
Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Biotechnologie Cellulari e Molecolari

Ciclo XX

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: B10

TITOLO TESI

**Caratterizzazione mediante HPLC-MS
di modifiche post-trasduzionali di proteine istoniche**

Presentata da: Marina Naldi

Coordinatore Dottorato

Lanfranco Masotti

Relatore

Lanfranco Masotti

Esame finale anno 2008

Struttura della tesi.

Gli istoni sono proteine basiche che possono essere classificate in varie classi: H1, H2A, H2B, H3 e H4. Queste proteine formano l'ottamero proteico attorno al quale si avvolge il DNA per formare il nucleosoma che è l'unità fondamentale della cromatina.

A livello delle code N-terminali, gli istoni possono essere soggetti a numerose modifiche post-traduzionali quali acetilazioni, metilazioni, fosforilazioni, ADP-ribosilazioni e ubiquitinazioni. Queste modifiche portano alla formazione di diversi siti di riconoscimento per diversi complessi enzimatici coinvolti in importanti processi come la riparazione e la replicazione del DNA e l'assemblaggio della cromatina. La più importante e la più studiata di queste modifiche è l'acetilazione che avviene a livello dei residui amminici della catena laterale dell'amminoacido lisina. I livelli corretti di acetilazione delle proteine istoniche sono mantenuti dall'attività combinata di due enzimi: istone acetil transferasi (HAT) e istone deacetilasi (HDAC). Gli enzimi appartenenti a questa famiglia possono essere suddivisi in varie classi a seconda delle loro diverse caratteristiche, quali la localizzazione cellulare, la dimensione, l'omologia strutturale e il meccanismo d'azione.

Recentemente è stato osservato che livelli aberranti di HDAC sono coinvolti nella carcinogenesi; per questo motivo numerosi gruppi di ricerca sono interessati alla progettazione e alla sintesi di composti che siano in grado di inibire questa classe enzimatica. L'inibizione delle HDAC può infatti provocare arresto della crescita cellulare, apoptosi o morte cellulare. Per questo motivo la ricerca farmaceutica in campo antitumorale è mirata alla sintesi di inibitori selettivi verso le diverse classi di HDAC per sviluppare farmaci meno tossici e per cercare di comprendere con maggiore chiarezza il ruolo biologico di questi enzimi. Il potenziale antitumorale degli inibitori delle HDAC deriva infatti dalla loro capacità di interferire con diversi processi cellulari, generalmente non più controllati nelle cellule neoplastiche. Nella maggior parte dei casi l'attività antitumorale risiede nella capacità di attivare programmi di differenziamento, di inibire la progressione del ciclo cellulare e di indurre apoptosi. Inoltre sembra essere molto importante anche la capacità di attivare la risposta immunitaria e l'inibizione dell'angiogenesi.

Gli inibitori delle HDAC possono essere a loro volta classificati in base alla struttura chimica, alla loro origine (naturale o sintetica), e alla loro capacità di inibire selettivamente le HDAC appartenenti a classi diverse. Non è ancora chiaro se la selettività di queste molecole verso una

specifica classe di HDAC sia importante per ottenere un effetto antitumorale, ma sicuramente inibitori selettivi possono essere molto utili per investigare e chiarire il ruolo delle HDAC nei processi cellulari che portano all'insorgenza del tumore.

Nel primo capitolo di questa tesi quindi è riportata un'introduzione sull'importanza delle proteine istoniche non solo da un punto di vista strutturale ma anche funzionale per il destino cellulare.

Nel secondo capitolo è riportato lo stato dell'arte dell'analisi delle proteine istoniche che comprende sia i metodi tradizionali come il microsequenziamento e l'utilizzo di anticorpi, sia metodi più innovativi (RP-LC, HILIC, HPCE) ideati per poter essere accoppiati ad analisi mediante spettrometria di massa. Questa tecnica consente infatti di ottenere importanti e precise informazioni che possono aiutare sia a identificare gli istoni come proteine che a individuare i siti coinvolti nelle modifiche post-traduzionali.

Nel capitolo 3 è riportata la prima parte del lavoro sperimentale di questa tesi volto alla caratterizzazione delle proteine istoniche mediante tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa. Nella prima fase del lavoro è stato messo a punto un nuovo metodo cromatografico HPLC che ha consentito di ottenere una buona separazione, alla linea di base, delle otto classi istoniche (H1-1, H1-2, H2A-1, H2A-2, H2B, H3-1, H3-2 e H4). La separazione HPLC delle proteine istoniche ha permesso di poter eseguire analisi accurate di spettrometria di massa mediante accoppiamento con un analizzatore a trappola ionica tramite la sorgente electrospray (ESI). E' stato così possibile identificare e quantificare tutte le isoforme istoniche, che differiscono per il tipo e il numero di modifiche post-traduzionali alle quali sono soggette, previa estrazione da colture cellulari di HT29 (cancro del colon). Un'analisi così dettagliata delle isoforme non può essere ottenuta con i metodi immunologici e permette di eseguire un'indagine molto accurata delle modifiche delle proteine istoniche correlandole ai diversi stadi della progressione del ciclo e alla morte cellulare.

Il metodo messo a punto è stato convalidato mediante analisi comparative che prevedono la stessa separazione cromatografica ma accoppiata a uno spettrometro di massa avente sorgente ESI e analizzatore Q-TOF, dotato di maggiore sensibilità e risoluzione.

Successivamente, per identificare quali sono gli specifici amminoacidi coinvolti nelle diverse modifiche post-traduzionali, l'istone H4 è stato sottoposto a digestione enzimatica e successiva analisi mediante tecniche MALDI-TOF e LC-ESI-MSMS. Queste analisi hanno permesso di

identificare le specifiche lisine acetilate della coda N-terminale e la sequenza temporale di acetilazione delle lisine stesse.

Nel quarto capitolo sono invece riportati gli studi di inibizione, mirati a caratterizzare le modifiche a carico delle proteine istoniche indotte da inibitori delle HDAC, dotati di diverso profilo di potenza e selettività. Dapprima il metodo messo a punto per l'analisi delle proteine istoniche è stato applicato all'analisi di istoni estratti da cellule HT29 trattate con due noti inibitori delle HDAC, valproato e butirato, somministrati alle cellule a dosi diverse, che corrispondono alle dosi con cui sono stati testati *in vivo*, per convalidare il metodo per studi di inibizione di composti incogniti. Successivamente, lo studio è proseguito con lo scopo di evidenziare effetti legati alla diversa potenza e selettività degli inibitori. Le cellule sono state trattate con due inibitori più potenti, SAHA e MS275, alla stessa concentrazione. In entrambi i casi il metodo messo a punto ha permesso di evidenziare l'aumento dei livelli di acetilazione indotto dal trattamento con gli inibitori; ha inoltre messo in luce differenti livelli di acetilazione. Ad esempio il SAHA, potente inibitore di tutte le classi di HDAC, ha prodotto un'estesa iperacetilazione di tutte le proteine istoniche, mentre MS275 selettivo per la classe I di HDAC, ha prodotto modifiche molto più blande.

E' stato quindi deciso di applicare questo metodo per studiare la dose e la tempo-dipendenza dell'effetto di quattro diversi inibitori delle HDAC (SAHA, MS275, MC1855 e MC1568) sulle modifiche post-traduzionali di istoni estratti da cellule HT29. Questi inibitori differiscono oltre che per la struttura chimica anche per il profilo di selettività nei confronti delle HDAC appartenenti alle diverse classi. Sono stati condotti quindi studi di dose-dipendenza che hanno consentito di ottenere i valori di IC_{50} (concentrazione capace di ridurre della metà la quantità relativa dell'istone meno acetilato) caratteristici per ogni inibitore nei confronti di tutte le classi istoniche. E' stata inoltre calcolata la percentuale massima di inibizione per ogni inibitore. Infine sono stati eseguiti studi di tempo-dipendenza.

I risultati ottenuti da questi studi hanno permesso di correlare i livelli di acetilazione delle varie classi istoniche con la selettività d'azione e la struttura chimica degli inibitori somministrati alle cellule.

In particolare, SAHA e MC1855, inibitori delle HDAC di classi I e II a struttura idrossamica, hanno causato l'iperacetilazione di tutte le proteine istoniche, mentre MC1568 (inibitore selettivo per HDAC di classe II) ha prodotto l'iperacetilazione solo di H4.

Inoltre la potenza e la selettività degli inibitori nel provocare un aumento dei livelli di acetilazione a livello delle distinte classi istoniche è stata correlata al destino biologico della cellula, tramite studi di vitalità cellulare. E' stato osservato che il SAHA e MC1855, inibitori potenti e non selettivi, somministrati alla coltura HT29 a dose 50 μ M producono morte cellulare, mentre MS275 alla stessa dose produce accumulo citostatico in G1/G0. MC1568, invece, non produce effetti significativi sul ciclo cellulare.

Questo studio ha perciò dimostrato che l'analisi tramite HPLC-ESI-MS delle proteine istoniche permette di caratterizzare finemente la potenza e la selettività di nuovi composti inibitori delle HDAC, prevedendone l'effetto sul ciclo cellulare. In maggiore dettaglio è risultato che l'iperacetilazione di H4 non è in grado di provocare modifiche significative sul ciclo cellulare.

Questo metodo, insieme alle analisi MALDI-TOF e LC-ESI-MSMS che permettono di individuare l'ordine di acetilazione delle lisine della coda N-terminale, potrà fornire importanti informazioni sugli inibitori delle HDAC e potrà essere applicato per delineare la potenza, la selettività e il meccanismo di azione di nuovi potenziali inibitori di questa classe enzimatica in colture cellulari tumorali.

Indice

Capitolo 1 : Introduzione

1.1 Epigenetica

1.1.1 Metilazione del DNA.....	2
1.1.2 Acetilazione, deacetilazione e rimodellamento della cromatina.....	2
1.1.3 HDAC e carcinogenesi.....	6

1.2 Istone deacetilasi

1.2.1 Classificazione.....	9
1.2.2 Struttura e meccanismo d'azione delle HDAC.....	10

1.3 Inibitori delle HDAC

1.3.1 Classificazione.....	15
1.3.2 Effetti biologici degli HDACi.....	19
1.3.3 SAHA e MS275.....	21

1.4 Bibliografia.....

25

Capitolo 2 : Tecniche usate per l'analisi delle proteine istoniche: stato dell'arte

2.1 Metodi tradizionali

2.1.1 Cromatografia con idrossiapatite (HAP).....	28
2.1.2 Microsequenziamento e saggi immunologici.....	28

2.2 Metodi accoppiati alla spettrometria di massa

2.2.1 Cromatografia liquida a fase inversa (RP-LC) accoppiata alla spettrometria di massa.....	30
2.2.2 Cromatografia a interazioni idrofiliche accoppiata alla spettrometria di massa.....	30
2.2.3 Elettroforesi capillare accoppiata alla spettrometria di massa.....	31
2.2.4 Gel elettroforesi su poliacrilamide.....	32

2.3 Analisi delle proteine istoniche mediante spettrometria di massa

2.3.1 Digestione enzimatica delle proteine e analisi dei peptidi mediante tecniche di spettrometria di massa.....	32
2.3.2 Analisi in modalità MS/MS.....	34

2.4 Bibliografia.....

36

Capitolo 3 : Caratterizzazione delle proteine istoniche mediante cromatografia liquida accoppiata a diverse tecniche di spettrometria di massa

3.1 Parte sperimentale

3.1.1 Materiali	39
3.1.2 Colture cellulari	39
3.1.3 Isolamento dei nuclei ed estrazione degli istoni	39
3.1.4 Dosaggio delle proteine	40
3.1.5 Preparazione del campione per le analisi LC-MS delle proteine intatte	40
3.1.6 Sistema cromatografico e spettrometri di massa per l'analisi delle proteine intatte	40
3.1.7 Raccolte delle singole frazioni di istoni	41
3.1.8 SDS-PAGE	42
3.1.9 Digestione dell'istone H4	42
3.1.10 Analisi MALDI-TOF della miscela peptidica	42
3.1.11 Analisi LC/MSMS della miscela peptidica	43

3.2 Caratterizzazione delle isoforme istoniche mediante analisi delle proteine intatte

3.2.1 Risultati e discussione

3.2.1.1 Separazione cromatografica delle proteine istoniche	44
3.2.1.2 Identificazione e quantificazione delle isoforme istoniche	48

3.3 Identificazione dei siti di acetilazione sull'istone H4

3.3.1 Risultati e discussione

3.3.1.1 Separazione e raccolta delle proteine istoniche	55
3.3.1.2 Digestione dell'istone H4 ed analisi MALDI-TOF del digerito	56
3.3.1.3 Analisi LC/MSMS della miscela peptidica	61
3.3.1.4 Conclusioni	64

3.4 Bibliografia	65
-------------------------------	-----------

Capitolo 4 : Studi di inibizione

4.1 Parte sperimentale

4.1.1 Materiali	67
4.1.2 Colture cellulari e trattamento con inibitori	67
4.1.3 Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio dell' MTT	67
4.1.4 Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare	68

4.2 Valutazione dell'azione di inibitori delle HDAC

4.2.1 Risultati e discussione	69
-------------------------------------	----

4.3 Studi di dose e tempo dipendenza

4.3.1 Risultati	76
4.3.2 Discussione	122

4.4 Saggi biologici su cellule di tumore intestinale trattate con gli inibitori delle HDAC

4.4.1 Saggio dell'MTT	126
4.4.2 Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare	126

4.5 Analisi MALDI-TOF e LC-ESI-MSMS dell'istone H4 estratto da cellule trattate con SAHA

4.5.1 Risultati e discussione	129
-------------------------------------	-----

4.6 Conclusioni

132

4.7 Bibliografia

134

Appendici

Pubblicazioni

136

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Epigenetica

Sono ormai numerose le evidenze che suggeriscono che l'espressione genica non è determinata unicamente dal codice genetico ma anche da una molteplicità di fenomeni, definiti epigenetici, in grado di modificarla, senza modificare la sequenza del DNA, e di trasmettersi di generazione in generazione. Sebbene il meccanismo dell'ereditarietà delle modificazioni epigenetiche non sia ancora del tutto chiaro, la differenza più importante tra meccanismo epigenetico e meccanismo genetico risiede nel fatto che i cambiamenti epigenetici possono essere contrastati da agenti chimici [1,2]. Negli ultimi 10 anni è stato largamente dimostrato che l'attività genica è influenzata dalle proteine che interagiscono con il DNA nell'assemblaggio della cromatina, dagli enzimi capaci di modificare queste proteine e il DNA e infine dall'RNA.

I due principali meccanismi, spesso correlati tra loro, coinvolti nella regolazione epigenetica dei geni, prevedono cambiamenti nella struttura della cromatina (rimodellamento) mediante modifiche covalenti a livello delle proteine istoniche, e la metilazione del DNA [3].

1.1.1 Metilazione del DNA

Il meccanismo epigenetico più conosciuto consiste nella metilazione del DNA in posizione 5 dell'anello pirimidinico della citosina, una delle quattro basi componenti del codice genetico. Gli enzimi responsabili di questa modificazione, le DNMT (DNA cytosine methyltransferases; 1, 3a e 3b), sono stati recentemente clonati e caratterizzati; la metilazione che consegue alla loro azione è in grado di alterare la conformazione del solco maggiore del DNA al quale si legano le proteine in grado di interagire con il DNA stesso. Questi "marker" epigenetici possono essere copiati dopo la sintesi del DNA diventando quindi cambiamenti ereditabili nella struttura della cromatina [4].

1.1.2 Acetilazione, deacetilazione e rimodellamento della cromatina

Un altro meccanismo epigenetico fondamentale, coinvolto nella regolazione dell'espressione genica, è il rimodellamento della cromatina, che può essere considerata come una macromolecola dinamica composta da DNA, proteine istoniche e proteine non istoniche [5].

I distinti livelli di organizzazione della cromatina dipendono dalla struttura dinamica dei nucleosomi che rappresentano l'unità fondamentale della cromatina stessa. Il nucleosoma è costituito da un ottamero di istoni nucleari e da 147 pb di DNA avvolte attorno ad esso in una superelica sinistrorsa. L'ottamero di istoni consiste in una struttura tripartita, composta da due dimeri H3-H4

che interagiscono attraverso un gruppo di 4 eliche degli istoni H3 per formare un tetramero e da due dimeri H2A-H2B.

Gli istoni sono piccole proteine altamente basiche caratterizzate da un dominio centrale apolare, a struttura globulare, e da regioni N-terminali e C-terminali che contengono una maggiore quantità di amminoacidi basici, i più abbondanti dei quali risultano essere lisine e arginine. Le regioni basiche N-terminali degli istoni H2A, H2B, H3 e H4 sono molto flessibili, fuoriescono dal nucleosoma e sono i principali siti di interazione con il DNA; le zone non polari e le regioni C-terminali sono coinvolte sia nelle interazioni tra istoni che tra istoni e DNA [6].

Non è ancora chiaro come i nucleosomi, assieme agli istoni linker H1, siano in grado di disporsi per formare una struttura così estremamente ordinata; gli istoni H1 giocano comunque un ruolo fondamentale nella condensazione del DNA, stabilizzando la struttura finale grazie all'interazione dei loro domini C-terminali, carichi positivamente, con i filamenti di DNA linker, che connettono un nucleosoma all'altro. In questo modo la struttura dinamica dei nucleosomi definisce distinti livelli di organizzazione della cromatina e, conseguentemente, l'attività genica.

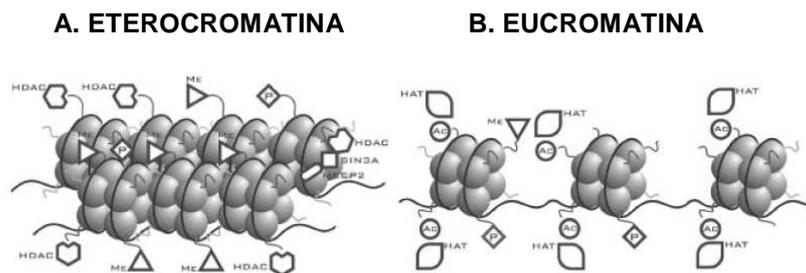


Figura 1.10. La struttura della cromatina regola l'attività trascrizionale. **A:** Fenomeni quali la metilazione del DNA e la deacetilazione degli istoni inducono un compattamento della cromatina e la repressione della trascrizione. **B:** L'acetilazione degli istoni e la demetilazione del DNA promuovono un rilassamento della cromatina e permettono l'attivazione della trascrizione.

In generale, la cromatina condensata (eterocromatina) è meno accessibile ai fattori di trascrizione (TF) e ciò comporta una repressione della trascrizione, mentre quando la cromatina è nella forma rilassata (eucromatina) i TF sono in grado di raggiungere le zone dei promotori e attivano la trascrizione (fig. 1). Occorre comunque ricordare che la struttura dei cromosomi è dinamica quindi vi sarà un continuo passaggio tra uno stato e l'altro della struttura cromatinica.

Mentre in passato si pensava che le proteine istoniche fossero di importanza prevalentemente strutturale, oggi è largamente riconosciuto che esse siano elementi integranti e dinamici dei

meccanismi coinvolti non solo nella trascrizione genica, ma anche in processi quali la replicazione, la riparazione del DNA, la ricombinazione e la segregazione dei cromosomi.

Gli istoni possono subire una serie di modificazioni post-traduzionali (PTM) che comprendono reazioni quali acetilazione, metilazione, fosforilazione, poli-ADP ribosilazione, ubiquitinazione, sumoilazione, carbonilazione e glicosilazione [7-9].

Le PTM avvengono a livello delle code terminali che fuoriescono dal nucleosoma e sono quindi accessibili alle proteasi; esse costituiscono il 25-30% della massa dei singoli istoni e rappresentano quindi un'estesa superficie di interazione con altre proteine [10-12].

In modo particolare le code dell'istone H4 si estendono fino ai cromosomi adiacenti, dove interagiscono con i dimeri formati dagli istoni H2A e H2B, e in questo modo sono in grado di regolare la struttura della cromatina. Le code degli istoni H3 e H4 sono i principali target delle PTM catalizzate da vari enzimi quali le istone acetiltransferasi (HAT), le istone deacetilasi (HDAC), le metiltransferasi (HMT) e le chinasi (HK), le cui reazioni sono in grado di regolare l'espressione genica. E' stata infatti proposta l'esistenza di un vero e proprio "codice istonico" o "codice epigenetico" definito dall'insieme delle modificazioni che sono in grado di regolare l'attività trascrizionale di specifici geni [13-15].

L'ipotesi è che i complessi multiproteici dei fattori di trascrizione siano in grado di leggere questo codice; in particolare è stato osservato che specifiche modificazioni a livello delle code ammino-terminali degli istoni possono costituire siti di riconoscimento per diverse proteine che a loro volta determinano il passaggio da eucromatina ed eterocromatina. La natura combinatoriale di queste modificazioni sembra rivelare il fatto che il codice istonico non sia altro che un'estensione del codice genetico del DNA.

Per interpretare le regole e gli effetti del codice istonico è di fondamentale importanza identificare e caratterizzare i sistemi enzimatici che promuovono le PTM o che rappresentano il loro substrato. Tra le varie PTM la più studiata e conosciuta è quella relativa all'acetilazione [16]. Lo stato di acetilazione degli istoni è controllato dall'attività di due famiglie di enzimi: le HAT e le HDAC [17], i cui substrati preferenziali sono i gruppi ϵ -amminici dei residui di lisina delle code N-terminali. Generalmente a un core istonico altamente acetilato corrisponde un'attivazione della trascrizione mentre quando gli istoni sono scarsamente acetilati si verifica una repressione trascrizionale (fig. 2). Nel nucleosoma le cariche positive degli istoni ipoacetilati interagiscono con i gruppi fosfato carichi negativamente del DNA mantenendo la cromatina in una struttura compatta e quindi

silente. L'acetilazione, neutralizza tale carica positiva sugli istoni, e, provocando un rilassamento della cromatina, rende le regioni dei promotori più accessibili ai TF, ai complessi di regolazione della trascrizione e alla RNA polimerasi.

Al contrario di ciò che è stato affermato precedentemente può accadere che l'acetilazione degli istoni sia coinvolta in una repressione trascrizionale; l'ipotesi del codice istonico può fornire una spiegazione a questa eventualità [18].

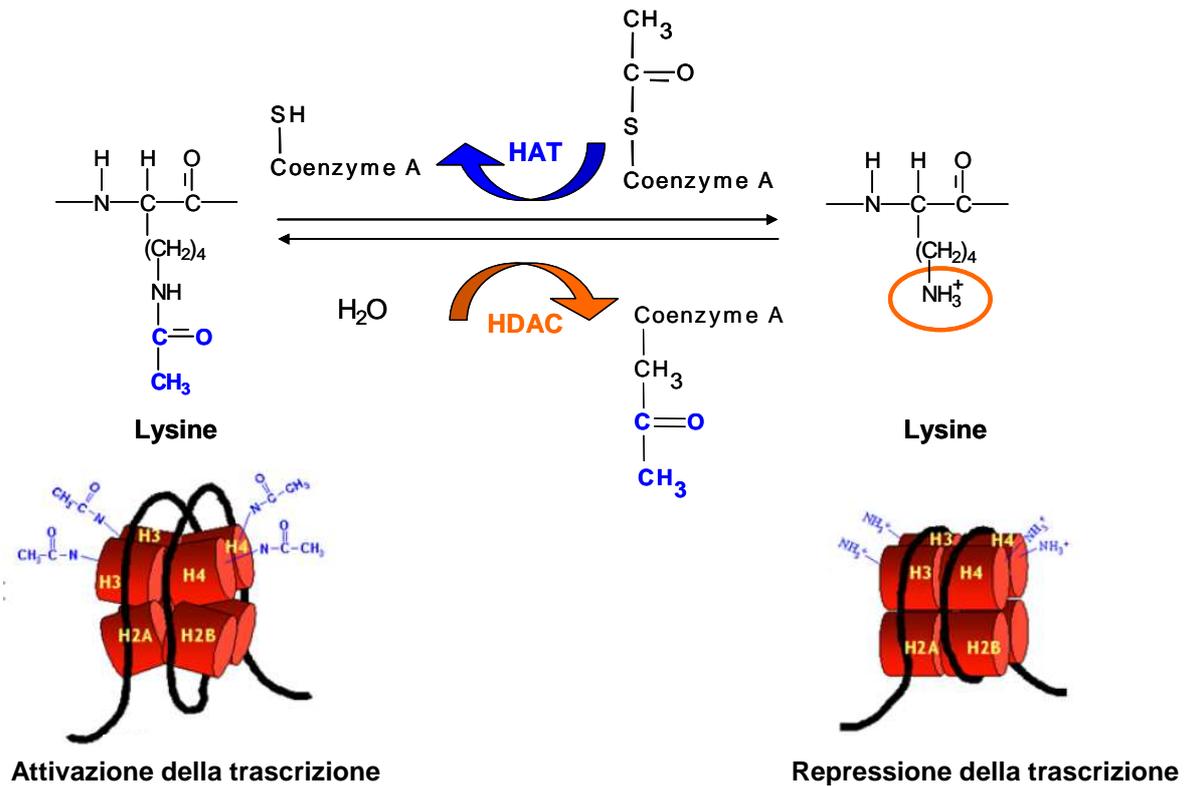


Figura 1.2. Ruolo delle HDAC e delle HAT nella regolazione dell'accessibilità del nucleosoma e nella trascrizione genica. Le code ammino-terminali degli istoni H2A, H2B, H3 e H4 contengono numerosi residui di lisine che sono potenziali substrati delle HDAC e delle HAT. Quando si trovano nello stato deacetilato le lisine cariche positivamente permettono alle code istoniche di interagire strettamente con i filamenti di DNA. L'acetilazione neutralizza la carica e le code si staccano dal DNA che diventa più accessibile per la trascrizione.

Gli enzimi con attività deacetilasica possono essere classificati in due gruppi: le istone deacetilasi, o HDAC, e le sirtuine, o Sir [19]. Entrambe queste famiglie si sono conservate durante l'evoluzione e consistono in diverse proteine con funzione cellulare non ridondante; molte di esse non sono

solo coinvolte nella regolazione della trascrizione ma anche in altri processi. Infatti l'equilibrio tra la forma acetilata e quella non acetilata di proteine non istoniche e di altre piccole molecole risulta essere critico per numerosi eventi cellulari.

1.1.3 HDAC e carcinogenesi

E' ormai riconosciuto che una trascrizione aberrante di geni coinvolti nel differenziamento cellulare, nel ciclo cellulare e nell'apoptosi, può essere dovuta a un'alterata espressione o alla mutazione di geni che codificano per le HAT, le HDAC o per le proteine che concorrono alla loro azione. Questi eventi sono elementi chiave nell'insorgere e nella progressione del tumore [20,21].

Lo sviluppo e il differenziamento della cellula sono regolati dall'attivazione di una serie di geni la cui trascrizione è controllata dalla struttura della cromatina.

Le HAT e le HDAC sono in grado di acetilare e deacetilare non solo proteine istoniche, ma anche altre proteine in grado di controllare la progressione del ciclo cellulare, il differenziamento e/o l'apoptosi [22].

L'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi sono eventi integranti nel processo di differenziamento; per questo motivo il rimodellamento della cromatina, regolato dall'azione di HAT e HDAC, che può comportare l'espressione aberrante di alcuni geni, può interferire con questi processi finemente controllati e indurre la proliferazione di cellule non differenziate e quindi l'insorgenza del tumore.

Risulta sempre più importante la connessione tra regolazione epigenetica dell'espressione genica e la modificazione post-traduzionale di proteine, e che le HAT e le HDAC giocano un ruolo fondamentale ad entrambi i livelli di regolazione della proliferazione cellulare [23-26].

Cellule trasformate, caratterizzate da un'inappropriata proliferazione, non necessariamente perdono la capacità, se sottoposte a specifici stimoli, di andare incontro ad arresto della crescita [27,28]. Attualmente, infatti, diversi inibitori delle HDAC (HDACi) con diverse caratteristiche chimiche sono risultati in grado, sia *in vitro* che *in vivo*, di indurre arresto della crescita cellulare con scarsa tossicità. Questi composti sono risultati in grado di inibire parzialmente HDAC precedentemente isolate e di bloccare la proliferazione cellulare attraverso arresto del ciclo cellulare nelle fasi G1 e/o G2, differenziamento, e/o apoptosi di cellule trasformate; essi sono risultati attivi su una vasta gamma di colture cellulari sia di tumori solidi che di neoplasie ematiche e alcuni di essi sono stati clinicamente testati [29-31]. Il potenziale antitumorale degli inibitori delle HDAC deriva dalla loro capacità di interferire con diversi processi cellulari, generalmente non più

controllati nelle cellule neoplastiche. Nella maggior parte dei casi l'attività antitumorale risiede nella capacità di attivare programmi di differenziamento, di inibire la progressione del ciclo cellulare e di indurre apoptosi. Inoltre sembra essere molto importante anche la capacità di attivare la risposta immunitaria e l'inibizione dell'angiogenesi (fig. 3).

