

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI ANATOMIA E FISIOLOGIA UMANA – SEZIONE DI FISIOLOGIA



**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE,
CLINICHE E SPERIMENTALI
INDIRIZZO: NEUROSCIENZE
XXI CICLO**

**HERPES VIRUS BOVINO DI TIPO 4 COME VETTORE PER LA
TERAPIA GENICA DEI GLIOMI**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Carla Mucignat

Dottorando: Dott. Marco Redaelli

Matricola: 964733-DR

INDICE

SOMMARIO	Pag.5
ABSTRACT	Pag.6
CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE	Pag.7
1.1 PREMESSA	Pag.7
1.2 I GLIOMI	Pag.9
1.3 TERAPIA GENICA	Pag.12
1.4 TERAPIA GENICA E TUMORI CEREBRALI	Pag.15
1.5 CLASSIFICAZIONE DEGLI HERPESVIRUS	Pag.17
1.6 HERPESVIRUS BOVINO DI TIPO 4 (BoHV-4)	Pag.18
1.7 PROTEIN CHINASI AMPc-dipendenti	Pag.21
1.8 SCOPO DEL PRESENTE STUDIO	Pag.24
CAPITOLO 2 - MATERIALI E METODI	Pag.27
2.1 MATERIALI	Pag.27
2.2 COLTURE CELLULARI	Pag.28
2.3 INFEZIONE IN VITRO CON BoHV-4EGFPΔTK ED ANALISI DELLA CITOTOSSICITA'	Pag.30
2.4 INOCULO DI BoHV-4 IN VIVO	Pag.33
2.5 PERFUSIONE	Pag.34
2.6 INOCULO DI CELLULE TUMORALI	Pag.35
2.7 INOCULO DI BoHV-4 NELLA MASSA TUMORALE DI RATTO	Pag.36
2.8 PREPARAZIONE DI CELLULE F98-PKH26red	Pag.37
2.9 AVVIO DI UNA COLTURA PRIMARIA	Pag.38
2.10 COLTURE PRIMARIE DI TUMORE	Pag.38

2.11 ALTRE COLTURE PRIMARIE	Pag.40
2.12 IMMUNOISTOCHEMICA	Pag.42
2.13 WESTERN BLOT	Pag.44
2.14 SUPERARRAY	Pag.46
2.15 TRATTAMENTI CON MOLECOLE INTERFERENTI CON PROTEIN CHINASI AMPc-dipendenti	Pag.47
2.16 SILENZIAMENTO DELL'ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE SiRNA	Pag.49
2.17 INTEGRAZIONE DEI DATI GENETICI CON IL DATABASE REMBRANDT	Pag.50
2.18 ANALISI STATISTICHE ED ELABORAZIONE DEI DATI	Pag.51
CAPITOLO 3 - RISULTATI	Pag.53
3.1 STUDI PRELIMINARI IN VITRO	Pag.53
3.2 BoHV-4 IN VIVO: EFFETTI SUL SNC NORMALE	Pag.56
3.3 BoHV-4 IN VIVO: EFFETTI SUI GLIOMI SPERIMENTALI	Pag.59
3.4 BoHV-4 IN VITRO: COLTURE PRIMARIE DA BIOPSIA NEUROCHIRURGICA UMANA	Pag.67
3.5 SUPERARRAY SU CELLULE INFETTATE CON BoHV-4	Pag.72
3.6 DISTRIBUZIONE DELLE PROTEIN CHINASI AMPc-dipendenti NEI TUMORI CEREBRALI	Pag.74
3.7 PKA RII α : EFFETTI DELL'INTERFERENZA IN VITRO	Pag.78
3.8 PKA RII α : SiRNA	Pag.80
3.9 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENETICA DI PKA NEI TUMORI CEREBRALI	Pag.81
CAPITOLO 4 - DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	Pag.87
BIBLIOGRAFIA	Pag.93

APPENDICE - PRODUZIONE SCIENTIFICA DEL CANDIDATO	Pag.111
A.1 ARTICOLI PUBBLICATI SU RIVISTA	Pag.111
A.2 ARTICOLI SOTTOMESSI E IN FASE DI REVISIONE	Pag.111
A.3 BREVETTI	Pag.112
A.4 PARTECIPAZIONE A CONGRESSI	Pag.112
RINGRAZIAMENTI	Pag.115

SOMMARIO

L'ipotesi alla base di questo lavoro è che vi sia la possibilità di impiegare quale vettore virale per la terapia genica dei gliomi l'herpesvirus bovino di tipo 4 (BoHV-4) e di determinare se la via di trasduzione del segnale mediata dalle protein chinasi AMPc-dipendenti (PKA) possa essere utilizzata come bersaglio terapeutico. Infatti i gliomi sono ritenuti essere uno dei più importanti e stimolanti problemi irrisolti della medicina. Questo sia per la evidente complessità della sede anatomica di insorgenza, sia per il fatto che, nonostante gli enormi sforzi in cui gli scienziati di tutto il mondo si sono profusi non si è ancora riusciti a giungere alla messa a punto di un protocollo curativo realmente efficace.

Il progetto di ricerca su cui si è basato il presente studio è il risultato della convergenza di due linee di ricerca preesistenti presso le Università di Padova e di Parma.

I risultati conseguiti hanno dimostrato la capacità di BoHV-4 di infettare in vitro e in vivo cellule di glioma di ratto. Inoltre tale capacità è stata confermata in vitro sia su cellule immortalizzate di glioma umano che su colture primarie di tumore cerebrale umano.

Per quanto riguarda lo studio della relazione tra PKA e tumori cerebrali, è stato in primo luogo rilevata una distribuzione peculiare delle diverse subunità regolatorie delle medesime che è caratteristica delle cellule di glioma. Inoltre diversi esperimenti suggeriscono che la modulazione di tale via possa essere impiegata per il trattamento dei gliomi oltre che per fini diagnostici.

Tutti i risultati ottenuti suggeriscono di proseguire ed ampliare il progetto facendo convergere entrambe le sue linee costituenti in un modello da poter esportare nella pratica clinica nel minor tempo possibile.

ABSTRACT

Gliomas are considered among the most puzzling problems of medicine due to the complexity of their anatomic localization, and the lack of a real therapeutic treatment. The main topic of this work concerns the possibility to use bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) as a vector for gene therapy for the treatment of glioma, and that the cAMP-dependent protein kinases (PKA) pathway as a possible target for such therapy.

This study is based on a research project that involved both University of Padova and University of Parma.

Here BoHV-4 is shown to infect rat glioma cells *in vitro* and *in vivo*, in addition, BoHV-4 can infect human immortalized glioma cells *in vitro* and human brain tumour primary cell cultures.

The study of the relationship between gliomas and the PKA pathway shows a peculiar distribution of the PKA regulatory subunits in glioma cells in mouse, rat and human. The present data suggest that the PKA pathway modulation may be targeted for the treatment of gliomas.

The present Study paves the way to the use of a safe and efficient BoHV-4-based vector for the delivery of therapeutic genes or for the targeting of specific abnormal pathways, like the PKA-mediated one, for the treatment of the hopeless high-grade glioma.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 PREMESSA

I dati sull'incidenza e sulla mortalità in caso di diagnosi di tumore cerebrale mostrano che nel corso degli ultimi 20 anni di ricerca e progresso clinico nulla sia di fatto cambiato (Fig. 1.1 - Fonte: National Cancer Institute su popolazione bianca statunitense). Da un lato la mancanza di un effettivo calo dell'incidenza ci pone dinanzi al fatto che molto poco è stato compreso e messo in atto in ottica di prevenzione e riduzione dei fattori di rischio. Dall'altro il permanere della stessa percentuale di mortalità negli ultimi 20 anni è un indice di quanto ridotto sia l'impatto clinico delle scoperte scientifiche in questo campo.

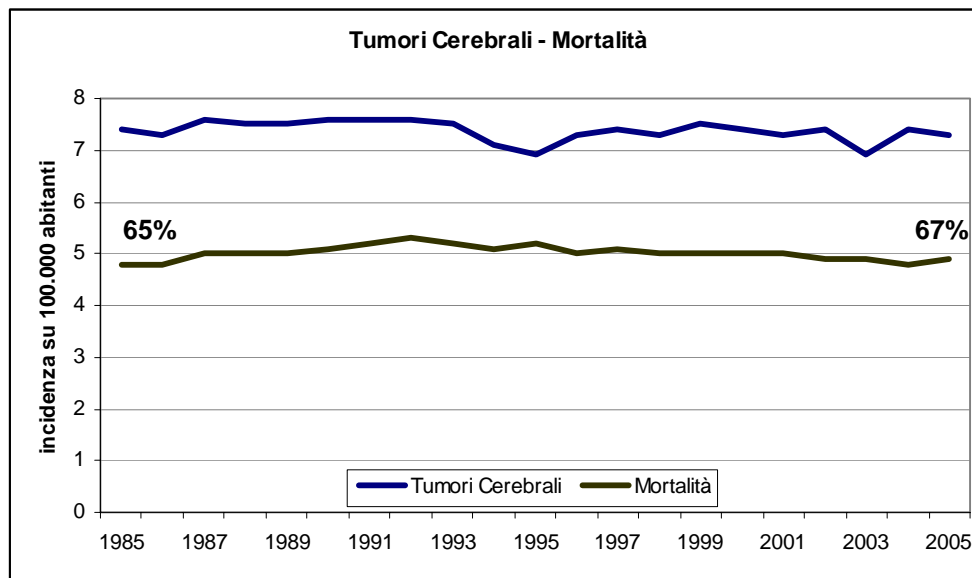


Figura 1.1 – Incidenza dei tumori cerebrali e relativa mortalità nella popolazione bianca statunitense (dati rielaborati dal database del National Cancer Institute – www.cancer.gov)

Quanto presentato assume una connotazione ancora più sinistra se paragonato con i dati che si riferiscono ai tumori del seno (Fig. 1.2) e del colon-retto (Fig. 1.3), dove si può osservare nel primo caso una consistente diminuzione della mortalità, a segnale di un miglioramento dell'efficacia terapeutica sia durante il trattamento diretto che nel post-trattamento.

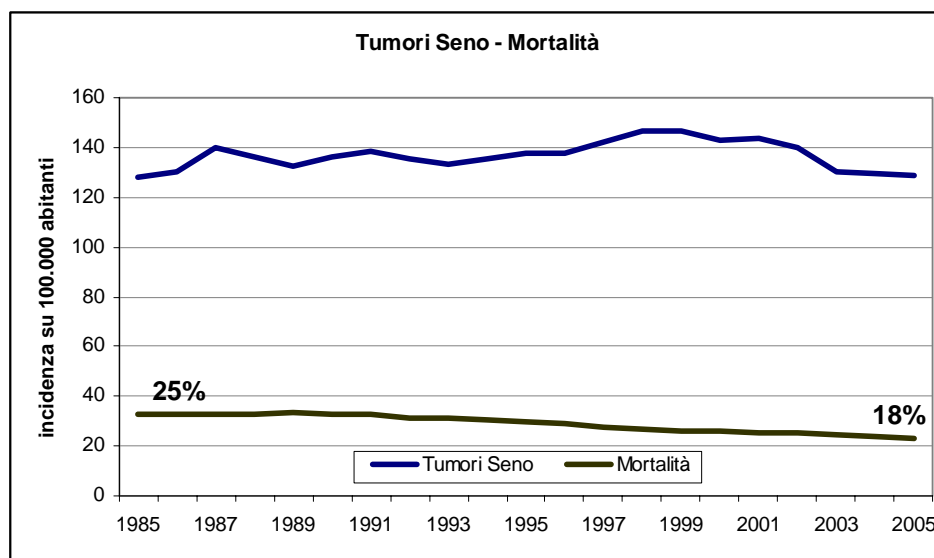


Figura 1.2 – Incidenza dei tumori del seno e relativa mortalità nella popolazione bianca statunitense (dati rielaborati dal database del National Cancer Institute – www.cancer.gov)

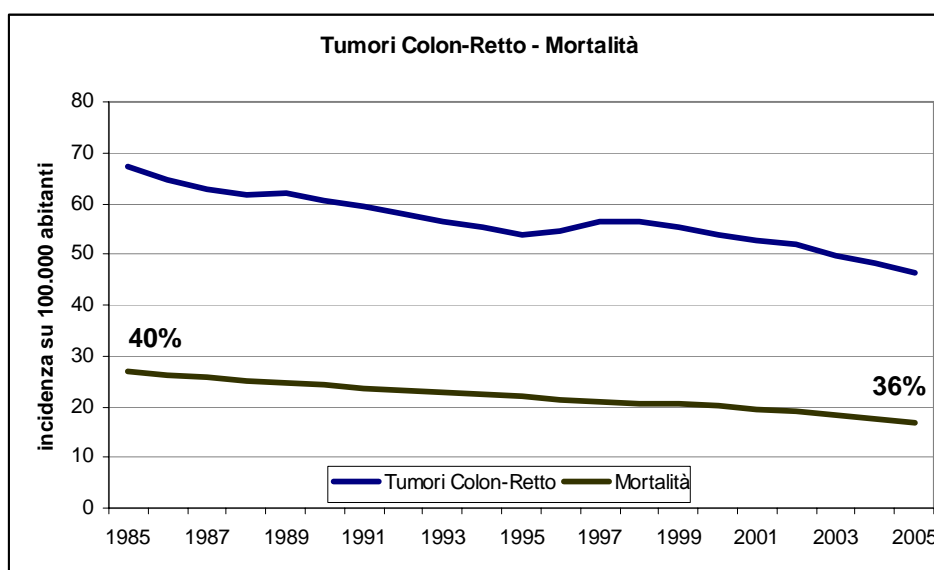


Figura 1.3 – Incidenza dei tumori del colon-retto e relativa mortalità nella popolazione bianca statunitense (dati rielaborati dal database del National Cancer Institute – www.cancer.gov)

Nel secondo caso la riduzione, oltre che della mortalità, anche dell'incidenza, è indice di una migliore applicazione dei protocolli preventivi, ma anche di una più profonda comprensione dei fattori di rischio.

Con quanto messo in evidenza non si vuole puntare il dito contro coloro i quali si occupano di ricerca neuro-oncologica, ma piuttosto, si vuole sottolineare come la neuro-oncologia moderna sia ancora in attesa di risposte più convincenti per poter iniziare a gestire una così complessa questione. Va tuttavia sottolineato che le risorse investite in ambito di ricerca neuro-oncologica sono mediamente del 40% inferiori rispetto a quanto si investe nella ricerca scientifica sui tumori del colon-retto (Fonte: National Cancer Institute). Ciò naturalmente impone delle scelte che in molti casi possono rallentare, se non addirittura sopprimere, ricerche che, con un maggiore investimento di risorse avrebbero potuto portare risultati significativi.

1.2 I GLIOMI

I gliomi rappresentano, tra le differenti classi di tumori cerebrali, quella più diffusa con il 67% della totalità dei tumori cerebrali (Larjavaara et al. 2007) e con il più alto tasso di mortalità (90% a 2 anni dalla diagnosi). Tra le neoplasie gliali il Glioblastoma Multiforme rappresenta il tumore con il più elevato livello di malignità, l'incidenza di questa patologia nei paesi dell'area europea e del Nord America risulta essere di 2,6 nuovi casi all'anno ogni 100'000 abitanti (Lantos et al. 1996). In Italia ogni anno si presentano 7000 nuovi casi di glioma di cui circa il 30% ad insorgenza pediatrica con una media di sopravvivenza di 13 mesi dal momento della diagnosi (Fonte: Ministero della Sanità 2006). La corrente nomenclatura è stata standardizzata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità WHO-2000 e successivamente confermata nell'edizione WHO-2007 (Tabella 1.1 - Kleihues et al. 2000).

Grado	Definizione
Grado 1	Astrocitoma Pilocitico
Grado 2	Astrocitoma a basso grado o diffuso
Grado 3	Astrocitoma maligno
Grado 4	Glioblastoma Multiforme

Tabella 1.1 – WHO-2007 nomenclatura dei tumori cerebrali astrogliali

I gliomi sono caratterizzati da un processo di crescita multifattoriale che, attraverso una sovraespressione di fattori di crescita e alterati processi di traduzione dei segnali endogeni, porta ad un'anomala proliferazione (Hulleman et al. 2005). Il glioblastoma multiforme consiste in formazioni composte da una massa eterogenea di cellule tumorali di natura astrogliale scarsamente differenziate che colpiscono con prevalenza gli emisferi cerebrali (Figura 1.4). Si ipotizza che durante il processo di costituzione, ma anche nel corso del mantenimento dell'architettura del sistema nervoso centrale si inneschino, probabilmente in alcune cellule staminali del sistema nervoso (Vescovi et al. 2006), mutazioni che portano alla disregolazione del ciclo cellulare e l'aumento dei segnali anti-apoptotici con la conseguente induzione proliferativa neoplastica (Anella et al. 2005).

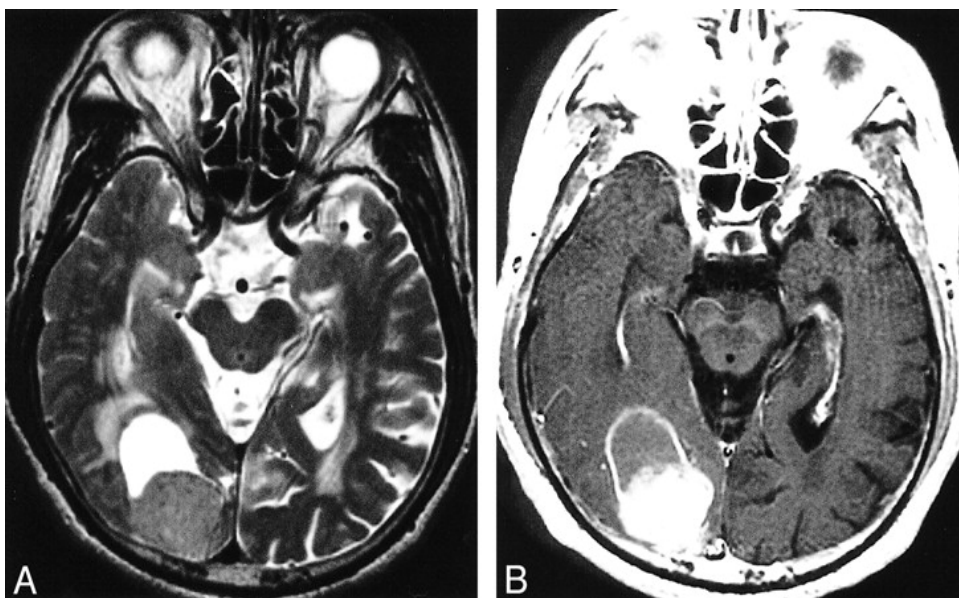


Figura 1.4 – Risonanza magnetica di glioma ad alto grado di prima insorgenza (A – senza contrasto, B – con contrasto; modificato da www.misradiologycenter.net).

Le cosiddette *Brain Tumor Stem Cells*, cellule tumorali con caratteristiche tipiche delle cellule staminali, sono ritenute essere il motore del tumore e soprattutto essere responsabili dell'alto tasso di recidivazione che queste neoplasie comportano (Ignatova et al. 2002; Singh et al. 2003; Galli et al. 2004). Secondo quanto noto sino ad ora, queste cellule staminali tumorali danno continuamente origine sia a nuove cellule tumorali sia a nuove cellule staminali neoplastiche responsabili a loro volta della proliferazione tumorale. Le cellule staminali neoplastiche inoltre risultano essere molto più resistenti al trattamento sia radioterapico che chemioterapico, rispetto alle cellule tumorali propriamente dette, in quanto dispongono di vie metaboliche per la riparazione rapida del DNA e si possono trovare anche in una sede differente rispetto a quella della massa tumorale primaria (Bao et al. 2006; Rich 2007; Liu et al. 2006; Salmaggi et al. 2006; Murat et al. 2008).

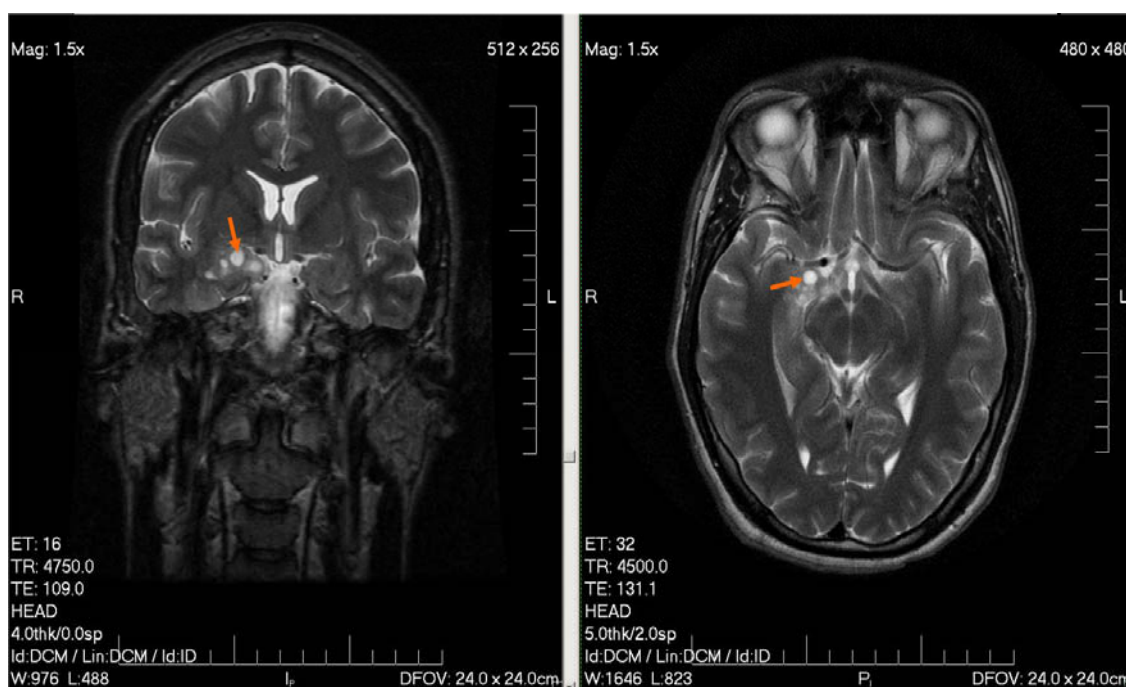


Figura 1.5 – Risonanza magnetica di glioma a basso grado di prima insorgenza (si veda la freccia rossa in piano coronale a sinistra e orizzontale a destra; modificato da www.en.wikipedia.org).

È importante evidenziare come l'attuale approccio terapeutico sia sostanzialmente costituito da due fasi. La prima fase è di natura chirurgica: ove possibile la massa

viene asportata o ridotta per limitare le sintomatologie ed i possibili danni dovuti all'aumento della pressione intracranica. Tale approccio ha, nel corso degli anni, subito un'evoluzione legata da un lato all'avanzamento qualitativo delle tecniche, dall'altro all'introduzione di supporti tecnologici di nuova generazione (Akard et al. 2008; Serrano et al. 2008; Kassam et al. 2008; Charalampaki et al. 2008; Berger e Hadjipanayis 2007). La seconda fase, successiva all'intervento chirurgico, prevede l'impiego, anche combinato, di molecole chemioterapiche e radioterapia. Tuttavia l'approccio alla neoplasia è diretto al trattamento palliativo e non ancora curativo, in quanto gli strumenti farmacologici disponibili non sono ancora sufficientemente efficaci.

Attualmente, il protocollo clinico approvato dalla FDA (Food and Drug Administration, USA) consiste, in seguito ad intervento chirurgico, nel trattamento chemioterapico con temozolomide associato a radioterapia. Il Temodal™ infatti è risultato essere il farmaco che fornisce i migliori risultati in termini di sopravvivenza, aumentandola fino a 24 mesi nel 26% dei casi se somministrato durante e successivamente alla radioterapia (Stupp et al. 2005).

Alla luce di queste considerazioni appare chiaro come nel panorama odierno sia opportuno ottimizzare le risorse per cercare di fornire una risposta terapeutica efficace a questo tipo di patologie. Risposta terapeutica che può trovare la sua espressione non solo nell'implementazione dell'approccio farmacologico, ma anche nell'impiego di supporti biotecnologici quali possono essere i vettori virali ed il silenziamento genico (Hutterer et al. 2006).

1.3 TERAPIA GENICA

Il concetto di terapia genica nasce negli anni '80 con la moderna biologia molecolare. Con questo tipo di approccio si intende il trasferimento di materiale genetico attivo all'interno di una cellula o più cellule somatiche al fine di integrare

o correggere processi di natura patologica eziologicamente correlati ad alterazioni genetiche acquisite o ereditate.

La terapia genica è stata utilizzata legalmente su un soggetto umano per la prima volta nel 1990 presso i National Institutes of Health (USA) dove i globuli bianchi di una bambina affetta da grave immunodeficienza complessa (SCID) sono stati trattati inserendo il materiale genetico mancante (Blaese et al. 1993). Il trattamento ebbe successo e nonostante esso debba essere periodicamente ripetuto la bambina oggi conduce una vita prossima alla normalità. È stato quindi ipotizzato che un tale approccio potesse essere una convincente risposta per il trattamento dei tumori (Rosenberg et al. 1993) e nel corso degli anni a venire molti sono stati i risultati promettenti su questo fronte, ma, per molti motivi, le ottime premesse non sono state tradotte in applicazioni cliniche dalla possibile ampia diffusione.

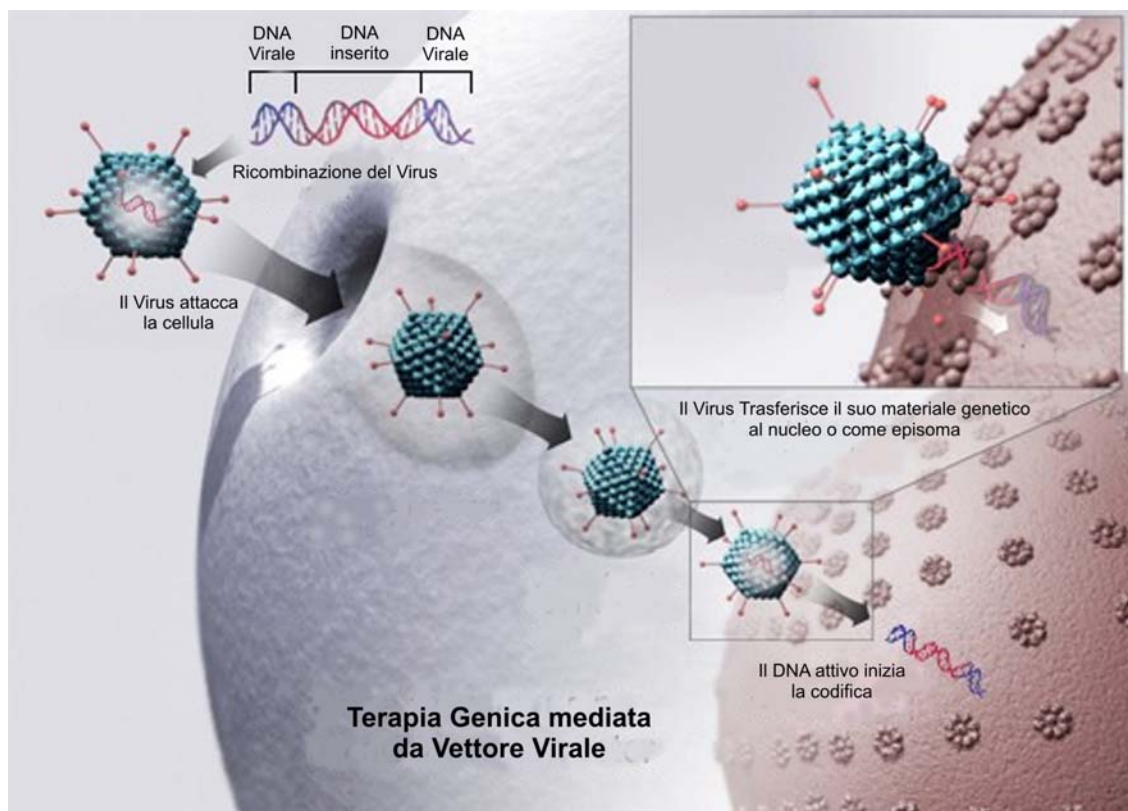


Figura 1.6 – Schema di Terapia Genica mediata da vettore virale
(modificata da U.S. National Library of Medicine)

Il concetto di terapia genica tuttavia risulta ancor oggi essere molto promettente, soprattutto in funzione dei notevoli progressi tecnici degli ultimi anni, che hanno permesso di dimostrare la possibilità di veicolare materiale genetico all'interno delle cellule con metodi sia di tipo fisico che biologico.

Tra i metodi fisici possiamo annoverare l'elettroporazione, applicabile prevalentemente nelle metodiche ex vivo, la microiniezione, anche questa utilizzata perlopiù nella manipolazione degli embrioni per la creazione di animali transgenici e infine l'utilizzo di liposomi, microsfele lipidiche contenenti i geni terapeutici, tecnica quest'ultima che presenta scarsa selettività e bassa efficienza di trasfezione. Le tecniche biologiche, diversamente, si basano sulla capacità dei virus di agire come vettori per il trasferimento del loro materiale genetico all'interno delle cellule soggette all'infezione (figura 1.6).

Il materiale genetico trasferito viene, a seconda delle caratteristiche del vettore, integrato nel DNA cromosomico oppure può permanere come materiale extracromosomico detto episoma (Bleiziffer et al. 2007). Naturalmente l'integrazione cromosomica offre indubbi vantaggi in termini di efficacia e stabilità dell'espressione genica, che viene mantenuta durante la replicazione e quindi anche nelle generazioni successive. L'espressione episomiale, di contro, mantenendo il gene esogeno al DNA cromosomiale, risulta essere meno efficace a lungo termine soprattutto a causa del mancato bilanciamento della segregazione durante la mitosi (Strachan 2001). Tuttavia è bene considerare come un approccio episomiale, che risulta essere certamente penalizzante per il trattamento di deficit ereditari, può essere una soluzione meno invasiva e quindi più sicura in ottica di terapia tumorale. Questo perché l'integrazione di DNA esogeno nel genoma di una cellula può dare origine ad una vasta gamma di problemi che possono andare dall'inserzione in una zona eterocromatinica che non consente l'espressione del nuovo gene oppure dall'inserzione in una zona che causa l'inattivazione di un gene oncosoppressore (Verma et al. 1997). La risoluzione di tali svantaggi rappresenta una delle più interessanti sfide per la biologia molecolare moderna che punta allo sviluppo di vettori virali sicuri.

Alla luce di quanto presentato risulta evidente come un vettore virale, in grado di colpire selettivamente le cellule tumorali trasferendo in esse materiale genetico episomiale, sia particolarmente adatto per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per la terapia dei gliomi.

1.4 TERAPIA GENICA E TUMORI CEREBRALI

A differenza degli altri tipi di tumore, i gliomi possiedono delle caratteristiche che li rendono bersaglio ideale per la terapia genica. Infatti, la sede anatomica circoscritta e la scarsa tendenza a metastatizzare consentirebbero di impiegare l'eventuale vettore virale direttamente nella sede della neoplasia, con un ridotto rischio di patogenicità sistemica (Immonen et al. 2004).

Allo stato attuale sono stati condotti numerosi studi che hanno impiegato come vettori sia adenovirus che retrovirus. Questi ultimi hanno inizialmente fornito risultati incoraggianti per quanto concerne la possibilità di impiego nel trasporto di geni suicidi, tuttavia gli studi in vivo hanno evidenziato una bassa efficienza di infezione che risulta essere condizione eccessivamente penalizzante (Vile e Russel 1995, Rainov e Ren 2003). Di contro, gli adenovirus si sono dimostrati molto più efficienti nell'imporre la trasduzione sia in cellule quiescenti che in cellule in divisione anche nelle forme in cui vengono delete le aree di materiale genetico necessario alla replicazione virale. Tali vettori si sono dimostrati molto efficaci in diversi trials clinici (Kay et al. 2001, Danthinne e Imperiale 2000), inoltre, grazie ai molti approcci di ingegnerizzazione sperimentati, è stato possibile indurre selettività per diversi tipi cellulari aumentando il livello di sicurezza per l'eventuale applicabilità clinica (Alemany et al. 2000, Kanerva e Hemminki 2004).

Il panorama per quanto riguarda la terapia genica dei gliomi si profila comunque molto variegato infatti esistono numerosi studi che, a seguito di buoni risultati preclinici, hanno proposto approcci che coinvolgono altri tipi di vettori, derivati ad esempio da: virus adeno-associati (Mizuno et al. 1998), reovirus (Wilcox et al. 2001), poliovirus (Jackson et al. 2001) e lentivirus (Stein e Davidson 2002).

