

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Corso di laurea magistrale in Biotecnologie per  
l'alimentazione

*Studi funzionali volti a chiarire il ruolo della metilazione nel  
silenziamento genico: un caso studio nel linfoma del cane.*

Relatore

Prof.ssa Mery Giantin

Correlatore

Dott.ssa Eleonora Zorzan

Laureando: Giorgia Guerra

Matricola n°: 1152011

ANNO ACCADEMICO 2017-2018



*A Tommaso e Marta...*

*Sempre devi avere in mente Itaca -  
raggiungerla sia il pensiero costante.  
Soprattutto, non affrettare il viaggio;  
fa che duri a lungo, per anni, e che da vecchio  
metta piede sull'isola, tu, ricco  
dei tesori accumulati per strada  
senza aspettarti ricchezze da Itaca.  
Itaca ti ha dato il bel viaggio,  
senza di lei mai ti saresti messo  
sulla strada: che cos'altro ti aspetti?*



## RIASSUNTO

---

Numerosi studi condotti nell'uomo dimostrano come la metilazione del DNA sia in grado di determinare un'inibizione dell'espressione genica, e che tale meccanismo di silenziamento genico sia sfruttato in alcuni tumori per il silenziamento di geni oncosoppressori. Nel cane, questa tipologia di studi è ancora agli albori e le informazioni a disposizione sono tuttora limitate. Il progetto, in cui il presente lavoro di tesi si inserisce, ha come obiettivo lo studio del ruolo della metilazione del DNA nella regolazione dell'espressione dei geni oncosoppressori CiDEA, MAL e PCDH17, nel *Diffuse Large B-Cell Lymphoma* (DLBCL) del cane, e di definire i meccanismi molecolari alla base di tale relazione.

Il potenziale ruolo della metilazione nel controllo dell'espressione dei tre geni è stato oggetto di studio nella prima parte della tesi, attraverso un saggio di *gene reporter assay*. Si è dunque proceduto con il clonaggio delle regioni CpG *island* (CGI) dei geni di interesse a monte del gene *reporter* per la luciferasi *Firefly*, all'interno del plasmide pCpGL-basic, privo di sequenze CpG. Per le prove di trasfezione è stata scelta la linea cellulare di timo di cane CF2Th, selezionata attraverso il confronto di diverse linee cellulari di cane, e per la quale è stato messo a punto un protocollo di trasfezione. Nella linea sono state eseguite tre prove di trasfezione indipendenti con i costrutti non metilati, che hanno permesso di definire le regioni CGI importanti nel controllo della trascrizione dei tre geni. Le regioni, risultate essere rilevanti nel controllo dell'espressione genica, sono state sottoposte alla reazione di metilazione con enzimi dotati di attività metiltransferasica e successivamente a trasfezione. Attraverso le prove di metilazione e l'utilizzo di un *gene reporter assay*, è stato possibile definire: in primo luogo, la relazione tra la metilazione delle CGI ed il silenziamento genico; in secondo luogo, quali siti all'interno delle CGI, soggetti a metilazione, potessero potenzialmente avere un ruolo di maggiore rilevanza nel controllare l'espressione genica *in vitro*.

Nell'ultima parte di questo lavoro, attraverso l'utilizzo di specifici *software* e combinando i risultati ottenuti dalle prove di trasfezione, è stata eseguita un'analisi predittiva *in silico* dei potenziali siti riconosciuti dai fattori di trascrizione, per cercare di definire quali delle

regioni sottoposte a metilazione potrebbero essere di maggiore interesse per il controllo dell'espressione genica e da approfondire in studi futuri.

PAROLE CHIAVE: Epigenetica, Metilazione, *CpG island*, Linfoma, DLBCL, Cane.

## ABSTRACT

---

In human medicine, many studies demonstrate a correlation between DNA hypermethylation and gene silencing. Additionally, it is known how DNA methylation can be associated with transcriptional silencing of tumour suppressor genes, in different types of human tumours. In dogs, only a few similar studies are present and therefore little information is available in this species. The aims of the project this thesis belongs to are to study the role of DNA methylation in the gene expression regulation of the tumour suppressor genes *CiDEA*, *MAL*, and *PCDH17* in canine *Diffuse Large B-Cell Lymphoma* (DLBCL) and to define the molecular mechanisms that control this relationship. The role of DNA methylation in the gene expression of the three above-mentioned genes was investigated by a gene reporter assay. Firstly, CpG islands (CGIs) were cloned upstream the luciferase gene reporter inside the pCpGL-basic vector, that is a CpG-free luciferase reporter vector. Then, after comparing different canine cell lines, the CF2Th cell line, derived from a normal canine thymus, was selected for transfection experiments. After developing a new transfection protocol, three independent transfection experiments were performed using unmethylated constructs in order to define which regions were more involved in the luciferase transcription and consequently in the gene expression. CGIs, that turned out to be the most important for transcription of the three genes, underwent *in vitro* methylation reaction by using specific methylases and three transfection experiments. Through methylation analysis and a gene reporter assay it was possible to demonstrate: first of all, the relationship between CGI methylation and the transcriptional silencing; second, it was established which CpGs inside CGI, shown to be influenced by methylation, could have a major role in the gene expression control *in vitro*.

In the last part of this thesis, an *in silico* predictive analysis was performed using specific bioinformatic tools and combining transfection results, in order to predict which sites, potentially recognised by transcription factors and influenced by methylation, could be more important for gene expression regulation and that could be deeply studied in future experiments.

KEY WORDS: Epigenetics, Methylation, CpG island, Lymphoma, DLBCL, Dog.





## ABBREVIAZIONI

---

<b>5mC</b>	5-metilcitosina
<b>ABC</b>	<i>Activated B-cell-like</i>
<b>AFLP</b>	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
<b>ANOVA</b>	<i>One-way analysis of variance</i>
<b>bp</b>	Paia di basi
<b>BRCA1</b>	<i>Breast Cancer 1</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementare
<b>CF2Th</b>	<i>Canis Familiaris 2 Thymus</i>
<b>CGH</b>	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
<b>CGI</b>	<i>CpG island</i>
<b>CIDEA</b>	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor <math>\alpha</math>-like effector A</i>
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CO<sub>2</sub></b>	Anidride Carbonica
<b>CREB</b>	<i>CRE Binding</i>
<b>C<sub>T</sub></b>	<i>Ciclo Threshold</i>
<b>DAPK</b>	<i>Death-associated protein kinase</i>
<b>ddNTPs</b>	Nucleotidi dideossitriofosfato
<b>DLBCL</b>	<i>Diffuse Large B-cell Lymphoma</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferasi
<b>dNTPs</b>	Deossinucleotidi trifosfato
<b>Elk-1</b>	<i>ETS domain-containing protein Elk-1</i>
<b>EMEM</b>	<i>Minimum Essential Medium Modified Eagle</i>
<b>ER<math>\alpha</math></b>	<i>Estrogen Receptor <math>\alpha</math></i>
<b>FBS</b>	Siero Fetale Bovino
<b>GCB</b>	<i>Germinal Center B-cell-like</i>
<b>HDAC</b>	Istone deacetilasi
<b>HNF4</b>	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4</i>
<b>HPLC-UV</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography-ultraviolet</i>
<b>HSPPC</b>	<i>Heat Shock Protein-Peptite Complex</i>
<b>IKZF1</b>	<i>IKAROS Family Zinc Finger 1</i>
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LC-MS/MS</b>	Cromatografia Liquida accoppiata a <i>Tandem Mass Spectrometry</i>
<b>LMO2</b>	<i>LIM domain only 2</i>
<b>M.HhaI</b>	<i>HhaI Metiltransferasi</i>
<b>M.HpaII</b>	<i>HpaII Metiltransferasi</i>
<b>M.SssI</b>	<i>SssI Metiltransferasi</i>
<b>MAL</b>	<i>Myelin and Lymphocyte protein</i>
<b>MALT</b>	<i>Mucose-associated lymphoid tissue</i>

<b>MBD</b>	<i>Methyl CpG binding domain</i>
<b>MCS</b>	<i>Sito multiplo di clonaggio</i>
<b>MDCK</b>	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
<b>MeCp</b>	<i>Methyl CpG binding protein</i>
<b>MeDIP</b>	<i>Methylated DNA Immunoprecipitation</i>
<b>MSP</b>	<i>Methylation Sensitive PCR</i>
<b>MZF1</b>	<i>Myeloid Zinc Finger</i>
<b>NAT</b>	<i>N-acetil transferasi</i>
<b>NF-kB</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b>NHL</b>	<i>Linfoma non-Hodgkin</i>
<b>NRF1</b>	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
<b>OPTI-MEM</b>	<i>Opti-Minimal Essential Medium</i>
<b>OSW</b>	<i>Oswald</i>
<b>PAX 5</b>	<i>Paired Box Protein 5</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCDH17</b>	<i>Protocadherin 17</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>pDNA</b>	<i>DNA plasmidico</i>
<b>PMBL</b>	<i>Primary Mediastinal B-cell Lymphoma</i>
<b>PPAR-<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\alpha</math></i>
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>RQ</b>	<i>Relative Quantification</i>
<b>RUNX3</b>	<i>Runt-related transcription factor 3</i>
<b>SAM</b>	<i>S-adenosilmetionina</i>
<b>Sp1</b>	<i>Specifity protein 1</i>
<b>TET</b>	<i>Ten Eleven Traslocation protein</i>
<b>TFPI-2</b>	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor-2</i>
<b>Tm</b>	<i>Temperatura di melting</i>
<b>TSS</b>	<i>Transcription Starting Site</i>
<b>TTS</b>	<i>Trascription Termination Site</i>
<b>WGBS</b>	<i>Whole Genome Bisulfite Sequencing</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
<b>WT</b>	<i>Wild Type</i>
<b>WT1</b>	<i>Wilm's tumor 1</i>
<b>ZBTB7</b>	<i>BTB-zinc finger 7</i>

# INDICE

---

1. Introduzione.....	9
1.1 Epigenetica .....	9
1.1.1 Meccanismi di regolazione epigenetica.....	10
1.1.2 Trascrizione ed epigenetica.....	16
1.2 Xenobiotici, dieta ed epigenetica.....	19
1.2.1 Il ruolo degli xenobiotici.....	20
1.2.2 Il ruolo della dieta.....	21
1.3 Epigenetica e tumori .....	22
1.3.1 Alterazioni del <i>pattern</i> di metilazione del DNA e i tumori.....	24
1.4 <i>Diffuse Large B-Cell Lymphoma</i> (DLBCL) nel cane.....	28
1.5 Metodiche biomolecolari per lo studio della metilazione del DNA .....	36
2. Scopo .....	39
3. Materiali e metodi.....	41
3.1 Scelta dei geni e localizzazione delle regioni CpG .....	41
3.2 Protocollo per l'ottenimento dei cloni .....	43
3.2.1 PCR <i>end point</i> per l'ottenimento del frammento da clonare.....	43
3.2.2 Elettroforesi in gel di agarosio.....	47
3.2.3 Purificazione da gel.....	47
3.2.4 Sequenziamento con metodo Sanger.....	48
3.2.5 Digestione con enzimi di restrizione .....	49
3.2.6 Ligazione.....	50
3.2.7 Trasformazione batterica .....	51
3.2.8 Mini-prep.....	53
3.2.9 Restrizione di controllo.....	53
3.2.10 Midi-Prep.....	54
3.3 Scelta della linea cellulare.....	54
3.3.1 Mantenimento delle cellule in coltura .....	55
3.3.2 Espressione genica nelle linee cellulari .....	58
3.3.3 Trasfezione.....	62
3.4 Protocollo di metilazione.....	68
3.4.1 Metilazione .....	69
3.4.2 Verifica della reazione di metilazione .....	71

3.5	Analisi statistica.....	72
3.6	Valutazione <i>in silico</i> dei siti di <i>binding</i> per i fattori di trascrizione.....	72
4.	Risultati e discussione .....	75
4.1	Clonaggio delle regioni di interesse .....	75
4.2	Scelta della linea cellulare .....	78
4.2.1	Espressione genica dei trascritti <i>target</i> e dei fattori di trascrizione .....	78
4.2.2	Prove comparative di trasfezione .....	80
4.3	Valutazione dell'effetto della metilazione sulla trascrizione e predizione dei siti di legame dei fattori di trascrizione interessati dalla metilazione .....	83
4.3.1	<i>Myelin and Lymphocyte protein</i> (MAL).....	83
4.3.2	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor <math>\alpha</math>-like effector A</i> (CiDEA).....	88
4.3.3	<i>Protocadherin 17</i> (PCDH17).....	91
4.3.4	Considerazioni finali in merito ai risultati della metilazione .....	95
5.	Conclusioni e prospettive future .....	97
6.	Bibliografia.....	99
7.	Sitografia .....	107
8.	Materiale supplementare .....	109

# 1. INTRODUZIONE

---

## 1.1 EPIGENETICA

Il termine epigenetica è stato coniato per la prima volta dal biologo inglese Conrad Hal Waddington nel 1942, il quale utilizzò questo termine per descrivere le interazioni casuali tra i geni ed i loro prodotti, che permettono al fenotipo di esprimersi. Tale definizione implica la capacità di un fenotipo di essere ereditabile, di essere cioè trasmissibile attraverso il processo di mitosi e meiosi; da qui la successiva definizione proposta dal genetista Arthur Riggs e colleghi, i quali definirono un “tratto epigenetico” come: il fenotipo stabile ereditabile che risulta dai cambiamenti a livello dei cromosomi, ma senza che ciò implichi alcuna alterazione a livello della sequenza di DNA. La definizione proposta da Waddington inizialmente si riferiva al ruolo che tali modifiche potevano avere nell’ambito dello sviluppo embrionale; ad oggi la definizione si è evoluta e comprende un gran numero di processi cellulari diversi. In particolare, al giorno d’oggi, con il termine epigenetica si indica quella branca della biologia che studia tutti i cambiamenti ereditabili e reversibili in termini di espressione genica, che non hanno però alla base una variazione nella sequenza genica (Puneet et al., 2018).

I cambiamenti epigenetici rappresentano, di fatto, delle modifiche covalenti a livello delle basi del DNA o degli istoni, che alterano la struttura terziaria della cromatina, il legame dei fattori di trascrizione con il DNA e, in ultima istanza, l’espressione genica all’interno della cellula (Bryan et al., 2008). Le due principali modifiche epigenetiche a livello della sequenza nucleotidica comprendono la metilazione del DNA ed il rimodellamento della cromatina; la prima normalmente avviene attraverso modifiche chimiche a livello del DNA stesso, mentre il secondo avviene attraverso modifiche covalenti a livello degli istoni, che sono in grado di influenzare l’interazione tra il DNA e le proteine che modificano la conformazione della cromatina stessa (Puneet et al., 2018; Hirst et al., 2009). L’epigenetica rappresenta un campo di studio relativamente nuovo che suscita particolare interesse, alla luce del fatto che le modifiche epigenetiche esercitano un ruolo essenziale nel processo di differenziamento cellulare, di morfogenesi, oltre ad essere alla base, insieme alla genetica, di tutta la variabilità osservabile a livello fenotipico ed a

rappresentare un potenziale meccanismo di adattamento dell'organismo a stimoli ambientali. Inoltre, le sempre più numerose conoscenze acquisite, soprattutto nell'uomo ma anche in specie di interesse veterinario, riguardo la relazione che sussiste tra epigenetica e patologie, possono rappresentare un'opportunità per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

### **1.1.1 Meccanismi di regolazione epigenetica**

Nelle cellule eucariote le modifiche epigenetiche vengono codificate attraverso due meccanismi principali. Il primo è rappresentato dalla metilazione a livello del DNA, il cui significato in termini di espressione genica è legato alla densità di metilazione a livello di una determinata regione genomica e che rappresenta un importante meccanismo alla base dello sviluppo di un organismo eucariote, fin dalle prime fasi di vita. Infatti, è sufficiente anche una minima alterazione in termini di densità di metilazione a livello dei residui di citosina per determinare anomalie di sviluppo, patologie e talvolta anche la letalità (Hirst et al., 2009). Il secondo meccanismo con cui vengono apportate modifiche epigenetiche è rappresentato da modifiche di natura covalente a livello dei polipeptidi che sono coinvolti nel compattamento della cromatina, i nucleosomi, in particolare a livello delle loro code amminoacidiche.

#### **1.1.1.1 Metilazione del DNA**

La metilazione del DNA rappresenta uno dei meccanismi di regolazione epigenetica maggiormente caratterizzato. In cellule normali, esso è coinvolto in numerosi processi cellulari quali: lo sviluppo embrionale, la trascrizione, *l'imprinting* genomico, il silenziamento dei microRNA (Puneet et al., 2018), oltre che nel silenziamento trascrizionale dei trasposoni e nel riconoscimento di DNA esogeno proveniente da organismi patogeni (Bryan et al., 2008).

Dal punto di vista chimico la metilazione del DNA rappresenta una modificazione reversibile che interessa i residui di citosina su entrambi i filamenti del DNA, in particolare le citosine che costituiscono le sequenze palindromiche CpG, le quali non sono uniformemente distribuite nel genoma. Esistono infatti delle regioni nel genoma,

identificate come *CpG island* (CGI), che sono molto ricche in sequenze dinucleotidiche CpG. Si definisce regione CGI una regione il cui contenuto in GC è superiore o uguale al 50% e la cui lunghezza è almeno pari a 200 paia di basi (bp); tali regioni sono nella maggior parte dei casi (94%) non metilate in condizioni fisiologiche, in particolare se si trovano a livello delle regioni promotoriali di geni coinvolti nel metabolismo basale della cellula (Puneet et al., 2018). È stato inoltre osservato, come anche le regioni CGI abbiano una localizzazione non casuale nel genoma e si trovino, in particolare, a livello di centromeri, telomeri, nelle regioni 5' di alcuni geni, cioè a livello del primo esone e del primo introne, oltre che a livello delle regioni promotoriali (Bryan et al., 2008). Secondo alcuni studi infatti, circa il 50% dei promotori dei geni nell'uomo presenta regioni CGI (Yamazaki et al. 2017). Nonostante sia stato osservato che le citosine contenute all'interno delle CGI siano solitamente non metilate in condizioni normali, esistono al contempo promotori di specifici geni, contenenti regioni ricche in CpG, che sono metilati nella linea germinale o in alcuni tessuti (Puneet et al., 2018).

La reazione di metilazione avviene utilizzando come donatore di gruppi metile l'S-adenosilmetionina (SAM) e permette la conversione di una citosina in una 5-metilcitosina (5mC), attraverso la formazione di un legame di natura covalente tra il carbonio in posizione 5 della base azotata citosina e un gruppo metile (CH<sub>3</sub>), come indicato in Figura 1.

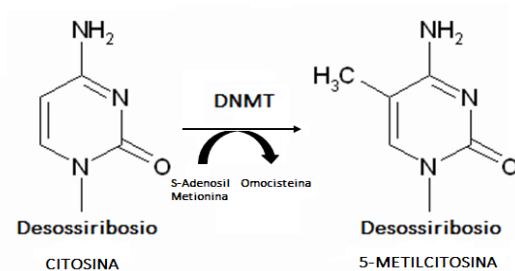


Figura 1. Reazione di metilazione mediata da DNA metiltransferasi (DNMT) (Modificata da Yamazaki et al., 2017).

La reazione di metilazione negli organismi eucarioti è mediata da enzimi definiti DNA metiltransferasi (DNMT), i quali vengono classificati in 4 famiglie principali in base all'omologia di sequenza a livello del dominio catalitico dell'estremità C-terminale: la famiglia delle metiltransferasi (DNMT) 1, delle DNMT2, delle DNMT3 e le Cromometiltransferasi, queste ultime sono specifiche del regno vegetale (Goll et al., 2005).

Questa classe di enzimi ha un ruolo sia nella metilazione *de novo* sia nel mantenimento del *pattern* di metilazione, che normalmente avviene subito dopo la replicazione del DNA. Nell'uomo le DNMT3A e DNMT3B sono implicate nel processo di metilazione *de novo*, mentre la DNMT1 si pensa abbia un ruolo nel mantenimento dello stato di metilazione; esiste infine la DNMT2, la cui funzione rimane ancora ad oggi sconosciuta (Puneet et al., 2018).

La reazione di metilazione *de novo* è un evento fisiologico finemente regolato nella fase di embriogenesi dei mammiferi: un normale livello di metilazione nell'embrione è essenziale per lo sviluppo post gastrulazione, oltre ad avere un ruolo importante per quanto concerne il differenziamento delle cellule somatiche (Kass et al., 1997). Raramente il processo di metilazione *de novo* avviene dopo la fase di sviluppo post gastrulazione ed è sicuramente rara in tessuti già differenziati.

Altrettanto importante, per definire lo stato di metilazione dell'embrione oltre che per mantenere il *pattern* di metilazione in cellule differenziate attraverso i cicli di replicazione cellulare, è il processo di mantenimento della metilazione, operato da parte di specifiche metiltransferasi. Durante il susseguirsi dei cicli replicativi del DNA e dunque dei cicli cellulari, il profilo di metilazione rimane uguale e tale fatto viene comunemente descritto attraverso il termine inglese *imprinting genetico*. Dal punto di vista meccanicistico questo avviene poiché, subito dopo un evento di replicazione cellulare, il filamento parentale mantiene lo stato di metilazione/demetilazione dei residui di citosina, mentre il filamento di nuova sintesi non presenta alcun sito metilato; le DNMT3 riconoscono i siti emimetilati ed aggiungono un gruppo metile al residuo di citosina non metilato, ma non riconoscono i siti non emimetilati e non aggiungono in tal caso alcun gruppo metile, come schematizzato in Figura 2 (Amaldi et al., 2014).

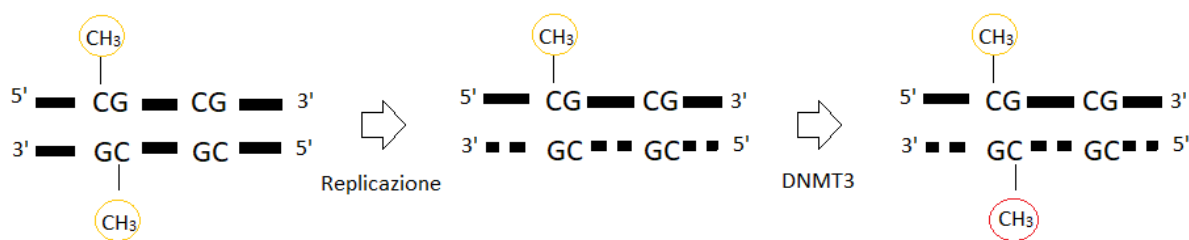


Figura 2. Schema di metilazione dopo replicazione del DNA; le linee tratteggiate indicano i filamenti di nuova sintesi; il gruppo metile all'interno del cerchio rosso rappresenta il gruppo aggiunto dopo la replicazione del DNA dalle DNMT3.



### 1.1.1.2 Modifiche post traduzionali degli istoni

Gli istoni sono proteine basiche altamente conservate, che rappresentano i costituenti strutturali della cromatina, essendo alla base della struttura dei nucleosomi. I nucleosomi sono, di fatto, degli ottameri istonici, poiché sono composti da 4 coppie di istoni: H2A, H2B, H3 e H4, che si assemblano tra loro formando coppie eterodimeriche; attorno a ciascun nucleosoma si avvolgono poi circa 146 bp del DNA. Ogni istone presenta tre regioni ad  $\alpha$ -elica, definite *histone-fold*, funzionali alla formazione degli eterodimeri, ed una regione N-terminale comunemente detta *coda istonica* (Amaldi et al., 2014). Complessivamente, gli istoni possono essere sottoposti a modifiche a livello di oltre 60 diverse tipologie di residui e tali modifiche sono state scoperte attraverso tecniche di spettrometria di massa o attraverso l'utilizzo di anticorpi specifici (Kouzarides, 2007). In generale però, i residui maggiormente coinvolti sono localizzati a livello dei domini N-terminali degli istoni, che sono i più accessibili (Figura 3).

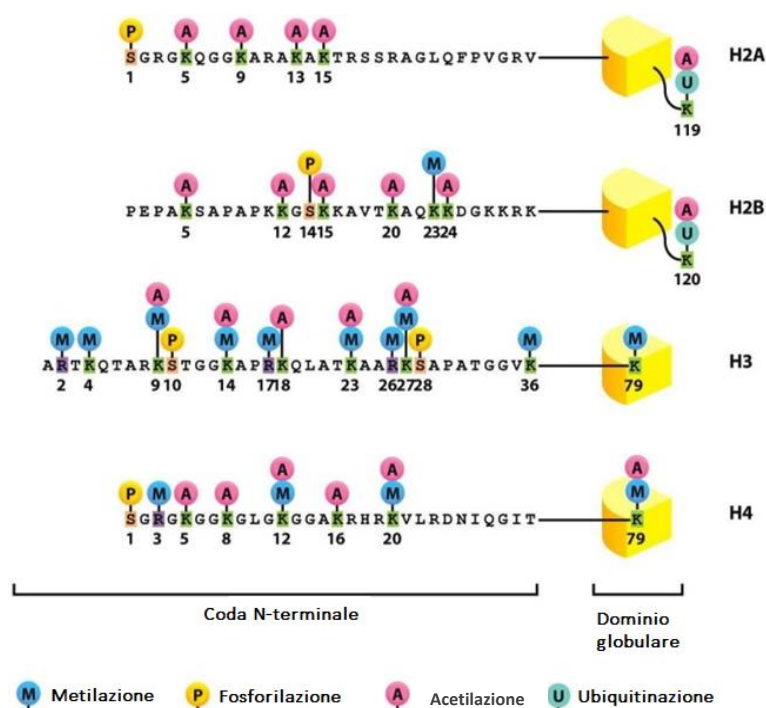


Figura 3. Schema delle modificazioni post traduzionali a livello del dominio N-terminale delle proteine istoniche (modificato da <https://www.studyblue.com/notes/hh/histonemodification/3012471820991862>).

Ciascuna modifica istonica avviene ad opera di specifiche attività enzimatiche, tra le quali si annoverano principalmente: l'acetilazione e la metilazione delle lisine (K) e delle arginine (R), la fosforilazione delle serine (S) e treonine (T), l'ubiquitinazione e la sumoilazione delle lisine e la ADP-ribosilazione. Tra tutte l'ubiquitinazione è l'unica che avviene a livello del dominio C-terminale degli istoni e non a livello del dominio N-terminale (Peterson et al., 2004). L'insieme delle modifiche che si riscontrano a livello istonico costituiscono il *codice istonico* di un individuo, termine utilizzato per descrivere il ruolo di tali modificazioni in relazione ad una specifica risposta funzionale (Amaldi et al., 2014; Kouzarides et al., 2007).

Nonostante il significato della maggior parte di queste modifiche rimanga ancora oggi poco chiaro, sono stati fatti dei notevoli passi avanti nella comprensione di quella che è la funzione della reazione di metilazione e acetilazione. La metilazione e l'acetilazione degli istoni hanno un effetto diretto su una serie di processi nucleari quali la trascrizione genica, la riparazione del DNA, la replicazione del DNA e l'organizzazione dei cromosomi (Estellar 2008). Le modifiche epigenetiche a carico degli istoni possono agire determinando un'alterazione dell'accessibilità della cromatina, oppure reclutando o escludendo proteine effettrici non istoniche, che sono in grado poi di decodificare il messaggio codificato dal *pattern* di modificazioni epigenetiche. A rendere il quadro ancor più complesso, vi è la capacità di ciascuna modifica di agire sia in senso positivo, sia in senso negativo in termini di trascrizione, a seconda della posizione del residuo a livello del quale avviene tale modifica (Bernstein et al., 2007). Oltre a questo, serve tener conto che vi è la possibilità che gli istoni possano essere sottoposti a diversi gradi di modificazione, ad esempio è possibile che la reazione di metilazione porti all'aggiunta di più di un gruppo metile, fino ad un massimo di tre, aumentando notevolmente il numero di possibili isoforme proteiche che si possono avere (Estellar, 2008).

Tra le modifiche istoniche maggiormente studiate e caratterizzate vi è l'acetilazione a livello dei residui di lisina che si trovano nel dominio N-terminale degli istoni. Tale reazione avviene ad opera dell'enzima N-acetiltransferasi (NAT), il quale trasferisce un gruppo acetile dal donatore acetil-CoA al gruppo amminico di una lisina (Amaldi et al., 2014). Tutte e quattro le tipologie di istoni coinvolte nella formazione del nucleosoma possono potenzialmente andare incontro a questa modifica post traduzionale che,

apportando una carica negativa all'amminoacido, induce così un indebolimento dell'interazione tra il DNA e le proteine. Solitamente lo stato di iperacetilazione delle lisine nelle code N-terminali correla con la riduzione della condensazione della cromatina (Figura 4) e quindi anche con la maggiore possibilità per i fattori di trascrizione di interagire con i promotori dei geni (Hirst et al., 2009). Essendo la reazione di acetilazione una reazione reversibile, esiste il corrispettivo enzima in grado di deacetilare i residui di lisina, definito *Istone deacetilasi* (HDAC).

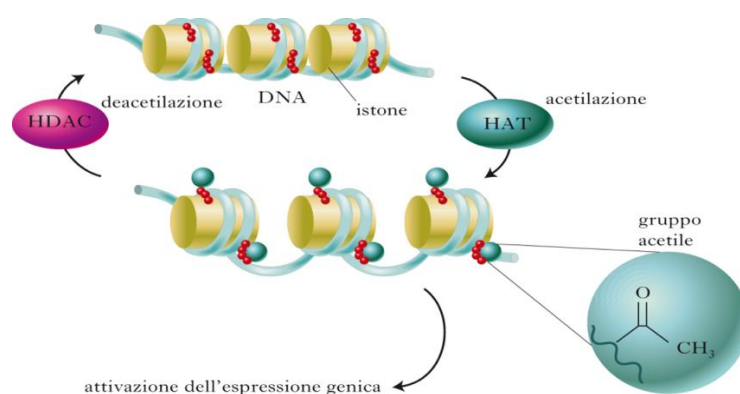


Figura 4. Reazione di acetilazione e deacetilazione degli istoni (<https://www.emaze.com/@AORRRWRCW>).

La reazione di metilazione a livello delle proteine istoniche, in particolare dei residui di lisina e arginina, può avvenire in concomitanza ad altre modifiche, quale ad esempio l'acetilazione. Non tutti i residui amminoacidici possono però andare incontro a diverse modifiche post traduzionali contestualmente. La reazione di metilazione prevede la formazione di un legame tra gli atomi di azoto delle catene laterali degli amminoacidi e un gruppo metile, fornito dal substrato SAM. L'aggiunta di un gruppo metile non altera la carica cationica dell'amminoacido ma aggiunge idrofobicità e ne aumenta l'ingombro sterico, ad esempio se un residuo di lisina viene di- o tri- metilato questo determina un notevole aumento dell'ingombro sterico della proteina di cui l'amminoacido fa parte, andando ad influire, oltre che con l'interazione proteina-proteina, anche con l'interazione con la cromatina (Amaldi et al., 2014). La reazione di metilazione a carico degli istoni H3 e H4 avviene ad opera di specifiche metiltransferasi, seppur ne esistano altri con la medesima funzione ma con attività meno specifica (Amaldi et al., 2014). È anch'essa una

reazione reversibile ed esistono pertanto enzimi in grado di demetilare un residuo amminoacidico, definiti *demetilasi*.

Per quanto concerne l'ereditabilità delle modifiche apportate a livello istonico, molti aspetti rimangono ancora ad oggi ambigui. Esistono evidenze che dimostrano come esse vengano mantenute attraverso la replicazione cellulare: in lievito è stato dimostrato come l'interazione tra istoni modificati e proteine effettrici venga mantenuta attraverso i cicli di divisione cellulare (Grewal et al., 2003). Gli istoni generalmente segregano in maniera casuale tra le cellule figlie, pertanto si presuppone che ciascuna erediti una parte degli istoni modificati, i quali sono poi in grado di estendere e propagare le modifiche anche agli istoni di nuova sintesi che costituiranno l'unità nucleosoma, grazie ovviamente all'azione di proteine effettrici (Bernstein et al., 2007; Groth et al., 2007).

### **1.1.2 Trascrizione ed epigenetica**

Quando è stato per la prima volta proposto il modello di metilazione del DNA, nessuna evidenza sperimentale supportava tale teoria, né la correlava all'attivazione o al silenziamento genico. Ad oggi invece numerose sono le evidenze che supportano la diretta correlazione che sussiste tra la densità di metilazione dei residui di citosina e il livello di trascrizione di alcuni geni. La metilazione risulta anzi essere un meccanismo particolarmente efficace nella soppressione dell'attività genica.

La reazione di metilazione, come già precedentemente descritto, avviene a livello di regioni definite CGI, in particolare a livello di sequenze palindromiche CpG in esse presenti. Tali regioni CGI non sono distribuite casualmente nel genoma e si localizzano prevalentemente a livello delle estremità 5' delle regioni regolatorie di un elevato numero (56%) di geni nell'uomo (Hirst et al., 2009; Antequera et al., 1993). Questo suggerisce come possa sussistere una relazione tra il livello di metilazione di una regione genomica ed il livello di espressione genica. Secondo una visione piuttosto semplicistica, schematizzata in Figura 5, si associa ad un maggior grado di metilazione delle regioni *CpG-rich*, il silenziamento genico; al contrario un minor livello di metilazione è associato ad una maggiore espressione genica (Muhonen et al., 2009).

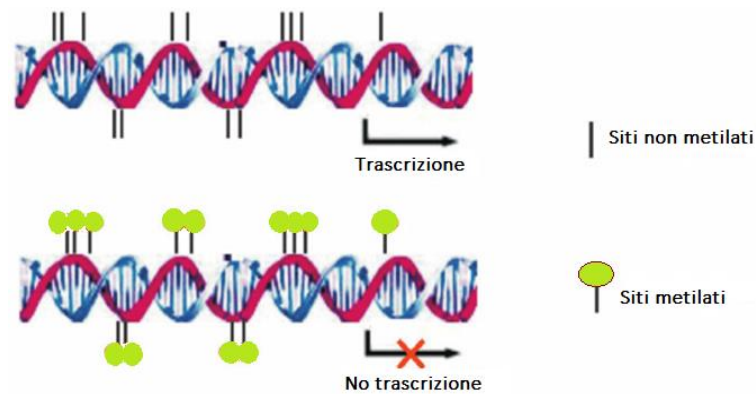


Figura 5. Schema della relazione che sussiste tra metilazione e attivazione della trascrizione (Modificata da Muhoen et al., 2009).

In realtà però il sistema è più complicato e prevede l'interazione di diversi fattori. Secondo recenti studi infatti, esistono diverse proteine che possono essere coinvolte in tale meccanismo di regolazione, come ad esempio le proteine appartenenti alla classe delle *Methyl CpG binding protein* (MeCp), che sono note per essere in grado di fungere da repressori trascrizionali ma che sono state individuate essere in grado di agire anche da attivatori trascrizionali all'interno di determinati contesti cellulari (Chahrour et al., 2008). Esistono quindi diversi possibili meccanismi attraverso cui la metilazione del DNA è in grado di reprimere la trascrizione genica (Karpf et al., 2002): il primo si basa sulla capacità della metilazione del DNA di creare un ingombro sterico e quindi di interferire con il legame dei fattori di trascrizione a livello delle sequenze promotoriali dei geni; mentre un secondo possibile meccanismo prevede il coinvolgimento di proteine in grado di interagire a livello dei domini CpG metilati quali le proteine appartenenti alla famiglia delle proteine MBD, dall'inglese *Methyl CpG binding domain proteins*. Si è già dimostrato come almeno 3 membri appartenenti a questa famiglia di proteine (MBD1, MBD2 e MeCp2) siano in grado di reprimere direttamente la trascrizione (Ng et al., 2000 e 1999; Nan et al., 1997). Le proteine appartenenti a questa famiglia sono anche in grado di interagire con corepressori trascrizionali, tra i quali le HDAC. Un terzo potenziale meccanismo attraverso cui la metilazione è in grado di ridurre l'espressione genica non è mediato da alcuna attività enzimatica, quanto piuttosto da una specifica attività non enzimatica repressiva di cui sono dotate le proteine DNMT. Infatti, tutte le DNMT, in particolare DNMT3A, DNMT3B e DNMT1, possiedono un dominio di repressione della

trascrizione e sono inoltre in grado di reclutare le HDAC oltre ad altre proteine corepressori (Karpf et al., 2002; Rountree et al., 2000).