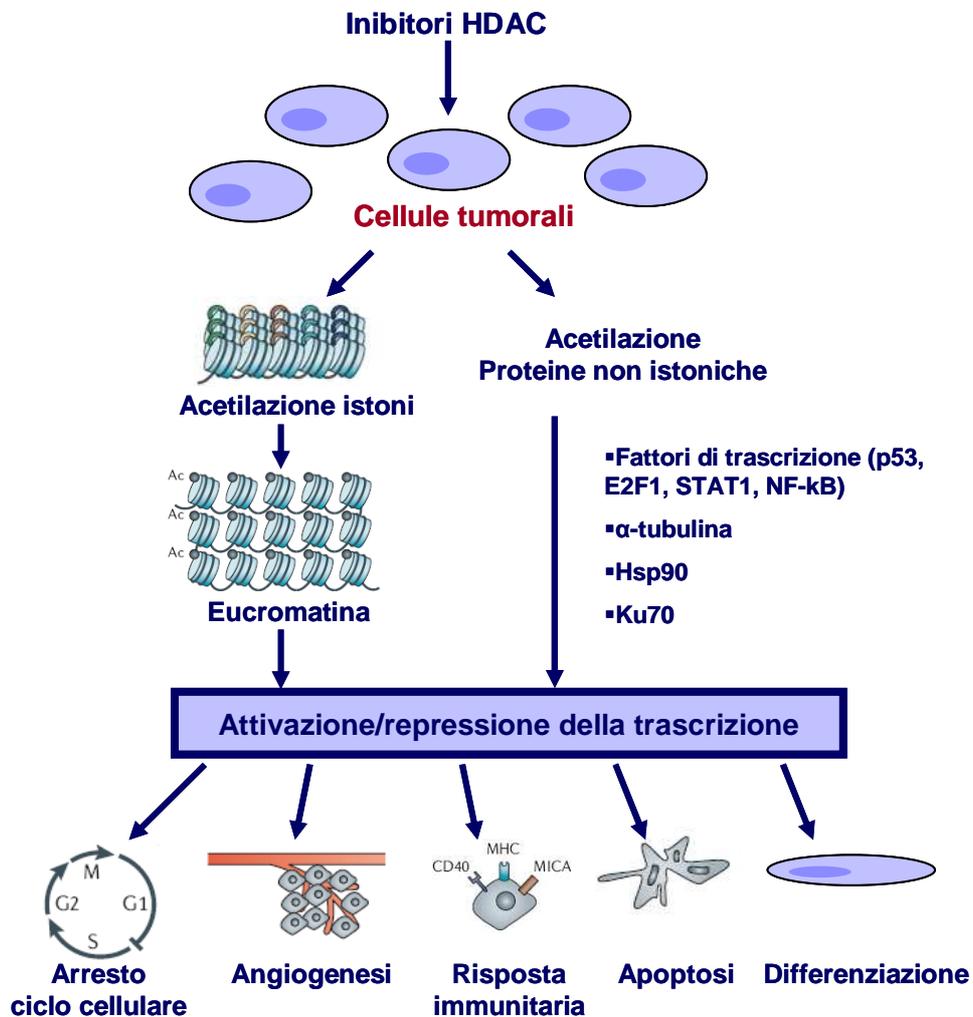


Figura 1.3. Effetti degli HDACi sulla crescita cellulare.

Il trattamento con HDACi provoca un aumento dei livelli di acetilazione degli istoni sia in cellule normali che in cellule tumorali; nonostante ciò, le cellule tumorali risultano essere più sensibili agli effetti di inibizione della crescita e agli effetti apoptotici rispetto alle cellule normali [32-35].

Nei trial clinici l'aumento dei livelli di acetilazione degli istoni, in tessuti tumorali e non, può essere utilizzato come marker dell'attività biologica. Un'altra caratteristica degli HDACi è la loro capacità di alterare selettivamente l'espressione genica in cellule trasformate [36]. Questi composti inducono un accumulo di istoni iperacetilati in gran parte della cromatina, ma solo una piccola parte dei geni espressi mostrano un cambiamento nel pattern di trascrizione. Recentemente, grazie alla tecnica del DNA microarray, è stato stabilito che solo il 10% dei geni vengono coinvolti. La base di questa selettività non è ancora stata chiarita; sembra che per questi effetti sia necessario che ci siano specifiche sequenze nelle regioni dei promotori. Inoltre, la selettività sembra essere correlata alla presenza di altre modificazioni covalenti a livello delle code istoniche che possono probabilmente influenzare l'espressione genica, confermando in questo modo l'ipotesi del codice istonico. In particolare, la metilazione degli istoni, che si verifica dopo l'acetilazione delle code istoniche, può indurre la repressione della trascrizione, e in questi casi l'impiego di HDACi potrebbe non essere sufficiente a riattivarla [37].

Tra i vari geni la cui espressione è aumentata dopo trattamento con HDACi, in numerose cellule trasformate, vi è il gene CDKN1A che codifica per l'inibitore delle chinasi ciclina dipendenti p21^{WAF1}. Questa proteina, con funzione di soppressore tumorale, lega le CDK e ne inibisce l'attività delle, provocando un'ipofosforilazione delle proteine pRb, p107 e p130, la soppressione della proliferazione cellulare e l'arresto del ciclo cellulare in fase G1.

Un altro gene la cui espressione risulta essere alterata è il TBP2 (thioredoxin-binding protein 2) la cui espressione è in genere bassa nelle cellule cancerogene [38]. Il SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid), noto inibitore delle HDAC, aumenta selettivamente l'espressione di TBP2, che a sua volta lega e inattiva la tioredoxina ridotta. Questa proteina è importante per le reazioni redox della cellula, quindi l'azione del SAHA aumenta la sensibilità della cellula agli stress ossidativi e può causare apoptosi. L'attivazione in seguito a trattamento con questi agenti di TBP2 e di altri geni, generalmente repressi in cellule tumorali, può contribuire all'arresto della crescita cellulare, al differenziamento, e/o ad apoptosi.

Il meccanismo della repressione genica non è ancora stato ben chiarito; può essere il risultato del reclutamento e/o dell'attivazione di co-repressori e/o dell'acetilazione di substrati non istonici.

1.2 Istone deacetilasi

1.2.1 Classificazione

Ad oggi nell'uomo sono stati identificati 18 enzimi con attività deacetilasica ed essi possono essere classificati in quattro classi sulla base della loro omologia alle deacetilasi di lievito, della loro localizzazione subcellulare e della loro attività enzimatica [39]. Tutti questi enzimi, fatta eccezione per le sirtuine, sono caratterizzati da un dominio catalitico altamente conservato, di circa 390 amminoacidi, e sono in grado di deacetilare i loro substrati mediante lo stesso meccanismo zinco-dipendente. La loro classificazione è riportata in tabella 1.

Le HDAC umane appartenenti alla classe I (HDAC1, 2, 3 e 8) sono state le prime ad essere identificate e sono analoghe alla deacetilasi di lievito Rpd3. Si trovano associate a proteine con funzione di co-repressore della trascrizione come Sin3a, N-CoR, e McCP2. Le HDAC della classe I sono localizzate nel nucleo nella maggior parte di cellule e tessuti, dove partecipano alla regolazione del ciclo cellulare.

Le HDAC appartenenti alla classe II (4, 5, 6, 7, 9 e 10) sono caratterizzate da un dominio simile a quello di Hda1, deacetilasi del lievito, e hanno dimensioni due o tre volte maggiori delle HDAC della prima classe (100-130 kD). Le HDAC appartenenti alla classe IIb, HDAC6 e HDAC10, sono state individuate nel citoplasma e contengono due domini con attività deacetilasica. La HDAC6 possiede come unico substrato un TDAC (α -tubulin deacetylase domain) caratteristico della proteina α -tubulina del citoscheletro [40].

Queste HDAC si possono trovare sia nel citoplasma che nel nucleo, dove sono deputate principalmente a mediare la repressione della trascrizione dei geni correlati al differenziamento, causando così una diminuzione del fenotipo differenziato. Inoltre questi enzimi sono coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare.

Come i membri della classe I, le HDAC di classe II agiscono in complessi multi-proteici, e sono sensibili all'azione di noti HDACi come il SAHA e il TSA. Nonostante ciò, le proteine di classe II sembrano interagire con una serie di proteine diverse da quelle di classe I.

Le HDAC di classe III (SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) sono omologhi della proteina Sir2 del lievito e richiedono la presenza di NAD^+ per esplicare la loro attività di regolazione genica in risposta a cambiamenti dello stato ossidoriduttivo della cellula. E' stato dimostrato che SIRT1 interagisce con e deacetila la proteina p53, causando una repressione della trascrizione.

HDAC11 è l'unico membro della quarta classe. La sequenza del sito catalitico è simile a quella degli enzimi delle prime due classi ma il resto della sequenza è sostanzialmente diversa e non permette di collocarla nelle suddette classi.

Tabella 1.I. Classificazione dell'HDAC

Classe	Enzima	Dominio Catalitico	Meccanismo d'azione	Localizzazione	Inibizione
I	HDAC1	1	Zn ²⁺ dipendente	nucleo	S
	HDAC2	1	Zn ²⁺ dipendente	nucleo	S
	HDAC3	1	Zn ²⁺ dipendente	nucleo/citoplasma	S
	HDAC8	1	Zn ²⁺ dipendente	nucleo	S
IIa	HDAC4	1	Zn ²⁺ dipendente	nucleo/citoplasma	S
	HDAC5	1	Zn ²⁺ dipendente	nucleo/citoplasma	S
	HDAC7	1	Zn ²⁺ dipendente	nucleo/citoplasma	S
	HDAC9	1	Zn ²⁺ dipendente	nucleo/citoplasma	S
IIb	HDAC6	2	Zn ²⁺ dipendente	nucleo/citoplasma	S
	HDAC10	2	Zn ²⁺ dipendente	nucleo/citoplasma	S
III	SIRT1	1	NAD ⁺ dipendente	nucleo	N
	SIRT2	1	NAD ⁺ dipendente	citoplasma	N
	SIRT3	1	NAD ⁺ dipendente	mitocondrio	?
	SIRT4	1	NAD ⁺ dipendente	?	?
	SIRT5	1	NAD ⁺ dipendente	?	?
	SIRT6	1	NAD ⁺ dipendente	?	?
	SIRT7	1	NAD ⁺ dipendente	?	?
IV	HDAC11	1	Zn ²⁺ dipendente	nucleo/citoplasma	S

1.2.2 Struttura e meccanismo d'azione delle HDAC

Nel 1999 è stata determinata la struttura ai raggi X della deacetilasi del batterio *Aquifex aeolicus*, denominata HDLP (histone deacetylase-like protein), la cui sequenza è omologa ai componenti della classi I e II delle HDAC; le analisi sono state effettuate anche in presenza degli inibitori SAHA e (R)-TSA (fig. 4) [41].

Il dominio catalitico di HDLP è strettamente correlato con quello delle prime due classi di HDAC umane (35% di identità su 375 residui amminoacidici) quindi il meccanismo d'azione è

presumibilmente conservato. HDLP si è mostrata attiva *in vitro* solo dopo incubazione con cloruro di zinco conformemente con i precedenti risultati secondo i quali le HDAC, per essere attive, necessitano di un cofattore metallico.

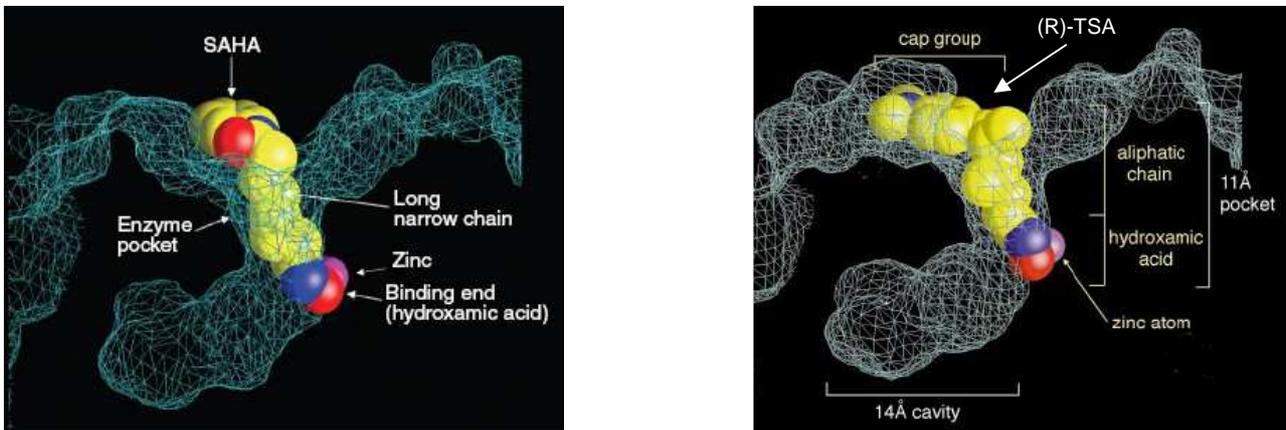


Figura 1.4. Struttura di TSA e SAHA legati a HDLP.

La struttura cristallina rivela che HDLP contiene un singolo dominio catalitico caratterizzato da strutture α e β ; la parte centrale del dominio catalitico è formato da otto foglietti β paralleli e 16 α -eliche (fig. 5). Quattro coppie di α -eliche sono posizionate su entrambe le facce di quattro dei foglietti β (α 7-13, α 8-12; α 9-11, α 10-16) formando un core α/β caratteristico di questa classe di proteine. Le restanti α -eliche sono raggruppate a lato della serie dei foglietti β (fig. 5).

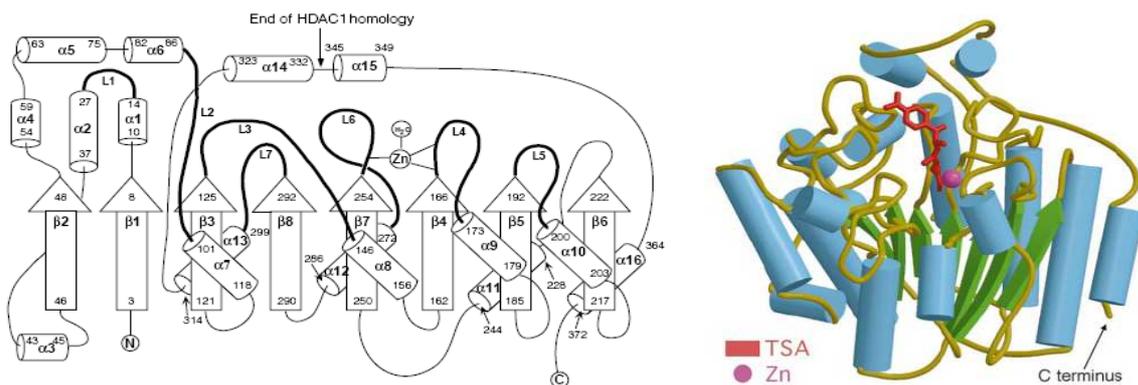


Figura 1.5. Struttura di HDLP.

Dalle estremità carbossiliche dei filamenti β originano dei lunghi e ben definiti loop (L1-L7). Questi loop assieme alle α -eliche non facenti parte del core sono associati con le strutture dello stesso core dando origine a due principali strutture tridimensionali: una lunga e stretta tasca affiancata da una cavità interna adiacente a questa (fig. 4).

La tasca ha una forma tubulare ed è profonda 11 Å; l'ampiezza della tasca diminuisce verso la metà della sua lunghezza (4,5-5,5 Å) ma aumenta verso il fondo. La tasca e le strutture adiacenti sono composte dai sette loop; le sue pareti interne sono costituite da residui idrofobici e aromatici, identici a quelli di HDAC1 (Pro22, Gly140, Phe141, Phe198, Leu256 e Tyr296). Particolarmente importanti sono i residui Phe141 e Phe198, i cui fenili interagiscono tra loro alla distanza di 7,5 Å, determinando il restringimento massimo della tasca.

Dalla struttura cristallina dell'enzima (fig. 6) si evince che lo ione zinco è posizionato sul fondo della tasca idrofobica ed è coordinato con Asp168, His170, Asp258 e una molecola d'acqua.

Oltre ai residui che coordinano lo zinco, il fondo della tasca idrofobica contiene due istidine (His131 e His132), due residui di acido aspartico (Asp166 e Asp173) e una tirosina (Tyr297); tutti questi residui sono conservati in HDAC1.

Entrambe le istidine formano un legame idrogeno con l'ossigeno appartenente a un residuo di acido aspartico che giace sul piano dell'anello imidazolico. Questa interazione His-Asp è caratteristica dei sistemi a rilascio di carica ritrovati nei siti attivi delle serine proteasi, dove servono per polarizzare l'azoto ϵ e aumentarne la basicità. La coppia a rilascio di carica Asp166-His131 è posizionata nella tasca idrofobica più in profondità ed è meno accessibile della coppia Asp173-His132 che è più esposta.

La coppia Asp166-His131 forma un legame idrogeno con la molecola d'acqua legata allo zinco, e può contribuire a una deviazione di quest'ultimo legame dalla sua geometria ideale. La tirosina 297 è posizionata di fianco allo ione zinco e dalla parte opposta ai due sistemi a rilascio di carica; il suo gruppo idrossilico giace a una distanza di 4,4 Å dall'atomo di zinco e non ha interazioni con il resto della proteina. Di fianco alla tirosina 297 c'è un'apertura nella parete della tasca enzimatica che la collega con la cavità interna adiacente.

La cavità interna è formata dai loop L3 e L7; il loop L1 demarca la cavità ed è caratterizzato da una buona flessibilità che sembra consentire gli scambi con il solvente esterno.

La cavità è delineata principalmente da residui idrofobici ed è particolarmente ricca di glicine, contiene solo due residui carichi che appartengono al loop L1 (Arg27 e His21). La funzione di

questa cavità non è chiara: è possibile tuttavia che fornisca lo spazio per la diffusione dei gruppi acetato prodotti dal centro catalitico che può essere protetto quando vi è attaccato il substrato. Questa struttura ha suggerito un meccanismo d'azione per la reazione di deacetilazione (fig. 7). Il meccanismo di catalisi consiste in un attacco nucleofilo da parte di una molecola d'acqua sul carbonile del substrato (l'acetile della lisina della coda istonica). La nucleofilicità della molecola d'acqua è aumentata dalla coordinazione con lo ione Zn^{2+} e dal sistema a trasferimento di carica His131-Asp166. Si suppone, inoltre, che lo ione zinco faciliti ulteriormente la reazione di deacetilazione riducendo l'entropia della reazione stessa, legando sia il nucleofilo, che il substrato, e polarizzando il gruppo carbonile del substrato. L'intermedio tetraedrico risulta stabilizzato da due legami di coordinazione con lo ione Zn^{2+} e da un legame a idrogeno con l'ossidrilica della Tyr297. Nell'ultimo passaggio, con la rottura del legame ammidico e la liberazione di acetato, l'atomo di azoto della lisina riceve un protone dalla coppia Asp173-His132.

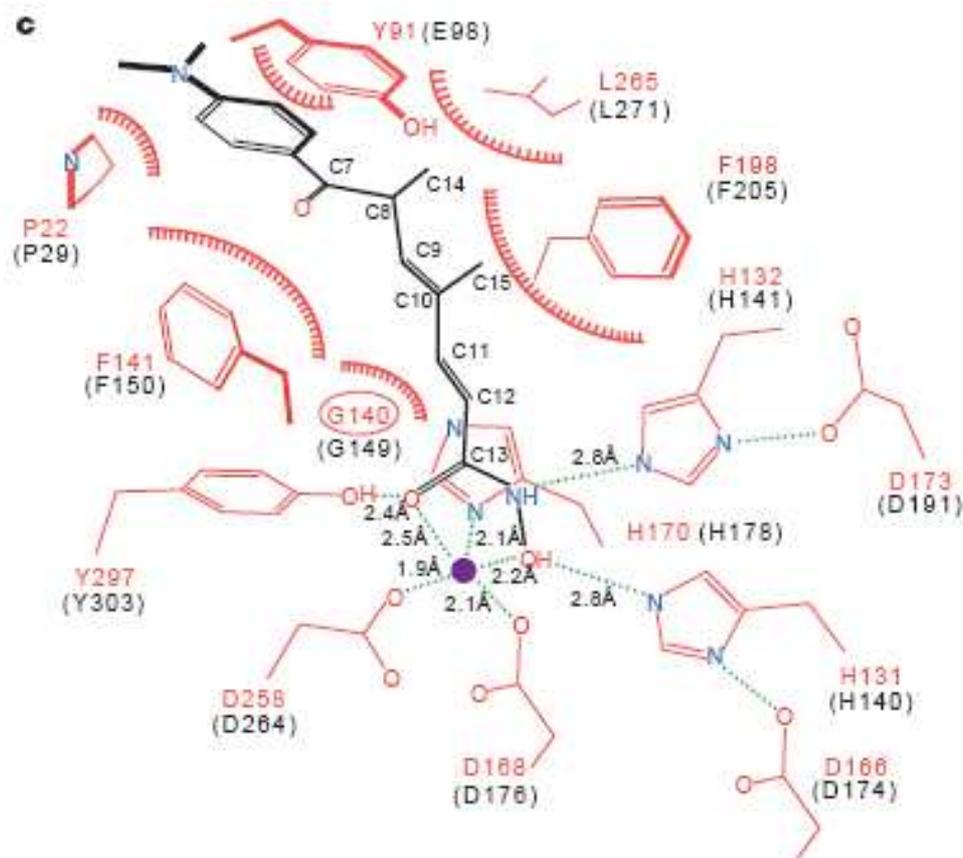


Figura 1.6. Struttura del sito catalitico di HDLP e interazioni con il substrato.

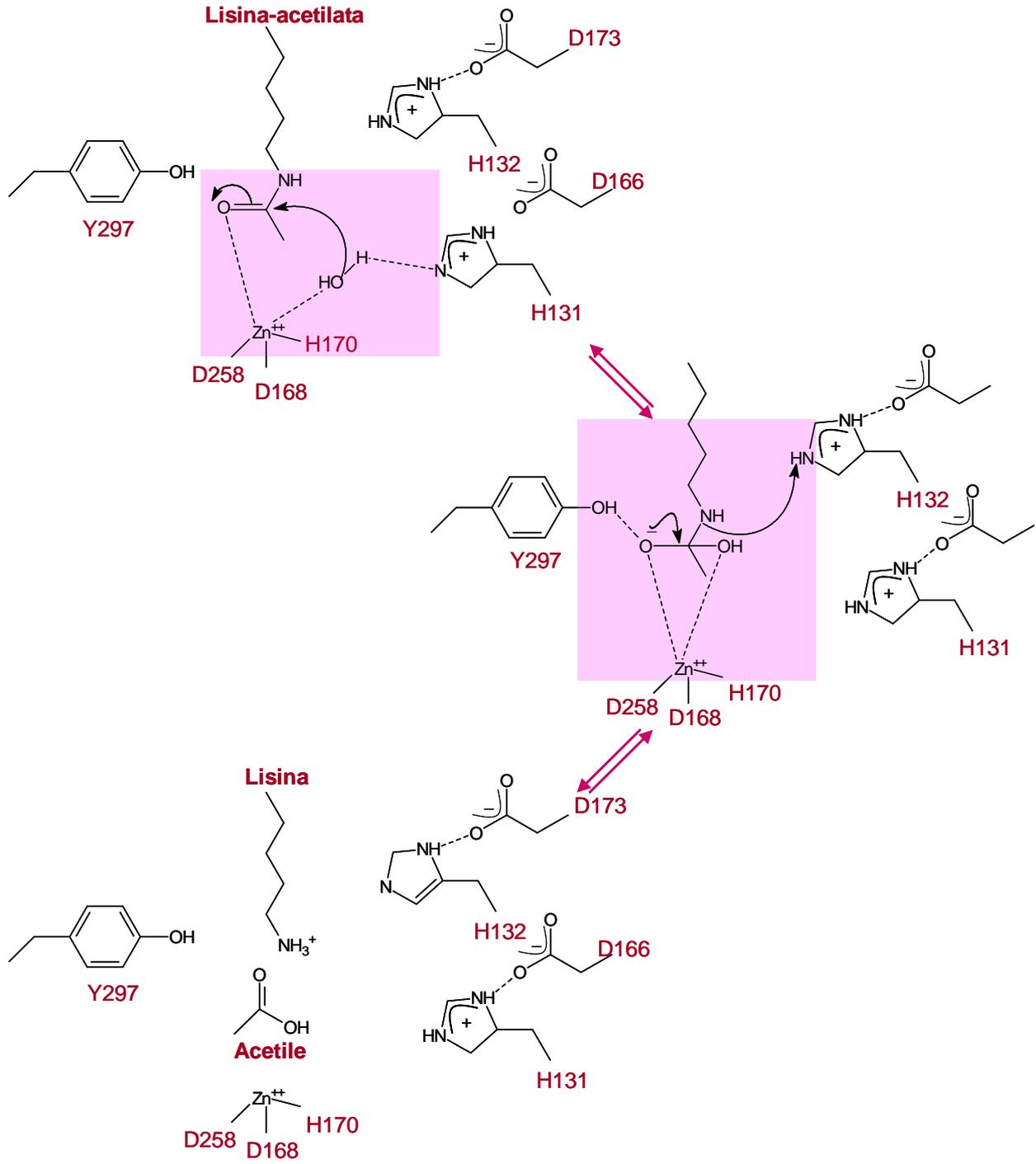


Figura 1.7. Meccanismo di deacetilazione delle lisine acetilate.

1.3 Inibitori delle HDAC

1.3.1 Classificazione

Sebbene gli inibitori delle HDAC possano essere suddivisi in classi in base alla loro struttura chimica o in base alla loro origine, naturale o sintetica, tutti possono essere ricondotti a un farmacoforo comune; la struttura base di queste molecole assomiglia a quella del TSA, molecola naturale e noto inibitore delle HDAC, che è caratterizzata da un gruppo di riconoscimento, una catena alifatica, e da un gruppo funzionale che dovrebbe chelare il catione sul fondo del sito attivo (fig. 8).

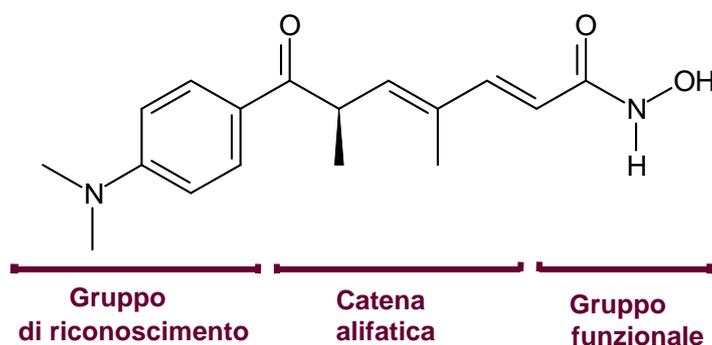


Figura 1.8. Struttura del TSA

La lunghezza ottimale, sperimentalmente determinata, per la catena alifatica varia dai cinque ai sei atomi di carbonio e l'attività inibitrice diminuisce drasticamente con catene di lunghezza maggiore o minore. Ci sono diversi possibili gruppi funzionali come l'acido idrossamico e le fenilendiammine, che presumibilmente coordinano reversibilmente lo ione zinco, così come gli epossidi che sembrano formare legami covalenti, irreversibili sotto le condizioni native, con i residui del sito attivo.

Le molecole con attività inibitrice nei confronti delle HDAC vengono comunque suddivise, in base alla struttura chimica, in carbossilati (acidi grassi a corta catena), idrossammati, epossidi, peptidi ciclici, benzammidi e composti ibridi.

Nella figura 9 sono riportate le formule di alcuni inibitori appartenenti alle diverse classi.

Acidi grassi a corta catena

Questa classe di composti è caratterizzata da una breve emivita plasmatica, aspecificità e scarsa potenza dovuta alla breve catena alifatica che limita il contatto con la tasca catalitica delle HDAC. Alcuni richiedono quindi alte concentrazioni, dell'ordine del millimolare, per esplicare la loro azione inibitrice; non sono perciò adatti all'uso clinico.

Il *butirrato di sodio* provoca un arresto del ciclo cellulare in G₂/M e la morte delle cellule per apoptosi; esso promuove l'acetilazione degli istoni e la maturazione dei granulociti nella leucemia mieloide acuta e, nell'uomo, inibisce selettivamente la crescita delle cellule del tumore della prostata e del carcinoma della cervice.

Il *valproato di sodio* inibisce le HDAC a concentrazioni millimolari; ha dimostrato di ridurre la crescita delle cellule dell'endometrio nell'uomo e, nei casi di leucemia mieloide acuta, di ridurre la proliferazione cellulare e indurre apoptosi.

Acidi idrossamici

Questa classe di inibitori è molto affine per le HDAC sia di classe I che di classe II; essi contengono la funzione dell'acido idrossamico che legandosi con alta affinità al residuo catalitico delle HDAC impedisce che il substrato acceda allo ione zinco.

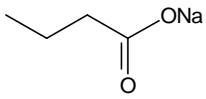
La struttura generale di queste molecole consiste in un linker idrofobico che permette al gruppo idrossamico di chelare il catione sul fondo della tasca mentre il resto della molecola blocca l'accesso alla tasca stessa.

La maggior parte delle molecole appartenenti a questo gruppo mostrano un'alta potenza, agendo a dosi micro e nanomolari in vitro, ma sono inibitori reversibili delle classi I e II di HDAC.

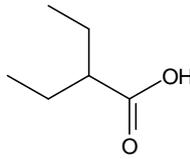
La *trichostatina* (TSA) è stato uno dei primi inibitori delle HDAC individuati ed è spesso utilizzato come riferimento. E' stato sviluppato come antifungino ma è relativamente instabile; la sua tossicità e la sua scarsa specificità hanno indotto però alla ricerca di altre molecole. Come detto precedentemente, la progettazione di molti inibitori è stata però ispirata alla sua struttura. Il TSA blocca la proliferazione e innesca l'apoptosi nelle cellule dell'epatocarcinoma, blocca il ciclo cellulare nelle cellule Hela e il differenziamento delle cellule del cancro delle ovaie. Semplici acidi idrossamici come il SAHA hanno dimostrato attività a dosi submicromolari.

Il SAHA è un composto planare e polare di seconda generazione che induce arresto della crescita cellulare, differenziamento e/o apoptosi ed è sotto sperimentazione clinica sia per il trattamento di tumori ematologici e non ematologici.

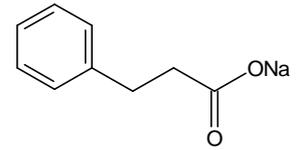
Acidi grassi a corta catena.



