



Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”

**“Analisi di markers biochimici in
Oncologia Sperimentale”**

Bruno Provenzano

IL TUMORE

**Massa di cellule che cresce in modo
incontrollato e sordoordinato**



TUMORI BENIGNI

**Sono costituiti da cellule che
mantengono in parte le loro
caratteristiche morfologiche e
funzionali**

**Hanno uno sviluppo di tipo
“espansivo”**

Non producono metastasi



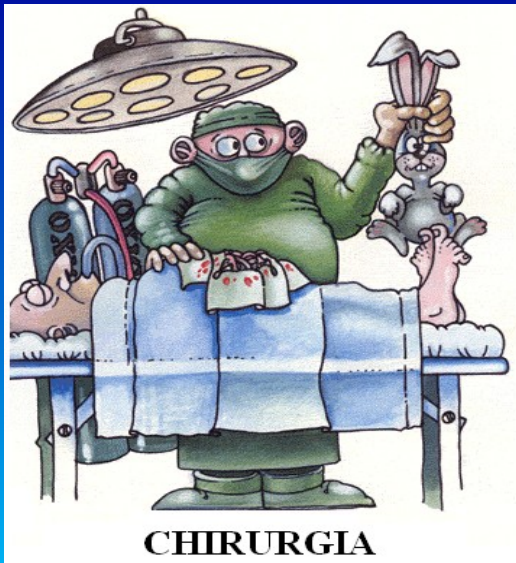
TUMORI MALIGNI

**Sono costituiti da cellule
morfologicamente
e funzionalmente diverse
dalle corrispondenti normali**

**Hanno uno sviluppo di tipo
“invasivo”**

Producono metastasi

APPROCCI TERAPEUTICI

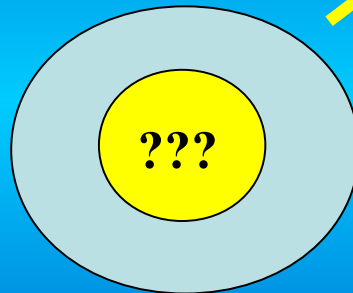
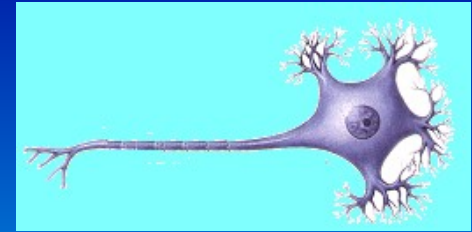


TERAPIA DIFFERENZIATIVA



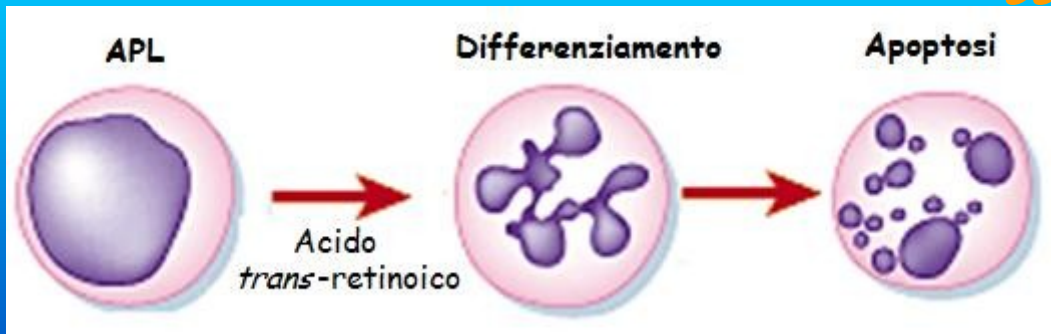
IL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