Per quanto concerne le modificazioni istoniche in relazione alla loro capacità di indurre o reprimere la trascrizione di un gene, esse si possono suddividere in: modificazioni in grado di indurre l'espressione genica, in particolare l'acetilazione, la metilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione, ed in modificazioni correlate all'inibizione genica, tra le quali ritroviamo la metilazione, l'ubiquitinazione e la sumoilazione. Nello specifico l'acetilazione degli istoni, come descritto nel capitolo precedente, è correlata con il grado di compattazione della cromatina, pertanto, la cromatina iperacetilata risulta essere meno compatta e maggiormente attiva dal punto di vista trascrizionale; al contrario la cromatina ipoacetilata risulta essere silente poiché i siti di trascrizione non sono accessibili, essendo la cromatina più condensata (Figura 6).

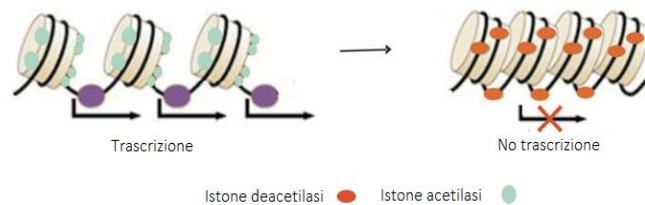


Figura 6. Schema della relazione tra acetilazione degli istoni ed espressione genica (Muhoen et al., 2009).

Le due principali categorie di modificazioni epigenetiche, la metilazione del DNA e le modifiche istoniche, sono in grado di interagire l'un l'altra ed è l'insieme di tali modifiche a regolare, in concomitanza anche ad altri fattori, la trascrizione genica, come schematizzato in Figura 7.

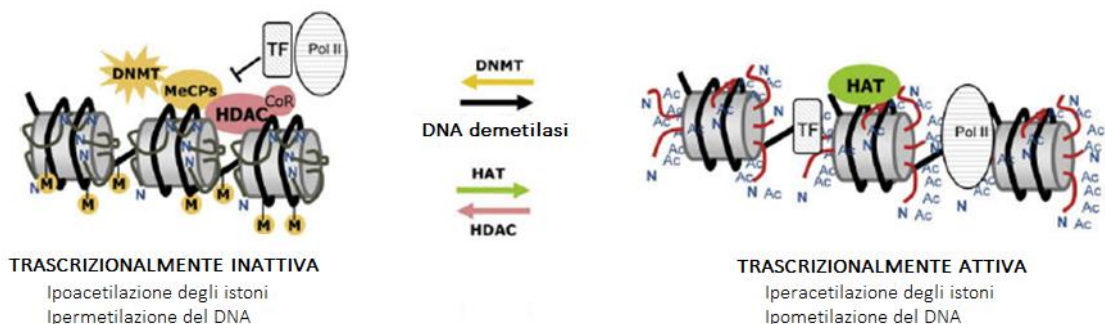


Figura 7. Come l'insieme delle modifiche epigenetiche (metilazione ed acetilazione) influenzano la trascrizione genica (Modificata da Snykers et al., 2009).

Considerando dunque l'insieme delle modifiche epigenetiche che possono avvenire a livello del DNA, si ipotizza l'esistenza di due meccanismi principali di regolazione trascrizionale: un meccanismo indiretto di silenziamento genico, in cui le proteine MeCp, interagiscono con le citosine metilate e reclutano il complesso corepressore dell'HDAC che, a sua volta, determina uno stato non permissivo della cromatina che impedisce il legame dei fattori di trascrizione e del complesso dell'RNA polimerasi II; ed un meccanismo diretto, il quale può essere legato all'interferenza diretta tra i fattori di trascrizione con l'HDAC o i siti *CpG-rich* metilati a livello delle regioni promotoriali (Snykers et al., 2009).

## **1.2 XENOBIOTICI, DIETA ED EPIGENETICA**

Le modifiche epigenetiche costituiscono un meccanismo che permette agli organismi viventi di propagare stabilmente nelle generazioni cellulari l'espressione di determinati geni. Alla luce del fatto che tali modifiche epigenetiche sono per definizione reversibili, è possibile che esse vengano modificate in funzione di fattori ambientali (Jaenisch et al., 2003) e rappresentino addirittura un meccanismo di adattamento dell'organismo ad essi. Infatti, oltre ai fattori genetici, anche fattori endogeni, come l'età e lo stato di salute, ed esogeni, quali lo stile di vita, l'esposizione a xenobiotici e la dieta, sono stati riscontrati essere in grado di determinare un'alterazione dell'epigenoma di un individuo

Inoltre, diversi studi hanno dimostrato come vi sia un link tra determinate patologie e l'influenza ambientale, in particolare durante lo sviluppo precoce (Hirst et al., 2009). Tale relazione mette in luce una potenziale associazione anche con quella che viene definita *riprogrammazione ambientale* o *imprinting*, che corrisponde al processo che permette, ad un organismo, di adattarsi all'ambiente circostante attraverso cambiamenti epigenetici ereditabili, e che, una volta definiti questi cambiamenti, possono predisporre un organismo a patologie qualora le condizioni ambientali, per le quali l'organismo si era inizialmente adattato, cambiassero più tardi nella sua vita (Hirst et al., 2009).

### 1.2.1 Il ruolo degli xenobiotici

Nell'ambito della valutazione del rischio per l'uomo a seguito dell'esposizione a sostanze tossiche, uno dei fattori cardine è rappresentato dalla capacità delle sostanze chimiche di determinare l'insorgenza di mutazioni a livello del DNA. Tale informazione è tutt'oggi utilizzata per definire il rischio ambientale delle sostanze ed è essenziale per definire i limiti di legge, che permettono la riduzione progressiva della concentrazione nell'ambiente di tali sostanze. Ad oggi è noto che l'effetto di queste sostanze è però in grado di estendersi oltre l'interazione diretta con il DNA e che le modifiche epigenetiche sono in grado di mediare gli effetti tossici di tali sostanze (Baccarelli et al., 2009).

Tra i meccanismi proposti essere alla base degli effetti tossici a seguito di esposizione ad agenti chimici vi è la trasmissione transgenerazionale dei cambiamenti epigenetici. In ratto, è stato ad esempio dimostrato come l'esposizione a Vinclozide, un distruttore endocrino, durante il periodo di gestazione nel quale si ha la determinazione del sesso del feto, è in grado di causare un'alterazione del pattern di metilazione del DNA a livello della linea germinale e che questo sia correlato con lo sviluppo di una serie di anomalie della capacità riproduttiva negli individui adulti, che vengono trasmesse attraverso le tre generazioni successive da ambo i sessi (Anway et al., 2005).

Numerosi studi condotti *in vitro*, in animali modello ed anche nell'uomo, hanno dimostrato come l'esposizione a diverse categorie di sostanze, tra le quali i metalli pesanti, le micotossine, i distruttori endocrini e, più in generale, i contaminanti ambientali, determini il cambiamento dell'epigenoma di un individuo e, in tal modo, possa essere in grado di indurre o contribuire ad indurre lo stato patologico. I meccanismi specifici che sono alla base di tale interazione rimangono ancora oscuri per talune sostanze. Serve inoltre considerare il fatto che, essendo i cambiamenti epigenetici piccoli, potenzialmente cumulativi e richiedendo talvolta tempistiche lunghe per avvenire, è complesso stabilire le relazioni di causa-effetto tra fattori ambientali, cambiamenti epigenetici e sviluppo di una patologia (Baccarelli et al., 2009).

In letteratura, numerosi studi sono stati condotti allo scopo di mettere in luce alcuni di questi aspetti. Ad esempio, è stato dimostrato nell'uomo come l'esposizione a metalli pesanti quali l'arsenico (As), sia in grado di indurre l'ipermetilazione di specifici geni come ad esempio p53 (Mass et al., 1997), oppure del gene codificante per la proteina *Death-*



*associated protein kinase* (DAPK). L'As inorganico è in grado di determinare lo sviluppo di tumori non solamente attraverso l'ipermetilazione di oncosoppressori, ma anche attraverso l'ipometilazione di oncogeni. La capacità di determinare l'ipometilazione di specifiche regioni geniche può essere spiegata dal fatto che l'As inorganico, nelle reazioni cellulari di detossificazione, viene metilato enzimaticamente da parte di enzimi che utilizzano come substrato il SAM e che potrebbero pertanto competere per esso con gli enzimi DNMT cellulari. Possono esistere però anche altri meccanismi attraverso cui i metalli pesanti sono in grado di determinare variazioni in termini di metilazione del DNA e potrebbero essere legati alla capacità di ciascuno di causare *stress* ossidativo, poiché la produzione di ROS è in grado di determinare dei danni a livello del DNA e, in tal modo, di interferire con l'interazione tra DNA e DNMT (Baccarelli et al., 2009).

Anche l'esposizione cronica ad aflatossine, è stato dimostrato essere in grado di indurre modificazioni a livello della metilazione del DNA. Uno studio condotto nell'uomo ha dimostrato come l'esposizione di donne nei primi mesi di gravidanza ad aflatossine sia in grado di determinare l'alterazione della metilazione del DNA dei globuli bianchi nei figli, con una percentuale di variazione del livello di metilazione pari al 1,7% ed un numero pari a 71 siti CpG a livello dei quali è stata riscontrata un'alterazione della metilazione (Hernandez-Vargas et al., 2015). Alcuni autori suppongono che tra i meccanismi che sono alla base dello sviluppo del cancro da parte di questa classe di sostanze, possa esserci l'interferenza con i normali processi di mantenimento dello stato di metilazione da parte degli enzimi DNMT, ad esempio attraverso la distruzione dell'apparato enzimatico che regola la reazione di metilazione, quindi degli enzimi DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e delle proteine MeCp (Bbosa et al., 2013).

### **1.2.2 Il ruolo della dieta**

La dieta rappresenta uno dei fattori ambientali che ha maggiormente influenza su diversi aspetti della salute umana ed il rischio di sviluppare patologie, quali il cancro.

La relazione che intercorre tra dieta e sviluppo di tumori è stata evidenziata già da molto tempo nell'uomo (Mayne et al., 2016). Più recentemente è stato messo in luce come siano proprio fattori epigenetici a poter essere modulati da fattori ambientali quali la dieta e

come questo possa spiegare il meccanismo che permette di integrare stimoli ambientali, cambiamenti permanenti in termini di espressione genica ed il processo neoplastico. Tale evidenza ha stimolato lo sviluppo di un nuovo campo di ricerca: l'epigenomica nutrizionale (Jiménez-Chillarón et al., 2012).

I periodi della vita nei quali è possibile che la dieta influenzi e modifichi l'epigenoma di un individuo possono essere essenzialmente due: il primo periodo è legato alle prime fasi di vita di un organismo, quindi durante lo sviluppo fetale e nella fase neonatale; il secondo periodo intercorre durante la fase adulta, quando si intraprendono cambiamenti considerevoli delle abitudini alimentari, ad esempio riducendo o aumentando drasticamente il quantitativo di calorie assunte con l'alimentazione (Jiménez-Chillarón et al., 2012).

Come i fattori legati alla dieta siano in grado di influire sulle modificazioni epigenetiche, in particolare sulla metilazione del DNA, può essere spiegato da tre possibili meccanismi, che non si escludono l'un l'altro ma potrebbero anzi agire in combinazione. Uno dei meccanismi, che potrebbe essere alla base della relazione tra epigenetica e nutrizione, è rappresentato dalla possibilità di fornire attraverso la dieta i precursori da cui viene sintetizzato il SAM, ad esempio attraverso l'assunzione di vitamine quali la vitamina B12, B6 e B2. Un secondo potenziale meccanismo può essere legato all'introduzione con la dieta di fattori in grado di modulare direttamente l'attività degli enzimi coinvolti nella reazione di metilazione. Infine, è possibile che alcune componenti alimentari esercitino un'influenza sul ciclo delle metionine, attraverso il quale viene prodotto il substrato donatore di gruppi metile per eccellenza (Jiménez-Chillarón et al., 2012).

### **1.3 EPIGENETICA E TUMORI**

Un elevato numero di alterazioni, che interessano modificazioni epigenetiche come la metilazione del DNA e le modifiche istoniche, sono state riscontrate essere associate allo sviluppo e alla progressione di diverse forme tumorali nell'uomo oltre che in alcune specie di interesse veterinario, ad esempio il cane.

La maggior parte delle modifiche epigenetiche vengono apportate durante la fase di differenziamento cellulare e vengono successivamente mantenute in modo stabile

attraverso i cicli cellulari, rendendo praticamente impossibile per le cellule avere identità diverse avendo lo stesso genoma. Di fatto quindi, l'eredità in termini di espressione genica viene mediata anche dalle modifiche epigenetiche (Sharma et al., 2010). Il fallimento nel mantenere correttamente determinate modifiche epigenetiche può implicare l'attivazione o al contrario l'inattivazione non appropriata di diverse vie di segnale, determinando in ultima analisi il potenziale sviluppo di patologie, come il cancro (Egger et al., 2004).

Il cancro viene definito come la crescita incontrollata e sparsa di cellule (*World Health Organization, WHO*) che costituiscono una popolazione più o meno eterogenea. Esistono diverse tipologie di tumori che possono colpire le diverse specie animali, tra le quali l'uomo, che sono tutte in generale accumulate dallo sviluppo di cellule anomale, che vanno incontro ad un processo di dedifferenziazione cellulare e che acquisiscono, attraverso eventi mutazionali successivi, capacità non tipiche di cellule differenziate. In particolare, le cellule tumorali, possiedono delle caratteristiche distintive che permettono di distinguerle dalle cellule normali. Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg nel 2000 definirono 6 possibili *hallmarks* tumorali, che riassumono quelle che sono le capacità generali che vengono acquisite dalle cellule tumorali attraverso successivi eventi mutazionali: la capacità di evadere il processo apoptotico; la capacità di replicare in maniera indipendente dai segnali di stimolazione di crescita cellulare; l'insensibilità ai segnali anti-proliferativi; la capacità di sostenere l'angiogenesi; il potenziale replicativo illimitato; la capacità di invadere i tessuti e dare metastasi. Successivamente, gli stessi autori, aggiunsero alla lista altri due *hallmarks*, in particolare la capacità di eludere il sistema immunitario e la sregolazione del sistema di produzione di energia della cellula. Gli stessi individuarono anche due condizioni predisponenti lo sviluppo tumorale, cioè l'instabilità genomica e l'induzione del processo infiammatorio (Hanahan et al., 2011). Di fatto tutte queste caratteristiche identificano il tumore come una patologia strettamente legata a modifiche a livello genetico che vengono acquisite in modo progressivo; è ad oggi però possibile immaginare come le medesime caratteristiche possano essere acquisite anche attraverso modifiche di natura epigenetica.

Lo sviluppo di tumori nell'uomo e nelle specie veterinarie è strettamente correlato all'acquisizione di alterazioni sia a livello genetico sia a livello epigenetico, che svolgono un ruolo nello sviluppo e nella progressione del tumore (Jones et al., 1999). Secondo il

modello descritto da Knudson nel 1971, il tumore corrisponde al risultato dell'accumulo di mutazioni che avvengono successivamente l'una all'altra a livello di geni oncogeni e oncosoppressori. Tale modello descrive come avviene l'inattivazione, in particolare, di oncosoppressori e viene comunemente definito "modello a due colpi": il primo "colpo" corrisponde ad un primo evento mutazionale che colpisce una delle due copie alleliche; il secondo "colpo" è rappresentato dal secondo evento mutazionale che colpisce la seconda copia allelica, considerando un organismo diploide (Jones et al, 1999).

I recenti studi che correlano nell'uomo lo sviluppo di tumori ad alterazioni della regolazione epigenetica hanno stimolato notevolmente la ricerca in questo ambito, che sempre più tenta di comprendere quali siano i meccanismi alla base di tale relazione. Pertanto, l'identificazione di *marker* epigenetici e soprattutto lo studio delle loro implicazioni biologiche e funzionali rappresentano uno *step* fondamentale per comprendere a fondo i meccanismi alla base del processo di cancerogenesi e, di conseguenza, per definire nuovi approcci terapeutici e preventivi nei confronti di questa complessa patologia.

### **1.3.1 Alterazioni del *pattern* di metilazione del DNA e i tumori**

Lo sviluppo di tumori e la loro progressione sono accompagnati da profondi cambiamenti nel *pattern* di metilazione del DNA, che rappresenta una delle alterazioni epigenetiche identificate per prime nei tumori. Si riporta che, nello sviluppo di tumori ad ereditabilità familiare, circa il 50% dei geni coinvolti nella cancerogenesi siano regolati da meccanismi che hanno alla base la metilazione del DNA (Jones et al., 2002) e non esclusivamente mutazioni a livello della sequenza nucleotidica, qualora tali mutazioni si riscontrino a livello delle cellule della linea germinale.

In genere, in un contesto tumorale, le cellule possiedono un epigenoma caratterizzato da uno stato di ipometilazione generale ed un'ipermetilazione a livello di specifiche CGI (Hirst et al., 2009; Jones et al., 2002) oltre a presentare alterazioni anche in termini di altre modifiche epigenetiche (Figura 8). In un tessuto normale, all'incirca il 3-5% di tutte le citosine risultano essere metilate; nei tumori, invece, durante il processo di ipometilazione

del DNA, si può osservare una bassa o moderata diminuzione del numero di citosine metilate, con un abbattimento medio tra il 5% e il 20% delle basi 5mC (Pfeifer, 2018). Solitamente si associa l'ipometilazione del DNA all'aumento dell'instabilità genomica e all'attivazione di proto-oncogeni oltre che di sequenze ripetute, retrotrasposoni ed introni.

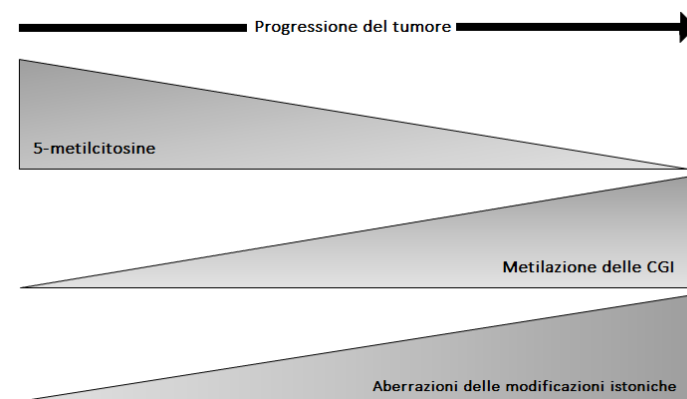


Figura 8. Cambiamenti epigenetici durante lo sviluppo tumorale (Modificato da Hirst et al., 2009).

Al contempo, anche l'ipermetilazione a livello di siti specifici favorisce il processo di tumorigenesi, silenziando geni oncosoppressori, coinvolti in processi cellulari essenziali per il tumore come ad esempio i meccanismi di riparazione del DNA, il ciclo cellulare, l'adesione cellulare e l'apoptosi (Sharma et al., 2010).

In molte forme tumorali nell'uomo, vengono meno i meccanismi di protezione e correzione della metilazione, che si basano sulla demetilazione delle regioni CGI ed eventualmente sulla ossidazione dei gruppi metile ad opera degli enzimi *Ten Eleven Translocation (TET) protein* (Pfeifer, 2018). Quindi l'incapacità delle cellule di riparare eventuali alterazioni a livello di modifiche epigenetiche si correla alla maggiore capacità del tumore di progredire, poiché è in tal modo in grado di attivare l'espressione di oncogeni e al contempo di inibire l'espressione di oncosoppressori in maniera incontrollata. È per questo che si può considerare la metilazione *de novo* delle CGI come un *hallmark* tumorale (Egger et al., 2004).

I meccanismi, attraverso cui la metilazione è in grado di determinare il silenziamento di oncosoppressori o l'induzione di oncogeni, possono essere di tipo *diretto*, attraverso l'iper- o l'ipometilazione del promotore del gene stesso; oppure di tipo *indiretto*, attraverso cioè

l'inibizione o l'induzione dell'espressione di geni, che codificano per fattori di trascrizione oppure per enzimi in grado di riparare il DNA.

Il significato, dal punto di vista funzionale, dell'ipermetilazione a livello delle regioni promotoriali di specifici oncosoppressori può essere valutato considerando le conseguenze dell'inattivazione di singole copie geniche o di tutte. Secondo il modello *a due colpi* proposto da Knudson nel 1971, per poter osservare un effetto a seguito della modificazione genica di un oncosoppressore è necessario che entrambe le copie alleliche, considerando un organismo diploide, vengano alterate. In relazione a questo, studi dimostrano come sia possibile che, in alcuni tumori, una delle due varianti alleliche presenti una mutazione che viene mantenuta stabilmente a livello della sequenza di DNA, e che l'altra variante allelica, al contempo, sia soggetta a ipermetilazione del DNA e questo determini nel complesso l'inattivazione dell'oncosoppressore (Slavotinek et al., 2000). Quindi spesso la metilazione del DNA può fungere da "secondo colpo" per l'induzione del tumore, come viene schematizzato nella Figura 9.

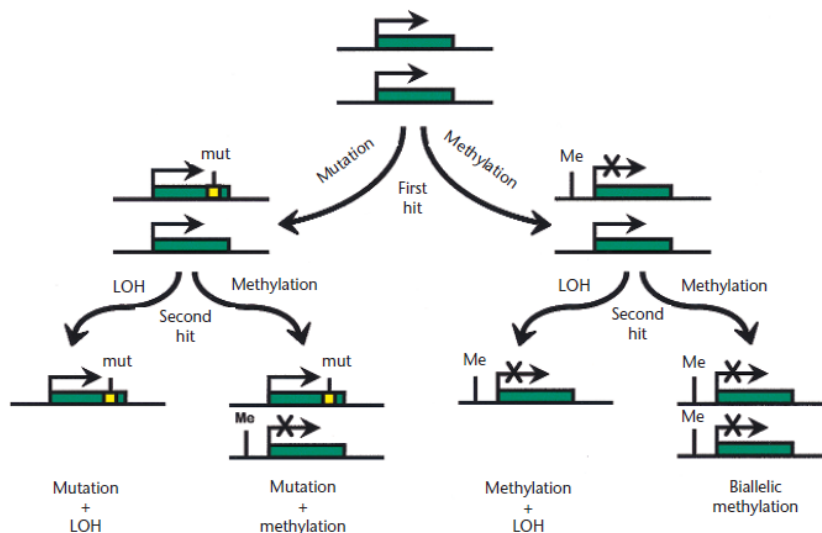


Figura 9. "Modello a due colpi" proposto da Knudson rivisitato, considerando potenziali modifiche genetiche ed epigenetiche contestualmente; LOH: Loss of Heterozygosity (Jones et al., 1999).

L'inattivazione di geni oncosoppressori attraverso l'ipermetilazione delle CGI, localizzate a livello di regioni promotoriali dei geni, rappresenta uno degli eventi principali nello sviluppo del tumore. Infatti, in diverse tipologie di tumore nell'uomo, è stata individuata un'alterata regolazione epigenetica a livello di sequenze promotrici, come ad esempio in forme sporadiche di tumore al seno e all'ovaio, dove il promotore del gene *Breast Cancer 1*

(BRCA1) risulta essere soggetto ad ipermetilazione. Tale gene è noto essere coinvolto nel mantenimento dell'integrità del genoma per cui la sua inattivazione sembra avere un ruolo nello sviluppo e nella progressione del tumore (Pfeifer, 2018; Truong et al., 2014). Un ulteriore esempio nell'uomo può essere rappresentato da geni codificanti fattori di trascrizione, come il gene *Runt-related transcription factor 3* (RUNX3) la cui ipermetilazione sembra giocare un importante ruolo nello sviluppo del tumore al seno, tanto che esso viene considerato come potenziale biomarcatore per la diagnosi della patologia (Lu et al., 2017). Non solo nell'uomo, ma anche in specie di interesse veterinario sono stati condotti alcuni studi che correlano alterazioni nell'espressione di alcuni oncosoppressori ed oncogeni con l'iper- o ipometilazione del DNA. Nel cane in particolare è stato dimostrato come l'oncosoppressore DAPK sia ipermetilato, e vada dunque incontro ad un processo di silenziamento, nella forma tumorale *Diffuse Large B-cell Lymphoma* (DLBCL) (Sato et al., 2013).

La metilazione, inoltre, è in grado di favorire il processo di sviluppo del tumore attraverso anche altri meccanismi, non correlati al silenziamento o all'induzione genica. Ad esempio, le 5mC sono considerate di per sé mutageniche, poiché è possibile che a livello di esse avvenga una reazione di deaminazione idrolitica che comporti una trasversione, cioè una sostituzione di una citosina con una timina (C→T). Anche le sequenze CpG non metilate sono frequentemente bersaglio di transizioni mutazionali che prevedono la sostituzione della citosina con un uracile (C→U), ma nella cellula questa sostituzione viene corretta con una maggiore efficienza rispetto a quella con la quale viene corretta la trasversione da C a T (Rollins et al., 2006; Jones et al., 2002;). La frequenza con la quale si può osservare una trasversione di una 5mC è stata stimata essere circa 18 volte più frequente rispetto alla frequenza media con la quale avvengono mutazioni puntiformi nel genoma dei mammiferi (Rollins et al., 2006).

A causa del fatto che le conoscenze nel campo dell'epigenetica in relazione al cancro sono tuttora limitate, non è ancora ad oggi del tutto chiaro quali siano i meccanismi che sono alla base di questi cambiamenti a livello genomico, in relazione proprio allo sviluppo del tumore. Quel che è noto è che alcune modifiche di natura epigenetica avvengono molto precocemente nello sviluppo tumorale, e possono, in parte, rappresentare delle mutazioni *driver* per il processo di cancerogenesi.

## 1.4 *DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA (DLBCL) NEL CANE*

Il linfoma, anche definito linfosarcoma o linfoma maligno, è una forma neoplastica che coinvolge il sistema ematopoietico e si sviluppa a partire dalla proliferazione di cellule linfoidi tumorali nei tessuti linfoidi, quali ad esempio linfonodi, milza, timo, oppure a livello delle mucose associate ai tessuti linfoidi, definite in inglese *mucosa-associated lymphoid tissue* (MALT), anche se in realtà lo sviluppo di questo tumore si può osservare in qualsiasi tipologia di tessuto, essendo le cellule da cui origina distribuite in tutto l'organismo. Il linfoma si distingue da un'altra forma tumorale che coinvolge la stessa tipologia cellulare: la leucemia linfoide. La principale distinzione tra linfoma e leucemia linfoide è legata al fatto che la prima rappresenta una forma neoplastica solida, mentre la seconda una forma neoplastica liquida che origina dal midollo osseo (Nikousefat et al., 2016).

I linfomi non-Hodgkin (NHL) costituiscono una famiglia di patologie tumorali del sistema linfoide, che risultano essere sia nell'uomo che nel cane tra le neoplasie più comuni. Nel cane, anche se risulta difficile definire quale sia la reale incidenza della patologia essendo la maggior parte dei dati non riportati, il linfoma NHL rappresenta circa il 6% di tutte le patologie neoplastiche e il 90% di tutte le neoplasie del sistema ematopoietico, con un'incidenza annuale nel 2016 stimata essere pari a 24 casi ogni 100.000 cani a rischio. La maggior parte dei linfomi NHL (80%) si osserva in cani di età compresa tra i 5 e gli 11 anni; l'incidenza infatti aumenta a 107 casi ogni 100.000 cani a rischio se corretta in funzione dell'età dell'animale. Sembra inoltre, che l'incidenza della patologia stia negli anni andando incontro ad un incremento in entrambe le specie, sia nell'uomo che nel cane (Nikousefat et al., 2016; Seeling et al., 2016).

Del linfoma si distinguono solitamente 4 diverse forme dal punto di vista del sito anatomico coinvolto: la forma anatomica *multicentrica*, caratterizzata da linfadenopatie generalizzate; la forma *alimentare*, caratterizzata da infiltrazioni a livello dell'apparato gastro-intestinale e/o linfadenopatie intestinali; la forma *mediastinica* ed *extranodale*, caratterizzate dal coinvolgimento di altri organi e tessuti (Mortier et al., 2012).

Con il termine linfoma si indica dunque un gruppo di patologie piuttosto eterogeneo, che comprende un gran numero di sottotipi tumorali, i quali si sviluppano a partire dalla



trasformazione neoplastica dei linfociti B e T a diversi stadi di sviluppo. Tra tutti, il sottotipo di linfoma NHL maturo più diffuso nel cane oltre che nell'uomo, è sicuramente rappresentato dal *linfoma diffuso a grandi cellule-B*, dall'inglese *Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)*. Nel cane l'incidenza di tale sottotipo tumorale, seppur sottostimata, risulta essere compresa tra il 47% e il 56% di tutte le tipologie di linfoma nella specie ed il 73% delle forme tumorali derivanti da cellule linfoidei di tipo B (Seeling et al., 2016).

L'eziologia del tumore è di natura multifattoriale e nella specie canina è tuttora controversa. Sono infatti numerosi i fattori che sono stati proposti come potenziali agenti scatenanti, tra i quali: infezioni retrovirali, anomalie cromosomiche, disfunzioni immunitarie, o fattori ambientali, legati ad esempio all'assunzione accidentale di alcuni erbicidi, come l'acido 2,4-Diclorofenossiacetico (Hayes et al., 1991), oppure all'esposizione a campi magnetici (Nikousefat et al., 2016). Mentre nell'uomo esistono numerose evidenze che supportano la correlazione tra lo sviluppo del linfoma e l'esposizione a contaminanti ambientali, quali ad esempio diossina o composti diossina simili (Fracchiolla et al., 2016), nel cane ancora pochi studi mettono in luce tale potenziale relazione. Quel che è noto nel cane, da quanto emerge da uno studio epidemiologico condotto in Campania nel 2009 da Marconato e collaboratori, è che vi sia un maggior rischio di sviluppo della patologia in cani che risiedono in aree note per l'esposizione a contaminanti ambientali, derivati da prodotti di scarto delle lavorazioni industriali. Questa tipologia di studi, condotti nel cane, suscita sempre maggior interesse, alla luce del fatto che questa specie potrebbe rappresentare un animale sentinella ideale per individuare la presenza di sostanze cancerogene nell'ambiente e predire dunque il rischio per l'uomo di sviluppare la patologia. Infatti, nel cane, il tumore DLBCL si presenta in maniera spontanea e presenta caratteristiche comuni al tumore nell'uomo, sia dal punto di vista clinico-patologico sia dal punto di vista istologico, tanto che viene solitamente trattato attraverso protocolli terapeutici simili a quelli adottati per l'uomo. Inoltre, il cane ha un'aspettativa di vita nettamente inferiore all'uomo, il periodo di latenza richiesto per lo sviluppo del tumore a seguito di esposizione ad una agente cancerogeno è più breve ed il tumore si sviluppa velocemente nella specie. Il cane potrebbe anche essere considerato un buon modello epidemiologico della patologia, condividendo con l'uomo l'ambiente in cui vive ed

essendo in tal modo possibile che vada incontro ad esposizione cronica alle medesime sostanze tossiche.

### 1.4.1.1 Classificazione

Nel cane, la classificazione dei sottotipi tumorali appartenenti alla classe del NHL è ancora ad oggi dibattuta e pertanto soggetta a revisioni. La classificazione presa come riferimento è quella proposta inizialmente per l'uomo dal WHO nel 2008, per la quale è stata proposta successivamente nel 2016 una revisione. Tale sistema di classificazione è stato successivamente adattato anche al cane.

Secondo tale sistema di classificazione, i sottotipi di linfoma sono definiti in base a criteri citologici, immunofenotipici, genetici, molecolari ed in base a caratteristiche cliniche del tumore. Basandosi su tali aspetti, nel cane sono stati definiti 20 diversi sottotipi di linfoma NHL (Seeling et al., 2016). Adottando un approccio di tipo istologico, il sistema proposto dalla WHO considera 3 aspetti (Figura 10): l'architettura del tumore, in base al quale si distinguono forme diffuse o nodulari/follicolari di tumore; la morfologia delle cellule tumorali, in base a tale criterio di distinguono cellule grandi, intermedie e piccole, prendendo come riferimento le dimensioni del globulo rosso oppure di una piccola cellula linfocitica; e l'attività mitotica.

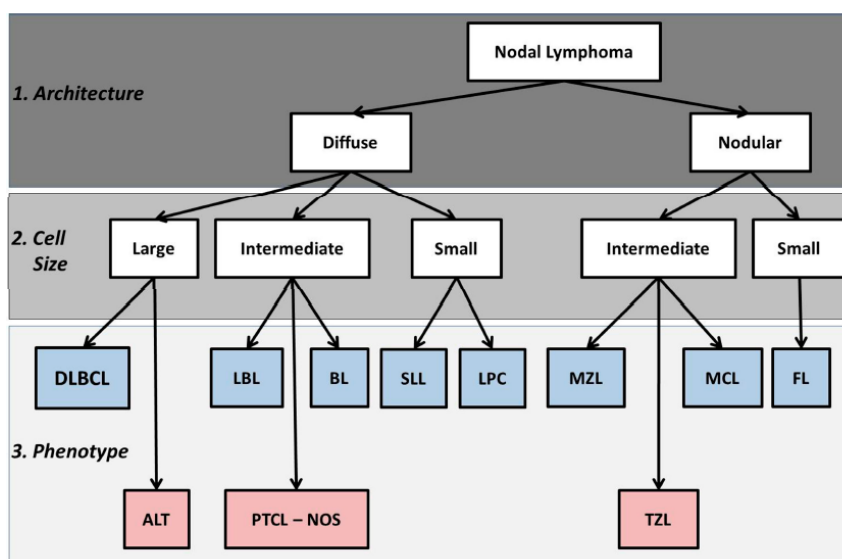


Figura 10. Classificazione del linfoma sulla base delle caratteristiche istologiche (Seeling et al., 2016).

Per arrivare ad una classificazione appropriata è necessario però considerare anche altre caratteristiche citologiche, quali caratteristiche citoplasmatiche e nucleari, oltre che ad informazioni riguardo l'immunofenotipo della cellula, essenziali per la classificazione oltre che per la diagnosi completa del linfoma.

Secondo tale sistema di classificazione, il sottotipo DLBCL nel cane è una forma tumorale diffusa, le cui cellule hanno elevate dimensioni, nuclei circolari, possono inoltre presentare nucleoli singoli oppure multipli, con un indice mitotico elevato e un aspetto definito in inglese "*Starry sky*", a cielo stellato. Dal punto di vista immunofenotipico, inoltre, le cellule appartenenti a questa classe tumorale presentano alcuni marcatori tipici, evidenziabili attraverso analisi di citofluorimetria, nello specifico sono positive ai marcatori cellulari CD20, CD79a, che corrispondono a marcatori di cellule B mature, e PAX5 (Aresu, 2016). Ai marcatori appena citati, possono talvolta esserne associati altri nell'uomo, come ad esempio CD30 o CD5 (Bosly, 2011).

#### **1.4.1.2 Aspetti clinici diagnostici e prognostici**

Dal punto di vista clinico, un cane affetto da linfoma presenta un generale ingrossamento dei linfonodi periferici. Inoltre, per quanto riguarda le manifestazioni cliniche del tumore, uno studio condotto sul linfoma, ha dimostrato come le diverse forme tumorali si sviluppino in siti prediletti: ad esempio la milza è maggiormente coinvolta in linfomi aggressivi derivanti da cellule B piuttosto che in linfomi indolenti derivanti da cellule T, mentre al contrario, il linfoma di tipo B aggressivo colpisce più raramente il midollo osseo rispetto al linfoma di tipo T (Aresu et al., 2015).