Tra le molte strategie proposte per l'impiego dei vettori vi è l'espressione del gene per la Timidina Chinasi di Herpes Simplex 1 (HSV-1-tk) seguito dalla somministrazione di Ganciclovir (GCV), in modo da sfruttare la specificità del trattamento antivirale (Schipper et al. 2007, Nanda et al. 2001, Moolten 1994, Kun et al. 1995). Tale approccio di fatto ha aperto la strada all'impiego di vettori erpetici, su tutti quelli derivati da HSV-1 (Varghese e Rabkin 2002). I vantaggi che i vettori derivati da HSV-1 possono offrire sono molteplici (Kirn et al. 2001): (a) HSV-1 è in primo luogo in grado di infettare una vasta gamma di tipi cellulari e di indurvi effetto citopatico; (b) il genoma di HSV-1 è noto (152 kb) e molte delle sue aree non essenziali possono essere sostituite con geni terapeutici (30 kb) (Roizman 1996); (c) esistono numerosi farmaci antierpetici con ampia documentazione clinica che possono essere impiegati in accoppiata al vettore (Balfour 1999); (d) il materiale genetico virale rimane a livello episomiale senza integrazione con il genoma della cellula ospite, anche durante la fase di latenza, escludendo il rischio di mutazione inserzionale (Mellerick e Fraser 1987). Gli studi in vitro con i vettori derivati da HSV-1 si sono dimostrati molto promettenti tanto da portare alcuni di questi progetti in fase clinica (Palù et al. 1999, Pulkkanen e Yla-Herttuala 2005). Nello specifico hanno fornito dati interessanti due studi clinici pilota condotti con l'impiego di mutanti di HSV-1 rispettivamente su 21 pazienti con il virus mutato G207 (Markert et al. 2000) e su 9 pazienti con il virus mutato 1716 (Rampling et al. 2000) che però non hanno tuttavia portato ad un incremento della sopravvivenza. Tuttavia l'impiego del mutante 1716 è stato rivalutato a seguito dei dati ottenuti in un secondo trial clinico condotto su 12 pazienti la cui mediana di sopravvivenza è passata da 9 a 11 mesi (Harrow et al. 2004). È facile intuire come risultati molto promettenti in laboratorio possono tradursi in indicazioni dalla difficile interpretazione durante l'approccio clinico. È per questo che nell'interesse del buon esito di una sperimentazione clinica gli sforzi in laboratorio devono convergere verso vettori sicuri che presentino selettività per le cellule tumorali.

1.5 CLASSIFICAZIONE DEGLI HERPESVIRUS

Gli Herpesvirus fanno parte della famiglia degli Herpesviridae, essi comprendono virus a DNA in grado di provocare importanti patologie nella specie ospite, ma anche di instaurare infezioni stabili senza manifestazione patologica. Essi sono caratterizzati da un involucro tondeggiate lipoproteico (envelope) e da un capsidico icosaedrico (nucleocapside), all'interno del quale è ospitato un genoma di 150 – 235 Kbp, tra envelope e nucleocapside si interpone uno strato di proteine virali specifiche che costituiscono il tegumento (Gaskell e Willoughby 1999, Subak-Sharpe e Dargan 1998, Inoue et al. 1993- Fig 1.7).

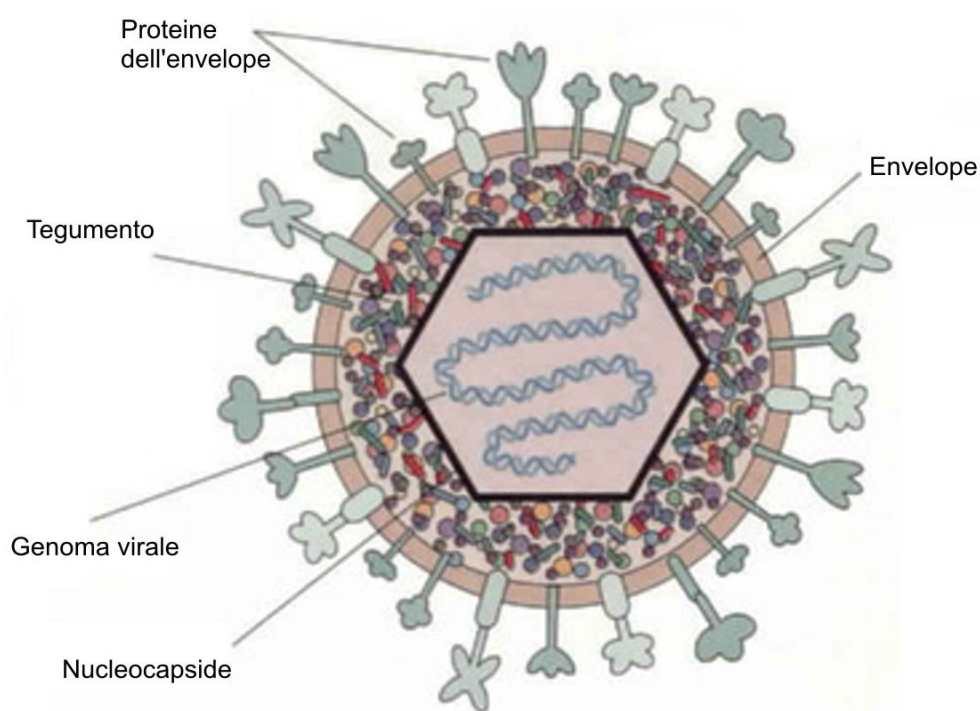


Figura 1.7 – Schema della struttura di HSV
(modificato da www.bact.wisc.edu)

Caratteristica tipica degli Herpesvirus è la capacità di rimanere in alcune cellule dell'ospite in stato quiescente (denominato latenza) dopo la fase acuta dell'infezione. Lo stato latente è caratterizzato dalla mancata produzione di nuovi virioni, si tratta tuttavia di uno stato reversibile e periodicamente si assiste al

manifestarsi a livello sistemico di episodi acuti (Bloom 2004).

In base alle caratteristiche dello spettro d'ospite ed alla rapidità nell'instaurare lo stato infettivo è possibile categorizzare questi virus in tre sottoclassi denominate Alphaherpesvirus, Betaherpesvirus e Gammaherpesvirus.

Gli Alphaherpesvirus sono la classe con lo spettro di ospiti possibili più ampio e producono in genere effetto citopatico rapidamente quando non entrano in fase di latenza. Tra gli Alphaherpesvirus si annoverano gli Herpes Simplex 1 e 2 umani (HSV-1, HSV-2) ed il virus varicella-zoster, HHV-3 (Thiry et al. 2005).

I Betaherpesvirus hanno un ristretto spettro d'ospite e tendono alla specie-specificità. Sono caratterizzati da un ciclo di replicazione di gran lunga più lento rispetto agli Alphaherpesvirus e molto legato al tipo cellulare infettato. Tra i Betaherpesvirus si annoverano il Citomegalovirus umano (CMV, HHV-5), in grado di infettare monociti e i roseolovirus (HHV-6, HHV-7) (Landolfo et al. 2003).

I Gammaherpesvirus hanno lo spettro d'ospite più ristretto tra gli erpetici e tendono a replicarsi quasi esclusivamente nei linfonodi. Questa classe comprende tra gli altri Epstein-Barr virus (EBV) e Herpesvirus Saimiri (HVS) (Ackermann 2006).

1.6 HERPESVIRUS BOVINO DI TIPO 4 (BoHV-4)

Tra i Gammaherpesvirus è possibile annoverare l'herpesvirus bovino di tipo 4 (BoHV-4) che, benché inizialmente categorizzato come beta-herpesvirus, è stato dimostrato essere molto più affine alla famiglia dei gamma. BoHV-4 è un parassita endocellulare obbligato dotato di un genoma virale costituito da DNA a doppio filamento racchiuso nel nucleocapside icosaedrico. Il virus si riproduce dunque solo in cellule ospiti dalle cui membrane citoplasmatiche, per gemmazione, ricava l'envelope che lo caratterizza (Donofrio et al. 2002).

BoHV-4 infetta le cellule mediante fusione o endocitosi sfruttando nel primo caso l'interazione tra proteina virale presente sull'envelope e il recettore cellulare la cui modificazione porta alla fusione delle membrane dell'envelope e della cellula

ospite; mentre nel caso di infezione per fusione dell'envelope con la vescicola endocitaria, essa libererà poi il materiale virale all'interno della cellula per acidificazione del pH (Smith e Helenius 2004).

Il genoma virale di BoHV-4 consta di 114 kb con una regione centrale di 110 kb caratterizzata da un basso contenuto di G-C, fiancheggiata da aree di DNA poliripetitivo con alto contenuti di G-C ripetute in tandem (Zimmermann et al. 2001).

BoHV-4 è in grado di stabilire infezioni persistenti sia nel suo ospite naturale, il bovino, che in quello sperimentale, il coniglio (Naeem et al. 1993; Osorio et al. 1982). Come per gli altri herpesvirus, BoHV-4 ha un effetto citopatico (pro-apoptotico o pro-necrotico) e si replica in colture primarie ed immortalizzate di diversi tessuti bovini e di altre specie animali. Il suo ruolo patogenico però non è ancora stato del tutto chiarito (Donofrio et al. 2007).

Il virus è stato isolato in diversi campioni di tessuto provenienti da animali sani o affetti da infezioni dell'apparato respiratorio, delle mucose, dell'apparato gastro-intestinale e da materiale abortivo. Lo studio in vivo ha comportato la titolazione dei leucociti nel sangue periferico o in organi infettati sperimentalmente (Donofrio et al. 2005). Tuttavia allo stato attuale non è ancora stata stabilita una relazione causa-effetto tra la presenza dell'infezione da BoHV-4 e le patologie in atto (Egyed et al. 1997).

La patogenesi di BoHV-4 è stata studiata, oltre che nei ruminanti, anche in gatti, conigli, leoni e cavie o porcellini d'india, mediante l'inoculo attraverso varie vie: congiuntivale, intranasale e peritoneale. L'effetto citopatico si riscontra prevalentemente a livello del sistema respiratorio (Egyed et al. 1998).

È stato dimostrato come il virus infetti e si replichi più facilmente in cellule in divisione e in animali giovani dal sistema immunitario immaturo. È stato inoltre dimostrata la persistenza dell'infezione a livello delle cellule linfonodali, osservata mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali, che costituiscono una abbondante e continua riserva di virus, e potrebbe interferire con le risposte immunitarie (Egyed et al. 1997).

BoHV-4EGFP Δ TK è il virus impiegato nel presente studio, si tratta di un vettore ingegnerizzato ottenuto per ricombinazione omologa tra BoHV-4 wild type e il plasmide pINT2EGFPTK, che contiene il gene reporter per la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) associato al promotore dei geni del citomegalovirus umano e inserito nel locus del gene della timidina chinasi (TK) che viene deletato di 94 Kb (Donofrio et al. 2002 – Fig 1.8).

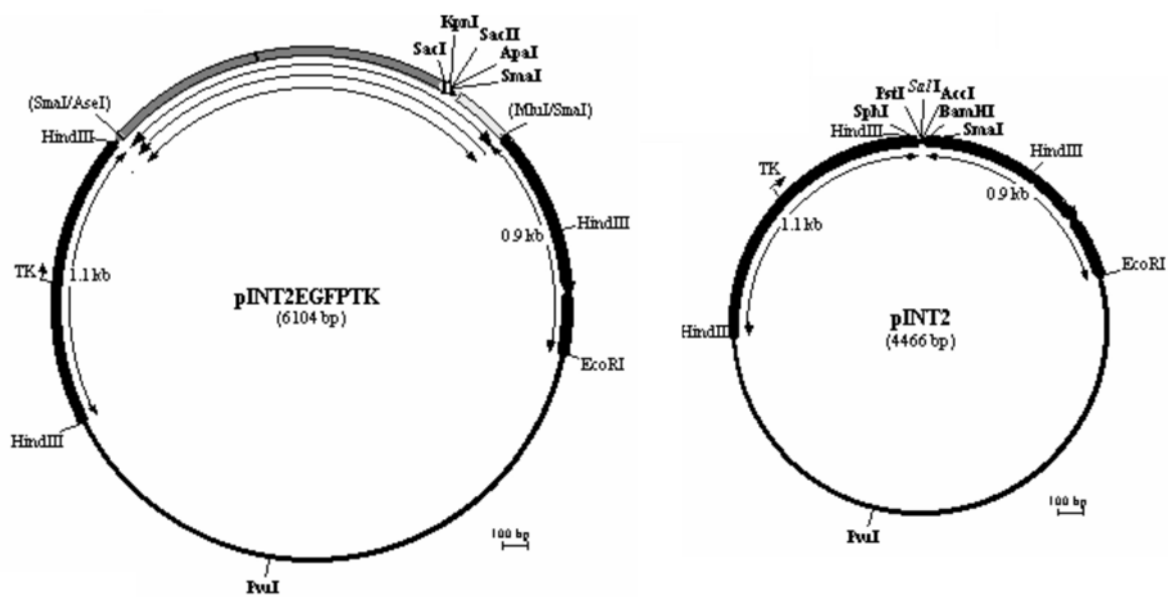


Figura 1.8 – Schema della ricombinazione omologa tra BoHV-4 wild type e il plasmide pINT2EGFPTK (modificata da Donofrio et al. 2002)

BoHV-4EGFP Δ TK è in grado di infettare e trasdurre EGFP in cellule embrionali indifferenziate mantenendo l'espressione del transgene durante il processo differenziativo. L'infezione in queste cellule non provoca morte cellulare o alterazioni del normale processo di differenziazione (Donofrio et al. 2004).

Se inoculato nel ventricolo laterale dell'encefalo di topo BoHV-4EGFP Δ TK è stato dimostrato che non è in grado di replicarsi e che soprattutto non è patogenico (Donofrio et al. 2006).

Sulla base di quanto noto circa le sue caratteristiche quali la poca o nulla patogenicità, la mancata evidenza che si tratti di un virus oncogeno, l'abilità a stabilire infezioni persistenti e la sua capacità di poter ospitare notevoli quantità di

materiale genetico estraneo, BoHV-4 è considerato un buon candidato come vettore per la terapia genica (Redaelli et al. 2008).

1.7 PROTEIN CHINASI AMPc-dipendenti

È possibile annoverare tra le più grandi e influenti classi di enzimi degli organismi eucarioti le protein chinasi, esse presentano un elevato grado di conservazione dal nematode *Caenorhabditis elegans* fino all'uomo (Barman et al. 2005). Le protein chinasi sono coinvolte nei processi fosforilativi ovvero dell'addizione di gruppi fosfato mediata da adenosin-5'-trifosfato (ATP). La famiglia delle protein chinasi risulta quindi coinvolta nella modulazione di numerosi processi metabolici cellulari (Hanks e Hunter 1995, Garret e Grisham 2004).

Le Protein Chinasi AMPc-dipendenti (3'-5'-adenosina monofosfato ciclico) meglio conosciute come PKA, sono definibili come enzimi dipendenti dal secondo messaggero (Smith et al. 1993). Esse sono complessi quaternari costituiti da un tetramero composto da 4 subunità delle quali due sono definite come regolatorie (PKAR) e due catalitiche (PKAC). Queste ultime vengono rilasciate, per svolgere la loro attività come monomeri, a seguito del legame di due molecole di AMPc con ciascuna subunità R (Taylor et al. 1990; Francis et al. 1994).

Le PKA risultano implicate in numerosi processi cellulari tra cui trascrizione (Huggenvik et al. 1991), metabolismo (Hubbard e Cohen 1993), ciclo cellulare (Matten et al. 1994) e apoptosi (Gjertsen e Døskeland 1995). L'attività di queste proteine è modulata anche mediante l'attivazione o la inattivazione dell'adenilato ciclasi che controlla la concentrazione di AMPc intracellulare (Figura 2.8).

Le subunità regolatorie sono state rilevate nei mammiferi in 4 differenti isoforme (RI α , RI β , RII α , RII β), che presentano minime differenze a livello biochimico e che sono caratterizzate da un alto livello di similitudine (Døskeland et al. 1993). Tali isoforme sono espresse e distribuite in modo differente a seconda del tessuto o del tipo cellulare (Clegg et al. 1988, Cadd and McKnight 1989). È stato altresì

dimostrato che le PKA presentano una distribuzione disomogenea nell'encefalo dei mammiferi (Mucignat-Caretta e Caretta 2001) ed in particolar modo è stato osservato che la subunità RII α ha una peculiare distribuzione nell'encefalo di topo e ratto a livello delle cellule endoteliali dei ventricoli (Mucignat-Caretta e Caretta 2004).

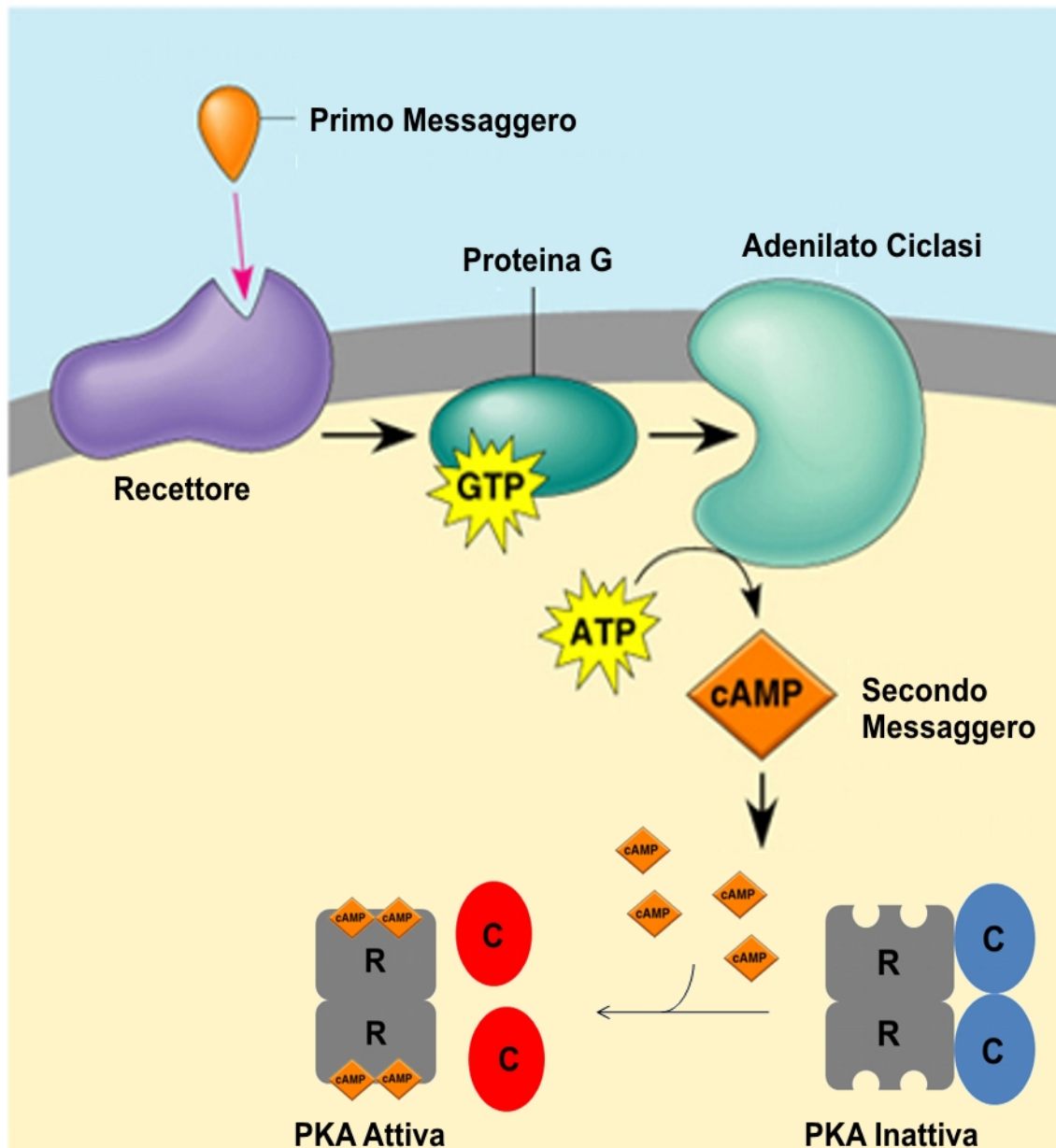


Figura 2.8 – Schema della via di attivazione delle PKA. (modificata da <http://porpax.bio.miami.edu>).

È importante sottolineare come le subunità regolatorie di PKA possano essere presenti all'interno delle cellule eucariotiche sia libere nella frazione solubile che legate alle strutture proprie della cellula quali possono essere il citoscheletro o gli organelli intracellulari. Il legame tra le PKAR e le strutture cellulari è reso possibile dalla mediazione di una ampia famiglia di proteine di legame specifiche per ciascuna isoforma denominate AKAPs (A Kinase Anchoring Proteins - Donelson Smith et. al 2006). Risulta quindi evidente come, nella frazione insolubile, la distribuzione delle subunità regolatorie di PKA venga influenzata oltre che dalla reperibilità delle differenti isoforme anche dall'espressione delle isoforme specifiche di AKAPs.

Il profondo coinvolgimento di PKA nel metabolismo cellulare e le variazioni che si riscontrano a seconda del tessuto e del tipo cellulare hanno spinto i ricercatori ad indagare la possibilità che possa sussistere una relazione tra espressione e distribuzione di PKA e cancro. Questo anche alla luce delle numerose evidenze sperimentali che suggeriscono come la via delle PKA possa essere coinvolta oltre che nei processi metabolici anche nei processi di proliferazione e differenziamento (Ferrari 2006, Stork e Schmitt 2002).

I risultati sino ad ora conseguiti nell'indagine della relazione sussistente tra via delle PKA e cancro risultano tuttavia essere di complessa interpretazione. Studi in vitro hanno, ad esempio, suggerito come un decremento di PKAR I α possa essere in relazione con i tumori del sistema endocrino (Bossis e Stratakis 2004, Nadella e Kirschner 2005). Tuttavia altri studi in vivo su uomo hanno evidenziato come un incremento della medesima subunità regolatoria possa essere associabile ad una maggiore aggressività e proliferazione del tumore (Tortora e Ciardiello 2002, Cho-Chung et al. 2002). Nei tumori prostatici inoltre è stato evidenziato come l'aumento dell'espressione di PKAR II β induca una inibizione della proliferazione tumorale mentre l'aumento dell'espressione di PKAR I α produca l'effetto opposto (Neary et al. 2004).

Questi dati, benché di complessa interpretazione, mettono tuttavia in evidenza come la via delle PKA risulti presentare delle importanti relazioni con l'insorgenza o l'arresto della proliferazione tumorale. Va quindi sottolineato come sia opportuno considerare le variazioni di PKA a seconda del tipo di tumore in oggetto di studio al fine di ottenere indicazioni il più chiare possibile.

Per quanto riguarda la relazione tra PKA e gliomi è stato dimostrato in vitro come l'interferenza farmacologica con la via delle PKA sia in grado di modulare la proliferazione in cellule di glioblastoma (Chen et al. 1998).

Recenti studi condotti presso il nostro Laboratorio hanno mostrato come la subunità RII α presenti una distribuzione peculiare in vitro in cellule immortalizzate di glioma di ratto F98, glioblastoma di topo GL261 e glioma umano GLI36. Inoltre tale distribuzione viene rilevata anche nei rispettivi modelli in vivo in ratto e topo (Mucignat-Caretta et al. 2008).

Alla luce di quanto riportato risulta evidente come un approccio allo studio dei gliomi che tenga conto di tali informazioni possa risultare estremamente interessante sia in ottica diagnostica che terapeutica, valutando la possibilità di utilizzare le subunità RII α delle PKA come possibile bersaglio per la terapia genica.

1.8 SCOPO DEL PRESENTE STUDIO

Il presente studio si propone di portare a termine due obiettivi convergenti per cercare di apportare alla ricerca sui gliomi un contributo significativo.

Il primo obiettivo è valutare la possibilità di utilizzare BoHV-4 come vettore per la terapia genica dei gliomi. Questo sia mediante studi in vitro che in vivo, tenendo conto delle possibili implicazioni a livello terapeutico in termini di sicurezza ed efficacia. Per determinare se BoHV-4 sia un vettore adatto per la terapia genica dei gliomi sono stati eseguiti i seguenti esperimenti:

- Analisi in vitro dell'effetto citopatico dopo infezione da BoHV-4 su colture cellulari immortalizzate di glioblastoma di topo (GL261), glioma di ratto (F98) e glioma umano (GLI36), al fine di determinare i tempi e le modalità di infezione.
- Analisi in vitro dell'infezione da BoHV-4 su colture cellulari primarie derivate da vari tessuti di ratto, per valutare le capacità infettive del virus in vitro.
- Inoculo di BoHV-4 nell'encefalo (ventricolo laterale) di topi e ratti sani al fine di valutarne gli effetti sia a livello cellulare che neuro-patologico.
- Induzione di masse tumorali mediante impianto di cellule di glioblastoma e glioma rispettivamente in topo e ratto e relativa infezione della massa stessa mediante BoHV-4, per valutare la capacità del candidato vettore di infettare le masse tumorali indotte.
- Induzione di masse tumorali mediante impianto di cellule di glioma marcate in ratto e relativa infezione della massa stessa mediante BoHV-4, con lo scopo di determinare la selettività infettiva del virus.
- Analisi in vitro dell'infezione da BoHV-4 su colture cellulari primarie derivate da glioma di ratto indotto.
- Dissociazione di materiale derivante da biopsia su pazienti neuro-oncologici e relativa coltura primaria per valutare l'infettabilità da BoHV-4, con lo scopo di dimostrare la capacità del candidato vettore di infettare tali colture.
- Analisi immunohistochimica del materiale istologico e raccolto sia dagli esperimenti condotti in vitro ed in vivo, al fine di meglio caratterizzare i tipi cellulari suscettibili all'infezione.
- Indagini Superarray per lo studio dell'espressione in vitro in cellule di glioblastoma di topo dei geni legati al ciclo cellulare in condizioni di controllo e con infezione da BoHV-4.

Il secondo obiettivo è estendere le scoperte già consolidate presso il nostro laboratorio circa il rapporto sussistente tra PKA e gliomi, valutando in primo luogo la possibilità di impiego terapeutico di molecole interferenti con la via delle PKA ed in parallelo gli effetti del silenziamento genico di tale via sulle cellule cancerose. In

secondo luogo ci di ampliare le conoscenze acquisite in questo campo per poter dare luogo eventualmente ad uno strumento diagnostico. A tal fine sono stati condotti i seguenti esperimenti:

- Analisi immunoistochimica di cellule di glioblastoma di topo (GL261), glioma di ratto (F98) e glioma umano (GLI36), al fine di determinare con differenti anticorpi la distribuzione delle differenti subunità regolatorie di PKA.
- Analisi Western blot di preparati derivati da cellule di glioma di ratto (F98) la fine di valutare la presenza e la distribuzione tra frazione solubile ed insolubile delle subunità regolatorie di PKA.
- Analisi immunoistochimica di sezioni istologiche di tessuto cerebrale di ratto con glioma indotto al fine di determinare con differenti anticorpi la distribuzione delle differenti subunità regolatorie di PKA sia nel tessuto sano che in quello tumorale.
- Dissociazione di materiale derivante da biopsia su pazienti neuro-oncologici e relativa coltura primaria per analisi immunoistochimica, al fine di valutare la distribuzione delle differenti subunità regolatorie di PKA.
- Trattamenti in vitro su cellule di glioma umano con molecole interferenti con la via delle PKA, al fine di mettere a confronto la natura dell'eventuale effetto citopatico con antitumorali commerciali quali il Taxolo.
- Analisi dell'espressione delle subunità regolatorie di PKA a seguito del silenziamento genico dell'espressione della subunità regolatoria PKARII α , realizzato con l'ausilio di tecniche SiRNA.
- Analisi dell'espressione genica delle diverse subunità regolatorie di PKA in tumori cerebrali umani di varia natura confrontati con tessuto sano, tali analisi vengono condotte interrogando il database REMBRANDT (REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa) del National Cancer Institute (<http://rembrandt.nci.nih.gov>) che raccoglie le analisi dell'espressione di oltre 11.500 geni su 587 differenti campioni.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI

Tutti gli esperimenti descritti in questo studio sono stati condotti presso il laboratorio di Neurofisiologia (diretto dal Prof. Andrea Cavaggioni) del Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana, Sezione di Fisiologia, Università degli Studi di Padova.

Gli esperimenti che hanno impiegato ratti e topi sono stati autorizzati dal Ministero della Salute ai sensi dell'art. 7/D Lgs. N. 116/92 (Regolamento EEC86/609/EEC).

REAGENTI E MATERIALI

I terreni di coltura (DMEM cat n° ECB7501L, DMEM-F12 cat n° ECB7502L), gli antibiotici (Penicillina e Streptomina cat n° ECB3001D e Tetraciclina cat n° ECB3003D), il siero fetale bovino (FBS cat n° ECS0180D), il PBS (Phosphate Buffered Saline cat n° ECB4053L) e gli enzimi di dissociazione (0,25% tripsina 0,1% EDTA in PBS cat n° ECB3052D) sono commercializzati da CellBio™. I marcatori di peso molecolare del DNA (DNA Ladder 50bp cat n° 10488043, DNA Ladder 50bp 100bp cat n° 10488058) e di peso molecolare delle proteine (14.4-97.4 KDa range cat n° 1495984) sono commercializzati da Invitrogen™. Plasmocin® (cat n° ant-mpp) è prodotto e commercializzato da InVivogen™. Gli anticorpi sono distribuiti da SantaCruz™, BD TransductionLab™, Chemicon™ e Sigma-Aldrich™. I kit per lo sviluppo della chemoluminescenza sono prodotti e distribuiti da GE Healthcare™ (ECL Advanced kit cat n° RPN2135). Tutti gli altri reagenti e materiali utilizzati nel presente studio vengono commercializzati da Sigma-Aldrich™. Il materiale per la realizzazione dei microarray è prodotto e

commercializzato da Superarray Bioscience Corporation™. I kit SiRNA sono prodotti e commercializzati da SantaCruz™. BoHV-4EGFPΔTK è stato ingegnerizzato partendo dal ceppo wild type (WT) presso il Laboratorio di Virologia del Dipartimento di Salute Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Parma (Prof. G. Donofrio)

2.2 COLTURE CELLULARI

LINEE CELLULARI

Nel presente studio sono state utilizzate tre linee cellulari, specificatamente GL261 F98 e GLI36. Le cellule GL261 (glioblastoma di topo C57BL6J - Seligman e Shear 1939) Sono state ottenute da un singolo topo C57BL6J che era stato esposto a ENU (N-ethyl-N-nitrosurea) durante la vita fetale, sono depositate presso il National Cancer Institute, USA. La linea cellulare F98 (glioma di ratto F244 Fischer – Ko et al. 1980) è stata ottenuta Presso l'Università dell'Ohio immortalizzando cellule provenienti da un singolo ratto Fischer che era stato esposto a ENU (N-ethyl-N-nitrosurea) durante la vita fetale. Le cellule di glioma umano GLI36 sono state isolate ed immortalizzate da Anthony Campagni della UCLA School of Medicine.

AVVIO DELLE COLTURE CELLULARI

Le colture vengono avviate partendo da aliquote commerciali crioconservate, le provette Nunc™ contenenti le cellule (conservate in sospensione di DMEM con 20% DMSO - Sigma-Aldrich cat n° D8418- e 20% FBS) vengono prelevate dall'apparato di stoccaggio (Dewar -170°C o freezer -70°C) e poste in un bagnetto termostato a 37°C fino a completa liquefazione del contenuto. La sospensione cellulare viene quindi introdotta in una fiasca da 75 cm² contenente 15 ml di mezzo di coltura completo (88% DMEM, 10% FBS, 1% Penicillina-Streptomicina-Tetraciclina, 1% Plasmocin) e poste in incubatore umidificato a 37°C con 5% CO₂ per 24 ore, trascorse le quali le cellule risultano aderenti al fondo della fiasca ed il

mezzo di coltura viene sostituito.

MANTENIMENTO DELLE COLTURE CELLULARI

Le condizioni ottimali di crescita delle linee cellulari utilizzate necessitano della sostituzione del mezzo ogni 48 ore. Tale operazione viene effettuata, in condizioni di sterilità, aspirando il mezzo di coltura esaurito e sostituendolo con 15 ml di mezzo di coltura completo.

Quando una coltura cellulare giunge a confluenza è necessario diluire la coltura ad una concentrazione che ne permetta la regolare crescita, per questo le cellule devono essere staccate dal fondo della fiasca cui aderiscono. Successivamente all'eliminazione del mezzo il monostrato cellulare viene lavato con 5 ml di PBS sterile (con 1% Penicillina-Streptomicina-Tetraciclina, 1% Plasmocin) per tre volte, tale operazione permette di diluire le proteine del siero fetale bovino ad una concentrazione che impedisce l'inibizione della tripsina. Terminato il lavaggio si procede a staccare le cellule in aderenza mediante tripsina: vengono inseriti 2,5 ml di soluzione tripsina-EDTA nella fiasca e si attende fino al passaggio delle cellule in sospensione. Raggiunto il completo distacco delle cellule dal fondo della fiasca, si inattiva la tripsina per 3 minuti con 10 ml di mezzo completo (contente FBS con inibitori della tripsina, Alpha 1-antitrypsin - Axelsson e Laurell 1965) e si trasferisce il mezzo di coltura con le cellule in sospensione in una provetta sterile da 50 ml che viene posta in centrifuga per 10 minuti a 1350 rpm a 37°C. Il fondello cellulare viene così separato dal mezzo che viene eliminato, vengono aggiunti 10 ml di mezzo fresco e, mediante azione meccanica del pipettatore, il fondello viene risospeso fino ad ottenere una sospensione omogenea. La sospensione a questo punto viene frazionata in base alla densità calcolata mediante ematocitometro in aliquote in base alla densità cellulare necessaria.

CONGELAMENTO DELLA COLTURA

Per conservare una coltura mediante congelamento le cellule devono essere staccate dal monostrato e raccolte in un fondello come descritto nel paragrafo precedente. Il

fondello viene risospeso in un volume di mezzo 10 volte superiore al suo volume. Dopo aver ottenuto una sospensione omogenea viene prelevata una aliquota ed introdotta in una provetta sterile Nunc[®] da 2ml aggiungendo (40% V:V) una soluzione di DMSO e FBS (1:1). Per il congelamento a -80° viene utilizzato un contenitore che rallenta il calo di temperatura (Nalgene Box cat n° 5100-0001) affinché le cellule non risultino danneggiate. Dopo 24 ore le cellule vengono stoccate in azoto liquido o a -70°C.