Sodio butirrato

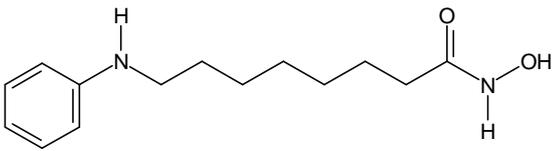


Acido valproico

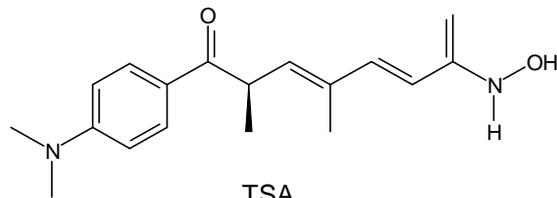


Sodio fenilbutirrato

Acidi idrossamici.

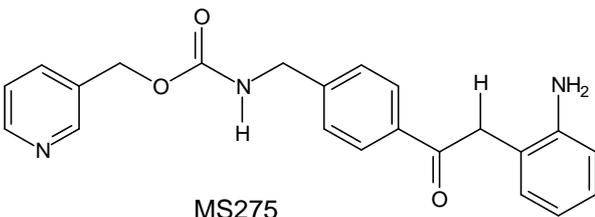


SAHA



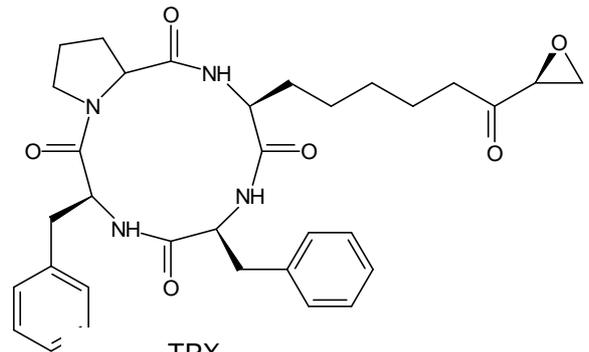
TSA

Benzammidi



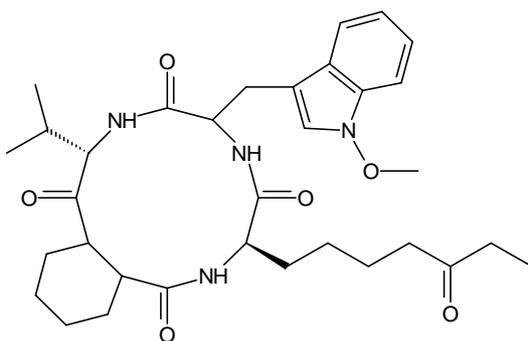
MS275

Epossichetoni



TPX

Peptidi ciclici



Apidicina

Figura 1.9. Struttura di alcuni HDACi.

Il SAHA si è dimostrato attivo in pazienti con tumori solidi e con linfoma di Hodgkin a dosi non tossiche. Il SAHA ha una buona biodisponibilità orale.

Chetoni elettrofili (epossidi)

Queste molecole possono agire modificando chimicamente un sito attivo nucleofilo con il gruppo epossidico e formando legami idrogeno con il chetone; sembra che blocchino le HDAC attraverso la reazione della molecola epossidica con lo zinco o con un amminoacido del sito attivo formando un legame covalente.

L'alta reattività del gruppo epossidico riduce drasticamente la biodisponibilità di queste molecole e le rende scarsamente interessanti dal punto di vista farmacologico. Gli unici inibitori appartenenti a questa classe sono una serie di composti naturali con una significativa attività in vitro come la *trapoxina* (TPX) A e B e la *depudicina*.

Peptidi ciclici

Peptidi ciclici come l'*apidicina*, che ha una molecola di etilchetone, e il *depsipeptide* inibiscono le HDAC a dosi nanomolari.

Sembra che l'*apidicina* interagisca con il sito catalitico e inibisca la proliferazione cellulare in diversi tumori.

Il *depsipeptide* è un prodotto naturale derivante dal *Chromobacterium violaceum* e mostra una potente attività antitumorale con meccanismo ancora non ben conosciuto.

Benzammidi

Questo gruppo di inibitori ha meccanismo d'azione sconosciuto ma sembra che inibisca la deacetilazione degli istoni e la proliferazione cellulare a livello della transizione tra la fase G1 e S del ciclo cellulare.

MS275 e alcuni suoi derivati inibiscono le HDAC in vitro a dosi micromolari; si ipotizza che il gruppo diamminofenile sia molto importante ai fini della sua attività inibitoria; probabilmente entrambe le funzioni amminiche chelano lo ione metallico del sito catalitico.

L'attività di MS275 comporta un aumento della trascrizione dell'inibitore p21^{WAF/Cip1} delle chinasi ciclina dipendenti e quindi un arresto del ciclo cellulare in G1.

MS275 ha dimostrato di possedere attività antiproliferativa in diverse linee cellulari tumorali umane (polmoni, seno, colon, leucemia, ovaia e pancreas).

Composti ibridi

I composti ibridi sono composti semisintetici nati dall'unione di tetrapeptidi ciclici e gruppi acidi idrossamici di TSA o SAHA; possono inibire le HDAC reversibilmente a concentrazioni nanomolari e hanno mostrato selettività d'azione per HDAC1 e HDAC4.

1.3.2 Effetti biologici degli HDACi

Come detto precedentemente l'inibizione dell'attività delle HDAC comporta l'aumento dei livelli di acetilazione sia delle proteine istoniche che di altre proteine provocando una serie di eventi che differiscono tra di loro sia in base allo spettro di selettività dell'inibitore verso le varie HDAC sia in base al contesto cellulare del tumore.

Nella maggior parte dei casi l'attività antitumorale risiede nella capacità di attivare programmi di differenziamento, di inibire la progressione del ciclo cellulare e di indurre apoptosi. Inoltre sembra essere molto importante anche la capacità di attivare la risposta immunitaria e l'inibizione dell'angiogenesi.

HDACi e inibizione del ciclo cellulare. L'iperacetilazione degli istoni comporta il rilassamento della struttura della cromatina e facilita l'espressione di numerosi geni regolatori. Il trattamento con gli inibitori delle HDAC comporta infatti un aumento dell'espressione dell'inibitore p21^{waf1} delle cinasi ciclina dipendenti, la repressione della trascrizione dei geni che codificano per le cicline A e D, così come l'inibizione della timidilato sintetasi che è coinvolta nella sintesi del DNA. Questi eventi probabilmente contribuiscono all'arresto del ciclo cellulare nelle fasi G1/S. p21^{waf1} ad esempio con funzione di soppressore tumorale, lega e inibisce l'attività delle CDK, comportando un'ipofosforilazione delle proteine pRb, p107 e p130, la soppressione della proliferazione cellulare e l'arresto del ciclo cellulare in fase G1.

Nelle cellule normali gli HDACi attivano un controllo del ciclo cellulare a livello della fase G2 che però è risultato mancante in molte cellule tumorali; la perdita di questo controllo comporta un'aberrante mitosi delle cellule tumorali che le conduce alla morte. Sebbene questo blocco nella fase G2 indotto dal trattamento con gli HDACi debba ancora essere chiarito si pensa che potrebbe essere alla base della azione selettiva di questi inibitori sulla cellula tumorale [42-44].

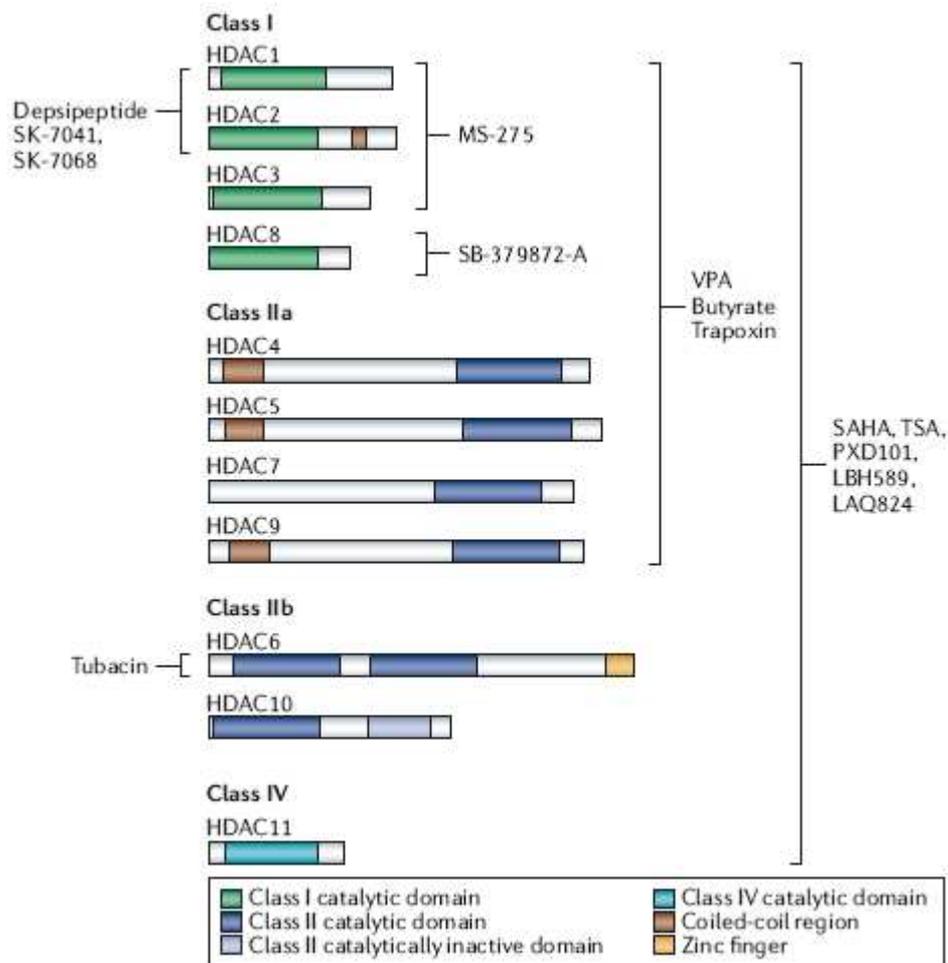


Figura 1.10. Shema in cui sono riportati i diversi profili di selettività di alcuni inibitori delle HDAC.

HDACi e apoptosi. Gli inibitori delle HDAC inducono apoptosi probabilmente mediante l'attivazione di diversi meccanismi.

Il trattamento con queste molecole sembra in primo luogo in grado di alterare l'espressione di geni coinvolti nella risposta proapoptotica; viene infatti aumentata la trascrizione di geni quali TRAIL, *fas* e *bak* e diminuita quella di geni come *XIAP* e *bcl-2*.

Inoltre gli inibitori della HDAC sarebbero anche in grado di indurre apoptosi mediante l'aumento della produzione di radicali dell'ossigeno. L'apoptosi può essere causata dall'alterata espressione del gene TBP2 (thioredoxin-binding protein 2) la cui espressione è in genere bassa nelle cellule cancerogene. Il SAHA, noto inibitore delle HDAC, aumenta selettivamente l'espressione di TBP2,

che a sua volta lega e inattiva la tioredoxina ridotta. Questa proteina è importante per le reazioni redox della cellula, quindi l'azione del SAHA aumenta la sensibilità della cellula agli stress ossidativi e può causare apoptosi.

Anche l'iperacetilazione delle proteine non istoniche può innescare un meccanismo apoptotico.

Effetti antiangiogenici degli HDACi. Gli inibitori delle HDAC hanno dimostrato di essere potenti agenti angiostatici sia *in vitro* che *in vivo*; sono infatti in grado di diminuire l'espressione genica correlata all'angiogenesi.

Sembra comunque improbabile che vi sia un unico meccanismo d'azione di questi farmaci, piuttosto sembrerebbero avere effetti dipendenti dal tipo di cellula; inoltre aumentano sempre più le evidenze che HDACi diversi abbiano effetti diversi anche sulle stesse cellule; ciò può essere spiegato in base alla diversa e specifica capacità di ogni farmaco di inibire le HDAC, i profili di selettività sono infatti diversi a seconda delle molecole (fig. 10).

1.3.3 SAHA e MS275

Il SAHA è un noto inibitore delle HDAC facente parte della famiglia degli acidi idrossamici, mentre MS275 appartiene alla categoria delle benzammidi (fig. 8).

Studi condotti per individuare le caratteristiche strutturali che rendono attive queste due molecole hanno mostrato che, mentre per il SAHA è fondamentale la presenza dell'acido idrossamico [45], per MS275 è indispensabile il gruppo amminico in posizione 2' della benzanilide [46]; la rimozione o la sostituzione di questi due gruppi provoca infatti una drastica riduzione della capacità inibitrice di queste due molecole.

Per individuare la natura delle interazioni tra queste molecole e il sito catalitico delle HDAC sono stati effettuati studi cristallografici ai raggi X del complesso formato da SAHA e HDPL; le analisi mostrano come il SAHA interagisce con il sito catalitico dell'enzima (fig. 4). Il SAHA si lega a HDLP mediante l'acido idrossamico che forma due legami coordinati con l'atomo di zinco che si trova in fondo alla tasca idrofobica. La catena alchilica si inserisce nella lunga e stretta tasca idrofobica e permettendo questa interazione, mentre il gruppo fenolico all'altra estremità della molecola interagisce con la superficie idrofobica dell'enzima (fig.11).

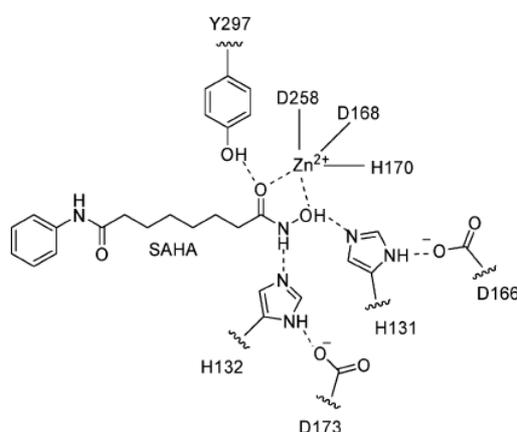


Figura 11. Interazioni instaurate dal SAHA a livello del sito catalitico delle HDAC.

Recentemente, Beckers e collaboratori hanno selezionato diversi inibitori appartenenti sia alla famiglia degli acidi idrossamici che a quella delle benzammidi e hanno effettuato studi comparativi sui loro effetti, sia *in vitro* che *in vivo*, estesi anche ad alcune isoforme di HDAC ricombinanti per valutarne la selettività. In particolare è stata studiata la capacità di queste molecole di indurre differenziamento.

Come detto precedentemente gli studi di selettività sono stati effettuati su HDAC ricombinanti e in particolare sulle HDAC 1, 3 e 8, appartenenti alla classe I, e sulla HDAC 6, appartenente alla seconda classe (vedi tab. 1).

TABLE I – INHIBITION OF HDAC ACTIVITY BY SAHA, LAQ824, CI994, MS275 AND MGCD0103

HDI	HDAC (HeLa nuclear extract) IC ₅₀ (μM)	HDAC1 IC ₅₀ (μM)	HDAC3 IC ₅₀ (μM)	HDAC6 IC ₅₀ (μM)	HDAC8 IC ₅₀ (μM)
SAHA (H)	0.07 ± 0.04 (8)	0.021 ± 0.013 (7)	0.037 ± 0.011 (4)	0.025 ± 0.006 (2)	1.2 ± 0.38 (5)
LAQ824 (H)	0.003 ± 0.0001 (2)	0.0018 ± 0.0006 (2)	0.0037 ± 0.003 (3)	0.015 ± 0.007 (2)	0.14 ± 0.034 (3)
CI994 (B)	8.5 ± 5.4 (3) ¹	0.41 (1)	0.75 ± 0.28 (3)	>100	≥100
MS275 (B)	11.0 ± 1.8 (2) ¹	0.18 ± 0.07 (2)	0.74 ± 0.25 (4)	>100	44.9 ± 18.1 (3)
MGCD0103 (B)	1.85 ± 1.06 (2) ¹	0.082 ± 0.0014 (2)	0.62 ± 0.16 (4)	>30	≥25 (3) ¹

H, hydroxamate analog; B, benzamide analog. Biochemical assays were established with various sources of HDAC activity, namely from HeLa nuclear extracts, Hek293 cells (recombinant HDAC1 and 6) and Sf21 insect cells (recombinant HDAC3 and HDAC8) using Ac-GGK(Ac)-AMC or Ac-RHK(Ac)K(Ac)-AMC as substrates. Mean IC₅₀ values +/- SD (standard deviation) (number of replicates shown in parenthesis) are shown.

¹IC₅₀ estimate (incomplete inhibition at 100 μM, flat curve).

Tabella 2. Valori di IC50 relativi ad alcuni inibitori delle HDAC.

I dati riportati in tabella 2 confermano che SAHA e LAQ824, derivati appartenenti alla famiglia degli acidi idrossamici, sono inibitori potenti e non selettivi delle HDAC di classe I e II. Dai valori delle IC_{50} si evince che l'attività del SAHA sulla HDAC 8 ($IC_{50} = 1.2 \mu M$) è notevolmente inferiore a quella sulle HDAC 1, 3 e 6 ($IC_{50} = 0.021-0.07 \mu M$).

I derivati benzamidici sono inibitori parziali dell'attività delle HDAC; MS275 è molto potente nei confronti delle HDAC 1 e 3 ($IC_{50} = 0.18, 0.74 \mu M$), molto meno potente sulla HDAC 8 ($IC_{50} = 44.9 \mu M$) ed infine non è in grado di inibire HDAC 6 fino alla concentrazione di $100 \mu M$.

Il meccanismo d'azione sia di SAHA che di MS275 è stato analizzato mediante studi di cinetica enzimatica e nei diagrammi di Lineweaver-Burk riportati in figura 12 si può osservare come varia l'attività enzimatica al variare della concentrazione di substrato e inibitore.

Come si evince dalla figura, MS275 e SAHA mostrano un'inibizione di tipo competitivo nei confronti di HDAC 1, con valori delle costanti di inibizione (K_i) rispettivamente di $1.3 \mu M$ e $14 nM$.

Gli studi sull'attività cellulare sono stati condotti monitorando l'iperacetilazione dell'istone H3 e l'induzione del gene $p21^{waf1}$ in cellule Hela di carcinoma della cervice uterina.

Sia SAHA che MS275 inducono un aumento dell'acetilazione dose-dipendente dell'istone H3, a livello delle lisine 9 e 13, e un aumento, pure dose-dipendente dei livelli di $p21^{waf1}$.

L'attività di SAHA e MS275 è stata poi studiata in dettaglio utilizzando numerose linee cellulari sia tumorali che normali; *in vitro*, tutti e due i composti si sono dimostrati attivi come agenti antiproliferativi e citotossici verso svariati tipi di cellule tumorali con valori di IC_{50} medi di $3.3 \mu M$ e $2.57 \mu M$.



Figura 12. Diagrammi di Lineweaver-Burk per MS275 e SAHA.

Inoltre sono stati effettuati studi su cellule tumorali del colon in cui l'induzione di p21 provoca un arresto del ciclo cellulare per valutare la citotossicità degli inibitori; sia SAHA che MS275 si sono dimostrati in grado di uccidere con efficacia paragonabile sia cellule in proliferazione sia cellule il cui ciclo cellulare è stato bloccato in G1 o G2 dall'induzione di p21, anche se l'apoptosi sembra insorgere prima nelle cellule in proliferazione.

Studi sulla reversibilità d'azione di questi farmaci hanno dimostrato che perché queste molecole siano in grado di provocare una consistente apoptosi, e quindi per essere efficaci antitumorali, sono necessarie esposizioni prolungate, ma non continue a concentrazioni superiori ai valori delle IC₅₀. Infine è stata valutata la capacità che hanno queste molecole di indurre differenziazione cellulare trattando linee cellulari di tumore al seno con gli inibitori e valutando, come marker di differenziazione, la produzione di lipidi neutri. Si è osservato in un primo momento un effettivo aumento dei livelli di acetilazione dell'istone H3 (dopo 8 ore), mentre ovviamente l'induzione di p21 si è osservata dopo 8-12 ore. In accordo con questi primi eventi, si è osservato un arresto della crescita cellulare nelle fasi S e G2/M tempo-dipendente seguito da apoptosi. Rispetto al SAHA, l'effetto indotto da MS275 è leggermente ritardato. Per quanto riguarda la differenziazione è stato osservato che MS275 10 µM induce la produzione di lipidi neutri nel 38% delle cellule, effetto comparabile a quello ottenuto con SAHA 15 µM (36% delle cellule). La differenziazione delle cellule del tumore al seno coincide quindi con l'induzione di p21^{waf1}, un'iperacetilazione istonica e arresto del ciclo cellulare. MS275 risulta essere potente tanto quanto il SAHA.

Si può quindi concludere che il profilo farmacologico di questi due inibitori, con evidenti spettri di attività differenti, risulta essere abbastanza analogo.

In molti laboratori si sta cercando di sintetizzare degli inibitori dotati di maggiore selettività verso le diverse deacetilasi; deve però essere ancora dimostrato che un inibitore selettivo verso le varie HDAC sia anche maggiormente attivo come antitumorale rispetto a un inibitore non selettivo come il SAHA.

1.4 Bibliografia

- [1] Lengauer C, Issa JP. *Mol Med Today* **4**, 102 (1998).
- [2] Jones PA, Laird PW. *Nat. Genet.* **21**, 163 (1999).
- [3] Fire A. *Nature* **391**, 806 (1998).
- [4] Okano M, Xie S, Li E. *Nat. Genet.* **19**, 219 (1998).
- [5] Wu J, Grunstein. *Biochem. Sci.* **25**, 612 (2000).
- [6] Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. *Nature* **389**, 251 (1997).
- [7] Nightingale, K. P., O'Neill, L. P. & Turner, B. M. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 125 (2006).
- [8] Jendwein T, Allis CD. *Science* **293**, 1074 (2001).
- [9] Turner BM. *BioEssay* **22**, 836 (2000).
- [10] Wolffe AP, Hayes JJ. *Nucleic Acid Res* **27**, 711 (1999).
- [11] Hecht A, Laroche T, Strahl-Bolsinger S, Gasser SM, Grunstein M. *Cell* **80**, 583 (1995).
- [12] Edmonson DG, Smith MM, Roth SY. *Genes Dev.* **10**, 1247 (1996).
- [13] Bird A. *Science* **294** 2113 (2001).
- [14] Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF. *Nature* **410**, 120 (2001).
- [15] Nakayama JI, Rice JC, Strahl BD. *Science* **292**, 110 (2001).
- [16] Grunstein M. *Nature* **389**, 349 (1997).
- [17] Struhl K. *Genes Dev.* **12**, 599 (1998).
- [18] Turner BM. *Bioessays* **22**, 836 (2000).
- [19] Gray SG, Ekstrom TJ. *Exp. Cell. Res.* **262**, 75 (2001).
- [20] Jones PA, Baylin SB. *Nat. Rev. Genet* **3**, 415 (2002).
- [21] Mahiknecht U, Hoelzer D. *Mol. Med* **6**, 623 (2000).
- [22] Moller C, Leutz A. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 167 (2001).
- [23] Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. *Mol Cell Biol* **20**, 6891 (2000).
- [24] Cai RL, Yan-Neale Y, Cueto MA, Xu H, Cohen D. *J Biol Chem* **275**, 27909 (2000).
- [25] Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. *Nat Genet* **25**, 338 (2000).
- [26] Smirnov DA, Hou S, Ricciardi RP. *Virology* **268**, 319 (2000).
- [27] Marks PA, Rifkind RA. *Ann Rev Biochem* **47**, 419 (1978)
- [28] Marks PA, Rifkind RA, Richon VM. *J. Natl. Cancer I* **92**, 1210 (2000).
- [29] Kramer OH, Gottlicher M, Heinzl T. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 294 (2001).

- [30] Marks PA, Richon VM, Breslow R. *Curr. Opin. Oncol.* **13**, 477 (2001).
- [31] Vigushin DM, Coombes RC. *Anticancer Drugs* **13**, 1 (2002).
- [32] Butler LM, Agus D, Scher HI. *Cancer Res.* **60**, 5165 (2000).
- [33] Butler LM, Webb Y, Agus DB. *Clin. Cancer Res.* **2001**;7:962–970.
- [34] Qui L, Kelso MJ, Hansen C, West ML, Fairlie DP, Parson PG. *Br. J. Cancer* **80**, 1252 (1999).
- [35] Parson PG, Hansen C, Fairlie DP. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 1719 (1997).
- [36] Marladason JM, Corner GA, Augenlicht LH. *Cancer Res.* **60**, 4561 (2000).
- [37] Zhang Y, Reinberg D. *Genes. Dev* **15**, 2343 (2001).
- [38] Butler LM, Zhou X, Xu WS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11700 (2002).
- [39] Thiagalingam, S. et al. *Ann. NY Acad. Sci.* **983**, 84 (2003).
- [40] Hubbert, C. et al. *Nature* **417**, 455 (2002).
- [41] Finnin MS, Pavletich NP. *Nature* **401**, 188 (1999).
- [42] Drummond, D. C. et al. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 495 (2005).
- [43] Dokmanovic, M. & Marks, P. A. *J. Cell. Biochem.* **96**, 293 (2005).
- [44] Kelly, W. K. & Marks, P. A. *Nature Clin. Pract. Oncol.* **2**, 150 (2005).
- [45] Breslow R, Jursic B, Yan ZF, Friedman E, Leng L, Ngo L, Rifkind RA, Marks PA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5542 (1991).
- [46] Suzuki, T., Ando, T., Tsuchiya, K., Fukuzawa, N., Saito, A., Mariko, Y., et al. *Journal of Medicinal Chemistry* **42**, 3001 (1999).

Capitolo 2

Tecniche usate per l'analisi delle proteine istoniche: stato dell'arte

2.1 Metodi tradizionali

2.1.1 Cromatografia con idrossiapatite (HAP)

Questa tecnica consente di purificare le proteine che fanno parte dei nucleosomi sfruttando le capacità di legame del DNA [1].

La separazione si basa sulla capacità del DNA di legarsi selettivamente, grazie alle sue proprietà chimiche, all'idrossiapatite in modo tale che le proteine possano essere eluite aumentando la concentrazione di NaCl nel tampone fosfato. Questo metodo consente di isolare le proteine istoniche con un alto recupero ed è utilizzato per la preparazione su larga scala di proteine istoniche e non istoniche.

2.1.2 Microsequenziamento e saggi immunologici

I metodi tradizionali per caratterizzare le modifiche post-traduzionali (PTM) delle proteine istoniche sono principalmente basati sul microsequenziamento e su saggi immunologici.

Il microsequenziamento consente di identificare con buona accuratezza le PTM però richiede una grande quantità di campione purificato e permette di caratterizzare peptidi di una lunghezza massima di 20-25 amminoacidi [2].

I metodi che si basano sull'approccio immunologico comprendono immunoprecipitazione, immunofluorescenza e western blotting [3].

Alla fine degli anni '80 numerosi gruppi hanno sviluppato una serie di anticorpi specifici verso i diversi siti di acetilazione dell'istone H4 [4,5]. Questi anticorpi furono impiegati mediante analisi di western blot per evidenziare eventuali cambiamenti dei siti coinvolti nelle PTM. Inoltre furono impiegati per studi di immunofluorescenza che consentirono per la prima volta di localizzare istoni con peculiari PTM a livello di precise regioni del genoma [5].

Successivamente si svilupparono anticorpi non diretti unicamente verso le acetilazioni ma anche verso lisine o arginine metilate e treonine o serine fosforilate [6]. Sebbene le tecniche che impiegano gli anticorpi siano molto sensibili, la loro efficacia è compromessa dalla scarsa specificità, dovuta sia alla presenza di modificazioni simili tra di loro sia alla presenza di modificazioni concomitanti a quella di interesse che non ne consentono il riconoscimento. Inoltre

non vi è una vasta gamma di anticorpi in commercio e molti di essi sono diretti verso le modificazioni a livello delle code N-terminali.

2.2 Metodi accoppiati alla spettrometria di massa

La spettrometria di massa è alla base di numerose strategie per la caratterizzazione di proteine e di miscele proteiche. Questa tecnica è stata impiegata con successo da numerosi gruppi per l'analisi delle proteine istoniche [7-10].

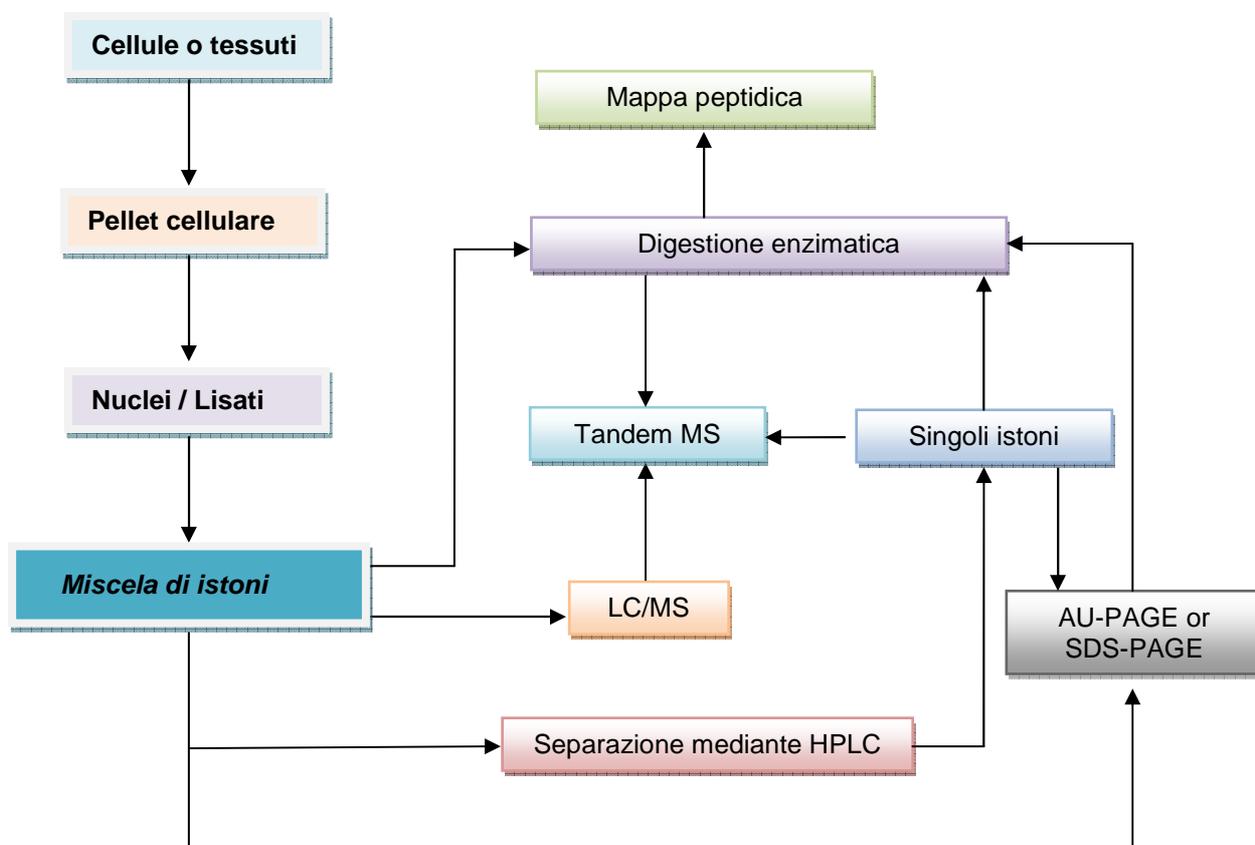


Figura 2.1. Strategie di analisi delle proteine istoniche mediante la spettrometria di massa.