(DIS)ATTIVAZIONE DI GENI
DIVERSI IN
TEMPI E SPAZI
DIFFERENTI



TERAPIA DIFFERENZIAATIVA

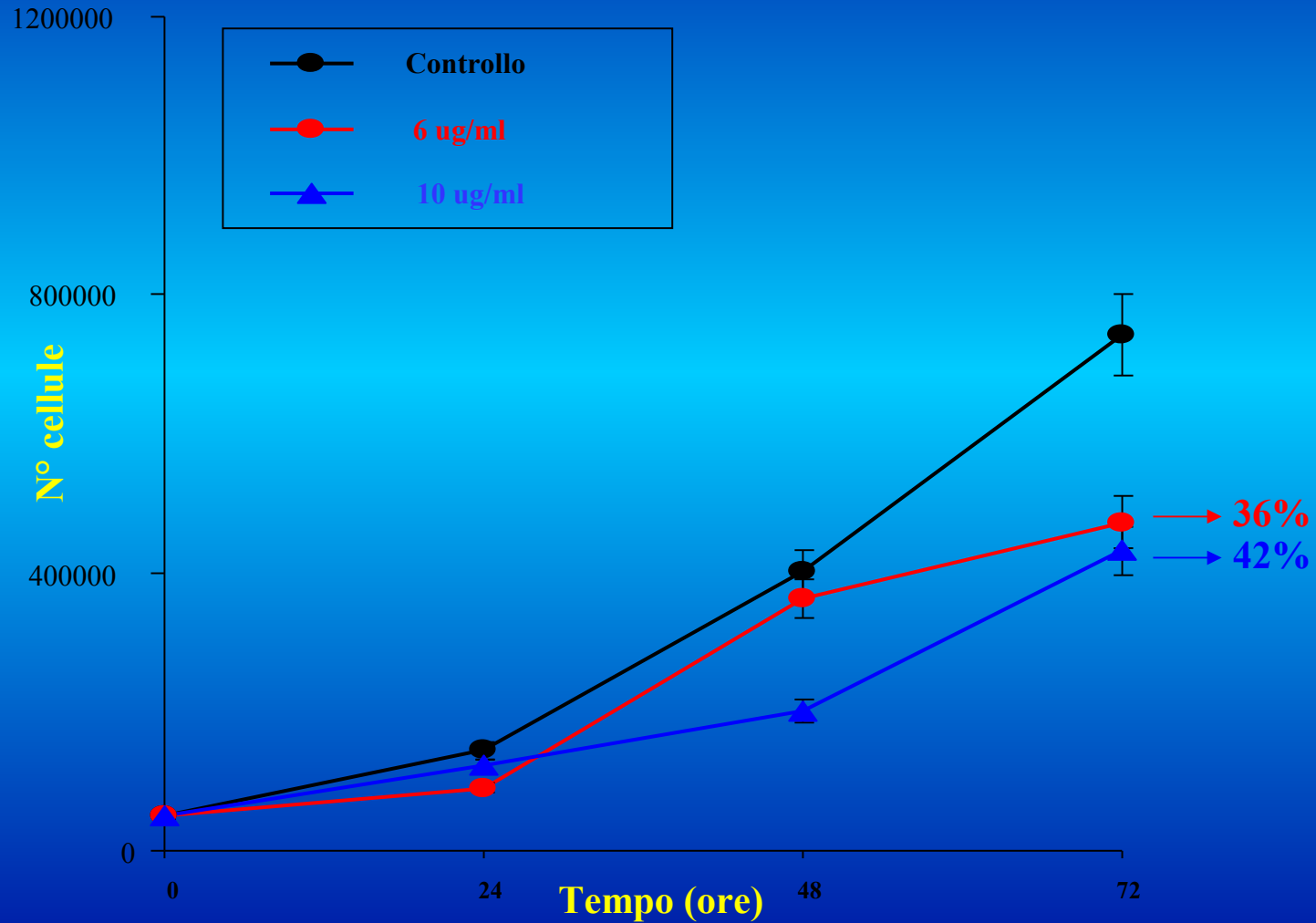
Il concetto di terapia differenziativa nasce dall'osservazione che alcune sostanze, sintetiche o naturali, con tossicità bassa possono ridurre la crescita di cellule tumorali inducendone il differenziamento.



*Terapia con acido
trans-retinoico in pazienti
affetti da leucemia
promielocitica acuta (APL)*

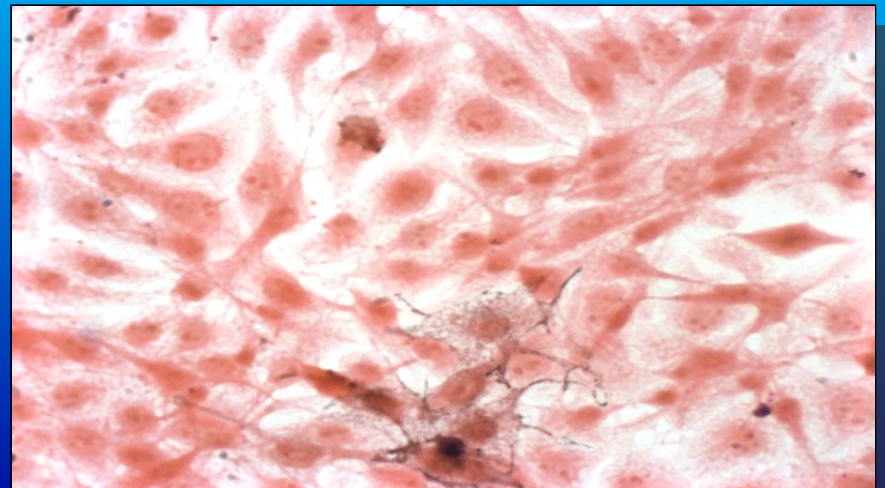
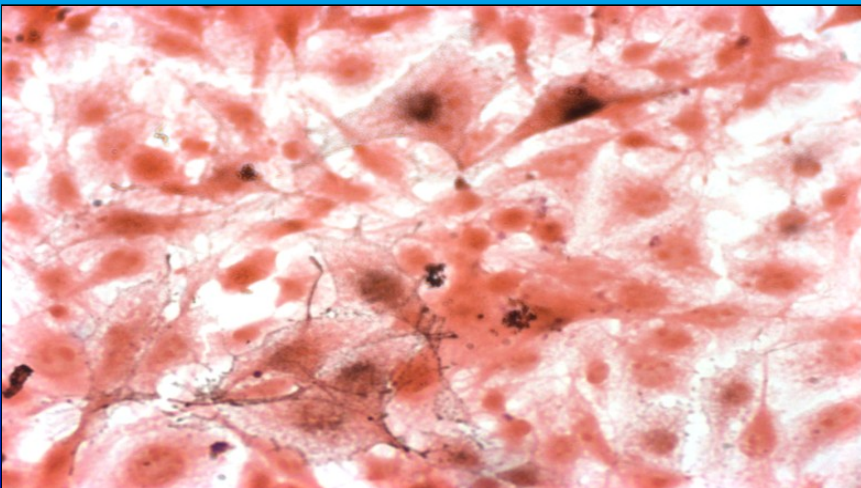
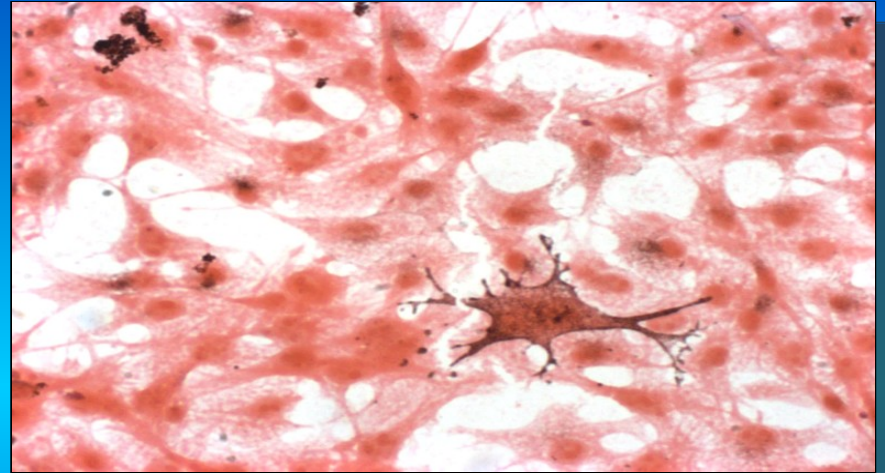
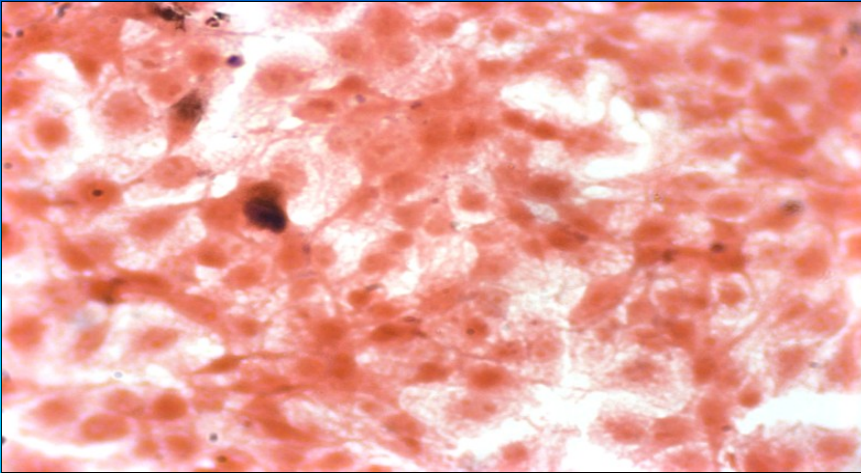
Thiele et al., Cell Death and Differentiation (2000)