2.3 INFEZIONE IN VITRO CON BoHV-4EGFPΔTK ED ANALISI DELLA CITOTOSSICITA'

INFEZIONE

Per lo studio degli effetti dell'infezione mediante BoHV-4EGFPΔTK le cellule vengono seminate su vetrino sterile in piastre di Petri da 30 mm. Le colture vengono infettate 72h dopo essere state piastrate eliminando il mezzo e depositando sul vetrino cui le cellule aderiscono 10 μl di BoHV-4EGFPΔTK (da questo momento BoHV-4) al di titolo di 10⁶ unità formanti placca per μl, ed introducendo successivamente 2 ml di mezzo completo fresco. Le cellule vengono monitorate a intervalli regolari di tempo (12 ore, 24 ore, 48 ore, 72 ore, 96 ore, 144 ore e 192 ore) ed osservate mediante microscopia ad epifluorescenza per individuare l'espressione del gene reporter per la EGFP; il supernatante viene inoltre titolato per valutare la replicazione virale all'interno della coltura.

ANALISI MORFOLOGICA DELLA CITOTOSSICITA'

A seguito dell'infezione (o di un trattamento farmacologico) è possibile determinare l'eventuale effetto citopatico mediante analisi morfologica delle cellule trattate. Nello specifico è stata utilizzata la colorazione mediante ematossilina di Wright. Tale colorazione si effettua fissando (dopo l'eliminazione del mezzo di coltura) le cellule in piastre di Petri da 30 mm con 2 ml di metanolo per 5 minuti, ponendo

sopra ciascun vetrino 4 gocce di colorante (filtrato a 0.22 µm) per 5 minuti e lavando per 10 minuti con acqua MilliQ. Dopo essere stati lasciati asciugare per 24 ore i vetrini vengono montati mediante Entellan® e sono pronti per l'analisi morfologica al microscopio. Ogni condizione viene replicata 4 volte e per ciascun vetrino vengono contate 600 cellule in totale discriminando tra sane, apoptotiche o necrotiche secondo i seguenti criteri:

- apoptosi: condensamento della cromatina sulla membrana nucleare e formazione dei corpi apoptotici.
- necrosi: ipertrofia strutturale, disgregazione degli organelli, rilascio di materia citoplasmatica a seguito della rottura della membrana cellulare e collasso di tutta struttura cellulare in un corpuscolo compatto.

ANALISI DELL'EFFETTO CITOTOSSICO MEDIANTE DNA LADDER

La tecnica del DNA ladder valuta la frammentazione del materiale genetico cellulare e permette di esaminare le conseguenze dovute all'infezione da parte del virus o di un trattamento farmacologico.

Questa metodologia prevede l'estrazione del DNA dalle cellule e la sua analisi mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio.

Per la procedura standard vengono preparate 3 fiasche da 75 cm² con cellule semi-confluenti: una con il mezzo di coltura senza siero per 72 ore in modo da togliere le condizioni ottimali per la crescita ed indurre apoptosi (controllo apoptotico); una seconda trattata (campione sperimentale) ed una terza in cui vengono mantenute le condizioni ideali di crescita e nella quale le cellule non subiscono alcun tipo di trattamento (controllo normale).

Viene inoltre utilizzato un marcatore del peso molecolare del DNA (DNA Ladder 50 pb, Invitrogen™) costituito da DNA estratto da un plasmide, che in corsa elettroforetica forma due bande visibili senza l'ausilio del transilluminatore UV, una iniziale verde e una finale arancione; in base alla loro distanza si ottiene un'indicazione precisa dello stato della corsa.

Per ciascuna fiasca di cellule viene effettuata la procedura di distacco del

monostrato ed estrazione del DNA. Senza eliminare il mezzo di coltura si stacca delicatamente il monostrato cellulare aderente al fondo della fiasca mediante l'azione meccanica di una spatola sterile e si trasferisce la sospensione in provetta sterile da 15 ml, la quale viene centrifugata per 15 minuti a 4°C a 3500 rpm. Dopo aver eliminato il supernatante, si risospende la componente cellulare in 500 µl di tampone di estrazione (EB- 400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA, 0,1% NP40), contenente una sostanza detergente (NP40) che favorisce la lisi delle membrane.

La sospensione viene quindi trasferita in 1 provetta sterile da 1,5 ml e posta in ghiaccio per 30 minuti. Questo permette il raggiungimento delle condizioni d'azione ottimali per il composto. In seguito si centrifuga il campione per 15 minuti a 3500 rpm a temperatura ambiente e si preleva il supernatante che viene trasferito in una nuova provetta da 1,5 ml.

Sotto cappa vengono introdotti 500 µl di Cloroformio-Fenolo (1:1) e, mediante l'uso del vortex per 2 min si ottiene una miscela che viene centrifugata per 5 min a 14000 rpm a temperatura ambiente. L'azione chimica e meccanica imposta provoca la precipitazione del materiale diverso dall'acido nucleico. La fase acquosa supernatante viene trasferita in una nuova provetta da 1,5 ml e vengono introdotti 0,1 volume di acetato di potassio 5 M e 1 volume di isopropanolo favorendo la precipitazione del DNA. Dopo la miscelazione mediante vortex per 2 min il campione viene centrifugato per 5 min a 14000 rpm a temperatura ambiente ottenendo il DNA sotto forma di un fondello opalescente compatto.

L'operazione di rimozione del supernatante è molto delicata e la si effettua lavando prima il fondello con 500 µl di etanolo al 70% per rimuovere i residui di isopropanolo e di altri solventi e successivamente centrifugando più volte il campione per 5 min a 14000 rpm a temperatura ambiente fino alla completa eliminazione del supernatante.

Si procede poi dissolvendo il fondello in 20 µl di TE buffer con 20 µg/ml di RNAasi priva di DNAasi e si lascia incubare per 60 min a 37°C. A questo punto i campioni possono essere analizzati mediante elettroforesi orizzontale (1,5% di gel

di agarosio) con colorazione di Etidio Bromuro.

I campioni preparati vengono addizionati con 20 µl di tampone di caricamento 2X (20% Ficoll 400, 0.1 M EDTA a pH 8.0, 1% SDS, 0.25% blu di bromofenolo) e lasciati incubare a 65°C per 10 min.

Viene preparata una soluzione di Agarosio al 1,5 % in TBE (108 g Tris base, 55 g acido borico, 40 ml 0.5M EDTA, pH 8.0 in 1l H₂O) e mediante l'uso di un fornello/agitatore si aumenta la temperatura fino a completo scioglimento dell'agarosio avendo cura di non portare ad ebollizione. Successivamente al raffreddamento della soluzione intorno ai 55°C vengono aggiunti 50 µl di Etidio Bromuro ad una concentrazione di 0,5 µg/ml, si versa la soluzione di agarosio sul lettino per l'elettroforesi, si inserisce il pettine e si lascia solidificare per 10 minuti a 4°C.

Quando il gel si è solidificato, si estrae con molta attenzione il pettine e le paratie collocate per impedire al gel di fuoriuscire e si posiziona il lettino nell'apparato elettroforetico orizzontale. Si riempie la camera elettroforetica con TBE fino a sommergere i pozzetti creati con il pettine e si introducono i campioni di DNA preparati ed i marcatori di peso molecolare, rispettivamente 7 µl e 5 µl, in ciascun pozzetto secondo il seguente ordine: marcatore, cellule sane, cellule apoptotiche e cellule trattate. Si applica una tensione di 100 V e si segue lo svolgimento della corsa, terminata la quale si osserva il gel su di un transilluminatore UV.

2.4 INOCULO DI BoHV-4 IN VIVO

Al fine di valutarne la possibile patogenicità, BoHV-4 è stato inoculato nell'encefalo di animali sani: 14 ratti Wistar e 42 topi C57BL/6J. La procedura prevede la preanestesia con anestetico volatile (isoflurano 2,5%) e successivamente anestesia mediante iniezione intraperitoneale di una miscela di xilazina (Rompun: 75 mg/kg di peso corporeo) e di tiletamina/zolazepam (Zoletil: 20 mg/kg di peso corporeo). Accertata l'azione dell'anestetico, mediante la valutazione dei riflessi

nocicettivi, gli animali vengono fissati sull'apparato stereotassico e si procede con la depilazione della parte superiore del cranio. Viene predisposto un microiniettore, caricato con una aliquota di virus (2 μ l per il topo e 12 μ l per il ratto). Con il bisturi si esegue un'incisione mediale della cute del cranio in direzione rostro-caudale, si divaricano i lembi con 2 pinze chirurgiche Kelly e si individua il Bregma, il punto di giunzione delle ossa parietali con l'osso frontale. Si effettua un foro mediante l'uso di una microfresa chirurgica e si pratica l'inoculo (coordinate stereotassiche dal Bregma: 1 mm anteriormente, 1,5 mm lateralmente alla linea mediana e 3,4 mm in profondità per il ratto - Paxinos e Watson, 1995, 1,5 mm anteriormente, 1 mm lateralmente alla linea mediana e 2 mm in profondità per il topo – Franklin e Paxinos, 1998). Utilizzando il microiniettore viene praticato l'inoculo a livello intracerebroventricolare di BoHV-4 in frazioni di 50 nl di virus (titolo 10^6 pfu/ μ l) ad intervalli regolari di 5 secondi.

Dopo l'inoculo, a tempi diversi (3, 6, 15, 30, 60, 90 e 300 giorni) gli animali sono sacrificati con un eccesso di anestesia e perfusi (paragrafo seguente). Il cervello è prelevato, fissato, crioprotetto con una soluzione di saccarosio al 30% e conservato a -70°C per poi essere sezionato orizzontalmente a fette di 16 μ m di spessore con un criostato. Le sezioni sono esaminate con un microscopio ad epifluorescenza (Leica DMR) identificando le cellule che, esprimendo EGFP, mostravano fluorescenza verde.

2.5 PERFUSIONE

Dopo aver praticato un'iniezione eutanassica (Tanax® 200 μ l in ratto, 50 μ l in topo) e valutato i riflessi nocicettivi, si procede eseguendo un'incisione mediale dell'addome in direzione rostro-caudale. Inciso il peritoneo, si individua il diaframma, si pratica una incisione orizzontale e si procede tagliando le prime 5 costole. Successivamente si ripiega rostralmente la parte ventrale liberata della gabbia toracica esponendo il cuore. Si inserisce l'ago della pompa peristaltica a

livello del ventricolo sinistro e si recide parte dei lobi epatici per favorire la fuoriuscita dei fluidi in eccesso. Viene pompato PBS (50 ml in topo e 150 ml in ratto), che permette di svuotare i vasi sanguigni dal sangue, seguiti da formalina al 4% (25 ml in topo e 80 in ratto) per fissare i tessuti. Terminato il flusso di formalina si procede con l'esposizione del cranio e il prelievo del cervello mediante l'utilizzo di una pinza ossivora facendo attenzione a non recare lesioni al tessuto nervoso. Successivamente si post-fissa in una soluzione al 4% di formalina per 2 ore al termine delle quali il materiale asportato viene posto in una soluzione crioprotettiva di saccarosio al 30% per 12 ore a 4°C; in ultimo l'encefalo viene congelato a -70°C in camera di congelamento.

2.6 INOCULO DI CELLULE TUMORALI

Si elimina il mezzo da colture cellulari semi-confluenti (F98 o GL261) e si lava il monostrato cellulare con 5 ml di PBS per 3 volte, in modo tale da eliminare le cellule morte e i residui di siero. Si procede staccando le cellule dalla fiasca mediante 3 ml di soluzione tripsina/EDITA che, ad avvenuto distacco, viene inattivata con 10 ml di mezzo completo. La sospensione cellulare viene posta in una provetta sterile da 15 ml e che viene centrifugata per 10 minuti a 37°C a 1350 rpm in modo da separare la componente cellulare dal mezzo. A separazione avvenuta si elimina il mezzo e le cellule vengono poste in una provetta sterile da 1,5 ml tenuta in ghiaccio per essere inoculate.

Sono stati inoculati 38 ratti Fischer e 55 topi C57BL6/J rispettivamente con cellule F98 e GL261 secondo la procedura descritta di seguito. L'animale da sottoporre all'intervento viene preanestetizzato mediante anestesia volatile (isoflurano) e successivamente si procede con l'anestesia chirurgica costituita da una miscela di xilazina (Rompum: 75 mg/kg di peso corporeo) e di tiletamina/zolazepam (Zoletil: 20 mg/kg di peso corporeo) somministrata mediante iniezione intraperitoneale. Prima di procedere con l'inoculo si valutano i riflessi nocicettivi dell'animale.

L'animale viene depilato sulla regione di interesse e posizionato sull'apparato stereotassico. Utilizzando un bisturi sterile si esegue un'incisione medialmente al cranio in direzione rostro-caudale, si divaricano i lembi della cute con 2 pinze chirurgiche Kelly e si individua il bregma. Le cellule vengono caricate in una siringa Hamilton dalla punta tronca che viene fissata all'apparecchio stereotassico. Si effettua un foro mediante l'uso di una microfresa chirurgica e si pratica l'inoculo (coordinate stereotassiche dal Bregma: 1 mm anteriormente, 1,5 mm lateralmente alla linea mediana e 3,4 mm in profondità per il ratto - Paxinos e Watson, 1995, 1,5 mm anteriormente, 1 lateralmente alla linea mediana e 2 mm in profondità per il topo – Franklin e Paxinos, 1998). Vengono inoculati 2 μ l (40.000 cell/ μ l) di cellule per il topo e 8 μ l (10^6 cell/ μ l) di cellule per il ratto alla velocità di 0,5 μ l ogni 30 secondi. Terminato l'inoculo si estrae molto lentamente la siringa e si procede con la sutura. L'animale viene posto in una gabbia con cibo e acqua e viene osservato per 6 ore fino al risveglio. Dopo 10 giorni dall'inoculo di cellule tumorali gli animali vengono esaminati giornalmente al fine di valutare la possibile presenza di sintomatologia clinica tipica dell'insorgenza di glioma. Nello specifico vengono valutati l'eventuale calo (10% in 48 ore) del peso corporeo ed eventuali segni neurologici che possono essere indice di un aumento della pressione intracranica.

2.7 INOCULO DI BoHV-4 NELLA MASSA TUMORALE DI RATTO

Accertata la presenza dei sintomi neurologici e/o del calo ponderale, dopo la preanestesia si iniettano 200 μ l di miscela anestetica intra-peritonealmente e si attende l'effetto dei farmaci valutando i riflessi nocicettivi dell'animale. Viene predisposto un microiniettore, caricato con una aliquota di virus (6 μ l). Con il bisturi si esegue un'incisione mediale della cute del cranio in direzione rostro-caudale, si divaricano i lembi con 2 pinze chirurgiche Kelly. Individuato il foro di inoculo precedente, si procede alla sua riapertura mediante l'impiego di una sonda chirurgica appuntita. Utilizzando il microiniettore viene praticato l'inoculo a livello

della sede presunta di sviluppo della massa (medesima sede dell'inoculo delle cellule) di BoHV-4 in frazioni di 50 nl di virus (titolo 10^6 pfu/ μ l) ad intervalli regolari di 5 secondi.

Dopo l'inoculo l'animale viene osservato per le successive 6 ore fino al risveglio e le sue condizioni vengono rilevate ogni 12 ore. In base allo stato dell'animale si decide per il sacrificio e relativa perfusione in modo tale da avere animali che hanno subito l'inoculo nella massa tumorale a tempi diversi (48, 60, 72, 86, 120, 132, 216 ore dopo l'inoculo del virus – un animale per ogni condizione).

2.8 PREPARAZIONE DI CELLULE F98-PKH26red

Il kit di colorazione PKH26 è un metodo di colorazione brevettato che lega un fluoroforo (PKH26) alle membrane cellulari in particolari condizioni in modo permanente (Horan e Slezak, 1989). La colorazione (rosso fluorescente λ_{exc} 551nm e λ_{em} 567nm) è stata con successo impiegata per lo studio di diversi sistemi cellulari sia in vitro (Horan et al. 1990) che in vivo (Maus et al. 2001) ed in particolare per lo studio degli infiltrati tumorali (Wallace et al. 1993).

In questo studio il kit di colorazione PKH26 è stato utilizzato per marcare la linea cellulare F98 in modo che essa potesse risultare fluorescente dando origine alla linea cellulare marcata F98-PKH26red, ciò al fine di permettere una migliore identificazione in vivo delle cellule tumorali. Il protocollo prevede la colorazione in sospensione delle cellule ed il loro immediato utilizzo sperimentale (la permanenza della colorazione è garantita almeno per 100 giorni).

Per applicare il protocollo è necessario quindi ottenere la sospensione cellulare partendo da un monostrato confluento come descritto precedentemente, la sospensione è preparata utilizzando mezzo di coltura privo di siero (le cui proteine possono sequestrare il colorante). Le cellule sono poi contate ed un quantitativo di 10^7 cellule per ml va a costituire un fondello dal quale la totalità del mezzo di coltura viene separata. Successivamente le cellule sono risospese nel diluente

fornito con il kit di colorazione cui va aggiunta una aliquota di reagente PKH26 tale per cui la concentrazione finale risulti essere 10^{-6} M, la sospensione viene incubata per 5 minuti invertendo la provetta. Ad incubazione avvenuta si aggiunge un eguale volume di siero per sequestrare il fluoroforo in eccesso e si centrifuga per riottenere un pellet che deve essere lavato 3 volte con mezzo completo senza siero prima di poter utilizzare le cellule.

Al fine di poter valutare l'utilità della colorazione, prima di utilizzare in vivo F98-PKH26red, sono stati condotti test in vitro per determinare la suscettibilità all'infezione da BoHV-4 della linea cellulare così marcata.

2.9 AVVIO DI UNA COLTURA PRIMARIA

Il materiale da cui si desidera avviare la coltura viene prelevato ed opportunamente selezionato, viene introdotto in una provetta sterile contenente 2 ml di soluzione tripsina/EDTA dove viene agitato ripetutamente al fine di dissociare le cellule ed ottenerne una sospensione. Dopo 10 minuti si inattiva la tripsina aggiungendo 10 ml di mezzo completo, e si centrifuga per 10 minuti a 1350 rpm a 37°C. Il fondello cellulare viene così separato dal mezzo, vengono aggiunti 10 ml di mezzo completo e mediante azione meccanica del pipettatore esso viene sospeso fino ad ottenere una sospensione omogenea che viene aliquotata in piastre di Petri contenenti un vetrino da microscopia sterile. Le piastre vengono incubate a 37°C con 5% CO₂, dopo 24 ore il mezzo viene sostituito con mezzo senza siero e rinnovato ogni 48 ore.

2.10 COLTURE PRIMARIE DI TUMORE

GLIOMA DI RATTO

Accertata la presenza dei sintomi neurologici e del calo ponderale, dopo la preanestesia si iniettano 200 µl di miscela anestetica intra-peritonealmente e si

attende l'effetto dei farmaci valutando i riflessi nocicettivi dell'animale. Successivamente l'animale viene posizionato sull'apparato stereotassico e si procede con la depilazione della parte superiore del cranio. Si esegue con il bisturi un'incisione mediale del cranio in direzione rostro-caudale e si divaricano i lembi con 2 pinze chirurgiche Kelly. Individuato il foro d'inoculo precedente, si definisce il perimetro di incisione e si procede alla trapanazione mediante l'uso di microfresa chirurgica. Si asporta il segmento osseo liberato, si esegue il drenaggio del materiale liquido eventualmente presente nella massa e lo si introduce in una piastra di Petri sterile con vetrino e 2 ml di mezzo di coltura. Si procede con l'asportazione del tessuto tumorale presente, ed alla dissociazione in 3 ml di tripsina e la sua introduzione in una piastra di Petri sterile con vetrino e 2 ml di mezzo di coltura. A questo punto l'animale viene sacrificato mediante iniezione di eutanastico (Tanax® 200 µl).

TUMORE CEREBRALE UMANO

Le colture derivate da tumore cerebrale umano vengono realizzate in collaborazione con l'equipe neurochirurgica diretta dal Prof. D. D'Avella. Per la tipizzazione istologica del materiale fornito si fa riferimento al referto clinico di ciascun caso.

Durante l'intervento di asportazione o riduzione della massa tumorale, il neurochirurgo fornisce un frammento di quanto asportato in provetta sterile, solitamente da 2 ai 5 mm³. Tale materiale viene dissociato immediatamente sul posto mediante azione meccanica ed enzimatica (Tripsina-EDTA) per circa 15 minuti, accertata l'avvenuta dissociazione la soluzione di 2 ml viene inattivata con 10 ml di mezzo di coltura completo. Viene dunque effettuato il trasporto a 37°C fino al laboratorio (15 min), dove il materiale centrifugato per viene trasferito in una fiasca da coltura sterile da 75 cm², e lasciato in coltura in mezzo completo fino ad avvenuto raggiungimento di una densità cellulare che consente l'esecuzione degli esperimenti.

2.11 ALTRE COLTURE PRIMARIE

Le colture primarie utilizzate in questo studio sono derivate da ratto neonato di 3 giorni: cellule gliali, cellule del bulbo olfattivo, epatociti, cardiomiociti, cellule delle ghiandole surrenali; oppure da ratto adulto di 8 mesi: cellule del midollo osseo e macrofagi da lavaggio peritoneale. Gli animali vengono anestetizzati come precedentemente descritto e i neonati posti in condizioni di ipotermia, accertata la mancanza di riflessi nocicettivi la cute degli animali viene lavata con una soluzione alcolica. Si procede dunque con il prelievo dei tessuti da dissociare. Ad avvenuta dissociazione la soluzione viene inattivata aggiungendo 10 ml di mezzo completo, e si centrifuga per 10 minuti a 1350 rpm a 37°C. Il fondello cellulare viene così separato dal mezzo, vengono aggiunti 10 ml di mezzo completo e mediante azione meccanica del pipettatore esso viene risospeso fino ad ottenere una sospensione omogenea che viene aliquotata in piastre di Petri contenenti vetrino da microscopia sterile. Le piastre di Petri vengono incubate a 37°C con 5% CO₂, dopo 24 ore il mezzo viene sostituito con mezzo senza siero e rinnovato ogni 48 ore.

CELLULE GLIALI E CELLULE DEL BULBO OLFATTIVO

Dopo aver decapitato l'animale con un bisturi sterile si incide la cute del cranio medialmente in direzione rostro-caudale e successivamente si incide anche l'osso del cranio avendo cura di non penetrare eccessivamente. Mediante una pinza microchirurgica e con l'ausilio di un bisturi si asporta il cranio dissezionato esponendo l'encefalo. Utilizzando una spatola sterile, si asporta solo la corteccia telencefalica per la coltura di cellule gliali ed i bulbi olfattivi per le colture di cellule del bulbo olfattivo. Il materiale prelevato viene disposto in una piastra di Petri da 30 mm dove viene lavato con 2 ml di PBS per tre volte. Con una lama da bisturi si frammenta il materiale in elementi da 1 mm³, e li si trasferisce in una provetta da 15 ml contenente 2 ml di soluzione Tripsina/EDTA e si agita il tutto delicatamente per 10 minuti fino alla completa dissociazione.

CELLULE DELLE ghiandole surrenali, cardiomiociti ed epatociti

Dopo aver decapitato l'animale con un bisturi sterile si prelevano gli organi da cui si desidera derivare una coltura primaria. Mediante una pinza microchirurgica e con l'ausilio di un bisturi si asportano tutte le parti di tessuto connettivo che non fanno parte dell'organo prescelto e si effettua una campionatura di tessuto il più possibile omogeneo. I campioni vengono così depositati separatamente in una piastra di Petri da 30 mm dove vengono lavati con 2 ml di PBS per tre volte. Con una lama da bisturi si frammenta ciascun campione in elementi da 1 mm³, e li si trasferisce in una provetta da 15 ml contenente 2 ml di soluzione Tripsina/EDTA e si agita il tutto delicatamente per 10 minuti fino alla completa dissociazione.

CELLULE DEL MIDOLLO OSSEO

Dopo aver anestetizzato l'animale si procede al suo sacrificio mediante la manovra di dislocazione cervicale. Dopo aver lavato abbondantemente con una soluzione alcolica gli arti inferiori, si procede con l'asportazione dei femori, che vengono posti in PBS sterile con antibiotici per 5 minuti. In condizioni di sterilità vengono, mediante una sega, tagliate le estremità dei femori e con una siringa da 1 ml si fa fluire attraverso la cavità del femore stesso 1 ml di mezzo completo che viene raccolto in una provetta da 15 ml, si esegue l'operazione nella medesima provetta per entrambi i femori. La provetta viene poi centrifugata per 10 minuti a 1350 rpm a 37°C ed il fondello cellulare viene così separato dal mezzo, vengono aggiunti 10 ml di mezzo completo e mediante azione meccanica del pipettatore esso viene dissolto fino ad ottenere una sospensione omogenea che viene aliquotata in piastre di Petri contenenti vetrino da microscopia sterile. Le piastre di Petri vengono incubate a 37°C con 5% CO₂, dopo 24 ore il mezzo viene sostituito con mezzo senza siero e rinnovato ogni 48 ore.

MACROFAGI DA LAVAGGIO PERITONEALE

Per ottenere una coltura di macrofagi da lavaggio peritoneale è necessario, dopo aver anestetizzato l'animale, lavare abbondantemente con una soluzione alcolica la

regione ventrale. Mediante l'ausilio di forbici chirurgiche e di un bisturi si incide la cute e si espone il peritoneo avendo cura di non lesionarlo. A questo punto nel quadrante inferiore sinistro si pratica una incisione di 2 millimetri attraverso cui si introduce un catetere sterile che viene fissato mediante 5 punti di sutura continua. All'altra estremità del catetere viene collegata una provetta da 50 ml. Accertata la tenuta della sutura il catetere viene pinzato e si procede iniettando a livello intraperitoneale, mediante l'ausilio di una siringa sterile da 50 ml, 40 ml di mezzo completo. Terminata l'iniezione si massaggia delicatamente l'addome per 2 minuti, al termine dei quali si rimuove la pinza ed il mezzo fluendo lungo il catetere riempie la provetta ad esso collegata. Solitamente si ottengono dai 25 ai 30 ml di liquido di drenaggio. La provetta viene poi centrifugata per 10 minuti a 1350 rpm a 37°C ed il fondello cellulare viene così separato dal mezzo, vengono aggiunti 10 ml di mezzo completo e mediante azione meccanica del pipettatore esso viene dissolto fino ad ottenere una sospensione omogenea che viene aliquotata in piastre di Petri contenenti vetrino da microscopia sterile. Le piastre di Petri vengono incubate a 37°C con 5% CO₂, dopo 24 ore il mezzo viene sostituito con mezzo senza siero e rinnovato ogni 48 ore.

2.12 IMMUNOISTOCHEMICA

L'immunoistochimica si basa sulla specifica interazione antigene-anticorpo. Questa tecnica è stata utilizzata diverse volte in questo studio sia su preparati derivanti da materiale ottenuto in vivo, sia su preparati di colture cellulari. I campioni vengono preparati fissando il materiale su vetrino con formalina al 4% per 10 minuti seguito da un lavaggio in PBS della durata di 2 minuti. Nello specifico sono stati utilizzati i seguenti anticorpi, con le rispettive diluizioni:

- Primario Anti-GFAP (Sigma-Aldrich cat n° G3893, topo, individua l'astroglia), impiegato per visualizzare gli astrociti su preparato da cervello di ratto (1:200), e per confermare la natura gliale delle cellule in coltura (1:1000).

- Primario Anti-PKARII α (SantaCruz cat n°sc-908, coniglio, individua PKARII α), impiegato su cellule GL261, F98, GLI36 e su tumore indotto con inoculo di cellule F98 in ratto (1:200)
- Primario Anti-Golgina97 (Molecular Probe cat n° A21270, topo, individua la rete di interscambio del corpo di Golgi), impiegato su cellule F98 per colocalizzazione con RII α (1:40)
- Neurotrace™ (Molecular Probe cat n° 530/615, colorazione in kit, individua i neuroni), impiegato per caratterizzare su preparato da cervello di ratto le cellule suscettibili all'infezione da BoHV-4.
- DAPI (Sigma-Aldrich cat n° 217085, colora il nucleo), impiegato per evidenziare i nuclei cellulari e di loro eventuale stato e per determinare la densità cellulare su preparati di cervello e cu coltura (100 nM).
- Secondario Anti-Topo Alexa 568 (Molecular Probe cat n° A21043, rivela gli anticorpi primari realizzati in topo; 1:300).
- Secondario Anti-Coniglio Alexa 568 (Molecular Probe cat n° A11011, rivela gli anticorpi primari realizzati in coniglio; 1:300).

PROTOCOLLO STANDARD

La procedura messa a punto e sviluppata per l'immunoistochimica è di seguito riportata:

- Idratazione in torretta delle sezioni in PBS per 10'
- Permeabilizzazione delle membrane mediante Triton-X 100 (Sigma-Aldrich cat n° T8787) 1% in PBS per 30'
- Lavaggio in PBS per 5'
- Blocco dei siti aspecifici mediante preincubazione con BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma-Aldrich cat n° B4287) al 0,4% in PBS per 20'
- Lavaggio in PBS per 5'
- Incubazione con anticorpo primario a 4°C in camera umida per la notte
- Lavaggio in PBS per 10'
- Incubazione con anticorpo secondario a 4°C in camera umida per 3 ore a

temperatura ambiente

- Lavaggio in PBS per 10'

- Montaggio del vetrino coprioggetto

Al termine della procedura i vetrini vengono osservati al microscopio confocale e al microscopio ad epifluorescenza al fine di colocalizzare le cellule infettate con le cellule marcate.

2.13 WESTERN BLOT

Mediante la tecnica del Western blot è possibile separare le proteine presenti in un dato campione e caratterizzarle attraverso una reazione immunochimica. Tale reazione viene realizzata dopo che le proteine sono state dapprima separate attraverso elettroforesi in gel di poliacrilammide e successivamente trasferite su membrana di nitrocellulosa.

Le cellule da analizzare devono essere raccolte in un fondello (30 mg) cui vengono aggiunti 810 μ l di PBS, 10 μ l di PMSF (fluoruro di fenilmetansulfonile Sigma-Aldrich cat n° 78830) e 10 μ l di inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich cat n° P8340); si procede alla risospensione del fondello in una provetta da 1,5 ml. La sospensione ottenuta viene fatta passare per 40 volte in un ago da insulina per lisare le cellule e successivamente centrifugata a temperatura ambiente per 15 minuti a 6000 rpm. Si prelevano 500 μ l di supernatante e si aggiungono 500 μ l di Sample buffer (in H₂O, 12,5% Tris-HCl 5M, 10% glicerolo, 5% 2- β -mercaptoetanololo, 2% SDS, 1% blu di bromofenolo) ottenendo così il primo campione di materiale solubile (campione supernatante, S). Il fondello restante viene risospeso in PBS fino ad ottenere una sospensione omogenea che viene centrifugata per 15 minuti a 6000rpm a temperatura ambiente per tre volte eliminando il supernatante. Al termine si risospende il fondello in 1 ml di PBS da cui si prelevano 500 μ l della sospensione aggiungendo 500 μ l di Sample buffer (campione pellet, P). I campioni S e P vengono lasciati per 10 minuti in acqua bollente e successivamente conservati

a -20°C .

Per effettuare la corsa elettroforetica viene prima preparato il running gel di poliacrilamide al 12% che viene fatto polimerizzare grazie ai catalizzatori (APS e Temed) in un apparato per minigel. In seguito viene preparato lo stacking gel (poliacrilamide al 4%) formando i pozzetti nei quali caricare i campioni. A questo punto è possibile caricare i pozzetti con i campioni e far correre l'elettroforesi per 90 minuti impostando lo strumento a 100 V e 200 mA. Terminata la corsa si monta l'apparato per minitransfer per trasferire le proteine separate dal gel su membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad cat n°162-0094) per 2 ore e 30 minuti a 100 V e 350 mA. Terminato il trasferimento, ciascuna membrana viene posta in una vaschetta di vetro a fondo piatto lavata precedentemente con TBS (0,48 g Tris HCl, 1,6 g NaCl, portati a 200 ml totali con H₂O) e precedentemente riempita con 10 ml di TBSTA (TBS 100 ml TBS + 1 ml Tween 20 + 2 g BSA) per saturare i siti di legame aspecifici e posta in agitazione a 20 rpm per 60 minuti. Successivamente si sostituisce il TBSTA con 10 ml della stessa soluzione fresca a cui viene aggiunto l'anticorpo primario in diluizione opportuna, che viene incubato su agitatore per la notte. Effettuato il legame antigene-anticorpo, le membrane vengono lavate con 10 ml di TBST (TBS 100 ml TBS + 1 ml Tween 20) tre volte per 20 minuti ed in seguito si sostituisce il TBST con TBS cui viene aggiunto l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano solitamente alla diluizione di 1:5000 ed incubato in agitazione per 3 ore. Al termine le membrane vengono lavate con 10 ml ciascuna di soluzione TBS per tre volte per 20 minuti e sviluppate in camera oscura in chemoluminescenza (Kit Advanced ECL Amersham Bioscience cat n° RPN 2135).