Nella figura 1 sono riportati le strategie adottate generalmente per analizzare gli istoni mediante la spettrometria di massa. La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa è una

tecnica sensibile, accurata e veloce che può essere impiegata per l'analisi delle proteine intatte. Anche la mappatura dei peptidi (peptide mass fingerprint, PMF) è un metodo efficace che consente di individuare su quali residui amminoacidici siano avvenute le PTM. Per ottenere invece il sequenziamento dei peptidi sono invece utili esperimenti di MSMS (tandem MS).

2.2.1 Cromatografia liquida a fase inversa (RP-LC) accoppiata alla spettrometria di massa

Miscele complesse di proteine richiedono una buona separazione prima di poter essere analizzate mediante la spettrometria di massa. Una volta separate le proteine possono essere raccolte e successivamente analizzate, oppure possono essere inviate direttamente allo spettrometro di massa e analizzate on-line. La cromatografia a fase inversa è la tecnica di elezione per la successiva analisi mediante la spettrometria di massa grazie alla compatibilità della fase mobile, che è volatile, con la sorgente di ionizzazione ESI.

Metodi di LC-MS sono anche stati impiegati per individuare le PTM dato che facilitano la preparazione del campione e l'interpretazione dei dati [11].

Zhang ha riportato l'uso di una colonna avente come fase stazionaria catene alchiliche a 4 atomi di carbonio [10], e in questo modo è riuscito a separare alcune delle proteine istoniche migliorando quindi la rivelazione mediante la spettrometria di massa che, in questo caso, ha anche consentito di valutare l'abbondanza delle acetilazioni e metilazioni su alcune varianti.

2.2.2 Cromatografia a interazioni idrofiliche accoppiata alla spettrometria di massa

Come detto nel paragrafo precedente la compatibilità delle fasi mobili rende la cromatografia liquida a fase inversa la tecnica di elezione per la successiva rivelazione mediante la spettrometria di massa; tuttavia la somiglianza delle varie classi istoniche limita l'efficacia di questa tecnica nella separazione delle proteine. La cromatografia liquida che si basa su interazioni idrofiliche (HILIC) ha dimostrato di essere una tecnica molto efficace per la separazione degli istoni. Con questa tecnica Lindner è riuscito ad ottenere un'eccellente risoluzione delle proteine istoniche; nel suo lavoro gli istoni vengono separati su una colonna a debole scambio cationico grazie ad un gradiente crescente di sodio perclorato in un tampone acido a pH 3.0 e in presenza di una percentuale di solvente organico. L'uso combinato di HILIC e RP-HPLC gli ha permesso di separare diverse varianti dell'istone H2A, forme acetilate dell'istone H2A e dell'istone H4 e

isoforme fosforilate dell'istone H1 la cui identità è stata determinata usando la rivelazione di massa in modalità offline. La completa separazione di queste isoforme è un prerequisito per studiarne la loro funzione biologica. Sarg ha messo a punto un metodo per identificare e separare le isoforme dell'istone H4 con una metilazione sulla lisina 20 dalle isoforme acetilate [12-16].

Questa separazione ha permesso di concludere che:

- L'iperacetilazione dell'istone H4 (tri e tetra-acetilazione) blocca la tri-metilazione della K 20.
- La tri-metilazione della K20 è correlata nei tessuti mammiferi all'invecchiamento.

Questa tecnica non è comunque esente da svantaggi. L'alta concentrazione salina nella fase mobile la rende una tecnica incompatibile con la rivelazione online mediante spettrometria di massa e inoltre la raccolta di frazioni di istoni per le successive analisi rende questa metodica molto lunga e comporta un'inevitabile perdita di campione.

2.2.3 Elettroforesi capillare accoppiata alla spettrometria di massa

L'elettroforesi capillare ad alta efficienza (HPCE) è un altro metodo per separare le proteine istoniche che offre numerosi vantaggi:

- Necessità di poco campione (nanolitri o anche meno) se comparata alla cromatografia tradizionale.
- Migliore risoluzione delle proteine istoniche se paragonata a elettroforesi su gel.
- Facile automazione.
- Alta efficienza di separazione in tempi brevi.

Questa tecnica è particolarmente adatta alla separazione di isoforme acetilate o fosforilate. Gurley, Lindner e Mizzen hanno dimostrato che con questa tecnica si può ottenere una buona separazione degli istoni [16-19].

L'uso combinato di HPCE e spettrometria di massa apre prospettive interessanti per l'analisi degli istoni. Aguilar ha per la prima volta accoppiato online queste due tecniche per analizzare le proteine istoniche [20]. L'uso di idrossipropilmetilcellulosa ha significativamente migliorato la separazione degli istoni. Un semplice passaggio di dialisi prima della separazione in CE e un idoneo capillare per la connessione con lo spettrometro di massa rendono possibile effettuare analisi CE-ESI-MS online. Le difficoltà che normalmente si incontrano con questa tecnica sono:

- L'interazione tra le proteine cariche positivamente e i gruppi silanolici ionizzati del capillare.
- Ottenere un'efficiente interfaccia CE-MS.
- Interferenze degli elettroliti.

Nonostante queste limitazioni i vantaggi che questa tecnica offre rimangono comunque promettenti per l'analisi delle proteine istoniche.

2.2.4 Gel elettroforesi su poliacrilamide

Gli istoni, come detto precedentemente sono proteine altamente basiche quindi in condizioni acide sono cariche positivamente sia a livello dell'estremità N-terminale, se non protetta, sia a livello degli amminoacidi basici (lisine). Lo stato di carica degli istoni è alterato dalla presenza di acetilazioni a livello delle lisine o di fosforilazioni a livello delle serine, delle tirosine e delle treonine. I gel tradizionali con SDS (sodio dodecil solfato), che prevedono la separazione delle proteine in base alle loro dimensioni, non riescono a separare le varie isoforme istoniche. I gel di poliacrilamide con urea a acido acetico riescono al contrario a separare le isoforme istoniche perchè la separazione avviene sia in base alle dimensioni che alla carica delle proteine. A pH acidi gli istoni, che hanno punti isoelettrici molto alti, si trovano carichi positivamente e qualsiasi rimozione o aggiunta di queste cariche positive su queste proteine relativamente piccole (la lunghezza dell'istone H4 è di 102 amminoacidi) causa un significativo aumento o riduzione della loro effettiva mobilità. Utilizzando l'elettroforesi su gel di poliacrilamide (PAGE) le isoforme dell'istone H4 vengono separate in base al numero di acetilazioni sulle lisine. Questa tecnica risulta eccellente per separare istoni che potranno poi essere analizzati mediante la spettrometria di massa.

2.3 Analisi delle proteine istoniche mediante spettrometria di massa

2.3.1 Digestione enzimatica delle proteine e analisi dei peptidi mediante tecniche di spettrometria di massa

Questa metodologia in genere viene utilizzata per l'identificazione delle proteine e prevede in un primo momento la digestione enzimatica, sia su gel che in soluzione, delle proteine stesse. Le analisi con varie tecniche di spettrometria di massa consentono di ottenere i valori dei pesi

molecolari dei peptidi che si formano dopo la digestione; l'identificazione della proteina avviene andando a confrontare i valori ottenuti con quelli che derivano dalla digestione teorica di ogni proteina e che sono elencati in apposite banche dati. Per ogni analisi e sottomissione in banca dati si otterranno vari risultati, ognuno caratterizzato da un punteggio (score) che indica quanto è affidabile l'identificazione.

Questa metodologia consente di identificare e caratterizzare le PTM a carico degli istoni. Ogni PTM induce un cambiamento della massa (shift di massa) teorica di ogni peptide (tab. 1).

Tabella 2.I. PTM caratteristiche delle proteine istoniche

Modificazione	Shift di massa (Da)	Residui modificati
Acetilazione	42.0106	K, N-terminale
Metilazione	14.0156	K, R
Fosforilazione	79.9663	S, T, Y
Ossidazione	15.9949	M
Ubiquitinazione	114.0429	K

La posizione e il numero di modificazioni possono essere determinate in base allo shift di massa del corrispondente peptide. Questa tecnica è stata usata, per esempio, per identificare l'acetilazione a livello della lisina 79 dell'istone H3 e per altri numerosi studi delle PTM.

Per l'analisi delle PTM è estremamente importante l'accuratezza dell'analizzatore di massa; infatti l'acetilazione delle lisine comporta uno shift di massa di 42.0106 Da mentre la trimetilazione uno shift di 42.0470 Da e solo analizzatori che riescano a raggiungere un'accuratezza di 3.6 ppm per proteine aventi peso molecolare di 10 KDa, riusciranno a discriminare tra queste due modificazioni. L'analizzatore dello spettrometro FT-ICR (Fourier transform ion cyclotron resonance) è ad oggi quello che offre risoluzione ($>10^6$) e accuratezza (< 1 ppm) migliori.

Lo spettrometro che viene invece usato di norma per queste analisi è il MALDI-TOF, che rende possibile analizzare velocemente e con sufficiente precisione i peptidi derivanti dalla digestione enzimatica degli istoni.

La quantificazione assoluta mediante tecniche di spettrometria di massa è resa problematica dal fatto che la capacità di ionizzazione di ogni peptide dipende dalla sua sequenza. E' possibile comunque monitorare cambiamenti delle abbondanze relative di peptidi aventi la stessa sequenza o sequenze molto simili.

2.3.2 Analisi in modalità MS/MS

Sebbene la tecnica descritta nel paragrafo precedente sia utile per lo studio delle PTM, essa non consente però di discriminare tra due peptidi aventi lo stesso peso molecolare ma diversa sequenza amminoacidica. In questi casi sono necessari degli spettrometri di massa che sono in grado di lavorare in modalità MS/MS e che prevedono, in un primo momento, l'isolamento del peptide e la determinazione del suo peso molecolare e, successivamente, la sua frammentazione; dalla massa molecolare degli ioni frammento e dalla loro distribuzione è poi possibile risalire alla sequenza del peptide.

Le tecniche di frammentazione dei peptidi normalmente adottate sono:

- Dissociazioni CID (collision induced dissociation).
- Dissociazioni CAD (collision activated dissociation).
- PSD (post-source decay).
- IRMPD (infrared multiphoton dissociation).
- ECD/ETD (electron capture/transfer dissociation)

Le analisi MS/MS che sfruttano le CID sono state utilizzate con successo per l'identificazione delle PTM degli istoni, come la glicosilazione [21], la fosforilazione [22], l'acilazione, l'acetilazione [23] e la metilazione [24].

Monitorando le abbondanze relative del precursore o degli ioni frammento generati durante gli esperimenti di MS/MS è possibile effettuare analisi quantitative relative.

La tecnica Nano-LC/MS/MS è l'approccio ideale quando il campione è una miscela complessa e la purificazione delle singole proteine è difficoltosa. Anche questa tecnica infatti è stata largamente impiegata per analizzare le PTM degli istoni [25]. Questo approccio ha permesso di identificare 32 modificazioni tra cui acetilazioni, metilazioni e ubiquitinazioni, per tutti gli istoni umani, e sette di queste non erano conosciute prima.

Anche le dissociazioni ECD, che furono scoperte per la prima volta da Fred McLafferty nel 1998, sono largamente sfruttate per l'analisi delle PTM degli istoni. La frammentazione avviene poiché i peptidi o le proteine catturano degli elettroni liberi che a loro volta ne inducono la frammentazione.

2.4 Bibliografia

- [1] Bloom KS, Anderson JN. *J. Biol. Chem.* **253** (12), 4446 (1978).
- [2] Han KK, Tetaert D, Debuire B, Dautrevaux M, Biserte G. *Biochimie* **59**, (7), 557 (1977).
- [3] Crane-Robinson C, Hebbes TR, Clayton AL, Thorne AW. *Methods* **12**, (1), 48 (1997).
- [4] T.R. Hebbes, C.H. Turner, A.W. Thorne, C. Crane-Robinson. **26**, 865 (1989).
- [5] T.R. Hebbes, A.W. Thorne, C. Crane-Robinson. *EMBO J.* **7** 1395– (1988).
- [6] B.M. Turner. *Cell* **111**, 285 (2002).
- [7] L. Zhang, M.A. Freitas, J. Wickam, M.R. Parthum, M.I. Klisovic, G. Marcucci, J.C. Byrd. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**,77 (2004).
- [8] Zhang L, Eugeni EE, Parthun MR, Fraeitas MA. *Chromosoma* **112** (2), 77 (2003).
- [9] Zhang K, Tang K, Huang L et al. *Anal. Biochem.* **306** (2), 259 (2002).
- [10] K. Zhang, H. Thang, *J. Chromatogr. B* **783**, 173 (2003).
- [11] Bonenfant D, Coulot M, Towbin H, Shindler P, Van Oostrum J. *Moll. Cell. Proteomics* **5** (3), 541 (2005).
- [12] Lindner H, Sarg B, Meraner C, Helliger W. *J. Chromatogr. A* **743** (1), 137 (1996).
- [13] Lindner H, Sarg B, Helliger W. *J. Chromatogr. A* **782** (1), 55 (1997).
- [14] Sarg B, Helliger W, Hoertnagl B, Pushendorf B, Lindner H. *Arch. Biochem. Biophys.* **372** (2), 333 (1999).
- [15] Sarg B, Green A, Soderkvist P, Helliger W, Rundquist I, Lindner HH. *FEBS. J.* **272** (14), 3673 (2005).
- [16] Gurley LR, London JE, Valdez JC. *J. Chromatogr.* **559** (1-2), 431 (1991).
- [17] Lindner H, Helliger W, Dirschlmayer A, Jaquemar M, Pushendorf B. *Biochem. J.* **283** (Pt 2), 467 (1992).
- [18] Lindner H, Sarg B, Helliger W. *J. Capill. Electrophor. Microchip. Technol.* **8** (3-4), 59 (2003).
- [19] Lindner H, Helliger W, Sarg B, Meraner C. *Electrophoresis* **16** (4), 604 (1995).
- [20] Aguilar C, Hofte AJ, Tjaden UR, Van der Greef J. *J. Chromatogr. A* **926** (1), 57 (2001).
- [21] Reid GE, Stephenson JL Jr, McLuckey SA. *Anal. Chem.* **74** (3), 577 (2002).
- [22] Johnson RS, Ohguro H, Palczewski K, Hurley JB, Walsh KA, Neubert TA. *J. Biol. Chem.* **269** (33), 21067 (1994).

[23] Michael SM, Chien BM, Lubman DM. *Anal. Chem.* **65**, 2614 (1993).

[24] Vishwanathan K, Tackett RL, Stewart JT, Barlett MG. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **748** (1), 157 (2000).

[25] Beck HC, Nielsen EC, Matthiesen R. *Mol. Cell Proteomics* **5** (7), 1314 (2006).

Capitolo 3

***Caratterizzazione delle proteine istoniche
mediante cromatografia liquida accoppiata a
diverse tecniche di spettrometria di massa***

3.1 Parte sperimentale

3.1.1 Materiali

L'acetonitrile, con grado di purezza per HPLC, l'acido eptafluorobutirrico (HFBA), l'acido trifluoroacetico (TFA), l'acido formico (FA) e la tripsina sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

L'Endoproteinasi Arg-C è stata fornita dalla Roche (Milano, Italia).

L'acido α -ciano-4-idrossicinnamico (CHCA) è stato fornito da LaserBioLab, Sophia-Antipolis, France.

L'acqua deionizzata è stata ottenuta con un apparato Milli-RX (Millipore, Milford, MA, USA).

Gli istoni sono stati isolati dal laboratorio del Professor Masotti, Dipartimento di Biochimica, Università degli Studi di Bologna, Italia.

3.1.2 Colture cellulari

Lo studio è stato condotto utilizzando una linea cellulare di adenocarcinoma del colon umano, HT-29.

Le cellule sono state coltivate in *medium* RPMI 1640 (Euroclone) arricchito con 10% di FBS (siero fetale bovino, Euroclone), scomplementato per 30 minuti a 56° e con 1% di L-glutammina (Sigma-Aldrich) 2 mM.

Le cellule sono state inoculate ad una densità di 10.000 cell/cm² in piastre Petri (Orange) o in *multiwell*, da 6 pozzetti, in incubatore a 37°C ed in atmosfera al 5% di CO₂.

Il distacco è stato eseguito mediante tripsinizzazione: le cellule sono state lavate due volte con tampone fosfato PBS [(8 g/L di NaCl (Sigma), 1.15 g/L di Na₂HPO₄ (Sigma), 0.2 g/L di KH₂PO₄ (Sigma), 0.2 g/L di KCl (Sigma)], quindi vengono staccate dalla piastra con una soluzione di tripsina (Seromed) allo 0,125% in EDTA (Sigma) allo 0,02% a 37°C. Al termine del distacco la tripsina è stata neutralizzata con terreno completo di siero al 10%.

La conta delle cellule è stata effettuata utilizzando la camera di *Burker*.

3.1.3 Isolamento dei nuclei ed estrazione degli istoni

Le cellule tripsinizzate sono state centrifugate per 10 minuti a 240 g e lavate due volte in PBS. Al pellet cellulare sono stati aggiunti 750 μ L di un tampone di lisi così costituito: tampone fosfato

sodico 10 mM pH 7.4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, p-fenilmetilsulfanilfluoride (PMSF) 0.1 mM, Nonidet 0.1%, ortovanadato di sodio 0.5 mM e dagli inibitori delle proteasi Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, Antipaina 1 mg/mL (Amellem O. et al.1996). Il tampone fosfato ipotonico è stato lasciato agire per 15 minuti in ghiaccio; in seguito al campione sono stati aggiunti 250 µL di p-formaldeide al 3% al fine di ottenere la lisi cellulare preservando l'integrità dei nuclei. Si lascia per 45 minuti in ghiaccio, centrifugati e il surnatante eliminato mentre il pellet nucleare è stato lavato due volte in PBS, centrifugando per 5 minuti a 320 g. Ai nuclei sono stati aggiunti 100 µL di H₂O bidistillata ghiacciata ed un pari volume di H₂SO₄ 0,8 N, goccia a goccia su vortex. E' stato lasciato a 4°C per 1 h e successivamente centrifugato a 15.000 rpm per 5 minuti: il surnatante raccolto è stato addizionato a 1 mL di acetone e posto tutta notte a -20°C. E' stato centrifugato a 18.000 rpm per 5 minuti e dopo aver eliminato l'acetone portato completamente a secco sotto flusso d'azoto; il pellet così ottenuto è stato risospeso in tampone fosfato 0.01 M pH 7.4 per il successivo dosaggio proteico.

3.1.4 Dosaggio delle proteine

Gli estratti proteici sono stati dosati utilizzando il metodo di Bradford, mediante uno spettrofotometro Uvikon 930 (Kontron). E' stata costruita una curva di calibrazione misurando l'assorbanza di standard di albumina sierica (BSA) a concentrazione nota (da 5 a 25 µg/mL). I dati sono stati utilizzati per ottenere una retta di regressione che consente di ricavare il contenuto proteico dei campioni per interpolazione. L'assorbanza delle proteine è stata misurata a 595 nm, lunghezza d'onda di assorbimento del Coomassie Blu che ha reagito con i gruppi proteici.

3.1.5 Preparazione del campione per le analisi LC-MS delle proteine intatte

Gli estratti nucleari acquosi, contenenti le proteine istoniche, sono stati diluiti con acqua deionizzata per ottenere concentrazioni di circa 1 mg/mL.

3.1.6 Sistema cromatografico e spettrometri di massa per l'analisi delle proteine intatte

Le analisi LC-MS sono state effettuate utilizzando un cromatografo Jasco PU-1558 (Jasco, Tokio, Giappone) interfacciato con uno spettrometro di massa LCQ-DUO (ThermoFinnigan, San Jose, CA), con sorgente di ionizzazione ESI e analizzatore a trappola ionica. L'estratto acquoso della miscela di istoni è stato iniettato utilizzando la valvola di iniezione Reodyne 7281i con loop di 10

μL . Le analisi cromatografiche sono state effettuate su una colonna C4 (Phenomenex Jupiter 150 x 2.0 mm I.D., 5 μm) preceduta da una precolonna C18 (Phenomenex 4.0 x 3.0 mm I.D.). Sono stati utilizzati due solventi per la preparazione della fase mobile, il solvente A è composto da acqua:HFBA:FA (100:0.04:0.4) (v/v), il solvente B da acetonitrile:HFBA:FA (100:0.04:0.4) (v/v). La separazione è stata ottenuta lavorando ad una velocità di flusso di 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ tramite un gradiente lineare con condizioni iniziali (t_0) B:A (35:65) (v/v) e condizioni finali (t_{100}) B:A (70:30) (v/v).

Lo spettrometro di massa è stato utilizzato in polarità positiva, al capillare è stato applicato un voltaggio di 46 eV e la temperatura del capillare riscaldato è stata fissata a 170°C. Lo spettro è stato registrato in modalità total ion current (TIC) nel range di valori di m/z 500-2000.

Dagli spettri di massa corrispondenti ai picchi cromatografici è stato possibile risalire ai pesi molecolari delle varie isoforme istoniche corrispondenti, mediante il programma di deconvoluzione Mag Tran 1.0. Con questo programma è stato anche possibile determinare la quantità relativa (espressa come abbondanza percentuale) di ciascuna isoforma istonica nell'ambito delle quattro classi (H2A, H2B, H3 e H4).

Il sistema cromatografico è stato anche accoppiato a uno spettrometro di massa Q-TOF Micro (Micromass) dotato di una sorgente di ionizzazione electrospray (Z-spray). La temperatura della sorgente è stata impostata a 80°C mentre la temperatura di desolvatazione a 150°C; al capillare è stato applicato un voltaggio di 3 kV e al cono un voltaggio di 40 V. Gli spettri sono stati acquisiti nell'intervallo di m/z compreso tra 600 e 2000 Da in polarità positiva.

Gli spettri sono stati elaborati mediante il software Mass Lynks (Waters, Milford, MA, USA) che permette di risalire dallo spettro di massa multicarica, caratteristico delle proteine, al peso molecolare delle proteine stesse. Questo software ha permesso di ottenere velocemente i pesi molecolari delle varie isoforme e anche le intensità relative delle isoforme stesse.

3.1.7 Raccolte delle singole frazioni di istoni

Le analisi LC-MS sono state condotte utilizzando un cromatografo Jasco PU-1558 (Jasco, Tokio, Giappone) interfacciato con un detector UV (Jasco UV-1575) e monitorando il segnale a 215nm.

La separazione delle varie classi di proteine istoniche (H1, H2A, H2B, H3 e H4) è stata ottenuta mediante cromatografia a fase inversa; la miscela di istoni (1 mg/mL in acqua, 50-100 μM) è stata iniettata nell'apparato cromatografico utilizzando una valvola di iniezione Reodyne 7281i con loop

da 20 μ L. Le analisi cromatografiche sono state effettuate su una colonna C18 (Phenomenex Jupiter 150 x 4.6 mm I.D., 5 μ m) preceduta da una precolonna C18 (Phenomenex 4.0 x 3.0 mm I.D.). Le analisi sono state condotte utilizzando un gradiente da A [acqua:HFBA (100:0.04) (v/v)]/B [acetonitrile:HFBA (100:0.04) (v/v)] 60/40 (v/v), a A/B 38/62 (v/v) in 110 minuti a flusso di 400 μ L/min. La colonna è stata ricondizionata per 10 minuti prima dell'iniezione successiva. Le frazioni raccolte corrispondenti all'istone H4 sono state portate a secco sotto vuoto.

3.1.8 SDS-PAGE

Le frazioni istoniche separate in HPLC sono state caricate su gel di poliacrilammide al 15%. La corsa elettroforetica è stata condotta a 150 V per circa 90 minuti in tampone di corsa costituito da TRIZMA-BASE 25 mM, glicina 192 mM, SDS 10% e H₂O. A fine corsa le bande proteiche sono state evidenziate mediante colorazione con Coomassie (soluzione acquosa costituita da Coomassie R-250 0.3 mM, metanolo 40% v/v e acido acetico glaciale 7% v/v) per 15 minuti e successiva decolorazione del gel con una soluzione acquosa di metanolo (40% v/v) e acido acetico glaciale (7% v/v).

3.1.9 Digestione dell'istone H4

La digestione dell'istone H4 è stata condotta in un primo momento con tripsina. Aliquote contenenti circa 10 μ g di proteina sono state digerite in tampone ammonio bicarbonato 20 mM a pH 8.0. Il rapporto proteina enzima scelto è stato 100/1. La reazione di digestione è stata condotta a 4°C per 16 ore dopo di che è stata terminata aggiungendo lo 0.1% (v/v) di acido formico.

Successivamente è stato utilizzato l'enzima proteolitico *Endoproteinase Arg-C*. Aliquote contenenti approssimativamente 10 μ g di proteina sono state digerite in tampone ammonio bicarbonato 100 mM a pH 8.5. Il rapporto proteina enzima scelto è stato 50/1; la reazione di digestione è stata condotta a 37°C per 18 ore dopo di che è stata terminata aggiungendo lo 0.1% (v/v) di acido formico. Il volume totale della miscela di digestione è di 30 μ L e la reazione è stata fatta avvenire in eppendorf da 200 μ L in modo da ridurre il più possibile l'evaporazione del tampone di reazione.

3.1.10 Analisi MALDI-TOF della miscela peptidica

Per le analisi MALDI-TOF è stato utilizzato uno spettrometro Voyager DE Pro (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipaggiato di un laser a N₂ pulsato che opera a 337 nm. Gli spettri sono stati

acquisiti in polarità positiva nel range di m/z di 500-5000. Le analisi sono state condotte in modalità reflector utilizzando un voltaggio di accelerazione di 20.000 V, un voltaggio della griglia di 14.900 V e un extraction delay time di 150 ns. Gli spettri relativi al digerito dell'istone H4 sono stati calibrati internamente sui peptidi 46-67 e 24-35, utilizzando i loro pesi teorici come riferimenti, rispettivamente 2.548,4497 e 1.325,7535.

Come matrice è stata utilizzata una soluzione di CHCA solubilizzato in una miscela 1:1 di acqua/acetonitrile contenente lo 0.5% di acido formico, ottenendo una concentrazione finale di 10 mg/mL.

Le analisi sono state effettuate caricando sulla piastra dello strumento 1 μ L di campione e un ugual volume di matrice.

3.1.11 Analisi LC/MSMS della miscela peptidica

La miscela di peptidi, ottenuta dalla digestione proteolitica dell'istone H4 con *Endoproteinasi Arg-C*, è stata analizzata utilizzando un sistema cromatografico capillare CapLC (Waters, Massachusetts, USA) accoppiato online allo spettrometro di massa Q-TOF Micro descritto precedentemente. I peptidi (10 μ L) sono stati in un primo momento caricati su una precolonna (RP trap column, Waters) grazie a una prima pompa che serve per trasportare il campione dall'autocampionatore alla precolonna stessa. Il solvente utilizzato è stato acqua:HFBA (100:0.1, v/v) a un flusso di 30 μ L/min.

Sfruttando una valvola a dieci vie i peptidi sono stati successivamente trasferiti alla colonna analitica capillare C18 (150 mm \times 30 μ m I.D., Zorbax, Agilent) a un flusso di 5 μ L/min, e sono stati separati sfruttando un gradiente lineare compreso tra A [acqua:FA (100:0.1) (v/v)]/ B [acetonitrile:FA (100:0.1) (v/v)] 95/5 (v/v), e A/B 40/60 (v/v), in 70 min.

Le analisi allo spettrometro di massa sono state condotte in polarità positiva. Al capillare è stato applicato un voltaggio di 3200 V, mentre il voltaggio del cono è stato fissato a 40 V. La temperatura della sorgente è stata impostata a 90°C e quella di desolvatazione a 200°C. Le analisi sono state condotte in modalità Survey Scan impostando una soglia di intensità al di sopra della quale i peptidi multicarica vengono frammentati.

3.2 Caratterizzazione delle isoforme istoniche mediante analisi delle proteine intatte

3.2.1 Risultati e discussione

3.2.1.1 Separazione cromatografica degli istoni

Il primo obiettivo di questo lavoro è stato quello raggiungere l'ottimizzazione della separazione cromatografica delle diverse classi di istoni (H1, H2A, H2B, H3 e H4); infatti una buona separazione prima dell'analisi con lo spettrometro di massa rende più accurata la determinazione del peso molecolare delle proteine. Lo spettrometro di massa dotato di un analizzatore a trappola ionica, possiede una scarsa capacità risolutiva se paragonata ad altri analizzatori di massa. Perciò la separazione cromatografica è essenziale perchè, permettendo di analizzare le proteine individualmente, consente di determinarne il peso molecolare con maggiore accuratezza.