Curva di proliferazione di cellule tumorali trattate con un agente differenziante



ANALISI MORFOLOGICA

COLORAZIONE *EMATOSSILINA-EOSINA*



LE TRANSGLUTAMINASI (TGasi)

- **Enzima chiave nell'induzione del processo di differenziamento**
- **L'attività della TGasi è alta nelle molecole differenziate, bassa in quelle indifferenziate (cellule tumorali)**

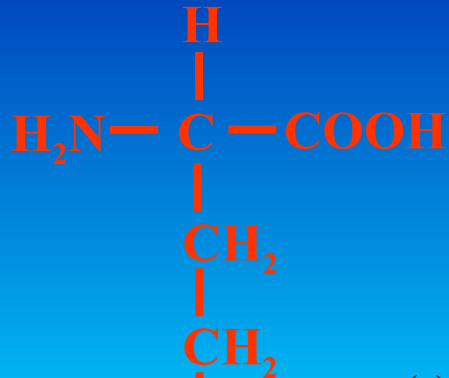
LE POLIAMMINE

- **Fattori di crescita endogeni**
- **I livelli di Poliammine sono alti nelle cellule con elevata proliferazione (cellule tumorali), bassi in quelle con scarsa proliferazione**

N.B. Le Poliammine sono substrato per la TGasi

REAZIONE DI TRANSAMMIDAZIONE

GLUTAMMINA

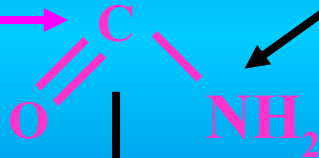


AZIONI DELLA TGASI

(a)

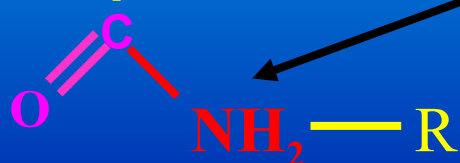
(b)