Nel Presente studio sono stati utilizzati i seguenti anticorpi:

- Primario Anti-PKA RII α (SantaCruz cat n° sc-908, coniglio, individua le subunità regolatorie RII α delle protein chinasi A di topo) 1:5000.
- Primario Anti-PKA RI β (SantaCruz cat n° sc-907, coniglio, individua le subunità regolatorie RI β delle protein chinasi A di topo) 1:5000.
- Primario Anti-PKA RII α (TransductionLab cat n°P55120, coniglio, individua le

subunità regolatorie RII α delle protein chinasi A umane) 1:5000.

- Primario Anti-PKA RII β (TrasductionLab cat n°P54720, coniglio, individua le subunità regolatorie RII β delle protein chinasi A umane) 1:5000.

- Primario Anti-Actina (SantaCruz cat n° sc-8432, topo, si lega all'actina) viene solitamente impiegato come misura di riferimento.

- Secondario Anti-Coniglio coniugato con perossidasi di rafano (Sigma-Aldrich cat n° 0545, amplifica gli anticorpi primari realizzati in coniglio; 1:5000).

- Secondario Anti-Topo coniugato con perossidasi di rafano (Chemicon cat n°AP124P, amplifica gli anticorpi primari realizzati in topo; 1:5000).

2.14 SUPERARRAY

La tecnica consente di analizzare l'espressione genica di una popolazione di cellule derivanti sia da colture cellulari che da tessuto, mediante l'amplificazione e la marcatura dell'RNA e la sua successiva interazione con delle sonde legate permanentemente ad una membrana. In questo studio sono stati valutati gli effetti dell'infezione da BoHV-4 sull'espressione di 128 geni legati al ciclo cellulare normale (Oligo GEArray[®] Cell Cycle) in una popolazione di cellule glioblastoma murino GL261 paragonata ad una popolazione gemella che non ha subito l'infezione. È stata utilizzata la linea cellulare GL261 in quanto la disponibilità dei kit commerciali Superarray è limitata al topo.

La riuscita della tecnica dipende da un materiale di partenza che non abbia subito degrado e che sia il più puro possibile. Per raggiungere l'obiettivo è stato utilizzato un kit specifico di estrazione del solo RNA ed un kit di amplificazione di quest'ultimo. Tutti i passaggi effettuati sono stati monitorati attraverso analisi spettrofotometrica mediante Spettrofotometro per microvolumi (NanoDrop[™]).

Il protocollo prevede dopo l'estrazione dell'RNA la sua purificazione e marcatura mediante Biotin-UTP, l'ibridazione del segnale con le sonde legate alla membrana. Svoltata la procedura la membrana ibridizzata viene sviluppata con uno specifico kit

per la chemoluminescenza che consente di rilevare l'espressione dei geni che la membrana permette di analizzare.

Le lastre impresse vengono sottoposte a 4 processi: acquisizione, digitalizzazione, analisi ed elaborazione informatica. Ciascuna lastra viene impressionata, oltre che dagli spot campione, anche da marcatori che consentono oltre alla normale valutazione delle attivazione del gene in questione anche di operare una valutazione quantitativa. Le lastre ottenute dalle membrane delle cellule infettate con BoHV-4 e non infettate sono state messe a confronto tra di loro per stabilire quali geni venissero inibiti e quali attivati in seguito alle 72 ore di esposizione a BoHV-4.

2.15 TRATTAMENTI CON MOLECOLE INTERFERENTI CON PROTEIN CHINASI AMPc-dipendenti

Nell'ottica di individuare un possibile bersaglio per la terapia genica sono stati condotti diversi esperimenti per valutare la possibilità di utilizzare le conoscenze acquisite circa la relazione tra distribuzione delle protein chinasi AMPc-dipendenti ed i gliomi (Mucignat-Caretta et al. 2008).

Sono state utilizzate molecole considerate possibili antitumorali e molecole che interferiscono a diversi livelli con le vie delle protein chinasi AMPc-dipendenti, i vari trattamenti sono stati confrontati sia con un controllo che con gli effetti di un antitumorale commerciale: il taxolo.

Progesterone (1 μ M). Si tratta di un ormone steroideo che è coinvolto nella regolazione della crescita delle cellule tumorali. È stato dimostrato che le cellule di glioma umano esprimono il recettore di membrana per questo ormone (Gonzales-Aguero et al. 2001).

Glutammato (500 μ M). È un amminoacido che agisce anche come neurotrasmettitore eccitatorio, in caso di trattamento prolungato la conseguente attivazione dei canali per il calcio può determinare l'attivazione di proteasi e fosforilasi determinando morte cellulare (Garret e Grisham 2004).

8-Br-AMPC (500 μ M) e **6-Dibutiril-AMPC** (500 μ M). Sono molecole analoghe agoniste dell'AMPC che, come **IBMX** (3-isobutil-1-metil-xantina, 500 μ M), aumentano la concentrazione di AMPC intracellulare e attivano PKA. È stato dimostrato che tale attività induce apoptosi in alcune linee cellulari di glioma (Chen et al. 1998).

H89 (12 μ M). Inibisce selettivamente PKA (Davies et al. 2000). Nonostante una folta letteratura confermi che H89 sia in grado di inibire l'attività di PKA il suo meccanismo di azione deve ancora essere chiarito (Lochner e Moolman 2006).

Forskolina (10 μ M). Attivando l'adenilato ciclasi viene aumentata la concentrazione di AMPC intracellulare e di conseguenza si attiva PKA (Curtin et al. 2006).

Caffeina (2mM). La caffeina riveste un ruolo importante nei punti di controllo del ciclo cellulare; essa agisce su diversi enzimi tra cui AMPC. Alte concentrazioni di caffeina sono in grado di ridurre la sintesi del DNA con effetto citotossico (Kaufmann et al. 2003).

Teofillina (100 μ M). È una metilxantina che inibisce la fosfodiesterasi dell'AMPC aumentandone la concentrazione intracellulare (Makino et al. 1999).

Vinblastina (0,03 μ M) Si tratta di un classico chemioterapico che causa il disassemblaggio dei microtubuli impedendo la mitosi e causando effetto citotossico (Wolff et al. 1999).

Taxolo (0,05 μ M). È un farmaco chemioterapico. È stato dimostrato che promuove la formazione di microtubuli non funzionali bloccando la cellula in fase G2/M ed inducendo di conseguenza morte cellulare per apoptosi (Ray et al. 1994).

Per ciascun trattamento vengono utilizzati 4 vetrini, con cellule GLI36 derivanti dalla medesima coltura, che al termine vengono preparati come precedentemente descritto nel paragrafo 2.3 per l'analisi della citotossicità (Figura 2.1).

I dati sono stati analizzati confrontando ciascun trattamento con il trattamento a base di Taxolo e con il controllo mediante ANOVA ad 1 via, disegno tra gruppi a casualizzazione completa con test post hoc per comparazione multipla di Bonferroni.

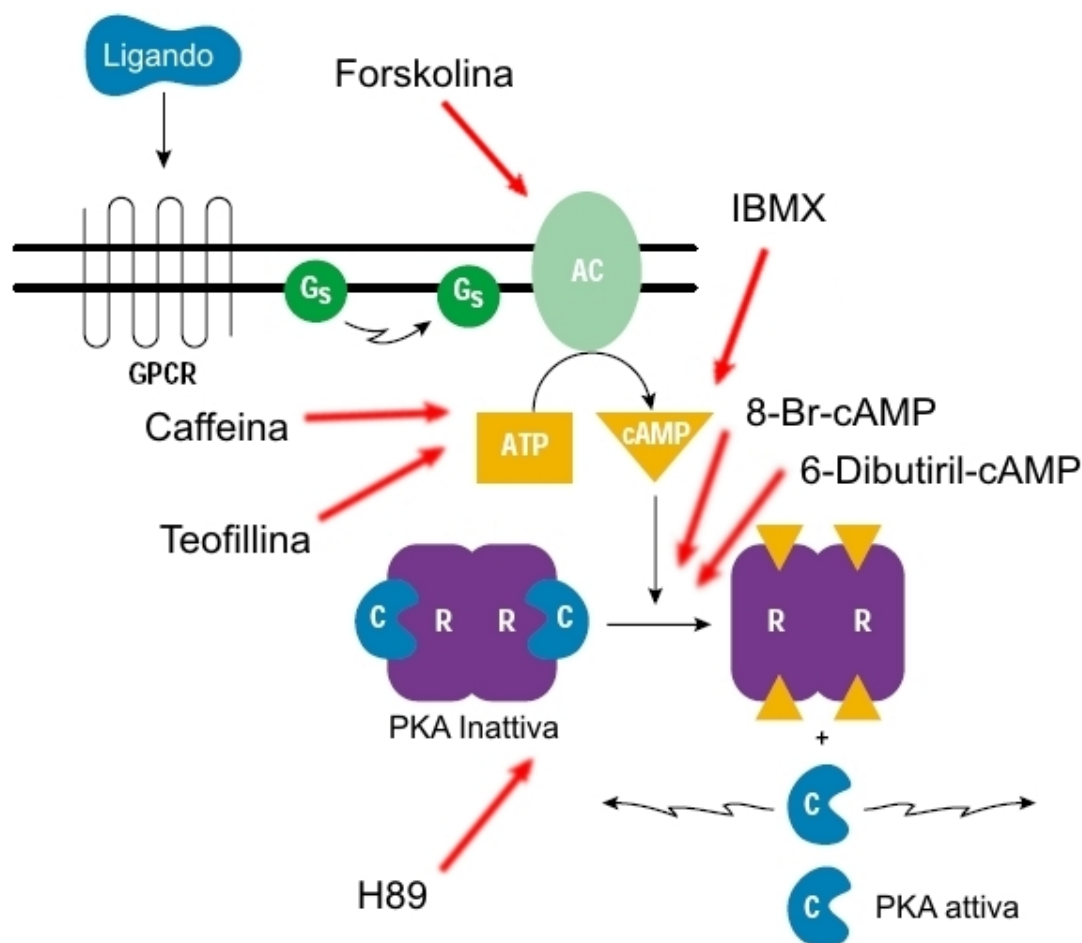


Figura 2.1 – Schema della via di attivazione delle PKA, con riportata l’interferenza delle molecole impiegate nei trattamenti. (GPCR – recettore accoppiato a proteina G; Gs – proteina G stimolatoria; AC – Adenilato Ciclastasi)

2.16 SILENZIAMENTO DELL’ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE SiRNA

La tecnica RNA interference (RNAi) è considerata un possibile e potenzialmente molto efficace approccio al trattamento delle neoplasie cerebrali (Mathupala et al. 2005, Nowak et al. 2006). L’impiego di sonde RNAi permette di poter studiare sia i possibili effetti dell’inibizione di una data via di espressione, sia di poter dedurre ciò che l’espressione della via in questione comporta. Nel presente studio si è

utilizzata la tecnica SiRNA per valutare gli effetti di una inibizione diretta dell'espressione della subunità proteica PKA RII α in cellule di glioblastoma murino GL261, dal momento che il kit per topo era l'unico disponibile in commercio. La tecnica prevede l'applicazione del protocollo del produttore (SantaCruzTM) mediante l'impiego di uno kit (Transfection Medium cat n° sc-36868, Transfection Reagent cat n° sc29528, SiRNA PKARII α reg cat n°sc39165) su una coltura di cellule semi-confluenti che dopo essere state distaccate mediante l'azione di tripsina/EDTA vengono portate in sospensione in condizioni ottimali di trasfezione (200 μ l di Transfection medium e Transfection Reagent 1:1 per 10⁷ cellule) da parte delle sonde SiRNA ed incubate in fiasca da coltura per un tempo variabile dalle 5 alle 7 ore. Terminata l'incubazione le cellule vengono lavate con PBS per tre volte e riportate in condizioni normali di crescita con l'aggiunta di mezzo di coltura completo. Dopo 24 o 72 si esegue un'indagine immunoistochimica per valutare l'effettiva riuscita del silenziamento utilizzando gli anticorpi primari specifici per le proteine bersaglio di SiRNA e successivamente si esegue una colorazione con ematossilina di Wright per poter a posteriori valutare l'eventuale effetto citotossico del trattamento.

2.17 INTEGRAZIONE DEI DATI GENETICI CON IL DATABASE REMBRANDT

Il National Cancer Institute (NCI) statunitense, in collaborazione con il National Institute of Neurological Disorder e diverse strutture cliniche, ha avviato nel 2005 il progetto REMBRANDT (REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa), con lo scopo di raccogliere in un unico database il maggior numero di informazioni possibili sulle vie di espressione genica in ambito neuro-oncologico. Attualmente il database REMBRANDT (<http://rembrandt.nci.nih.gov>) comprende circa 11500 geni studiati longitudinalmente su 587 pazienti. È stato possibile quindi integrare i risultati ottenuti tramite microarray con i dati presenti nel database, ottenendo

importanti riscontri. Inoltre è stato utilizzato il database per effettuare ricerche mirate su singoli geni ed ottenere un consistente supporto alle informazioni ottenute circa l'espressione delle subunità regolatorie delle PKA nei tumori cerebrali.

2.18 ANALISI STATISTICHE ED ELABORAZIONE DEI DATI

Nel presente studio sono tutte le immagini sono state elaborate mediante l'ausilio del software Corel Suite X3 per Windows XP (Corel Corporation Inc., Palo Alto, USA) elaborando luminosità e contrasto non oltre il 10% dell'originale. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software Statistica 5 (Statsoft Inc., Tulsa, USA) mentre i grafici sono stati realizzati mediante il software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software inc., USA).

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 STUDI PRELIMINARI IN VITRO

COLTURE IMMORTALIZZATE

Le cellule immortalizzate di glioblastoma di topo (GL261), di glioma di ratto (F98), e di glioma umano (GLI36) sono risultate tutte essere suscettibili all'infezione in vitro con BoHV-4 (figura 3.1).

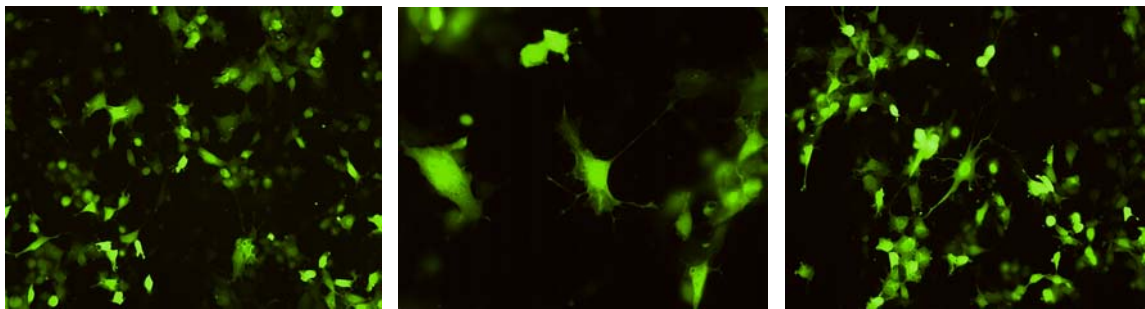


Figura 3.1 - Cellule GL261 (20x), F98 (40x) e GLI36 (20x), infettate con BoHV-4 da 72h. Le tre linee cellulari risultano essere suscettibili all'infezione ed esprimono il gene reporter per EGFP.

L'infezione ha indotto un effetto citopatico a carattere prevalentemente necrotico come è stato possibile determinare in base alla analisi elettroforetica della frammentazione del DNA cellulare (figura 3.2) dove è possibile notare come, nonostante sia presente del DNA frammentato, nella corsia delle cellule infettate con BoHV-4 è ben visibile una consistente banda di DNA non frammentato. Tale è stata confermata dai risultati della analisi morfologica delle tre linee cellulari. L'analisi morfologica ha dimostrato inoltre un significativo incremento della apoptosi nelle linee GL261 e GLI36 (Figura 3.3).

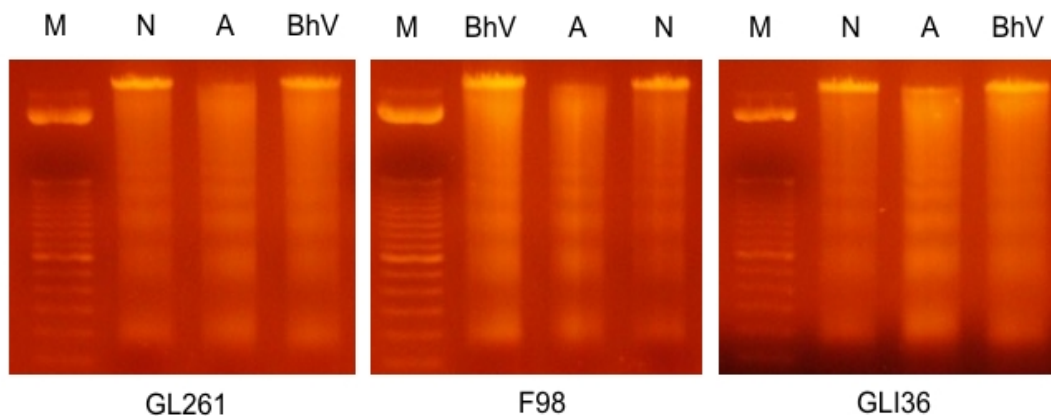


Figura 3.2 – Analisi della frammentazione del DNA su colture cellulari infettate da 72h con BoHV-4 (M – marker 100bp, N – cellule non infettate, A – cellule con apoptosi indotta, BhV – cellule infettate con BoHV-4). Si noti come le colture infettate presentino un incremento di DNA frammentato (indice di incremento di apoptosi), ma la presenza della banda di materiale genetico non frammentato suggerisce che un eventuale effetto citopatico è attribuibile anche a necrosi.

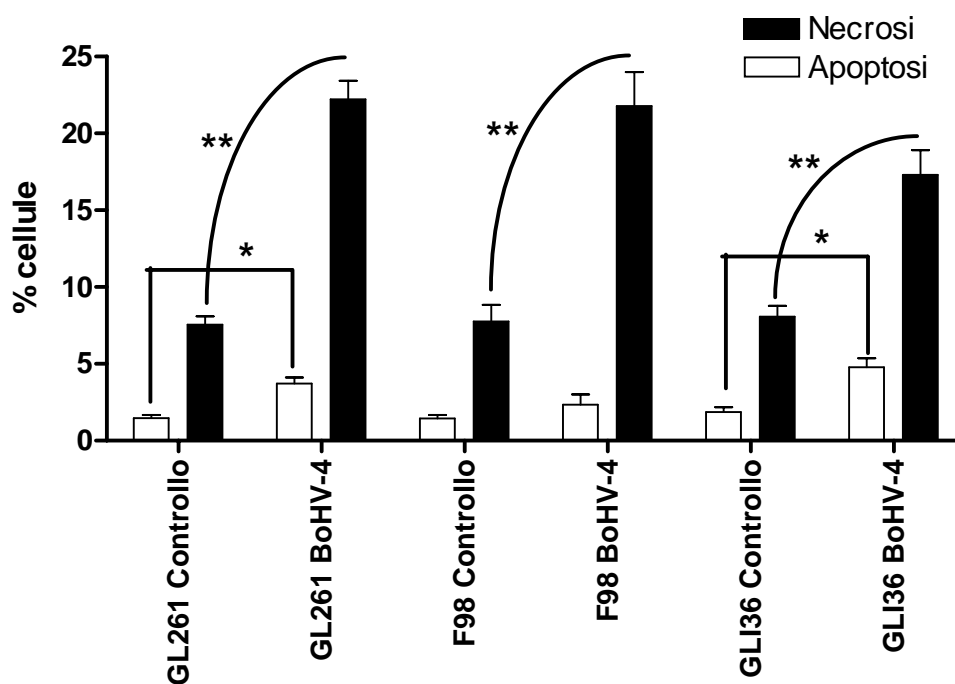


Figura 3.3 – Analisi della citotossicità mediante identificazione morfologica di necrosi ed apoptosi su colture infettate da 72h con BoHV-4 (ANOVA, ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$). L'analisi morfologica indica come BoHV-4 abbia un effetto citopatico prevalentemente di natura necrotica nelle tre linee. Tuttavia si riscontra un significativo aumento di apoptosi in GL261 ed F98.

In seguito è stata messa a punto la tecnica di marcatura PHK26red su cellule di glioma di ratto F98. Si è riscontrato che le cellule F98 così marcate non risentono del trattamento per quanto concerne la capacità replicativa ed il tasso di divisione. Le cellule F98 marcate con PHK26red sono state sottoposte ad infezione con BoHV-4 in vitro. Esse si sono infettate ed hanno espresso il gene reporter per la EGFP (figura 3.4)

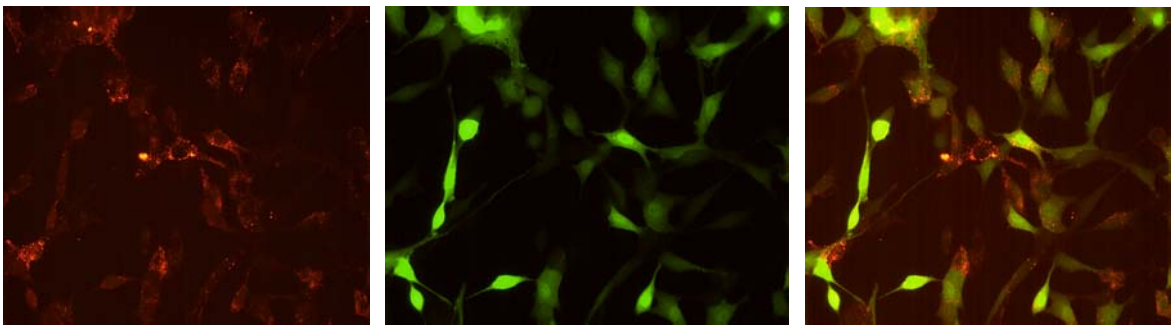


Figura 3.4 – Cellule F98 con colorazione PHK26red infettate con BoHV-4 da 72h, (a sinistra epifluorescenza rossa, al centro epifluorescenza verde, a destra sovrapposizione, 20x). La figura mostra come le cellule F98 marcate con PHK26red siano suscettibili all'infezione da BoHV-4 ed esprimano il genere reporter EGFP.

COLTURE PRIMARIE

Al fine di ampliare le conoscenze sulla capacità infettiva di BoHV-4 sono stati condotti una serie di esperimenti infettando una serie di colture primarie derivate da ratto Fischer. Come è possibile osservare in figura 3.5 colture primarie derivate da glia, bulbo olfattivo, ghiandola surrenale, cellule mesenchimali, cardiomiociti e macrofagi esprimono il gene reporter 72 ore dopo l'infezione.

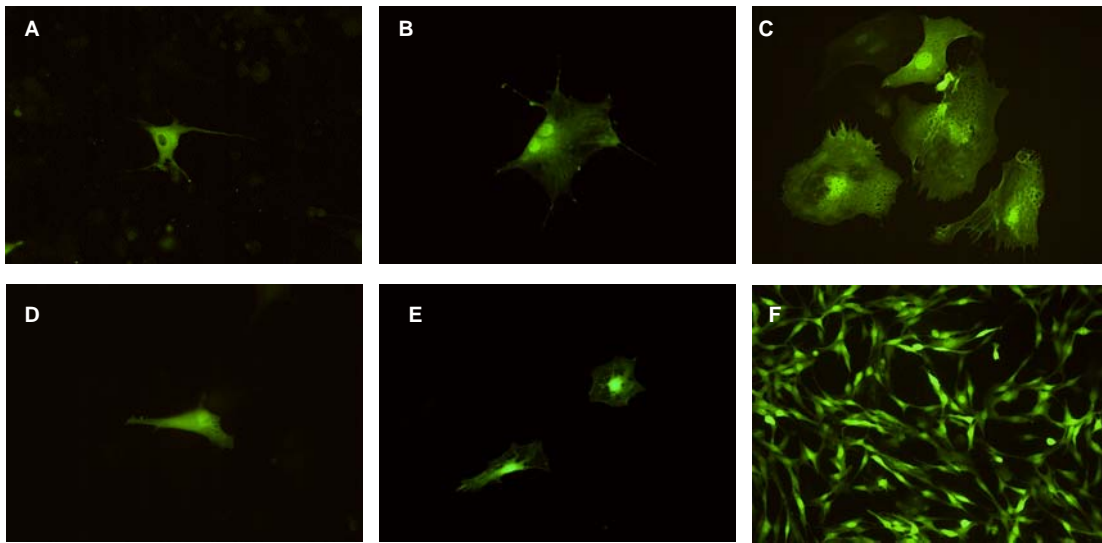


Figura 3.5 – Colture primarie di ratto Fischer infettate da 72 ore con BoHV-4, A - glia, B - bulbo olfattivo, C - ghiandola surrenale, D - cellule mesenchimali, E – cardiomiociti, F – macrofagi. Si osservi come le sei colture primarie riportate in figura risultino essere suscettibili all’infezione da BoHV-4 ed esprimano il gene reporter EGFP.

3.2 BoHV-4 IN VIVO: EFFETTI SUL SNC NORMALE

La valutazione dell’impiego di BoHV-4 per il trattamento delle neoplasie cerebrali ha imposto un passo obbligato al fine di poterne determinare la possibile adattabilità alla pratica clinica. È infatti condizione di notevole rilevanza che il candidato vettore non sia in grado di causare eventi patologici se inoculato in un encefalo sano. Pertanto la prima fase di esperimenti in vivo su topi Swiss e C57BL6J e ratti Wistar e Fischer ha dimostrato che BoHV-4 inoculato a livello del ventricolo cerebrale laterale:

- 1- non causa alcuna sintomatologia neurologica rilevabile nell’animale,
- 2 - non è associabile all’insorgenza di alcuna patologia,
- 3 - non è neuroncogeno.

Inoltre esso instaura una infezione con espressione del gene reporter a livello delle cellule della corrente migratoria rostrale (RMS - figura 3.6) e delle cellule endodimali (figura 3.7), tale infezione non è tuttavia replicativo-competente e non si

estende oltre il sessantesimo giorno post inoculo (Redaelli et al. 2008).

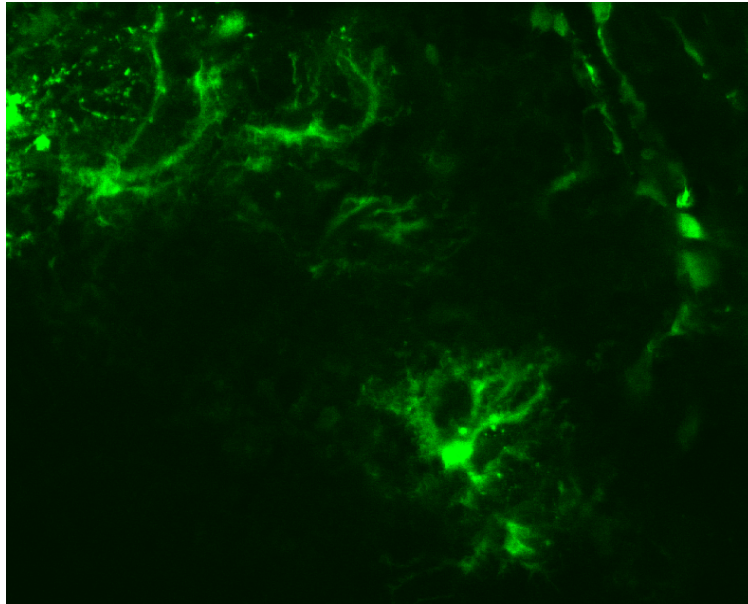


Figura 3.6 – Cellule della corrente migratoria rostrale di ratto Fischer 144 ore post inoculo. 60x olio epifluorescenza (sezione orizzontale - rostrale a sinistra). BoHV-4 se inoculato nel ventricolo laterale dell'encefalo di ratto è in grado di infettare ed esprimere il gene reporter EGFP nelle cellule della RMS e nelle cellule ependimali.

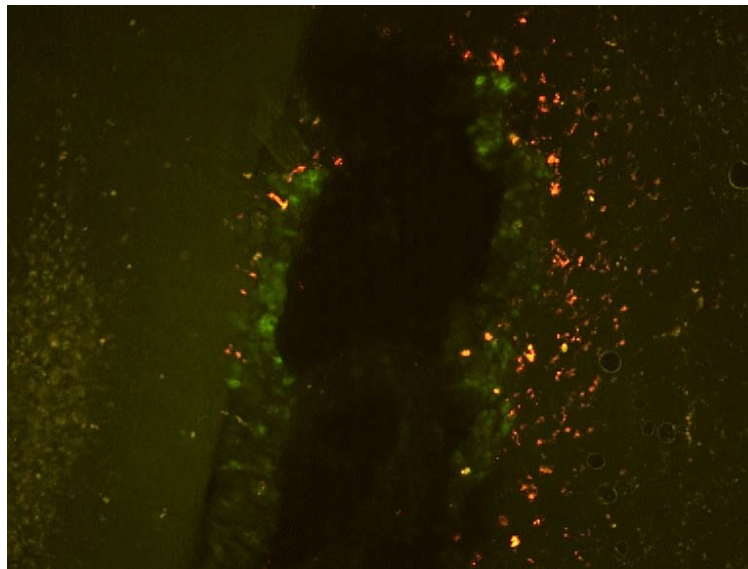


Figura 3.7 – Cellule ependimali di topo Swiss 144 ore post inoculo. 20x epifluorescenza (sezione orizzontale rostrale in alto). BoHV-4 se inoculato nel ventricolo laterale dell'encefalo di topo è in grado di infettare ed esprimere il gene reporter EGFP nelle cellule ependimali e nelle cellule della RMS.

Analisi immunohistochemiche hanno permesso di colocalizzare le cellule della RMS e le cellule esprimenti GFAP (figura 3.8)

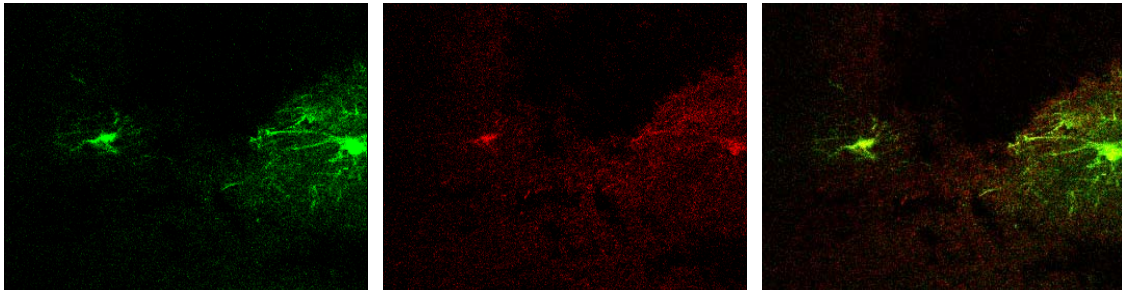


Figura 3.8 – Cellula della RMS di ratto infettata EGFP (sinistra), immunohistochemica anti-GFAP (centro), sovrapposizione (destra). 60x olio confocale. Le cellule infettate da BoHV-4 nella RMS risultano essere di natura astrogliale.

Parallelamente, grazie all'impiego del tracciante NeuroTrace™ che evidenzia le cellule neuronali ed all'uso di un microscopio confocale, è stato possibile determinare che BoHV-4 non infetta i neuroni in vivo (figura 3.9)

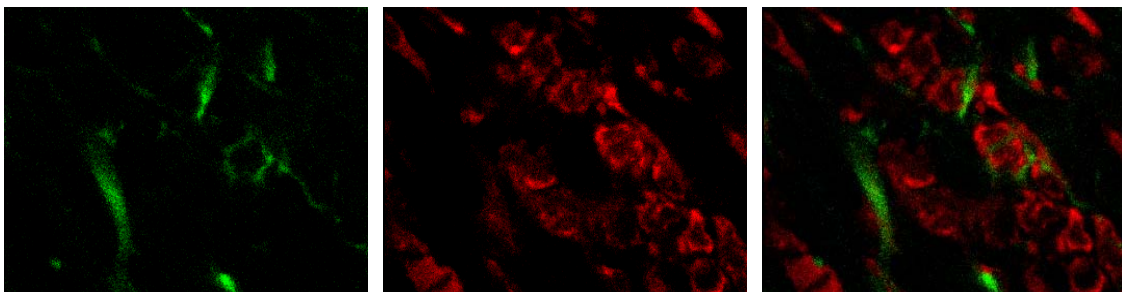


Figura 3.9 – Cellula della RMS di ratto infettata EGFP (sinistra), colorazione NeuroTrace™ (centro), sovrapposizione (destra). 60x in olio Confocale. Le cellule infettate da BoHV-4 nell'encefalo di ratto non risultano essere neuroni.

Infine, 4 giorni dopo la nascita, sono stati infettati 6 ratti neonati, che sono stati posti in monitoraggio per 18 mesi al fine di valutare le possibili implicazioni dell'impiego di BoHV-4 in un encefalo molto giovane. È stato così possibile determinare che l'inoculo di BoHV-4 non determina l'insorgenza di patologie, nonostante l'analisi istologica effettuata 30 giorni dopo l'infezione mostrasse una

ampia diffusione dell'espressione virale (figura 3.10) per 60 giorni dopo l'inoculo. Tale dato risulta essere molto interessante e necessita di ulteriori approfondimenti che sono allo stato attuale in corso.