Stato dell'arte. I metodi HPLC-MS riportati in letteratura non hanno permesso di ottenere una completa separazione alla linea di base delle otto proteine istoniche. Lindner ha ottenuto una buona separazione degli istoni mediante cromatografia liquida basata sulle interazioni idrofiliche (HILIC) accoppiata alla HPLC a fase inversa e rivelazione UV [1]; questo metodo cromatografico è comunque molto lungo (più di 100 minuti) e non è stato ottimizzato per essere accoppiato alla rivelazione con uno spettrometro di massa. Zhang ha proposto un metodo cromatografico a fase inversa che sfrutta l'utilizzo di una colonna cromatografica con fase stazionaria C18 e come modificatore acido per la fase mobile il TFA [2]; questo metodo non ha però permesso di separare gli istoni H3-1 dagli H3-2 e nemmeno gli istoni H2A-1 dagli H2A-2. Anche Galasinski ha proposto la separazione delle proteine istoniche mediante un tecnica a fase inversa con l'utilizzo di TFA (0.1%) nella fase mobile [3, 4] ma non è riuscito a separare gli H3-1 dagli H3-2 e gli H2A-1 dagli H2A-2 e dagli H2B. Zhang e Tang non sono riusciti a discriminare, mediante cromatografia a fase inversa con colonna cromatografica C4 e fase mobile contenente come modificatore acido HFBA (0.1%), gli istoni H2A-1 dagli H2A-2 [5].

Sviluppo del metodo cromatografico. In questo lavoro FA, TFA e HFBA sono stati testati come modificatori acidi volatili della fase mobile per le analisi HPLC-ESI-MS degli istoni; sono stati scelti questi modificatori perchè gli istoni sono proteine estremamente basiche per l'elevato contenuto di amminoacidi basici, soprattutto lisine. Questi acidi sono importanti sia perchè sono in grado di protonare le proteine, sia perchè formano con esse delle coppie ioniche e in questo modo

modificano la ritenzione e la risoluzione delle proteine stesse durante la cromatografia a fase inversa. Abbiamo ritenuto possibile che la completa separazione delle diverse classi delle proteine istoniche non sia stata ottenuta nei lavori precedenti [2] perché TFA e HFBA, accoppiatori ionici lipofili, se utilizzati a concentrazioni troppo elevate possono provocare un eccessivo allungamento dei tempi di ritenzione che va a inficiare la capacità risolutiva del sistema. Inoltre, concentrazioni elevate di TFA e HFBA possono causare una diminuzione dell'intensità del segnale perché le coppie ioniche che formano con gli istoni, estremamente stabili, si dissociano più difficilmente a livello della sorgente di ionizzazione ESI [6].

Partendo da questi presupposti è stata scelta una colonna cromatografica, avente fase stazionaria lipofila C4, preceduta da una precolonna C18, per preservare la pulizia della colonna e garantire una buona ripetibilità dei tempi di ritenzione. Sono stati poi messi a punto degli esperimenti distinti con i tre diversi modificatori acidi, la cui concentrazione è risultata inversamente correlata alla loro lipofilità (0.04% HFBA, 0.06% TFA, 0.4% FA). Per quanto riguarda TFA e HFBA, la loro concentrazione è più bassa di quelle adottate nei precedenti lavori, mentre la concentrazione di FA, il più idrofilo dei tre, è stata aumentata fino allo 0.4%. Successivamente per ogni modificatore acido è stato ottimizzato un gradiente di eluizione che consentisse di ottenere la risoluzione migliore delle proteine istoniche. In figura 3.1 sono riportati i cromatogrammi relativi alle separazioni ottimizzate con i tre modificatori acidi, ottenuti accoppiando al sistema cromatografico un analizzatore a trappola ionica operante in modalità TIC (Total Ion Current) e in polarità positiva. HFBA (0.04%) è risultato il modificatore acido che ha consentito di ottenere la separazione migliore delle otto classi istoniche (fig. 3.1a), causando però un maggiore effetto di soppressione ionica rispetto a FA (fig. 3.1.c). Si può infatti osservare che con FA non si riescono a separare gli istoni H2B dagli H4 e gli H1-1 dagli H1-2 (fig. 3.1c), però l'area totale risulta maggiore di quella ottenuta con HFBA. La separazione ottenuta con TFA (0.06%) non ha invece consentito di risolvere gli istoni H2A-1 dagli H4 e gli H1-1 dagli H1-2; inoltre anche TFA causa una marcata soppressione ionica (fig. 3.1b).

Considerando che HFBA offre i risultati migliori in termini di risoluzione e FA in termini di sensibilità, i due modificatori sono stati aggiunti contemporaneamente alla fase mobile mantenendo fissa la percentuale di HFBA (0.04%) e variando quella di FA, con la speranza di mantenere una buona separazione e aumentare la sensibilità del metodo.

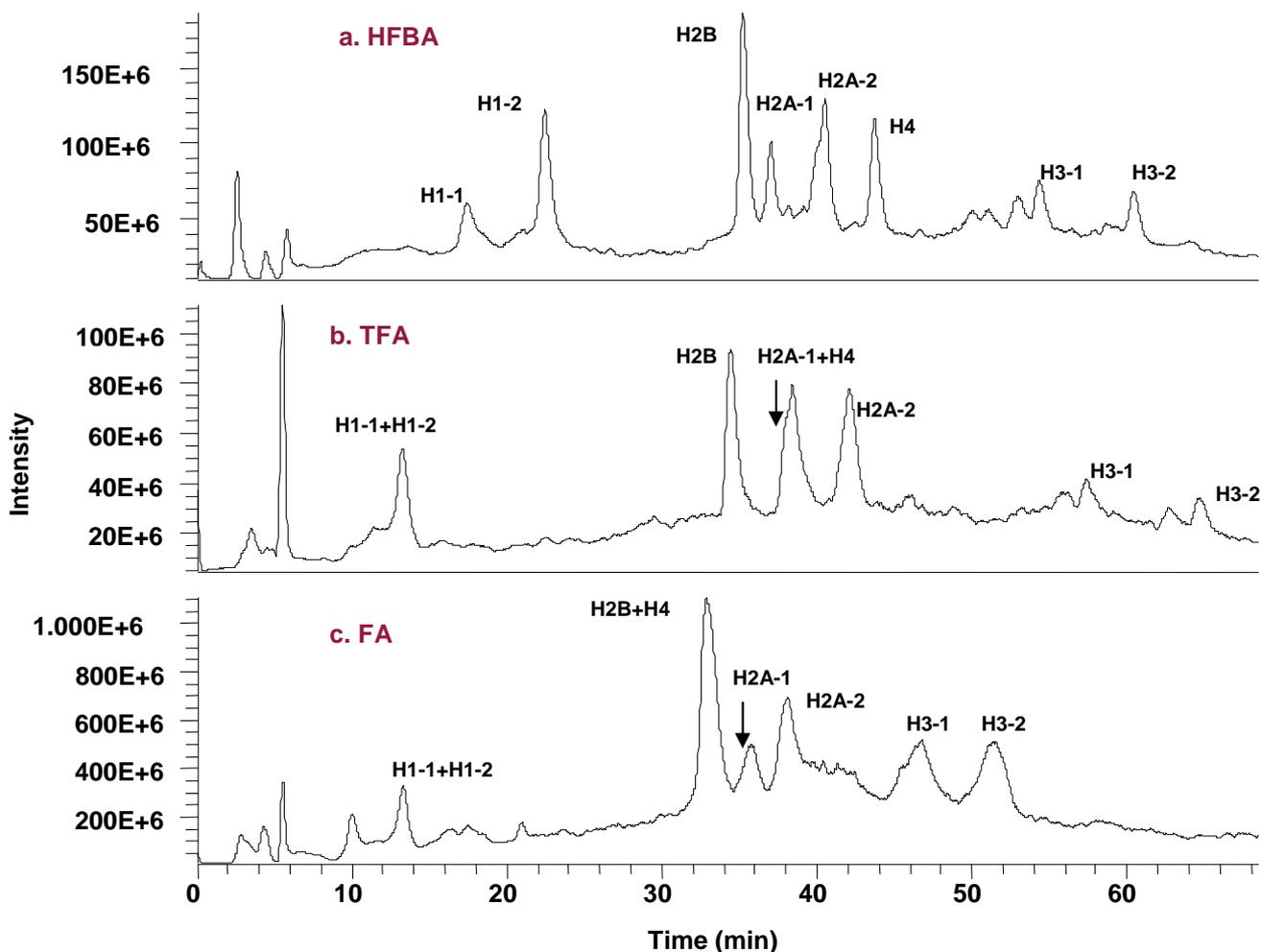


Figura 3.1. Cromatogrammi relativi alla separazione in HPLC a fase inversa delle proteine istoniche, ottenuti grazie all'accoppiamento del sistema cromatografico con uno spettrometro di massa avente come analizzatore la trappola ionica. Le analisi sono state effettuate iniettando 10 μ L dello stesso campione di istoni (1 mg/mL) isolati da cellule HT29. I gradienti ottimizzati sono i seguenti: a) da A [acqua:HFBA (100:0.04 v/v)]/B [acetonitrile:HFBA (100:0.04, v/v)] 68/32 (v/v), a A/B 30/70 (v/v) in 100 min; b) da A [acqua:TFA (100:0.06 v/v)]/B [acetonitrile:TFA (100:0.06, v/v)] 68/32 (v/v), a A/B 40/60 (v/v) in 100 min; c) da A [acqua:FA (100:0.4) (v/v)]/B [acetonitrile:FA (100:0.4 v/v)] 75/25 (v/v), a A/B 40/70 (v/v) in 100 min.

L'area totale dei picchi relativi agli istoni è stata plottata in funzione del rapporto tra FA e HFBA presenti nelle fase mobile. L'area aumenta del 50% quando il rapporto è 5:1 e rimane pressoché stabile aumentando ulteriormente il rapporto fino a 10:1 (fig. 3.2). Nella stessa figura è riportato il

cromatogramma HPLC-ESI-MS ottenuto aggiungendo entrambe i modificatori acidi alla fase mobile in rapporto 10.1. Come si può osservare la separazione di tutte le otto classi istoniche è mantenuta e la sensibilità d'analisi è aumentata notevolmente.

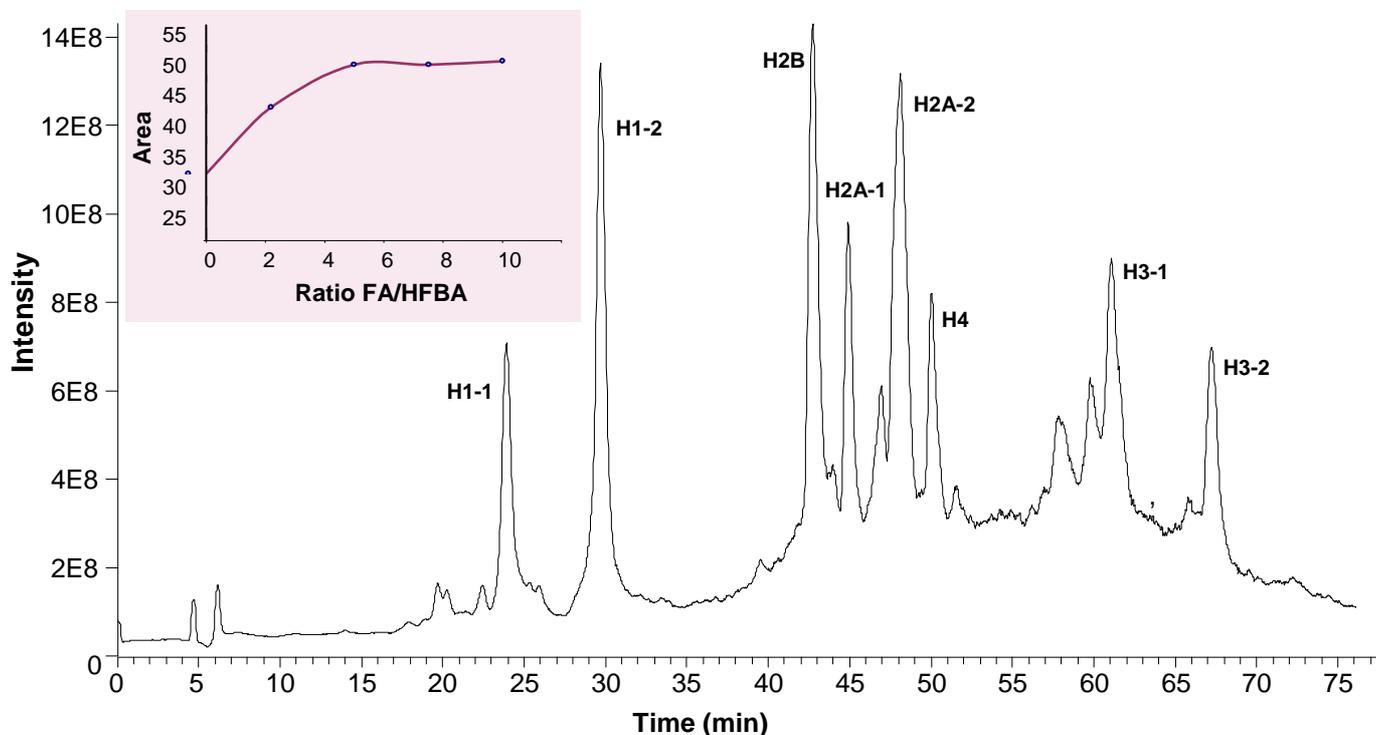


Figura 3.2. Cromatogramma relativo alla separazione cromatografica delle otto classi istoniche. Il gradiente di eluizione è il seguente: da [acqua:HFBA:FA (100:0.04:0.4, v/v/v)]/B [acetonitrile:HFBA:FA (100:0.04:0.4, v/v/v)] 65/35 (v/v), a A/B 30/70 (v/v) in 100 min.

La presenza contemporanea dei due modificatori acidi è cruciale in due distinti momenti dell'analisi: durante la separazione cromatografica e al momento della ionizzazione delle proteine. Una possibile spiegazione del perché HFBA sia importante per garantire una buona separazione cromatografica risiede nella sua capacità di agire da agente di coppia ionica [7]; i gruppi carbossilici di questo acido interagiscono infatti con i gruppi amminici, molto abbondanti, delle proteine istoniche, e in questo modo gli istoni si separano grazie alla diversa affinità della coppia ionica per la fase stazionaria. Successivamente, a livello della sorgente ESI, FA riesce ad

aumentare la ionizzazione e a diminuire la soppressione del segnale perchè essendo presente ad alte concentrazioni spiazza gli istoni dalle coppie ioniche che formano con HFBA.

Infine, applicando le condizioni finali, riportate sia in figura 3.2 che nella parte strumentale, è stata valutata la riproducibilità dei tempi di ritenzione delle varie proteine istoniche; essa è risultata soddisfacente con valori di deviazione percentuale dei tempi compresi tra 0.05 e 1%.

3.2.1.2 Identificazione e quantificazione delle isoforme istoniche

Per caratterizzare gli istoni, determinandone il peso molecolare, e confermare la loro presenza negli estratti nucleari di cellule HT29, il sistema cromatografico è stato accoppiato a spettrometri di massa, come descritto precedentemente nella parte strumentale. Le analisi mediante spettrometria di massa sono essenziali poiché le varie isoforme istoniche, ovvero proteine istoniche che differiscono per la presenza di una o più modifiche post-traduzionali (acetilazioni, fosforilazioni e metilazioni), non vengono separate tra loro con il metodo cromatografico sopra descritto; in corrispondenza di ogni picco cromatografico co-eluiscono quindi le diverse isoforme di ogni singolo istone: questo perché modificazioni come metilazioni e acetilazioni influenzano scarsamente il tempo di ritenzione delle proteine. Lo spettrometro di massa, lavorando in modalità full-scan, permette di rivelare contemporaneamente le varie isoforme istoniche e determinarne il corrispondente peso molecolare. Avremo quindi una separazione in due dimensioni: cromatograficamente si separano le diverse classi istoniche mentre a livello dell'analizzatore dello spettrometro di massa, in questo caso una trappola ionica, verranno separate tra di loro, in base al diverso rapporto m/z , le varie isoforme istoniche.

Allo scopo di validare il metodo proposto per identificare le isoforme istoniche con lo spettrometro di massa avente come analizzatore la trappola ionica, sono state effettuate analisi parallele con un altro spettrometro avente come analizzatore un quadrupolo accoppiato a un tempo di volo (Q-TOF), che notoriamente è dotato di una migliore capacità risolutiva. La separazione cromatografica, che precede l'analisi con i due spettrometri di massa, rimane comunque la stessa. In figura 3.3 (a e b) sono riportati gli spettri di massa multicarica, caratteristici delle proteine, che si ricavano in corrispondenza dell'apice del picco cromatografico, in questo caso corrispondente all'istone H4, ottenuti sia con il Q-TOF (a) che con la trappola ionica (b). Già osservando lo spettro di massa si può notare che il Q-TOF è dotato di una maggiore capacità risolutiva rispetto alla trappola ionica. Nella figura 3.3 sono indicati con dei numeri gli stati di carica mentre con le lettere

(A e B) sono indicati i segnali di m/z corrispondenti alle isoforme più abbondanti, in questo caso dell'istone H4.

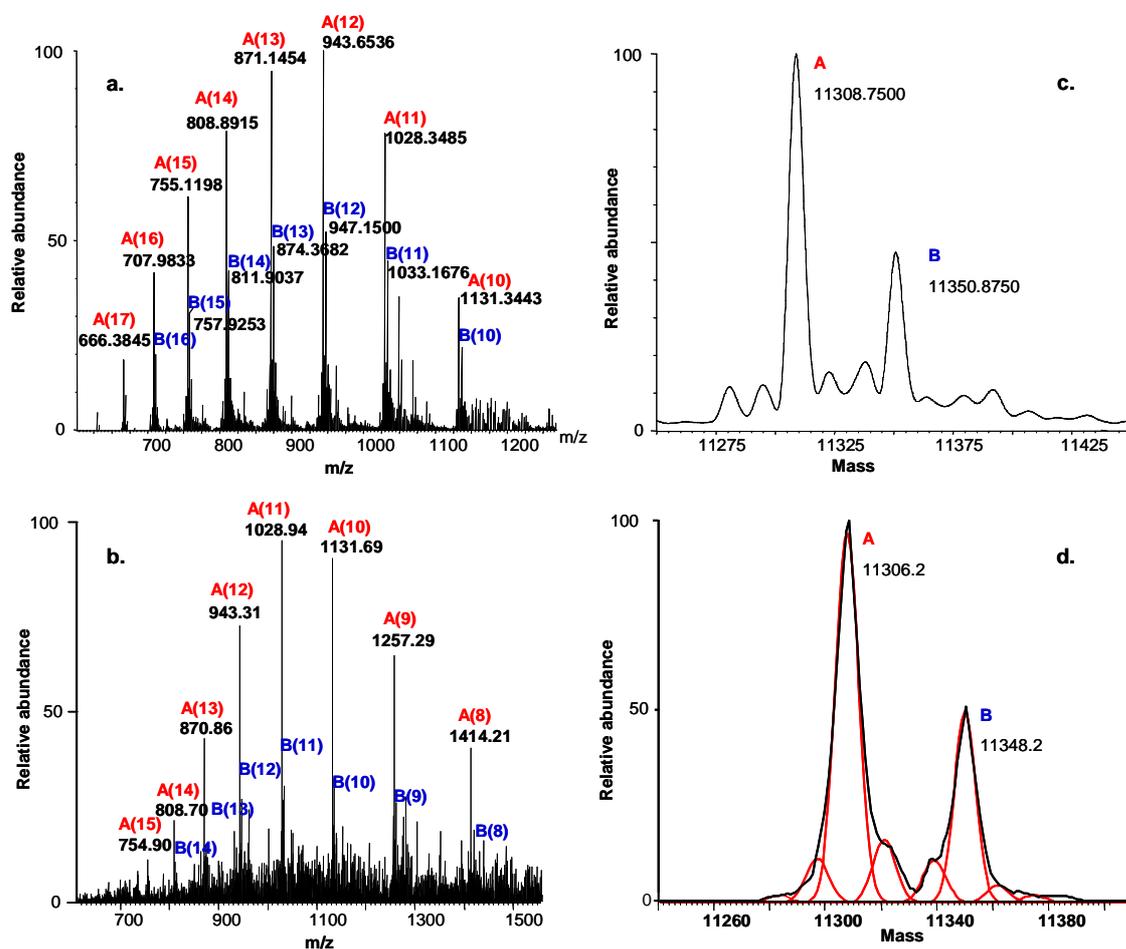


Figura 3.3. Nelle figure a e b sono riportati gli spettri di massa multicarica acquisiti, sia con il Q-TOF (a) che con la trappola ionica (b), in corrispondenza dell'apice del picco cromatografico che eluisce a 50 minuti e identificato come istone H4. Come si può osservare i segnali m/z cadono nell'intervallo 500-1500. Nello spettro di massa multicarica si possono notare i diversi stati di carica corrispondenti alla stessa proteina indicati con il numero, mentre con le lettere sono stati indicati i segnali relativi alle isoforme più abbondanti, in questo caso A e B, che coeluiscono nello stesso picco cromatografico. Da questi spettri di massa multicarica si ottengono, grazie a software di deconvoluzione, le trasformate (c e d) che, oltre ad indicare i pesi molecolari delle isoforme più abbondanti, forniscono anche una rappresentazione grafica delle loro abbondanze.

Da questi spettri di massa è possibile risalire, grazie a dei software di deconvoluzione, che si basano su algoritmi matematici, al peso molecolare della proteina intatta; gli stessi software permettono di ricavare lo spettro deconvoluto o trasformata che, in questo caso, ci fornisce una rappresentazione grafica dell'abbondanza delle varie isoforme (fig. 3c e 3d). I software utilizzati sono stati, nel caso delle analisi al Q-TOF, Mass Lynx e, per le analisi alla trappola ionica, MagTran 1.0. Anche osservando gli spettri deconvoluti si può notare la maggiore risoluzione che contraddistingue il Q-TOF, sebbene l'andamento sia del tutto analogo a quello ottenuto con analisi alla trappola ionica.

Nelle tabelle 3.I e 3.II sono elencati i pesi molecolari delle varie isoforme istoniche. La modificazione post-traduzionale viene identificata dal delta di massa osservato tra un'isoforma e l'altra; delta di massa di 42 Da corrisponderà infatti ad acetilazioni, di 14 Da a metilazioni mentre di 80 Da indica la presenza di fosforilazioni. Per alcune classi istoniche l'attribuzione della modifica post-traduzionale risulta univoca, un po' per le conoscenze acquisite dalla letteratura, come nel caso dell'istone H4 che è stato largamente caratterizzato con diverse tecniche analitiche, un po' perché non sono state individuate numerose isoforme, come nel caso dell'istone H2A-1. Nel caso degli istoni H2B e H3 (I e II) invece le analisi allo spettrometro di massa ci forniscono delle trasformate, anche ben risolte (fig. 4) ma che presentano segnali che differiscono tra loro sempre di 14 Da. Purtroppo i primi due segnali (B e C) che differiscono di 14 Da possono essere attribuiti a metilazioni ma, dal terzo segnale (D) in poi va considerato che ogni segnale può anche corrispondere ad una acetilazione ($14 \times 3 = 42$ Da); ad esempio in figura 4 il segnale D potrebbe rappresentare sia la metilazione dell'isoforma avente massa 13789 Da (C) ma anche l'acetilazione dell'isoforma avente massa 13761 Da (A). Per questo motivo nelle tabelle relative agli istoni H2B e H3 (I e II) quando vengono descritte le modifiche post-traduzionali sono riportate più opzioni.

Sebbene la trappola ionica fornisca una minore precisione nella determinazione delle masse molecolari delle varie isoforme, i loro pesi molecolari sono stati identificati con soddisfacente accuratezza e riproducibilità ($RSD < \pm 4\%$); anche le abbondanze percentuali delle varie isoforme istoniche seguono lo stesso andamento con entrambe le tecniche utilizzate. La trappola ionica è comunque dotata anche di minore sensibilità e non rende possibile quantificare le isoforme meno abbondanti; il software MagTran ha un altro limite nel poter identificare e quantificare non più di otto isoforme ad analisi e, purtroppo, per proteine come gli istoni soggette a numerose modificazioni contemporanee, e quindi come numerose isoforme, ciò può costituire un limite.

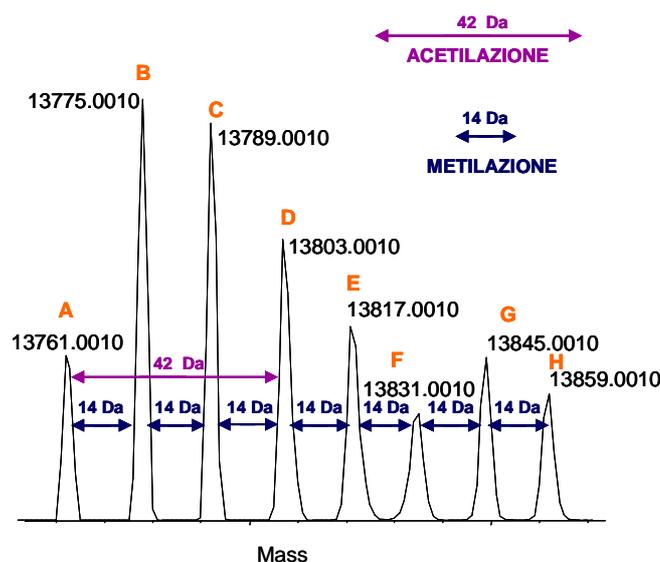


Figura 3.4. Trasformata relativa all'istone H2B ottenuta mediante analisi LC-ESI-Q-TOF:

Analizzando cellule HT29 si può osservare che l'isoforma più abbondante dell'istone H4 (fig. 3.3 e tab. 3.II) è quella mono-acetilata e di-metilata (11.306 Da, 52%). Gli altri segnali sono stati assegnati alle seguenti isoforme: H4 mono-acetilato (11.279 Da), H4 mono-acetilato e mono-metilato (11.292 Da), H4 di-acetilato (11.320 Da), H4 di-acetilato e mono-metilato (11.335 Da), H4 di-acetilato e di-metilato (11.348 Da), che è il secondo picco in ordine di abbondanza percentuale, H4 tri-acetilato (11.362 Da) e H4 tri-acetilato e mono-metilato (11.377 Da) (tab. 3.II). L'istone H4 con tre acetilazioni e due metilazioni (11.390 Da) è stato determinato solo con il Q-TOF, che come detto prima risulta più sensibile della trappola ionica.

Per validare il metodo proposto sono stati utilizzati i dati in tabella 3.II, relativi ai risultati ottenuti per gli istoni H3 sia con analisi alla trappola ionica che al Q-TOF. La varianza dei valori di massa molecolare ottenuti con il Q-TOF è risultata inferiore a quella relativa alle analisi con la trappola ionica. Comunque applicando il test F, la differenza non è risultata significativa a livello di probabilità del 5%.

Tabella 3.I. Nella tabella sono riportati i pesi molecolari delle varie isoforme istoniche, appartenenti alle classi istoniche H1, H2A e H2B, ottenuti mediante analisi indipendenti al Q-TOF e alla trappola ionica. Sono inoltre riportati i valori delle abbondanze percentuali delle isoforme stesse ottenuti in questo caso solo con la trappola ionica. Ac, Acetilazione (+42); P, fosforilazione (+80); Me, metilazione (+14).

Istone	Q-TOF	Trappola Ionica	Interpretazione	Trappola ionica
	Massa trovata (Da) ± SD	Massa trovata (Da) ± SD		Abbondanza % ± SD
H1-1	22492.31 ± 0.70	22492.0 ± 1.4	H1-1	44 ± 0.1
	22520.11 ± 0.55	22519.7 ± 1.9	H1-1 + 2Me	28 ± 0.1
	22573.02 ± 0.21	22572.5 ± 2.1	H1-1 + 1P	14 ± 0.1
	22599.51 ± 0.31	22599.2 ± 1.6	H1-1 + 2Me +1P	13 ± 0.1
	22652.01 ± 0.29	22651.7 ± 0.9	H1-1 +2P	1 ± 0.9
H1-2	21278.01 ± 0.87	21277.2 ± 1.2	H1-2	70 ± 1.0
	21356.98 ± 0.99	21357.3 ± 1.4	H1-2 + 1P	30 ± 1.0
H2B	13761.53 ± 0.40	13760.6 ± 0.8	H2B	9 ± 1.8
	13776.60 ± 0.40	13775.0 ± 1.3	1Me	25 ± 3.8
	13790.63 ± 0.54	13788.3 ± 2.1	2Me	25 ± 3.9
	13805.98 ± 0.49	13802.6 ± 2.5	3 Me o 1Ac	16 ± 2.5
	13819.75 ± 0.55	13817.5 ± 2.2	4 Me o 1Ac+ 1Me	11 ± 1.9
	13831.74 ± 0.16	13832.0 ± 2.9	5 Me o 1Ac+ 2Me	6 ± 2.5
	13846.50 ± 0.34	13845.6 ± 3.3	6 Me o 1Ac+ 3Me o 2Ac	4 ± 1.2
	13860.31 ± 0.43	13859.9 ± 2.1	7 Me o 1Ac+ 4Me o 2Ac+1Me	4 ± 2.1
H2A-1	14008.29 ± 0.61	14007.3 ± 1.1	H2A-1	77 ± 1.2
	14020.65 ± 0.75	14020.9 ± 0.2	H2A-1 + 1Me	11 ± 1.2
	14049.45 ± 0.55	14049.4 ± 0.8	H2A-1 + 1Ac	4 ± 1.3
	14088.44 ± 0.67	14086.8 ± 2.1	H2A-1 + 1Me + 1 Ac	8 ± 0.7
H2A-2	14004.51 ± 0.37	14004.3 ± 0.4	H2A-2	42 ± 1.2
	14019.55 ± 0.12	14018.7 ± 1.6	H2A-2 + 1Me	26 ± 0.6
	14032.26 ± 0.12	14031.9 ± 1.0	H2A-2 + 2Me	8 ± 0.5
	14047.96 ± 0.24	14047.3 ± 0.6	H2A-2 + 1Ac	18 ± 0.2
	14061.38 ± 0.03	14061.1 ± 1.1	H2A-2 +1 Me+1Ac	6 ± 1.1
	14084.50 ± 0.22	14087.5 ± 1.3	H2A-2 + 2Ac	0 ± 0.00

I risultati relativi alla determinazione delle masse molecolari delle isoforme istoniche, ottenuti con entrambe i metodi, sono stati analizzati statisticamente mediante un test significativo (*t*-test) al livello di confidenza del 95% ($P=0.05$) [8].