GRUPPO
ACILICO



AMMINA

GLU



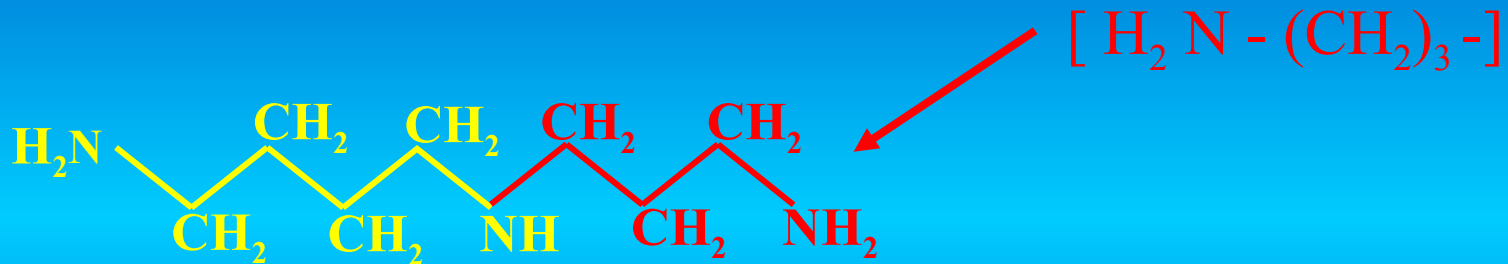
MODIFICAZIONE POST-TRADUZIONALE

LE POLIAMMINE



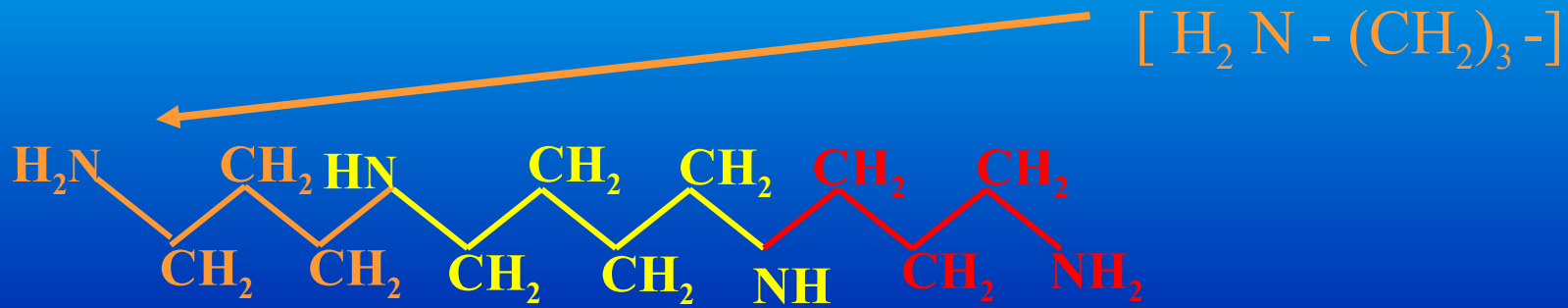
PUTRESCINA (PUT)

+ GRUPPO AMMINO PROPIONICO



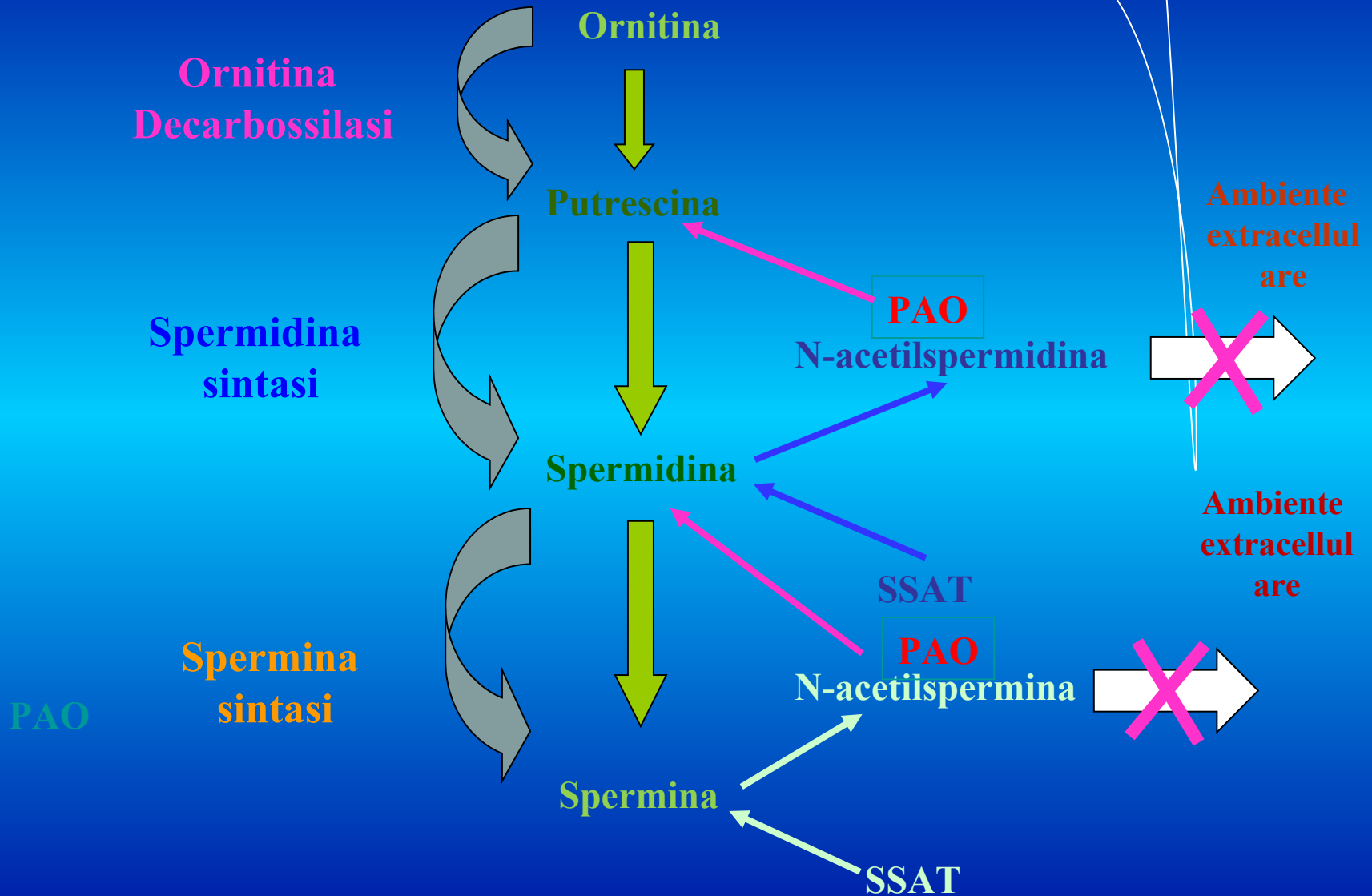
SPERMIDINA (SPD)