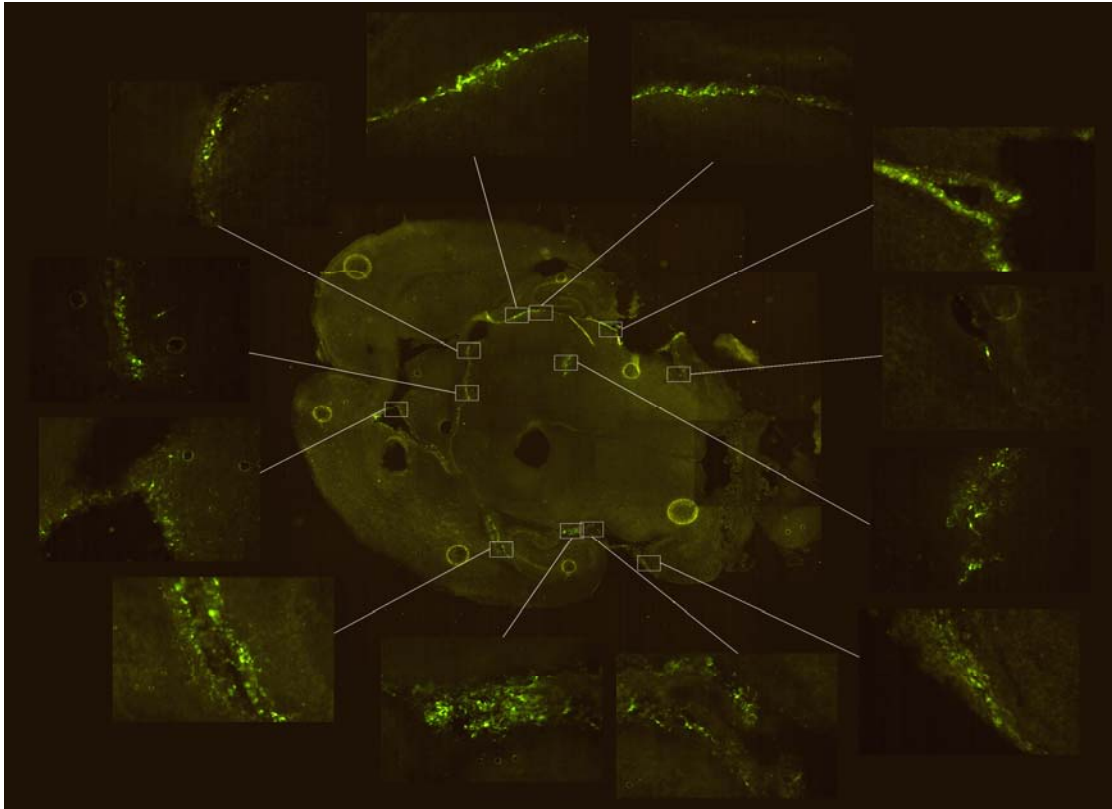


Figura 3.10 – sezione di encefalo di ratto Fischer di 34 giorni 30 giorni post inoculo di BoHV-4. 5x (20x gli inserti ingranditi) epifluorescenza. Dalla figura è possibile osservare come BoHV-4 se inoculato nel ventricolo laterale di un encefalo di ratto giovane presenta una infezione ed espressione del gene reporter EGFP, molto più diffusa che nell'adulto, senza patologia rilevabile.

3.3 BoHV-4 IN VIVO: EFFETTI SUI GLIOMI SPERIMENTALI

Su tre tumori di ratto indotti mediante inoculo di cellule F98 è stata praticata una biopsia, il materiale asportato è stato dissociato e piastrato in coltura al fine di ottenere una coltura primaria. Tali colture si sono dimostrate infettabili da BoH-4 (figura 3.11).

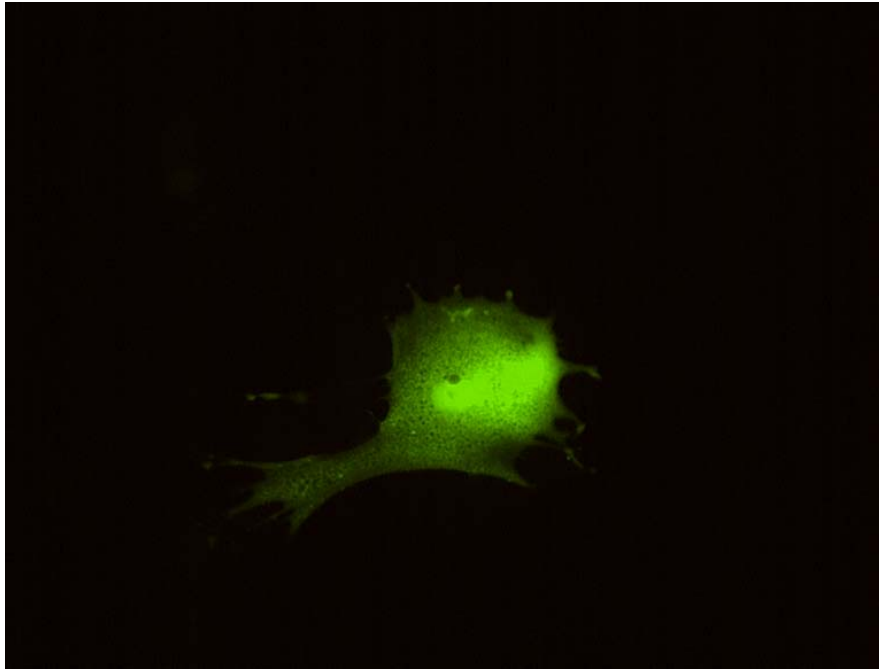


Figura 3.11 – cellula derivata da biopsia di massa tumorale F98 72h dopo l’infezione in vitro con BoHV-4, 20x epifluorescenza. La figura mostra come BoHV-4 sia in grado di infettare e di esprimere il gene reporter EGFP in cellule derivate da glioma F98.

In 8 ratti Fischer è stato praticata l’induzione di glioma mediante l’inoculo di cellule F98. È stato accertato, mediante analisi della sintomatologia neurologica indotta e monitoraggio del calo ponderale, che la massa tumorale fosse presente. Quindi è stato praticato un inoculo di sospensione virale nella sede di impianto delle cellule tumorali. A distanza di 48, 60, 72, 86, 120, 132, 216 ore dell’inoculo del virus gli animali sono stati sacrificati mediante sovradosaggio di anestetico e perfusione. L’analisi delle sezioni istologiche in epifluorescenza ha evidenziato che il virus era in grado di infettare le cellule della massa tumorale. Le immagini riportate nelle figure da 3.12 a 3.18 mostrano come l’infezione interessi le aree marginali della massa (tutte le immagini che seguono sono sezioni orizzontali con orientamento rostrale in alto).

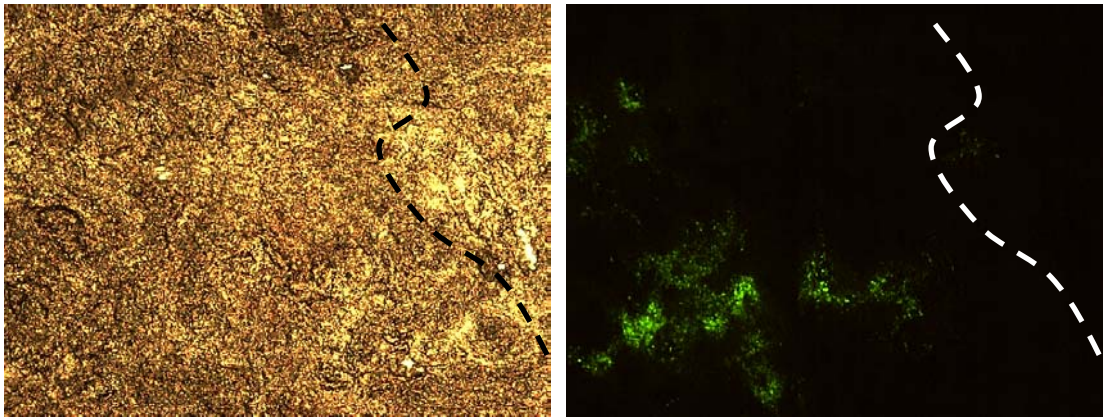


Figura 3.12 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale accertata 48 ore post inoculo di BoHV-4 nella medesima sede di inoculo di F98 . 5x luce diretta a sinistra, epifluorescenza a destra. Si noti come in sole 48 ore il virus sia in grado di infettare ed esprimere il gene reporter EGFP nell'area di inoculo.

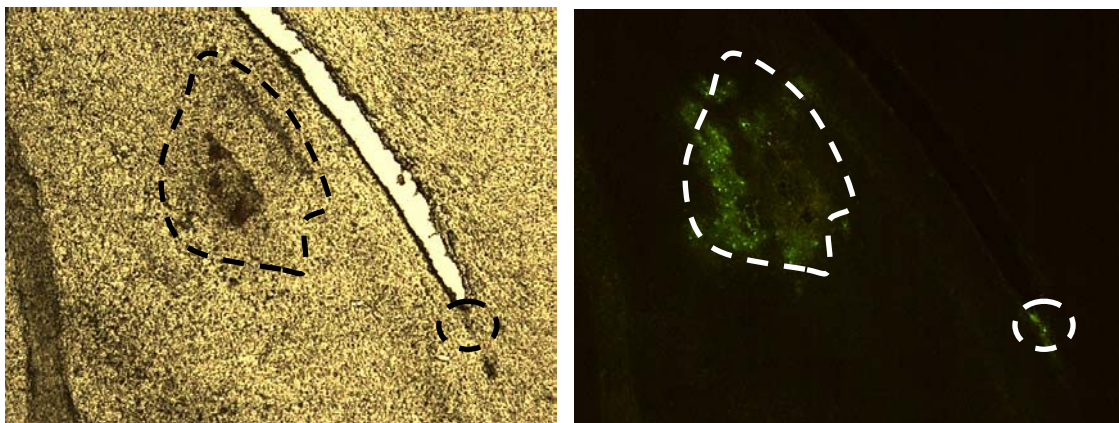


Figura 3.13 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale accertata 60 ore post inoculo di BoHV-4 nella medesima sede di inoculo di F98. 5x luce diretta a sinistra, epifluorescenza a destra. In questa figura è possibile osservare come l'area del tumore sia infettate diffusamente e vi sia una seconda area di infezione a margine del ventricolo laterale

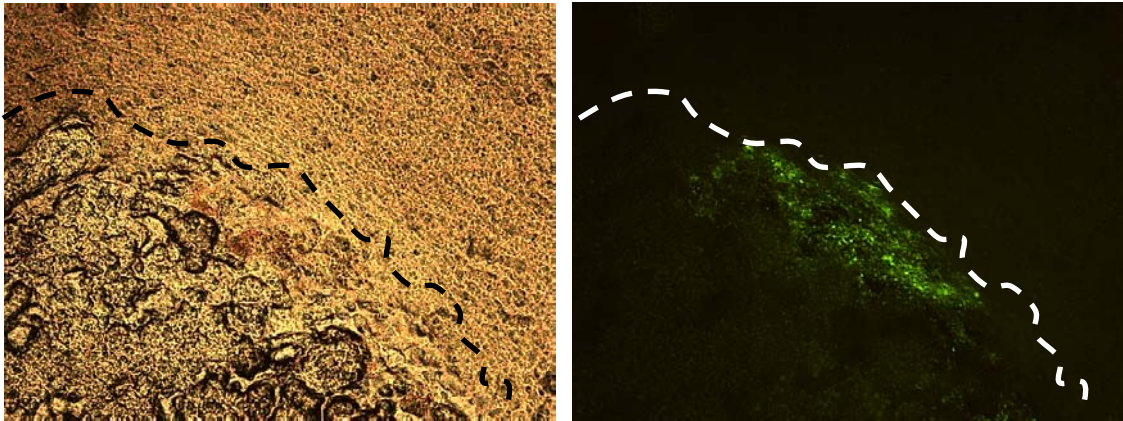


Figura 3.14 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale accertata 72 ore post inoculo di BoHV-4 nella medesima sede di inoculo di F98. 5x luce diretta a sinistra, epifluorescenza a destra. È possibile osservare come il margine della massa sia interessato dall'infezione che non si estende nel tessuto sano ed all'interno della massa ove probabilmente è presente necrosi.

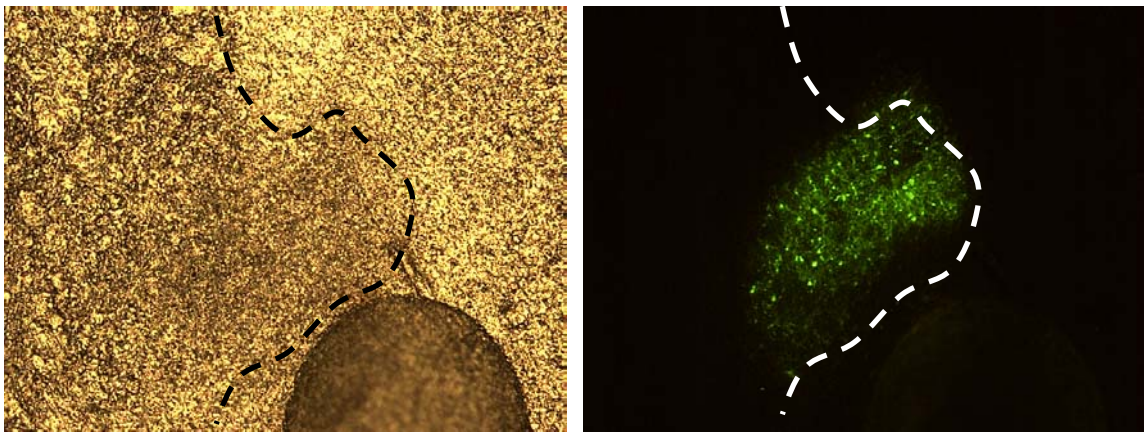


Figura 3.15 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale accertata 86 ore post inoculo di BoHV-4 nella medesima sede di inoculo di F98. 5x luce diretta a sinistra, epifluorescenza a destra. In questa figura si può facilmente notare come l'infezione colpisca diffusamente il lembo della massa tumorale ove è stato praticato l'inoculo di virus.

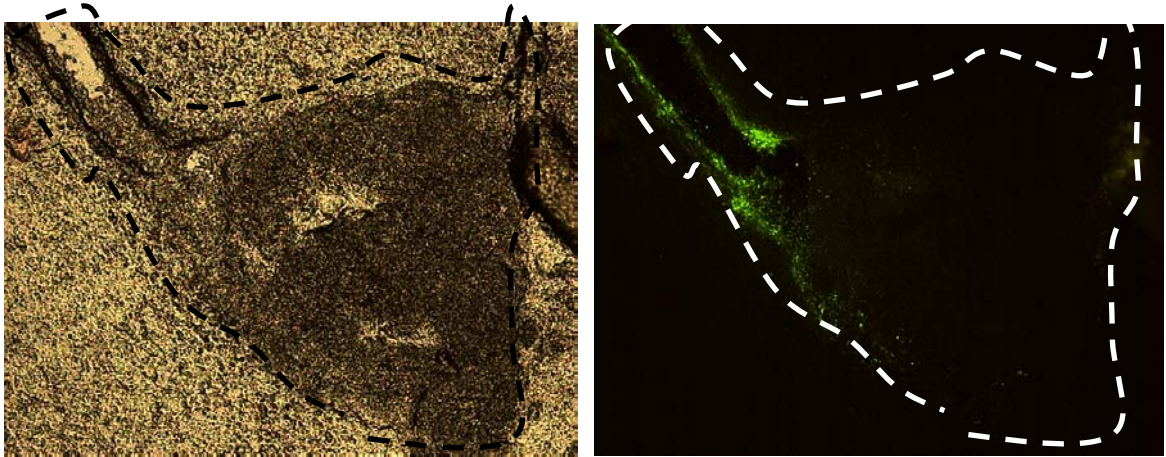


Figura 3.16 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale accertata 120 ore post inoculo di BoHV-4 nella medesima sede di inoculo di F98. 5x luce diretta a sinistra, epifluorescenza a destra. La particolarità di questa figura consiste nel fatto che risulta visibile in alto a sinistra il foro attraverso cui è stato inoculato il virus, interessante è notare sia come il foro stesso venga invaso da cellule suscettibili all'infezione, sia come l'infezione stessa interessi il margine della massa, a partire dal punto di inoculo.

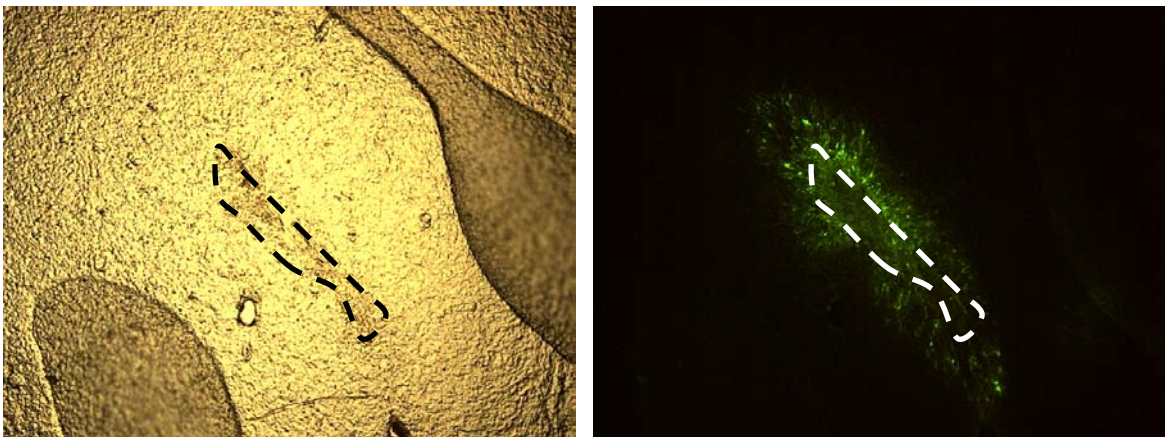


Figura 3.17 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale accertata 132 ore post inoculo di BoHV-4 nella medesima sede di inoculo di F98. 5x luce diretta a sinistra, epifluorescenza a destra. In questo caso è possibile notare come la massa di ridotte dimensioni venga totalmente interessata dall'infezione.

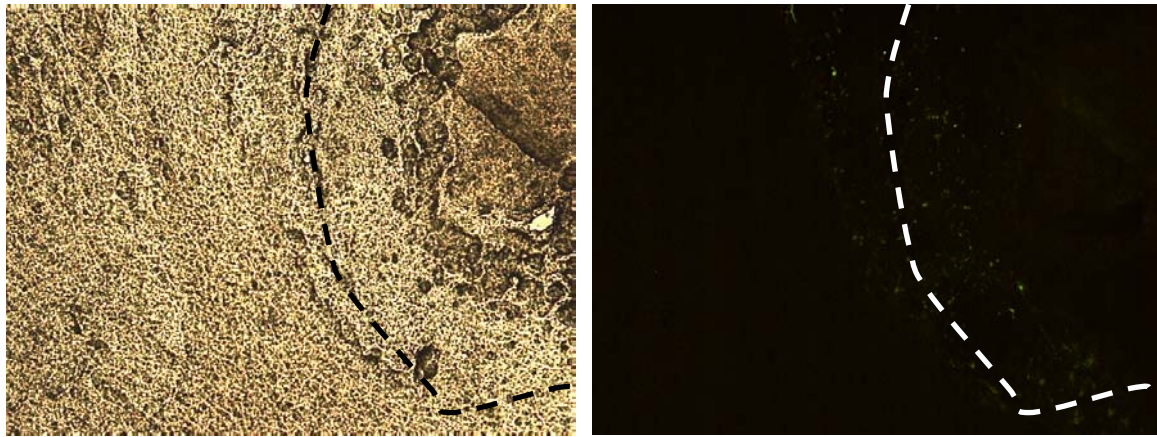


Figura 3.18 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale accertata 216 ore post inoculo di BoHV-4 nella medesima sede di inoculo di F98. 5x luce diretta a sinistra, epifluorescenza a destra. Questa figura evidenzia come le cellule colpite da infezione siano diffuse prossimalmente al margine della massa.

Un fattore su cui porre l'attenzione è che quando la massa tumorale presenta un'area necrotica (fig 3.13, 3.14, 3.16, 3.18) questa viene risparmiata dall'infezione a sottolineare come lo stato della cellula sia un criterio per determinarne la suscettibilità all'infezione. Tale affermazione viene suffragata in particolare dalla figura 3.17 ove è possibile osservare come la massa tumorale, di dimensioni ridotte, venga colpita dall'infezione nella sua totalità essendo in una fase di sviluppo.

In ultimo è bene sottolineare come il parenchima cerebrale peritumorale non risulti essere suscettibile all'infezione, tale informazione risulta essere di notevole rilievo per un eventuale impiego terapeutico sicuro.

I tumori cerebrali cistici presentano una diffusione limitata rispetto i tumori di natura solida, essi sono tuttavia documentati in letteratura per le loro particolari caratteristiche sia eziologiche che morfologiche (Lee et al. 2008, Graça et al. 2006). Durante il presente studio si è presentato un caso di tumore cistico in ratto Fischer, la cisti è stata trattata mediante l'inserzione di un catetere che ha permesso di drenarne il liquido contenuto e di introdurre nella cisti la sospensione virale. Dopo 96 ore le sezioni di encefalo sono state analizzate mediante microscopio ad epifluorescenza, evidenziando come il margine solido della cisti era infettato (Figura 3.19).

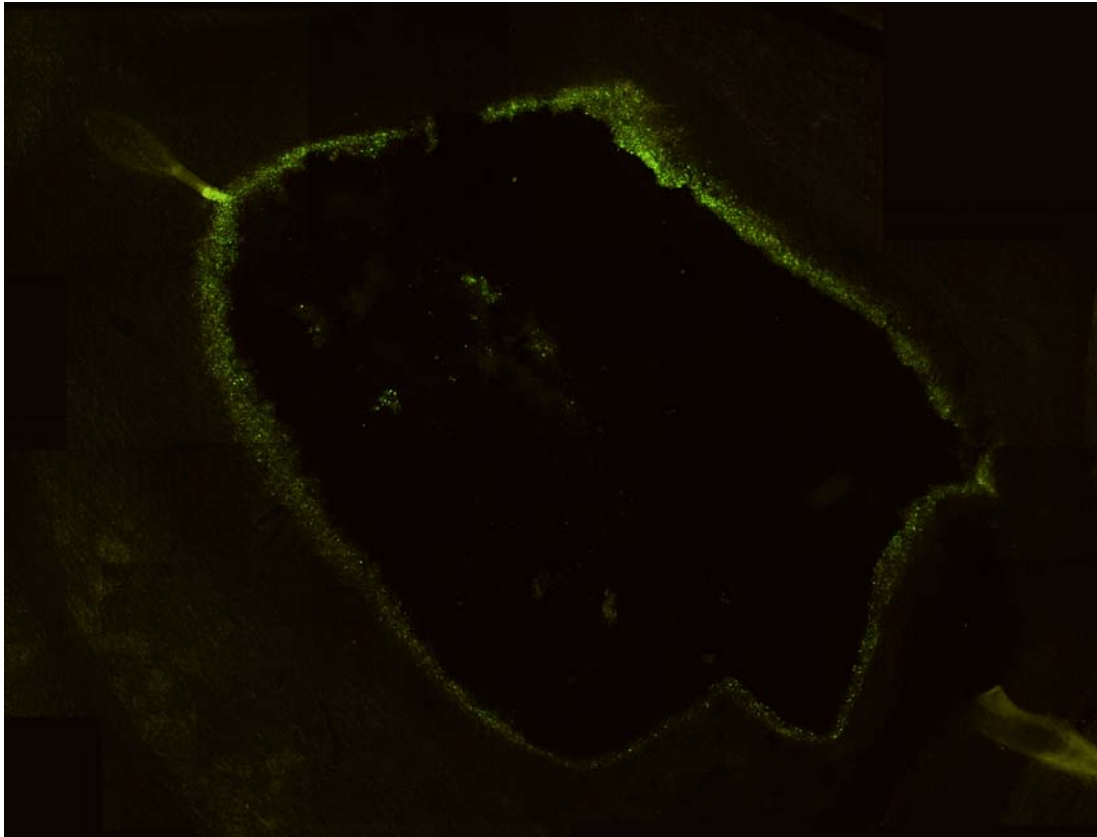


Figura 3.19 – sezione di encefalo di ratto Fischer con tumore cistico accertato, 96 ore post inoculo di BoHV-4 a sostituzione parziale del liquido ivi contenuto. 5x luce epifluorescenza. Si noti come il margine solido della cisti risulti essere interessato dall'infezione.

Visti i risultati ottenuti, il passo successivo è stato dare evidenza definitiva che le cellule infettate facessero effettivamente parte della massa tumorale. Per questo sono state impiegate le cellule F98 marcate con PHK26red che inoculate nell'encefalo di ratto Fischer danno origine ad una massa che presenta una fluorescenza di colore rosso se osservata con il microscopio ad epifluorescenza. È stato quindi possibile infettare con BoHV-4 tale massa ed il risultato istologico mostra che le aree infettate fanno parte della massa tumorale (figura 3.20).

Inoltre le sezioni istologiche sono state analizzate con microscopio confocale (Nikkon D2). Le cellule esprimenti EGFP si trovavano solo nell'area delle cellule tumorali rosse fluorescenti (figura 3.21) e non nel parenchima sano.

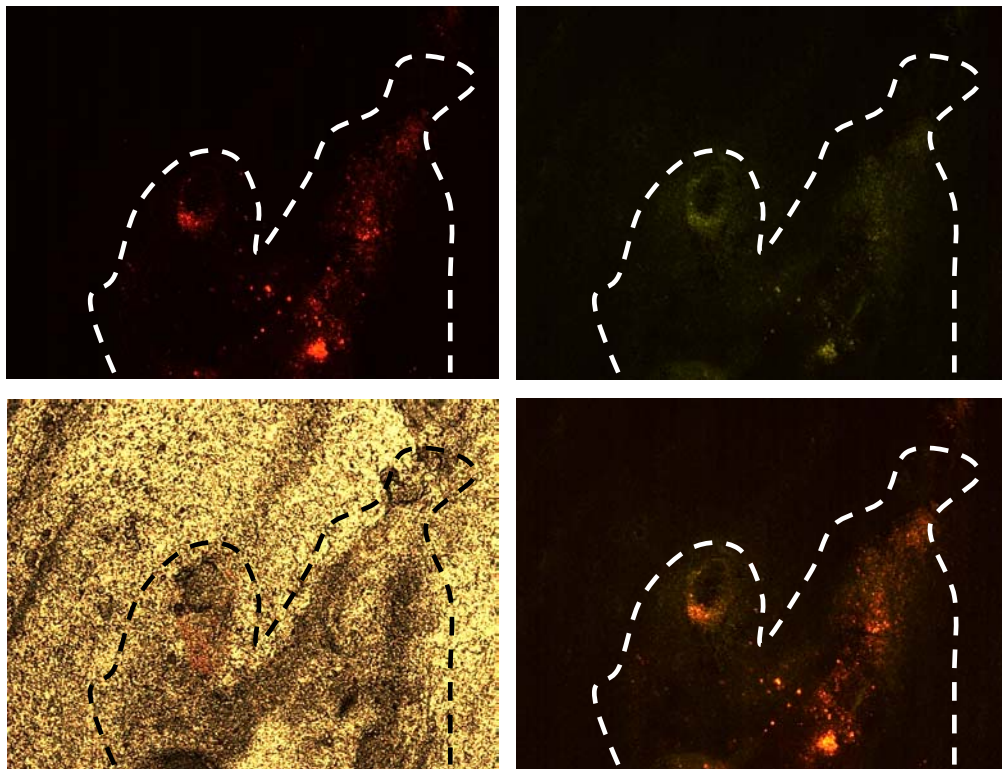


Figura 3.20 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale F98PHK26red accertata 48 ore post inoculo di BoHV-4 nella medesima sede di inoculo di F98. 5x. epifluorescenza rossa in alto a sinistra, EGFP in alto a destra, luce diretta in basso a sinistra, sovrapposizione in basso a destra. In questa figura è importante notare come le aree interessate dall'infezione coincidano solo con le aree marcate in rosso a dimostrazione che l'infezione non interessa il parenchima cerebrale.

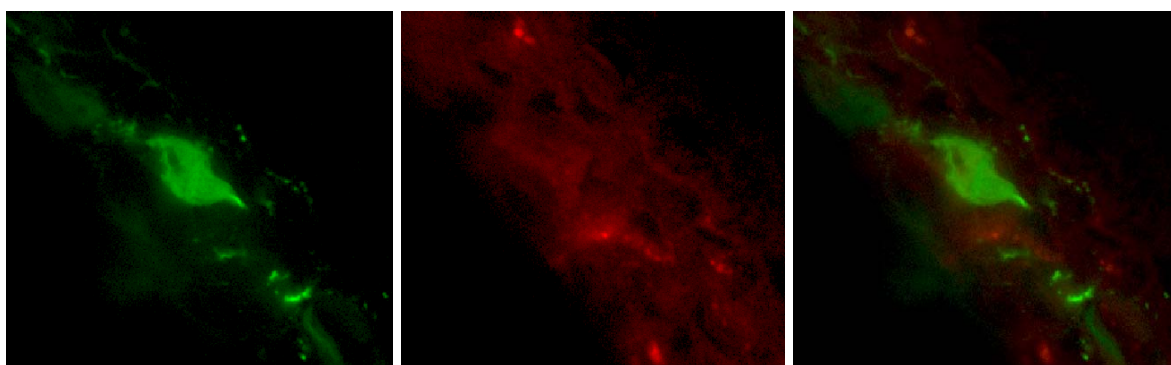


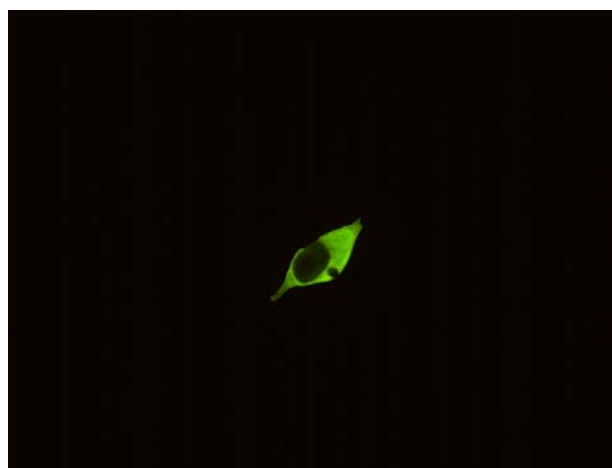
Figura 3.21 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale F98PHK26red accertata 48 ore post inoculo di BoHV-4 nella medesima sede di inoculo di F98. 60x confocale EGFP a sinistra, epifluorescenza rossa al centro e sovrapposizione a destra. Le immagini ottenute mediante microscopia confocale confermano quanto sostenuto nella figura precedente, ovvero che BoHV-4 non estende la sua infezione al parenchima sano.

3.4 BoHV-4 IN VITRO: COLTURE PRIMARIE DA BIOPSIA NEUROCHIRURGICA UMANA

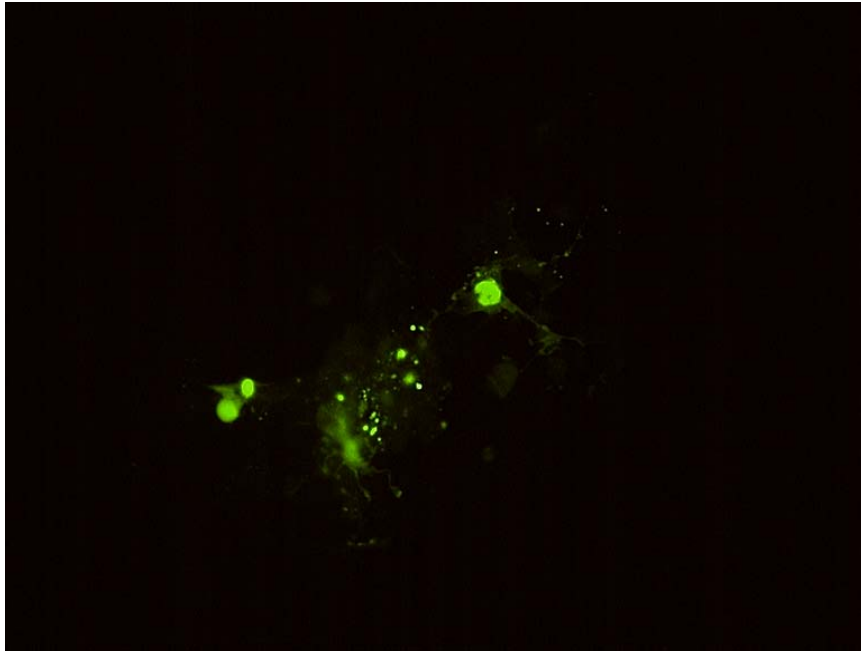
Visti i risultati ottenuti è stata sviluppata la collaborazione tra il laboratorio di neurofisiologia e l'equipe neurochirurgica del Prof Domenico D'Avella del Dipartimento di Neuroscienze, in modo da ottenere del materiale proveniente dalle masse tumorali al fine di sviluppare colture cellulari primarie, sulle quali testare l'efficacia di BoHV-4. Alcuni mesi sono stati impegnati per la messa punto dei protocolli di dissociazione e di gestione delle colture derivate da biopsie umane; ma anche per la standardizzazione dei protocolli di trasferimento del materiale neurochirurgico dalla sala operatoria al laboratorio.