Tabella 3.II. Nella tabella sono riportati I pesi molecolari delle varie isoforme istoniche, appartenenti alle classi istoniche H3 e H4, ottenuti mediante analisi indipendenti al Q-TOF e alla trappola ionica. Sono inoltre riportati i valori delle abbondanze percentuali delle isoforme stesse ottenuti in questo caso solo con la trappola ionica. Ac, Acetilazione (+42); P, fosforilazione (+80); Me, metilazione (+14).

Istone	Q-TOF	Trappola ionica	Interpretazione	Trappola ionica
	Massa trovata (Da) ± SD	Massa trovata (Da) ± SD		Abbondanza% ± SD
H4	11279.94 ± 0.46	11279.2 ± 0.9	H4 + 1 Acet	3 ± 1.9
	11293.89 ± 0.43	11292.8 ± 0.9	H4 + 1 Acet + 1Met	5 ± 0.9
	11307.92 ± 0.43	11306.2 ± 1.5	H4 + 1 Acet + 2Met	52 ± 1.0
	11321.70 ± 0.34	11320.9 ± 0.8	H4 + 2 Acet	10 ± 0.8
	11334.22 ± 0.56	11335.1 ± 1.0	H4 + 2 Acet + 1Met	5 ± 1.9
	11349.81 ± 0.44	11348.2 ± 1.4	H4 + 2 Acet + 2Met	21 ± 0.5
	11363.48 ± 0.45	11362.2 ± 1.1	H4 + 3 Acet	3 ± 0.6
	11376.88 ± 0.78	11376.6 ± 1.6	H4 + 3 Acet + 1Met	1 ± 1.0
	11389.17 ± 0.76	11390.4 ± 0.8	H4 + 3 Acet + 2Met	0 ± 0.0
11404.16 ± 1.46	11405.1 ± 1.4	H4 + 3 Acet + 3Met	0 ± 0.0	
H3-1	15271.90 ± 1.28	15271.9 ± 2.6	H3-1	4 ± 3.1
	15288.10 ± 1.57	15286.1 ± 2.0	H3-1+ 1Me	7 ± 2.9
	15302.1 ± 1.49	15300.2 ± 1.9	H3-1+ 2Me	13 ± 2.0
	15316.83 ± 1.19	15313.8 ± 2.3	H3-1+ 3 Me o 1Ac	20 ± 3.4
	15330.83 ± 1.19	15327.9 ± 1.5	H3-1+ 4 Me o 1Ac+1Me	22 ± 3.9
	15344.47 ± 1.38	15342.3 ± 2.0	H3-1+ 5 Me o 1Ac+2Me	17 ± 3.1
	15358.55 ± 1.19	15355.7 ± 2.1	H3-1+ 6 Me o 1Ac+3Me o 2Ac	10 ± 3.0
15372.55 ± 1.29	15370.0 ± 2.3	H3-1+ 7 Me o 1Ac+4Me o 2Ac+1Me	7 ± 3.8	
H3-2	15304.23 ± 1.27	15303.8 ± 2.1	H3-2	4 ± 2.8
	15318.78 ± 1.18	15318.3 ± 1.8	H3-2+ 1Me	10 ± 2.4
	15332.89 ± 1.13	15332.9 ± 1.2	H3-2+ 2Me	17 ± 2.9
	15346.81 ± 1.18	15346.3 ± 1.2	H3-2+ 3 Me o 1Ac	23 ± 2.2
	15360.80 ± 1.26	16361.3 ± 1.8	H3-2+ 4 Me o 1Ac+1Me	17 ± 2.8
	15374.76 ± 0.95	15375.4 ± 1.0	H3-2+ 5 Me o 1Ac+2Me	14 ± 1.2
	15389.07 ± 1.02	15388.9 ± 2.1	H3-2+ 6 Me o 1Ac+3Me o 2Ac	10 ± 1.9
15402.64 ± 1.04	15402.0 ± 2.0	H3-2+ 7 Me o 1Ac+4Me o 2Ac+1Me	5 ± 1.0	

Le analisi statistiche sono state quindi condotte confrontando i risultati ottenuti mediante analisi alla trappola ionica con quelli ottenuti con il metodo di riferimento al Q-TOF. Nel caso dell'istone H3, le abbondanze relative delle otto isoforme più abbondanti non differiscono significativamente ($P = 0.05$) nelle due analisi.

Tabella 3.III Nella tabella sono riportati sia le masse molecolari sia le abbondanze relative delle isoforme degli istoni H3, ottenuti con il Q-TOF e la trappola ionica. I dati riportati sono stati utilizzati per effettuare il *t*-test e convalidare il metodo con la trappola ionica.

Istone	Q-TOF	Trappola ionica	Q-TOF	Trappola ionica
	Massa trovata (Da) \pm SD	Massa trovata (Da) \pm SD	Abbondanza% \pm SD	Abbondanza% \pm SD
H3-1	15271.90 \pm 1.28	15271.9 \pm 2.6	4 \pm 1.5	4 \pm 3.1
	15288.10 \pm 1.57	15286.1 \pm 2.0	10 \pm 0.3	7 \pm 2.9
	15302.1 \pm 1.49	15300.2 \pm 1.9	13 \pm 0.5	13 \pm 2.0
	15316.83 \pm 1.19	15313.8 \pm 2.3	15 \pm 0.6	20 \pm 3.4
	15330.83 \pm 1.19	15327.9 \pm 1.5	17 \pm 1.0	22 \pm 3.9
	15344.47 \pm 1.38	15342.3 \pm 2.0	14 \pm 0.5	17 \pm 3.1
	15358.55 \pm 1.19	15355.7 \pm 2.1	14 \pm 0.3	10 \pm 3.0
	15372.55 \pm 1.29	15370.0 \pm 2.3	12 \pm 0.5	7 \pm 3.8
H3-2	15304.23 \pm 1.27	15303.8 \pm 2.1	8 \pm 0.3	4 \pm 2.8
	15318.78 \pm 1.18	15318.3 \pm 1.8	10 \pm 0.5	10 \pm 2.4
	15332.89 \pm 1.13	15332.9 \pm 1.2	13 \pm 0.5	17 \pm 2.9
	15346.81 \pm 1.18	15346.3 \pm 1.2	23 \pm 0.3	23 \pm 2.2
	15360.80 \pm 1.26	16361.3 \pm 1.8	14 \pm 0.7	17 \pm 2.8
	15374.76 \pm 0.95	15375.4 \pm 1.0	12 \pm 0.4	14 \pm 1.2
	15389.07 \pm 1.02	15388.9 \pm 2.1	11 \pm 0.3	10 \pm 1.9
	15402.64 \pm 1.04	15402.0 \pm 2.0	9 \pm 0.6	5 \pm 1.0

Quindi utilizzando il metodo LC-ESI-MS descritto, validato mediante confronto con il metodo di riferimento al Q-TOF, abbiamo concluso che l'estratto nucleare da cellule HT29 contiene le seguenti proteine istoniche: H1-1, H1-2, H2A-1, H2A-2, H2B, H3-1, H3-2, H4. Nelle tabelle 3.I e 3.II sono inoltre riportate le isoforme appartenenti ad ogni classe istonica, caratterizzate sia in termini di massa molecolare sia in termini di abbondanza relativa. Gli istoni H1 sono stati quindi trovati sia metilati che fosforilati, gli H2B, H3 e H4 possono essere metilati o acetilati e gli H2A metilati, acetilati e fosforilati.

3.3 Identificazione dei siti di acetilazione sull'istone H4

3.3.1 Risultati e discussione

3.3.1.1 Separazione e raccolta degli istoni

Le analisi sulle proteine istoniche intatte ci consentono di identificare e quantificare le isoforme istoniche, che differiscono tra di loro a seguito delle diverse modifiche post-traduzionali. Per poter individuare quali specifici amminoacidi sono coinvolti in tali modifiche è necessario sottoporre gli istoni a digestione enzimatica e successivamente analizzare la miscela di peptidi mediante tecniche di spettrometria di massa.

A tale scopo gli istoni estratti da cellule HT29 sono stati separati mediante cromatografia a fase inversa; nella figura 3.5 è riportato il cromatogramma relativo a tale separazione. In questo caso gli istoni, separati cromatograficamente, sono stati inviati, grazie a una valvola a T, sia allo spettrometro di massa avente come analizzatore la trappola ionica, sia a un rivelatore UV a 215 nm, che corrisponde al massimo di assorbimento di queste proteine.

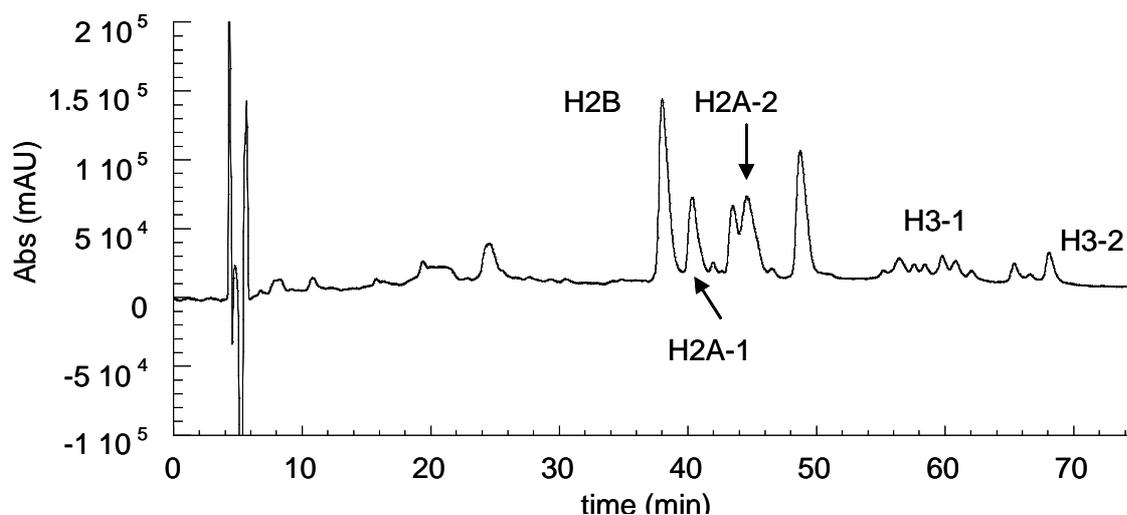


Figura 3.5. Cromatogramma relativo alla separazione degli istoni mediante cromatografia a fase inversa e analisi al rivelatore UV a 215 nm. Il gradiente di eluizione è il seguente: da [acqua:HFBA (100:0.04, v/v)]/B [acetonitrile:HFBA (100:0.04, v/v)] 60/40 (v/v), a A/B 38/62 (v/v) in 110 min. Il flusso è 400 μ L/min.

L'analisi contemporanea con lo spettrometro di massa ci ha permesso di identificare le proteine istoniche. Le condizioni cromatografiche sono state cambiate rispetto alle analisi con il solo spettrometro di massa perchè l'alta percentuale di FA, a basse lunghezze d'onda, interferisce con l'analisi; per questo motivo nella fase mobile è presente solo HFBA che, comunque, come detto precedentemente, garantisce la separazione alla linea di base delle otto classi di proteine istoniche.

Le frazioni corrispondenti ai singoli istoni sono state raccolte e portate a secco sotto vuoto. Prima di procedere alla digestione enzimatica la purezza delle varie frazioni è stata verificata mediante SDS-PAGE (fig. 6).

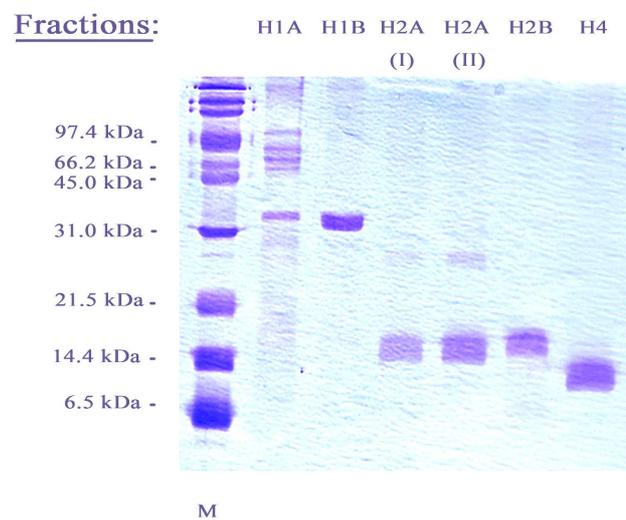


Figura 3.6. Verifica della purezza delle frazioni corrispondenti alle proteine istoniche mediante SDS-PAGE.

3.3.1.2 Digestione dell'istone H4 ed analisi MALDI-TOF del digerito

La digestione enzimatica dell'istone H4 è stata condotta con due diversi enzimi proteolitici. In un primo momento è stata utilizzata la tripsina, enzima che viene comunemente usato per questo tipo di analisi e che è in grado di idrolizzare i legami peptidici a livello delle estremità C-terminali degli amminoacidi lisina ed arginina. Successivamente è invece stato utilizzato l'enzima proteolitico *Endoproteinase Arg-C* che taglia selettivamente a livello dei residui di arginina.

Nella figura 3.7 è riportato lo spettro di massa ottenuto allo spettrometro MALDI-TOF analizzando i peptidi dell'istone H4 che derivano dalla digestione con tripsina.

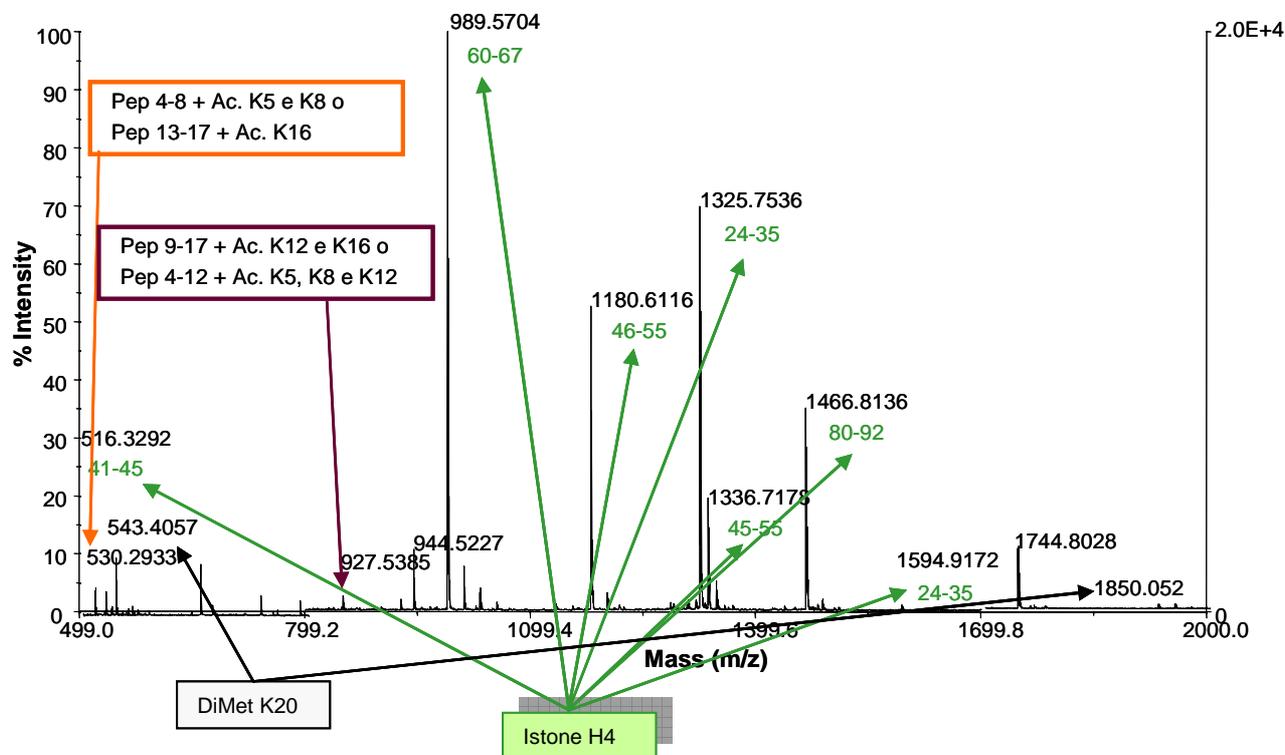


Figura 7. Analisi MALDI-TOF dell'istone H4 digerito con tripsina.

riportando in ascisse i valori di m/z e in ordinate le abbondanze percentuali. Le analisi allo spettrometro MALDI-TOF producono quasi sempre ioni a singola carica, per cui i valori di m/z corrispondono al valore di massa molecolare del peptide più un idrogeno ($m+1$). In questo spettro si possono osservare i segnali corrispondenti ai peptidi che derivano dalla digestione con tripsina e che sono caratterizzati da diversi valori di m/z a seconda della loro sequenza amminoacidica. I segnali indicati con le frecce verdi corrispondono a quei peptidi le cui masse molecolari corrispondono a quelle ottenute dalla digestione teorica dell'istone H4 con tripsina, e che sono riportate in banca dati. Le frecce verdi indicano comunque peptidi che non sono soggetti a modifiche post-traduzionali. Quando è presente una modifica post-traduzionale il peso molecolare

del peptide corrisponde al peso molecolare di quel peptide più il peso molecolare della specifica modificazione a cui è soggetto. Il segnale a 927.5385 Da, ad esempio, può corrispondere sia al peptide 9-17 (843.5174 Da) con due acetilazioni, che al peptide 4-12 (801.5068 Da) con tre acetilazioni. Entrambe queste ipotesi sono plausibili perché nelle sequenze indicate e riportate in figura 3.8 (a) sono presenti i possibili siti di acetilazione che sono, per il peptide 9-17, le lisine 12 e 16, mentre per il peptide 4-14, le lisine 5, 8 e 12.

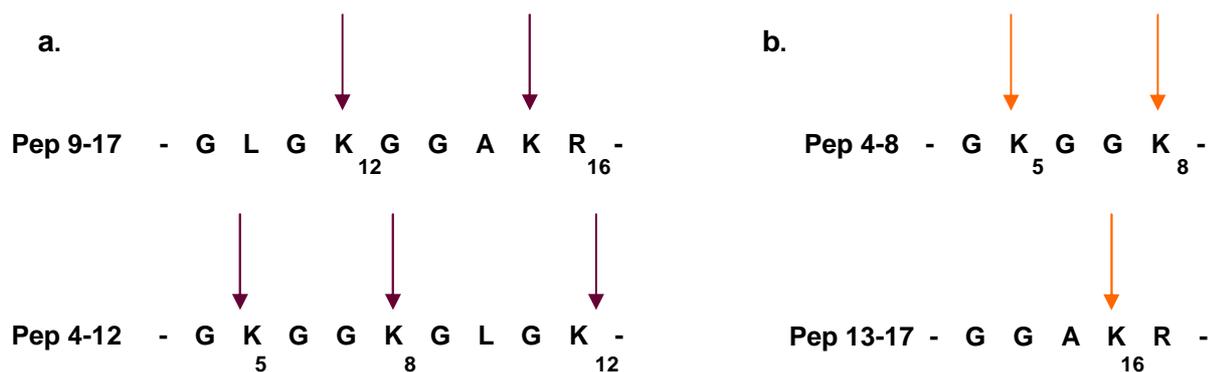


Figura 3.8. Sequenza e possibili siti di acetilazione dei peptidi avente massa molecolare 927.5385 (a.) e 530.2933 (b.)

Anche il segnale a 530.2933 può corrispondere sia al peptide 4-8 acetilato a livello delle lisine 5 e 8, oppure al peptide 13-17 acetilato a livello della lisina 16 (fig. 8 b.). Infine in figura sono anche indicati i segnali relativi alla di-metilazione dell'istone H4; in questo caso l'attribuzione dell'amminoacido interessato è univoca perché nei peptidi indicati è presente solo una lisina (K 20). Questo dato conferma le informazioni che erano state ottenute analizzando l'istone H4 intatto; infatti nelle tabelle che riportano le abbondanze relative delle sue isoforme si può notare che le isoforme più abbondanti erano comunque quelle di-metilate (11.306 e 11.348 Da).

L'analisi dell'istone H4 digerito con la tripsina ci ha permesso quindi di concludere che le acetilazioni avvengono a livello della coda N-terminale ma non consentono di determinare su quale specifico residuo amminoacidico. Inoltre, come si può osservare dallo spettro di massa, i segnali relativi ai peptidi che recano le modifiche post-traduzionali sono poco intensi rispetto agli altri; questo fenomeno può essere spiegato considerando i siti di taglio caratteristici della tripsina e le

caratteristiche delle proteine istoniche. L'istone H4, in particolare, è infatti ricco di residui di lisina, specie a livello della coda N-terminale, quindi i peptidi che si generano dopo taglio della tripsina saranno molto piccoli e quindi difficili da analizzare con questa tecnica.

Per ottenere peptidi più lunghi e quindi segnali più intensi si è deciso di digerire l'istone H4 con l'enzima proteolitico *Endoproteinase Arg-C* che taglia solo a livello dei residui di arginina. In figura 3.9 è riportato lo spettro che si è così ottenuto analizzando il dell'istone H4 al MALDI-TOF.

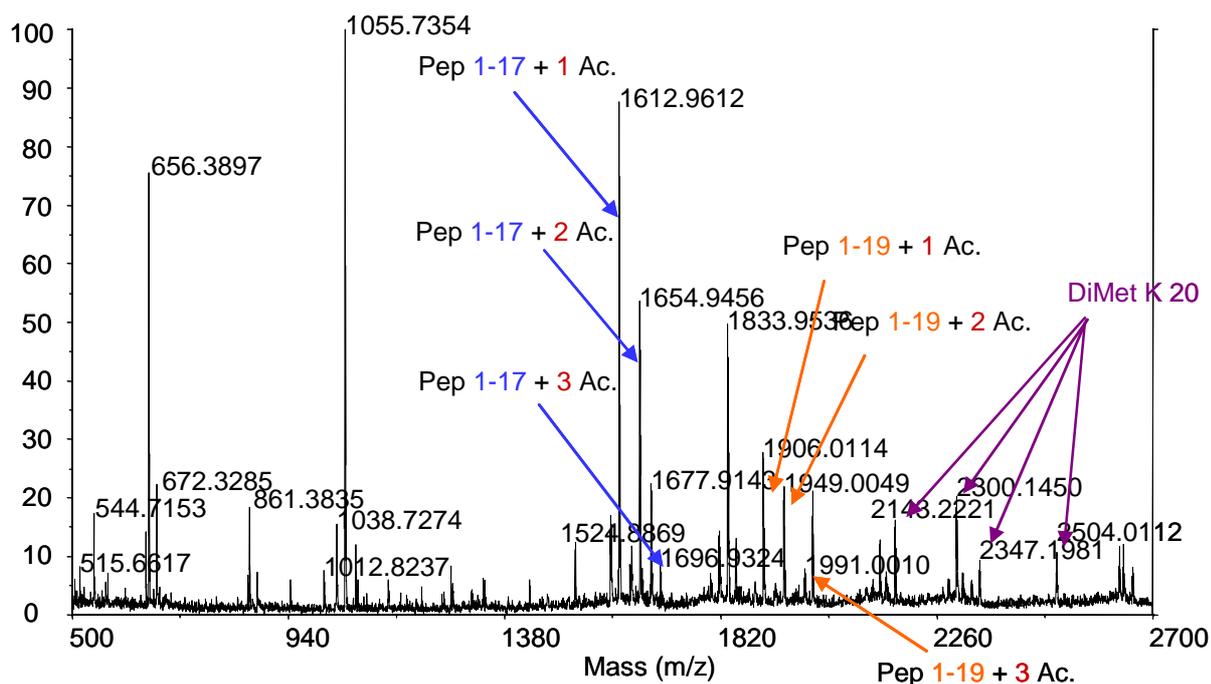


Figura 3.9. Analisi MALDI-TOF dell'istone H4 digerito con l'endoproteinasi Arg-C.

Nella figura si può effettivamente notare che la digestione con l'*Endoproteinasi Arg-C* genera peptidi più lunghi e i corrispondenti segnali sono più intensi. Sono stati identificati diversi peptidi arrecanti modifiche post-traduzionali: il peptide 1-17 e il peptide 1-19, che sono stati individuati nelle forme mono- di- e tri-acetilate; infatti i segnali indicati dalle frecce differiscono tra loro di 42 Da, che corrisponde al peso molecolare di una acetilazione. Nella figura 3.10 sono riportati i possibili siti di acetilazione di questi due peptidi, che corrispondono alle lisine 5, 8, 12 e 16.

3.3.1.3 Analisi LC/MSMS della miscela peptidica

La miscela di peptidi ottenuta dalla digestione dell'istone H4 mediante trattamento con l'enzima *Endoproteinase Arg-C* è stata analizzata mediante un metodo LC-ESI-MS/MS. E' stato scelto di utilizzare questo enzima per la digestione perché consente di ottenere peptidi di dimensioni maggiori e quindi più facilmente rivelabili.

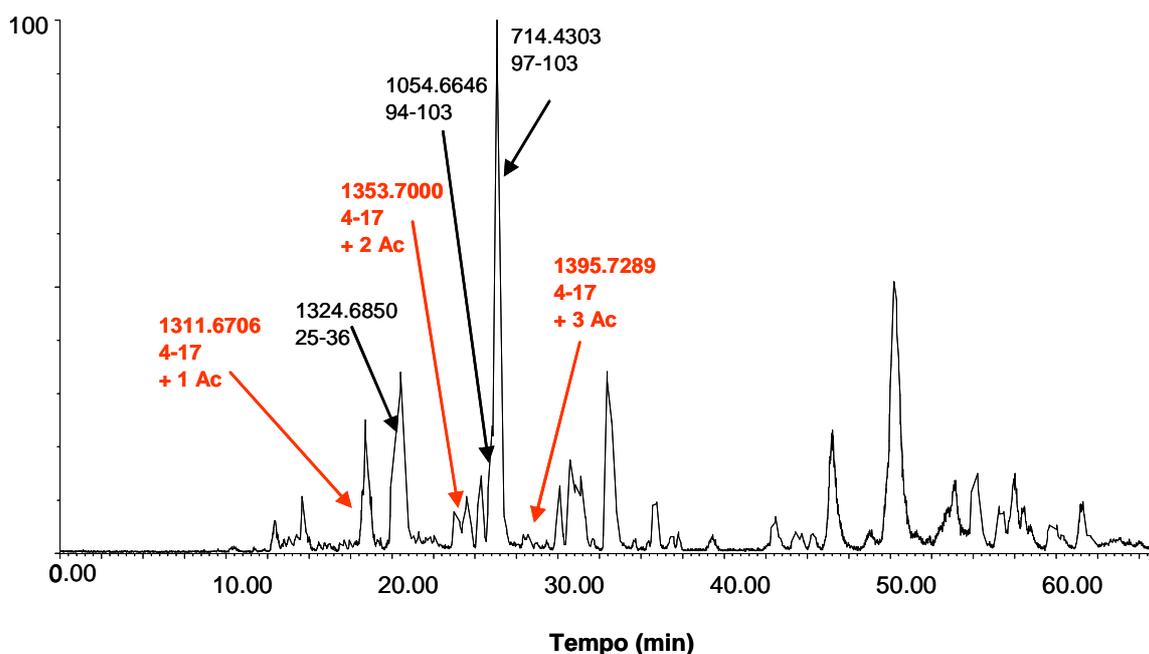


Figura 3.11. Separazione cromatografica dei peptidi ottenuti dalla digestione dell'istone H4 con l'enzima endoproteinasasi Arg-C. Il gradiente di eluzione è il seguente: da [acqua:FA (100:0.1 v/v)]/B [acetonitrile:FA (100:0.1, v/v)] 95/5 (v/v), a A/B 40/60 (v/v) in 100 min.

I peptidi sono stati in un primo momento separati cromatograficamente e poi analizzati mediante uno spettrometro di massa ESI-Q-TOF. Per la separazione cromatografica è stata scelta una colonna analitica C18; i peptidi sono stati prima intrappolati su una precolonna che ha la funzione di concentrare il campione e di preservare la pulizia della colonna.

Come fasi mobili sono state utilizzate acqua e acetonitrile, e come modificatore acido FA. La separazione dei peptidi è stata ottenuta impostando un gradiente crescente di fase organica. Nel cromatogramma riportato in figura 3.11 si può osservare la separazione ottenuta.

Per risalire al peso molecolare dei peptidi sottesi ad ogni picco cromatografico si può acquisire lo spettro di massa corrispondente al picco stesso. In figura 3.12, ad esempio, è riportato lo spettro di massa acquisito in corrispondenza del picco cromatografico con tempo di ritenzione di 18 minuti.