Per quanto concerne l'istologia del tumore DLBCL, esso è caratterizzato da una proliferazione diffusa dei grandi linfociti neoplastici, dei quali la dimensione dei nuclei corrisponde a più del doppio della grandezza dei globuli rossi. La variante centroblastica è la più diffusa ed è caratterizzata da una proliferazione diffusa di cellule linfoidi, che assomigliano molto ai centroblasti del centro germinativo, con nuclei vescicolari ovoidali o circolari con una cromatina poco addensata (*fine chromatin*) e uno scarso citoplasma da anfolitico a basofilo. Sono inoltre presenti nucleoli multipli, ben visibili (Aresu, 2016).

Il decorso clinico di questa patologia nel cane può variare notevolmente, come anche la risposta ai trattamenti e la prognosi. La presenza di cellule tumorali infiltranti il midollo osseo ha un significato prognostico importante, tanto che viene utilizzato per stimare il tempo di sopravvivenza dell'animale oltre che il tempo di progressione della patologia (Marconato et al., 2013).

Il trattamento del linfoma in medicina umana e veterinaria si basa convenzionalmente sull'utilizzo di chemioterapici citotossici, nello specifico si basa su protocolli CHOP che prevedono il trattamento con Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina e Prednisone. Benché inizialmente la risposta a questa terapia risulti essere molto buona (*tasso di prima remissione* pari al 90%), il problema maggiore legato a questo approccio è rappresentato dal fenomeno della resistenza ai farmaci, ossia dalla selezione di popolazioni cellulari resistenti che possono in tal modo crescere, espandersi e conseguentemente dare adito a recidive della patologia (Argyle et al., 2016). Tra gli approcci terapeutici alternativi alla chemioterapia che sono stati fino ad oggi esplorati, si annoverano il trapianto di midollo osseo e trattamenti attraverso immunoterapia, anche se entrambe queste strategie sono associate a un periodo di sopravvivenza corto e un elevato tasso di recidive (Ferraresso et al., 2017). Ad esempio, nel 2014 è stato testato da Marconato e collaboratori, in cani affetti da DLBCL, un vaccino autologo contenente l'antigene tumorale *Heat Shock Protein-Peptide Complex* (HSPPC); tale strategia è risultata essere sicura ed efficace solo se combinata con elevate dosi di chemioterapici.

Alla luce di questi aspetti, si rende di fatto necessario sviluppare degli approcci terapeutici alternativi, che richiedono una conoscenza più approfondita delle caratteristiche intrinseche del tumore, acquisibili attraverso le nuove tecnologie *high-throughput*.

#### **1.4.1.3 Landscape genetico e patogenesi molecolare del tumore**

Dal punto di vista della genetica del tumore, alla base di questa patologia è stato dimostrato come vi siano al contempo modifiche cromosomiche e alterazioni dell'espressione di geni, implicati nello sviluppo e nella progressione tumorale. Tali evidenze sono emerse da studi che hanno permesso di caratterizzare il trascrittoma (Ferraresso et al., 2017; Mudaliar et al., 2013), l'assetto cromosomico e l'eventuale presenza di aberrazioni nelle cellule tumorali (Aricò et al., 2014; Thomas et al., 2003). Ancora ad

oggi non esiste però uno studio che correli alterazioni in termini di espressione genica con l'acquisizione di copie cromosomiche o con loro perdita (Aresu, 2016).

Quel che si suppone è che alla base della patofisiologia di questa forma tumorale vi sia proprio il meccanismo con cui le cellule B originano, in quanto lo sviluppo di queste cellule può esso stesso portare a potenziali danni a livello del DNA; durante lo sviluppo, le cellule B infatti vanno incontro ad una serie di modifiche a livello del DNA, che possono predisporre l'acquisizione di alterazioni geniche e dunque lo sviluppo del tumore.

L'introduzione dello studio dei profili di espressione genica in medicina umana ha permesso di identificare nuovi sottotipi molecolari di linfoma che sono indistinguibili dal punto di vista istologico. Il sottotipo tumorale DLBCL è una forma tumorale piuttosto eterogenea dal punto di vista sia clinico che patologico; dal punto di vista molecolare però, è possibile distinguere tre sottoclassi: *Germinal center B-cell-like* (GCB) DLBCL, *Activated B-cell-like* (ABC) DLBCL e *Primary mediastinal B-cell lymphoma* (PMBL) (Argyle et al., 2016; Richards et al., 2013). Tale distinzione si sta iniziando a tradurre anche in termini clinici, in quanto queste categorie diagnostiche hanno tassi di sopravvivenza nettamente diversi in seguito ai trattamenti con i convenzionali chemioterapici. Dal punto di vista molecolare è inoltre possibile distinguere la forma tumorale DLBCL dal Linfoma di Burkitt. (Argyle et al., 2016).

In ambito veterinario sono stati identificati anche nel cane dei sottotipi molecolari di linfoma, che potrebbero corrispondere alle forme ABC e GCB DLBCL dell'uomo, ma sono necessari ulteriori studi su un numero di pazienti sufficientemente ampio per confermare tale evidenza (Mudaliar et al., 2013). Frantz e colleghi furono i primi, nel 2013, ad eseguire un'analisi di espressione genica mediante *DNA microarray* su 35 campioni di linfoma di cane, comprendenti i 6 principali sottotipi istologici di linfoma della specie canina. In base ai risultati ottenuti dall'analisi, gli autori sono stati in grado di suddividere i casi in tre gruppi principali, uno dei quali costituito proprio dai linfomi derivanti dalle cellule B, che comprendeva il linfoma delle cellule B marginale, il DLBCL ed il linfoma di Burkitt. Successivamente Mudaliar e colleghi nel 2013 hanno eseguito analisi di espressione genica comparando la stessa forma tumorale nelle due specie. Lo studio si concentra in particolare sul *pathway* cellulare di NF- $\kappa$ B, la cui attivazione anomala è stata dimostrata essere una caratteristica piuttosto comune nelle patologie linfoidi dell'uomo, in particolare

è stata dimostrata essere coinvolta nello sviluppo del sottotipo tumorale DLBCL. In questo studio, si dimostra che anche nel cane si ha l'attivazione del *pathway* cellulare di NF- $\kappa$ B, oltre che di altri *pathway* di segnale cellulari quali quello di p53, JAK/STAT e PI3K/AKT, anch'essi modulati in ambo le specie. I pazienti che presentano un'attivazione anomala del *pathway* PI3K/AKT/mTOR manifestano solitamente dei sintomi più severi, una risposta inferiore alle terapie chemioterapiche ed una minore capacità di sopravvivenza, da qui il valore prognostico della conoscenza dell'alterazione dell'espressione genica di questo *pathway* cellulare. Altri geni come BCL6 e MUM1/IRF4 sono invece raramente espressi nel cane rispetto all'uomo, in cui risultano essere maggiormente espressi (Richards et al., 2013).

Per quanto riguarda l'assetto cromosomico del tumore DLBCL, da analisi condotte con la tecnica *Comparative Genomic Hybridization* (CGH) è stato dimostrato come si possa associare allo stato patologico anche un certo numero di aberrazioni cromosomiche. Thomas et al. hanno dimostrato, nel 2003, come su 25 campioni di linfoma multicentrico, in 12 casi si potesse osservare l'acquisizione di una copia del cromosoma 13; ulteriori aberrazioni rilevate erano rappresentate dall'acquisizione del cromosoma 31 in 8 casi su 25, oppure dalla perdita del cromosoma 14 in 5 casi su 25. In uno studio successivo (Aricò et al., 2014), gli autori hanno correlato alcune delle sopra citate aberrazioni cromosomiche, riscontrate anche nel DLBCL, con la risposta al trattamento. In particolare, è stata osservata una risposta completa al trattamento in cani ai quali era stato diagnosticato un grado tre e quattro della patologia e che presentavano una copia in più del cromosoma 13; al contrario una prognosi più infausta è stata associata a cani che presentavano l'acquisizione di una copia del cromosoma 31 (Aresu, 2016).

Nonostante il tumore sia stato caratterizzato dal punto di vista molecolare, rimane ancora, dal punto di vista biologico, una forma tumorale eterogenea. Fino ad ora sono stati evidenziati pochi *biomarkers* con funzione prognostica, oltre ad essere tuttora limitato il numero di studi che si occupano di valutare la relazione che sussiste tra le modifiche epigenetiche e lo sviluppo del DLBCL nel cane.

La capacità delle modifiche epigenetiche di definire un diverso destino fenotipico per cellule con uguale genoma risulta essere una caratteristica alquanto interessante relazionata allo sviluppo dei tumori. Come già discusso precedentemente, l'espressione

genica è strettamente correlata alle modificazioni epigenetiche, tra le quali la metilazione del DNA, sia in un contesto normale sia in un contesto tumorale. La distribuzione anomala delle citosine metilate nel genoma si può infatti considerare un *hallmark* tumorale, addirittura alcuni autori credono che si possa associare ad un *pattern* di metilazione via via sempre più anomalo un comportamento più aggressivo del tumore. Ad oggi nella specie canina, ancora non è stata eseguita un'analisi completa del metiloma delle cellule tumorali DLBCL e soprattutto non sono stati studiati a fondo gli effetti che ha la metilazione, specialmente in relazione allo sviluppo e alla progressione di questa forma tumorale.

In letteratura esistono soprattutto studi che dimostrano come l'alterazione dell'espressione di singoli geni, evidenziati essere sregolati nel tumore rispetto ai tessuti sani, sia legata alla metilazione delle corrispondenti regioni promotoriali. Oltre al gene DAPK, descritto in uno dei capitoli precedenti, nel tumore DLBCL un altro gene è stato dimostrato essere ipermetilato a livello della regione promotoriale ed in tal modo silenziato nel tumore, in particolare il gene *Tissue Factor Pathway Inhibitor-2* (TFPI-2). Il TFPI-2 è un gene che codifica per l'inibitore di una serin-proteinasi, che regola l'attivazione delle metalloproteinasi ed influenza la regolazione della degradazione della matrice extracellulare, *step* essenziale per il rimodellamento cellulare, l'invasività del tumore e la capacità metastatica (Ferraresso et al., 2014).

Inoltre, è stato dimostrato in uno studio di CpG *microarray* condotto su linee cellulari di linfoma di cane, come l'ipermetilazione sia in grado di determinare il silenziamento anche del gene oncosoppressore codificante per la proteina p16, la quale è coinvolta nella regolazione della progressione del ciclo cellulare (Fujiwara-Igarashi et al., 2014).

Solo più recentemente, è stato pubblicato un lavoro nel quale si evidenzia la presenza di 1.194 loci con diverso livello di metilazione nei campioni tumorali (DLBCL) rispetto ai campioni sani (linfonodo) (Ferraresso et al., 2017). Questi loci genomici sono localizzati a livello di regioni promotoriali, ma anche a livello di regioni 5'-UTR, oltre che a livello di regioni esoniche o a monte del promotore. Nello specifico, dall'analisi delle regioni differenzialmente metilate è emerso che 1.011 regioni CpG su 29.513 sequenze analizzate risultavano essere ipermetilate nel tumore rispetto al controllo, mentre 183 sequenze risultavano essere ipometilate; le prime si localizzavano in particolare a livello dei

promotori (38,6%), delle regioni 5'-UTR , delle regioni esoniche (42,8%) e nelle regioni a monte dei geni, mentre le seconde soprattutto a livello delle regioni esoniche, delle regioni 3'-UTR e nelle regioni a valle dei geni (Ferraresso et al., 2017). Dal medesimo studio sembra emergere inoltre che l'accumulo progressivo di cambiamenti epigenetici possa conferire al tumore una maggiore aggressività.

Il *pattern* di metilazione del tumore è stato riscontrato essere rilevante anche nella distinzione delle forme tumorali ABC DLBCL e GCB DLBCL nel cane. Nel 2010 Shaknovich et al. hanno dimostrato come i due sottotipi molecolari di tumore si distinguano anche dal punto di vista epigenetico. Gli autori infatti analizzando il profilo di 69 casi di DLBCL primari trattati secondo il protocollo terapeutico CHOP, hanno evidenziato la presenza di 263 geni differenzialmente metilati nelle due sottoclassi tumorali, i quali permettono di classificare il tumore con una accuratezza pari al 91%. Questo sostiene la tesi secondo la quale aberrazioni in termini di metilazione del DNA siano in grado di contribuire nella determinazione del fenotipo tumorale.

## **1.5 METODICHE BIOMOLECOLARI PER LO STUDIO DELLA METILAZIONE DEL DNA**

Gli studi che hanno come obiettivo quello di chiarire il ruolo della metilazione nell'espressione genica, prevedono inizialmente la valutazione dello stato di metilazione della sequenza oggetto di analisi e successivamente l'esecuzione di studi funzionali, volti a capire quali siano i meccanismi alla base di tale relazione.

L'approccio più adatto per lo studio della metilazione del DNA viene definito in base all'obiettivo che lo studio si pone e può variare a seconda che la sequenza, di cui si vuole eseguire l'analisi, sia nota oppure no; nel caso in cui la sequenza candidata non sia nota, si può decidere di procedere definendo il profilo di metilazione dell'intero genoma oppure cercare in modo specifico le regioni differenzialmente metilate in campioni posti a confronto.

Le tecniche adottate per studi di questo tipo si possono distinguere in: metodiche basate sulla tecnica di conversione con bisolfito, che rappresenta il *gold standard* negli studi di metilazione del DNA; e metodiche non basate sulla conversione con bisolfito. Tale



tecnica di conversione, sviluppata da ricercatori canadesi nel 1992 (Frommer et al., 1992), si basa sulla trasformazione delle citosine non metilate in uracile, attraverso una reazione di deaminazione, che lascia al contempo le citosine metilate immutate (Figura 11). Il livello di risoluzione della tecnica è molto elevato, poiché permette di valutare lo stato di metilazione di ogni singola base nucleotidica.

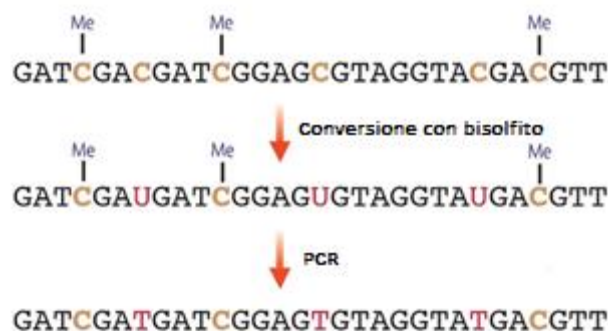


Figura 11. Reazione di conversione con bisolfito (Modificata da <https://www.activemotif.com/catalog/1182/ffpe-bisulfite-conversion-kit>).

La tecnica di conversione con bisolfito può essere applicata in analisi a livello dell'intero genoma, per valutarne il complessivo stato di metilazione o per eseguire analisi di natura comparata. A tale scopo, il prodotto della reazione di conversione può essere successivamente analizzato attraverso tecnologie di *Next Generation Sequencing* (NGS), si parla dunque di *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS), oppure attraverso analisi *microarray* (Kurdyukov et al., 2016). Nel caso in cui la sequenza in analisi sia invece nota, a seguito della conversione con bisolfito, è possibile proseguire in diversi modi: eseguendo un'amplificazione del DNA attraverso l'utilizzo di specifici *primer* in grado di discriminare sequenze metilate da sequenze non metilate, tale tecnica viene definita *Methylation Sensitive PCR* (MSP) (Herman et al., 1996); oppure è possibile amplificare tramite PCR *end point* la sequenza di interesse e procedere con il sequenziamento Sanger, nel caso in cui l'analisi sia limitata ad un numero esiguo di campioni, oppure attraverso pirosequenziamento.

Oltre a tecniche che si basano sulla conversione del DNA con bisolfito, esistono tecniche alternative, incentrate su diversi principi. Per l'analisi dello stato di metilazione dell'intero genoma si può ricorrere ad esempio a tecniche cromatografiche come la *High Performance Liquid Chromatography-ultraviolet* (HPLC-UV) oppure alla cromatografia liquida

accoppiata a *Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS). Alternativamente è possibile eseguire un'analisi della metilazione del DNA ricorrendo alla tecnica ELISA, il cui principio si basa sul riconoscimento delle 5mC attraverso l'utilizzo di anticorpi specifici e sulla rilevazione colorimetrica o fluorimetrica del legame antigene-anticorpo. Altre tecniche, considerate ad oggi però del tutto obsolete per lo studio della metilazione del DNA, sono rappresentate dalle tecniche *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), le quali richiedono l'utilizzo di enzimi restrizione, come HhaI o HpaII, in grado di tagliare o meno la sequenza di DNA a seconda che sia metilata oppure no. Tra le tecniche *high throughput*, la tecnica di *MethylCap-Seq* viene spesso utilizzata per studi condotti sull'intero genoma in alternativa alle tecniche di WGBS per i costi inferiori associati alla prima. Infatti, il sequenziamento viene eseguito non su tutto il genoma ma più selettivamente su una libreria costituita solo da sequenze soggette a metilazione; in particolare, nella fase di preparazione della libreria, sfruttando il dominio *Methyl CpG binding domain* (MBD) delle proteine MeCp2, è possibile selezionare in modo specifico le sequenze sottoposte a metilazione che verranno poi sequenziate (Brinkman et al., 2010). La preparazione della libreria può avvenire anche attraverso la tecnica di purificazione *Methylated DNA immunoprecipitation* (MeDIP), che si basa sull'utilizzo di anticorpi in grado di riconoscere le 5mC (Mohn et al., 2009).

Una volta evidenziata la presenza di modifiche dello stato di metilazione della sequenza nucleotidica, si procede con studi funzionali atti a chiarire quale sia lo specifico ruolo della metilazione in relazione all'espressione genica e quali siano i meccanismi alla base di questa relazione. A tale scopo, si eseguono degli studi *in vitro*, basati su saggi di *gene reporter assay*, che prevedono il clonaggio delle regioni di interesse a monte di un *gene reporter*, e la trasfezione di cellule competenti con i costrutti. Per poter dirimere il ruolo assunto dalla metilazione nella regolazione dell'espressione genica, è possibile eseguire delle prove di metilazione *in vitro*, attraverso l'utilizzo di enzimi dotati di attività metiltransferasica. La metilazione, con enzimi in grado di riconoscere specifici siti CpG, permette inoltre di definire preliminarmente quali siti, soggetti a metilazione, potrebbero essere maggiormente coinvolti nel controllo della trascrizione. Solo attraverso saggi di mutagenesi *in vitro*, è però possibile dimostrare l'effettiva rilevanza di un sito nel controllo dell'espressione genica e l'eventuale influenza data dalla metilazione di tale sito.

## 2. SCOPO

---

Negli ultimi anni l'epigenetica, in particolar modo l'interazione tra questa scienza e la genetica, sta suscitando sempre un maggior interesse. Le modifiche epigenetiche sembrano rappresentare uno dei meccanismi attraverso cui l'organismo è in grado di adattarsi a stimoli esogeni ed ambientali, oltre ad essere associate allo sviluppo di diverse patologie. Sempre un maggior numero di evidenze correla infatti lo sviluppo di alcuni tumori nell'uomo a modifiche di natura epigenetica ed in particolare ad alterazioni del *pattern* di metilazione del DNA o a modificazioni istoniche. In particolare, nel tumore DLBCL dell'uomo, numerose evidenze supportano la correlazione che sussiste tra l'alterazione dell'epigenoma dell'individuo e l'insorgenza del tumore; nell'ambito veterinario invece, le informazioni disponibili sono più limitate, nonostante il cane possa rappresentare un modello comparato interessante per lo studio della patologia.

Il presente lavoro di tesi si inserisce in un progetto più ampio, che ha come scopo quello di definire la relazione che sussiste tra espressione genica e metilazione del DNA in un contesto tumorale, in particolar modo nel DLBCL del cane, e di comprendere nel dettaglio i meccanismi molecolari alla base di questa potenziale relazione. Grazie a studi preliminari, sono stati selezionati i geni CiDEA, MAL e PCDH17, che sono stati poi l'oggetto di studio di questa tesi.

Lo scopo del lavoro di tesi è stato quello di valutare, attraverso degli studi funzionali *in vitro*, quale fosse il ruolo della metilazione a livello di specifiche regioni CGI dei geni oggetto di studio e quali delle regioni di interesse rappresentassero siti di maggiore rilevanza per la regolazione dell'espressione genica. A tale scopo, è stato messo a punto un saggio di *gene reporter assay*, che ha previsto, inizialmente, il clonaggio delle regioni CGI all'interno di un plasmide contenente il gene *reporter* codificante per la luciferasi; successivamente, la messa a punto di un protocollo di trasfezione in una linea cellulare di cane. La trasfezione è stata eseguita sia con i prodotti del clonaggio non metilati, sia con i prodotti del clonaggio metilati attraverso tre diversi enzimi dotati di attività metiltransferasica: Metiltransferasi SssI (M.SssI), in grado di metilare tutte le sequenze CpG; HpaII Metiltransferasi (M.HpaII) e HhaI Metiltransferasi (M.HhaI), in grado di metilare specifiche sequenze CpG. Sulla base dei risultati ottenuti, sono stati poi effettuati

degli studi di predizione, volti ad individuare i siti potenzialmente riconosciuti dai fattori di trascrizione, la cui attività poteva essere influenzata dalla metilazione di specifici *binding sites*.

### 3. MATERIALI E METODI

---

#### 3.1 SCELTA DEI GENI E LOCALIZZAZIONE DELLE REGIONI CPG

Il seguente lavoro di tesi si inserisce in un progetto sperimentale più ampio in cui, grazie all'applicazione di tecnologie *omiche*, sono stati caratterizzati il trascrittoma ed il metiloma di campioni tumorali di DLBCL di cane e confrontati con campioni sani di linfonodo; sui medesimi campioni è stata eseguita anche una valutazione della eventuale presenza di aberrazioni cromosomiche, attraverso la tecnica CGH. Dalla combinazione ed integrazione bioinformatica dei risultati ottenuti dalle tre tecnologie *omiche*, sono stati selezionati tutti i geni che sono risultati essere ipermetilati, sottoespressi e al contempo localizzati in regioni non sottoposte a riarrangiamento cromosomico nel tumore rispetto ai campioni sani. Tra tutti questi, grazie anche al supporto di un'indagine bibliografica, sono stati selezionati 20 geni che risultassero essere coinvolti nello sviluppo di forme tumorali, anche in altre specie come nell'uomo, e che potessero essere dei potenziali oncosoppressori; inoltre sono stati scelti i geni la cui espressione risultasse essere influenzata dalla metilazione del DNA.

Di tali geni, sono stati successivamente selezionati solo quelli la cui espressione genica, a seguito di trattamento con composti ipometilanti (Azacitidina e Decitabina), venisse ripristinata sia in una linea tumorale stabilizzata di cane (CLBL1), sia in linee cellulari primarie di DLBCL di cane. I geni risultati essere di interesse a seguito dell'utilizzo di questo approccio preliminare, che sono oggetto della presente tesi sono *Cell death-inducing DNA fragmentation factor  $\alpha$ -like effector A* (CiDEA), *Myelin and Lymphocyte protein* (MAL) e *Protocadherin 17* (PCDH17). Per prima cosa, si è proceduto alla localizzazione delle CGI ipermetilate in DLBCL a livello di regioni esoniche, intergeniche ed introniche dei geni di interesse, utilizzando i risultati ottenuti dall'analisi del metiloma; sono state escluse dall'analisi le regioni CGI presenti a livello del *Transcription Termination Site* (TTS) perché il ruolo di tali regioni nella regolazione della trascrizione è ancora poco chiaro. La localizzazione delle regioni CGI è avvenuta prendendo come riferimento il sito di inizio della trascrizione (TSS), che rappresenta la posizione 0 nella sequenza.

A livello del gene MAL (Figura 12) è stata individuata un'unica regione CGI ipermetilata in DLBCL, denominata MAL\_CpG1, la quale comprende l'intero esone 1 e si estende da -822 bp a monte del sito di inizio della TSS, fino a +578 bp a valle del TSS, cioè all'interno del primo introne.

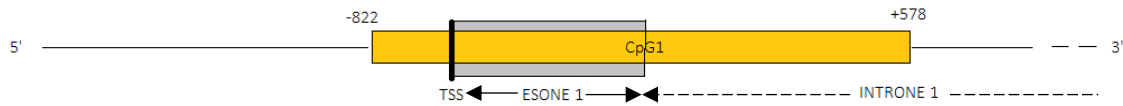


Figura 12. Disegno della regione CpG island oggetto di studio del gene MAL.

Per quanto riguarda il gene CiDEA, sono state selezionate due regioni CGI ipermetilate nel tumore, descritte in Figura 13, le quali sono localizzate: la prima, denominata CiDEA\_CpG1, si trova a valle del TSS, nello specifico tra la posizione +210 e +510, cioè a cavallo dell'esone 1 e dell'introne 1; la seconda regione, denominata CiDEA\_CpG2, si trova all'interno dell'introne 1, tra la posizione +710 e +1.510 rispetto al TSS.

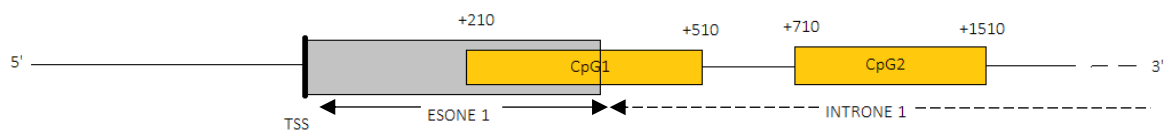


Figura 13. Disegno delle regioni CpG island oggetto di studio del gene CiDEA.

Infine, per il gene PCDH17 (schematizzato in Figura 14) sono state selezionate 5 diverse regioni CGI ipermetilate nel linfoma, tre delle quali si trovano a monte del sito di inizio della trascrizione, in particolare le regioni denominate PCDH17\_CpG1 (da -3.779 bp a -2.779 bp), PCDH17\_CpG2 (da -2.379 bp a -1.879 bp) e PCDH17\_CpG3 (da -1.679 bp a -579 bp). La regione PCDH17\_CpG4 si localizza a -479 bp a monte del TSS, fino all'esone 1 cioè fino a +721 bp a valle del TSS; mentre la regione PCDH17\_CpG5 si trova nella regione compresa tra l'esone 1 e l'introne 1, cioè da +821 a +2.421.

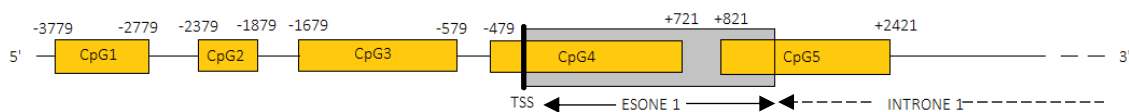


Figura 14. Disegno delle regioni CpG island oggetto di studio del gene PCDH17.

## 3.2 PROTOCOLLO PER L'OTTENIMENTO DEI CLONI

Per poter valutare l'effetto della metilazione delle regioni promotoriali dei geni oggetto di analisi, è stato necessario clonare le diverse regioni all'interno del plasmide pCpGL-basic (cortesemente donato da Maja Klug e Michael Rehli; *Department of Hematology and Oncology, University Hospital, Regensburg, Germany*), il quale non presenta all'interno della sua sequenza regioni CGI. Le diverse sequenze sono state clonate all'interno del vettore scelto, a monte del gene che

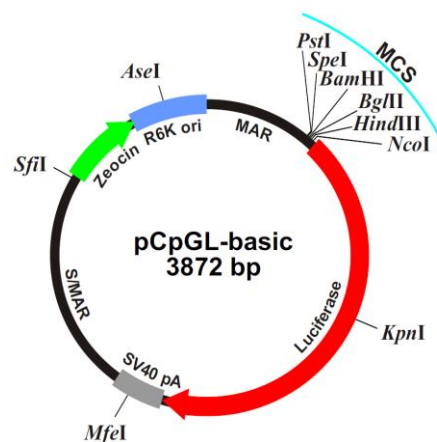


Figura 15. Schema plasmide pCpGL-basic (Klug et al., 2006)

codifica per la luciferasi *Firefly* attraverso un Sito Multiplo di Clonaggio (MCS), che comprende una serie di siti riconosciuti da enzimi di restrizione. All'interno del plasmide è poi presente il gene per la resistenza alla Zeocina e l'origine di replicazione batterica R6K ori, che permette la replicazione del plasmide in batteri *Escherichia coli*, esprimenti il gene PIR1 (Figura 15).

### 3.2.1 PCR end point per l'ottenimento del frammento da clonare

La Reazione a Catena della Polimerasi, dall'inglese *Polymerase Chain Reaction* (PCR), è una tecnica che permette di amplificare una sequenza di DNA specifica, attraverso la simulazione *in vitro* di ciò che normalmente avviene durante il processo di replicazione del DNA *in vivo*. Essa si basa sull'utilizzo di una coppia di sequenze oligomeriche comunemente dette *primer*, le quali riconoscono specificatamente la regione da amplificare e forniscono all'enzima DNA polimerasi l'estremità 3'-OH, dalla quale la reazione di amplificazione può avere inizio. La reazione di PCR avviene attraverso la ripetizione di una serie di fasi (denaturazione, appaiamento, estensione) per un numero definito di cicli, attraverso i quali il numero di copie di DNA di partenza aumenta in maniera esponenziale, fino al completo esaurimento delle componenti della reazione.

Da alcuni dati preliminari ottenuti in precedenza in laboratorio, è stato possibile individuare le isole CpG presenti nei tre geni presi in esame. A partire da tali indicazioni, in questo lavoro di tesi, sono state amplificate inizialmente delle regioni più ampie (di circa 1.000-1.500 bp), utilizzando delle coppie di *primer* disegnate attraverso l'utilizzo del *tool* bioinformatico Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabella 1). Le temperature di *annealing* dei *primer* ( $T_m$ ) sono state scelte attraverso l'utilizzo dei *tool* bioinformatici Primer Blast e NEB  $T_m$  calculator (<http://tmcalculator.neb.com/>).

GENE	REGIONE	SEQUENZA PRIMER FORWARD (5'-3')	SEQUENZA PRIMER REVERSE (5'-3')	$T_m$
<b>CiDEA</b>	CpG1	GCGACACATCTACCTTTTCA	AGGCGTGGCCGCGAG	62°C
	CpG2	CCCCTCGTGCCCCAGCG	GATCTTCAAAGAAGCACTGGCCCTTCC	65°C
<b>MAL</b>	CpG1	AAGATTAATCTTAGTCCAGGAAGAAA	AGCTGGGCACTCCTACAAG	60°C
<b>PCDH17</b>	CpG1	TGCTTCTGGAGGAAGACGGT	CTCTTCTATCACGGGTGGTCTC	60°C
	CpG2	CCTCCAAAACATGAATCTGGCTTTT	GTAGGAGTGGGCTGGATGGAA	60°C
	CpG3	CCATGAGTTGCCTGTTGATTTC	GACTTGGGGACTCAAAGTTGA	65°C
	CpG4	GGTTCGGGGAACTTGAGCGGAA	AGGACCCTGCACTGCAGCTG	60°C
	CpG5	CAAGCTGGAGGAGAACTACGACAA	TCCTGGTCCGAAGGTGTCAGG	60°C

Tabella 1. Sequenze dei primer utilizzati nella prima reazione di PCR per l'amplificazione delle regioni CpG rich dei geni CiDEA, MAL e PCDH17 e le rispettive temperature di melting ( $T_m$ ) utilizzate.

Per tutte le reazioni di PCR è stato utilizzato l'enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs, New England). La composizione della mix è riportata nella Tabella 2.

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE FINALE	25µl DI REAZIONE
<b>Q5 Reaction Buffer (5X)</b>	1X	5µl
<b>dNTPs (10 mM)</b>	200 µM	0,5µl
<b>Forward Primer (10 µM)</b>	0.5 µM	1,25µl
<b>Reverse Primer (10 µM)</b>	0.5 µM	1,25µl
<b>Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2U/µl)</b>	0.02 U/µl	0,25µl
<b>Q5 High GC Enhancer (5X)</b>	1X	5µl
<b>Nuclease-free water</b>	-	Fino a 25 µl

Tabella 2. Componenti della mix di reazione preparata per la PCR con l'enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs, New England).



La quantità di DNA genomico che è stata utilizzata per la prima reazione di PCR è variata tra 30 e 50 ng. Tale reazione è avvenuta attraverso l'utilizzo del termociclatore Proflex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), secondo il seguente protocollo termico (Tabella 3):

NUMERO DI CICLI	FASE	DURATA	TEMPERATURA
	Fase iniziale	30 secondi	95°C
<b>35-40</b>	Denaturazione	10 secondi	95°C
	Appaiamento	10 secondi	vedi Tabella 1 e 4
	Estensione	10 secondi	72°C
	Fase finale di estensione	10 minuti	72°C
	Fase di blocco della reazione	10 minuti	10°C

Tabella 3. Protocollo termico utilizzato per le reazioni di PCR.

Successivamente, si è proceduto ad effettuare una reazione di *Nested-PCR*, che ha permesso:

- l'amplificazione di un frammento più corto che contenesse esattamente le isole CpG di interesse;
- l'inserimento manuale delle sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione, utilizzati per il successivo clonaggio del frammento all'interno del plasmide pCpGL-basic.

Dopo aver individuato i siti di taglio riconosciuti dagli enzimi di restrizione presenti nel plasmide, è stato necessario disegnare dei *primer* per la *Nested-PCR*, che permettessero l'inserimento dei medesimi siti di taglio anche all'interno dell'amplicone (Tabella 4).

Le temperature di *annealing* dei *primer* ( $T_m$ ) sono state scelte attraverso l'utilizzo dei *tools* bioinformatici *Primer Blast* e *NEB Tm calculator* (<http://tmcalculator.neb.com/>).

Per la reazione di *Nested-PCR* è stato utilizzato: l'enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs, New England), per le sequenze CiDEA\_CpG1, MAL\_CpG1, PCDH17\_CpG3, PCDH17\_CpG4 e PCDH17\_CpG5; l'enzima Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), per le sequenze CiDEA\_CpG2, PCDH17\_CpG1 e PCDH17\_CpG2. I dettagli delle componenti delle mix di reazione per i due enzimi sono riportati in Tabella 2 e Tabella 5.

GENE	REGIONE	SEQUENZA PRIMER FORWARD (5'-3')	SEQUENZA PRIMER REVERSE (5'-3')	VARIANTE	T <sub>m</sub>
<b>CIDEA</b>	CpG1	GTCTCCAGTCACCCCGTCTCGG	GCAAGCTTGGCCGCGAGCC	WT	65°C
		GTCaCtAGTCACCCCGTCTCGG	GCAaGCTTGGCCGCGAGCC	Mut	
	CpG2	CTCCTGCACCCGGCATCCC	CTTCCAAGAGATATTTATCAACAAAGACA	WT	60°C
		CTCCTGCAGCCGGCATCCC	CTTCCAtGgGATATTTATCAACAAAGACA	Mut	
<b>MAL</b>	CpG1	AAACAACATCCAGGCAATGGGAGGG	CAAGGACGTGCGCCCTCTCGGAAGG	WT	65°C
		AAACAaggATCCAGGCAATGGGAGGG	CAAGGcCaTgGCCCTCTCGGAAGG	Mut	
<b>PCDH17</b>	CpG1	GGTAGCTGGAGACTCTGGAGAGC	TCAGCTCATAGCCTGCAAAAGAC	WT	65°C
		GGTAGCTGcAGACTCTGGAGAGC	TCAGCcCATgGCCTGCAAAAGAC	Mut	
	CpG2	CAGAGAAAGCGTTAGGAAGAAGCCG	GTGATGCAATTCTGCAGTCTGGC	WT	60°C
		CAGAGAAactaGTTAGGAAGAAGCCG	GTGAaGcTtTCTGCAGTCTGGC	Mut	
	CpG3	AAACTGCATTCGAGAGGAGTCA	GTGTCCCGGCTCCCCTAG	WT	62°C
		AAACTGCAGCGAGAGGAGTCA	GTGTCCatGGCTCCCCTAG	Mut	
	CpG4	AAGGACCCACGGACTCGGGGC	CCCCTGGCGCACGGAGACG	WT	65°C
		AAGGAtCCACGGACTCGGGGC	CCCaTGGCGCACGGAGACG	Mut	
	CpG5	CAGGACGAGTACAACGTGACGA	AGTTAGGCTACAAGTCTTTACctg	WT	61°C
		CAGGACtAGTACAACGTGACGA	AGTTAaGCTtCAAGTCTTTACctg	Mut	

Tabella 4. Sequenze dei primer utilizzati nella reazione di Nested-PCR e le rispettive temperature di annealing (T<sub>m</sub>). In grigio sono evidenziati i siti di taglio per gli enzimi BclI (5'-ACTAGT-3'), HindIII (5'-AAGCTT-3'), PstI (5'-CTGCAG-3'), NcoI (5'-CCATGG-3'), BamHI (5'-GGATCC-3'); sottolineate in grassetto sono indicate le basi che sono state mutate (Mut) rispetto alla sequenza wild type (WT).