In questo periodo le colture sono state infettate con BoHV-4 fornendo dei risultati incoraggianti, in particolare sono risultati suscettibili all'infezione:

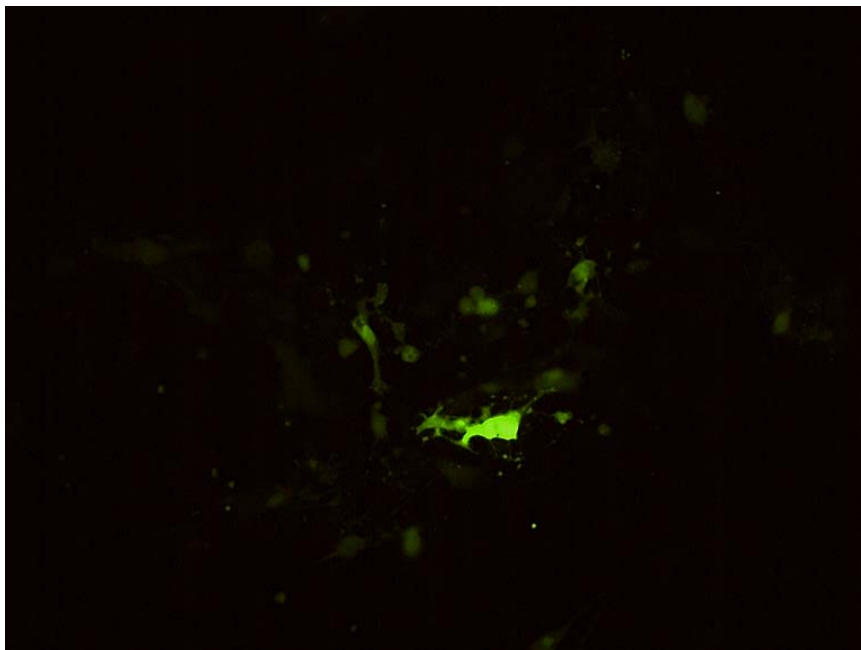
- una coltura derivata da glioblastoma (paziente di 17 anni - figura 3.22),
- una coltura derivata da recidiva linfoma non Hodgkin a grandi cellule ad alta malignità (paziente di 69 anni - figura 3.23),
- una coltura derivata da glioblastoma di IV grado (paziente di 63 anni - figura 3.24).



P7 Figura 3.22 – coltura cellulare derivata da glioblastoma 72 ore dopo l'infezione da BoHV-4, 40x epifluorescenza. Nella foto una cellula in coltura che risulta essere suscettibile all'infezione da BoHV-4 ed esprime il gene reporter EGFP.



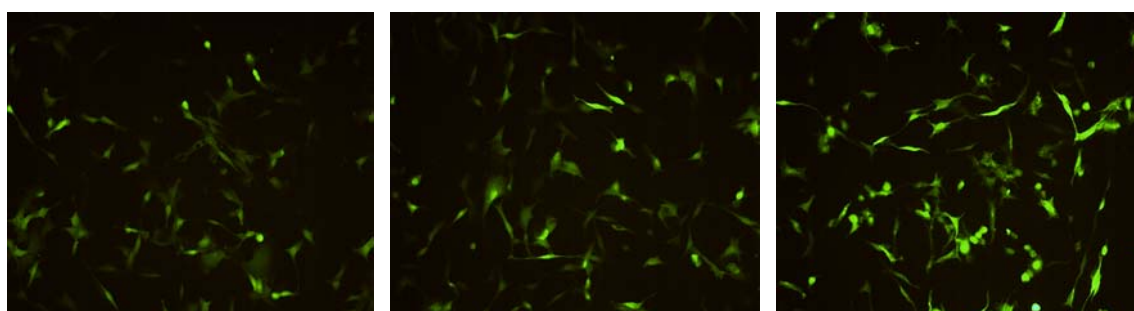
P16 Figura 3.23 – coltura cellulare derivata da recidiva di linfoma non Hodgkin a grandi cellule ad alta malignità 72 ore dopo l'infezione da BoHV-4, 40x epifluorescenza. Si noti come le cellule presenti risultino essere suscettibili all'infezione da BoHV-4 ed esprimano il gene reporter EGFP.



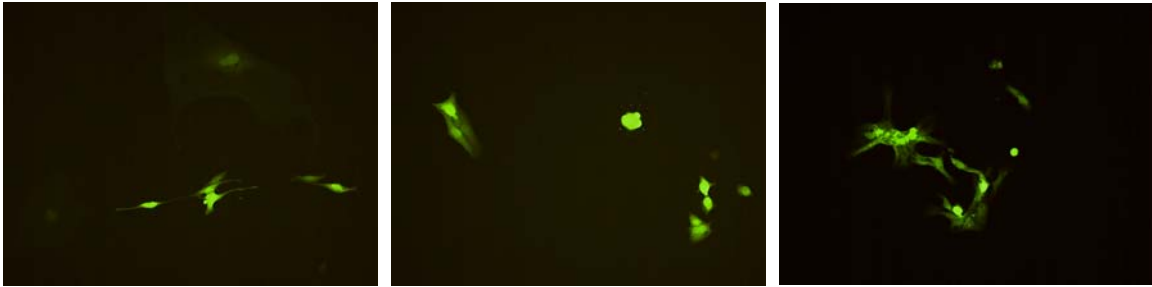
P17 Figura 3.24 – coltura cellulare derivata da glioblastoma di IV grado 72 ore dopo l'infezione da BoHV-4, 40x epifluorescenza. È possibile osservare come le cellule presenti risultino essere suscettibili all'infezione da BoHV-4 ed esprimano il gene reporter EGFP.

Dopo una migliore messa a punto delle tecniche e dei protocolli di trasferimento è stato possibile ottenere colture molto più dense che hanno permesso anche di seguire seppur limitatamente il progresso dell'infezione. Anche in questi casi le colture si sono dimostrate essere suscettibili all'infezione in particolare:

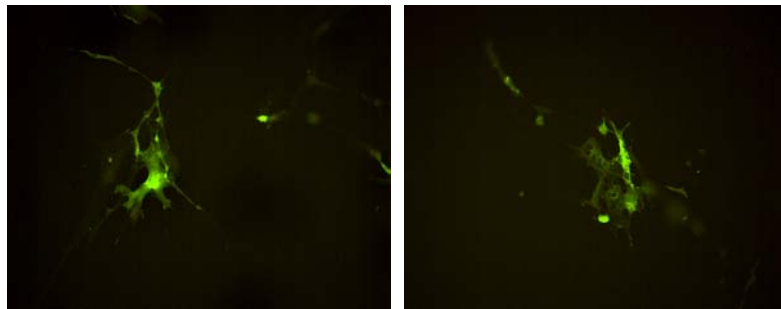
- una coltura derivata da glioblastoma di IV grado (59 anni - figura 3.25),
- una coltura derivata da neoplasia epitelioromorfa con atipie e mitosi (42 anni - figura 3.26),
- una coltura derivata da meningioma meningoteliosomatoso (paziente di 62 anni - figura 3.27), in questo ultimo caso l'effetto citopatico del virus è stato particolarmente importante ed ha portato alla morte della coltura prima delle 72 ore,
- una coltura derivata da medulloblastoma (paziente di 4 anni - figura 3.28), in questo ultimo caso l'effetto citopatico del virus è stato particolarmente importante ed ha portato alla morte della coltura prima delle 48 ore,
- una coltura derivata da recidiva di sarcoma di Ewing (paziente di 17 anni - figura 3.29),
- una coltura derivata da glioblastoma di IV grado (paziente di 79 anni - figura 3.30),
- una coltura derivata da meningioma (paziente di 77 anni - figura 3.31).



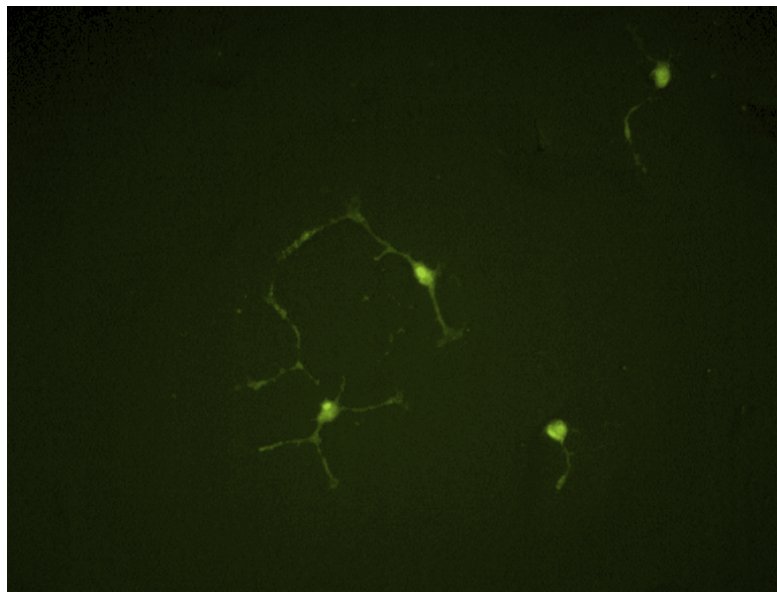
P26 Figura 3.25 – coltura cellulare derivata da glioblastoma di IV grado 24, 48, 72 ore dopo l'infezione da BoHV-4, 40x epifluorescenza. È possibile osservare come l'intensità del segnale EGFP cresce col perdurare dell'infezione.



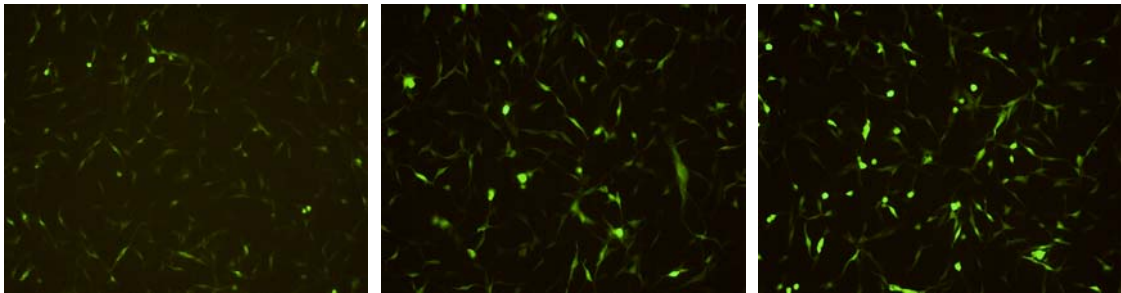
P27 Figura 3.26 – coltura cellulare derivata da neoplasia epiteliorfa con atipie e mitosi 24, 48, 72 ore dopo l’infezione da BoHV-4, 40x epifluorescenza. In questa figura si può osservare come le cellule in coltura siano suscettibili all’infezione ed esprimano il gene reporter EGFP.



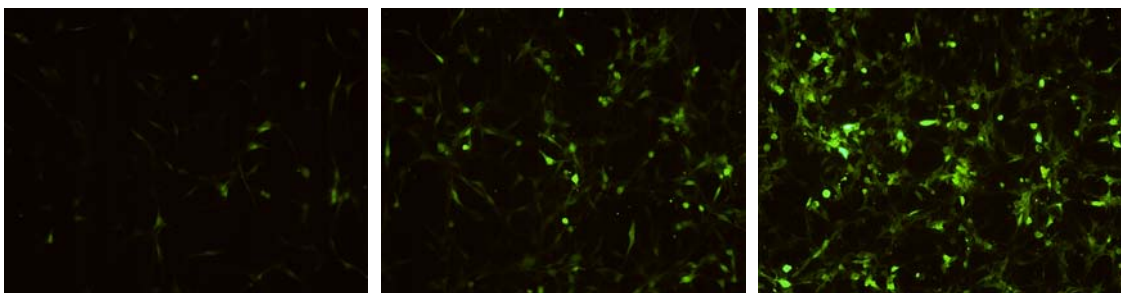
P28 Figura 3.27 – coltura cellulare derivata da meningioma meningoteliomatoso 24, 48 ore dopo l’infezione da BoHV-4, 40x epifluorescenza. In questo caso l’infezione ha prodotto un effetto citopatico tale per cui le cellule in coltura non sono sopravvissute sino alle 72h.



P29 Figura 3.28 – coltura cellulare derivata da medulloblastoma 24 ore dopo l’infezione da BoHV-4, 20x epifluorescenza. L’infezione ha prodotto un effetto citopatico tale per cui le cellule in coltura non sono sopravvissute sino alle 48h.



P31 Figura 3.29 – coltura cellulare derivata da sarcoma di Ewing 24, 48, 72 ore dopo l’infezione da BoHV-4, 20x epifluorescenza. È possibile osservare come l’intensità del segnale EGFP cresca col perdurare dell’infezione.



P26 Figura 3.30 – coltura cellulare derivata da glioblastoma di IV grado 24, 48, 72 ore dopo l’infezione da BoHV-4, 40x epifluorescenza. Si noti come l’intensità del segnale EGFP cresca col perdurare dell’infezione.

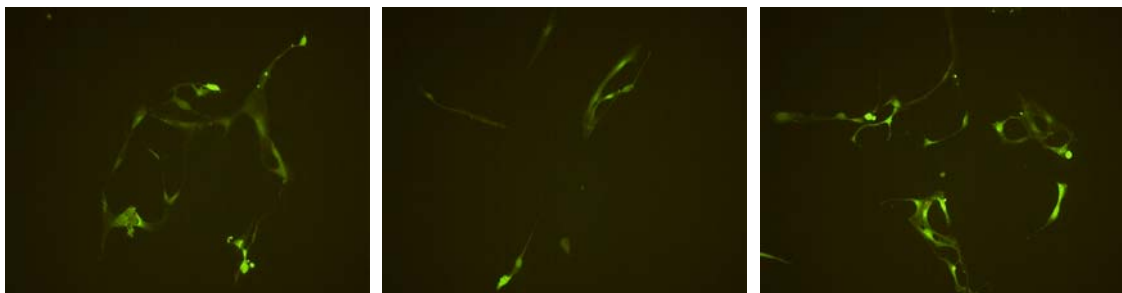


Figura 3.31 – coltura cellulare derivata da meningioma 24, 48, 72 ore dopo l’infezione da BoHV-4, 20x epifluorescenza. In questa figura si può osservare come le cellule in coltura siano suscettibili all’infezione ed esprimano il gene reporter EGFP.

3.5 SUPERARRAY SU CELLULE INFETTATE CON BoHV-4

L'impiego di Superarray ha consentito di monitorare gli effetti dell'infezione con BoHV-4 sull'espressione genica in cellule GL261 di glioblastoma di topo. Le analisi hanno rilevato su 128 geni legati al ciclo cellulare delle differenze assolute che coinvolgono un totale di 9 geni che vengono attivati o inibiti dall'infezione con BoHV-4 (rispettivamente 5 inibiti e 4 attivati). Nella figura 4.31 vengono evidenziati con marcatura rossa i geni che risultano essere attivati in modo differente dopo l'infezione.

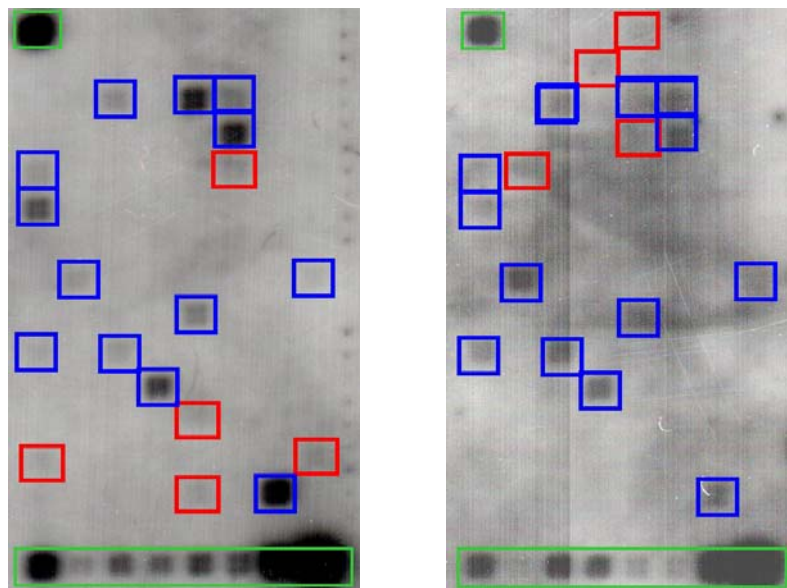


Figura 3.32 – Superarray su cellule GL261 in crescita normale a sinistra e infettate con BoHV-4 a destra, in verde: marker standard interni, in blu spot in comune, in rosso spot differenti. Si noti come l'infezione con BoHV-4 causi l'inibizione di 5 geni e l'attivazione di 5 geni rispetto al controllo.

Sulla base di quanto osservabile in figura 3.32, risulta evidente come alcuni geni siano modulati differentemente in caso di infezione da BoHV-4, tuttavia in questa sede si è deciso di commentare solo i geni attivati o inibiti in presenza dell'infezione. È possibile riassumere i risultati in uno schema suddiviso in due parti: la prima dove vengo presentati brevemente i geni attivati e la seconda dove

vengono presentati quelli inibiti in seguito all'infezione. I dati presentati derivano da ricerche condotte mediante l'ausilio dei database del National Health Institute. A fianco di ciascun gene viene riportato brevemente il ruolo rivestito in riferimento al ciclo cellulare.

Geni attivati

A_{ppb2} – (amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2)

Regolazione negativa del ciclo cellulare.

Codifica per una proteina precursore della beta amiloide (A4)

Camk2_g – (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma)

Coinvolto negli eventi della Fase G1 e nella transizione da G1 a S.

Codifica per la protein chinasi Calcio/calmodulino dipendente II gamma

Cdk2 – (cyclin-dependent kinase 2)

Coinvolto negli eventi della fase M.

Codifica per la protein chinasi ciclina dipendente 2

Cdkn1_b – (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B)

Coinvolto nel controllo o arresto del ciclo cellulare

Inibitore 1B delle protein chinasi ciclina dipendenti

Geni inibiti

Cdkn2_d – (cyclin-dependent kinase inhibitor 2D)

Regolazione negativa del ciclo cellulare.

Inibitore 2D delle protein chinasi ciclina dipendenti

R_{hou} – (ras homolog gene family, member U)

Coinvolto negli eventi della Fase G1 e nella transizione da G1 a S.

Membro U della famiglia dei geni omologhi che codificano per le proteine Ras.

Shc1 – (SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1)

Coinvolto negli eventi della fase M.

Codifica come omologo per la proteina di trasformazione 1.

Sumo1 – (SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1)

Coinvolto nella replicazione DNA

Gene omologo e soppressore di mif 2.

Trp53 – (transformation related protein 53)

Regolazione negativa del ciclo cellulare.

Codifica per la proteina p53.

3.6 DISTRIBUZIONE DELLE PROTEIN CHINASI AMPc-dipendenti NEI TUMORI CEREBRALI

In figura 4.32 viene mostrato un Western blot effettuato su estratti proteici solubili ed insolubili derivati da colture primarie di glia (corsie 1,2,5,6) di topo e da colture di glioblastoma di topo GL261 (corsie 3,4,7,8), incubato con anticorpi primari anti-PKARI (corsie da 1 a 4) e anti-PKARII (corsie da 5 a 8). Entrambe le proteine sono presenti maggiormente nella frazione insolubile (corsie pari).

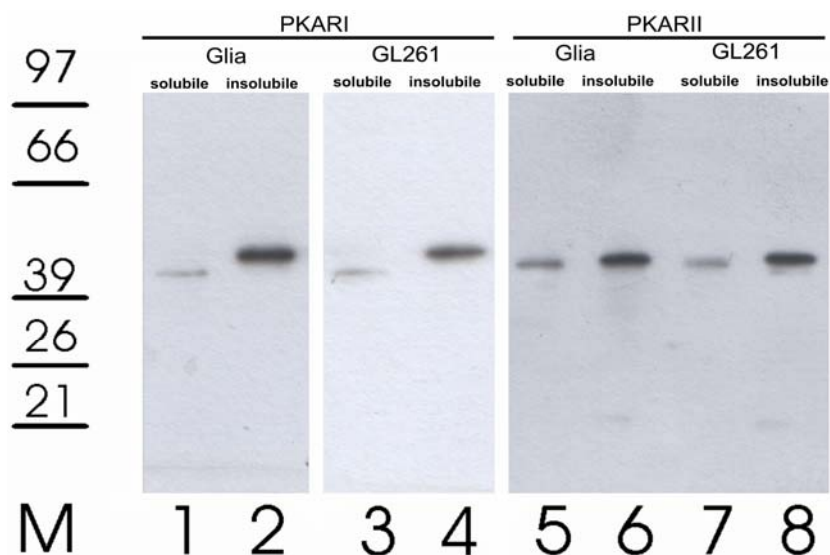


Figura 4.32 – Western blot effettuato su estratti proteici da coltura di glia primaria di topo e GL261 con anticorpi primari anti-PKARI e PKARII (M: marker peso molecolare – 1,5: glia primaria solubile RI e RII – 2,6: glia primaria insolubile RI e RII – 3,7: GL261 solubile RI e RII – 4,8: GL261 insolubile RI e RII). Sinodi come entrambe le subunità proteiche siano rilevabili nei campioni e come siano maggiormente presenti nella frazione insolubile.

Parallelamente sono state condotte analisi immunohistochimiche su cellule di glioma di ratto F98 cresciute aderenti su vetrino. Tali analisi evidenziano come le subunità regolatorie RII α siano concentrate in un cluster a ridosso del nucleo (figura 4.33).

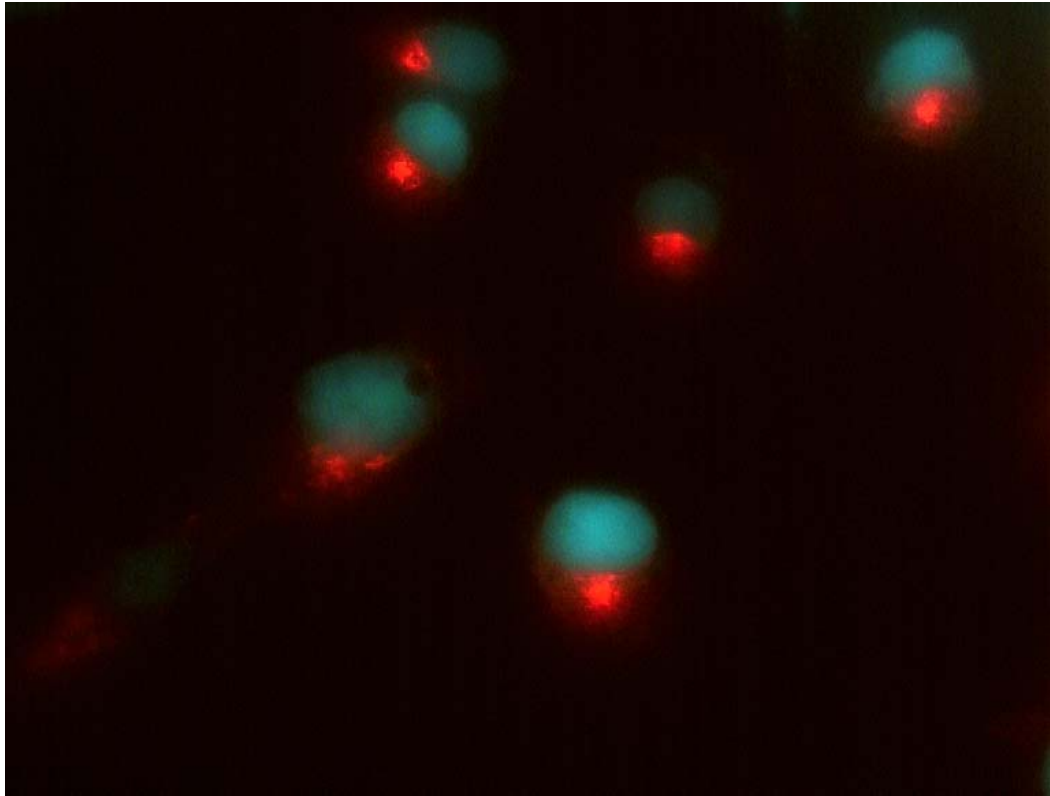


Figura 4.33 – cellule F98 incubate con anticorpo anti-PKARII α (rossa) e contro-colorazione DAPI (blu), 100x olio epifluorescenza. Si noti come PKARII α presentino una distribuzione peculiare in un cluster a ridosso del nucleo.

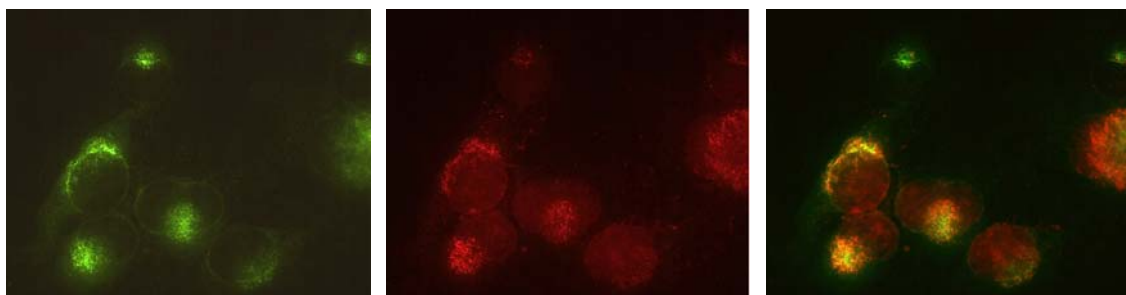


Figura 4.34 – cellule F98 incubate con anticorpo anti-PKARII α (verde a sinistra) e anti-Golgina97 (rossa al centro) e sovrapposte (a destra), 100x olio epifluorescenza. Questa figura dimostra come PKARII α sia colocalizzata con la rete di interscambio dell'apparato di Golgi rivelato dall'anticorpo anti-Golgina97.

Le successive indagini immunohistochemiche hanno evidenziato una colocalizzazione tra la distribuzione di PKARII α e la marcatura con anti-Golgina97 un marker della rete di interscambio dell'apparato di Golgi (figura 4.34).

Gli studi immunohistochemici in vivo evidenziano in primo luogo come le subunità PKARII α presentino la stessa peculiare distribuzione anche a livello delle masse tumorali indotte in ratto Fischer mediante l'inoculo di cellule F98, in contrasto rispetto al parenchima sano (figura 4.35). Inoltre la marcatura si presenta come nei test in vitro: un cluster a ridosso del nucleo (figura 4.36).

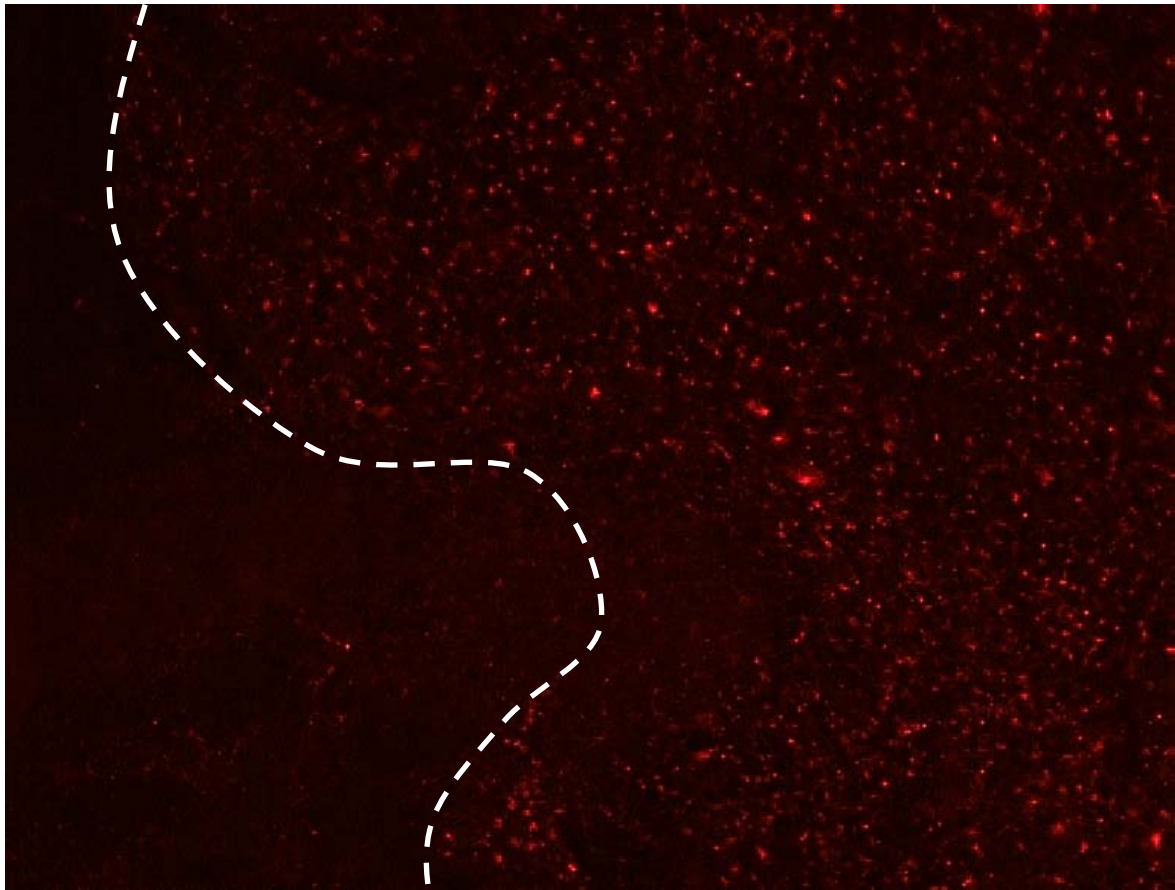


Figura 4.35 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale con anticorpo anti-PKARII α (rosso), la linea tratteggiata indica il margine del tumore, 20x epifluorescenza. In questa figura è possibile osservare come la peculiare distribuzione di PKARII α nelle cellule di glioma permette di operare una distinzione tra l'area delle cellule tumorali ed il parenchima sano.

I successivi studi immunohistochimici sulla linea cellulare GLI36 hanno evidenziato come la marcatura sia del tutto simile a quella rilevata nelle cellule GL261 e F98 (figura 4.37).

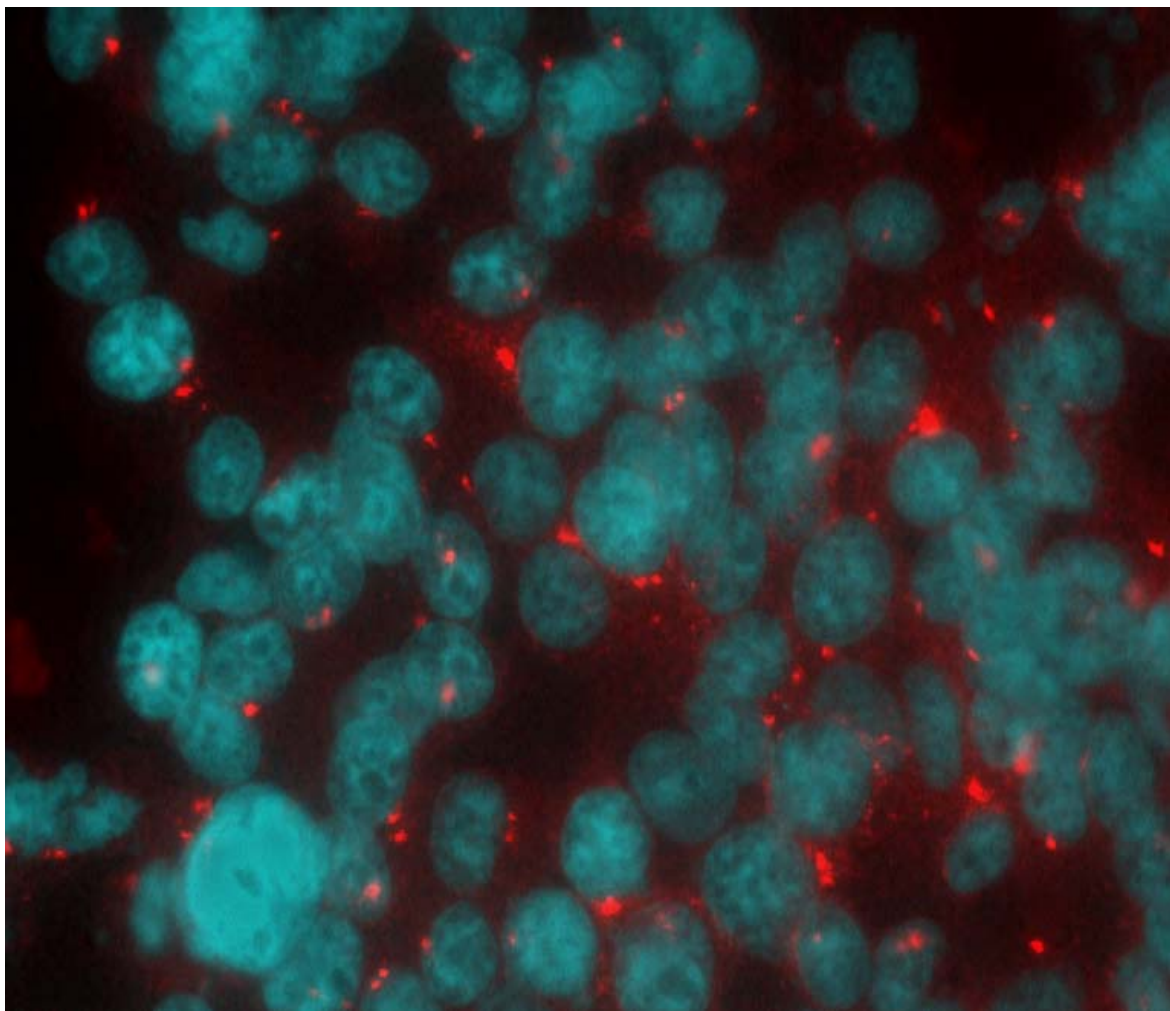


Figura 4.36 – sezione di encefalo di ratto Fischer con massa tumorale con anticorpo anti-PKARII α (rosso), DAPI (blu), 100x olio epifluorescenza. In questa immagine ingrandita è possibile notare come anche in vivo PKARII α presenti nelle cellule tumorali la medesima distribuzione peculiare osservata in vitro.