+ GRUPPO AMMINO PROPIONICO

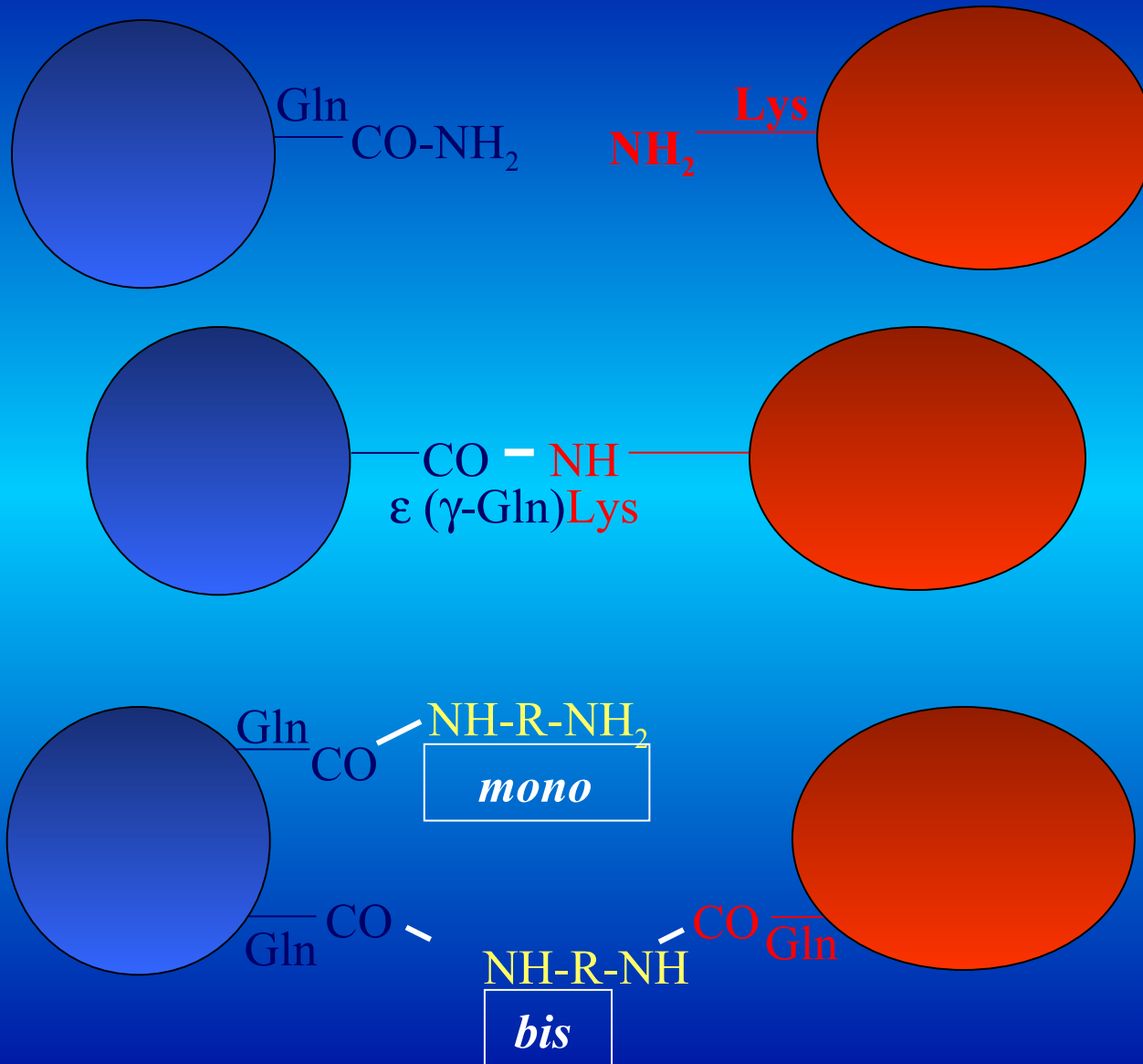


SPERMINA (SPM)

Metabolismo delle poliammine



Reazioni catalizzate dalla transglutaminasi



TGASI, POLIAMMINE E CANCRO

Int. J. Cancer: 53, 792–797 (1993)

© 1993 Wiley-Liss, Inc.



Publication of the International Union Against Cancer
Publication de l'Union Internationale Contre le Cancer

DIFFERENCES IN THE POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION OF PROTEINS BY POLYAMINES BETWEEN WEAKLY AND HIGHLY METASTATIC B16 MELANOMA CELLS

Simone BENINATI^{1,4}, Alberto ABBRUZZESE² and Massimo CARDINALI³

¹Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", Via E. Carnevale, 00173, Rome; ²Department of Biochemistry and Biophysics, University of Naples, Via Costantinopoli, 16, 80138, Naples, Italy; and ³Laboratory of Cellular Development and Oncology, NIDR, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA.

Da questi primi studi molti nuovi risultati sono stati ottenuti grazie a protocolli sperimentali costantemente aggiornati. L'ipotesi che la **TERAPIA DIFFERENZIATIVA**, possa entrare nel novero delle terapie antitumorali si fa **SEMPRE PIU' CONCRETO**. Questa terapia dovrebbe essere basata sullo **UTILIZZO DI NUOVE MOLECOLE**, con **BASSA CITOTOSSICITA'**, ma capaci di attivare la TGasi, con conseguente **EFFETTO ANTINEOPLASTICO**

N.B. Si rimanda inoltre alle dispense pubblicate online

**RICERCARE SOSTANZE POCO TOSSICHE, PREFERIBILMENTE DI
ORIGINI NATURALE, CAPACI DI INDURRE IL DIFFERENZIAMENTO
CELLULARE ATTRAVERSO L'ATTIVAZIONE DELLA TGasi**

**VALUTARNE L'EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO SU COLTURE
CELLULARI DI SVARIATE LINEE CELLULARI TUMORALI**