COMPONENTI	CONCENTRAZIONE FINALE	20µl DI REAZIONE
<b>Phire Reaction Buffer (5X)</b>	1X	4µl
<b>dNTPs (10 mM)</b>	200µM	0,4µl
<b>Primer Forward (10 µM)</b>	0,5µM	1 µl
<b>Primer Reverse (10 µM)</b>	0,5µM	1 µl
<b>DMSO</b>	3%	0,6 µl
<b>Phire Hot Start II DNA Polymerase</b>	-	0,4 µl
<b>Nuclease-free water</b>	-	Fino a 20 µl

Tabella 5. Componenti della mix di reazione preparata per la prima PCR con l'enzima Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Nella Reazione di Nested-PCR è stato utilizzato come template un volume pari a 0,5-2 µl di prodotto di amplificazione della prima PCR.

La reazione è avvenuta attraverso l'utilizzo del termociclatore Proflex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), secondo il protocollo termico descritto in Tabella 3.

### 3.2.2 Elettroforesi in gel di agarosio

La tecnica di elettroforesi in gel di agarosio permette di analizzare e separare gli acidi nucleici, sfruttando la loro carica intrinseca e il loro peso molecolare. Il DNA viene fatto migrare attraverso una matrice, rappresentata dal gel di agarosio, applicando una corrente elettrica ai poli del gel.

Tale tecnica è stata utilizzata per analizzare i prodotti di PCR, in modo tale da poter verificare l'ottenimento di un unico prodotto di PCR della lunghezza desiderata da poter in seguito purificare e clonare. È stato preparato un gel di agarosio al 1,2% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in *buffer* TAE 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), a cui è stato aggiunto l'intercalante Euro Safe 20.000 X (Euro Clone, Milano, Italia) per la visualizzazione delle bande. Sono stati caricati: 5µl di prodotto di amplificazione più 1 µl di Blu di Bromofenolo 6X (Qiagen, Hilden, Germania) per ciascun pozzetto; 3 µl di *ladder* da 100 bp Sharp Mass™ 100 (Euro Clone, Milano, Italia). La corsa in gel è avvenuta all'interno di una cameretta elettroforetica (Major Science, Saratoga, USA) in *buffer* TAE 1X, a 100 V per 25 minuti.

I prodotti di amplificazione della *Nested-PCR* sono stati caricati in gel di agarosio 2% *low melting* (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in *buffer* TBE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) dal quale poi è stato possibile purificare e concentrare ciascun prodotto di PCR. Sono stati caricati: 25 µl per pozzetto di prodotto di reazione della *Nested-PCR* più 5 µl di una soluzione di Blu di Bromofenolo 6X; 3µl di *ladder* da 100 bp Sharp Mass™ 100 (Euro Clone, Milano, Italia). La corsa è avvenuta in cameretta elettroforetica (Elettrofor, Rovigo, Italia) a 100 V per 70 minuti.

### 3.2.3 Purificazione da gel

Allo scopo di purificare e concentrare il prodotto di amplificazione derivante dalla *Nested-PCR* si è ricorso all'utilizzo del kit di purificazione NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Le bande corrispondenti alle sequenze di interesse sono state prima visualizzate attraverso il trans illuminatore UV (Euro Clone, Milano, Italia), prelevate dal gel di agarosio *low melting* 2% grazie all'utilizzo di un bisturi e poste

in eppendorf. Si è quindi proceduto alla purificazione seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice del kit. Il prodotto purificato è stato quantificato con Qubit dsDNA Broad Range (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

### 3.2.4 Sequenziamento con metodo Sanger

Il sequenziamento con metodo Sanger è un metodo di sequenziamento enzimatico che si basa sull'utilizzo di nucleotidi dideossitriofosfato (ddNTPs) modificati, che vengono inseriti nella mix di reazione con i deossinucleotidi trifosfato (dNTPs) in proporzione definita, in modo tale da permettere l'interruzione della reazione di sintesi del DNA in ciascuna posizione della sequenza nucleotidica. Attraverso poi un'analisi di elettroforesi capillare è possibile separare i diversi frammenti ottenuti e definire la sequenza nucleotidica, rilevando il segnale di fluorescenza emanato da ciascun ddNTP terminatore marcato. Questa tecnica permette di analizzare con una buona efficienza sequenze di lunghezza compresa tra 700-900 bp.

Tale analisi è stata eseguita in modo da poter verificare l'effettivo inserimento dei siti di restrizione all'interno del frammento che verrà successivamente clonato. I *primer* che sono stati utilizzati per la reazione di sequenziamento vengono riportati nella Tabella 6. Per alcune regioni di lunghezza superiore a quella sequenziabile con metodo Sanger, è stato necessario ridisegnare la coppia di *primer*, in modo tale da ottenere due sequenze grazie alle quali analizzare le estremità 5' e 3', dove si localizzano i siti mutati.

GENE	REGIONE	SEQUENZA PRIMER FORWARD (5'-3')	SEQUENZA PRIMER REVERSE (5'-3')
<b>CIDEA</b>	CpG1	GTCACTAGTCACCCCGTCTCGG	GCAAGCTTGGCCGCGAGCC
	CpG2	CTCCTGCAGCCGGCATCCC	CTCCATGGGATATTTTATCAACAAAGACA
<b>MAL</b>	CpG1	GATGGTTATCATTCTTAAGGGAC	CCAAGGCCGAGATGCG
<b>PCDH17</b>	CpG1	GGTAGCTGCAGACTCTGGAGAGC	TCAGCCCATGGCCTGCAAAAGAC
	CpG2	CAGAGAACTAGTTAGGAAGAAGCCG	GTGAAGCTTTCTGCAGTCTGGC
	CpG3	TTGGCTGCTCGGAAAGGAG	CGGACTGCATCTCCCAGC
	CpG4	TCGAGATGGACATCTCGGAGAAC	TAGGTGCGGAGCCCGTTGT
	CpG5	GTGTCCTACTCCATCCTGCCC	CGCAGGGCGTAGATGGCC

Tabella 6. Primer utilizzati per la verifica di inserimento dei siti di restrizione dopo amplificazione attraverso Nested-PCR.

### 3.2.5 Digestione con enzimi di restrizione

Una volta verificato l'inserimento dei siti di taglio all'interno delle sequenze, si è proceduto con la reazione di restrizione, utilizzando enzimi di restrizione di nuova generazione denominati *Fast Digest* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e che necessitano di un unico *buffer* universale. I dettagli riguardanti le tempistiche adottate per la reazione di reazione ed i siti di taglio di ciascun enzima sono riportati in Tabella 7. Tutti gli enzimi utilizzati producono estremità coesive, definite in inglese *sticky ends* e lavorano alla temperatura ottimale di 37°C.

NOME ENZIMA	NOME DI CATALOGO	SITO RICONOSCIUTO	TEMPO (minuti)
<b>Fast Digest BcuI</b>	FD1253	5'-A↓CTAGT-3' 3'-TGATC↑A-5'	20
<b>Fast Digest HindIII</b>	FD0504	5'-A↓AGCTT-3' 3'-TTCGA↑A-5'	20
<b>Fast Digest PstI</b>	FD0614	5'-CTGCA↓G-3' 3'-G↑ACGTC-5'	10-15
<b>Fast Digest NcoI</b>	FD0573	5'-C↓CATGG-3' 3'-GGTAC↑C-3'	15-30
<b>Fast Digest BamHI</b>	FD0054	5'-G↓GATCC-3' 3'-CCTAG↑G-3'	15

Tabella 7. Enzimi di restrizione utilizzati per il clonaggio e rispettivi siti di riconoscimento.

Per ciascuna sequenza in analisi è stata utilizzata una specifica coppia di enzimi affinché il clonaggio avvenisse in modo unidirezionale, grazie alla creazione di estremità compatibili specifiche tra il plasmide e le regioni da inserire, come specificato in Tabella 8. Il plasmide è stato digerito con ciascuna coppia di enzimi, in modo tale da creare estremità compatibili con ognuno dei frammenti da inserire.

REGIONE	COPPIA DI ENZIMI (Fast Digest)
<b>CIDEA_CpG1</b>	BcuI e HindIII
<b>CIDEA_CpG2</b>	PstI e NcoI
<b>MAL_CpG1</b>	BamHI e NcoI
<b>PCDH17_CpG1</b>	PstI e NcoI
<b>PCDH17_CpG2</b>	BcuI e HindIII
<b>PCDH17_CpG3</b>	PstI e NcoI
<b>PCDH17_CpG4</b>	BamHI e NcoI
<b>PCDH17_CpG5</b>	BcuI e HindIII

Tabella 8. Coppie di enzimi utilizzati per il clonaggio delle regioni nel plasmide pCpGL-basic.

Vengono di seguito riportate (Tabella 9) le due diverse mix utilizzate per la reazione di restrizione del plasmide pCpGL-basic e delle regioni CpG dei geni oggetto di analisi.

COMPONENTI	DNA PLASMIDICO	PRODOTTO DI PCR
<b>Nuclease-free water</b>	15 µl	17 µl
<b>Fast Digest buffer (10X)</b>	2 µl	2 µl
<b>DNA</b>	2 µl (fino ad 1 µg)	10 µl (circa 0,2 µg)
<b>Fast Digest Enzyme</b>	1 µl	1 µl
<b>Volume totale</b>	20 µl	30 µl

Tabella 9. Dettagli della mix per la doppia restrizione.

I prodotti di digestione sono stati poi analizzati in gel di agarosio 1,2% in *buffer* TAE 1X.

### 3.2.6 Ligazione

La reazione di ligazione ha permesso di inserire le porzioni delle regioni promotoriali dei geni oggetto di studio all'interno del plasmide pCpGL-basic.

Sono stati sottoposti a ligazione i prodotti di digestione del plasmide e del frammento di interesse, dopo purificazione da gel e quantificazione con Qubit dsDNA Broad Range. La purificazione da gel dei prodotti di digestione enzimatica è stato un passaggio necessario per permettere l'inattivazione degli enzimi di restrizione, che non potendo essere termicamente inattivati avrebbero potuto presentare *Star Activity*, cioè avrebbero potuto esercitare la loro azione in modo aspecifico dopo tempistiche definite.

La reazione è avvenuta ad opera dell'enzima T4 ligasi (Biolabs, New England-M0202), *overnight* alla temperatura di 16°C; in seguito l'enzima è stato inattivato a 65°C per 10 minuti.

La quantità di DNA inserito da utilizzare nella reazione di ligazione è stata calcolata attraverso l'utilizzo della seguente formula:

$$\frac{100 \text{ ng vettore} \times \text{lunghezza inserto}}{\text{lunghezza vettore senza inserto}} \times 3$$

Si riportano in Tabella 10 i quantitativi di DNA che sono stati utilizzati per la reazione di ligazione in relazione a ciascun frammento, alla luce del fatto che la lunghezza del

plasmide senza inserto è pari a 3.872 bp e che il rapporto in termini di lunghezza che deve sussistere tra vettore e inserto deve essere pari a 1:3.

GENE	REGIONE	LUNGHEZZA		PLASMIDE (ng)
		INSERTO (bp)	INSERTO (ng)	
<b>CIDEA</b>	CpG1	353	27,5	100
	CpG2	807	62,5	100
<b>MAL</b>	CpG1	1.217	47,5	50
<b>PCDH17</b>	CpG1	439	35	100
	CpG2	311	25	100
	CpG3	765	60	100
	CpG4	1.222	95	100
	CpG5	1.271	100	100

Tabella 10. Dettagli della reazione di ligazione: quantità di pDNA e di inserto utilizzate per la reazione.

Nella Tabella 11 vengono riportati i dettagli della mix di reazione utilizzata per la ligazione, avvenuta attraverso l'utilizzo dell'enzima T4 ligasi.

COMPONENTI	20 µl DI REZIONE
<b>T4 DNA Ligase Buffer (10X)</b>	2 µl
<b>pDNA</b>	Vedi Tabella 10
<b>Inserto DNA</b>	Vedi Tabella 10
<b>T4 DNA Ligasi</b>	1 µl
<b>Nuclease-free water</b>	Fino a 20 µl

Tabella 11. Componenti della mix di reazione di ligazione con T4 Ligasi.

Nella reazione è stato inserito anche un controllo negativo, in cui non è stato messo il DNA ma al suo posto dell'acqua.

### 3.2.7 Trasformazione batterica

Il processo di trasformazione dei batteri permette di inserire del DNA esogeno all'interno di cellule "competenti" alla trasformazione, cioè in grado di acquisire tale DNA. Alcune cellule batteriche sono naturalmente competenti altre invece, come ad esempio *Escherichia coli*, non sono naturalmente trasformabili; possono però acquisire tale capacità grazie a trattamenti chimici o fisici, che alterano la permeabilità della membrana senza influenzarne la vitalità.

Il protocollo di trasformazione ha consentito di inserire i prodotti di ligazione all'interno dei batteri. La resistenza alla Zeocina, presente nel plasmide, ha permesso di selezionare i batteri che hanno acquisito il plasmide ma non di discriminare se il plasmide contenesse o meno l'inserito clonato. I batteri che sono stati selezionati per la trasformazione appartengono alla specie *E. coli* ed è stato utilizzato il kit One Shot® PIR1 and PIR2 Competent *E. coli* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Per la crescita dei batteri sono state preparate due tipologie di terreno:

- *Low-salt* Luria Bertani (LB) Agar (Miller Merck, Whitehouse Station, New jersey, USA) per la crescita delle colonie batteriche in piastra, sciogliendo 37 gr di terreno in 1000 ml di acqua deionizzata;
- *Low-salt* Luria Bertani (LB) Broth (Miller Merck, Whitehouse Station, New jersey, USA) per la crescita dei batteri in sospensione, sciogliendo 25 gr di terreno in 1000 ml di acqua deionizzata.

Prima del loro utilizzo entrambe le tipologie di terreno sono state autoclavate a 121°C per 15 minuti. È stato dunque aggiunto loro l'antibiotico Zeocina, partendo da una soluzione madre 100 mg/ml: il terreno *low-salt* LB Broth dopo sterilizzazione è stato addizionato di 1 µl di Zeocina (100 mg/ml) ogni ml di brodo, in modo tale da raggiungere una concentrazione finale di Zeocina 100 µg/ml; il terreno *low-salt* LB Agar è stato utilizzato per preparare delle piastre Petri, alle quali sono stati addizionati, prima di piastrare i batteri, 10 µl di Zeocina diluita in 70 µl di terreno *low-salt* LB.

Per la trasformazione dei batteri è stato seguito il protocollo fornito dal produttore, successivamente sono stati piastrati i batteri trasformati su terreno *low-salt* LB Agar addizionato dell'antibiotico e si è incubato per tutta la notte a 37°C. Il giorno successivo sono state prelevate 20 colonie singole, isolate, che presentavano un bordo ben definito, e sono state fatte crescere in terreno *low-salt* LB addizionato di Zeocina (concentrazione finale 100 µg/ml), posto all'interno di appositi tubini, a 37°C sotto agitazione per tutta la notte. Questa fase, anche definita "fase di arricchimento", ha permesso di aumentare la quantità di batteri che hanno incorporato al loro interno il prodotto di ligazione.



### 3.2.8 Mini-prep

Per poter verificare che le colonie di *E. coli* prelevate dalle piastre con ampicillina contenessero il plasmide con al suo interno l'inserto di interesse è stato necessario estrarre il DNA plasmidico (pDNA). Per tale estrazione si è ricorso all'utilizzo del kit MINIPrep QIAprep (Qiagen, Hilden, Germania) ed è stato seguito il protocollo fornito dalla casa produttrice. Il prodotto di purificazione è stato quindi quantificato con Qubit dsDNA Broad Range.

### 3.2.9 Restrizione di controllo

Una volta estratto il pDNA dai batteri è stato necessario verificare preliminarmente se tale DNA contenesse al suo interno il frammento di interesse, oppure se i batteri fossero stati trasformati con il plasmide vuoto. A tale scopo è stata allestita una restrizione di controllo utilizzando gli enzimi (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) riportati in Tabella 12.

ENZIMA	NOME DI CATALOGO	SITO RICONOSCIUTO	TEMPO	BUFFER	REGIONE
<b>EcoRI</b>	ER0271	5'-G↓AATTC-3' 3'-CTTAA↑G-5'	1 ora	<i>EcoRI buffer</i>	pCpGLΔCiDEA_CpG2, pCpGLΔPCDH17_CpG1
<b>Fast Digest PstI</b>	FD0614	5'-CTGCA↓G-3' 3'-G↑ACGTC-5'	10-15 minuti	<i>Fast Digest Buffer</i>	pCpGLΔMAL_CpG1, pCpGLΔPCDH17_CpG4
<b>Fast Digest SacI</b>	FD1133	5'-GAGCT↓C-3' 3'-C↑TCGAG-5'	5-15 minuti	<i>Fast Digest Buffer</i>	pCpGLΔPCDH17_CpG2, pCpGLΔPCDH17_CpG3, pCpGLΔPCDH17_CpG5
<b>Fast Digest NcoI</b>	FD0573	5'-C↓CATGG-3' 3'-GGTAC↑C-3'	15-30 minuti	<i>Fast Digest Buffer</i>	pCpGLΔCiDEA_CpG1

Tabella 12. Enzimi utilizzati per la restrizione di controllo per verificare il corretto inserimento del frammento nel plasmide.

La reazione di restrizione è stata condotta alla temperatura di 37°C per tempistiche variabili, secondo quanto riportato in Tabella 12. I prodotti di digestione sono stati poi analizzati in gel di agarosio 1,2% in *buffer* TAE 1X, caricando in gel il *ladder* da 10 Kb Sharp Mass™ 1 (Euro Clone, Milano, Italia).

L'effettivo inserimento delle regioni di interesse all'interno del plasmide pCpGL-basic è stato possibile verificarlo in modo inequivocabile solo attraverso il sequenziamento del

pDNA ottenuto dalla mini-prep. Sono stati sequenziati tutti i cloni che sono risultati positivi alla preliminare analisi attraverso digestione con enzimi di controllo e successiva elettroforesi in gel di agarosio. Per il sequenziamento sono stati utilizzati i *primer* universali: pCpGL\_seq forward (sequenza: 5'-GTGAGCAAACAGCAGATTTAAAAGGAA-3'), il quale si lega alla sequenza a monte del MCS; ed il primer pCpGL\_seq reverse (sequenza: 5'-CATACCTCTTCATGGCCTTGTG-3'), che si lega alla sequenza a valle del MCS.

Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando il *software* FinchTV (Geospiza Inc., Seattle, USA) e l'allineamento con le sequenze di riferimento è stato ottenuto utilizzando il *tool* bioinformatico Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

### 3.2.10 Midi-Prep

Una volta verificato quali cloni contenessero il plasmide con al loro interno l'inserito corretto, si è proceduto propagando i cloni batterici ed estraendo da tali batteri il pDNA utilizzando il kit Midi-prep Qiagen (Qiagen, Hilden, Germania). Per l'estrazione del pDNA sono state seguite le indicazioni definite da protocollo dalla casa produttrice. Il pDNA estratto è stato quindi quantificato con il kit Qubit dsDNA Broad Range.

## 3.3 SCELTA DELLA LINEA CELLULARE

Preliminarmente, è stato necessario scegliere quale modello cellulare utilizzare per i successivi esperimenti di trasfezione, allo scopo di individuare una linea che permettesse la valutazione dell'espressione del gene *reporter* luciferasi posto sotto controllo delle diverse regioni clonate. Sono state pertanto considerate quattro diverse linee cellulari:

- la linea cellulare *Oswald* (OSW), comunemente definita come una linea di "linfoma di cane", isolata a partire da un linfoma T ma che progressivamente ha perso i caratteristici marcatori dei linfociti T. La linea cellulare cresce in sospensione;
- la linea cellulare CLBL1, una linea tumorale di cellule B di cane, che deriva da un soggetto di razza Bovaro del Bernese affetto da una forma spontanea di DLBCL di grado IV. Anche questa linea cellulare cresce in sospensione;

- la linea *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK), una linea non-tumorale di rene di cane per la quale si disponeva già in laboratorio di un protocollo di trasfezione precedentemente ottimizzato (Guerra, tesi triennale);
- la linea *Canis Familiaris 2 Thymus* (CF2Th), una linea di timo di cane di recente acquisizione.

Per le prime due linee cellulari, essendo entrambe due linee costituite da cellule che crescono in sospensione, si è tentato di mettere a punto un protocollo di trasfezione basato sulla tecnica di elettroporazione. Tuttavia, gli scarsi risultati ottenuti ci hanno spinto a scegliere due linee cellulari che crescono in monostrato: la linea MDCK e la linea CF2Th. Al fine di valutare quale delle due linee fosse più adatta per il saggio di *gene reporter assay*, si è proceduto eseguendo delle analisi più approfondite. In particolare, è stata eseguita un'analisi di espressione genica che ha permesso di valutare il livello di espressione dei tre geni oggetto di studio nelle due linee e di alcuni dei principali fattori di trascrizione potenzialmente coinvolti nell'espressione dei geni stessi. Al contempo, le due linee sono state confrontate anche in termini di efficienza di trasfezione, mettendo a punto un nuovo protocollo di trasfezione per la linea CF2Th ed applicando un protocollo già ottimizzato per la linea MDCK.

### **3.3.1 Mantenimento delle cellule in coltura**

#### **3.3.1.1 Linea cellulare**

La linea cellulare MDCK è una linea che deriva da cellule di tubulo renale di cane, che deve il suo nome ai due ricercatori S. H. Madin e N. B. Darby, che per primi la isolarono nel 1958 da un esemplare adulto di Cocker Spaniel. È una linea cellulare a morfologia epiteliale, le cui cellule crescono in monostrato in apposite fiaschette, a 37°C con il 5% di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>). Per la coltivazione di tali cellule si utilizza il terreno EMEM (*Minimum Essential Medium Modified Eagle*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) addizionato di: siero fetale bovino deplementato (FBS, 10%), L-glutamina (2 mM), penicillina e streptomina (1%) e amminoacidi non essenziali (1%). Le cellule sono state utilizzate tra il passaggio 5 e 30.

La linea cellulare CF2Th è una linea di cellule di timo di cane con morfologia epiteliale, piatta e fusiforme, prelevate la prima volta nel 1967 a partire da un soggetto sano, allo stadio di sviluppo fetale. Le cellule crescono in monostrato adese al fondo della fiaschetta, a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>. Il terreno utilizzato per la loro coltivazione è il terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) addizionato di: FBS decomplesato (10%), L-glutamina (2 mM), penicillina e streptomina (1%), amminoacidi non essenziali (1%). Le cellule sono state utilizzate tra il passaggio 70 e 95.

### 3.3.1.2 *Splitting* MDCK

Affinché le cellule possano continuare a crescere e sia così possibile propagare la coltura, ogni tre giorni circa, quando le cellule raggiungono una percentuale di confluenza pari all'80-90% e il terreno di coltura vira al giallo, è necessario staccare le cellule dal fondo della fiaschetta, isolarle e trasferirle in nuove fiaschette. Tale procedimento viene definito *splitting*.

Partendo da una fiaschetta, la cui superficie di base misura 25 cm<sup>2</sup> (T25), il protocollo ha previsto di:

- eliminare il terreno di coltura aspirandolo con l'ausilio di una pompa a vuoto;
- eseguire due lavaggi con 5 ml di *Phosphate Buffered Saline* (PBS) più EDTA 1X (chelante del calcio che permette di allentare le giunzioni tra le cellule e ne facilita in tal modo il distacco) cosicché vengano eliminati tutti gli eventuali residui di terreno di coltura;
- aspirare il PBS più EDTA 1X con l'ausilio di una pompa a vuoto;
- aggiungere 1 ml di tripsina, che permette il definitivo distacco delle cellule e la disgregazione del monostrato;
- incubare per 5-10 minuti a 37°C;
- una volta avvenuto il completo distacco delle cellule, la tripsina inattivare attraverso l'aggiunta di 9 ml di terreno contenente FBS;
- trasferire l'intero volume di cellule in un tubo da 15 ml;
- centrifugare a 1.500 rpm per 5 minuti, così da eliminare il surnatante contenente l'enzima tripsina inattivato;

- aspirare il surnatante con l'ausilio di una pompa a vuoto;
- risospendere il *pellet* in 5 ml di terreno.

Ad ogni passaggio, dopo aver eseguito la conta, sono state preparate due nuove fiaschette la cui superficie di base misura 25 cm<sup>2</sup> (T25), aggiungendo 9,5 ml di terreno EMEM completo a cui sono stati aggiunti 0,5 ml di cellule risospese, splittando in questo modo le cellule 1:10. Si è incubato quindi a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per i tre giorni successivi.

### 3.3.1.3 *Splitting* CF2Th

Partendo da una fiaschetta T25, si è proceduto come descritto nel paragrafo in cui si descrive lo *splitting* della linea MDCK, eseguendo però un singolo lavaggio con 5 ml di PBS più EDTA (1X) e risospendendo il *pellet* cellulare in 15 ml di terreno DMEM completo. Ad ogni passaggio, dopo aver eseguito la conta, sono state preparate due nuove fiaschette T25 aggiungendo 9,5 ml di terreno DMEM completo a cui sono stati aggiunti 0,5 ml di cellule risospese, splittando in questo modo le cellule 1:30. Si è incubato quindi a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per i tre giorni successivi.

### 3.3.1.4 **Conta cellulare**

La conta cellulare è stata eseguita attraverso due metodi: un metodo manuale, attraverso l'utilizzo della camera di Bürker e Trypan Blue (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ed un metodo automatico, attraverso l'utilizzo dello strumento Countess II FL Automated Cell Counter (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) e Trypan Blue (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

La procedura di conta automatica attraverso l'utilizzo dello strumento Countess II FL Automated Cell ha previsto di:

- preparare una soluzione contenente 10 µl della soluzione Trypan Blue (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) e 10 µl di sospensione cellulare;
- inserire 10 µl della soluzione all'interno dell'apposita cameretta di conta;
- inserire la cameretta di conta all'interno dello strumento.

La procedura di conta manuale (utilizzo della cameretta di Bürker) ha previsto di:

- preparare una soluzione contenente 500 µl di Trypan Blue, 300 µl di PBS più EDTA 1X e 200 µl di sospensione cellulare;
- posizionare 10 µl della soluzione all'interno della cameretta di Bürker;
- eseguire la conta del numero di cellule al microscopio ottico in 5 quadranti e calcolare la media del numero di cellule;
- applicare la seguente formula:

$$n^{\circ} \text{ medio di cellule} \times \text{fattore di diluizione} \times 10.000 = n^{\circ} \text{ cellule/ml}$$

nel nostro caso il fattore di diluizione è pari a 5 (200 µl di sospensione cellulare in 1.000 µl totali di soluzione) e 10.000 corrisponde al fattore di conversione della camera di Bürker.

Una volta stimato il numero di cellule attraverso i due metodi, è stata eseguita la media dei due valori.

### **3.3.2 Espressione genica nelle linee cellulari**

Le linee cellulari MDCK e CF2Th rappresentano due linee cellulari di cane non tumorali. Allo scopo di confrontare le due linee, è stata eseguita un'analisi di espressione genica attraverso la tecnica di *Real-Time PCR*, la quale ha permesso di valutare il livello di espressione basale dei geni CiDEA, MAL, PCDH17 e l'espressione di alcuni fattori di trascrizione potenzialmente rilevanti per la trascrizione dei tre geni, selezionati attraverso analisi *in silico*.

#### **3.3.2.1 Estrazione dell'RNA**

Per la procedura di estrazione dell'RNA è stato utilizzato il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania). Dopo aver staccato le cellule dal monostrato, come descritto nei capitoli "*Splitting MDCK*" e "*Splitting CF2Th*", si è proceduto come riportato nel protocollo del produttore.

Il prodotto di purificazione è stato quantificato allo spettrofotometro Nanodrop (Euro Clone, Milano, Italia).

### 3.3.2.2 Retrotrascrizione

Al fine di poter analizzare, attraverso un saggio di *Real-Time PCR*, l'espressione dei geni oggetto di studio e dei fattori di trascrizione scelti, si è proceduto alla retrotrascrizione dell'RNA purificato a partire dalle cellule CF2Th e MDCK in DNA complementare (cDNA). In questa tesi è stato utilizzato il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Prima di procedere con la reazione di retrotrascrizione, è stata preparata una diluizione dell'RNA purificato e quantificato, la cui concentrazione finale era pari a 100 ng/μl. È stata quindi preparata la mix di reazione, i cui dettagli sono riportati nella Tabella 13.

	CONCENTRAZIONE FINALE	20 μL DI REAZIONE
<b>RT Buffer (10X)</b>	1 X	2 μL
<b>dNTP MIX (25 X)</b>	1 X	0,8 μL
<b>MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/μL)</b>	2,5 U/μL	1 μL
<b>Nuclease-free water</b>	-	6,2 μL
<b>RNA (100 ng/μL)</b>	50 ng/μL	10 μl

Tabella 13. Dettagli della mix utilizzata per la reazione di retrotrascrizione.

La reazione di retrotrascrizione è avvenuta in termociclatore Proflex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) secondo il protocollo termico riportato in Tabella 14.

FASE	DURATA	TEMPERATURA
<b>Step 1</b>	10 minuti	25°C
<b>Step 2</b>	120 minuti	37°C
<b>Step 3</b>	5 minuti	85°C
<b>Step 4</b>	∞	4° C

Tabella 14. Protocollo termico utilizzato per la reazione di retrotrascrizione.

### 3.3.2.3 *Real-Time PCR*

La tecnica di *Real-Time PCR*, anche definita *PCR quantitativa*, oltre all'amplificazione della sequenza di interesse, permette anche di quantificare il prodotto amplificato, analizzandolo non alla fine dei cicli di amplificazione ma durante l'amplificazione stessa.

In particolare, la quantificazione viene determinata a partire dal ciclo di PCR in corrispondenza del quale l'amplicone diventa rilevabile; tale ciclo viene definito *Ciclo Threshold* ( $C_T$ ) o *Ciclo Soglia*, ed è inversamente proporzionale alla quantità di template presente nel campione: all'aumentare della quantità di DNA presente nel campione, diminuirà il numero di cicli necessari affinché l'amplicato sia rilevabile dallo strumento. Attraverso la tecnica di *Real-Time PCR* è possibile eseguire due tipologie di quantificazione: la quantificazione *assoluta*, sfruttando dei campioni di DNA a concentrazione nota e la costruzione di una retta standard; oppure la quantificazione *relativa*, la quale permette di stimare un aumento o una diminuzione della concentrazione del template iniziale, rapportandolo al gene di riferimento, definito *housekeeping*. Per poter seguire l'amplificazione mentre essa avviene, è possibile ricorrere a chimiche diverse: è possibile utilizzare un composto fluorescente in grado di intercalarsi in modo aspecifico a qualsiasi doppio filamento di DNA, ad esempio il *Sybr green*; oppure è possibile utilizzare delle sonde marcate, in grado di legare in modo specifico la sequenza di DNA complementare, ad esempio le sonde TaqMan oppure le sonde UPL.

Il saggio di *Real-Time PCR* per l'analisi di espressione genica nelle due linee di interesse, si è basato sull'utilizzo dell'intercalante *Sybr green* ed è stata eseguita una quantificazione di tipo relativo.

I *primer* che sono stati utilizzati per l'analisi di espressione dei geni CiDEA, PCDH17 e MAL sono riportati in Tabella 15, mentre quelli utilizzati per la valutazione dell'espressione dei geni codificanti per i fattori di trascrizione sono riportati in Tabella 16. Tali coppie di *primer* sono state disegnate utilizzando il *tool* bioinformatico Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Ai fini di massimizzare l'efficienza della reazione di amplificazione, sono state utilizzate concentrazioni diverse di *primer*, riportate anch'esse in Tabella 15 e 16.

GENE	SEQUENZA PRIMER FORWARD (5'-3')	SEQUENZA PRIMER REVERSE (5'-3')	CONCENTRAZIONE FINALE DEI PRIMER (Forward/Reverse)
<b>CiDEA</b>	ACGTGAAGGCCACCATGTAT	TGAGCAACTGTCCAGTCACC	300/50 nM
<b>MAL</b>	TTCTCCGTCTTCACGACCTT	ACGAGGCAATCAAGATCCAC	300/50 nM
<b>PCDH17</b>	CTGCCACTCGGATGTCCATA	CCTTAAACGTGGAGCTACTTTG	300/300 nM

Tabella 15. Coppie di primer utilizzate per la reazione di Real-Time PCR.



FATTORE DI TRASCRIZIONE	PRIMER FORWARD (5'-3')	PRIMER REVERSE (5'-3')	CONCENTRAZIONE FINALE DEI PRIMER (Forward/Reverse)
<b>IKZF1</b>	TGCTGATGAGGGTCAAGACATG	AGATGTGGTGAAAGGTCTTCG	300/300 nM
<b>MZF1</b>	CATCTTCCCTCCAGGGTTTGC	CACTGCATGTGAGAAGCCACT	300/300 nM
<b>NF-kB subunit (RELA)</b>	CAGACACAGATGATCGTCACCG	CTGAGGGATGGCGTAAAGGG	300/300 nM
<b>NF-kB subunit (RELB)</b>	CCTTACAATGCTGGGTCCCTG	GCAGCTCTGACGTGTTTGTG	300/300 nM
<b>Sp1</b>	CAGTGAAGGAAGAGGCTCTGGG	CCTGTATGCCAACGCAAGTGTG	300/300 nM
<b>PAX 5</b>	CACAGTATAGTGTCCACGGGCT	CTCTTGCCTTGTGGTGTGTC	300/300 nM
<b>LMO2</b>	GGACTACCTCAGGCTTTTGGC	CGCCACACAGAAATGCTTC	300/300 nM

Tabella 16. Primer utilizzati per l'analisi di espressione genica dei fattori di trascrizione IKAROS Family Zinc Finger 1 (IKZF1), Myeloid Zinc Finger (MZF1), Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) subunit (RELA) e (RELB), Specificity protein 1 (Sp1), Paired Box Protein 5 (PAX 5), LIM domain only 2 (LMO2).

Per le analisi in quantificazione relativa sono stati considerati anche due geni *housekeeping*: CCZ1 (concentrazione finale dei primer: 600/600 nM) e GOLGA (concentrazione finale dei primer: 300/300 nM). Sono state inoltre valutate diverse diluizioni di cDNA, in particolare le diluizioni 1:10, 1:20 ed 1:40. Per la mix di reazione, sono stati utilizzati 2,5 µl di cDNA e 5 µl di Master Mix, il volume dei primer è variato invece in funzione della concentrazione finale necessaria e di conseguenza anche il volume di acqua, per un volume finale di reazione pari a 10 µl. La reazione è avvenuta nel termociclatore Stratagene Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, California, USA), secondo il protocollo termico descritto nella Tabella 17. Al termine della reazione di amplificazione, è stato necessario introdurre un ciclo di denaturazione in modo da ottenere una curva di dissociazione che permettesse di valutare l'amplificazione di eventuali aspecifici. Inoltre, il protocollo termico utilizzato per l'amplificazione del gene CiDEA è differente rispetto a quello utilizzato per l'amplificazione dei geni MAL e PCDH17: l'acquisizione del segnale prodotto dal legame del *Sybr Green* ai doppi filamenti di DNA avviene a 81 °C non a 60°C come avviene nel protocollo *standard* (indicato in Tabella 17 tra due linee tratteggiate).