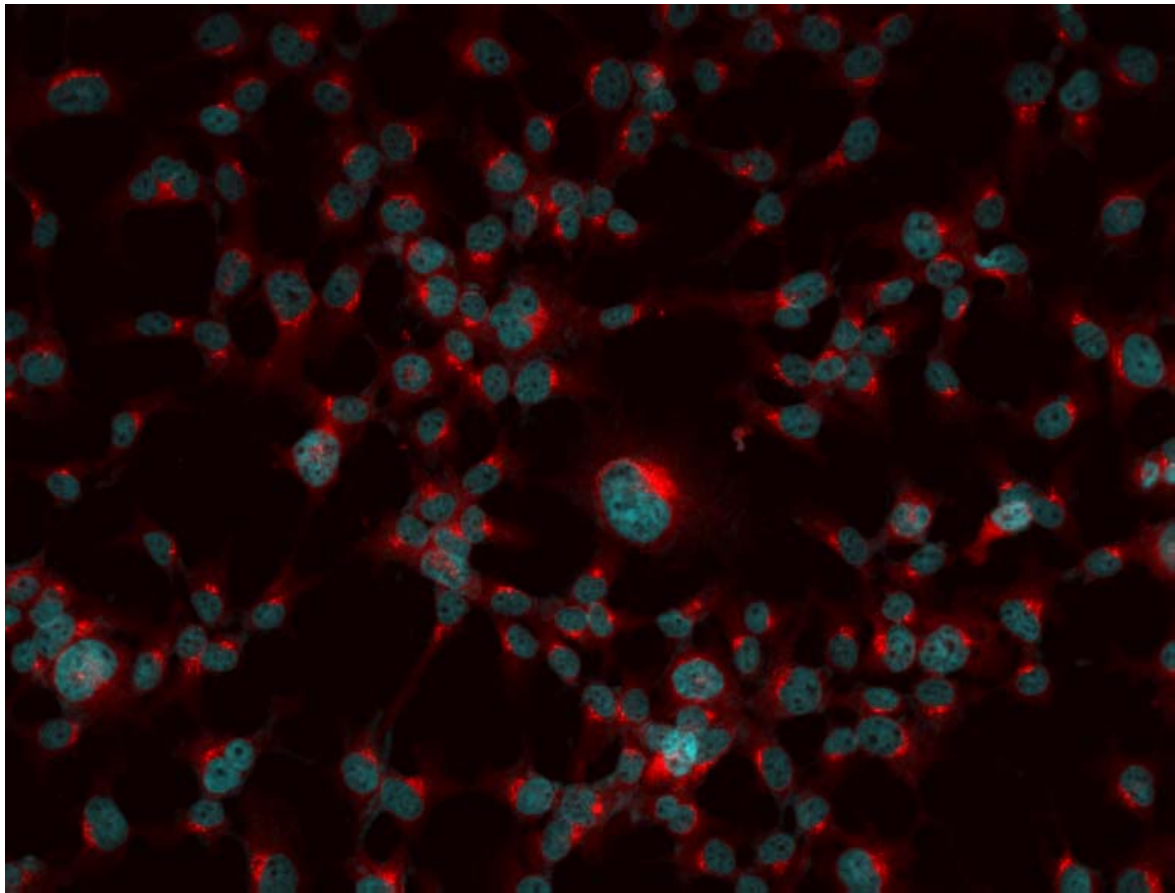


Figura 4.37 – coltura cellulare GLI36 con anticorpo anti-PKARII α (rosso), DAPI (blu), 100x olio epifluorescenza. Si noti come la caratteristica distribuzione, rilevata nelle cellule di glioma di ratto F98, sia peculiare anche delle cellule di glioma umano GLI36.

3.7 PKA RII α : EFFETTI DELL'INTERFERENZA IN VITRO

I trattamenti farmacologici condotti su cellule di glioma umano GLI36 hanno dimostrato come le molecole impiegate eccetto di caffeina e teofillina hanno un effetto pro-apoptotico significativo rispetto ai controlli (ANOVA $f_{1,12}=61,44$, $p<0.001$). Di seguito è riportato l'elenco delle molecole saggiate:

- **Progesterone** (1 μ M),
- **Glutammato** (500 μ M),
- **8-Br-AMPC** (500 μ M),
- **6-Dibutiril-AMPC** (500 μ M),

- **IBMX** (3-isobutil-1-metil-xantina, 500 μ M),
- **H89** (12 μ M),
- **Forskolina** (10 μ M),
- **Caffeina** (2mM),
- **Teofillina** (100 μ M),
- **Vinblastina** (0,03 μ M),
- **Taxolo** (0,05 μ M).

Tutte le molecole saggate, eccetto IBMX, hanno un effetto inferiore o paragonabile a quello indotto dal Taxolo (Figura 4.38).

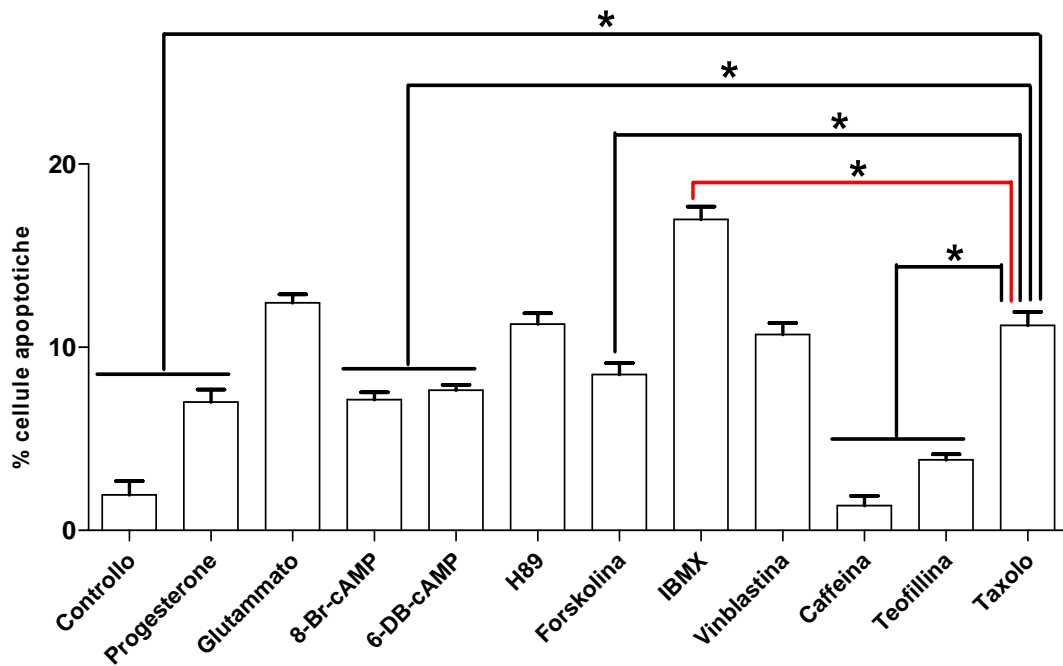


Figura 4.38 – Effetto apoptotico indotto da trattamento farmacologico di 24 ore su cellule GLI36 (ANOVA, * $p < 0.001$). Dal grafico si evince che l'effetto pro-apoptotico di IBMX sia significativamente superiore al taxolo, un antitumorale commerciale.

In seconda analisi è stato considerato anche l'effetto necrotico indotto dai trattamenti farmacologici sopraindicati. Il dato rilevato per IBMX, mostra un tasso di necrosi significativamente inferiore al taxolo che, associato ad un effetto pro-

apoptotico significativamente superiore, ne fa un possibile candidato per l'impiego clinico (Figura 4.39). Gli altri dati indicano che alcune molecole quali 6-DB-cAMP e Teofillina pur avendo un basso tasso di necrosi indotta, non riescono a produrre un effetto pro-apoptotico rilevante. D'altro canto la vinblastina, che presenta un effetto pro-apoptotico paragonabile a quello del taxolo, ha un tasso di necrosi indotta significativamente più alto che la rende poco adatta alla candidatura per l'impiego clinico. Molto incoraggiante è invece Naturalmente si tratta di dati che necessitano di ulteriori conferme in vivo.

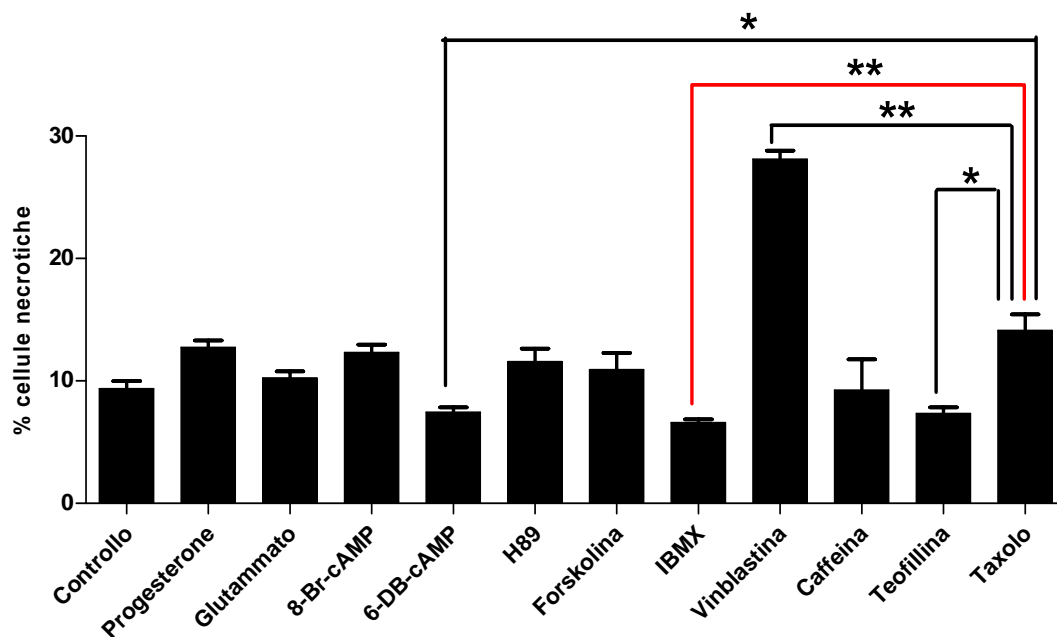


Figura 4.39 – Effetto necrotico indotto da trattamento farmacologico di 24 ore su cellule GLI36 (ANOVA, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$). Dal grafico si può osservare come IBMX produca un effetto necrotico significativamente inferiore rispetto al taxolo.

3.8 PKA RII α : SiRNA

Sulla base di quanto rilevato analizzando gli effetti delle molecole interferenti con la via delle PKA, si è optato per l'impiego di sonde RNA interference per valutare l'effetto di una interferenza diretta con l'espressione delle subunità RII α di PKA

sullo stato funzionale delle cellule di glioma. Questo in ottica di poter utilizzare la via della PKA come bersaglio per la terapia genica. I dati raccolti hanno mostrato una variazione dell'espressione della subunità RII β nelle cellule di glioblastoma murino GLI261 esposte per 72 ore al trattamento con SiRNA inibitore della PKARII α . Tale variazione è riconducibile ad una maggiore diffusione del segnale nelle cellule e ad un aumento dell'intensità del medesimo (Figura 4.40).

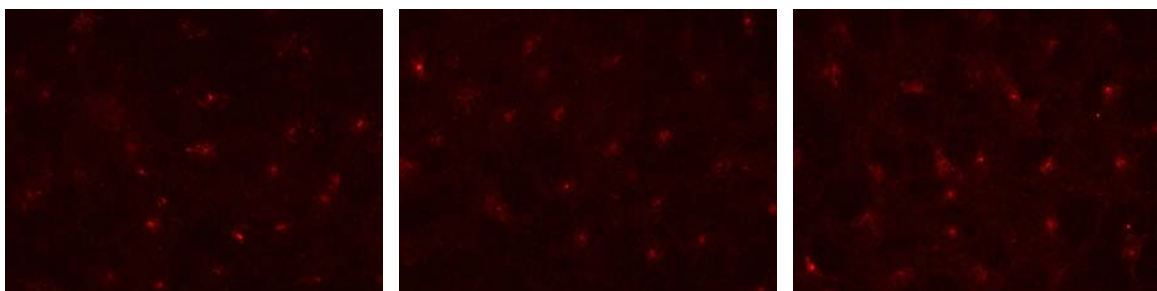


Figura 4.40 – cellule GL261 trattate con SiRNA inibitore di PKARII α e incubate con anticorpo anti-PKARII β . Si noti come le cellule trattate (a destra) presentino una maggior intensità e diffusione del segnale rispetto al controllo trattato con i reagenti ma senza SiRNA (al centro) e al controllo non trattato (a sinistra). Questo dato risulta essere di notevole interesse per l'approfondimento della relazione tra distribuzione delle PKA e gliomi.

Questo dato si rivela degno di essere approfondito se contestualizzato con quanto esposto sino ad ora. In particolare un confronto con quanto riportato nel database REMBRANDT, risulta essere necessario per una indagine più approfondita.

3.9 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENETICA DI PKA NEI TUMORI CEREBRALI

Sulla base dei dati rilevati dalle ricerche sopra riportate, sono state condotte indagini mirate sul database REMBRANDT. Nello specifico si è analizzata in primo luogo l'espressione del gene PRKARIIA che regola la subunità RII α di PKA. I risultati mostrano una espressione significativamente superiore di tale subunità

proteica nelle cellule di tumore cerebrale rispetto al tessuto sano umano (Tessuto Sano n=28, Tumori Cerebrali n=291 che comprendono anche: Astrocitoma n=62, Glioblastoma n=142, Oligodendroglioma n=64, Figura 4.41). Tale dato ottenuto su biopsie neurochirurgiche umane fornisce un notevole supporto a quanto sino ad ora presentato, sia per l'ampiezza della casistica e sia perché ottenuto in diversi laboratori esterni.

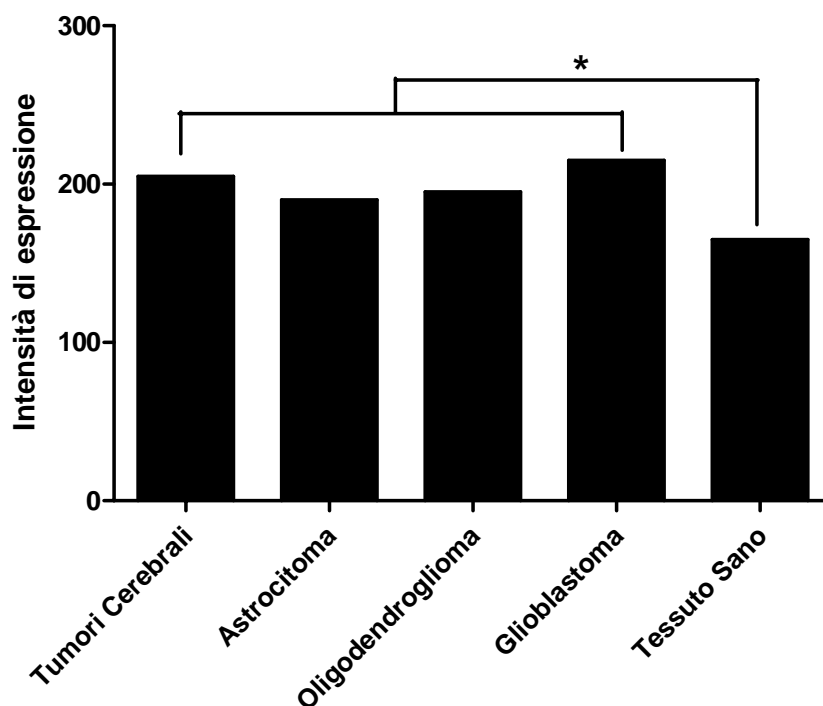


Figura 4.41 – analisi della espressione del gene PRKAR1A su biopsie neurochirurgiche, ANOVA * $p < 0.05$. Il grafico mostra una sotto-espressione statisticamente significativa di PRKAR1A nel tessuto sano rispetto ai tumori cerebrali.

Il dato presentato assume una rilevanza ben più notevole se associato ai dati sulla sopravvivenza dei pazienti del database in relazione al livello di espressione del gene PRKAR1A, nello specifico si è considerata sotto-regolata l'espressione di almeno 2 volte superiore alla media e sovra-regolata l'espressione di almeno 2 volte inferiore alla media secondo i criteri suggeriti dal database REMBRANDT. I

risultati riportati in figura 4.42 mostrano come il tasso di mortalità sia notevolmente più alto quando si riscontra una sovra-espressione di PRKAR1A.

A fronte di quanto rilevato circa l'espressione di PRKAR1A è stato interrogato il database REMBRANDT per ottenere informazioni circa l'espressione delle altre subunità regolatorie di PKA. Le analisi condotte hanno prodotto una serie di risultati che mostrano come invece i geni PRKAR1B, PRKAR1A e PRKAR1B (esprimenti rispettivamente PKAR1 β , PKAR1 α e PKAR1 β), siano meno espressi nel tessuto tumorale rispetto al tessuto sano (figure 4.43, 4.44 e 4.45).

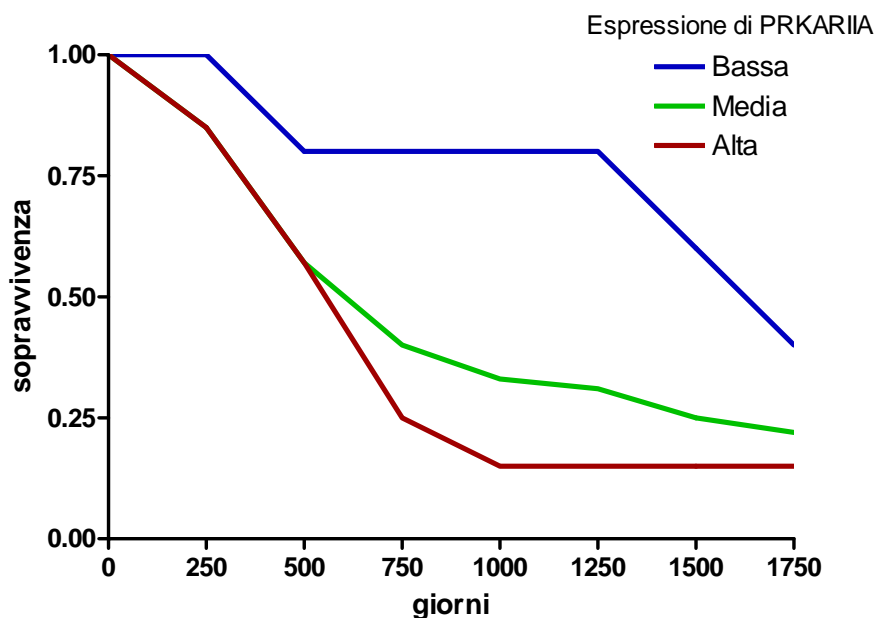


Figura 4.42 – sopravvivenza dei pazienti con tumore cerebrale sulla base dell'espressione di PRKAR1A (Bassa: espressione 2 volte inferiore ai controlli, Media: espressione uguale ai controlli, Alta: espressione 2 volte superiore ai controlli). Si noti come ad un incremento dell'espressione di PRKAR1A sia associato un incremento del tasso di mortalità.

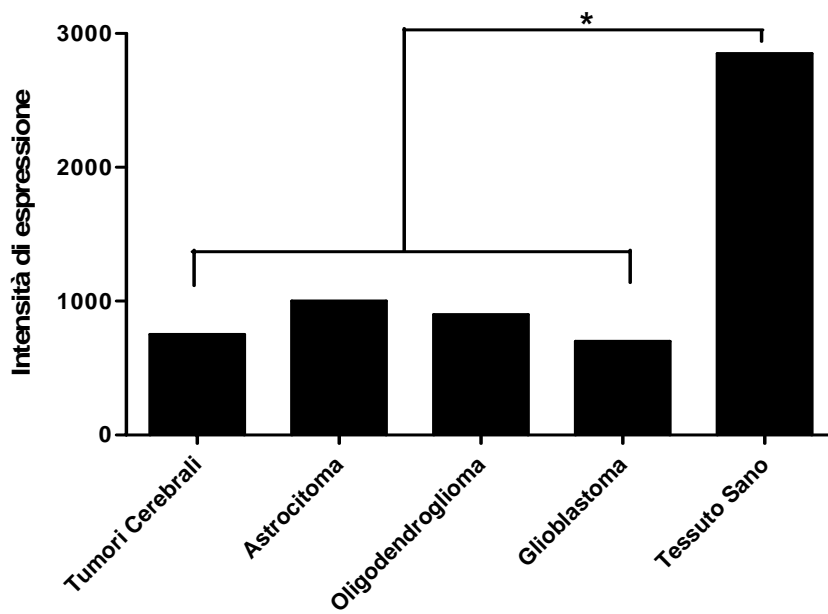


Figura 4.43 – analisi della espressione del gene PRKARIIB su biopsie neurochirurgiche, ANOVA * $p < 0.05$. Viene mostrata una sovra-espressione statisticamente significativa di PRKARIIB nel tessuto sano rispetto ai tumori cerebrali.

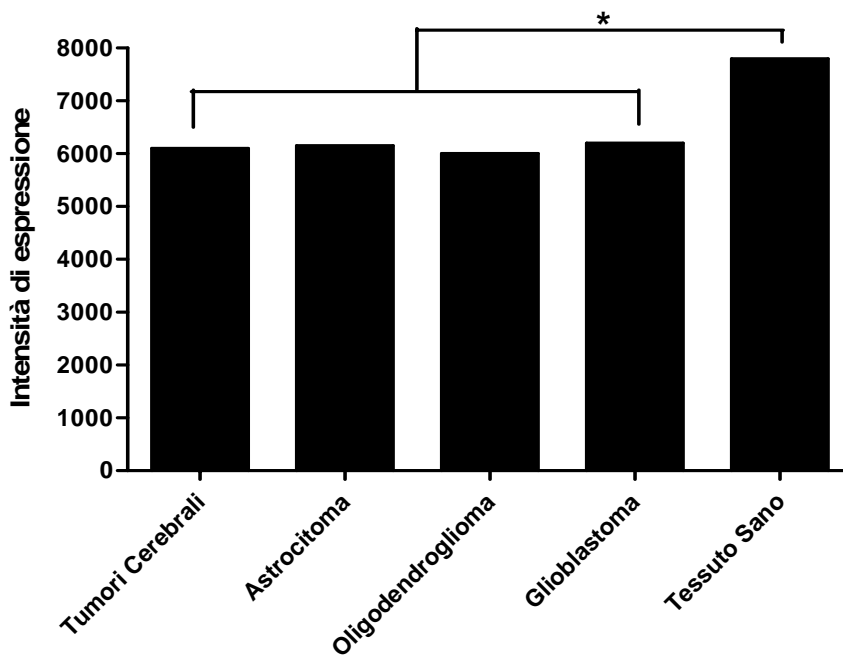


Figura 4.44 – analisi della espressione del gene PRKARIA su biopsie neurochirurgiche, ANOVA * $p < 0.05$. Si noti la sovra-espressione statisticamente significativa di PRKARIA nel tessuto sano rispetto ai tumori cerebrali.

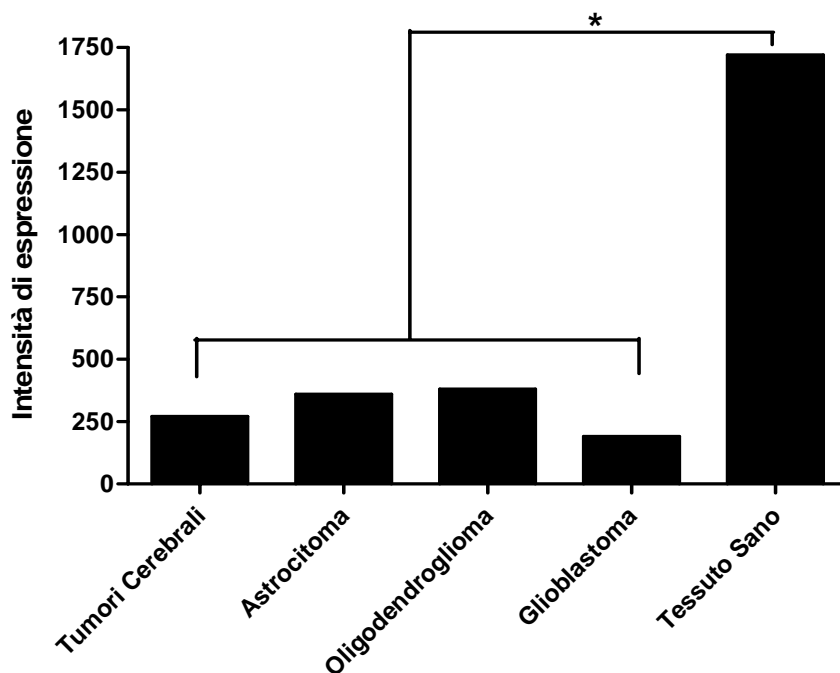


Figura 4.45 – analisi della espressione del gene PRKARIB su biopsie neurochirurgiche, ANOVA * $p < 0.05$. Il grafico mostra una sovra-espressione statisticamente significativa di PRKARIB nel tessuto sano rispetto ai tumori cerebrali.

Questi dati, in particolare quanto riportato in figura 4.45, sono in linea con quanto descritto circa il silenziamento di PKARII α . Infatti nel tessuto sano l'elevata espressione di PRKARII β è accompagnata da una bassa espressione di PRKARII α , mentre nei campioni di tumore cerebrale la situazione si inverte.

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio e la messa a punto di un approccio innovativo per il trattamento dei tumori cerebrali è da diversi anni considerato una delle più grandi sfide della moderna medicina. Nell'ultima decade numerosi sono stati i tentativi dalle notevoli premesse che purtroppo non hanno avuto un adeguato seguito clinico (Chicoine e Rich 2008, Dent et al 2008, Wen e Cesari 2008).

Attualmente i protocolli impiegati, che prevedono a seguito dell'intervento chirurgico, radioterapia e Temozolomide (Dario e Tomei 2006, Hart et al. 2008), forniscono un approccio di natura contenitiva piuttosto che curativa. Nonostante il protocollo attuale migliori le prospettive dei pazienti portando la mediana di sopravvivenza da 13 a 24 mesi (Stupp et al. 2005, Hegi et al. 2005), risulta imperativo riuscire nella messa a punto di un approccio che fornisca migliori prospettive ai pazienti neuro-oncologici (Sathornsumetee e Rich, 2008). Il presente studio si è proposto di affrontare la questione con un ampio raggio d'azione.

Le necessità cliniche di ottenere un trattamento per la cura dei gliomi che sia selettivo ed efficace sono state più volte sottolineate. L'idea di impiegare virus per il trattamento dei tumori risale all'inizio dello scorso secolo quando per la prima volta vennero osservati casi di regressione tumorale a seguito di vaccinazioni o di patologie virali (DePace 1912, Dock 1904). Benché le elevatissime aspettative che si sono generate negli anni non si sono tradotte in realtà cliniche, oggi esistono molti approcci che seguono la via tracciata allora e che stanno fornendo risultati promettenti (Chiocca 2002).

BoHV-4 è un vettore è in grado di infettare in vitro sia colture primarie che immortalizzate (Donofrio et al. 2002, Peterson e Goyal 1988). Altri studi hanno inoltre dimostrato come il virus sia in grado di infettare diverse colture cellulari

umane (Gilet et al. 2004, Egyed 1998). In questo studio BoHV-4 è stato dimostrato essere in grado di infettare differenti colture primarie di ratto e topo, esprimendo il gene reporter inserito nel genoma a seguito di ingegnerizzazione (Donofrio et al. 2002). A differenza di quanto è stato descritto sino ad ora in letteratura per altri vettori virali modificati (Varghese e Rabkin 2002, Pulkkanen e Yla-Herttuala 2005, Lawler et al. 2006), il processo di ingegnerizzazione eseguito sul vettore impiegato è circoscritto alla sola inserzione del gene reporter nel genoma virale garantendo così un discreto livello di stabilità rispetto al ceppo wild type (Donofrio et al. 2002). In alcune linee cellulari di carcinoma umano (fegato e ovaio) BoHV-4 è in grado di produrre un effetto pro-apoptotico in vitro ed in vivo (Gilet et al. 2005). Nel presente studio BoHV-4 è stato utilizzato per infettare in vitro le linee cellulari di glioblastoma di topo, di glioma di ratto e di uomo (rispettivamente GL261, F98, GLI36); il virus si è dimostrato così in grado di infettare le linee cellulari producendo un effetto citopatico a carattere prevalentemente necrotico.

Per valutare la possibilità di impiegare BoHV-4 come vettore virale per la terapia genica dei glomi, si è reso necessario confermare, anche per quanto riguarda il sistema nervoso centrale, i dati presenti in letteratura circa la sua poca o nulla patogenicità (Donofrio et al. 2007, Egyed 1998). È stato dunque dimostrato che l'inoculo di BoHV-4 nell'encefalo di topo e di ratto provoca una infezione a carico delle cellule ependimali e della RMS in grado di esprimere il gene reporter fino a 60 giorni post inoculo. Tale infezione non risulta associata ad alcuna patologia o disturbo neurologico in atto. Questo dato è rilevante perché a differenza degli altri vettori che sino ad ora sono stati impiegati (Alemany et al. 2000, Varghese e Rabkin 2002, Kanerva e Hemminki 2004) BoHV-4 non ha dovuto subire importanti manipolazioni rispetto al ceppo wild type, ciò ne garantisce una maggior stabilità (Donofrio et al. 2002).

Inoltre, se inoculato nell'encefalo di ratti cui erano state precedentemente impiantate cellule tumorali di glioma F98, BoHV-4 è in grado di infettare selettivamente le cellule della massa tumorale (sia solida che cistica), in particolar modo quelle poste al margine della massa stessa, risparmiando il parenchima sano.

Tale dato viene supportato dagli studi condotti mediante l'impiego di cellule F98 marcate che hanno dato origine ad una massa tumorale di colore rosso fluorescente ove si rilevavano le cellule infettate con BoHV-4 che esprimevano EGFP a differenza di quanto avviene nel parenchima sano. Ciò a riprova dell'affinità documentata di BoHV-4 per le cellule in replicazione (Donofrio et al. 2006, Gillet et al. 2005, Donofrio et al. 2002, Egyed 1998).

Si è potuto successivamente testare BoHV-4 su colture cellulari primarie derivate da materiale tumorale umano. Tutte le colture primarie umane utilizzate nel presente studio si sono dimostrate essere suscettibili all'infezione con BoHV-4 ed in grado di esprimerne il gene reporter per la EGFP. I dati forniti dall'infezione sulle colture primarie umane sono in linea con quanto noto circa la capacità di BoHV-4 di instaurare infezioni in colture cellulari umane (Gilet et al. 2004, Egyed 1998).

È stata in ultimo condotta una analisi dell'espressione genica sulle cellule di glioblastoma di topo GL261 infettate con BoHV-4. Si è osservato come l'infezione causi l'inibizione di alcuni geni e l'attivazione di altri. In particolare viene attivato Cdk2 che codifica per la protein chinasi ciclina dipendente 2 la quale è nota essere importante per il normale proseguimento del ciclo cellulare in molti tipi cellulari (Sherr e Roberts 2004). BoHV-4 sembra quindi impedire alla cellula l'induzione della morte cellulare prima del processo di replicazione virale, infatti anche l'inibizione di Sumo1, rilevata nelle cellule infettate con BoHV-4, risulta essere importante per il proseguimento del ciclo cellulare. Sumo1 è un gene soppressore di Mif2, la cui espressione è essenziale nelle fasi di replicazione del DNA in molti tipi cellulari (Brown et al. 1993).

Concludendo la prima parte di questo progetto è possibile dunque affermare che BoHV-4 è in grado di infettare ed esprimere il gene reporter in vivo ed in vitro in cellule tumorali di glioblastoma di topo e glioma di ratto senza infettare le cellule del parenchima cerebrale sano. Inoltre BoHV-4 è in grado di infettare ed esprimere il gene reporter anche in cellule di glioma umano immortalizzate e cellule tumorali derivate da biopsia neurochirurgica.

Il fatto che il virus non sia associabile ad alcuna patologia in atto se inoculato nell'encefalo di topi e ratti sani, fa di BoHV-4 un ottimo candidato per la terapia genica dei gliomi.

La seconda linea di questo progetto si è occupata dello studio della relazione tra distribuzione delle subunità regolatorie di PKA e tumori cerebrali. È argomento di interesse scientifico molto attuale il rapporto sussistente tra la via delle PKA, differenziamento cellulare e oncogenesi (Cho-Chung e Nesterova 2005). Diversi tumori tra cui quelli del colon, della mammella, delle mucose endometriali, delle ovaie e del tessuto osseo, presentano un caratteristico squilibrio nel rapporto sussistente tra subunità RI ed RII delle PKA (Cho-Chung e Nesterova 2005, McDaid et al. 1999). Diverse ricerche hanno evidenziato come il differenziamento sia associabile al ripristino delle proporzioni del rapporto RI/RII (Tortora e Ciardiello 2002, Cho-Chung 1990).

Allo stato attuale i marcatori molecolari che vengono utilizzati per la distinzione delle cellule di glioma dal parenchima sano, come ad esempio nestina (Almqvist et al. 2002), laminina-8 (Ljubimova et al. 2004), EGFR e tenascina (McLendon et al. 2000, Herold-Mende et al. 2002), non hanno un livello di specificità tanto elevato per le cellule di glioma tale da rappresentare quello che può essere ritenuto un "golden standard".