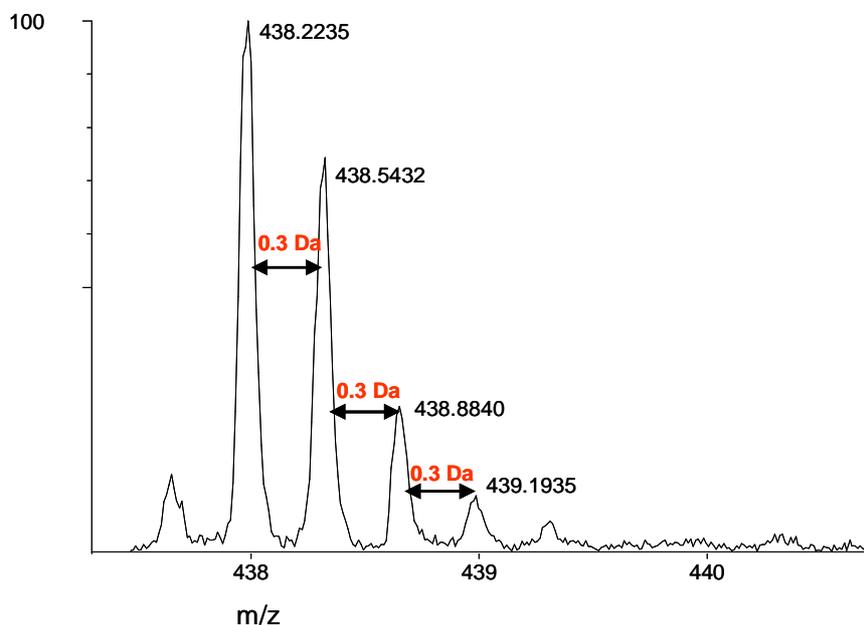


Figura 3.12. Spettro di massa corrispondente al picco cromatografico avente tempo di ritenzione di 18 minuti e corrispondente al peptide 4-17 mono-acetilato.

Osservando lo spettro di massa e la distanza tra i segnali corrispondenti agli isotopi del carbonio si può risalire allo stato di carica del peptide; in questo caso dato che i segnali differiscono di circa 0.3 Da lo stato di carica del peptide è 3 e il suo reale peso molecolare è 1.311,6706 Da che corrisponde al peso molecolare del peptide della coda N-terminale dell'istone H4 (1.269,7702 Da), mono-acetilato.

In questo modo possono essere calcolati i pesi molecolari di tutti i peptidi presenti nella miscela analizzata. In figura sono indicati sia i picchi relativi a peptidi che non hanno modifiche post-traduzionali (in nero) sia i picchi che sono risultati acetilati (rosso).

Lo strumento, oltre a determinare la massa molecolare dei peptidi tali e quali, è anche in grado di frammentarli e di determinare per ognuno di essi un caratteristico spettro di MS/MS nel quale sono riportati i segnali relativi agli ioni frammento. Le analisi sono state impostate in modo da frammentare tutti i peptidi la cui intensità di segnale supera un valore soglia.

In figura 3.13 è riportato lo spettro MSMS del peptide avente peso molecolare 1.311,6706 Da che come abbiamo detto, corrisponde al peptide 4-17 mono-acetilato. Analizzando questo spettro si può risalire alla sequenza del peptide e si può anche individuare quale amminoacido è eventualmente acetilato.

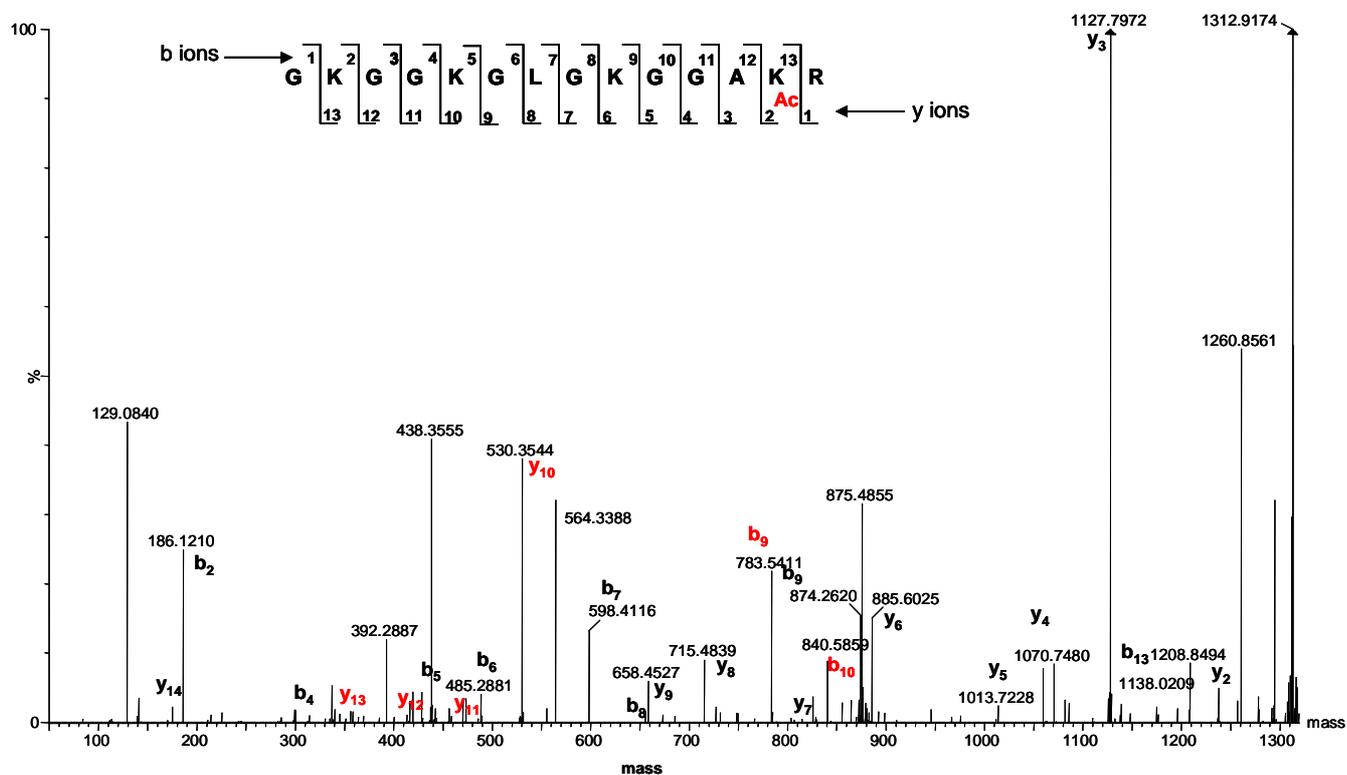


Figura 3.13. Spettro MSMS relativo alla frammentazione del peptide avente peso molecolare 1311.6706. Con le lettere è indicato il tipo di frammento che può conservare la carica sull'estremità C-terminale (frammenti y) o N-terminale (frammenti b).

In questo caso il sequenziamento è stato effettuato sottoponendo il file con tutti i valori delle masse molecolari dei peptide intatto e degli ioni frammento in banca dati on-line (Mascott). L'analisi in banca dati ha successivamente confrontato i valori sottomessi con quelli che derivano dalle frammentazioni teoriche dei peptidi dell'istone H4 e ha stabilito che l'acetilazione, nel caso del peptide 4-17, avviene a livello della lisina 16. Nella figura 3.13 sono riportati tutti gli ioni, y e b, che corrispondono a quelli che derivano dalla digestione teorica. Il peptide 4-17 comprende tutte le

lisine della coda N-terminale che potrebbero essere soggette ad acetilazione, quindi è possibile concludere che quando l'istone H4 delle cellule HT29 è mono-acetilato, questa acetilazione è localizzata a livello della lisina 16.

Lo stesso approccio è stato utilizzato per analizzare anche il peptide 4-17 con due acetilazioni e le analisi ci hanno permesso di stabilire che la seconda acetilazione avviene a livello della lisina 12.

Infine per quanto riguarda il peptide tri-acetilato l'attribuzione della terza lisina non è risultata univoca, dato che questo peptide è poco abbondante e così anche i segnali che derivano dalla sua frammentazione. I risultati che si ottengono comunque dalla banca dati fanno pensare che quando l'istone H4 è tri-acetilato queste acetilazioni avvengono a livello delle lisine 16, 12 e 5 o 8.

3.3.1.4 Conclusioni

Concludendo possiamo affermare che le analisi dell'istone H4 dopo digestione con l'enzima proteolitico *Endoproteinase Arg-C* hanno in parte convalidato i risultati ottenuti analizzando la proteina intatta e hanno inoltre fornito ulteriori informazioni fondamentali per caratterizzare questa proteina istonica. Sia dalle analisi del prodotto di digestione con il MALDI-TOF che quelle mediante LC-ESI-MSMS è risultato che peptidi della coda N-terminale (1-17 e 4-17), che contengono tutte le lisine che possono essere acetilate, sono più abbondanti nella forma mono-acetilata, seguita da quella di-acetilata e tri-acetilata, presente in basse percentuali. Questa conclusione era la stessa ottenuta mediante analisi sulla proteina intatta che indicavano come isoforma più abbondante dell'istone H4 quella avente massa molecolare 11.306 Da e che corrispondeva a quella mono-acetilata e di-metilata. Le analisi sul digerito hanno anche permesso di individuare la lisina di-metilata che è risultata essere la lisina 20.

Le analisi in modalità MSMS hanno anche permesso di stabilire una sorta di ordine di acetilazione delle coda N-terminale dell'istone H4 che prevederebbe una prima acetilazione a livello della lisina 16 seguita da acetilazione della lisina 12 e infine quando l'istone è tri-acetilato oltre alle due lisine già indicate si possono trovare alternativamente acetilate anche le lisine 5 e 8.

3.4 Bibliografia

- [1] H. Lindner, B. Sarg, C. Meraner, W. Helliger. *J. Chromatogr. A* **743**, 137 (1996).
- [2] L. Zhang, M.A. Freitas, J. Wickam, M.R. Parthum, M.I. Klisovic, G. Marcucci, J.C. Byrd. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 77 (2004).
- [3] S.C. Galasinski, D.F. Louie, K.K. Gloor, K.A. Resing, N.G. Ahn. *J. Biol. Chem.* **277**, 2579 (2002).
- [4] S.C. Galasinski, K.A. Resing, N.G. Ahn. *Methods* **31**, 3 (2003).
- [5] K. Zhang, H. Thang. *J. Chromatogr. B* **783**, 173 (2003).
- [6] M.C. Garcia. *J. Chromatogr. B* **825**, 111 (2005).
- [7] M.T.W. Hearn. *Ion–Pair Chromatography—Theory and Biological and Pharmaceutical Applications*, Marcel Dekker, New York, 1985.
- [8] J.C. Miller, J.N. Miller. *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1984.

Capitolo 4

Studi di inibizione

4.1 Parte sperimentale

I materiali e i metodi impiegati per estrarre ed analizzare le proteine istoniche sono gli stessi descritti nel paragrafo 3.1. Sono di seguito riportati i materiali e le condizioni relative al trattamento con gli inibitori.

4.1.1 Materiali

Per effettuare gli studi di inibizione sono stati impiegati i seguenti inibitori:

- Il butirrato e il valproato sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).
- Il SAHA e MS-275 sono stati forniti dalla Sigma-tau s.p.a., Pomezia (Roma, Italia).
- MC1855 e MC1568 sono stati forniti dal laboratorio del Prof. Antonello Mai (Università la Sapienza, Roma).

4.1.2 Colture cellulari e trattamento con inibitori

Le cellule sono state cresciute in terreno RMPI, addizionato di siero fetale bovino (FBS) al 10% e di L-glutamina all'1%, a 37 °C e in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Esse sono state inoculate alla densità di 2 x 10⁶ cellule/cm² in piastre Petri da 75 cm² e lasciate aderire per 72 ore.

Per effettuare gli studi di inibizione le cellule sono state trattate a questo punto con i vari inibitori.

Il trattamento con valproato 1mM e butirrato 5mM è durato 6 ore. Con gli altri inibitori (SAHA, MS275, MC1855 e MC1568) sono stati effettuati studi di dose e tempo dipendenza; le cellule sono state trattate con tutti gli inibitori per sei ore a concentrazioni crescenti (5, 25, 50 e 100 µM); successivamente gli inibitori sono stati somministrati alla concentrazione 50 µM per tempi crescenti (1, 4, 6, 8 e 24 ore).

Le cellule sono state staccate dalle piastre Petri mediante il seguente procedimento: dopo due lavaggi con PBS (tampono fosfato costituito da NaCl 8 g/L; Na₂HPO₄ 1.15 g/L; KH₂PO₄ 0.20 g/L e KCl 0.20 g/L) si aggiungono 1-3 mL di una soluzione di tripsina 0.1%-EDTA 0.02% e si lasciano in incubazione per 5 minuti, quindi si tampona la tripsina con terreno fresco; infine si procede con la conta, utilizzando la camera di burker.

4.1.3 Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio dell' MTT

La determinazione della dose inibitrice della crescita nel 50% della popolazione cellulare trattata (IC₅₀) è stata effettuata mediante saggio dell'MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio).

Questo metodo sfrutta una reazione colorimetrica. Il test si basa su una reazione catalizzata dall'enzima mitocondriale succinico deidrogenasi, che trasforma il substrato (MTT) in un sale di formazano, insolubile in acqua. La formazione di questo sale è indice di integrità delle cellule in esame e quindi di vitalità. Le HT-29 sono state inoculate in piastre *multiwell* da 6 pozzetti e, dopo 24 ore di adesione, sono state trattate con concentrazioni crescenti di inibitore (1, 5, 10, 30, 50, 100 e 300 μM) per 24 ore. Al termine del trattamento il terreno è stato rimosso ed è stato aggiunto 1 mL di soluzione di MTT (0,2 mg/mL in PBS) per pozzetto. Dopo 2 ore di incubazione a 37 °C l'MTT è stato eliminato e sono stati aggiunti 2 mL di isopropanolo, che solubilizza i cristalli di sale precipitati. Dopo 20 min in agitazione a temperatura ambiente, è stata effettuata la lettura spettrofotometrica a 570 nm sul surnatante con strumentazione UVIKON 930 (KONTRON). Mettendo in relazione la densità ottica a 570 nm con il logaritmo delle concentrazioni molarie di inibitore e utilizzando il software PRISM PROJECT 3, è stato calcolato il valore di IC_{50} .

4.1.4 Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

Le cellule sono state inoculate alla densità di 10.000 cellule/cm² in piastre Petri. Dopo 24 h d'adesione sono state trattate con concentrazioni crescenti di inibitore, precisamente 10, 20 e 50 μM . A 24 ore dal trattamento, le HT29 di controllo e trattate sono state staccate mediante tripsinizzazione e contate in camera di Burker. Per la preparazione dei campioni, le cellule sono state centrifugate a 240 g per 10 min, a temperatura ambiente. Il pellet è stato lavato due volte in PBS e risospeso in 100 μL di PBS aggiungendo 900 μL di etanolo al 70% freddo. In queste condizioni le cellule sono state fissate e mantenute a -20°C fino al momento della marcatura con il propidio ioduro (PI). Questa è una sonda fluorescente ($\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 639 \text{ nm}$) che s'intercala tra le basi del DNA. L'intensità della fluorescenza emessa è quindi proporzionale alla quantità di DNA presente nella cellula. Al momento della misura i campioni sono stati lavati due volte con PBS e risospesi ad una concentrazione di 10⁶ cellule/mL. Alla sospensione cellulare sono poi stati 10 $\mu\text{g/mL}$ di RNasi (Sigma), e 50 $\mu\text{g/mL}$ di Propidio Ioduro (PI) (Sigma). I campioni, così preparati, sono stati incubati a 37°C per 30 minuti per permettere alle nucleasi di degradare l'RNA cellulare. Il citofluorimetro utilizzato per l'analisi è un Epics Elite (Beckman-Coulter) e per valutare la distribuzione percentuale delle cellule nelle diverse fasi del ciclo sono stati utilizzati i programmi MCycle, MODFIT 5.0.

4.2 Valutazione dell'azione di inibitori delle HDAC

4.2.1 Risultati e discussione

Il metodo messo a punto e convalidato per separare le proteine istoniche, identificarne e quantificarne le isoforme è stato applicato all'analisi di istoni estratti da cellule HT29 trattate con diversi inibitori delle HDAC, con lo scopo di individuare eventuali modificazioni indotte dal trattamento. I primi inibitori con cui sono state trattate le cellule, butirrato e valproato (fig. 4.1), sono stati precedentemente testati su diverse linee tumorali e sono risultati effettivamente in grado di inibire le HDAC [1-4]. Questi inibitori hanno mostrato capacità di indurre arresto della crescita della cellula tumorale mediante diversi meccanismi, tra i quali l'iperacetilazione degli istoni [5].

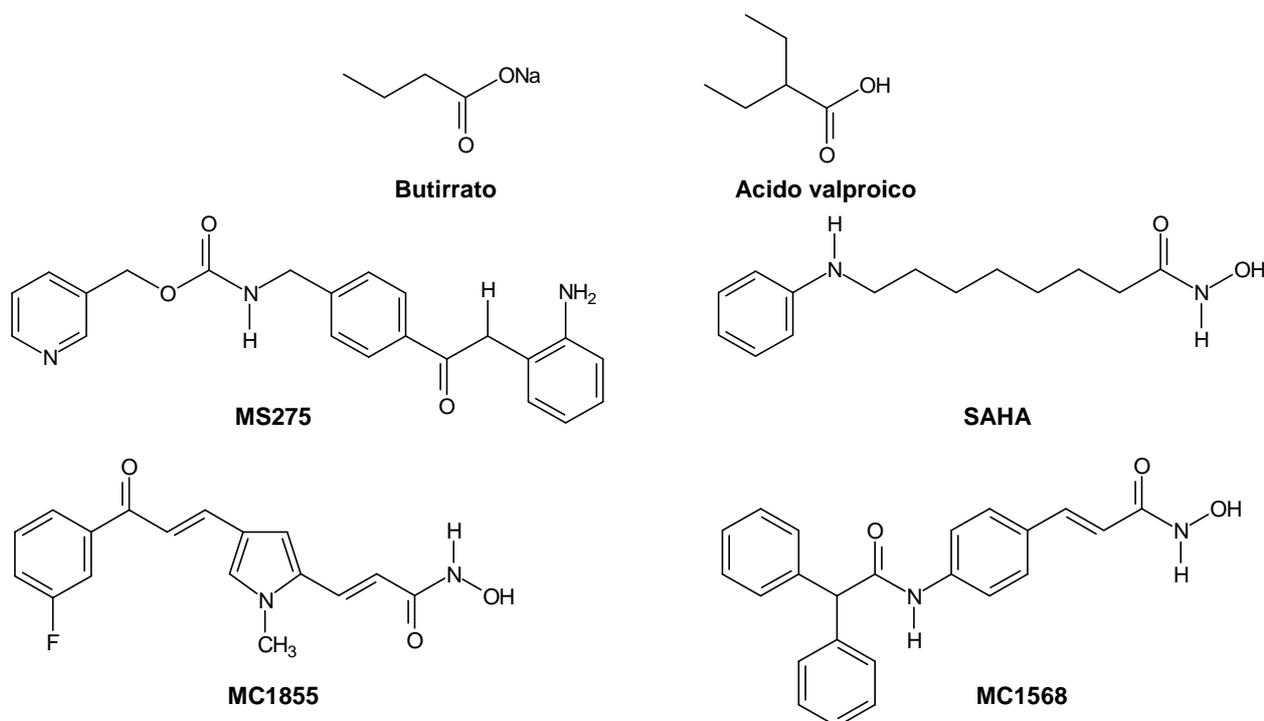


Figura 4.1. Strutture degli HDACi usati per gli studi di inibizione.

Istioni estratti da linee cellulari HT29 trattate con butirrato 5 mM e valproato 1 mM per 6 ore sono stati analizzati mediante il sistema LC-ESI-MS descritto nel capitolo 3; un effettivo incremento delle abbondanze relative delle isoforme acetilate è stato osservato sia per gli istoni H2A, H3 e H4, mentre a livello degli istoni H1 e H2B non sono stati riscontrati significativi cambiamenti. In figura

4.2 si può osservare che la trasformata relativa all'istone H4 estratto da cellule di controllo differisce da quella relativa allo stesso istone estratto da cellule trattate con butirrato 5 mM; vediamo infatti che il segnale corrispondente all'isoforma di-acetilata (11.348 Da) aumenta a discapito di quello corrispondente alla forma mono-acetilata (11.306 Da) e anche che compare il segnale corrispondente all'isoforma tri-acetilata (11.390 Da), appena visibile nella trasformata relativa al controllo.

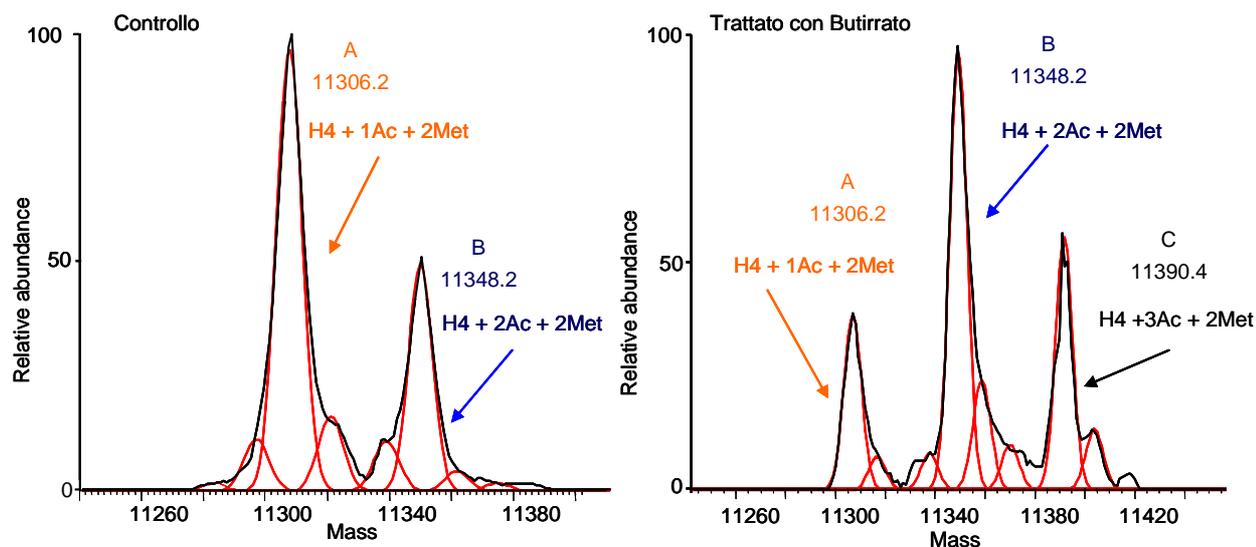


Figura 4.2. Trasformate relative all'istone H4 estratto da cellule HT29 non trattate (controllo) e da cellule trattate con butirrato 5 mM.

In tabella 4.I sono riportati i risultati quantitativi relativi alle variazioni delle abbondanze percentuali delle varie isoforme istoniche dopo trattamento con valproato e butirrato. Notiamo che effettivamente l'isoforma dell'istone H4 più abbondante in cellule di controllo è quella mono-acetilata e di-metilata (11.306 Da), mentre dopo il trattamento con valproato la corrispondente forma di-acetilata (11.348 Da) aumenta del 68% e dopo trattamento con il butirrato aumenta del 98%. Anche le isoforme tri-acetilata (11.362 Da) e tri-acetilata mono-metilata (11.376 Da) aumentano dopo trattamento con i due inibitori, mentre la forma di-metilata e tri-acetilata (11.390 Da) aumenta significativamente solo dopo trattamento con butirrato 5 mM.

Tabella 4.I. Abbondanze relative delle isoforme delle classi istoniche che subiscono dei cambiamenti in seguito al trattamento con valproato 1 mM e butirrato 5 mM.

Istone	Massa molecolare		Controllo	Valproato 1mM	Butirrato 5 mM
	Massa trovata (Da) ± SD	Interpretazione			
H2A-1	14007.3 ± 1.1	H2A-1	77 ± 1.2	58 ± 0.4	71 ± 2.2
	14020.9 ± 0.2	H2A-1 + 1Me	11 ± 1.2	25 ± 1.1	8 ± 2.6
	14049.4 ± 0.8	H2A-1 + 1Ac	4 ± 1.3	17 ± 0.7	17 ± 3.1
	14086.8 ± 2.1	H2A-1 + 1Me + 1 Ac	8 ± 0.7	0 ± 0.0	4 ± 0.6
H2A-2	14004.3 ± 0.4	H2A-2	42 ± 1.2	37 ± 2.6	39 ± 2.7
	14018.7 ± 1.6	H2A-2 + 1Me	26 ± 0.6	21 ± 1.3	22 ± 1.8
	14031.9 ± 1.0	H2A-2 + 2Me	8 ± 0.5	10 ± 2.7	9 ± 2.4
	14047.3 ± 0.6	H2A-2 + 1Ac	18 ± 0.2	20 ± 0.1	20 ± 3.4
	14061.1 ± 1.1	H2A-2 +1 Me+1Ac	6 ± 1.1	10 ± 1.8	8 ± 2.0
	14087.5 ± 1.3	H2A-2 + 2Ac	0 ± 0.00	3 ± 1.7	3 ± 1.0
H4	11279.2 ± 0.9	H4 + 1 Acet	3 ± 1.9	1 ± 0.7	0 ± 0.0
	11292.8 ± 0.9	H4 + 1 Acet + 1Met	5 ± 0.9	1 ± 1.8	0 ± 0.0
	11306.2 ± 1.5	H4 + 1 Acet + 2Met	52 ± 1.0	32 ± 1.4	26 ± 0.5
	11320.9 ± 0.8	H4 + 2 Acet	10 ± 0.8	7 ± 0.7	4 ± 0.2
	11335.1 ± 1.0	H4 + 2 Acet + 1Met	5 ± 1.9	4 ± 1.0	4 ± 0.0
	11348.2 ± 1.4	H4 + 2 Acet + 2Met	21 ± 0.5	40 ± 2.0	35 ± 2.3
	11362.2 ± 1.1	H4 + 3 Acet	3 ± 0.6	6 ± 1.1	6 ± 0.5
	11376.6 ± 1.6	H4 + 3 Acet + 1Met	1 ± 1.0	2 ± 1.8	4 ± 1.3
	11390.4 ± 0.8	H4 + 3 Acet + 2Met	0 ± 0.0	6 ± 4.0	16 ± 1.3
11405.1 ± 1.4	H4 + 3 Acet + 3Met	0 ± 0.0	1 ± 1.3	4 ± 0.0	
H3-1	15271.9 ± 2.6	H3-1	4 ± 3.1	n.d.	n.d.
	15286.1 ± 2.0	H3-1+ 1Me	7 ± 2.9	7 ± 2.1	n.d.
	15300.2 ± 1.9	H3-1+ 2Me	13 ± 2.0	10 ± 1.0	n.d.
	15313.8 ± 2.3	H3-1+ 3 Me o 1Ac	20 ± 3.4	7 ± 0.5	12 ± 0.1
	15327.9 ± 1.5	H3-1+ 4 Me o 1Ac+1Me	22 ± 3.9	13 ± 1.3	31 ± 4.1
	15342.3 ± 2.0	H3-1+ 5 Me o 1Ac+2Me	17 ± 3.1	20 ± 5.1	18 ± 4.0
	15355.7 ± 2.1	H3-1+ 6 Me o 1Ac+3Me o 2Ac	10 ± 3.0	23 ± 1.2	9 ± 3.3
	15370.0 ± 2.3	H3-1+ 7 Me o 1Ac+4Me o 2Ac+1Me	7 ± 3.8	13 ± 5.9	7 ± 2.2
	15383.7 ± 3.0	H3-1+ 8 Me o 1Ac+5Me o 2Ac+2Me	n.d.	7 ± 0.1	n.d.
	15397.8 ± 2.7	H3-1+ 9 Me o 1Ac+6Me o 2Ac+3Me o 3Ac	n.d.	n.d.	7 ± 0.5
	15411.8 ± 2.1	H3-1+ 10 Me o 1Ac+7Me o 2Ac+4Me o 3Ac+1Me	n.d.	n.d.	8 ± 1.8
	15425.1 ± 2.3	H3-1+ 11 Me o 1Ac+8Me o 2Ac+5Me o 3Ac+2Me	n.d.	n.d.	7 ± 0.2

Per quanto concerne l'istone H2A-2 il trattamento con gli inibitori provoca la comparsa della forma di-acetilata e un incremento di quella mono-acetilata pari al 18%; inoltre il valproato provoca un aumento del 59% dell'isoforma mono-acetilata e mono-metilata.

Anche nel caso dell'istone H2A-1 il trattamento con i due inibitori causa un incremento dell'abbondanza relativa dell'isoforma mono-acetilata (14.049 Da) a discapito di quella non acetilata (14.007 Da).

Infine per quanto riguarda le isoforme dell'istone H3-1, alle quali come detto precedentemente non si riescono ad attribuire con certezza le modificazioni a cui sono soggette, si può osservare un aumento delle abbondanze delle isoforme a più alto peso molecolare; possiamo quindi concludere che il trattamento con gli inibitori ha effetto anche su questa classe istonica.

I due inibitori, valproato e butirrato, sono stati saggiati alle concentrazioni a cui sono stati usati per i test *in vivo*; come si può vedere dai risultati sopra riportati il metodo si è dimostrato valido sia per individuare che per quantificare l'aumento dei livelli di acetilazione indotto dal trattamento.

Il metodo è stato quindi applicato per l'analisi di istoni estratti da cellule HT29 trattate con inibitori diversi ma alla stessa concentrazione per vedere se effettivamente è in grado di discriminare tra inibitori più o meno potenti. Per effettuare queste analisi le cellule HT29 sono state trattate con altri due noti inibitori delle HDAC, il SAHA e MS275 (fig. 4.1). E' già stato dimostrato che queste due molecole hanno profili di selettività differenti nei confronti delle varie HDAC; il SAHA ha dimostrato di essere in grado di inibire le HDAC di classe I e II, mentre MS275 è attivo solo nei confronti delle HDAC1, 2 e 3 appartenenti alla classe I. Studi condotti precedentemente hanno dimostrato che entrambe questi inibitori sono comunque in grado di provocare un aumento dei livelli di acetilazione delle proteine istoniche [6].