NUMERO DI CICLI	FASE	DURATA	TEMPERATURA
	Fase iniziale	10 minuti	95°C
<b>40</b>	Denaturazione	15 secondi	95°C
	Appaiamento, estensione (acquisizione MAL e PCDH17)	1 minuto	60°C
	Acquisizione CiDEA	10 secondi	81°C
<b>1</b>		15 secondi	95°C
		20 secondi	60°C
		15 secondi	95°C

Tabella 17. Protocollo termico della reazione di Real-Time PCR.

I risultati sono stati analizzati con il programma MxPro QPCR Software (Agilent Technologies, California, USA). Il dato di quantificazione relativa (RQ) è stato calcolato come:  $2^{(-\Delta C_T)}$ , con  $\Delta C_T$  corrispondente alla differenza tra il valore di  $C_T$  derivante dalla media dei due replicati di ciascun gene o fattore di trascrizione ed il valore medio di  $C_T$  dei due geni utilizzati come geni *housekeeping* (GOLGA e CCZ1), anch'essi analizzati in duplicato.

### 3.3.3 Trasfezione

La tecnica di trasfezione permette l'introduzione di acidi nucleici esogeni all'interno di cellule eucariote, che possono poi essere mantenuti all'interno della cellula in maniera stabile (trasfezione stabile), oppure in maniera transiente (trasfezione transiente).

Per valutarne l'efficienza di trasfezione, sono state eseguite alcune prove preliminari di nelle due linee cellulari CF2Th e MDCK.

Il protocollo utilizzato sia per la linea cellulare MDCK, sia per la linea cellulare CF2Th, permette una trasfezione transiente delle cellule con il costrutto desiderato.

Le cellule per le prove di trasfezione sono state piastrate all'interno di piastre P96 bianche (Sarsted, Nümbrecht, Germania), utilizzando dei terreni di coltura diversi rispetto a quelli utilizzati per la propagazione della coltura cellulare, in particolare:

- il terreno OPTI-MEM (*Opti-Minimal Essential Medium*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) addizionato del 5% di FBS deplementato ma non di antibiotici, utilizzato per piastrare le cellule;
- il terreno OPTI-MEM (*Opti-Minimal Essential Medium*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) non addizionato di FBS ed antibiotici, utilizzato per la preparazione delle mix di trasfezione e la diluizione del pDNA.

#### 3.3.3.1 Protocollo di trasfezione MDCK

Il protocollo di trasfezione della linea cellulare MDCK era già stato precedentemente messo a punto in laboratorio.

Sono state comunque eseguite delle ulteriori prove, per confermare i parametri già definiti, in cui sono stati testati: diversi rapporti tra agente trasfettante e DNA; diversi

quantitativi di DNA totale, con il quale trasfettare le cellule; diversi rapporti tra il plasmide pGL4.75 (Promega, Madison, USA), contenente il gene codificante per la luciferasi *Renilla*, e il plasmide pCpGLΔ, all'interno del quale sono state clonate le regioni di interesse.

Alla luce dei risultati ottenuti, si è deciso di utilizzare le seguenti condizioni:

- utilizzare 200 ng di DNA totale;
- utilizzare 4 µl di agente trasfettante FuGENE (Promega, Madison, USA) ogni microgrammo di pDNA (*ratio* 4:1);
- piastrare 5.000 cellule per pozzetto in 100 µl di OPTI-MEM (5% FBS, senza antibiotici);
- utilizzare un rapporto tra pCpGLΔ e pGL4.75 pari a 4:1. Il segnale prodotto dalla luciferasi *Renilla* è essenziale poiché costituisce il segnale basale sul quale poi valutare l'eventuale effetto determinato dalla metilazione delle regioni di interesse, poiché non è influenzato da tale reazione.

### **3.3.3.2 Messa a punto del protocollo di trasfezione nella linea cellulare CF2Th**

Essendo la linea CF2Th di nuova acquisizione e non essendo pertanto già disponibile in laboratorio un protocollo di trasfezione ottimizzato, è stato necessario metterlo a punto. In particolare, sono stati valutati i seguenti parametri: il numero di cellule da utilizzare per la prova; la quantità totale di DNA; l'agente trasfettante migliore; il miglior rapporto tra agente trasfettante e DNA.

#### *Definizione delle condizioni di coltura per le prove di trasfezione*

La reazione di trasfezione normalmente viene condotta su cellule in attiva replicazione, che si trovano cioè in fase di crescita logaritmica, per massimizzare l'efficienza della reazione di trasfezione. A tale scopo, è stato dapprima necessario definire che numero di cellule fosse necessario piastrare per: raggiungere un livello di confluenza pari al 70-80% dopo 24 ore di incubazione; e per fare in modo che al termine della prova le cellule non fossero in condizioni di sofferenza.

Pertanto, è stata allestita una prova in cui si è valutato come variasse la crescita delle cellule dopo 4 giorni di incubazione e valutando il livello di confluenza a 24 ore dalla semina, piastrando numeri diversi di cellule e lavorando in sestuplicato.

È stata preparata una sospensione cellulare in terreno OPTI-MEM (5% FBS depleto) contenente  $1 \times 10^6$  cellule/ml, a partire dalla quale sono state preparate 6 diluizioni di sospensione cellulare, secondo un fattore 1:2. Sono stati poi piastrati 100  $\mu$ l di ciascuna sospensione cellulare per pozzetto in una piastra P96 trasparente, testando in questo modo le seguenti numerosità di cellule: 1.562 cellule/pozzetto, 3.125 cellule/pozzetto, 6.250 cellule/pozzetto, 12.500 cellule/pozzetto, 25.000 cellule/pozzetto, 500.00 cellule per pozzetto, 100.000 cellule/pozzetto; ciascuna condizione è stata analizzata in sestuplicato. Le piastre sono state incubate a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 48 ore, dopo le quali, simulando quel che normalmente avviene durante il processo di trasfezione, il medium OPTI-MEM (5% FBS) è stato sostituito con 100  $\mu$ l di terreno DMEM completo. Le cellule sono state incubate a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per ulteriori 24 ore.

Per poter valutare la vitalità cellulare, al termine della prova è stato utilizzato un saggio di proliferazione denominato Alamar Blue: le cellule vitali e metabolicamente attive sono le uniche in grado di convertire la Resazurina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide), presente all'interno della soluzione Alamar Blue, in Resorufina, che a sua volta è in grado di produrre un segnale di fluorescenza, misurando il quale è possibile stimare il numero di cellule vitali.

Quindi, dopo 72 ore di incubazione, sono stati aggiunti 20  $\mu$ l di Alamar Blue (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) per pozzetto, si è incubato per 4 ore a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> e si è proceduto con la lettura della fluorescenza prodotta, utilizzando lo strumento Viktor (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA).

#### *Scelta dell'agente trasfettante, della quantità totale di DNA, della ratio tra agente trasfettante:DNA*

Una volta definito il numero di cellule da piastrare in ciascun pozzetto, si è proceduto con la messa a punto del protocollo di trasfezione, definendo quale fosse l'agente trasfettante più adatto da utilizzare, quale rapporto utilizzare tra agente trasfettante e DNA totale, e quale quantità di DNA utilizzare per poter ottenere un buon segnale, senza determinare

effetti tossici alle cellule. Il processo di trasfezione non avviene spontaneamente a livello cellulare, questo a causa della repulsione di carica che sussiste tra il DNA carico negativamente e la membrana cellulare idrofobica. È pertanto necessario ricorrere a dei metodi chimici o fisici che permettano a tale processo di avvenire. Nel nostro caso, si è deciso di adoperare una reazione di trasfezione di tipo transiente, ricorrendo all'utilizzo di un agente chimico, che forma un complesso con il DNA, neutralizzando in tal modo le cariche presenti su di esso e permettendone il passaggio all'interno della cellula.

Si è deciso di testare due diversi agenti trasfettanti: FuGENE (Promega, Madison, USA), del quale sono state testate le seguenti *ratio* FuGENE( $\mu$ l) : DNA( $\mu$ g) 1,5:1 , 2:1 , 2,5:1 , 3:1 , 3,5:1, 4:1; e TurboFect (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), del quale sono state testate le *ratio* TurboFect( $\mu$ l) : DNA( $\mu$ g) 1,5:1 , 2:1 , 2,5:1 , 3:1. Per quanto concerne la quantità totale di DNA con cui trasfettare le cellule, si è deciso di testare 3 diversi quantitativi di DNA per ciascun agente trasfettante: 40 ng, 100 ng e 200 ng totali. Ciascuna condizione è stata analizzata in triplicato.

È stata allestita una prova di trasfezione preparando due piastre P96 bianche, una per ciascun agente trasfettante, nelle quali sono state piastrate 10.000 cellule per pozzetto, prelevando 100  $\mu$ l di cellule opportunamente diluite in terreno OPTI-MEM (5% FBS). Le piastre sono state quindi incubate a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore. È stata allestita anche una piastra P96 trasparente di controllo nella quale è stato piastrato lo stesso numero di cellule per pozzetto.

Una volta verificato che le cellule avessero raggiunto il livello di confluenza pari al 70-80% dopo le 24 ore di incubazione, si è proceduto con la trasfezione aggiungendo un appropriato volume di Complex Mix FuGENE o di Complex Mix TurboFect (vedi composizione in Tabella 18 e 19).

	RATIO FuGENE ( $\mu$ l) : DNA( $\mu$ g)					
	1,5:1	2:1	2,5:1	3:1	3,5:1	4:1
<b>Quantità totale di DNA (<math>\mu</math>g)</b>	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
<b>pCMV+ (120 ng /<math>\mu</math>l) (<math>\mu</math>l)</b>	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
<b>FuGENE (<math>\mu</math>l)</b>	1,8	2,4	3	3,6	4,2	4,8
<b>OPTI-Mem (<math>\mu</math>l)</b>	48,2	47,6	47	46,4	45,8	45,2
<b>Volume finale (<math>\mu</math>l)</b>	60	60	60	60	60	60

Tabella 18. Dettagli della composizione della Complex Mix FuGENE.

	RATIO TurboFect( $\mu$ l) : DNA( $\mu$ g)											
	1,5:1	2:1	2,5:1	3:1	1,5:1	2:1	2,5:1	3:1	1,5:1	2:1	2,5:1	3:1
<b>Quantità totale di DNA (<math>\mu</math>g)</b>	0,7	0,7	0,7	0,7	0,35	0,35	0,35	0,35	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>pCMV+ (120 ng /<math>\mu</math>l) (<math>\mu</math>l)</b>	5,83	5,83	5,83	5,83	2,92	2,92	2,92	2,92	1,67	1,67	1,67	1,67
<b>TurboFect (<math>\mu</math>l)</b>	1,05	1,4	1,75	2,1	0,53	0,7	0,88	1,05	0,3	0,4	0,5	0,6
<b>OPTI-Mem (<math>\mu</math>l)</b>	63,12	62,77	62,42	62,07	66,55	66,38	66,2	66,03	98,03	97,93	97,83	97,73
<b>Volume finale (<math>\mu</math>l)</b>	70	70	70	70	70	70	70	70	100	100	100	100
	<b>200 ng</b>				<b>100 ng</b>				<b>40 ng</b>			

Tabella 19. Dettagli della composizione delle Complex Mix TurboFect.

In questa fase di messa a punto del protocollo è stato utilizzato il plasmide pCpGL-CMV/EF1 (cortesemente donato da Maja Klug e Michael Rehli; Department of Hematology and Oncology, University Hospital, Regensburg, Germany), il quale contiene il gene che codifica per l'enzima luciferasi *Firefly*, posto sotto controllo del promotore forte di Citomegalovirus (CMV).

Il segnale prodotto da parte dell'enzima luciferasi, utilizzando come substrato la luciferina, è stato rilevato utilizzando un solo reagente del kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega, Madison, USA), in particolare il DUAL-Glo® Luciferase Reagent.

Tale kit, utilizzato anche per tutte le successive prove di trasfezione, permette la rilevazione al contempo del segnale della luciferasi *Renilla*, prodotto dal gene presente all'interno del plasmide pGL4.75, ed il segnale della luciferasi *Firefly*, prodotto dal gene *reporter* presente all'interno del plasmide pCpGL $\Delta$ , a monte del quale sono state clonate le regioni di interesse. Pertanto, è stato necessario ricostituire i reagenti e successivamente procedere al buio, come indicato nel protocollo fornito dal produttore. I dati ottenuti sono stati poi analizzati con il programma Excel.

### **Scelta del rapporto tra luciferasi *Firefly* e *Renilla***

In un esperimento di trasfezione, è necessario l'utilizzo di un vettore interno di controllo contenente un gene *reporter* (ad esempio il gene per la luciferasi *Renilla*), che emetta un segnale basale di riferimento, che possa essere utilizzato per la normalizzazione del risultato corrispondente all'espressione del gene *Firefly*, in modo tale da eliminare la variabilità che si può riscontrare in ciascun pozzetto, legata a fattori non oggetto di studio,

quali la diversa efficienza di trasfezione. Pertanto, è stato necessario operare una co-trasfezione con il plasmide pCpGL $\Delta$ , contenente l'inserto di interesse a monte del gene *reporter* codificante per la luciferasi *Firefly*, ed il plasmide pGL4.75, che funge da vettore di controllo contenente il gene che codifica per la luciferasi *Renilla*, posto sotto controllo di un promotore forte.

Una volta definita la quantità di DNA totale con cui trasfettare le cellule, l'agente trasfettante migliore e il miglior rapporto tra agente trasfettante e DNA, si è proceduto mettendo a punto quale fosse il miglior rapporto tra i due plasmidi con cui operare la co-trasfezione. È stata a tal scopo allestita una prova, nella quale sono stati vagliati i seguenti rapporti tra pCpGL $\Delta$  (a titolo esemplificativo è stato scelto pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG3) e pGL4.75: 4:1; 8:1; 10:1; 12,5:1; 16:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, ciascuna condizione è stata analizzata in triplicato.

È stata preparata una piastra P96 bianca nella quale sono state piastrate 10.000 cellule per pozzetto prelevando 100  $\mu$ l di sospensione cellulare in terreno OPTI-MEM (5% FBS); la piastra è stata quindi incubata a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore prima di operare la co-trasfezione.

Sono state preparate 5 diverse Complex Mix, una per ciascuna *ratio* testata; 10  $\mu$ l di ciascuna mix sono stati poi aggiunti a ciascun pozzetto. I dettagli delle mix vengono riportati in Tabella 20.

La prova è stata eseguita utilizzando il plasmide pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG3 ed il plasmide di controllo pCpGL-basic. Una volta inserita la Complex Mix FuGENE in ciascun pozzetto si è incubato a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore, successivamente alle quali la reazione di trasfezione è stata bloccata attraverso la sostituzione del medium colturale con 100  $\mu$ l di medium DMEM completo. Si è nuovamente incubato a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore, dopo le quali è stata eseguita la lettura del segnale prodotto, utilizzando il kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega, Madison, USA) e si è proceduto come indicato nel protocollo fornito dal produttore.

	RATIO pCpGLΔ:pGL4.75								
	4:1	8:1	10:1	12,5:1	16:1	20:1	30:1	40:1	50:1
<b>Quantità totale di DNA (μg)</b>	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg	1μg
<b>PCpGLΔPCDH17_CpG3 (200 ng/μl) (μl)</b>	4	4,44	4,55	4,63	4,7	4,76	4,84	4,87	4,9
<b>Renilla (50 ng/μl) (μl)</b>	4	2,22	1,8	1,48	1,18	0,95	0,65	0,48	0,39
<b>FuGENE (μl)</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>OPTI-MEM (μl)</b>	38	39,34	39,65	39,89	40,12	40,29	40,51	40,65	40,71
<b>Volume finale (μl)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Tabella 20. Dettagli della Complex Mix FuGENE utilizzata per la prova di messa a punto del rapporto tra Firefly e Renilla.

### 3.3.3.3 Analisi dei dati di trasfezione

Le condizioni messe a punto nella linea CF2Th sono state applicate nell'esecuzione di tre prove indipendenti con tutti i plasmidi non metilati e con i plasmidi metilati, replicando in ciascuna prova ogni condizione in sestuplicato. Al termine delle prove, si è proceduto rilevando il segnale prodotto dalla luciferasi *Firefly* e *Renilla*. I dati ottenuti sono stati analizzati come segue: al segnale prodotto dal gene *reporter Firefly* è stato sottratto il segnale basale, rilevato nei pozzetti in cui le cellule non sono state trasfettate con alcun plasmide, ed è stato successivamente normalizzato sul segnale prodotto dalla luciferasi *Renilla*, al quale è stato a sua volta sottratto il segnale basale. Per poter stabilire se il gene *reporter* fosse effettivamente espresso e per poter relativizzare il dato, si è deciso di rapportare il dato di luminescenza medio dei sestuplicati, normalizzato sul segnale della *Renilla*, a: il segnale prodotto dalla trasfezione delle cellule con il plasmide pCpGL-basic vuoto, nel caso delle trasfezioni con i plasmidi non metilati; al segnale prodotto dal plasmide non metilato utilizzato come controllo negativo (CTRL-), nel caso dei plasmidi metilati. È stata poi calcolata la media dei risultati delle tre prove.

## 3.4 PROTOCOLLO DI METILAZIONE

Per poter valutare se e come la metilazione di ciascuna regione oggetto di analisi possa influenzare l'espressione del gene posto sotto controllo di esse, è stato necessario metilare



*in vitro* i cloni prescelti e successivamente trasferire con i costrutti metilati la linea cellulare di cane, eseguendo 3 prove indipendenti e replicando ciascuna condizione in sestuplicato. La reazione di metilazione è stata eseguita con tre enzimi in grado di riconoscere e metilare siti diversi, allo scopo di valutare a livello di quali siti, all'interno delle regioni CGI clonate, la metilazione fosse maggiormente rilevante nella regolazione dell'espressione del gene *reporter*.

Gli enzimi utilizzati sono stati:

- l'enzima CpG SssI Metiltransferasi (M.SssI, Biolabs, New England) che è in grado di metilare tutti i residui di citosina (C<sup>5</sup>) su entrambi i filamenti, riconoscendo la sequenza riportata in Figura 16.

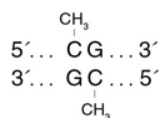


Figura 16. Sito riconosciuto dall'enzima M.SssI e siti di metilazione delle citosine.

- l'enzima HhaI Metiltransferasi (M.HhaI, Biolabs, New England) che è in grado di metilare solo i residui di citosina (C<sup>5</sup>) interni alla sequenza riconosciuta, riportata in Figura 17, su entrambi i filamenti.

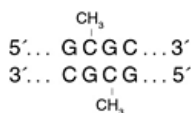


Figura 17. Sito riconosciuto dall'enzima M.HhaI e siti di metilazione delle citosine.

- l'enzima HpaII Metiltransferasi (M.HpaII, Biolabs, New England) che è in grado di riconoscere e modificare solo i residui di citosina (C<sup>5</sup>) interni alla sequenza riportata in Figura 18, su entrambi i filamenti.

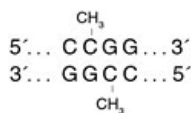


Figura 18. Sito riconosciuto dall'enzima M.HpaII e siti di metilazione delle citosine.

### 3.4.1 Metilazione

La reazione di metilazione è stata condotta utilizzando ciascun enzima singolarmente e successivamente combinando gli enzimi M.HhaI e M.HpaII. Ciascun enzima utilizza come

substrato il SAM che viene fornito dal produttore alla concentrazione di 32 mM e viene diluito ed utilizzato alla concentrazione di 1.600  $\mu$ M.

La reazione di metilazione con l'enzima M.SssI è stata condotta a 37°C per due ore, l'enzima è stato poi inattivato a 65°C per 20 minuti. I dettagli della mix di reazione, all'interno della quale sono stati inseriti 2  $\mu$ g di pDNA, sono riportati in Tabella 21.

	CONCENTRAZIONE FINALE	20 $\mu$ l di REAZIONE
<b>Nuclease-free water</b>	-	Fino a 20 $\mu$ l
<b>NEBuffer 2 (10 X)</b>	1 X	2 $\mu$ l
<b>SAM (1.600 <math>\mu</math>M)</b>	160 $\mu$ M	2 $\mu$ l
<b>SssI Metiltransferasi (4 U/<math>\mu</math>l)</b>	0,2 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l

Tabella 21. Componenti della mix di reazione preparata per la reazione di metilazione con M.SssI.

Le reazioni di metilazione con gli enzimi M.HhaI e M.HpaII sono state condotte a 37°C per due ore; gli enzimi sono stati poi inattivati a 65°C per 15 minuti. I dettagli delle mix di reazione sono riportati in Tabella 22 e 23. All'interno delle due mix sono stati inseriti 2  $\mu$ g e 3  $\mu$ g di pDNA, nella reazione con l'enzima M.HpaII e M.HhaI rispettivamente.

	CONCENTRAZIONE FINALE	20 $\mu$ l di REAZIONE
<b>Nuclease-free water</b>	-	Fino a 20 $\mu$ l
<b>CutSmart® Buffer HhaI (10 X)</b>	1 X	2 $\mu$ l
<b>SAM (1.600 <math>\mu</math>M)</b>	80 $\mu$ M	1 $\mu$ l
<b>HhaI Metiltransferasi (25 U/<math>\mu</math>l)</b>	0,6 U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l

Tabella 22. Componenti della mix di reazione preparata per la reazione di metilazione con M.HhaI.

	CONCENTRAZIONE FINALE	20 $\mu$ l di REAZIONE
<b>Nuclease-free water</b>	-	Fino a 20 $\mu$ l
<b>CutSmart® Buffer HpaII (10 X)</b>	1 X	2 $\mu$ l
<b>SAM (1.600 <math>\mu</math>M)</b>	80 $\mu$ M	1 $\mu$ l
<b>HpaII Metiltransferasi (4 U/<math>\mu</math>l)</b>	0,2 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l

Tabella 23. Componenti della mix di reazione preparata per la reazione di metilazione con M.HpaII.

La reazione di metilazione con entrambi gli enzimi M.HhaI e M.HpaII è stata condotta a 37°C per due ore e gli enzimi sono stati inattivati a 65°C per 20 minuti. La mix di reazione utilizzata conteneva: 1 $\mu$ l di ciascuno dei due buffer CutSmart® Buffer HhaI e CutSmart®

Buffer HpaII, un volume di SAM (1.600  $\mu\text{M}$ ) pari al doppio di quello utilizzato nelle reazioni con i singoli enzimi, 1 $\mu\text{l}$  dell'enzima HpaII, 0,5 $\mu\text{l}$  dell'enzima HhaI e 3  $\mu\text{g}$  di pDNA.

### 3.4.2 Verifica della reazione di metilazione

Al fine di valutare se la reazione di metilazione fosse avvenuta correttamente, è stato necessario digerire il prodotto di metilazione con degli enzimi sensibili alla presenza o meno di un gruppo metile legato ai residui di citosina.

Per verificare la reazione di metilazione da parte degli enzimi M.HhaI e M.HpaII sono stati digeriti i prodotti della metilazione con i corrispettivi enzimi dotati di attività endonucleasica, HhaI e HpaII varianti Fast Digest (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Con i medesimi enzimi si è digerito, come controllo, anche il plasmide non metilato. Per verificare la reazione di metilazione operata da parte dell'enzima M.SssI, si è digerito il prodotto di metilazione con gli enzimi HhaI e HpaII separatamente. La reazione di digestione è stata condotta a 37°C per 10 minuti. I dettagli della mix di reazione utilizzata per entrambi gli enzimi viene riportata in Tabella 24. In ciascuna reazione sono stati aggiunti 500 ng di pDNA.

	CONCENTRAZIONE FINALE	20 $\mu\text{l}$ di REAZIONE
<b>Nuclease-free water</b>	-	Fino a 20 $\mu\text{l}$
<b>Fast Digest Buffer (10X)</b>	1 X	2 $\mu\text{l}$
<b>HhaI o HpaII (10 U/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	0,5 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$

Tabella 24. Componenti della mix di reazione preparata per la reazione di digestione con HhaI e HpaII.

I prodotti di digestione sono stati analizzati in gel di agarosio 1,2% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) preparato in *buffer* TBE 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). La corsa in gel è avvenuta all'interno di una cameretta elettroforetica (Major Science, Saratoga, USA) in *buffer* TBE 1X, a 100 V per 60 minuti.

### 3.5 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita con l'ausilio del programma GraphPad Prism 5. Nello specifico sono stati utilizzati, negli studi di metilazione *in vitro*, il test parametrico ANOVA (One-way analysis of variance) ed il post-test di Bonferroni, nel caso in cui i dati rispettassero i criteri di normalità. È stato considerato significativo un valore di  $P < 0.05$ . I grafici sono stati disegnati con l'ausilio del programma GraphPad Prism 5.

### 3.6 VALUTAZIONE *IN SILICO* DEI SITI DI *BINDING* PER I FATTORI DI TRASCRIZIONE

Le isole CpG localizzate nei geni CiDEA, MAL e PCDH17 sono state analizzate attraverso l'utilizzo di *software* predittivi per l'individuazione degli eventuali siti di legame per i fattori di trascrizione. Esistono molteplici *tools* bioinformatici che sfruttano diversi algoritmi e matrici di calcolo, per cui, in una prima analisi esplorativa, è sempre opportuno utilizzare più *software* diversi e confrontarne i risultati al fine di rendere più robuste le predizioni. I *software* utilizzati in questo studio sono stati: MatInspector, TFbind e Promo3.

Il *software* MatInspector fa parte della piattaforma Genomatix e utilizza matrici estratte dal *database* TRANSFAC, specifiche per ciascuna famiglia di fattori di trascrizione (Quandt et al., 1995). Le regioni clonate sono state inserite manualmente una ad una e sono state analizzate nei confronti della specie *Homo sapiens*, che risulta essere più aggiornata e completa rispetto a quella del cane. L'*output* fornito ha permesso di ottenere un *file Excel* in cui vengono indicati tutti i fattori di trascrizione presenti in quella regione e la loro posizione, assieme a dei parametri qualitativi quali la famiglia di appartenenza e la matrice utilizzata per individuarli. Ad ogni fattore di trascrizione viene inoltre assegnato un valore di *Matrix similarity* e di *Core Similarity*, il cui valore massimo arriva a 1; essi rappresentano il grado di omologia tra il sito identificato nella sequenza in analisi e la matrice.

Promo3 utilizza la versione 8.3 di TRANSFAC e permette di selezionare la specie di interesse (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002). Ha un *cut-off* di similitudine fisso all'85% per cui non permette di ridurre i falsi positivi al contrario di MatInspector, che

permette di modificare i valori di *Matrix similarity* e *Core similarity* fino a raggiungere il 100%, ovvero il riconoscimento perfetto del sito di legame del fattore di trascrizione.

TFbind è stato creato da Tatsuhiko Tsunoda nel 1999 e utilizza matrici derivate dal *database* TRANSFAC R.3.4. Comprende 433 promotori di organismi vertebrati e presenta delle impostazioni predefinite. Non permette infatti né di selezionare famiglia o specie né di agire sugli eventuali falsi positivi, restringendo i parametri di omologia tra sequenza input e matrice.

Gli *output* provenienti dai tre *tool* sono stati confrontati ed integrati sebbene i risultati ottenuti da MatInspector sono stati maggiormente considerati sulla base della maggiore robustezza del *software*.



## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

---

### 4.1 CLONAGGIO DELLE REGIONI DI INTERESSE

Attraverso la reazione di *Nested-PCR* sono stati amplificati i frammenti di DNA di interesse, corrispondenti alle regioni CiDEA\_CpG1, CiDEA\_CpG2, MAL\_CpG1, PCDH17\_CpG1, PCDH17\_CpG2, PCDH17\_CpG3, PCDH17\_CpG4, PCDH17\_CpG5. L'ottenimento di tali frammenti è stato confermato attraverso l'analisi in gel; si riporta in Figura 19 un'immagine esemplificativa corrispondente all'analisi in gel del prodotto della *Nested-PCR* di PCDH17\_CpG1, di lunghezza pari a 459 bp, caricato in quadruplicato.

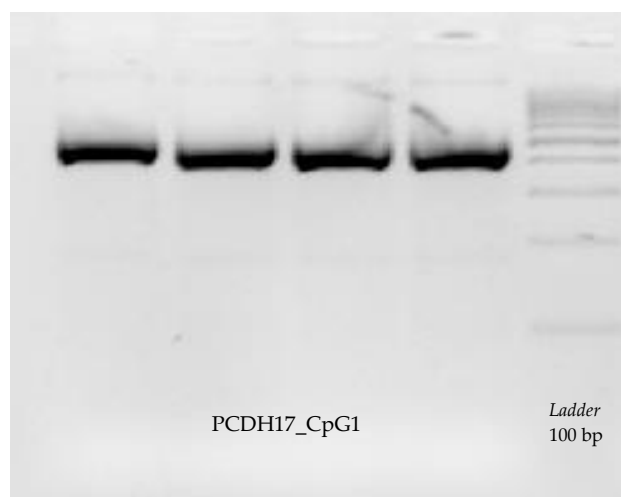


Figura 19. Elettroforesi in gel di agarosio 1,5% del prodotto della *Nested-PCR*.

Attraverso sequenziamento con metodo Sanger dei prodotti della *Nested-PCR* purificati da gel, è stato possibile verificare il corretto inserimento dei siti di taglio per gli enzimi di restrizione all'inizio e alla fine di ciascun frammento. Si riporta in Figura 20 la sequenza del gene PCDH17\_CpG1 allineata rispetto alla sequenza *wild type* (WT) presa come riferimento (CanFam3.1). Sono evidenziati in figura i siti mutati rispetto alla sequenza WT, per l'inserimento dei siti di restrizione PstI e NcoI, e la presenza di uno SNP in posizione 248. Tale variante è stata confermata attraverso il sequenziamento di 3 campioni diversi fra loro.

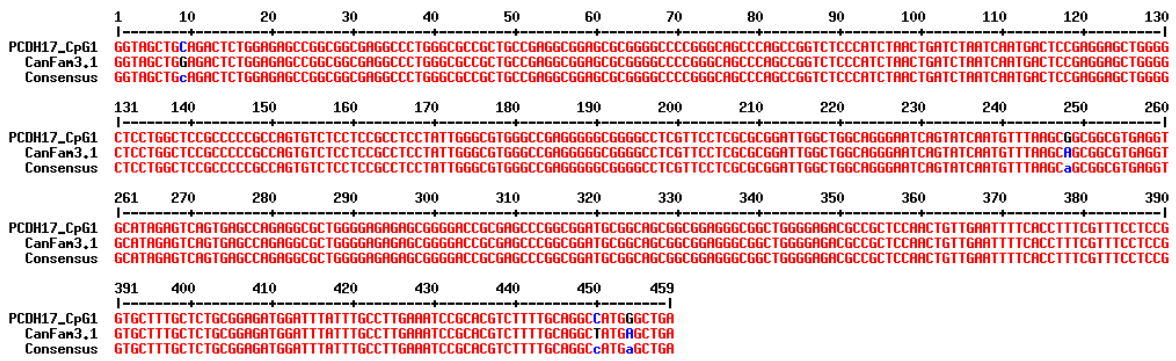


Figura 20. Allineamento della sequenza del prodotto di Nested-PCR della regione PCDH17\_CpG1 con la sequenza WT di riferimento CanFam3.1.

Verificato l’inserimento dei siti di restrizione all’interno di ciascun frammento, si è proceduto con il clonaggio all’interno del plasmide pCpGL-basic, come descritto nei Materiali e Metodi.

Dopo la reazione di ligazione, sono stati trasformati i batteri *E. coli* con i prodotti del clonaggio e, questi, sono stati poi piastrati overnight su terreno low-salt LB Agar addizionato di Zeocina (Figura 21). La crescita delle colonie batteriche in terreno selettivo ha confermato la corretta trasformazione dei batteri con il plasmide contenente il gene per la resistenza alla Zeocina.

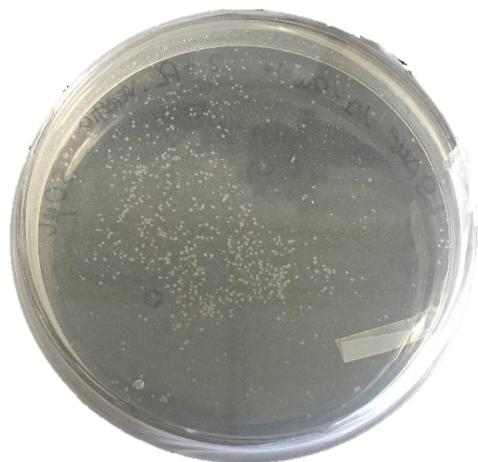


Figura 21. Immagine esemplificativa di colonie di *E. coli* trasformate con pCpGLAPCDH17\_CpG1 su terreno low Salt LB Agar addizionato con Zeocina.

Tuttavia, per poter verificare, in modo preliminare, che i clonaggi fossero avvenuti correttamente, è stato necessario prelevare le colonie batteriche cresciute in terreno selettivo, estrarne il pDNA ed eseguire una digestione con enzimi di controllo.

L’analisi elettroforetica ha permesso di visualizzare i prodotti di restrizione e verificare il corretto inserimento del frammento, mediante confronto con il plasmide vuoto pCpGL-basic sottoposto alla stessa reazione di digestione. Si riporta in Figura 22 un’immagine esemplificativa del prodotto della digestione del pDNA pCpGLAPCDH17\_CpG1, digerito con l’enzima EcoRI. Come è possibile vedere in figura, i cloni positivi con all’interno del



plasmide l'inserto di interesse, in seguito a digestione, hanno prodotto in gel una banda da 2.330 bp e una banda da 1.950 bp; al contrario il plasmide di controllo, digerito con il medesimo enzima, ha prodotto due frammenti di lunghezza simile da 1.922 e 1.950 bp.

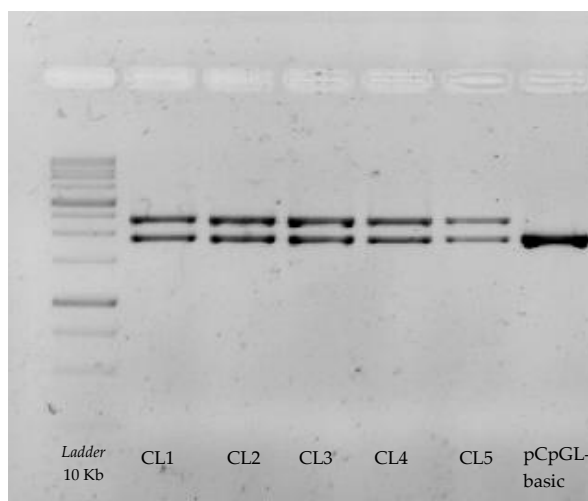


Figura 22. Porzione esemplificativa dell'elettroforesi in gel dei prodotti di restrizione di controllo dei cloni (CL) 1-5 del plasmide pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG1.

I cloni risultati positivi all'analisi preliminare con enzimi di restrizione, sono stati successivamente sequenziati attraverso metodo Sanger, che ha confermato il corretto inserimento delle

regioni CiDEA\_CpG1, CiDEA\_CpG2, MAL\_CpG1, PCDH17\_CpG1, PCDH17\_CpG2, PCDH17\_CpG3, PCDH17\_CpG4, PCDH17\_CpG5 all'interno del plasmide pCpGL-basic. Dall'analisi di sequenziamento sono però emerse alcune varianti rispetto alla sequenza CanFam3.1 (Tabella 25). Potenziali errori di sequenziamento sono stati esclusi grazie all'analisi di più campioni di diversa provenienza.