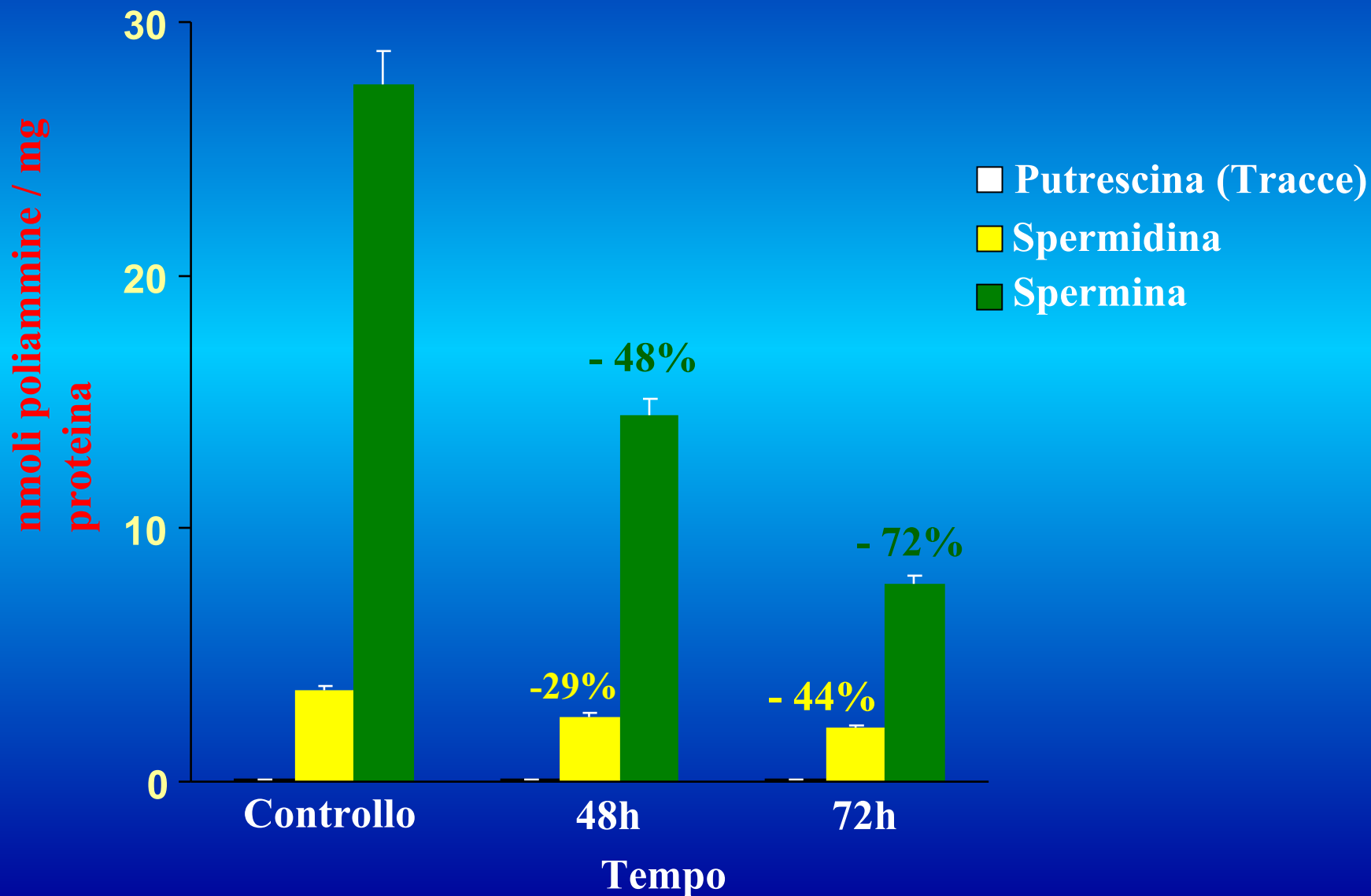
**APPLICARE IN VITRO PROTOCOLLI SPERIMENTALI CHE
CONFERMINO L'EFFETTO DIFFERENZIANTE,
ANTIPROLIFERATIVO E ANTIMETASTATICO**

**SOMMINISTRARE LE MOLECOLE CHE HANNO DATO I RISULTATI
PIU' PROMETTENTI AD ANIMALI IN MODO DA VALUTARNE
L'EFFICACIA ANCHE *IN VIVO***

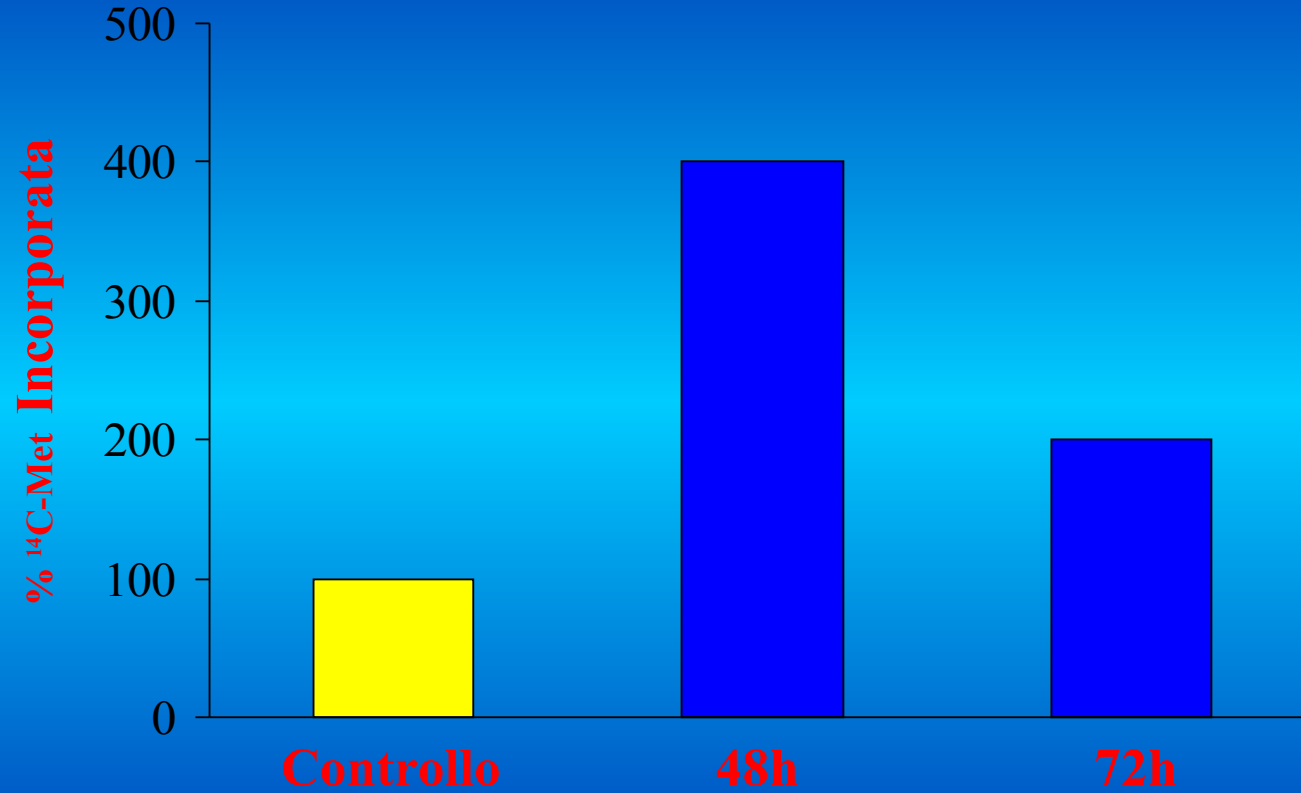
Protocolli sperimentali “*IN VITRO*”