Sulla base di quanto sino ad ora presentato è stata indagata la distribuzione delle subunità regolatorie di PKA nelle cellule di glioblastoma di topo e di glioma di ratto e uomo. La presenza preponderante della isoforma RII di PKA nelle cellule di glioma era stata descritta in alcuni studi dei primi anni '80 (Schwartz e Costa 1980, Fattola et al. 1983), tale dato viene suffragato anche dalle indagini svolte in questo studio interrogando il database REMBRANDT circa l'espressione delle varie subunità regolatorie di PKA. Le analisi condotte mediante Western blot qui presentate tuttavia evidenziano come anche la subunità RI sia presente nella frazione insolubile delle cellule di glioblastoma di topo, mentre le analisi immunostochimiche condotte hanno rilevato solo la subunità RII α . Questo dato

può essere attribuito ad una distribuzione maggiormente diffusa delle subunità RI che non ne consente la localizzazione. La peculiare distribuzione delle subunità RII α non viene descritta nel parenchima sano, tuttavia tale subunità risulta rilevabile anche nelle cellule ependimali ma con una localizzazione differente (alla base delle ciglia) che ne suggerisce un differente significato funzionale (Mucignat-Caretta e Caretta 2004).

I dati delle indagini immunohistochimiche condotte sulle tre linee cellulari presentati in questo lavoro evidenziano una distribuzione peculiare della subunità RII α nella frazione insolubile che viene colocalizzata quasi totalmente con la rete di interscambio del corpo di Golgi. Il significato bio-molecolare di tale distribuzione risulta ancora da chiarire, così come quale significato sia da attribuire agli aggregati dell'isoforma RII β caratteristici del parenchima cerebrale sano (Mucignat-Caretta et al. 2008). Gli esperimenti che hanno impiegato le sonde SiRNA per il silenziamento dell'espressione delle subunità RII α , hanno mostrato come in presenza di tali sonde sia osservabile un incremento della espressione di RII β . Tale dato, alla luce di quanto si è appena descritto, risulta essere molto incoraggiante per proseguire le indagini sugli effetti delle sonde SiRNA.

Negli esperimenti in vivo, condotti su ratto e topo, la distribuzione sopra descritta viene confermata. Nelle cellule tumorali è infatti possibile osservare come la subunità RII α si presenti localizzata in un cluster a ridosso del nucleo, come si era riscontrato nelle indagini immunohistochimiche condotte su colture cellulari. Tale distribuzione peculiare di fatto permette di operare una netta distinzione tra le cellule tumorali e le cellule proprie del parenchima sano. Questa evidenza offre tra le altre anche la possibilità di implementare un eventuale strumento diagnostico.

In ottica dell'impiego terapeutico di quanto sino ad ora descritto sono stati condotti anche alcuni test con molecole che interferiscono a vari livelli con la via delle PKA. I dati circa le percentuali di necrosi ed apoptosi indotta sono stati confrontati sia con controlli sani che con taxolo. Il taxolo è un chemioterapico che nelle cellule di tumore al seno induce la iperfosforilazione di Bcl2 inducendo un effetto pro-apoptotico (Srivastava et al. 1998). Quasi tutte le molecole testate hanno dato luogo

ad un effetto pro-apoptotico inferiore o paragonabile al taxolo ad eccezione di IBMX (3-isobutil-1-metil-xantina) che agisce aumentando la concentrazione di AMPc intracellulare e attivando PKA (Chen et al. 1998). Tale molecola ha non solo un effetto pro-apoptotico superiore al taxolo ma anche una percentuale di necrosi indotta significativamente inferiore, ciò ne fa un possibile candidato come chemioterapico.

Concludendo, è possibile affermare che nelle cellule di glioma la subunità RII α di PKA presenta una distribuzione caratteristica differente dalle cellule sane e che l'interferenza con la via delle PKA ha un effetto citopatico su tali cellule.

Più volte durante questo lavoro è stata sottolineata l'urgenza e la necessità di mettere a punto un approccio terapeutico per il trattamento dei gliomi che permetta di estendere le prospettive di sopravvivenza dei pazienti neuro-oncologici. Il lavoro che è stato presentato apre molte interessanti prospettive in tre direzioni: diagnosi, trattamento e selettività del trattamento. Naturalmente molto rimane ancora da fare per poter mettere a frutto i risultati di questo studio. Diagnosi estemporanee ed anatomo-patologiche ed impiego del vettore con il sistema profarmaco, sono due tappe intermedie che possono fornire ampie motivazioni sia in termini scientifici che in termini di reperimento delle risorse per poter raggiungere l'ambizioso obiettivo finale che ora ci permettiamo di sussurrare: un protocollo per il trattamento curativo dei gliomi.

BIBLIOGRAFIA

Akard W, Tubbs RS, Seymour ZA, Hitselberger WE, Cohen-Gadol AA. 2008. Evolution of techniques for the resection of vestibular schwannomas: from saving life to saving function. *J Neurosurg.* ahead of print.

Ackermann M. 2006. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol.* 113(3-4):211-22.

Alemanly R, Balagué C, Curiel DT. 2000. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol.* 18(7):723-7.

Almqvist PM, Mah R, Lendahl U, Jacobsson B, Hendson G. 2002. Immunohistochemical detection of nestin in pediatric brain tumors. *J Histochem Cytochem.* 50(2):147-58.

Anella NS, Ding Q, Menegazzo I, Wang W, Gillespie GY, Grammer JR, Gladson CL, Nabors LB. 2005. A novel technique to quantify glioma tumor invasion using serial microscopy sections. *Journal of Neuroscience Methods* 153, 183-189.

Axelsson U, Laurell CB. 1965. Hereditary variants of serum alpha-1-antitrypsin. *Am J Hum Genet.* 1965 Nov;17(6):466-72.

Balfour HH Jr. 1999. Antiviral drugs. *N Engl J Med.* 340(16):1255-68.

Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 444(7120):756-60.

Berger MS, Hadjipanayis CG. 2007. Surgery of intrinsic cerebral tumors. *Neurosurgery*. 61(1 Suppl):279-304; discussion 304-5.

Berman HM, Ten Eyck LF, Goodsell DS, Haste NM, Kornev A, Taylor SS. 2005. The AMPc binding domain: an ancient signaling module. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(1):45-50.

Blaese RM, Culver KW, Chang L, Anderson WF, Mullen C, Nienhuis A, Carter C, Dunbar C, Leitman S, Berger M, et al. 1993. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. *Hum Gene Ther*. 1993 Aug;4(4):521-7.

Bleiziffer O, Eriksson E, Yao F, Horch RE, Kneser U. 2007. Gene transfer strategies in tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 11(2):206-23.

Bloom DC. 2004. HSV LAT and neuronal survival. *Int Rev Immunol*. 23(1-2):187-98.

Bossis I, Stratakis CA. 2004. Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145:5452-8.

Brown MT, Goetsch L, Hartwell LH. 1993. MIF2 is required for mitotic spindle integrity during anaphase spindle elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 123(2):387-403.

Cadd G, McKnight GS. 1989. Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron*. 3(1):71-9.

Charalampaki P, Filippi R, Welschehold S, Conrad J, Perneczky A. 2008. Tumors of the lateral and third ventricle: removal under endoscope-assisted keyhole conditions. *Neurosurgery*. 62(6 Suppl 3):1049-58.

Chen TC, Hinton DR, Zidovetzki R, Hofman FM. 1998. Up-regulation of the AMPc/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant glioma. *Lab Invest.*;78:165-74.

Chicoine MR, Rich KM. 2008. Clinical management of frequently encountered brain tumors. *Mo Med*. 105(5):429-33.

Chiocca EA. 2002. Oncolytic viruses. *Nat. Rev. Cancer* 2:938-950.

Cho-Chung YS, Nesterova MV. 2005. Tumor reversion: protein kinase A isozyme switching. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1058: 76-86.

Cho-Chung YS. 1990. Role of cyclic AMP receptor proteins in growth, differentiation, and suppression of malignancy: new approaches to therapy. *cancer res.* 50:7093-7100.

Clegg CH, Cadd GG, McKnight GS. 1988. Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(11):3703-7.

Curtin BF, Pal N, Gordon RK, Nambiar MP. 2006. Forskolin, an inducer of AMPc, up-regulates acetylcholinesterase expression and protects against organophosphate exposure in neuro 2A cells. *Mol Cell Biochem*. 290(1-2):23-32.

Danthinne X, Imperiale MJ. 2000. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther*. 7(20):1707-14.

Dario A, Tomei G. 2006. The safety of the temozolomide in patients with malignant glioma. *Curr Drug Saf.* 1(2):205-22.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly protein kinase inhibitors. *Biochem J.*; 351:95-105.

Dent P, Yacoub A, Park M, Sarkar D, Shah K, Curiel DT, Grant S, Fischer PB. 2008. Searching for a cure: gene therapy for glioblastoma. *Cancer Biol Ther.* 7(9):1335-40.

DePace N. 1912. Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia* 9:82-89.

Dock G. 1904. Rabies virus vaccination in a patient with cervical carcinoma. *Am. J. Med. Sci.* 127:563

Donelson Smith F, Langeberg LK, Scott JD. 2006. The where's and when's of kinase anchoring. *Trends Biochem Sci.* 31:316-323.

Donofrio G, Cavirani S, Simone T, van Santen VL. 2002. Potential of bovine herpesvirus 4 as a gene delivery vector. *J. Virol. Methods* 10 , 49–61.

Donofrio G, Grandi G, Cavirani S, Taddei S, Flammini C. 2004. Bovine herpesvirus 4 infects differentiated neuronal cells in culture and establish persistent infection upon selection. *J Neurovirol.* 10(2):123-30.

Donofrio G, Cavaggioni A, Bondi M, Cavirani S, Flammini CF, Mucignat-Caretta C. 2006. Outcome of bovine herpesvirus 4 infection following direct viral injection in the lateral ventricle of the mouse brain. *Microbes Infect.* 8, 898-904.

Donofrio G, Herath S, Sartori C, Cavirani S, Flammini CF, Sheldon IM. 2007. Bovine herpesvirus 4 is tropic for bovine endometrial cells and modulates endocrine function. *Reproduction*. 134(1):183-97.

Donofrio G, Martignani E, Cavirani S, Flammini CF. 2005. Exploiting persistent infection for selection of bovine herpesvirus 4 recombinants. *J Virol Methods*. 128(1-2):6-13.

Døskeland SO, Maronde E, Gjertsen BT. 1993. The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase--functionally different or redundant? *Biochim Biophys Acta*. 1178(3):249-58.

Egyed L, Bartha A. 1998. PCR studies on the potential sites for latency of BoHV-4 in calves. *Vet. Res. Commun*, 22 , 209–216.

Egyed L. 1998. Replication of Bovine herpesvirus type 4 in human cells in vitro. *J. Clin. Microbiol* 36:2109-2111

Egyed L, Kluge JP, Bartha A. 1997. Histological studies of bovine herpesvirus type 4 infection in non ruminant species. *Veterinary Microbiology* 51, 283-288.

Ferrari S. 2006. Protein kinases controlling the onset of mitosis, *Cell Mol Life Sci* 63:781-95.

Francio SH, Corbin JD. 1994. Structure and function of cyclic nucleotide dependent protein kinase. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 237-272.

Franklin BJ, Paxinos G. 1997. *The Mouse Brain, in stereotaxic coordinates*. Academic Press. San Diego, USA.

Frattola L, Canal N, Ferrarese C, et al. 1983. Multiple forms of protein kinase from normal human brain and glioblastoma. *Cancer Res.* 43:1321-1324.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):7011-21.

Garret RH, Grisham CM. 2004. *Principi di biochimica. Con messa a fuoco su quella umana.* Ed. Piccin

Gaskell R, Willoughby K. 1999. Herpesviruses of carnivores. *Vet Microbiol.* 69(1-2):73-88.

Gillet L, Minner F, Detry B. 2004. Investigation of the susceptibility of human cell lines to bovine herpesvirus 4 infection: demonstration that human cells can support a nonpermissive persistent infection which protects them against tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *J. Virol.* 78:2336-2347.

Gillet L, Dewals M, Farnir F, de Leval L, Vanderplasschen A. 2005 Bovine herpesvirus 4 induces apoptosis of Human Carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 65:(20).

Gjertsen BT, Døskeland SO. 1995. Protein phosphorylation in apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1269(2):187-99.

González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez R, Cerbón MA, Camacho-Arroyo I. 2001. Progesterone receptor isoform expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res. Bull.*; 56: 43-48.

Graça J, Gültasli N, D'Haene N, Brotchi J, Salmon I, Balériaux D. 2006. Cystic extramedullary ependymoma. *JNR Am J Neuroradiol.* 27(4):818-21.

Hanks SK, Hunter T. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9(8):576-96.

Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, Hadley D, Patterson J, Brown SM, Rampling R. 2004. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene Ther.* 11(22):16

Hart MG, Grant R, Garside R, Rogers G, Somerville M, Stein K. 2008. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev.* (4):CD007415.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 352(10):997-1003.

Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH. 2002. Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int J Cancer.* 2002 Mar 20;98(3):362-9.

Horan PK, Melnicoff MJ, Jensen BD, Slezak SE. 1990. Fluorescent cell labeling for in vivo and in vitro cell tracking. *Methods Cell Biol.* 1990;33:469-90.

Horan PK, Slezak SE. 1989. Stable cell membrane labelling. *Nature.* 13;340(6229):167-8.

Hubbard MJ, Cohen P. 1993. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci.* 18(5):172-7.

Huggenvik JI, Collard MW, Stofko RE, Seasholtz AF, Uhler MD. 1991. Regulation of the human enkephalin promoter by two isoforms of the catalytic subunit of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol.* 5(7):921-30.

Hulleman E, Helin K. 2005. Molecular mechanisms in gliomagenesis. *Adv Cancer Res.* 94:1-27.

Hutterer M, Gunsilius E, Stockhammer G. 2006. Molecular therapies for malignant glioma. *Wien Med Wochenschr.* 2006 Jun;156(11-12):351-63.

Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. 2002. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia.* 2002 Sep;39(3):193-206.

Immonen A, Vapalahti M, Tyynelä K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, Langford G, Murray N, Ylä-Herttuala S. 2004. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther.* 10(5):967-72.

Inoue N, Dambaugh TR, Pellett PE. 1993. Molecular biology of human herpesviruses 6A and 6B. *Infect Agents Dis.* 2(6):343-60.

Jackson CA, Cobbs C, Peduzzi JD, Novak M, Morrow CD. 2001. Repetitive intrathecal injections of poliovirus replicons result in gene expression in neurons of the central nervous system without pathogenesis. *Hum Gene Ther.* 12(15):1827-41.

Kanerva A, Hemminki A. 2004. Modified adenoviruses for cancer gene therapy. *Int J Cancer*. 110(4):475-80.

Kassam AB, Engh JA, Mintz AH, Prevedello DM. 2008. Completely endoscopic resection of intraparenchymal brain tumors. *J Neurosurg*. ahead of print.

Kaufmann WK, Heffernan TP, Beaulieu LM, Doherty S, Frank AR, Zhou Y, Bryant MF, Zhou T, Nikolaishvili-Feinberg DDN, Simpson DA, Cordeiro-Stone M. 2003. Caffeine and human DNA metabolism: the magic and the mystery. *Mutat Res*.; 532: 85-102.

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*. 7(1):33-40.

Kirn D, Martuza RL, Zwiebel J. 2001. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat Med*. 7(7):781-7.

Kleihues P. 2000. Glioblastoma. In Kleihues P, Cavanee WK, eds., *Pathology and genetics of tumors of nervous system, World Health Organization classification of tumours*. Lyon France: IARC.

Ko L, Koestner A, Wechsler W. 1980. Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones. *Acta Neuropathol*. 51(1):23-31.

Kun LE, Gajjar A, Muhlbauer M, Heideman RL, Sanford R, Brenner M, Walter A, Langston J, Jenkins J, Facchini S. 1995. Stereotactic injection of herpes simplex thymidine kinase vector producer cells (PA317-G1Tk1SvNa.7) and intravenous ganciclovir for the treatment of progressive or recurrent primary supratentorial pediatric malignant brain tumors. *Hum Gene Ther*. 1995 Sep;6(9):1231-55.

Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* 98(3):269-97.

Lantos PL, VandenBerg SR, Kleihues P. 1996. Tumor of the Nervous System. In: Greenfield's Neuropathology, Graham DI, Lantos PL (eds), 6th ed. Arnold: London. Pag. 583-879.

Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, Haapasalo H, Raitanen J, Jääskeläinen J, Auvinen A. 2007. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol.* 9(3):319-25.

Lawler SE, Peruzzi PP, Chiocca EA. 2006. Genetic strategies for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther.* 13(3):225-33.

Lee HO, Koh EJ, Oh YM, Choi HY. 2008. Midline glioblastoma multiforme with bilateral symmetric cysts. *J Korean Neurosurg Soc.*43(2):105-8.

Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. 2006 Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 5:67.

Ljubimova JY, Fugita M, Khazenzon NM, Das A, Pikul BB, Newman D, Sekiguchi K, Sorokin LM, Sasaki T, Black KL. 2004. Association between laminin-8 and glial tumor grade, recurrence, and patient survival. *Cancer.* 2004 Aug 1;101(3):604-12.

Lochner A, Moolman JA. 2006. The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev.* 24(3-4):261-74.

Makino Y, Sakagami H, Takeda M. 1999. Induction of cell death by ascorbic acid derivatives in human renal carcinoma and glioblastoma cell lines. *Anticancer Res.* 19(4B):3125-32.

Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer CA, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, Martuza RL. 2000. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* 7(10):867-74.

Mathupala SP, Guthikonda M, Sloan AE. 2006. RNAi based approaches to the treatment of malignant glioma. *Technol Cancer Res Treat.* 5(3):261-9.

Matten W, Daar I, Vande Woude GF. 1994. Protein kinase A acts at multiple points to inhibit *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol.* 14(7):4419-26.

Maus U, Herold S, Muth H, Maus R, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rosseau S, Seeger W, Grimminger F, Lohmeyer J. 2001. Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280(1):L58-68.

McDaid HM, Cairns MT, Atkinson RI. 1999. Increased expression of the R1a subunit of the cAMP-dependent protein kinase A is associated with associated stage of the ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 79:933-939.

McLendon RE, Wikstrand CJ, Matthews MR, Al-Baradei R, Bigner SH, Bigner DD. 2000. Glioma-associated antigen expression in oligodendroglial neoplasms. Tenascin and epidermal growth factor receptor. *J Histochem Cytochem.* 2000 Aug;48(8):1103-10.

Mellerick DM, Fraser NW. 1987. Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology*. 158(2):265-75.

Mizuno M, Yoshida J, Colosi P, Kurtzman G. 1998. Adeno-associated virus vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene causes complete regression of intracerebrally implanted human gliomas in mice, in conjunction with ganciclovir administration. *Jpn J Cancer Res*.89(1):76-80.

Moolten FL. 1994. Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. *Cancer Gene Ther*. 1(4):279-87.

Mucignat-Caretta C, Caretta A. 2001. Localization of Triton-insoluble AMPc-dependent kinase type RIbeta in rat and mouse brain. *J Neurocytol*. 30(11):885-94.

Mucignat-Caretta C, Caretta A. 2004. Regional variations in the localization of insoluble kinase A regulatory isoforms during rodent brain development. *J Chem Neuroanat*. 27(3):201-12.

Mucignat-Caretta C, Cavaggioni A, Redaelli M, Malatesta M, Zancanaro C, Caretta A. 2008. Selective distribution of protein kinase A regulatory subunit RII{alpha} in rodent gliomas. *Neuro Oncol*. 10(6):958-67.

Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, de Tribolet N, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MC, Hainfellner JA, Heppner FL, Dietrich PY, Zimmer Y, Cairncross JG, Janzer RC, Domany E, Delorenzi M, Stupp R, Hegi ME. 2008. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol*. 26(18):3015-24.

Nanda D, Vogels R, Havenga M, Avezaat CJ, Bout A, Smitt PS. 2001. Treatment of malignant gliomas with a replicating adenoviral vector expressing herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res.* 61(24):8743-50.

Nadella KS, Kirschner LS. 2005. Disruption of protein kinase a regulation causes immortalization and dysregulation of D-type cyclins. *Cancer Res.* 65:10307-15.

Naeem K, Caywood DD, Goyal SM, Werdin RE, Murtaugh MP. 1993. Persistence of bovid herpesvirus-4 in experimentally inoculated pregnant rabbits. *Microbiologica.* 16 , 87–94.

National Cancer Institute. 2005. REMBRANDT home page. <http://rembrandt.nci.nih.gov>. Accessed 2008 November 22

Neary CL, Nesterova M, Cho YS, Becker KG, Cho-Chung YS. 2004. Protein kinase A isozyme switching: eliciting differential cAMP signalling and tumor reversion. *Oncogene* 23:8847-56.

Nowak S, Zukiel R, Barciszewska AM, Barciszewski J. 2005. The diagnosis and therapy of brain tumours. *Folia Neuropathol.* 43(3):193-6.

Osorio FA, Reed DE, Rock DL. 1982. Experimental infection of rabbits with bovine herpesvirus-4: acute and persistent infection. *Vet. Microbiol.* 7 , 503–513.

Palù G, Cavaggioni A, Calvi P, Franchin E, Pizzato M, Boschetto R, Parolin C, Chilosi M, Ferrini S, Zanusso A, Colombo F. 1999. Gene therapy of glioblastoma multiforme via combined expression of suicide and cytokine genes: a pilot study in humans. *Gene Ther.* 6(3):330-7.

Paxinos G, Watson C. 1998. The Rat Brain, in stereotaxic coordinates. Fourth Edition. Academic Press. San Diego, USA.

Peterson RB, Goyal SM. 1988. Propagation and quantitation of animal herpesviruses in eight cell culture systems. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 11:93-98.

Pulkkanen KJ, Yla-Herttuala S. 2005. Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Mol Ther.* 2005 Oct;12(4):585-98.

Rainov NG, Ren H. 2003. Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy-- what have we learned? *J Neurooncol.* 65(3):227-36.

Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, Nicoll J, Hadley D, Brennan D, Petty R, MacLean A, Harland J, McKie E, Mabbs R, Brown M. 2000. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther.* 7(10):859-66.

Ray S, Ponnathpur V, Huang Y, Tang C, Mahoney ME, Ibrado MA, Bullock G, Bhalla K. 1994. 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine-, mitoxantrone-, and paclitaxel-induced apoptosis in HL-60 cell: improved method for detection of internucleosomal DNA fragmentation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*; 34: 365-371.

Redaelli M, Cavaggioni A, Mucignat-Caretta C, Cavirani S, Caretta A, Donofrio G. 2008. Transduction of the rat brain by Bovine Herpesvirus 4. *Genet. Vaccines Ther.* 12; 6:6.

Rich JN. 2007. Cancer stem cell in radiation resistance. *Cancer Res.* 67, 8980-8984.

Roizman B. 1996. The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(21):11307-12.

Rosenberg SA, Anderson WF, Blaese M, Hwu P, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Ettinghausen SE, et al. 1993. The development of gene therapy for the treatment of cancer. *Ann Surg.* 218(4):455-63; discussion 463-4.

Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, Russo A, Calatozzolo C, Ciusani E, Sciacca FL, Ottolina A, Parati EA, La Porta C, Alessandri G, Marras C, Croci D, De Rossi M. 2006. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia.* (8):850-60.

Sathornsumetee S, Rich JN. 2008. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann N Y Acad Sci.* 1142:108-32.

Schipper ML, Goris ML, Gambhir SS. 2007. Evaluation of herpes simplex virus 1 thymidine kinase-mediated trapping of (131)I FIAU and prodrug activation of ganciclovir as a synergistic cancer radio/chemotherapy. *Mol Imaging Biol.* 9(3):110-6.

Schwartz JP, Costa E. 1980. Protein kinase translocation following α -adrenergic receptor activation in C6 glioma cells. *J Biol Chem.* 255:2943-2948.

Seligman AM, Shear MJ. 1939. Studies in carcinogenesis. VIII. Experimental production of Brain tumors in mice with methylcholanthrene. *Am. J. Cancer.* 37: 364-395.

Serrano J, Rayo JI, Infante JR, Domínguez L, García-Bernardo L, Durán C, Fernández Portales I, Cabezudo JM. 2008. Radioguided surgery in brain tumors with thallium-201. *Clin Nucl Med.* 33(12):838-40.

Sherr CJ, Roberts JM. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 18(22):2699-711.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003 Sep 15;63(18):5821-8.

Smith JA, Francis SH, Corbin JD. 1993. Autophosphorylation: a salient feature of protein kinases. *Mol Cell Biochem.* 127-128:51-70.

Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS, Longo DL. 1998. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol.* 18:3509-3517.

Stein CS, Davidson BL. 2002. *Methods Enzymol.* Gene transfer to the brain using feline immunodeficiency virus-based lentivirus vectors. 2002;346:433-54.

Stork PJ, Schmitt JM. 2002. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signalling in the regulation of cell proliferation *Trends Cell Biol* 12:258-66.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fischer B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada

Clinical Trials Group. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 352(10):987-96.

Smith AE, Helenius A. 2004. How viruses enter animal cells. *Science.* 2004 Apr 9;304(5668):237-42.

Strachan T and Read AP. 2001. *Genetica umana molecolare.* Ed. UTET.

Subak-Sharpe JH, Dargan DJ. 1998. HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. *Virus Genes.*16(3):239-51.

Taylor SS, Buechler TA, Yonemoto W. 1990. AMPC-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 971-1005.

Thiry E, Meurens F, Muylkens B, McVoy M, Gogev S, Thiry J, Vanderplasschen A, Epstein A, Keil G, Schynts F. 2005. Recombination in alphaherpesviruses. *Rev Med Virol.* 15(2):89-103.

Tortora G, Ciardiello F. 2002. Protein kinase A as target for novel integrated strategies of cancer therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 968:139-47.

Varghese S, Rabkin SD. 2002. Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther.* 9(12):967-78.

Verma IM, Somia N. 1997. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature.* 18;389(6648):239-42.

Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. 2006. Brain tumor stem cells. *Nature Reviews Cancer* 6, 425-436.

Vile RG, Russell SJ. 1995. Retroviruses as vectors. *Br Med Bull.* 51(1):12-30.

Wallace PK, Palmer LD, Perry-Lalley D, Bolton ES, Alexander RB, Horan PK, Yang JC, Muirhead KA. 1993. Mechanisms of adoptive immunotherapy: improved methods for in vivo tracking of tumor-infiltrating lymphocytes and lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res.* 53(10 Suppl):2358-67.

Wen PY, Kesari S. 2008. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 359(5):492-507.

Wilcox ME, Yang W, Senger D, Rewcastle NB, Morris DG, Brasher PM, Shi ZQ, Johnston RN, Nishikawa S, Lee PW, Forsyth PA. 2001. Reovirus as an oncolytic agent against experimental human malignant gliomas. *J Natl Cancer Inst.* 93(12):903-12.

Wolff JE, Trillino T, Mölenkamp G, Egeler RM, Jürgens H. 1999. Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 125:481-6.

Zimmermann W, Broll H, Ehlers B, Buhk HJ, Rosenthal A, Goltz M. 2001. Genome sequence of bovine herpesvirus 4, a bovine Rhadinovirus, and identification of an origin of DNA replication. *J Virol.* 75(3):1186-94.

APPENDICE

PRODUZIONE SCIENTIFICA DEL CANDIDATO

A.1 ARTICOLI PUBBLICATI SU RIVISTA

Mucignat-Caretta C., Cavaggioni A., Redaelli M., Malatesta M., Zancanaro C., Caretta A. (2008). **Selective Distribution of Protein Kinase A Regulatory Subunit RIIAlpha in Rodent Gliomas.** *Neuro-Oncology*, 6:958-67.

Redaelli M., Cavaggioni A., Mucignat-Caretta C., Cavirani S., Caretta A., Donofrio G. (2008). **Rat brain susceptibility to BoHV-4 infection.** *Genetic Vaccines and Therapy*, 6:6.

Cavaggioni A., Mucignat-Caretta C., Redaelli M. (2008). **The behavior of the male mouse, *Mus musculus*, and the scent of urine spots.** *Chemical Senses*, 33:655-663.

Rubini A., Parmagnani A., Redaelli M., Catena V., Del Monte D. (2008). **Does menstrual cycle influence spirometric indices in regularly menstruated young women?** *Minerva Pneumologica*, 46:11-15

Cavaggioni A., Mucignat-Caretta C., Redaelli M. & Zagotto G. (2006). **The scent of urine traces of male mice, *Mus musculus*. Changes of the chemical composition over time.** *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 20(24):3741-6.

A.2 ARTICOLI SOTTOMESSI E IN FASE DI REVISIONE

Rubini A., Redaelli M., Bondi M. (2008). **Pressure-flow relationship in swine ureter: effect of NO-synthase inhibition by L-NAME.** *Urologia internationalis*. Accepted.

Redaelli M., Bondi M., Orsetti A., Cavaggioni A., Zagotto G., & Mucignat-Caretta, C. (2008). **Exploring odorants molecules in the faeces of mouse, *Mus musculus*.** *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, Submitted.

Rubini A., Parmagnani A., Redaelli M., Del Monte D. , Catena V. (2008). **Daily variations of spirometric indexes and maximum expiratory pressure in young healthy adults.** Respiratory Care, Submitted.

A.3 BREVETTI

SafeNeedle – “Assieme ago ipodermico con dispositivo di sicurezza” N°PD2008A000275, Sez. A, Classe 61, Sottoclasse M. In collaborazione con Università degli Studi di Padova.

A.4 PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

Redaelli M., Cavaggioni A., Mucignat-Caretta C., Caretta A., Todesco P., Donofrio G. **Bovine herpesvirus 4 as a vector for gene delivery in a rat glioma model.** 2008, FENS, Geneve.

Cavedon A., Donati G. e Redaelli M., **La testimonianza dei minori in relazione agli oggetti e al loro colore.** 2008, Convegno Nazionale di Psicologia Giuridica, Bari.

Redaelli M., Bondi M., Orsetti A., Zagotto G., Cavaggioni A., and Mucignat-Caretta C. **Volatile Compounds in the faeces of the mouse.** 2008, ECRO, Portorose .

Caretta A., Mucignat-Caretta C., Denaro L., Redaelli M., Ciccarono P., Rossetto M., Cavaggioni A., D’Avella D. **Differential distribution of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunits in pediatric brain tumors: preliminary data.** 2007, SNCh, Roma.

Ganem G., Rueff C., Redaelli M., Zagotto G., Orsetti A., Mucignat C. **Odour based subspecies recognition in the house mouse: What is in the signals?** 2007, 6th International Zoo and Wildlife Research Conference on Behaviour, Physiology and Genetics, Berlin.

Redaelli M., Cavaggioni A., Mucignat-Caretta C., Caretta A., Donofrio G. **Gene delivery to the brain: Bovine herpesvirus 4 as a vector in a rat model.** 2007, SiNS, Verona

Redaelli M., Cavaggioni A., Mucignat-Caretta C. **Modulation of male mouse territorial behaviour by time-induced changes in composition of urinary marks.** 2006, FENS, Wien.

Redaelli M., Mucignat-Caretta C., Zagotto G., Cavaggioni A. **Male mouse investigation of scent marks depends on the trace aging.** 2006, CSiV, Chester.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare in primo luogo il mio tutor la **Prof.ssa Carla Mucignat** che mi ha permesso di affrontare questa esperienza nel miglior modo possibile e mi ha insegnato ad essere sempre aperto alle sfide che questo lavoro pone, ed alla quale devo moltissimo. Ringrazio il **Prof. Andrea Cavaggioni**, direttore del laboratorio nel quale ho l'onore di prestare servizio, alla cui saggezza ed esperienza tutti noi facciamo sempre riferimento. Ringrazio il **Prof. Gaetano Donofrio**, coordinatore nazionale del progetto, per l'opportunità che mi ha concesso e per la sua sempre grande disponibilità ed apertura. Ringrazio il **Prof. Antonio Caretta** per il grande valore che il suo supporto scientifico ha avuto in questo progetto. Ringrazio infine il **Prof. Giuseppe Zagotto** per il suo sostegno e la sua disponibilità.

Un ringraziamento speciale va ai miei colleghi che condividono con me l'amore per la ricerca, in primis la **Dott.ssa Michela Bondi** che con me divide ogni giorno il Laboratorio di Neurofisiologia, poi il **Dott. Raffaele Pezzani**, il **Dott. Alessandro Bertoldo**, **Alessandro Orsetti**, la **Dott.ssa Erika Martina**, la **Dott.ssa Alessandra Gianoncelli** e la **Dott.ssa Cristina Bergo**.

Ringrazio inoltre il **Prof. Ignazio Castagliuolo** ed il **Dott. Michele Scorzeto** per il supporto fornitomi con la microscopia confocale.

Tengo molto a ringraziare tutti i miei studenti i quali sono stati per me una delle migliori soddisfazioni che questo lavoro ha saputo darmi soprattutto per essere riuscito a trasmettere loro un po' della mia passione per la ricerca. In ordine alfabetico: **Serena Calgaro**, **Mara Campeol**, **Dott. Francesco Carmona**, **Giulia Costantini**, **Marco Pizzi**, **Dott. Krishna Schirippa**, **Dott.ssa Paola Todesco**.

In ultimo ringrazio la mia famiglia, per il sostegno che mai mi è stato fatto mancare durante questa mia intensa avventura.