PRODOTTO DEL CLONAGGIO	LUNGHEZZA PLASMIDE (bp)	LUNGHEZZA INSERTO (bp)	POSIZIONE VARIANTE (rispetto all'ATG)
<b>PCpGL<math>\Delta</math>CiDEA_CpG1</b>	4.206	353	
<b>PCpGL<math>\Delta</math>CiDEA_CpG2</b>	4.650	808	c.38+268G>C c.38+481insG c.38+545A>C c.38+553C>T c.38+713G>A
<b>PCpGL<math>\Delta</math>MAL_CpG1</b>	5.067	1.217	
<b>PCpGL<math>\Delta</math>PCDH17_CpG1</b>	4.280	439	c.-3103A>G
<b>PCpGL<math>\Delta</math>PCDH17_CpG2</b>	4.164	311	c.-2324A>G
<b>PCpGL<math>\Delta</math>PCDH17_CpG3</b>	4.551	710	c.-1436_-1380del c.-1170insA
<b>PCpGL<math>\Delta</math>PCDH17_CpG4</b>	5.063	1.213	c.-337C>T c.-335G>C c.-332G>T c.-329G>C c.-327G>C c.-326G>T c.-325A>C c.-321G>A c.-319A>C c.-314C>A c.-308A>C c.-232T>G c.-229T>C c.-228C>G c.-218_-209del
<b>PCpGL<math>\Delta</math>PCDH17_CpG5</b>	5.124	1.271	

Tabella 25. Tabella riassuntiva dei prodotti del clonaggio.

Questa prima parte dello studio ha permesso quindi di ottenere un totale di 8 cloni, uno per ciascuna regione di interesse, con le regioni oggetto di analisi inserite all'interno del plasmide pCpGL-basic.

Si è dunque proceduto con la scelta della linea cellulare da utilizzare per le prove di trasfezione.

## 4.2 SCELTA DELLA LINEA CELLULARE

Per le prove di trasfezione, sono state considerate due diverse linee cellulari di cane, CF2Th e MDCK, che sono state confrontate tra loro sia in termini di espressione genica, sia in termini di efficienza di trasfezione. Il fine è stato quello di identificare la linea cellulare migliore, che permettesse di massimizzare il segnale ottenibile dal gene *reporter*.

### 4.2.1 Espressione genica dei trascritti *target* e dei fattori di trascrizione

Dopo aver estratto l'RNA dalle cellule ed averlo retrotrascritto in cDNA, sono state eseguite delle prove di espressione genica che hanno permesso di valutare quale fosse il livello di espressione basale dei geni oggetto di studio nelle linee cellulari MDCK e CF2Th. Da tali prove (Figura 23), è emerso che nella linea cellulare MDCK l'unico gene ad essere espresso è il gene MAL, a supporto di quanto già riscontrato da Zacchetti e collaboratori (1995). Al contrario, nella linea cellulare CF2Th l'unico gene che è risultato essere espresso è il gene PCDH17, ma in letteratura non esistono dati pregressi a supporto di tale risultato.

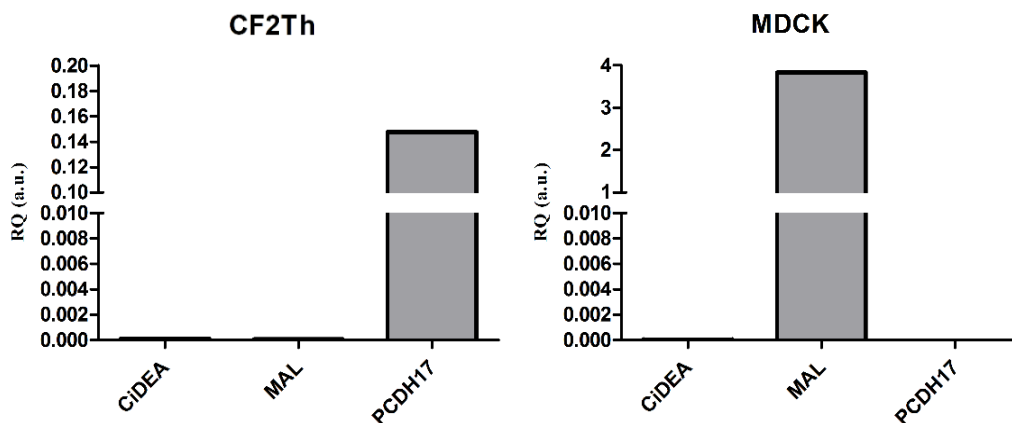


Figura 23. Risultati della prova di espressione genica dei geni CiDEA, MAL, PCDH17 nelle linee cellulari CF2Th e MDCK.

Ulteriori prove di espressione genica hanno permesso di valutare quale fosse l'espressione basale di alcuni dei fattori di trascrizione, che potevano essere potenzialmente coinvolti nella regolazione dell'espressione dei tre geni oggetto di studio. Si riportano in Figura 24 i risultati ottenuti dalla quantificazione relativa di ciascun fattore di trascrizione scelto.

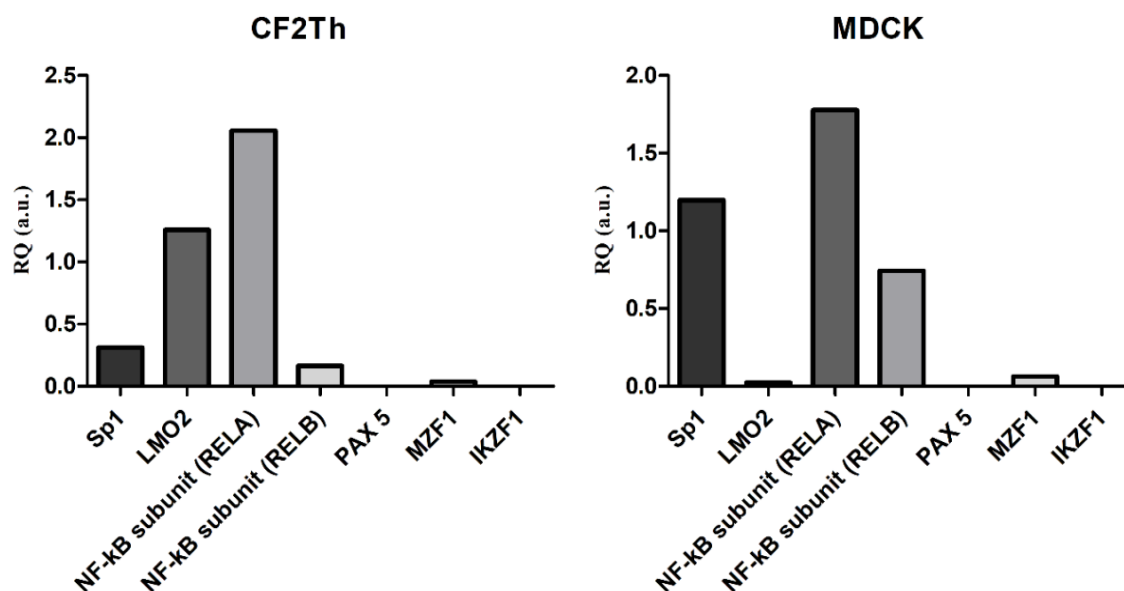


Figura 24. Risultati ottenuti dalla prova di espressione genica dei fattori di trascrizione Sp1, LMO2, NF-kB subunit (RELA), NF-kB subunit (RELB), PAX5, MZF1, IKF1.

Come è possibile osservare dai grafici, in entrambe le linee i fattori di trascrizione PAX5, MZF1 e IKF1 non sono risultati essere espressi. In particolare, il fattore di trascrizione PAX5 è implicato nella definizione, nello sviluppo e nel controllo trascrizionale delle cellule linfoidi B, oltre ad essere noto per essere coinvolto nello sviluppo tumorale di tali cellule (Cobaleda et al., 2007). Entrambe le linee in analisi non sono linee tumorali e sono di derivazione epiteliale e questo potrebbe spiegare perché tale fattore non è risultato essere in esse espresso. IKF1 è un fattore di trascrizione essenziale nello sviluppo dei linfociti, in particolare nel loro differenziamento in cellule di tipo B e T (Westman et al., 2002). Le due linee cellulari però non derivano da cellule linfocitiche ed è per tale motivo che il fattore potrebbe non essere stato espresso. Il fattore di trascrizione LMO2, che è noto essere sottoregolato in numerose forme di leucemia T nell'uomo (Nam et al., 2006), è risultato essere espresso nella linea cellulare CF2Th ma non nella linea cellulare MDCK. Infine, i fattori di trascrizione Sp1 e NF-kB sono risultati essere espressi in entrambe le linee, come atteso, essendo fattori di trascrizione ubiquitari (Suske, 1999; Barnes, 1997).

## 4.2.2 Prove comparative di trasfezione

Da prove preliminari, la linea cellulare CF2Th ha rivelato un'efficienza di trasfezione molto elevata. Si è pertanto deciso di mettere a punto il protocollo dettagliato di trasfezione in questa linea cellulare, al fine di verificare se tale linea potesse essere più indicata, rispetto alla linea MDCK, per lo scopo dello studio. Vengono di seguito riportati i risultati preliminari ottenuti dalle prove di messa a punto nella linea cellulare CF2Th.

### 4.2.2.1 Messa a punto trasfezioni nella linea cellulare CF2Th

Attraverso una prima prova, basata sul saggio di proliferazione Alamar Blue, è stato definito il numero di cellule da piastrare in ciascun pozzetto P96. Sulla base dei dati ottenuti (dati non mostrati), si è deciso di piastrare, nelle prove successive, 10.000 cellule/pozzetto, in quanto tale numerosità di cellule ha permesso di:

- ottenere una percentuale di confluenza compresa tra il 70 e l'80% dopo 24 ore di incubazione;
- di non determinare un'eccessiva mortalità cellulare dopo 4 giorni, ovvero al momento della lettura del segnale prodotto dalla luciferasi *Firefly*.

#### *Scelta dell'agente trasfettante, della quantità di DNA totale e del rapporto agente trasfettante:DNA*

È stata dunque allestita una successiva prova che ha permesso di mettere a punto diversi parametri contemporaneamente. Dopo avere piastrato 10.000 cellule/pozzetto ed aver incubato per 24h, si è proceduto con la trasfezione delle cellule testando: diversi quantitativi di DNA totale (40, 100 e 200 ng); due diversi agenti trasfettanti (FuGENE e TurboFect) e diversi rapporti tra agente trasfettante e DNA.

In Figura 25 vengono riportati i risultati ottenuti trasfettando le cellule con il reagente FuGENE. Quel che si può osservare è che il segnale di luminescenza maggiore è stato ottenuto con le *ratio* 3,5:1 e 4:1. Il segnale, inoltre, è risultato aumentare in modo proporzionale alla quantità di DNA utilizzata, con un picco massimo di segnale ottenuto utilizzando 200 ng di DNA totale.

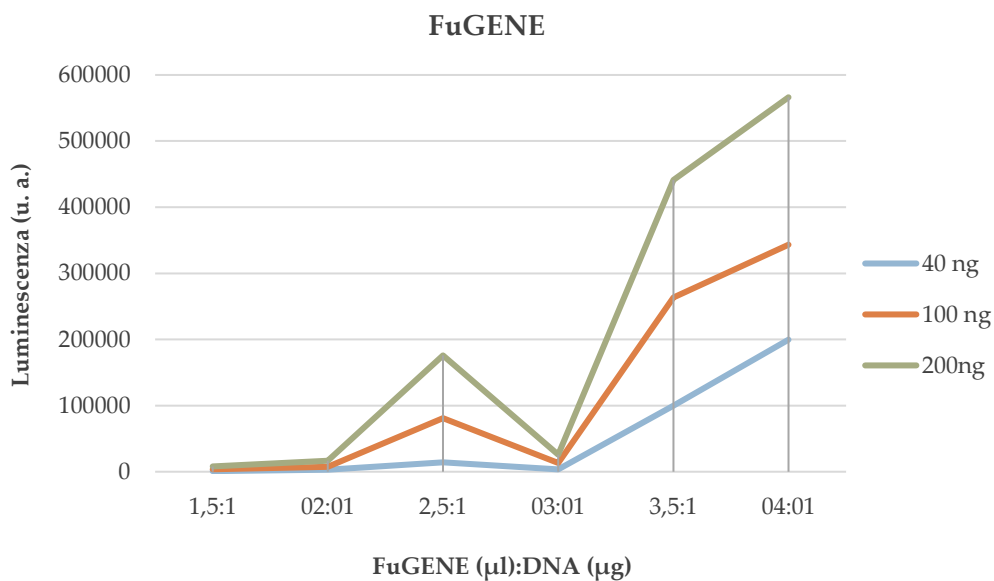


Figura 25. Grafico dei risultati ottenuti attraverso la trasfezione con l'agente trasfettante FuGENE.

Per quanto riguarda l'agente trasfettante TurboFect, i risultati riportati in Figura 26 hanno mostrato un segnale più elevato di *Firefly* ottenuto con il rapporto 3:1 e con una quantità di DNA pari a 100 ng. La quantità di DNA massima, pari a 200 ng, unita al reagente TurboFect, è sembrato creare tossicità alle cellule in quanto non è stato misurato alcun valore di luminescenza per nessuna delle *ratio* testate.

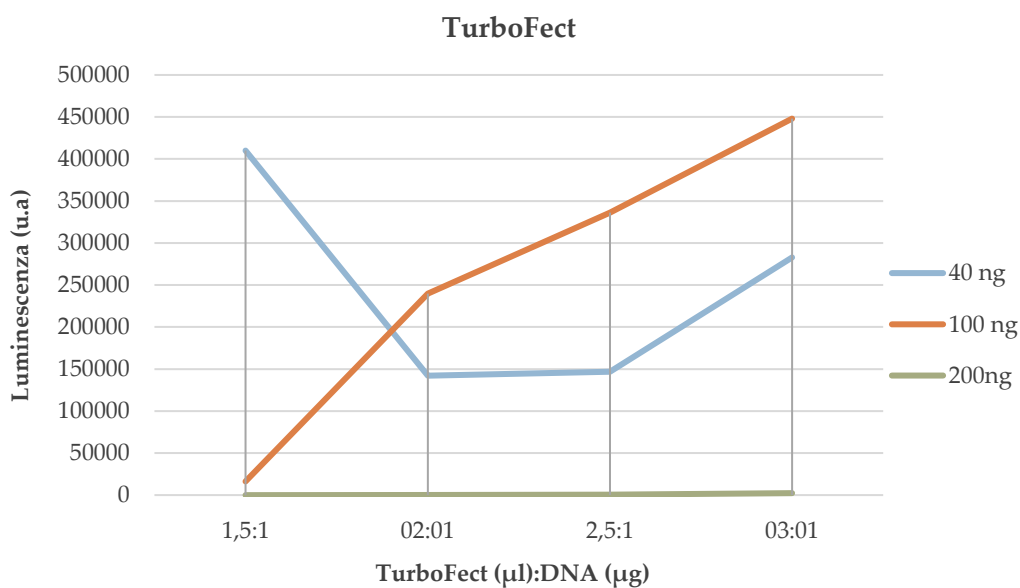


Figura 26. Grafico dei risultati ottenuti attraverso la trasfezione con l'agente trasfettante TurboFect.

Dal confronto dei risultati ottenuti con i due agenti trasfettanti, è emerso che l'agente trasfettante FuGENE è stato quello che ha permesso di ottenere i valori più elevati in termini di luminescenza. Inoltre, si è deciso di utilizzare la quantità più elevata di DNA testata, pari a 200 ng totali, poiché in tal modo è stato possibile massimizzare il segnale ottenibile da parte della luciferasi *Firefly*, senza determinare tossicità cellulare. Infine, il rapporto tra FuGENE:DNA che si è deciso di utilizzare per le prove successive è stato pari al rapporto 4:1.

### ***Scelta del rapporto tra luciferasi Firefly e Renilla***

Per stabilire quale fosse il rapporto migliore tra pCpGL $\Delta$  e pGL4.75 è stata eseguita una prova utilizzando, a titolo esemplificativo, il plasmide pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG3. In tale prova sono stati testati diversi rapporti tra il plasmide contenente la luciferasi *Firefly* e quello contenente la *Renilla*. Il rapporto scelto è stato il 30:1, il quale ha permesso di massimizzare il segnale della luciferasi *Firefly* e di ottenere, al tempo stesso, un segnale della luciferasi *Renilla* almeno 3 volte superiore rispetto al segnale di luminescenza basale, dato dai pozzetti di controllo contenenti le cellule non sottoposte alla trasfezione.

In conclusione, la linea di timo CF2Th è la linea che ha mostrato un'efficienza di trasfezione più elevata rispetto alla linea cellulare MDCK. Quindi, sebbene i risultati ottenuti dalle prove di espressione genica non erano risultati essere particolarmente discriminanti, la scelta della linea cellulare più appropriata è ricaduta sulla linea cellulare CF2Th. Inoltre, pur essendo entrambe le linee di derivazione epiteliale, le cellule CF2Th, che derivano da cellule di timo, potrebbero rappresentare un modello più appropriato rispetto alla linea MDCK, che deriva invece da cellule di tubulo renale di cane.

Le condizioni di trasfezione messe a punto sono state applicate nelle successive prove di trasfezione della linea cellulare con i prodotti del clonaggio non metilati e sottoposti a metilazione.

### 4.3 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DELLA METILAZIONE SULLA TRASCRIZIONE E PREDIZIONE DEI SITI DI LEGAME DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE INTERESSATI DALLA METILAZIONE

Successivamente alla messa a punto del protocollo di trasfezione e alla scelta della linea cellulare, si è proceduto con le prove di trasfezione dei plasmidi sottoposti o meno a metilazione. Lo scopo di tali prove è stato triplice: 1) verificare se la regione promotoriale clonata presentasse degli elementi regolatori necessari e sufficienti all'attivazione della trascrizione; 2) comprendere se la metilazione enzimatica della regione promotoriale clonata fosse in grado di ridurre la trascrizione; 3) identificare e localizzare le CGI responsabili dell'inibizione della trascrizione.

I risultati vengono di seguito riportati, suddivisi in base al gene oggetto di studio.

#### 4.3.1 *Myelin and Lymphocyte protein (MAL)*

*Myelin and Lymphocyte protein (MAL)*, è una proteina di differenziamento delle cellule, il cui cDNA è stato per la prima volta caratterizzato da Alonso e Weissman nel 1989, i quali la descrissero come presente in cellule-T mature ma non in cellule T ai primi stati di differenziamento. MAL è una proteina di membrana idrofobica del peso di 16,7 kDa, che si ritrova nella frazione insolubile delle membrane cellulari ed in particolare in strutture dinamiche quali i *raft* lipidici, microdomini costituiti da sfingolipidi e colesterolo che hanno un'influenza sull'adesione cellulare, sulla fluidità di membrana, sulla mediazione di segnali cellulari, sul traffico di proteine e sull'apoptosi (Lee et al., 2010). Tale proteina si trova in particolare in cellule epiteliali polarizzate ed esplica la sua principale funzione nel trasporto apicale e nella mediazione del segnale cellulare. Questo potrebbe spiegare come mai tale gene risultasse espresso nella linea cellulare MDCK, costituita da cellule non clonali che sono in grado di formare un monostrato polarizzato (Dukes et al., 2011). Del gene MAL solo una regione, denominata MAL\_CpG1, è stata oggetto di studio in questa tesi. Attraverso le prove di trasfezione con il plasmide pCpGLΔMAL\_CpG1 è stato possibile confermare che la regione CGI clonata fosse importante per la trascrizione del gene. Infatti, il segnale della luciferasi *Firefly* che è stato ottenuto dalle tre prove di trasfezione, normalizzato sul segnale della luciferasi *Renilla*, è risultato essere 442,4 volte

più elevato rispetto al segnale dato dal plasmide vuoto, come riportato in Figura 27. Il valore *Firefly/Renilla* di ciascun plasmide è stato rapportato al segnale prodotto dalle cellule trasfettate con il plasmide pCpGL-basic, anch'esso normalizzato sul segnale della *Renilla*, a cui è stato arbitrariamente assegnato un valore pari a 1.

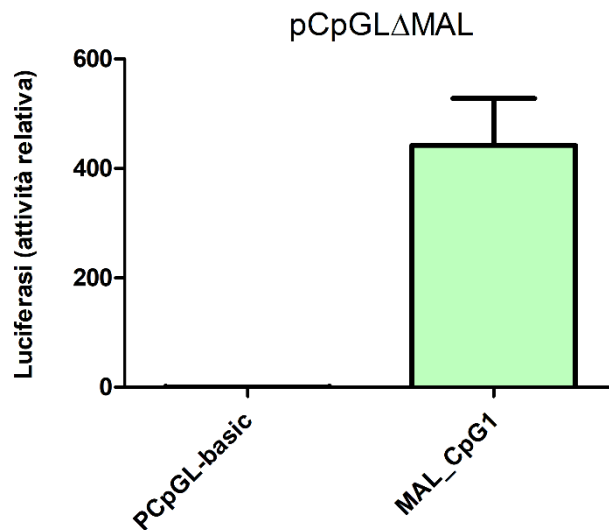


Figura 27. Risultati delle tre prove di trasfezione nella linea CF2Th con il plasmide pCpGLΔMAL\_CpG1.

Si è dunque proceduto con le successive prove sperimentali di trasfezione dopo metilazione enzimatica. In generale, in questo caso e per i successivi geni oggetto di studio, la scelta dei cloni da sottoporre alla fase di metilazione è stata effettuata considerando quale *cut-off* di attività relativa della luciferasi un valore arbitrario superiore a 100. Ciò ha permesso di selezionare i costrutti maggiormente coinvolti nella trascrizione genica e, ipoteticamente, maggiormente influenzati dalla metilazione *in vitro*. Il plasmide pCpGLΔMAL\_CpG1 è stato quindi sottoposto alle reazioni di metilazione con le metiltransferasi M.SssI, M.HhaI e M.HpaII e con la combinazione degli enzimi M.HhaI e M.HpaII. Nella prova è stato inserito anche un controllo negativo interno (denominato CTRL-), in cui il pDNA è stato sottoposto alla medesima reazione di metilazione ma in assenza di enzima. Tutti i prodotti di metilazione sono stati successivamente sottoposti ad una reazione di restrizione con enzimi sensibili alla metilazione e ad analisi elettroforetica in gel d'agarosio 1.2%, in modo da verificare che i siti CpG fossero stati effettivamente metilati. Il risultato della reazione di metilazione di pCpGLΔMAL\_CpG1 viene riportato in Figura 28, in cui è stato possibile osservare la presenza di una singola banda in ciascun



campione metilato, mentre nella lane 2 e 3 è stato possibile osservare la presenza di una banda più bassa corrispondente al plasmide non metilato, che è stato quindi digerito.

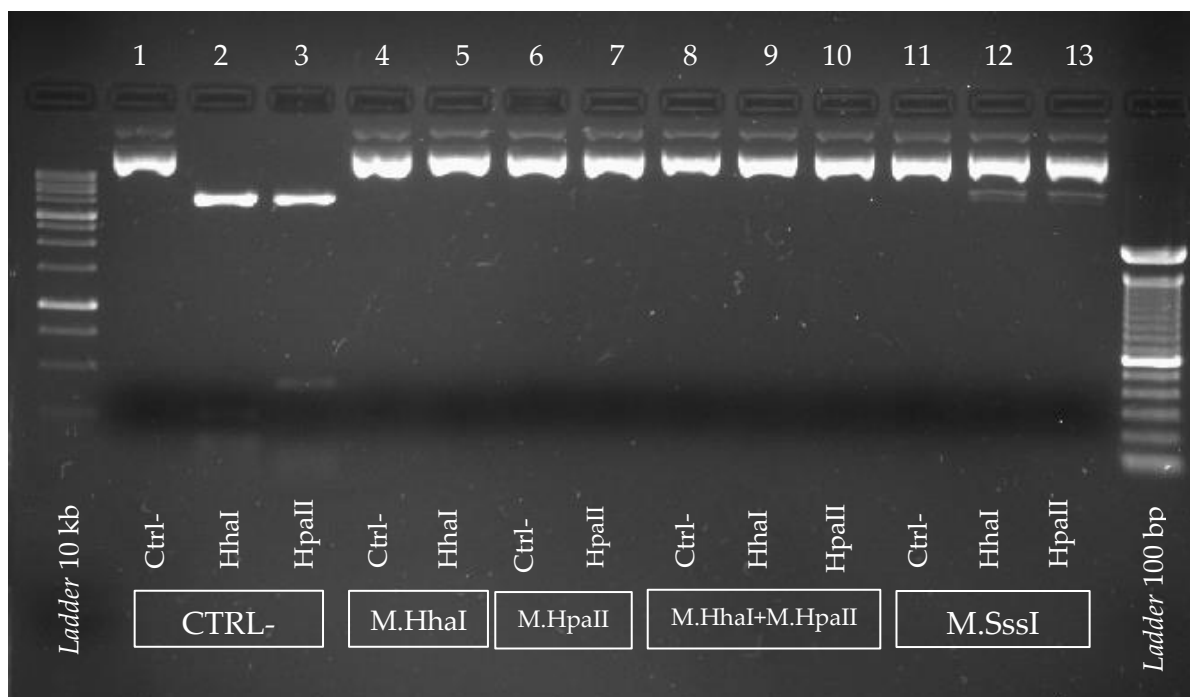


Figura 28. Risultati della prova di restrizione di controllo con gli enzimi HhaI e HpaII dei prodotti metilati e del CTRL- non metilato, in gel di agarosio 1,2%.

In Figura 29 si riportano i risultati delle medie delle tre prove, normalizzati rispetto al segnale di luminescenza prodotto dalla luciferasi *Renilla* e rapportati al controllo negativo (CTRL-), corrispondente al segnale prodotto dalle cellule trasfettate con il CTRL-, cioè con il plasmide non metilato. La metilazione con l'enzima M.SssI ha determinato un abbattimento statisticamente significativo del segnale del gene *reporter*, pari al 99,3% ( $P < 0,001$ ) rispetto al segnale prodotto dal controllo negativo (CTRL-).

Quel che è emerso dal grafico, inoltre, è che anche la metilazione con gli enzimi M.HhaI e M.HpaII è stata in grado di determinare un abbattimento del segnale prodotto dalla luciferasi *Firefly*, in particolare: la metilazione con M.HhaI ha determinato una diminuzione del segnale del 72,89% ( $P < 0,001$ ) rispetto al controllo, mentre la metilazione con M.HpaII ha determinato una diminuzione del 58,85% ( $P < 0,001$ ). Tali risultati sono stati confermati anche dal dato di luminescenza che è stato ottenuto a seguito della metilazione combinata con entrambi gli enzimi M.HhaI e M.HpaII: la diminuzione del segnale si è attestata infatti attorno al 89,7% ( $P < 0,001$ ) rispetto al controllo non metilato, ad indicare

una sorta di effetto congiunto di silenziamento, derivante dall'azione combinata dei due enzimi.

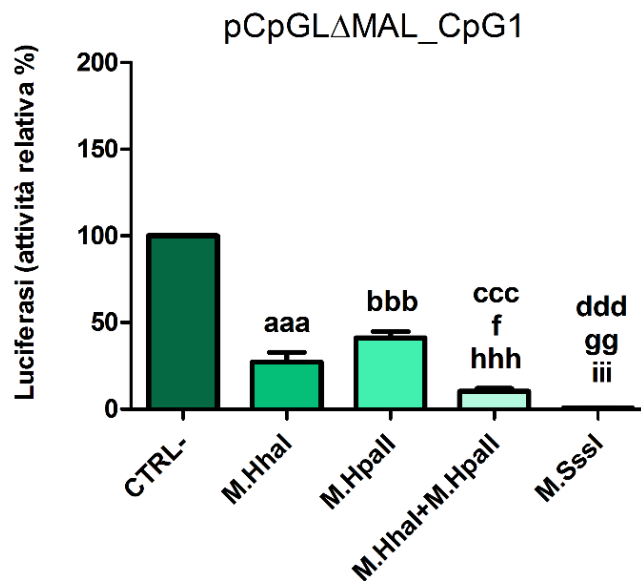


Figura 29. Risultati delle tre prove di trasfezione nella linea CF2Th con il plasmide pCpGLΔMAL\_CpG1 metilato con gli enzimi M.SssI, M.HhaI e M.HpaII; aaa:  $P < 0,001$  (CTRL- vs. M.HhaI), bbb:  $P < 0,001$  (CTRL- vs. M.HpaII), ccc:  $P < 0,001$  (CTRL- vs. M.HhaI+M.HpaII), ddd:  $P < 0,001$  (CTRL- vs. M.SssI), f:  $P < 0,05$  (M.HhaI vs. M.HhaI+M.HpaII), gg:  $P < 0,01$  (M.HhaI vs. M.SssI), hhh:  $P < 0,001$  (M.HpaII vs. M.HhaI+M.HpaII), iii:  $P < 0,001$  (M.HpaII vs. M.SssI).

Il gene MAL si considera un gene oncosoppressore che risulta essere differenzialmente espresso nel sottotipo tumorale di linfoma primario mediastinico diffuso delle cellule B (PMBL) rispetto agli altri sottotipi di DLBCL, in cui non risulta espresso. Quindi l'espressione del gene MAL non è ristretta solamente al sottotipo cellulare T ma anche a cellule B neoplastiche (Copi-Bergman et al., 1999).

La regione promotoriale del gene MAL non è stata ad oggi caratterizzata in nessuna specie. Nonostante ciò, nell'uomo, numerosi studi dimostrano che l'espressione del gene nei tumori sottostà a meccanismi di regolazione di natura epigenetica. Risulta essere infatti ipermetilato nel tumore al colon-retto nell'uomo (Kalmàr et al., 2015; Lind et al., 2008; Mori et al., 2006), nel tumore al polmone (Suzuki et al., 2012), nel tumore allo stomaco (Buffart et al., 2008), nel carcinoma esofageo (Jin et al., 2013), nel tumore alla cervice e all'endometrio (De Strooper et al., 2014), oltre a rappresentare un potenziale fattore di rischio per quanto riguarda lo sviluppo di tumore in donne che risultano positive all'infezione a Papillomavirus (Hesselink et al., 2011).

Sebbene nel cane le informazioni riguardo a questo gene ed alla sua regolazione siano scarse, i risultati ottenuti dal presente studio sembrano essere supportati dagli studi effettuati nell'uomo.

Inoltre, nonostante nel cane la regione promotoriale del gene non sia stata ancora ad oggi caratterizzata, nel presente lavoro di tesi è stata eseguita un'analisi predittiva dei siti di legame per i fattori di trascrizione nella regione MAL\_CpG1, utilizzando i programmi MatInspector, TFbind e Promo3. Da tali indagini, è emerso come, all'interno della regione clonata di 1.217 bp, fossero presenti diversi siti di legame per numerosi fattori di trascrizione, in particolare a livello di siti riconosciuti dagli enzimi M.HhaI e M.HpaII. Concentrandosi su questi ultimi, sono stati riscontrati due siti di legame per il fattore di trascrizione *Nuclear respiratory factor 1* (NRF1), a cavallo di siti riconosciuti da entrambi gli enzimi metiltrasferasici. In topo, è stato dimostrato come il legame del fattore di trascrizione NRF1 sia influenzato dallo stato di metilazione del DNA; Domcke e collaboratori, in uno studio pubblicato nel 2015, dimostrano inoltre che lo stato di ipometilazione dei siti riconosciuti dal fattore di trascrizione può essere determinato dall'interazione di fattori trascrizionali, sensibili alla metilazione, con la sequenza di DNA. Un altro sito potenzialmente interessante, localizzato a cavallo di siti riconosciuti da M.HhaI e M.HpaII, è rappresentato dal sito per il fattore di trascrizione *BTB-zinc finger 7* (ZBTB7). ZBTB7 appartiene ad una famiglia di proteine che esercitano un ruolo importante nella differenziazione delle cellule del sistema ematopoietico, oltre che nella trasformazione tumorale di tali cellule (Maeda, 2016). Alla medesima famiglia appartiene il fattore di trascrizione ZBTB33, il quale presenta la capacità di interagire con il DNA metilato ed in tal modo reclutare gli enzimi HDAC, che determinano un aumento dello stato di acetilazione della cromatina, regolando in tal modo negativamente l'espressione genica (Kondo, 2009; Bird, 2002). Studi così approfonditi sulla relazione che potrebbe sussistere tra lo stato di metilazione del DNA e l'interazione con il fattore di trascrizione ZBTB7 non sono ancora disponibili, ma è possibile supporre che una relazione tra modificazioni epigenetiche ed interazione con il fattore di trascrizione ZBTB7 possa esistere e che essa possa esercitare un'influenza sull'espressione del gene.

Un altro sito, che è stato identificato essere presente nella sequenza, è il sito riconosciuto dal fattore di trascrizione Sp1, localizzato in una regione che comprende i siti metilati da

entrambi gli enzimi M.HhaI e M.HpaII; inoltre, sono stati predetti due siti per il fattore trascrizionale Myc, solo a livello di sequenze riconosciute dall'enzima M.HhaI, la cui metilazione determina il maggior abbattimento di segnale della luciferasi nelle prove di trasfezione. Tali siti potrebbero rappresentare dei siti importanti per il controllo della trascrizione genica, in relazione allo stato di metilazione della sequenza. È noto, che tra i meccanismi attraverso cui Myc è in grado di inibire l'espressione genica vi sia la capacità di tale fattore di trascrizione di reclutare la DNMT3A a livello di sequenze geniche specifiche, metilandole e dunque silenziandole (Brenner et al., 2005).

#### 4.3.2 Cell death-inducing DNA fragmentation factor $\alpha$ -like effector A (CiDEA)

Cell death-inducing DNA fragmentation factor  $\alpha$ -like effector A (CiDEA) è una proteina appartenente ad una famiglia di proteine proapoptotiche di recente scoperta, alla quale si riconducono anche il Cell death-inducing DNA fragmentation factor  $\alpha$ -like effector B e C (CiDEB, CiDEC), oltre al DNA Fragmentation Factor 40 e 45 (DFF40 e DFF45). CiDEA viene considerato un fattore proapoptotico, anche se da studi condotti nella specie murina non si è riscontrato, a seguito di un'induzione dell'espressione di tale gene, un aumento del processo di morte cellulare programmata nel tessuto (Viswakarma et al., 2007). È particolarmente espresso a livello del tessuto adiposo bruno nel topo ed anche nell'uomo è considerato un regolatore importante del metabolismo degli adipociti.

Si mostrano in Figura 30 i risultati ottenuti dalle prove di trasfezione con i plasmidi non metilati. Come è possibile osservare, il segnale prodotto da pCpGL $\Delta$ CiDEA\_CpG1 è risultato essere 138 volte più elevato rispetto al segnale prodotto dal plasmide pCpGL-basic; per quanto concerne il plasmide pCpGL $\Delta$ CiDEA\_CpG2 il

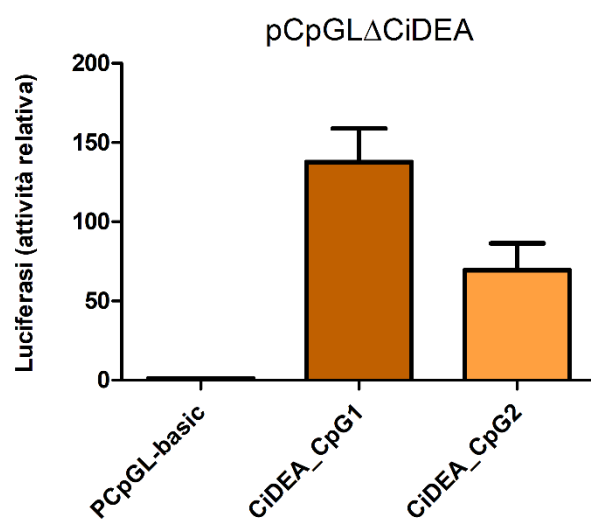


Figura 30. Risultati delle tre prove di trasfezione nella linea CF2Th con il plasmide pCpGL $\Delta$ CiDEA\_CpG1 e pCpGL $\Delta$ CiDEA\_CpG2.

segnale prodotto è risultato essere 69,4 volte più elevato rispetto al segnale prodotto dal plasmide di riferimento.