- Studio della proliferazione cellulare
 - Analisi dei livelli di poliammine intracellulari → **Marker di proliferazione cellulare**
 - Studio del differenziamento cellulare mediante osservazione al microscopio
 - Analisi dell'attività della transglutaminasi
 - Analisi della concentrazione di melanina
 - Analisi dell'attività della tirosinasi
- } **markers di differenziamento cellulare**
- Studio delle capacità metastatiche
 - a) Saggio di adesione
 - b) Saggio di invasione
 - c) **Zimografia**

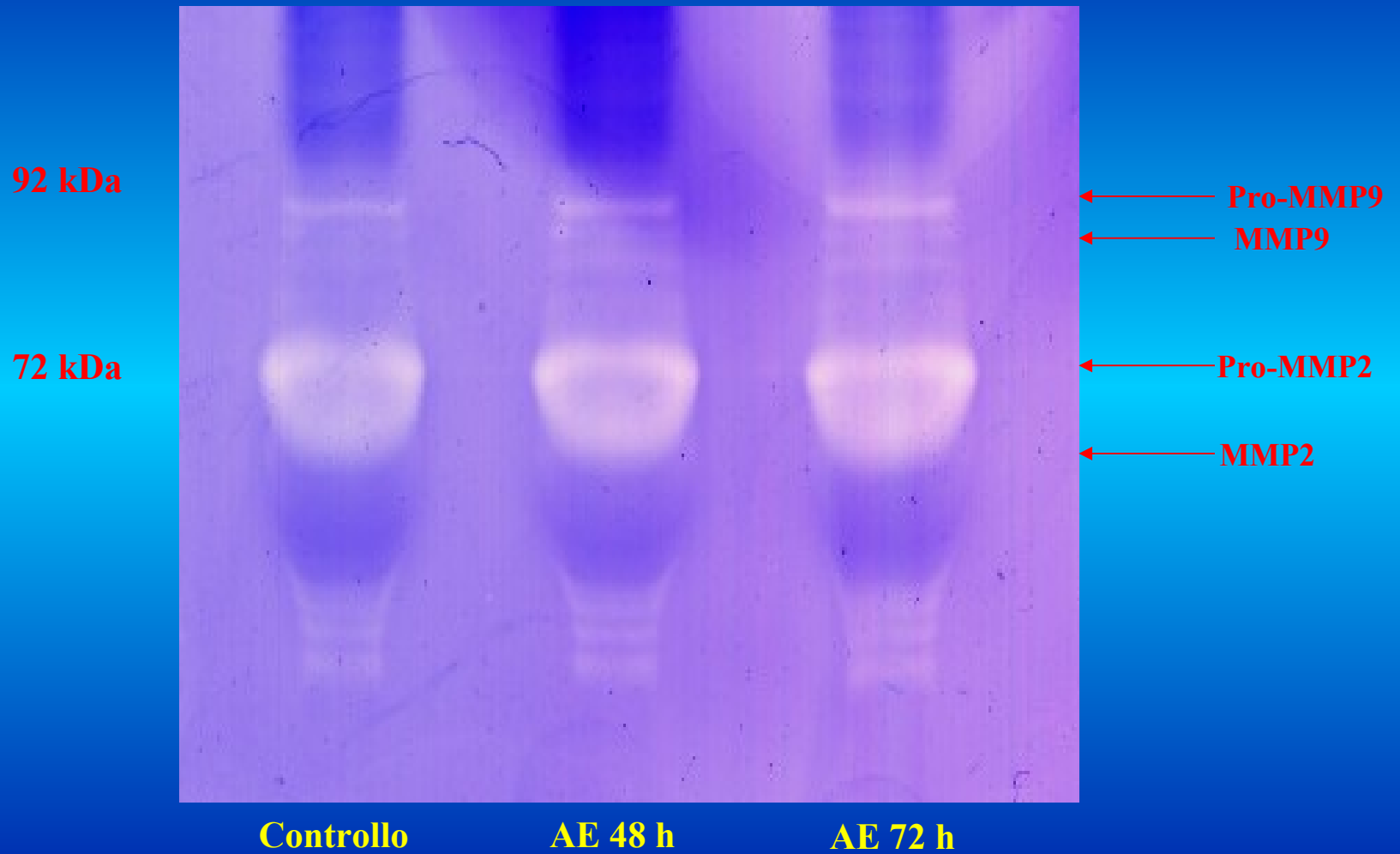
Analisi dei livelli di di livelli di Poliammine di cellule di Melanoma Murino B16-F10 trattate con QUERCITINA (10 μ M)