Alla luce dei risultati ottenuti, è stato selezionato il clone pCpGLΔCiDEA\_CpG1 per le successive prove di metilazione e trasfezione, in quanto è stato il clone che ha permesso di ottenere un segnale da parte della luciferasi *Firefly* almeno 100 volte superiore rispetto al segnale prodotto dal pCpGL-basic.

Il plasmide pCpGLΔCiDEA\_CpG1 è stato quindi sottoposto alle reazioni di metilazione con i diversi enzimi selezionati. Il prodotto di metilazione è stato verificato attraverso digestione con enzimi di restrizione e successiva analisi in gel (dati non mostrati).

Una volta verificata la metilazione di pCpGLΔCiDEA\_CpG1, sono state eseguite tre prove di trasfezione con il costrutto metilato.

Si riportano in Figura 31 i risultati dal saggio della luciferasi in presenza del plasmide metilato. Come è possibile osservare dalla figura, la metilazione con l'enzima M.SssI, che ha metilato teoricamente tutti i siti CpG, ha determinato un abbattimento statisticamente significativo del segnale di luminescenza del 96,6% ( $P < 0,05$ ) rispetto al segnale prodotto dal plasmide non metilato (CTRL-). Al contrario, non è stata osservata una diminuzione del segnale a

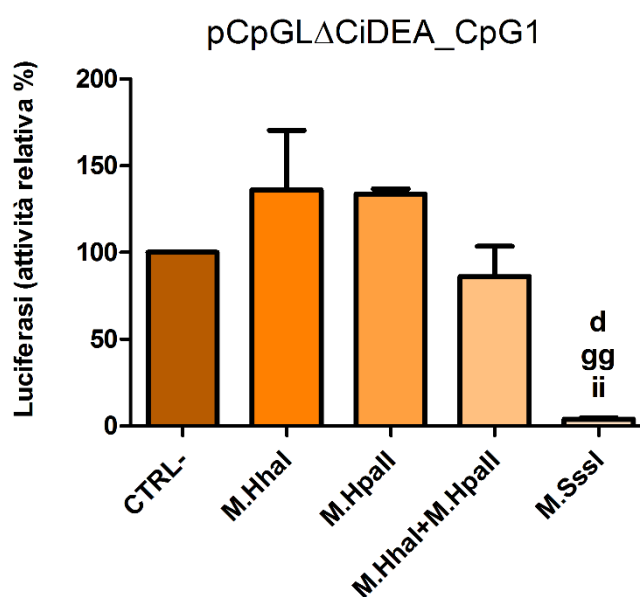


Figura 31. Risultati delle tre prove di trasfezione nella linea CF2Th con il plasmide pCpGLΔCiDEA\_CpG1 metilato con gli enzimi M.SssI, M.HhaI e M.HpaII; d:  $P < 0,05$  (CTRL- vs. M.SssI), gg:  $P < 0,01$  (M.HhaI vs. M.SssI), ii:  $P < 0,01$  (M.HpaII vs. M.SssI).

seguito della metilazione con gli enzimi M.HhaI, M.HpaII e con la loro combinazione. Questo potrebbe essere stato determinato dal fatto che i siti riconosciuti da questi ultimi non siano determinanti per il controllo dell'espressione del gene. Ciononostante, i risultati ottenuti dalla metilazione con M.SssI, hanno confermato che la metilazione esercita un certo qual ruolo nel controllo dell'espressione di questo gene *in vitro*, come è stato

dimostrato nell'uomo, in cui è noto che l'ipermetilazione a livello delle regioni CGI, presenti a livello del promotore, sia in grado di influenzare l'espressione del gene, inibendola (Li et al., 2008).

La maggior parte delle informazioni ad oggi disponibili riguardo la regione promotoriale del gene CiDEA derivano da studi condotti nell'uomo e nella specie murina, in cui tale regione è stata caratterizzata. Nell'uomo in particolare, la regione promotoriale del gene CiDEA è stata caratterizzata da Pettersson e collaboratori nel 2008 in cellule adipocitiche: gli autori hanno definito la posizione del TSS, localizzandolo a 14 bp a monte del codone di inizio della trascrizione (ATG). Confrontando le regioni promotoriali del gene nelle due specie, è stata riscontrata una sovrapposizione per quanto concerne la posizione delle CGI a livello del promotore, il che suggerisce l'importanza di tali regioni nella regolazione dell'espressione del gene (Pettersson et al., 2008). Nel cane tale sovrapposizione non è stata messa in luce, è stata però rilevata anche nel cane la presenza dell'elemento TATA box.

I medesimi studi di caratterizzazione del promotore non sono fino ad ora stati condotti nella specie canina, in cui le informazioni derivanti dalla letteratura sono spesso limitate. La sequenza CiDEA\_CpG1 clonata è stata dunque oggetto di analisi predittive *in silico*, con il fine di predire la presenza di sequenze *consensus* riconosciute da fattori di trascrizione. Nell'analisi ci si è concentrati sui siti CpG riconosciuti dall'enzima M.SssI, escludendo quelli riconosciuti dalle metiltransferasi M.HhaI e M.HpaII, alla luce dei risultati ottenuti dalle prove di trasfezione.

Utilizzando i programmi MatInspector, TFbind e Promo3 è stato possibile predire la presenza di 3 siti riconosciuti da NF-kB e 2 siti riconosciuti da Sp1. Entrambi i fattori di trascrizione sono risultati essere espressi nella linea cellulare (paragrafo: Espressione genica dei trascritti *target* e dei fattori di trascrizione). Sp1 potrebbe rappresentare un fattore di trascrizione di interesse anche nel cane. Nell'uomo, infatti, è già stato messo in luce come la metilazione sia in grado di influenzare il legame di tale proteina con il DNA: Li et al. nel 2008 hanno dimostrato, attraverso prove *in vitro*, come la metilazione sia in grado di influenzare negativamente il legame con il fattore di trascrizione Sp1 inibendo, di conseguenza, l'espressione del gene CiDEA.

Per quanto riguarda la famiglia di fattori di trascrizione NF-kB, a livello della sequenza oggetto di studio sono stati predetti tre siti di legame per queste proteine, le quali regolano

*pathway* di segnale intracellulari e sono a loro volta regolate a monte dalle citochine *Tumor Necrosis Factor* (TNF) (Hayden et al., 2014). Tra i fattori noti per regolare la trascrizione del gene CiDEA si evidenzia proprio TNF- $\alpha$ : Pettersson e collaboratori nel 2008, studiando gli effetti di questa citochina in un sistema cellulare *in vitro*, hanno dimostrato come il trattamento con TNF- $\alpha$  sia in grado di determinare un'inibizione dell'espressione di un gene *reporter* posto sotto controllo della regione promotoriale del gene CiDEA, sia in adipociti umani che di topo.

Infine, attraverso l'analisi predittiva, sono stati evidenziati anche altri siti di riconoscimento per fattori di trascrizione, quali HNF4, ER $\alpha$ , MZF1 e PAX5. Questo ultimo, in particolare, è noto per essere l'unico gene, appartenente alla famiglia dei geni PAX, espresso nei linfociti B. Tale fattore di trascrizione non risulta però espresso nella linea cellulare CF2Th, questo potrebbe essere legato al fatto che è una linea cellulare epiteliale di timo e come tale non corrisponde a cellule linfoidi vere e proprie.

#### **4.3.3 Protocadherin 17 (PCDH17)**

La Protocaderina 17 (PCDH17) è una proteina di adesione cellulare che appartiene al gruppo proteico delle protocaderine, le quali a loro volta appartengono alla famiglia delle caderine. La famiglia delle caderine comprende le caderine cosiddette *classiche*, le caderine *desmosomiali* e le *protocaderine* (PCDH). La principale distinzione tra queste sottoclassi di caderine è legata a differenze strutturali, mentre le protocaderine si distinguono in PCDH *clustered* e *non-clustered*, in base alla distribuzione nel genoma dei geni che le codificano (Kim et al., 2011).

Le proteine PCDH *non-clustered* (tra cui PCDH17) sono principalmente espresse a livello del sistema nervoso, dove esercitano infatti un ruolo fondamentale nella morfogenesi del tessuto neuronale e nella generazione di nuove sinapsi. Esse sono codificate da geni oncosoppressori che risultano essere coinvolti nello sviluppo di alcune forme tumorali, nelle quali sono solitamente silenziati. Il *pathway* cellulare che è stato dimostrato essere coinvolto nel silenziamento di questi geni è quello dipendente dalla via di segnale Wnt/ $\beta$ -catenina: quel che si evidenzia infatti, a seguito del silenziamento del gene PCDH17, è un

accumulo di  $\beta$ -catenina, in aggiunta alla sua traslocazione al nucleo e ad un aumento della trascrizione dei geni *target* di Wnt (Mah et al., 2017).

Il gene PCDH17 fa parte dei tre geni che sono stati oggetto del presente lavoro di tesi. In particolare, per questo gene sono state identificate, clonate e successivamente testate mediante *luciferase assay* 5 regioni CGI, denominate PCDH17\_CpG1, PCDH17\_CpG2, PCDH17\_CpG3, PCDH17\_CpG4 e PCDH17\_CpG5. I risultati di luminescenza medi, normalizzati sul segnale prodotto dalla luciferasi *Renilla*, delle prove di trasfezione con le 5 CGI di PCDH17 non metilate vengono riportati in Figura 32.

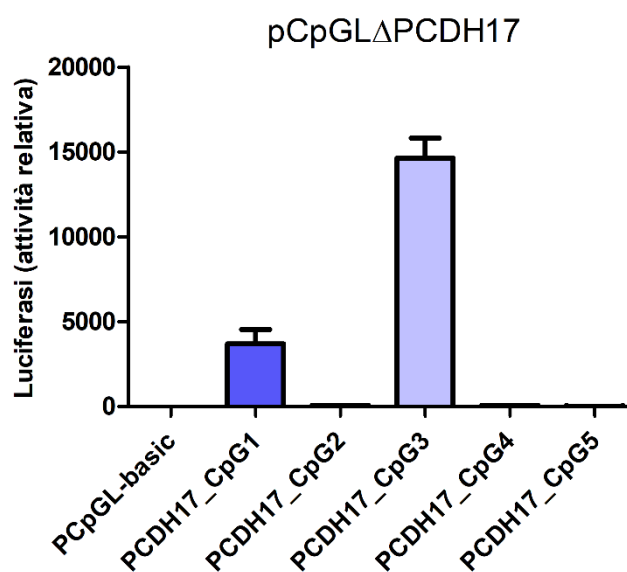


Figura 32. Risultati delle tre prove di trasfezione nella linea CF2Th con il plasmide pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG1, pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG2, pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG3, pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG4, pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG5.

Come è possibile osservare nella Figura 32, le regioni PCDH17\_CpG1 e PCDH17\_CpG3 sono state le uniche in grado di determinare un aumento del segnale della luciferasi *Firefly*, superiore a 100 volte rispetto al segnale dato dal plasmide pCpGL-basic vuoto. Nello specifico: PCDH17\_CpG1 ha determinato la produzione di un segnale 3.695 volte più elevato rispetto al segnale di controllo, mentre PCDH17\_CpG3 ha portato alla produzione di un segnale 14.622 volte più elevato rispetto al controllo. Questo potrebbe essere legato alla rilevanza di tali regioni nella regolazione dell'espressione genica, in termini di presenza di siti riconosciuti da fattori di trascrizione.



I plasmidi pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG1, pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG3 sono stati pertanto scelti per le successive prove di metilazione con gli enzimi. Anche in questo caso la reazione di metilazione è stata verificata attraverso digestione con enzimi di restrizione sensibili alla metilazione e successiva analisi elettroforetica dei prodotti digeriti (dati non mostrati). Sono state dunque eseguite le prove di trasfezione con i plasmidi metilati. I risultati di luminescenza medi delle prove, normalizzati sul dato di luminescenza della *Renilla* e rapportati al controllo CTRL-, vengono riportati in Figura 33.

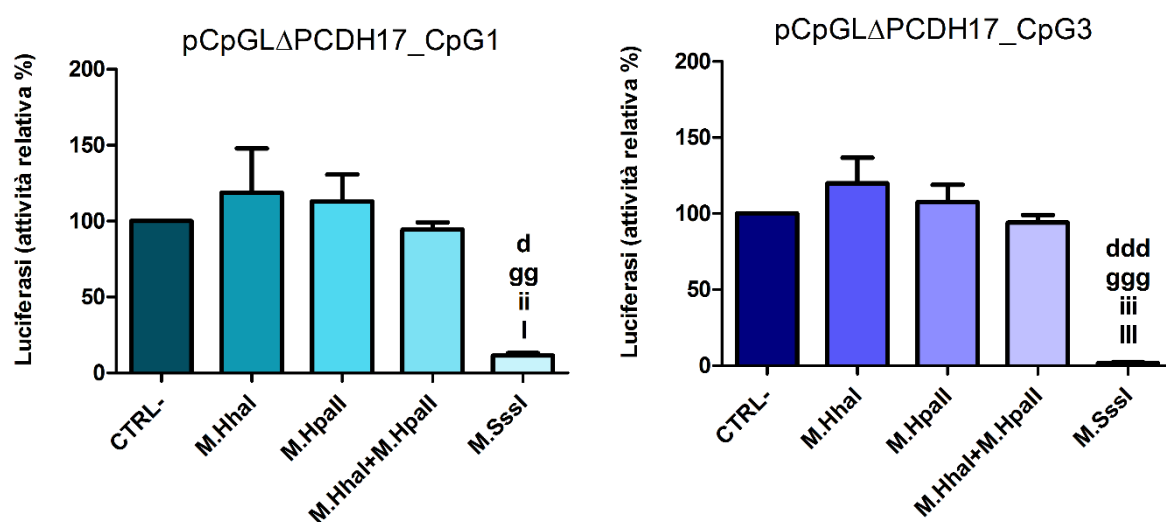


Figura 33. Risultati delle tre prove di trasfezione nella linea CF2Th con il plasmide pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG1 e pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG3 metilati con gli enzimi M.SssI, M.HhaI e M.HpaII; d:  $P < 0,05$  (CTRL- vs. M.SssI), ddd:  $P < 0,001$  (CTRL- vs. M.SssI), gg:  $P < 0,01$  (M.HhaI vs. M.SssI), ggg:  $P < 0,001$  (M.HhaI vs. M.HpaII), ii:  $P < 0,01$  (M.HpaII vs. M.SssI), iii:  $P < 0,001$  (M.HpaII vs. M.SssI), l:  $P < 0,05$  (M.HhaI+M.HpaII vs. M.SssI), III:  $P < 0,001$  (M.HhaI+M.HpaII vs. M.SssI).

È possibile osservare come per entrambi i plasmidi sia stata solamente la metilazione con l'enzima M.SssI ad essere in grado di determinare un abbattimento del segnale della luciferasi *Firefly* rispetto al controllo non metilato: la metilazione a carico della regione PCDH17\_CpG1 ha determinato un abbattimento statisticamente significativo ( $P < 0,05$ ) del segnale rispetto al controllo pari al 88,58%; la metilazione a carico della regione PCDH17\_CpG3 ha determinato invece un abbattimento del segnale pari al 98,26% ( $P < 0,001$ ).

Al contrario la metilazione con gli enzimi M.HhaI e M.HpaII non ha determinato alcun effetto significativo rispetto al controllo. Questo potrebbe essere legato al fatto che i siti riconosciuti dagli enzimi M.HhaI e M.HpaII non siano siti di particolare rilevanza per il controllo della trascrizione.

Confrontando i risultati ottenuti dalle prove di trasfezione con i costrutti pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG1 e pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG3 metilati con M.SssI (Figura 34), è possibile osservare come la metilazione a carico della regione PCDH17\_CpG3 sia stata in grado di determinare un abbattimento del segnale della luciferasi *Firefly* di entità maggiore rispetto alla regione PCDH17\_CpG1. La CGI PCDH17\_CpG3 potrebbe pertanto rappresentare una regione di particolare rilevanza per il controllo della trascrizione genica.

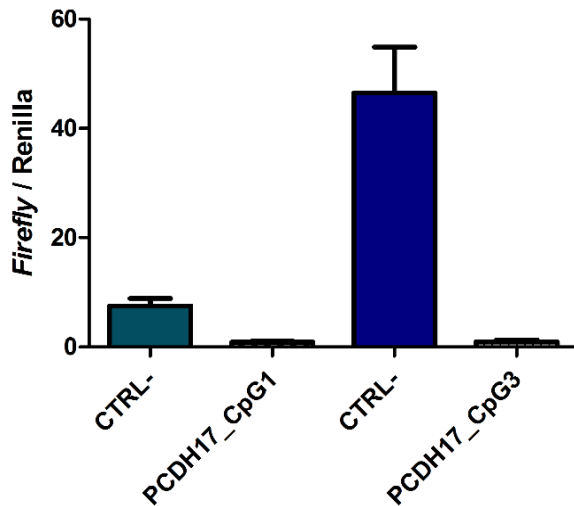


Figura 34. Risultati delle tre prove di trasfezione nella linea CF2Th con il plasmide pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG1 e pCpGL $\Delta$ PCDH17\_CpG3 metilati con l'enzima M.SssI.

La regione promotoriale del gene PCDH17 non è stata ancora caratterizzata nel cane e nemmeno nell'uomo. Inoltre, la maggior parte degli studi su questo gene sono stati condotti nella specie umana, nella quale è stato dimostrato che alla base del meccanismo di silenziamento di PCDH17 vi siano proprio modifiche di natura epigenetica, in particolare la metilazione del DNA. Yang et al. nel 2012 hanno dimostrato come l'espressione di PCDH17 sia sottoregolata in tessuti tumorali di carcinoma gastrico e che il promotore del gene risulta essere ipermetilato rispetto al corrispettivo tessuto normale, determinando in tal modo la perdita della capacità antitumorale del gene.

Nell'uomo è stato inoltre dimostrato come, in forme tumorali quali la leucemia linfoblastica pediatrica acuta, la regione promotoriale del gene PCDH17 sia metilata e la frequenza della metilazione nel tumore risulta essere pari al 30%; questo è quanto emerge da uno studio condotto su 40 pazienti affetti dalla patologia. Gli stessi autori hanno inoltre osservato come vi sia una correlazione tra lo stato di metilazione del gene PCDH17 e la prognosi del paziente, in particolare con il rischio di recidive e la mortalità (Uyen et al., 2016).

Nel cane le informazioni riguardo la correlazione che potrebbe sussistere tra l'espressione del gene e le modifiche epigenetiche a carico di esso sono ancora limitate. In questo lavoro di tesi, alla luce dei risultati ottenuti dalle prove di trasfezione, si è proceduto eseguendo

delle analisi predittive *in silico* della presenza di siti riconosciuti da fattori di trascrizione, soprattutto nelle regioni CpG metilate da M.SssI e non riconosciute dalle altre metiltransferasi. In entrambe le regioni PCDH17\_CpG1 e PCDH17\_CpG3 sono stati riscontrati essere presenti siti di riconoscimento per i fattori di trascrizione PAX5, Sp1, MZF1 e GATA, localizzati a livello di sequenze ricche in CpG, che potrebbero rappresentare dei siti di interesse per il controllo trascrizionale. Come noto in letteratura, il fattore di trascrizione GATA-1, appartenente alla famiglia dei GATA *elements*, è in grado di modulare la trascrizione genica in modo dipendente dallo stato di metilazione del DNA. Uhm e collaboratori nel 2012 hanno infatti dimostrato come la regolazione del gene CCR3 sia mediata da GATA-1 e che la metilazione a livello dei siti CpG presenti a livello promotoriale del gene è in grado di inibire il legame del fattore di trascrizione, portando però, in quel caso, all'induzione dell'espressione genica.

A livello della regione PCDH17\_CpG1 è stato identificato un sito potenzialmente riconosciuto dal fattore di trascrizione *Wilm's tumor 1* (WT1). Tale fattore trascrizionale è noto essere coinvolto nello sviluppo dell'organismo ed è noto possa fungere da oncosoppressore oltre ad essere in grado di regolare, dal punto di vista trascrizionale, l'enzima DNMT3A (Szemes et al., 2012), influenzando lo stato di metilazione di tutto il genoma.

Nella regione PCDH17\_CpG3 sono stati inoltre predetti i siti per i fattori di trascrizione NF- $\kappa$ B, *Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$*  (PPAR- $\alpha$ ), *ETS domain-containing protein Elk-1* (Elk-1) e *CRE Binding protein* (CREB), tutti localizzati a livello di sequenze ricche in CpG. In particolare, è stato dimostrato nell'uomo che il legame di CREB è influenzato negativamente dalla presenza di 5mC all'interno del sito di riconoscimento (Mancini et al., 1999), pertanto potrebbe essere considerato un sito importante per il controllo trascrizionale del gene anche nel cane.

#### **4.3.4 Considerazioni finali in merito ai risultati della metilazione**

Nel presente lavoro di tesi, è stato possibile definire la capacità di almeno una regione per ciascun gene di attivare la trascrizione genica della luciferasi *Firefly*, dimostrando in tal modo che tali regioni esercitano un certo qual ruolo nella trascrizione. È stato poi possibile, attraverso la tecnica di metilazione *in vitro*, chiarire il ruolo della metilazione delle CpG

nella trascrizione dei geni, in particolare, il risultato più importante è stato ottenuto con l'enzima M.SssI, che ha determinato, in tutte le regioni metilate, un abbattimento significativo del segnale della luciferasi rispetto al controllo non metilato. Alla luce dei risultati ottenuti dalle prove di metilazione con gli enzimi M.HhaI e M.HpaII, è possibile supporre che ad avere un ruolo nel controllo dell'espressione genica non siano solamente i singoli siti, ma anche l'interazione della metilazione tra diverse CpG. Infatti, i risultati migliori in termini di abbattimento del segnale di luminescenza sono stati ottenuti in queste condizioni: 1) con l'enzima M.SssI, in grado di metilare tutte le CpG; 2) con la regione MAL\_CpG1, la quale rappresenta una delle regioni più lunghe clonate e quella con il maggiore numero di siti riconosciuti da M.HhaI (17 siti) e da M.HpaII (13 siti). Le altre regioni contengono al contrario un numero inferiore di siti riconosciuti dagli enzimi: la regione CiDEA\_CpG1 contiene 6 siti per ciascun enzima, PCDH17\_CpG1 4 e 5 siti rispettivamente e PCDH17\_CpG3 3 siti per ciascun enzima.

Serve comunque sottolineare che nelle regioni in cui non vi è stato un abbattimento significativo della trascrizione con gli enzimi M.HhaI e M.HpaII, ciò potrebbe essere imputato al fatto che gli enzimi non riconoscano siti di *binding* per fattori di trascrizione. Avere a disposizione altri enzimi con attività metiltransferasica specifica potrebbe dirimere questi dubbi, tuttavia la loro disponibilità è alquanto limitata, infatti anche in altri studi simili al presente lavoro di tesi si utilizzano solamente questi due enzimi (Deng et al., 2004). Va comunque sottolineato il fatto, che molti altri studi riportati in letteratura ricorrono all'utilizzo di un solo enzima, quale le M.SssI (Hashimoto et al., 2013).

## 5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

---

L'epigenetica, scienza che studia le modifiche ereditabili e reversibili in termini di espressione genica, che non hanno però alla base una variazione nella sequenza genica, sta suscitando negli ultimi anni un interesse sempre maggiore. Diversi fattori, quali l'esposizione a xenobiotici e la dieta, sono noti essere in grado di determinare variazioni a carico dell'epigenoma di un individuo, tanto che le modificazioni epigenetiche si considerano dei potenziali meccanismi alla base dell'adattamento fisiologico di un organismo a stimoli esogeni ed ambientali. Nell'uomo inoltre, numerose evidenze correlano l'alterazione del metiloma con lo sviluppo di patologie, quali il cancro. Da qui l'interesse per lo sviluppo di approcci terapeutici innovativi, basati sull'utilizzo di farmaci in grado di intervenire proprio a livello epigenetico. Nell'ambito delle specie di interesse veterinario, per quanto concerne il ruolo della metilazione nella regolazione dell'espressione genica in un contesto tumorale, le informazioni sono spesso scarse e pochi studi provano a chiarire i meccanismi alla base della relazione tra la metilazione e l'espressione genica.

In questo contesto si inserisce il progetto di ricerca, di cui il presente lavoro di tesi fa parte ed il cui fine è stato quello di studiare la relazione tra la metilazione e l'espressione genica, oltre che i meccanismi che sono alla base di tale relazione, nel tumore DLBCL del cane. Il DLBCL è una forma tumorale che insorge spontaneamente nel cane e che rappresenta il sottotipo più comune di linfoma nella specie, oltre a presentare una serie di analogie dal punto di vista clinico-patologico, fisiologico e molecolare con il corrispettivo tumore nell'uomo e costituendo, in tal modo, un potenziale modello comparato per lo studio della patologia.

Dati derivanti dalla caratterizzazione del trascrittoma e del metiloma di campioni di DLBCL del cane, precedenti a questo lavoro di tesi, hanno permesso di identificare un numero molto elevato di geni, che risultavano essere ipermetilati e al contempo sottoespressi nei campioni di tumore rispetto ai campioni di controllo sani. Attraverso un passaggio di selezione, basato sulla verifica della riespressione dei geni a seguito di trattamento con ipometilanti e successiva analisi in *Real-time* PCR, è stato possibile restringere l'analisi ai tre geni oncosoppressori che sono stati poi oggetto di studio in

questa tesi: CiDEA, MAL e PCDH17. Era dunque necessario confermare anche *in vitro* i risultati ottenuti attraverso l'applicazione delle tecnologie *omiche* ed in particolare il ruolo della metilazione nel controllo dell'espressione dei tre geni. A tale scopo, nel presente lavoro di tesi, è stato messo a punto un saggio di *gene reporter assay* in una linea cellulare di timo di cane, la linea CF2Th. Questi studi hanno permesso inizialmente di identificare le regioni CGI CiDEA\_CpG1, MAL\_CpG1, PCDH17\_CpG1, PCDH17\_CpG3 come le regioni, sottoposte a metilazione, di maggiore rilevanza per la regolazione dell'espressione genica dei tre geni oggetto di studio. Successivamente, grazie a prove di metilazione *in vitro* con enzimi dotati di attività metiltransferasica e prove di trasfezione, è stato possibile mettere in luce l'effettiva correlazione che sussiste tra l'ipermetilazione delle regioni CGI e l'inibizione dell'espressione genica. Attraverso questi studi, è stata dunque ottenuta una conferma dei risultati che erano stati precedentemente acquisiti attraverso un approccio più globale, oltre a dimostrare che i tre geni oncosoppressori erano stati scelti in modo accurato e corretto. Studi predittivi condotti *in silico* hanno infine permesso di identificare dei siti, soggetti alla reazione di metilazione, potenzialmente interessanti per il legame con i fattori di trascrizione.

I risultati ottenuti da questi studi funzionali e predittivi potrebbero dunque aprire la porta a studi futuri di mutagenesi, attraverso i quali sarebbe possibile individuare quali sono effettivamente le regioni ed i fattori di trascrizione maggiormente rilevanti nella regolazione dell'espressione genica. Sarebbe successivamente interessante verificare, tramite la tecnica *Chromatin immunoprecipitation* (ChIP), in una linea cellulare di linfoma B di cane, l'effettiva interazione dei fattori di trascrizione con le sequenze individuate dagli studi di mutagenesi.

## 6. BIBLIOGRAFIA

---

Alonso M. A., Weissman S. M., cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation (1987), *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 84, 1997-2001.

Amaldi F., Benedetti P., Pesole G., et al., Regolazioni epigenetiche: metilazione del DNA e rimodellamento della cromatina (2014), In: *Biologia molecolare*, Casa Editrice Ambrosiana, seconda edizione, pag 460-490.

Antequera F., Bird A., Number of CpG islands and genes in human mouse (1993), *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 90, 11995-1199.

Anway M. D., Cupp A. S., Uzumcu M., et al., Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility (2005), *Science*, 308, 1466-1469.

Aresu L., Martini V., Rossi F., et al., Canine indolent and aggressive lymphoma: clinical spectrum with histologic correlation (2015), *Veterinary and Comparative Oncology*, 13, 348-362.

Aresu L., Canine Lymphoma, More Than a Morphological Diagnosis: what we Have Learned about Diffuse Large B-Cell Lymphoma (2016), *Frontiers in Veterinary Science*, DOI: 10.3389/fvets.2016.00077.

Argyle D. J., Pecceu E., Canine and feline lymphoma: challenges and opportunities for creating a paradigm shift (2016), *Veterinary and Comparative Oncology*, DOI: 10.1111/vco.12253.

Aricò A., Ferraresso S., Bresolin S., et al., Array-Based Comparative Genomic Hybridization Analysis Reveals Chromosomal Copy Number Aberrations Associated with Clinical Outcome in Canine Diffuse Large B-Cell Lymphoma (2014), *Plos One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0111817.

Baccarelli A., Bollati V., Epigenetics and environmental chemicals (2009), *Current Opinion in Pediatrics*, 21, 243-251.

Barnes P. J., Nuclear Factor-kB (1997), *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29, 867-870.

Bbosa G. S., Kitya D., Odda J., et al., Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis (2013), *Health*, 5, 14-34.

Bernstein E. B., Meissner A., Lander E. S., The Mammalian Epigenome (2007), *Cell*, 128, 669-681.

Bird A., DNA methylation patterns and epigenetic memory (2002), *Genes & Development*, 16, 6-21.

Bosly A., Diffuse large B-cell lymphoma: concise review (2011), *Belgian Journal of Hematology*, 2, 57-63.

Brenner C., Deplus R., Didelot C., et al., Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor (2005), *The EMBO Journal*, 24, 336-346.

Brinkman A. B., Simmer F., Ma K., et al., Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq (2010), *Methods*, 52, 232-236.

Bryan J. N., Taylor K. H., Henry C. J., et al., DNA methylation in cancer: techniques and preliminary evidence of hypermethylation in canine lymphoma (2008), *Cancer Therapy*, 6, 137-148.

Buffart T. E., Overmeer R. M., Steenbergen R. D. M., et al., MAL promoter hypermethylation as a novel prognostic marker in gastric cancer (2008), *British Journal of Cancer*, 99, 1802-1807.

Chahrour M., Jung S. Y., Shaw C., et al., MeCP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription (2008), *Science*, 320, 1224-1229.

Cobaleda C., Schebesta A., Delogu A., et al., Pax5: the guardian of B cell identity and function (2007), *Nature Immunology*, DOI: 10.1038/ni1454.

Copi-Bergman C., Gaulard P., Maouche-Chrétien L., et al., The MAL Gene Is Expressed in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma (1999), *Blood*, 94, 3567-3575.

De Strooper L. M. A., Van Zummeren M., Steenbergen R. D. M., et al., CADM1, MAL and miR124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer (2014), *Journal of Clinical Pathology*, 67, 1067-1071.

Deng G., Song G. A., Pong E., et al., Promoter Methylation Inhibits APC Gene Expression by Causing Changes in Chromatin Conformation and Interfering with the Binding of Transcription Factor CCAAT-Binding Factor (2004), *Cancer Research*, 64, 2692-2698.

Domcke S., Bardet A. F., Ginno P. A., et al., Competition between DNA methylation and transcription factors determines binding of NRF1 (2015), *Nature*, 528, 575-579.

Dukes J. D., Whitley P., Chalmers A. D., The MDCK variety pack: choosing the right strain (2011), *BMC Cell Biology*, DOI: 10.1186/1471-2121-12-43.

Egger G., Liang G., Aparicio A., et al., Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy (2004), *Nature*, 429, 457-463.

Estellar M., Epigenetics in Cancer (2008), *The New England Journal of Medicine*, 358, 1148-1159.

Farré D., Roset R., Huerta M., et al., Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN (2003), *Nucleic Acids Research*, 31, 3651-3653.

Ferraresso S., Bresolin S., Aricò A., et al., Epigenetic Silencing of TFPI-2 in Canine Diffuse Large B Cell Lymphoma (2014), *Plos One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0092707.



- Ferraresso S., Aricò A., Sanavia T., et al., DNA methylation profiling reveals common signatures of tumorigenesis and defines epigenetic prognostic subtypes of canine Diffuse Large B-cell Lymphoma (2017), *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/s41598-017-11724-w.
- Fracchiolla N. S., Annaloro C., Guidotti F., et al., 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) role in hematopoiesis and in hematologic diseases: A critical review (2016), *Toxicology*, 374, 60-68.
- Frantz A. M., Sarver A. L., Ito D., et al., Molecular Profiling Reveals Prognostically Significant Subtypes of Canine Lymphoma (2013), *Veterinary Pathology*, 50, 693-703.
- Frommer M., McDonald L. E., Millar D. S., et al., A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands (1992), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 1827-1831.
- Fujiwara-Igarashi A., Goto-Koshino Y., Mochizuki H., et al., Inhibition of p16 tumor suppressor gene expression via promoter hypermethylation in canine lymphoid tumor cells (2014), *Research in Veterinary Science*, 97, 60-63.
- Goll M. G., Bestor T. H., Eukaryotic cytosine methyltransferases (2005), *Annual Review of Biochemistry*, 74, 481-514.
- Grewal S. I. S., Moazed D., Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene Expression (2003), *Science*, 301, 798-802.
- Groth A., Rocha W., Verreault A., et al., Chromatin Challenges during DNA Replication and Repair (2007), *Cell*, 128, 721-733.
- Guerra G., Verifica del ruolo delle conformazioni g-quadruplex nell'inibizione della trascrizione del gene c-kit nel cane: messa a punto di un protocollo di gene reporter assay (2016), Tesi triennale in Biotecnologie, Università di Padova, Padova, Italia.
- Hanahan D., Weinberg R. A., The Hallmarks of Cancer (2000), *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan D., Weinberg R. A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation (2011), *Cell*, 144, 646-64.
- Hashimoto K., Otero M., Imagawa K., et al., Regulated Transcription of Human Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13) and Interleukin-1 $\beta$  (IL1B) Genes in Chondrocytes Depends on Methylation of Specific Proximal Promoter CpG Sites (2013), *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 10061-10072.
- Hayden M. S., Ghosh S., Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines (2014), *Seminars in immunology*, 26, 253-266.
- Hayes H. M., Tarone R. E., Cantor K. P., et al., Case-control study of canine malignant lymphoma: positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides (1991), *Journal of the National Cancer Institute*, 83, 1226-1231.

- Herman J. G., Graff J. R., Myöhänen S., et al., Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands (1996), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 9821-9826.
- Hernandez-Vargas H., Castelino J., Silver M. J., et al., Exposure to aflatoxin B1 in utero is associated with DNA methylation in white blood cells of infants in The Gambia (2015), *International Journal of Epidemiology*, 44, 1238-1248.
- Hesselink A. T., Heideman D. A. M., Steenbergen R., et al., Combined promoter methylation analysis of CADM1 and MAL: an objective triage tool for high-risk human papillomavirus DNA positive women (2011), *Clinical Cancer Research*, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2548.
- Hirst M., Marra M. A., Epigenetics and human disease (2009), *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 136-146.
- Jaenisch R., Bird A., Epigenetic regulation of the gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals (2003), *Nature Genetics*, 33, 245-254.
- Jiménez-Chillarón J. C., Díaz R., Martínez D., et al., The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health (2012), *Biochimie*, 94, 2242-2263.
- Jin Z., Wang L., Zhang Y., et al., MAL hypermethylation is a tissue-specific event that correlates with MAL mRNA expression in esophageal carcinoma (2013), *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep02838.
- Jones P. A., Laird P.W., Cancer epigenetics comes of age (1999), *Nature Genetics*, 21, 163-167.
- Jones P. A., Baylin S. B., The fundamental role of epigenetic events in cancer (2002), *Nature Reviews Genetics*, 3, 415-428.
- Kalmár A., Péterfia B., Hollósi P., et al., DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 in colorectal adenoma and cancer (2015), *BMC Cancer*, DOI: 10.1186/s12885-015-1687-x.
- Karpf A. R., Jones D. A., Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer (2002), *Oncogene*, 21, 5496-5503.
- Kass S. U., Pruss D., Wolffe A. P., How does DNA methylation repress transcription (1997), *Trends in Genetics*, 13, 444-449.
- Kim S. Y., Yasuda S., Tanaka H., et al., Non-clustered protocadherin (2011), *Cell Adhesion & Migration*, 5, 07-105.
- Klug M., Rehli M., Functional Analysis of Promoter CPG-Methylation using a CpG-Free Luciferase Reporter Vector (2006), *Epigenetics*, 1, 127-130.
- Kondo Y., Epigenetic Cross-Talk between DNA Methylation and Histone Modifications in Human Cancers (2009), *Yonsei Medical Journal*, 50, 455-463.
- Kouzarides T., Chromatin Modifications and Their Function (2007), *Cell*, 128, 693-705.

- Kurdyukov S., Bullock M., DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method (2016), *Biology (Basel)*, DOI: 10.3390/biology5010003.
- Lee P. S., Teaberry V. S., Bland A. E., et al., Elevated MAL expression is accompanied by promoter hypomethylation and platinum resistance in epithelial ovarian cancer (2009), *International Journal of Cancer*, 126, 1378-1389.
- Li D., Da L., Tang H., et al., CpG methylation plays a vital role in determining tissue- and cell-specific expression of the human cell-death-inducing DFF45-like effector a gene through the regulation of Sp1/Sp3 binding (2008), *Nucleic Acids Research*, 36, 330-341.
- Lind G. E., Ahlquist T., Kolberg M., et al., Hypermethylated MAL gene – a silent marker of early colon tumorigenesis (2008), *Journal of Translational Medicine*, DOI: 10.1186/1479-5876-6-13.
- Lu D., Ma Y., Zhu A., et al., An early biomarker and potential therapeutic target of RUNX 3 hypermethylation in breast cancer, a system review and meta-analysis (2017), *Oncotarget*, 8, 22166-22174.
- Maeda T., Regulation of hematopoietic development by ZBTB transcription factors (2016), *International Journal of Hematology*, 104, 310-323.
- Mah K. M., Weiner J. A., Regulation of Wnt signaling by protocadherins (2017), *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 69, 158-171.
- Mancini D. N., Singh S. M., Archer T. K., et al., Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors (1999), *Oncogene*, 18, 4108-4119.
- Marconato L., Leo C., Girelli R., et al., Association between Waste Management and Cancer in Companion Animals (2009), *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 564-569.
- Marconato L., Martini V., Aresu L., et al., Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: Prognostic significance and proposal of a cut-off value (2013), *The Veterinary Journal*, 197, 776-781.
- Marconato L., Frayssinet P., Pouquet N., et al., Randomized, placebo-controlled, double-blinded chemoimmunotherapy clinical trial in a pet dog model of diffuse large B-cell lymphoma (2014), *Clinical Cancer Research*, 20, 668-677.
- Mass M. J., Wang L., Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis (1997), *Mutation Research*, 386, 263–277.
- Mayne S., Playdon M. C., Rock C. L., Diet, nutrition, and cancer: past, present and future (2016), *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13, 504-515.
- Messeguer X., Escudero R., Farré D., et al., PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches (2002), *Bioinformatics*, 18, 333-334.

- Mohn F., Weber M., Schübeler D., et al., Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP) (2009), In: Tost J. (eds) DNA Methylation, Methods in Molecular Biology, Humana Press, vol 507, pag 55-64.
- Mori Y., Cai K., Cheng Y., et al., A Genome-Wide Search Identifies Epigenetic Silencing of Somatostatin, Tachykinin-1, and 5 Other Genes in Colon Cancer (2006), *Gastroenterology*, 131, 797-808.
- Mortier F., Daminet S., Vandenabeele S., et al., Canine lymphoma: a retrospective study (2009 – 2010) (2012), *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 81, 341–351.
- Mudaliar M. A. V., Haggart R. D., Miele G., et al., Comparative Gene Expression Profiling Identifies Common Molecular Signatures of NF- $\kappa$ B Activation in Canine and Human Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) (2013), *Plos One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0072591.
- Muhonen P., Holthofer H., Epigenetic and microRNA-mediated regulation in diabetes (2009), *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24, 1088-1096.
- Nam C. H., Rabbitts T. H., The Role of LMO2 in Development and in T Cell Leukemia After Chromosomal Translocation or Retroviral Insertion (2006), *Molecular Therapy*, 13, 15-25.
- Nan X., Campoy F. J., Bird A., MeCP2 Is a Transcriptional Repressor with Abundant Binding Sites in Genomic Chromatin (1997), *Cell*, 88, 471-481.
- Ng H. H., Zhang Y., Hendrich B., et al., MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex (1999), *Nature Genetics*, 23, 58-61.
- Ng H. H., Jeppesen P., Bird A., Active Repression of Methylated Genes by the Chromosomal Protein MBD1 (2000), *Molecular and Cellular Biology*, 20, 1394-1406.
- Nikousefat Z., Hashemnia M., Javdani M., Large B-cell lymphoma in a dog: A cyto-histopathological evaluation and Immunophenotyping according to WHO classification for canine lymphomas (2016), *Veterinary Research Forum*, 7, 79-83.
- Peterson C. L., Laniel M. A., Histoned and histone modifications (2004), *Current Biology*, 14, 546-551.
- Pettersson A. T., Laurencikiene J., Nordström E. A., et al., Characterization of the human CIDEA promoter in fat cells (2008), *International Journal of Obesity*, 32, 1380-1387.
- Pfeifer G. P., Defining driver DNA methylation changes in human cancer (2018), *International Journal of Medical Science*, DOI: 10.3390/ijms19041166.
- Puneet, Kazmi H. R., Kumari S., et al., Epigenetic Mechanisms and Events in Gastric Cancer-Emerging Novel Biomarkers (2018), *Pathology & Oncology Research*, DOI: 10.1007/s12253-018-0410-z.

- Quandt K., French K., Karas H., et al., MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data (1995), *Nucleic Acids Research*, 23, 4878-4884.
- Richards K. L., Motsinger-Reif A. A., Chen H., et al., Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and post-germinal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL (2013), *Cancer Research*, 73, 5029-5039.
- Rollins R. A., Haghghi F., Edwards J. R., et al., Large-scale structure of genomic methylation patterns (2006), *Genome Research*, 16, 157-163.
- Rountree M. R., Bachman K. E., Baylin S. B., DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci (2000), *Nature Genetics*, 25, 269-277.
- Sato M., Mochizuki H., Goto-Koshino Y., et al., Prognostic significance of hypermethylation of death associated protein kinase (DAPK) gene CpG island in dogs with high-grade B-cell lymphoma (2013), *Veterinary and Comparative Oncology*, 16, 409-415.
- Seeling D. M., Avery A. C., Ehrhart E. J., et al., The Comparative Diagnostic Features of Canine and Human Lymphoma (2016), *Veterinary sciences*, DOI: 10.3390/vetsci3020011.
- Sharma S., Kelly T. K., Jones P. A., Epigenetics in cancer (2010), *Carcinogenesis*, 31, 27-36.
- Shaknovich R., Geng H., Johnson N. A., et al., DNA methylation signatures define molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma (2010), *Blood*, DOI: 10.1182/blood-2010-05-285320.
- Slavotinek A. M., Stone E. M., Mykytyn K., et al., Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer (2000), *Nature Genetics*, 26, 16-17.
- Snykers S., Henkens T., De Rop E., et al., Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming (2009), *Journal of Hepatology*, 51, 187-211.
- Suske G., The Sp-family of transcription factors (1999), *Gene*, 238, 291-300.
- Suzuki M., Shiraishi K., Eguchi A., et al., Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer (2013), *Oncology Reports*, 29, 1308-1314.
- Szemes M., Dallosso A. R., Meleg Z., et al., Control of epigenetic states by WT1 via regulation of de novo DNA methyltransferase 3A (2013), *Human Molecular Genetics*, 22, 74-83.
- Thomas R., Smith K. C., Ostrander E. A., et al., Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes (2003), *British Journal Cancer*, 89, 1530-1537.

- Truong P. K., Lao T. D., Doan T. P. T., et al., BRCA1 Promoter Hypermethylation Signature for Early Detection of Breast Cancer in the Vietnamese Population (2014), *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15, 9607-9610.
- Tsunoda T., Takagi T., Estimating Transcription Factor Bindability on DNA (1999), *Bioinformatics*, 15, 622-630.
- Uhm T. G., Lee S. K., Kim B. S., et al., CpG methylation at GATA elements in the regulatory region of CCR3 positively correlates with CCR3 transcription (2012), *Experimental and Molecular Medicine*, 44, 268-280.
- Uyen L. T. N., Sakashita K., Al-Kzayer L. F. Y., et al., Aberrant methylation of protocadherin 17 and its prognostic value in pediatric acute lymphoblastic leukemia (2017), *Pediatric Blood & Cancer*, DOI: 10.1002/pbc.26259.
- Viswakarma N., Yu S., Naik S., et al., Transcriptional Regulation of Cidea, Mitochondrial Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor -Like Effector A, in Mouse Liver by Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  (2007), *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 18613-18624.
- Waddington C. H., Canalization of development and the inheritance of acquired characters (1942), *Nature*, 150, 563-565.
- Westman B. J., Mackay J. P., Gell D., Ikaros: a key regulator of haematopoiesis (2002), *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 1304-1307.
- Yamazaki J., Jelinek J., Hisamoto S., et al., Dynamic changes in DNA methylation patterns in canine lymphoma cell lines demonstrated by genome-wide quantitative DNA methylation analysis (2018), *The Veterinary Journal*, 231, 48-54
- Yang Y., Liu J., Li X., et al., PCDH17 gene promoter demethylation and cell cycle arrest by genistein in gastric cancer (2012), *Histology and Histopathology*, 27, 217-224.
- Zacchetti D., Peränen J., Murata M., et al., VIP17/MAL, a proteolipid in apical transport vesicles (1995), *FEBS Letters*, 377, 465-469.

## 7. SITOGRAFIA

---

<https://www.studyblue.com/notes/hh/histonemodification/3012471820991862>

<https://www.emaze.com/@AORRRWRCW>

<https://www.activemotif.com/catalog/1182/ffpe-bisulfite-conversion-kit>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<http://tmcalculator.neb.com/>

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>





## 8. MATERIALE SUPPLEMENTARE

---

Vengono di seguito riportate le sequenze parziali degli otto cloni, in particolare: le CGI complete inserite all'interno del plasmide pCpGL-basic (sequenza in carattere maiuscolo); e parte della sequenza del plasmide (sequenza in carattere minuscolo). Sono inoltre evidenziati in grigio i siti riconosciuti dagli enzimi di restrizione; in grassetto e sottolineato sono evidenziate le basi che sono state mutate attraverso la reazione di *Nested-PCR*.

>pCpGLΔCiDEA\_CpG1

```
ttaattaaaattatctctaaggcatgtgaactggctgtcttggttttcatctgtacttcatctgctacctct
gtgacctgaaacataatttataattccattaagctgtgcatatgatagatttatcatatgtattttccttaa
ggatttttgtaagaactaattgaattgataacctgtaaagtctttatcacactaccaataaataataaatct
ctttgttcagctctctgtttctataaatatgtaccagttttattgtttttagtggtagtgattttattctct
ttctatatataacacacacatgtgtgcatcataaatatatacaatttttatgaataaaaaattattagca
atcaatattgaaaaccactgatttttgttatgtgagcaaacagcagattaaaaggaattcctgcaggacta
gTCAACCCCGTCTCGGGGAAGCGCGAGGCCAAACCTGGGGCTCCCAGTGACCATGGGGGGCGGGGGACCCGCGGA
GCTGCTGGGGGGCCGAGAGTCGCGGGGCACCATCCTCTGCAGCGGCTGGTCTGCGAGGGCCGCTCCCCAGGG
GCCCGGGGCTGCCGAGTTCCCCGCTGGGTGCTGGGCGCTGGGCGCTGGGCGCTGGGCGGGCCGGCGGGGGCGG
GGCTGGCGGGCGGGGCTTTAAGAGCGCGCGGGCGAGCCGGGCGAGCCCGCGAGGGGGACCCAGCGATGGAGA
CCGCCCCGGGACTACGCCGGAGCCCTCTTCAGGTGAGTGCAGCGCTGGCCCGGCTCGCGGCCAAGCTtagtcc
atggaggatgccaagaatattaagaaaggccctgccccattctaccctctggaagatggcactgctggtgag
caactgcacaaggccatgaagaggtatgccctggcctggcaccattgccttactgatgctcacattgag
gtggacatcacctatgctgaatactttgagatgtctgtgaggctggcagaagccatgaaaagataggactg
aacaccaaccacaggattgtggtgtgctctgagaactctctccagttcttcatgcctgtgttaggagccctg
ttcattggagtggctgtggccctgccaatgacatctacaatgagagagagctcctgaacagcatgggcatc
agccagccaactgtggtctttgtgagcaagaaggcctgcaaaagatcctgaatgtgcagaagaagctgcc
atcatccagaagatcat
```

>pCpGLΔCiDEA\_CpG2

```
ttaattaaaattatctctaaggcatgtgaactggctgtcttggttttcatctgtacttcatctgctacctct
gtgacctgaaacataatttataattccattaagctgtgcatatgatagatttatcatatgtattttccttaa
ggatttttgtaagaactaattgaattgataacctgtaaagtctttatcacactaccaataaataataaatct
ctttgttcagctctctgtttctataaatatgtaccagttttattgtttttagtggtagtgattttattctct
ttctatatataacacacacatgtgtgcatcataaatatatacaatttttatgaataaaaaattattagca
atcaatattgaaaaccactgatttttgttatgtgagcaaacagcagattaaaaggaattcctgcaGCGGC
ATCCCCGAGCGTCTGCGCCCCGCGTCCCTGTGCCTGGCACCTCCGTGAGCCCCCTCGTCTCCCTCCATCCG
GGGTCCGCCCGCACCCCTTGCGCACCCCGACCCGCGGCTCCCCGAGGCCCGGTCCCAGCCCACGCAGCCCC
GGTTACCTCTGGTGGCCACGCCTTGCGCAGCGGGGCCAGCCAGCCGCGAGCCCGCGGGCCCTTCCCTCC
CCCCTGCGCCGAGCGCCAGGTGTGGCGCCCCCGAGGGCGCACGGGCATCCACGGAGCAGGTGGCAGTGGTGA
GAGCGGGAGTGGCTGAATTTCTCGCTGCTGCTCCTGCGGCAGCAGGTGCAGATGAGGGCCTCGTGTGGGAA
AGGCGGGCGGCGCCTCCACGGGGCGCGGGCCAGGGCTTCCAGGGTCTCGGGATCGACGGGAGCTGGGGCGC
CGGGGGACACTCCGCGGCTTTGGCAGAGTCCAGGCTTACCCCTAAAGATGAGGGAGGCCTCTGGGCTCCACC
GGGAGGGCGGACTGAGCCAAAAGCACCCCTTGGGCTCTGAACGCGCCCGACCCCTGCTTGATGAGCCCACCG
AGGCTTCCCAGGGGTGTTTTGGGGGAAAAGGCTCCCCGTCTCACCGCATTCGAGAACGAGAACGCCACCC
TGGGCCCCGAGAGGCCTGTGGAGTCTCCTCCTTCCCTGGGCTTTGCCACCCCTGGGGGCTGAAGTACCCG
AGCACTTCTGCCACCCCAACCCAGCTTCCACTCATCTTCTATCCTGACATACCCAGGCCTGTCTTTGTTG
ATAAATATCCcatggaggatgccaagaatattaagaaaggccctgccccattctaccctctggaagatggc
actgctggtgagcaactgcacaaggccatgaagaggtatgccctggcctggcaccattgccttactgat
gctcacattgagggtggacatcacctatgctgaatactttgagatgtctgtgaggctggcagaagccatgaa
agatattggactgaacaccaaccacaggattgtggtgtgctctgagaactctctccagttcttcatgcctgtg
ttaggagccctgttcattggagtggctgtggccctgccaatgacatctacaatgagagagagctcctgaac
```

agcatgggcatcagccagccaactgtggtctttgtgagcaagaaggcctgcaaaaagatcctgaatgtgcag  
aagaagctgcccacatccagaagatcat

>pCpGLΔMAL\_CpG1

ttaattaaaattatctctaaggcatgtgaactggctgtcttggttttcatctgtacttcatctgtactctct  
gtgacctgaaacatatttataattccattaagctgtgcatatgatagatttatcatatgtattttctttaa  
ggatTTTTGTAAGAactaattgaattgatacctgtaaagtctttatcacactacccaataaataataaatct  
ctttgttcagctctctgtttctataaatatgtaccagttttattgttttttagtggtagtgtattttattctct  
ttctatatatatacacacacatgtgtgcattcataaatatatacaatTTTTatgaataaaaaattattagca  
atcaatattgaaaaccactgatttttgtttatgtgagcaaacagcagattaaaaggaattcctgcaggacta  
gtggATCCAGGCAATGGGAGGGTAAGAGAAGGGGCCATCTACCCACAGAGGTCCCGGATACCCCTCTGA  
GAGAAGGAGATAAATCTGCTCTATAAATGTCCCTTTTCGGTCCCTGGAATTCGAGGCCGACTTGCCCCGACAG  
CAGCAGCAGCAGCCCTCCTGGCGGGGTCCGCGGGGGGGGAGCCCTTCCCGCCCCACAGATGTGCATGG  
GGGAGAGGGCCCGCTGGGCCTGAAGGCGCGGGGAGCAGGGGCGCGTGGCCAGAGCTGCCTCGGAGCCGCC  
CCAGCCCCCGCCTGCAGCCGAGGGCAGACTGGGGCCTCGTCCCGCTTTGAGCCTGAACGCGGAGGTGCGAC  
GTATCAGCGCCCCGAGAGAAAGATGAGGAGACCCAACTTAAGAGCAGCTGAGGCAATGGTAACCCGCGGGG  
TGTCACGATGGGGACTCCGGGGGGCCTGGGTAGTGATGTTATCATTCTTAAGGACGGCGATCCCGTGCCA  
GGCGTGCGAAGCGCCTCGCCGGAGGGGCTCGGCCTGCTCGGGTGGGAGGTGGCGGGGAGGTGCGCGCAGG  
AGCCGGGGCCCGCCGAGCGCCACCACCCGAGCGCCTTCGGGAGGGTCCGGGCGGCGGCATCTCGGCCTT  
GGGCGGGGACGGGGCGGGGACCGGGCTCCTCCCTCCTCGGCCCGGGCTCCCTCCTTAACCCGC  
GCGCTGGGGCGCCGGGGCCACTGGGCTCCGCCGAGCAAGCGAGCGGTGAGCGGAAGCCGAGCCGCGCTCC  
AGCCCGCCGGCATGGCCCCAGCAGCGGCGTCCGGGGGAGCAGCCTGCCAGCGGCTTCTCCGTCTTCACGA  
CCTTCCCGGACCTGCTCTTCATCTTCAGTTTTGTGAGTGGCTGGCGGGCCGTGCCAGGGAAGGGGCGGGA  
TGGGTGGTGGCGCCGAGCCGAGGCTGCACGGGTCTCCGAGCGTCCGGGTAGCTGGGCCACAGCGGGGT  
GTCCCTCCTCCCGTCCACGCCCCGTCGTTCCGGCCCCCTTAGACAAGGGCAATGGGTGGACAGTCCCGGG  
ACCCAGGTGGGAAGTCCAAATTCGCAACATGGGTGCAATGTTGGAAGCAGGCCTGGGTCCACCTGCCGTGCG  
CTGGTTTCAGAGCCCCCTCCAACTCGCTTCGCTGGAGTCGCGCAGAGTATGCCCTTCCGAGAGGGCcatg  
gaggatgccaagaatattaagaaaggccctgccccattctaccctctggaagatggcactgctggtgagca  
ctgcacaaggccatgaagaggtatgccctggtccctggcaccattgccttactgatgctcacattgagggtg  
gacatcacctatgctgaatactttgagatgtctgtgaggctggcagaagccatgaaaagatatggactgaac  
accaaccacaggattgtggtgtgctctgagaactctctccagttcttcatgcctgtgttaggagccctgttc  
attggagtggctgtggcccctgccaatgacatctacaatgagagagagctcctgaacagcatgggcatcagc  
cagccaactgtggtctttgtgagcaagaaggcctgcaaaaagatcctgaatgtgcagaagaagctgcccac  
atccagaagatcat

>pCpGLΔPCDH17\_CpG1

ttaattaaaattatctctaaggcatgtgaactggctgtcttggttttcatctgtacttcatctgtactctct  
gtgacctgaaacatatttataattccattaagctgtgcatatgatagatttatcatatgtattttctttaa  
ggatTTTTGTAAGAactaattgaattgatacctgtaaagtctttatcacactacccaataaataataaatct  
ctttgttcagctctctgtttctataaatatgtaccagttttattgttttttagtggtagtgtattttattctct  
ttctatatatatacacacacacatgtgtgcattcataaatatatacaatTTTTatgaataaaaaattattagca  
atcaatattgaaaaccactgatttttgtttatgtgagcaaacagcagattaaaaggaattctgcaGACTCT  
GGAGAGCCGGCGGAGGCCCTGGGCGCCGCTGCCGAGGCGGAGCGGGGCCCCGGGAGCCAGCCGGTCT  
TCCCATCTAACTGATCTAATCAATGACTCCGAGGAGCTGGGGCTCCTGGCTCCGCCCCGCCAGTGTCTCCT  
CCGCCTCCTATTGGGCGTGGGCCGAGGGGGCGGGCCTCGTTCCTCGCGGATTGGCTGGCAGGGAATCAG  
TATCAATGTTTAAGCGGCGGCTGAGGTGCATAGAGTCACTGAGCCAGAGGCGTGGGGAGAGAGCGGGGAC  
CGCGAGCCCGGCGGATGCGGCAGCGGCGGAGGGCGGCTGGGGAGACCGGCTCCAACCTGTTGAATTTTACC  
TTTTCGTTTCTCCGGTGTCTTGTCTGCGGAGATGGATTTATTTGCCTTGAAATCCGCACGTCTTTTGCAGG  
Ccatggaggatgccaagaatattaagaaaggccctgccccattctaccctctggaagatggcactgctggtg  
agcaactgcacaaggccatgaagaggtatgccctggtccctggcaccattgccttactgatgctcacattg  
agggtgacatcacctatgctgaatactttgagatgtctgtgaggctggcagaagccatgaaaagatatggac  
tgaacaccaaccacaggattgtggtgtgctctgagaactctctccagttcttcatgcctgtgttaggagccc  
tgttcattggagtggctgtggcccctgccaatgacatctacaatgagagagagctcctgaacagcatgggca  
tcagccagccaactgtggtctttgtgagcaagaaggcctgcaaaaagatcctgaatgtgcagaagaagctgc  
ccatcatccagaagatcat

>pCpGLΔPCDH17\_CpG2

ttaattaaattatctctaagggcatgtgaactggctgtcttggttttcatctgtacttcatctgctacctct  
gtgacctgaaacatatattataattccattaagctgtgcatatgatagatttatcatatgtattttccctaaa  
ggatttttgtaagaactaattgaattgatacctgtaaagtctttatcacactaccaataaataataaatct  
ctttgttcagctctctgtttctataaatatgtaccagttttattgttttttagtggttagtgattttattctct  
ttctatatataacacacacacatgtgtgcattcataaatatatacaatttttatgaataaaaaattattagca  
atcaatattgaaaaccactgatttttgttatgtgagcaaacagcagattaaaaggaattcctgcaggacta  
GTTAGGAAGAAGCCGCAACTAATGTCTGTGGAGGAAGGACCATGAGGCCAGAGTGAATCCGATTCGTTCCAC  
CGCTTCTGACTCATCGGGCGGATCGGAACACCTGCATTTCTGGATGTGTCATTCCCCTATGTCGAGGTGCCT  
CGAGAACCCGAAATGATGTGCGGCCAGACCTGTGCCTGACAGCCCCCTCGGAGGGAGCTCTCGGGGGTTGGGT  
CCCCCCCCCGCTGGACCGCGGCCGCGCAGCTCCTCACCCCCCTGCCCTCCTCGAGTCGCCCAGAGCCAGA  
CTGAGAGCCAGACTGCAGAAagcttagtccatggaggatgccaagaatattaagaaaggccctgccccattc  
taccctctggaagatggcactgctggtgagcaactgcacaaggccatgaagaggtatgccctggtccctggc  
accattgcccttactgatgctcacattgaggtggacatcacctatgctgaatactttgagatgtctgtgagg  
ctggcagaagccatgaaaagatatggactgaacaccaaccacaggattgtggtgtgctctgagaactctctc  
cagttcttcatgcctgtgttaggagccctgttcattggagtggctgtggcccctgccaatgacatctacaat  
gagagagagctcctgaacagcatgggcatcagccagccaactgtggtctttgtgagcaagaaggccctgcaa  
aagatcctgaatgtgcagaagaagctgcccacatccagaagatcat

>pCpGLΔPCDH17\_CpG3

ttaattaaattatctctaagggcatgtgaactggctgtcttggttttcatctgtacttcatctgctacctct  
gtgacctgaaacatatattataattccattaagctgtgcatatgatagatttatcatatgtattttccctaaa  
ggatttttgtaagaactaattgaattgatacctgtaaagtctttatcacactaccaataaataataaatct  
ctttgttcagctctctgtttctataaatatgtaccagttttattgttttttagtggttagtgattttattctct  
ttctatatataacacacacacatgtgtgcattcataaatatatacaatttttatgaataaaaaattattagca  
atcaatattgaaaaccactgatttttgttatgtgagcaaacagcagattaaaaggaattcctgcaCGGAGA  
GGAGTCATTGCTCTCTCGGGGAGAGAATGGGATGGTAGCGGCGCTACTGGCTTGGCACCGAGGAATCACAG  
CGTGTGTGTTCTCCGAACAGAGGGCGGGATAGAGCTATAGATCCCCCTCCCCCACCAGACTCACACCGCA  
AACGCTGATCTGGCGGTGGCTTTCTGACTTCGGGGGACAGCCTTTTCCGAGGAAGAGAGGGAGGAGCCTGC  
TGGAGGGAGGAAACTACAAATCGGGACACTAGTTCTTTGCGCTGCATTTCTCCCCCCTCCCTTTGGCTGCTCG  
GAAAGGAGAGAGCGAGAGCGAGAGGAGGAGGAAAAAGAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAAGAATACGCT  
TGGCTGGGAGATGCAGTCCGCCGCCCTCTGCCTCAGCCAGCAATGCGAGATTAGATCTCTAAATGCAGCA  
AAACACAGCCTGAAAACCGAACGGCCCCGGAAGCCAGCAGACGTTTCCCAGGGCTCCGGCGAAGCTTCAGAA  
TACACCCGGCTCGGTCTCCTCTCTGCCGTCTCCCCGTTGCTCCTCACCCCCAGCAATTTTCATCACGGGAGGC  
GAGACACAAGTAAGGATTGCACTTTCCCATCTGCCCGAAGACACACCTCCCCGCTCCCTCCCCACCCGATG  
TGAGGAGGACCCGGGCGCCCGCGGGAGTGGAGGTGCAGCGCCCTAGCGGGAGCcatggaggatgccaag  
aatattaagaaaggccctgccccattctaccctctggaagatggcactgctggtgagcaactgcacaaggcc  
atgaagaggtatgccctggtccctggcaccattgccttactgatgctcacattgaggtggacatcacctat  
gctgaatactttgagatgtctgtgaggctggcagaagccatgaaaagatatggactgaacaccaaccacagg  
attgtggtgtgctctgagaactctctccagttcttcatgcctgtgttaggagccctgttcattggagtggct  
gtggcccctgccaatgacatctacaatgagagagagctcctgaacagcatgggcatcagccagccaactgtg  
gtctttgtgagcaagaaggccctgcaaaagatcctgaatgtgcagaagaagctgcccacatccagaagatc  
at

>pCpGLΔPCDH17\_CpG4

ttaattaaattatctctaagggcatgtgaactggctgtcttggttttcatctgtacttcatctgctacctct  
gtgacctgaaacatatattataattccattaagctgtgcatatgatagatttatcatatgtattttccctaaa  
ggatttttgtaagaactaattgaattgatacctgtaaagtctttatcacactaccaataaataataaatct  
ctttgttcagctctctgtttctataaatatgtaccagttttattgttttttagtggttagtgattttattctct  
ttctatatataacacacacacatgtgtgcattcataaatatatacaatttttatgaataaaaaattattagca  
atcaatattgaaaaccactgatttttgttatgtgagcaaacagcagattaaaaggaattcctgcaggacta  
gtgGATCCACGGACTCGGGCTCGCGTTCGCGCGCGCTGCGCCGGGGCCCCAGGCTGGCGCGCACCCCTC  
TCGCTCGCCCCCTCCGGTGGGCTGCTCCCGCCCCACCGCTCCGGTCTGGGATGTACCTGTCCATCTGTTGC  
TGTTTTCTCCGTGTGGGCCCTGCCCTGACGCTCAAAAACCTCAACTACTCGGTGCCGGAGGAGCAAGGGGC  
CGGCGCCGTGATCGGCAACATCGGCAAGGATGCTCGACTGCAGCCGGGGCTTCCGCCCGCAGAGCGCGGGC  
CGGCGGGCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
GCACCTGCTGGACGTGGACGCCGACAGCGGGCTCCTCTACACCAAGCAGCGCATCGACCGGAGTCCCTGTG

CCGCCACAACGCCAAGTGCCAGCTGTCCCTCGAGGTGTTCCGCAACGACAAGGAGATCTGCATGATCAAGGT  
GGAGGTCCAGGACATCAACGACAACGCGCCCTCCTTCCCTCGGACCAGATCGAGATGGACATCTCGGAGAA  
CGCGGCGCCCGGCACCCGCTTCCCGCTCACGAGCGCGCACGACCCCGACGCCGGCGACAACGGGCTCCGCAC  
CTACCTGCTCACGCGGACGACCACGGGCTCTTCGCGCTGGACGTCAAGTCCCGCGGGCAGGGCACCAGTT  
CCCCGAGCTGGTCATCCAGAAGGCCCTGGACCGCGAGCAGCAGAACCACCACACGCTGGTGTGACCGCCCT  
GGACGGCGGGCAGCCGCCAGGTGGCCACTGTGCAAATCAACGTGAAGGTGATCGACTCCAACGACAACAG  
CCCCGTCTTCGAGGGCGCCCTCCTACCTGGTGGAGCTGCCCAGAAACGCCCGCTGGGCACCGTGGTCATCGA  
TCTGAACGCCACCGACGCCGACGAGGGCCCCAACGGCGAGGTGCTCTACTCCTTCAGCAGCTACGTGCCTGA  
CCGCGTGGCAGAGCTCTTCTCCATCGACCCCAAGACCGGCTGATCCGCGTCAAGGGCAACCTGGACTATGA  
GGAGAACGGGATGCTGGAGATCGACGTGCAGGCCCGGGACCTGGGGCCCAACCCCATCCCGGCCACTGCAA  
GGTACCGTCAAGTCAATCGACCGCAACGACAACGCGCCGTCCATCGGTTTCGTCTCCGTGCGCcatggagg  
atgccaagaatattaagaaaggccctgccccattctaccctctggaagatggcactgctggtgagcaactgc  
acaaggccatgaagaggtatgccctggccctggcaccattgccttcaactgatgctcacattgaggtggaca  
tcacctatgctgaatactttgagatgtctgtgaggctggcagaagccatgaaaagataggactgaacacca  
accacaggattgtggtgtgctctgagaactctctccagttcttcatgcctgtgttaggagccctgttcattg  
gagtggtgtgtggccctgccaatgacatctacaatgagagagagctcctgaacagcatgggcatcagccagc  
caactgtggtctttgtgagcaagaagggcctgcaaaagatcctgaatgtgcagaagaagctgccatcatcc  
agaagatcat

>pCpGLΔPCDH17\_CpG5

ttaattaaaattatctctaaggcatgtgaactggctgtcttggttttcatctgtacttcatctgctacctct  
gtgacctgaaacatatttataattccattaagctgtgcatatgatagatttatcatatgtattttcccttaa  
ggatTTTTGTAAGAactaattgaattgatacctgtaaagtctttatcacactacccaataaataataaatct  
ctttgttcagctctctgtttctataaataatgtaccagttttattgttttttagtggtagtgtattttattctct  
ttctatatatacacacacatgtgtgcattcataaataatacaaatTTTTatgaataaaaaattattagca  
atcaatattgaaaaccactgatttttgtttatgtgagcaaacagcagattaaaaggaatttctgcaggaCTA  
GTACAACGTGACGATCGTGGCGCGGGACGGGGCTCGCCCCGCTCAACTCCACCAAGTCGTTCCCGCTCAA  
GATCCTGGACGAGAACGACAACCCCTCGTTTACCAAGGGCTCTACGTGCTGCAGGTGCACGAAAACAA  
CATCCCCGGGGAGTACCTGGGCTCGGTGCTCGCGCAGGACCCGACCTGGGCCAGAACGGCACCGTGTCTTA  
CTCCATCCTGCCCTCGCACATCGGCGACGTGTCCATCTACACCTACGTGAGCGTGAACCCACCAACGGGGC  
CATCTACGCCCTGCGCTCCTTCAACTACGAGCAGACCAAGGCGTTTGAAGTTCAAGGTGCTCGCCAAGGACTC  
GGGGGCGCCCGCACACCTGGAGAGCAACGCGACCGTGAAGGTGACCGTGTGGACGTGAACGACAACGCGCC  
GGTGATCGTGCTGCCACGCTGCAGAACGACACGGCCGAGCTGCAGGTGCCCCGCAACGCCGGCTGGGCTA  
CCTGGTGAACCGTGCAGCGCCCTCGACAGCGACTTCGGCGAGAGCGGGCGCCTCACCTACGAGATCGTGGA  
CGGGAACGACGACCACCTGTTTGAAGATCGATCCCTCCAGCGGGCAGATCCGCACGCTGCACCCCTTCTGGGA  
GGACGTGACCCCGGTGGTGGAGCTGGTTCGTGAAGGTGACTGACCACGGGAAGCCCACGCTGTGGCCGTGGC  
CAAGCTCATCATCCGCTCGGTGAGCGGCTCCCTGCCCGAGGGGGTCCCGCGCGTGAACGGCGAGCAGACCA  
CTGGGACATGTGCTGCCGCTCATCGTGACCCTGAGCACCATCTCCATCATCCTCCTCGCGGCCATGATCAC  
CATCGCCGTCAAGTGAAGCGCGAGAACAAGGAGATTTCGCACCTACAACCTGCCGCATCGCCGAGTACAGCCA  
CCCCGAGCTGGGCGGGCAAGGGCAAGAAGAAGATCAACAAAAACGATATCATGCTGGTGCAGAGCGA  
GGTGGAGGAGAGGAACGCCATGAACGTTCATGAACGTGGTGGAGCAGCCCTCCCTGGCCACCTCCCCATGTA  
CTTCGACTACCAGACCCGCTGCCCTCAGCTCGCCCCGCTCCGAGGTGATGTACCTCAAACCGGCCCTCCAA  
CAACCTGACTGTGCCCCAGGGCCACGCGGGCTGCCACACCAGCTTCACCGGACAAGGCACCTAACGCAAGCGA  
GACCCCTGCCACTCGGATGTCCATAATTCAGGTAAGAGACTTGAagcttagtccatggaggatgccaagaat  
attaagaaaggccctgccccattctaccctctggaagatggcactgctggtgagcaactgcacaaggccatg  
aagaggtatgccctggccctggcaccattgccttcaactgatgctcacattgaggtggacatcacctatgct  
gaatactttgagatgtctgtgaggctggcagaagccatgaaaagataggactgaacaccaaccacaggatt  
gtggtgtgctctgagaactctctccagttcttcatgcctgtgttaggagccctgttcattggagtggtgtg  
gccccctgccaatgacatctacaatgagagagagctcctgaacagcatgggcatcagccagccaactgtggtc  
tttgtgagcaagaagggcctgcaaaagatcctgaatgtgcagaagaagctgccatcatccagaagatcat