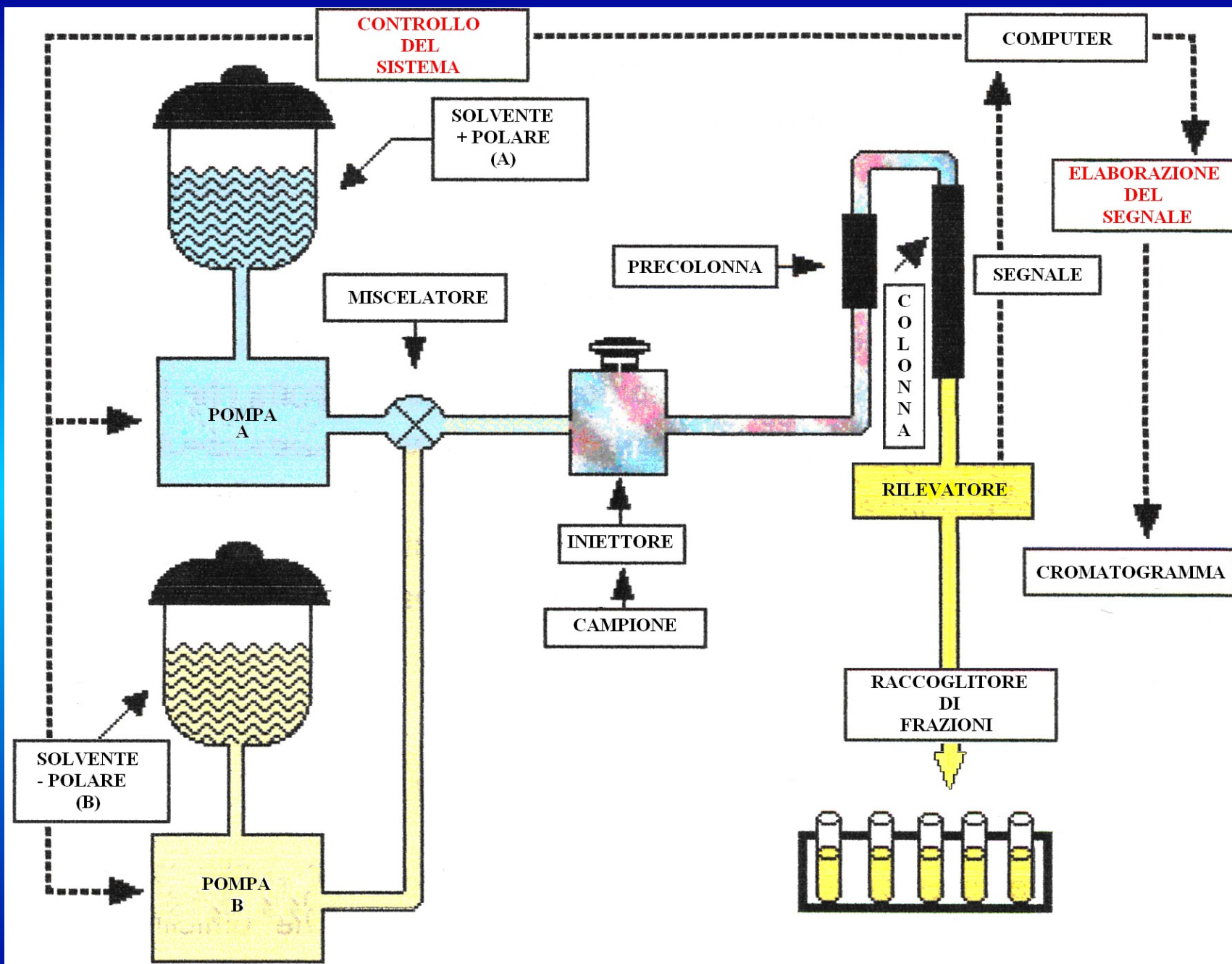
Dosaggio TGasi *in vivo* in cellule *B16-F10* trattate con QUERCITINA (10 μ M)



ANALISI ZIMOGRIFICA



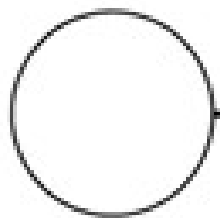




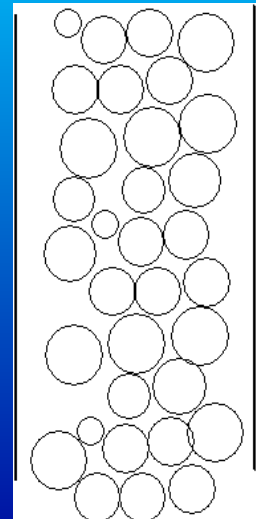
COLONNE CROMATOGRAFICHE REVERSE-PHASE



2-5 μm



RESINA C18



PRINCIPI DELLA CROMATOGRAFIA REVERSE -PHASE



Natura ionica ed alifatica

PARTE INIZIALE CORSA

FASE MOBILE
ALTAMENTE
POLARE (B<A)

MAGGIOR AFFINITA'
DELLE MOLECOLE
CON LA FASE
STAZIONARIA

MOLECOLE
TRATTENUTE IN
COLONNA +/-
INTENSAMENTE

PROSEGUO CORSA I

GRADUALE INVERSIONE NELLA POLARITA' DELLA FASE)

MOBILE (B ) (A )

PROSEGUO CORSA II - INVERSIONE DI FASE

FASE MOBILE
ALTAMENTE
APOLARE (B>A)

MAGGIOR AFFINITA'
DELLE
MOLECOLE CON LA
FASE MOBILE

MOLECOLE ELUITE
DALLA COLONNA IN
TEMPI DIVERSI

UNICORN 8.11 (26.04.2011)

Raw data file: C:_data\001_20110101_1.mn

mix 1 sample 1001_1_Conc mix 1 sample 1001_1_AD900