Le analisi LC-ESI-MS con il metodo ottimizzato alla trappola ionica hanno effettivamente mostrato che i due inibitori somministrati a concentrazione 5 μ M inducono entrambi un aumento dei livelli di acetilazione e che il SAHA è risultato più potente rispetto a MS275. Infatti si può osservare in tabella 4.11 che il SAHA induce modificazioni già a livello dell'istone H2B che non veniva modificato dopo trattamento con gli inibitori valproato e butirrato, anche se somministrati a concentrazioni millimolari. Il trattamento con il SAHA produce un aumento delle abbondanze relative delle isoforme a più alto peso molecolare, ma come detto precedentemente data la complessità degli spettri deconvoluti non è possibile stabilire il profilo di acetilazione. L'MS275 al contrario non

provoca alcuna modificazione e le abbondanze relative risultano essere del tutto analoghe a quelle del campione di controllo.

Tabella 4.II. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche prima (controllo) e dopo trattamento con gli inibitori SAHA e MS275, entrambe somministrati alla dose 5 μM .

	PM	PTM	Controllo	SAHA 5 μM	MS-275 5 μM
H2B	13761	H2B	9.18 \pm 1.76	9.21 \pm 1.25	11.30 \pm 2.30
	13775	H2B+1Me	25.31 \pm 3.85	23.34 \pm 4.15	25.52 \pm 1.15
	13789	H2B+2Me	24.61 \pm 0.31	22.02 \pm 1.61	21.49 \pm 0.69
	13803	H2B+3 Me o 1Ac	16.10 \pm 0.62	15.49 \pm 1.45	16.29 \pm 0.81
	13817	H2B+4 Me o 1Ac+ 1Me	10.86 \pm 1.91	10.29 \pm 0.09	10.84 \pm 0.75
	13831	H2B+5 Me o 1Ac+ 2Me	5.93 \pm 1.31	7.49 \pm 0.97	6.62 \pm 1.23
	13845	H2B+6 Me o 1Ac+ 3Me o 2Ac	4.52 \pm 1.20	n.d.	4.36 \pm 0.97
	13859	H2B+7 Me o 1Ac+ 4Me o 2Ac+1Me	3.49 \pm 2.10	7.02 \pm 1.25	3.58 \pm 0.55
	13873	H2B+8 Me o 1Ac+ 5Me o 2Ac+ 2Me	0.00 \pm 0.00	n.d.	0.00 \pm 0.00
	13887	H2B+9 Me o 1Ac+ 6Me o 2Ac+ 3Me o 3Ac	0.00 \pm 0.00	5.14 \pm 1.58	0.00 \pm 0.00
H2A-1	14007	H2A-1	61.48 \pm 0.65	43.33 \pm 0.91	55.72 \pm 1.87
	14020	H2A-1 +1Me	11.21 \pm 1.53	8.34 \pm 0.35	4.87 \pm 0.12
	14034	H2A-1 +2Me	6.37 \pm 1.57	4.17 \pm 0.16	4.98 \pm 0.26
	14049	H2A-1 +1Ac	2.07 \pm 0.09	14.35 \pm 0.90	10.31 \pm 0.91
	14063	H2A-1 +1 Ac + 1Me	1.93 \pm 0.08	4.01 \pm 0.52	2.88 \pm 2.00
	14084	H2A-1 +1P	14.77 \pm 0.99	20.43 \pm 0.04	17.49 \pm 2.31
	14105	H2A-1 +1 Me+ 2Ac	2.17 \pm 1.65	5.39 \pm 0.74	3.75 \pm 0.46
H2A-2	14004	H2A-2	42.01 \pm 1.25	31.12 \pm 2.22	41.15 \pm 3.63
	14018	H2A-2 + 1Me	25.87 \pm 0.64	23.74 \pm 1.19	21.40 \pm 1.63
	14031	H2A-2 + 2Me	8.92 \pm 0.46	9.53 \pm 1.56	8.73 \pm 1.10
	14047	H2A-2 + 1Ac	17.84 \pm 0.23	25.90 \pm 1.09	23.62 \pm 1.51
	14061	H2A-2 +1 Me+1Ac	6.30 \pm 1.15	7.71 \pm 3.02	5.10 \pm 1.07
	14087	H2A-2 + 2Ac	0.00 \pm 0.00	2.00 \pm 1.03	0.00 \pm 0.00
H4	11279	H4 + 1 Acet	2.84 \pm 1.93	0.00 \pm 0.00	0.82 \pm 0.33
	11292	H4 + 1 Acet + 1Met	5.38 \pm 0.88	4.68 \pm 0.65	8.83 \pm 0.12
	11306	H4 + 1 Acet + 2Met	52.43 \pm 0.98	19.82 \pm 1.27	31.51 \pm 0.56
	11321	H4 + 2 Acet	9.90 \pm 0.81	2.57 \pm 3.63	0.58 \pm 0.47
	11335	H4 + 2 Acet + 1Met	4.77 \pm 1.87	4.60 \pm 0.72	3.65 \pm 0.92
	11348	H4 + 2 Acet + 2Met	21.77 \pm 0.50	37.00 \pm 0.24	42.70 \pm 0.33
	11362	H4 + 3 Acet	2.91 \pm 0.60	9.02 \pm 2.60	11.10 \pm 1.40
	11376	H4 + 3 Acet + 1Met	0.70 \pm 1.02	2.19 \pm 3.10	0.81 \pm 0.34
	11390	H4 + 3 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	16.62 \pm 0.54	0.00 \pm 0.00
	11405	H4 + 4 Acet	0.00 \pm 0.00	3.50 \pm 0.95	0.00 \pm 0.00

Per quanto riguarda gli istoni H2A-1 la differenza tra la potenza dei due inibitori è meno marcata anche se il SAHA provoca un aumento dell'isoforma mono-acetilata di circa 6 volte mentre MS275 provoca un aumento della stessa isoforma di circa 4 volte.

Tabella 4.III. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche prima (controllo) e dopo trattamento con gli inibitori SAHA e MS275, entrambe somministrati alla dose 5 μ M.

	PM	PTM	Controllo	SAHA 5 μ M	MS-275 5 μ M
H3-1	15271	H3-1	4.41 \pm 0.38	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
	15286	H3-1 +1Me	6.93 \pm 2.75	0.00 \pm 0.00	5.32 \pm 1.92
	15300	H3-1 +2Me	12.65 \pm 1.98	0.00 \pm 0.00	9.53 \pm 1.08
	15313	H3-1 +3 Me o 1Ac	19.71 \pm 2.86	4.43 \pm 0.98	22.17 \pm 3.00
	15327	H3-1 +4 Me o 1Ac+ 1Me	22.37 \pm 0.21	6.38 \pm 2,14	18.78 \pm 3.46
	15342	H3-1 +5 Me o 1Ac+ 2Me	17.25 \pm 3.08	9.30 \pm 0.45	15.30 \pm 1.38
	15355	H3-1 +6 Me o 1Ac+ 3Me o 2Ac	10.13 \pm 0.15	15.42 \pm 1.26	18.59 \pm 0.71
	15370	H3-1 +7 Me o 1Ac+ 4Me o 2Ac+1Me	6.55 \pm 1.70	25.00 \pm 0.92	7.23 \pm 3.80
	15384	H3-1 +8 Me o 1Ac+ 5Me o 2Ac+ 2Me	0.00 \pm 0.00	19.69 \pm 2.04	3.08 \pm 2.33
	15398	H3-1 +9 Me o 1Ac+ 6Me o 2Ac+ 3Me o 3Ac	0.00 \pm 0.00	11.32 \pm 0.42	0.00 \pm 0.00
	15412	H3-1 +10 Me o 1Ac+ 7Me o 2Ac+ 4Me o 3Ac+1Me	0.00 \pm 0.00	8.46 \pm 1.01	0.00 \pm 0.00
	15426	H3-1 +11 Me o 1Ac+ 8Me o 2Ac+ 5Me o 3Ac+2Me	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
H3-2	15303	H3-2	4,51 \pm 2,77	0,00 \pm 0,00	4.85 \pm 1.17
	15318	H3-2 +1Me	9.77 \pm 2.44	0,00 \pm 0,00	10.00 \pm 2.77
	15332	H3-2 +2Me	16.73 \pm 0.46	6,59 \pm 1,53	17.21 \pm 1.79
	15346	H3-2 +3 Me o 1Ac	22.73 \pm 2.24	15,61 \pm 2,19	24.37 \pm 2.07
	15361	H3-2 +4 Me o 1Ac+ 1Me	17.29 \pm 2.26	22,55 \pm 0,93	19.96 \pm 1.50
	15375	H3-2 +5 Me o 1Ac+ 2Me	13.77 \pm 1.24	16,56 \pm 4,44	13.85 \pm 0.32
	15388	H3-2 +6 Me o 1Ac+ 3Me o 2Ac	9.87 \pm 1.87	12,96 \pm 1,38	6.47 \pm 1.04
	15402	H3-2 +7 Me o 1Ac+ 4Me o 2Ac+1Me	5.33 \pm 1.00	10,30 \pm 1,27	3.29 \pm 0.19
	15416	H3-2 +8 Me o 1Ac+ 5Me o 2Ac+ 2Me	0.00 \pm 0.00	9,61 \pm 0,59	0.00 \pm 0.00
	15430	H3-2 +9 Me o 1Ac+ 6Me o 2Ac+ 3Me o 3Ac	0.00 \pm 0.00	3,57 \pm 2,03	0.00 \pm 0.00
	15444	H3-2 +10 Me o 1Ac+ 7Me o 2Ac+ 4Me o 3Ac+1Me	0.00 \pm 0.00	2,27 \pm 2,20	0.00 \pm 0.00

Per quanto riguarda l'istone H2A-2 si può notare come, dopo trattamento con i due inibitori, aumentino sia l'isoforma mono-acetilata che quella di-acetilata, ma quest'ultima solo dopo trattamento con SAHA; la forma mono-acetilata aumenta del 45% dopo trattamento con SAHA e del 32% dopo trattamento con MS275. L'inibizione delle HDAC da parte di questi due inibitori è ben evidente anche a livello dell'istone H4 (tab. 4.II); infatti si può osservare come aumentino le abbondanze relative delle isoforme di-metilata e di- e tri-acetilata a discapito dell'isoforma di-metilata e mono-acetilata. Anche in questo caso però il SAHA provoca una diminuzione

dell'isoforma mono-acetilata del 62% mentre MS275 del 40%. Infine sull'istone H3-1 (tab. 4.III) il SAHA provoca un notevole incremento delle isoforme a più alto peso molecolare, più marcato di MS275, mentre sull'istone H3-2 il SAHA continua a mostrarsi attivo al contrario di MS275 che non causa alcun cambiamento sostanziale delle abbondanze relative delle varie isoforme.

Queste prove preliminari con inibitori utilizzati sia a concentrazioni diverse (valproato e butirato) sia alle stesse concentrazioni (SAHA e MS275) ci permettono di affermare che il sistema di analisi messo a punto per identificare e quantificare le isoforme istoniche è effettivamente utile per valutare l'efficacia di inibitori delle HDAC: ci permette infatti di evidenziare e quantificare l'aumento dei livelli di acetilazione degli istoni indotto dal trattamento con queste molecole.

Il metodo è stato quindi impiegato per effettuare degli studi di dose e tempo dipendenza dopo trattamento delle cellule HT29 con inibitori aventi diversi profili di selettività nei confronti delle HDAC.

4.3 Studi di dose e tempo dipendenza

4.3.1 Risultati

Istone H4

Studi di dose-dipendenza. In un primo momento le cellule HT29 sono state trattate con concentrazioni crescenti degli inibitori sopra menzionati e gli istoni estratti da esse sono stati analizzati con il sistema HPLC-ESI-MS; mentre le analisi dopo trattamento con MS275, MC1855 e MC1568 sono state effettuate mediante analizzatore Q-TOF e, quelle dopo trattamento con SAHA mediante la trappola ionica.

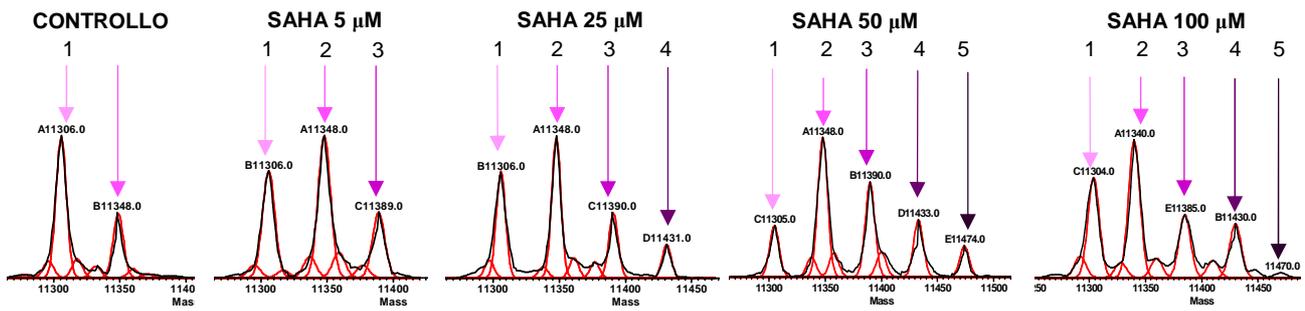
Nella figura 4.3 sono riportati gli spettri deconvoluti relativi all'istone H4. Per ogni trasformata è riportata la concentrazione di inibitore con cui sono state trattate le cellule e un numero che indica quante acetilazioni apporta l'isoforma indicata dalla freccia.

Osservando le trasformate relative all'effetto del SAHA sull'istone H4, ma anche i dati riportati in tabella 4.IV, si può osservare che mentre nel campione di controllo, derivante dall'estrazione di istoni da cellule non trattate, si possono osservare solo le forme mono e di-acetilate, all'aumentare della concentrazione di SAHA si vedono comparire la forma tri-acetilata (5 μM), tetra-acetilata (25 μM) e penta-acetilata (50 e 100 μM). Il fatto che nel campione di controllo analizzato con la trappola ionica non si vedano le isoforme tri e tetra-acetilata, visibili invece nei controlli analizzati con il Q-TOF, deriva, come detto precedentemente, dalla minore sensibilità di questo analizzatore di massa.

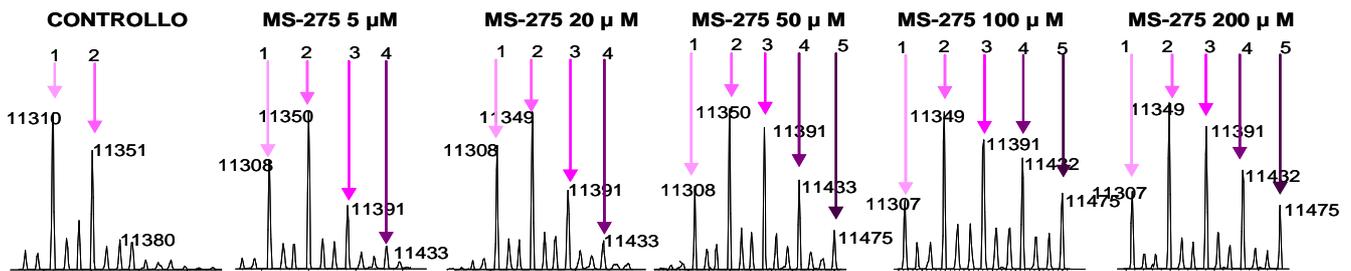
Anche dopo trattamento con MS275 e MC1855 si può osservare un netto incremento delle abbondanze relative delle isoforme più acetilate (fig. 4.3; tab. 4.V e 4.VI), l'incremento comunque è molto più marcato dopo trattamento con MC1855, che, nonostante abbia lo stesso spettro d'azione di MS275, risulta più attivo, probabilmente grazie alla sua funzione di acido idrossamico. Infine il trattamento con MC1568 causa solo un lieve incremento delle isoforme di- e tri-acetilate dell'istone H4, mentre le abbondanze relative delle forme tetra- e penta-acetilate rimangono basse anche quando la concentrazione dell'inibitore è 100 μM (fig. 4.3, tab. 4.VII). Questo dato è molto interessante perché MC1568 è un composto facente sì parte della famiglia degli acidi idrossamici, molto attivi, ma selettivo verso le HDAC di classe II.

Determinazione della IC_{50} . Per poter confrontare i diversi inibitori è stato calcolato il corrispondente valore di IC_{50} , concentrazione che ci permette di ottenere il 50% della massima

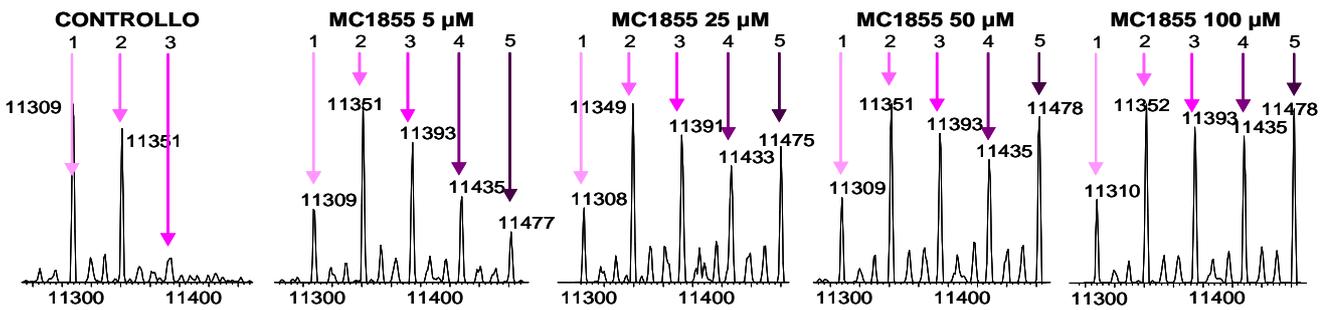
Trattamento con SAHA



Trattamento con MS275



Trattamento con MC1855



Trattamento con MC1568

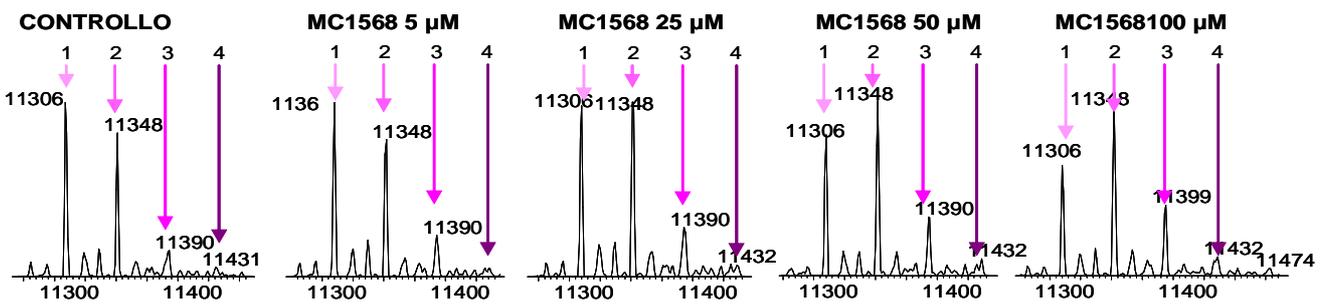


Figura 4.3. Spettri deconvolti relativi all'istone H4 estratto da cellule HT29 trattate con gli inibitori delle HDAC a concentrazioni crescenti.

Tabella 4.IV. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H4 prima e dopo trattamento con **SAHA** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi alla trappola ionica ed elaborati con il software MagTran 1.0.

PM	PTM	Controllo	SAHA 5 μ M	SAHA 25 μ M	SAHA 50 μ M	SAHA 100 μ M
11279	H4 + 1 Acet	1.63 \pm 0.67	0.00 \pm 0.00	n.d.	0.00 \pm 0.00	n.d.
11292	H4 + 1 Acet + 1Met	11.12 \pm 2.17	2.29 \pm 1.99	2.14 \pm 0.42	0.00 \pm 0.00	5.81 \pm 0.21
11306	H4 + 1 Acet + 2Met	49.58 \pm 0.25	38.00 \pm 1.19	26.15 \pm 0.51	15.01 \pm 0.73	19.22 \pm 0.23
11320	H4 + 2 Acet	7.58 \pm 0.69	3.16 \pm 1.23	3.72 \pm 1.77	3.00 \pm 0.21	1.10 \pm 1.00
11335	H4 + 2 Acet + 1Met	4.71 \pm 2.67	3.23 \pm 2.82	2.14 \pm 0.42	3.99 \pm 1.38	0.90 \pm 0.22
11348	H4 + 2 Acet + 2Met	20.65 \pm 2.02	24.83 \pm 1.97	33.97 \pm 0.63	23.44 \pm 0.38	32.30 \pm 0.87
11362	H4 + 3 Acet	3.80 \pm 0.03	6.10 \pm 1.24	5.55 \pm 1.00	7.86 \pm 1.13	3.00 \pm 0.91
11376	H4 + 3 Acet + 1Met	0.94 \pm 0.08	3.29 \pm 2.06	4.07 \pm 0.06	2.82 \pm 1.15	1.54 \pm 0.83
11390	H4 + 3 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	17.97 \pm 1.39	14.65 \pm 1.65	18.94 \pm 0.64	16.14 \pm 0.99
11405	H4 + 3 Acet + 3Met	0.00 \pm 0.00	1.14 \pm 1.97	n.d.	5.37 \pm 1.70	3.91 \pm 1.11
11432	H4 + 4 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	7.63 \pm 0.77	12.20 \pm 0.24	11.88 \pm 0.05
11474	H4 + 5 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	7.39 \pm 0.19	n.d.

Tabella 4.V. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H4 prima e dopo trattamento con **MS275** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MS-275 5 μ M	MS-275 20 μ M	MS-275 50 μ M	MS-275 100 μ M	MS-275 200 μ M
11279	H4 + 1 Acet	3.98 \pm 0.24	2.17 \pm 0.00	1.47 \pm 0.10	0.35 \pm 0.34	0.42 \pm 0.05	0.26 \pm 0.10
11292	H4 + 1 Acet + 1Met	3.09 \pm 0.04	2.02 \pm 0.01	1.62 \pm 0.39	0.91 \pm 0.08	0.87 \pm 0.05	1.17 \pm 0.72
11306	H4 + 1 Acet + 2Met	36.02 \pm 2.85	24.73 \pm 4.39	21.98 \pm 0.15	12.19 \pm 0.01	9.70 \pm 0.50	10.90 \pm 0.71
11320	H4 + 2 Acet	6.32 \pm 0.34	5.17 \pm 0.20	5.24 \pm 0.17	3.02 \pm 0.14	3.11 \pm 0.63	2.25 \pm 0.10
11335	H4 + 2 Acet + 1Met	9.04 \pm 0.88	5.23 \pm 0.56	5.07 \pm 0.18	3.41 \pm 0.32	3.46 \pm 0.24	2.07 \pm 0.16
11348	H4 + 2 Acet + 2Met	23.34 \pm 0.12	28.82 \pm 3.53	27.20 \pm 0.84	23.83 \pm 0.37	23.09 \pm 2.32	21.90 \pm 3.73
11362	H4 + 3 Acet	4.30 \pm 0.33	5.56 \pm 0.61	6.17 \pm 0.54	6.12 \pm 0.15	5.86 \pm 0.25	4.92 \pm 0.48
11376	H4 + 3 Acet + 1Met	5.23 \pm 0.87	5.78 \pm 0.58	6.31 \pm 0.78	5.41 \pm 0.04	6.03 \pm 0.17	3.83 \pm 0.18
11390	H4 + 3 Acet + 2Met	5.10 \pm 0.35	12.29 \pm 0.39	14.21 \pm 0.36	20.87 \pm 0.06	17.93 \pm 0.48	20.68 \pm 0.51
11405	H4 + 3 Acet + 3Met	1.58 \pm 0.44	2.99 \pm 0.54	3.60 \pm 0.49	5.18 \pm 0.06	5.39 \pm 0.23	6.66 \pm 1.86
11432	H4 + 4 Acet + 2Met	1.64 \pm 0.39	4.17 \pm 0.46	5.40 \pm 0.53	12.97 \pm 0.17	14.46 \pm 0.94	15.84 \pm 1.82
11474	H4 + 5 Acet + 2Met	0.37 \pm 0.02	1.06 \pm 0.19	1.74 \pm 0.09	5.74 \pm 0.11	9.70 \pm 0.93	9.51 \pm 0.21

Tabella 4.VI. Nella tabella sono riportate le abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H4 prima e dopo trattamento con **MC1855** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1855 5 μ M	MC1855 25 μ M	MC1855 50 μ M	MC1855 100 μ M
11279	H4 + 1 Acet	3.23 \pm 0.25	0.23 \pm 0.12	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
11292	H4 + 1 Acet + 1Met	2.66 \pm 0.26	0.83 \pm 0.03	2.02 \pm 2.17	0.44 \pm 0.17	0.40 \pm 0.00
11306	H4 + 1 Acet + 2Met	38.66 \pm 1.47	13.69 \pm 0.14	9.13 \pm 1.59	9.87 \pm 0.03	10.74 \pm 0.43
11320	H4 + 2 Acet	5.00 \pm 0.15	2.50 \pm 0.23	1.74 \pm 0.35	1.67 \pm 0.21	1.70 \pm 0.08
11335	H4 + 2 Acet + 1Met	6.15 \pm 0.13	3.30 \pm 0.06	2.86 \pm 0.37	3.22 \pm 0.15	2.50 \pm 0.03
11348	H4 + 2 Acet + 2Met	31.60 \pm 1.70	28.79 \pm 1.64	21.51 \pm 2.34	22.18 \pm 1.48	21.63 \pm 0.70
11362	H4 + 3 Acet	3.17 \pm 0.14	5.07 \pm 0.19	3.99 \pm 0.28	3.80 \pm 0.13	2.77 \pm 0.18
11376	H4 + 3 Acet + 1Met	2.34 \pm 0.25	4.11 \pm 0.76	4.73 \pm 0.06	3.79 \pm 0.65	2.69 \pm 0.18
11390	H4 + 3 Acet + 2Met	4.30 \pm 0.42	18.51 \pm 0.72	18.43 \pm 0.56	17.69 \pm 0.12	18.70 \pm 0.31
11405	H4 + 3 Acet + 3Met	1.43 \pm 0.05	3.92 \pm 0.37	3.98 \pm 0.22	3.30 \pm 0.04	3.14 \pm 0.23
11432	H4 + 4 Acet + 2Met	1.46 \pm 0.08	12.06 \pm 0.90	15.68 \pm 2.57	14.41 \pm 0.88	15.36 \pm 1.03
11474	H4 + 5 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	7.00 \pm 0.03	15.93 \pm 0.11	19.64 \pm 0.17	20.37 \pm 0.24

Tabella 4.VII. Nella tabella sono riportate le abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H4 prima e dopo trattamento con **MC1568** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1568 5 μ M	MC1568 25 μ M	MC1568 50 μ M	MC1568 100 μ M
11279	H4 + 1 Acet	3.23 \pm 0.25	3.12 \pm 0.10	2.58 \pm 0.15	1.76 \pm 0.10	1.75 \pm 0.08
11292	H4 + 1 Acet + 1Met	2.66 \pm 0.26	3.33 \pm 0.29	2.74 \pm 0.14	2.20 \pm 0.12	1.79 \pm 0.07
11306	H4 + 1 Acet + 2Met	38.66 \pm 1.47	36.23 \pm 0.97	31.07 \pm 1.73	26.32 \pm 0.53	22.73 \pm 0.46
11320	H4 + 2 Acet	5.00 \pm 0.15	5.84 \pm 0.34	5.28 \pm 0.60	4.86 \pm 0.01	4.61 \pm 0.42
11335	H4 + 2 Acet + 1Met	6.15 \pm 0.13	6.48 \pm 0.16	5.78 \pm 0.89	4.84 \pm 0.30	5.16 \pm 0.23
11348	H4 + 2 Acet + 2Met	31.60 \pm 1.70	29.21 \pm 1.72	32.93 \pm 1.69	35.34 \pm 1.21	34.78 \pm 0.39
11362	H4 + 3 Acet	3.17 \pm 0.14	3.62 \pm 0.03	4.05 \pm 0.27	4.43 \pm 0.17	4.80 \pm 0.12
11376	H4 + 3 Acet + 1Met	2.34 \pm 0.25	2.22 \pm 0.30	2.23 \pm 0.11	2.25 \pm 0.83	2.85 \pm 0.16
11390	H4 + 3 Acet + 2Met	4.30 \pm 0.42	6.88 \pm 0.41	8.43 \pm 1.85	11.60 \pm 0.68	14.10 \pm 0.41
11405	H4 + 3 Acet + 3Met	1.43 \pm 0.05	1.49 \pm 0.02	2.03 \pm 0.32	1.71 \pm 0.32	2.39 \pm 0.48
11432	H4 + 4 Acet + 2Met	1.46 \pm 0.08	1.58 \pm 0.05	2.40 \pm 0.42	3.18 \pm 0.38	3.51 \pm 0.06
11474	H4 + 5 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.48 \pm 0.69	1.49 \pm 0.06	1.52 \pm 0.11

inibizione, caratteristico per ogni classe istonica. Questo valore è stato calcolato mettendo in grafico i valori della percentuale di inibizione, intesa come diminuzione della percentuale dell'isoforma meno acetilata, in funzione della concentrazione di inibitore. Nel caso dell'istone H4, è stata valutata la diminuzione dell'isoforma mono-acetilata (11.306 Da) in funzione della concentrazione μM dei quattro inibitori con i quali sono state trattate le cellule HT29 e i grafici ottenuti sono rappresentati in figura 4.4. Oltre al valore di IC_{50} ci è sembrato opportuno riportare anche il valore massimo di inibizione ottenuto dopo trattamento con i diversi inibitori. Mentre con i primi tre inibitori si raggiunge il plateau, con MC1568, inibitore selettivo della classe II delle HDAC, questo non si verifica anche aumentando la sua concentrazione fino a 100 μM . Il composto caratterizzato dal valore di IC_{50} più basso è risultato essere MC1855 che non a caso è anche quello che provoca il massimo di inibizione, intesa come decremento della percentuale della forma meno acetilata.

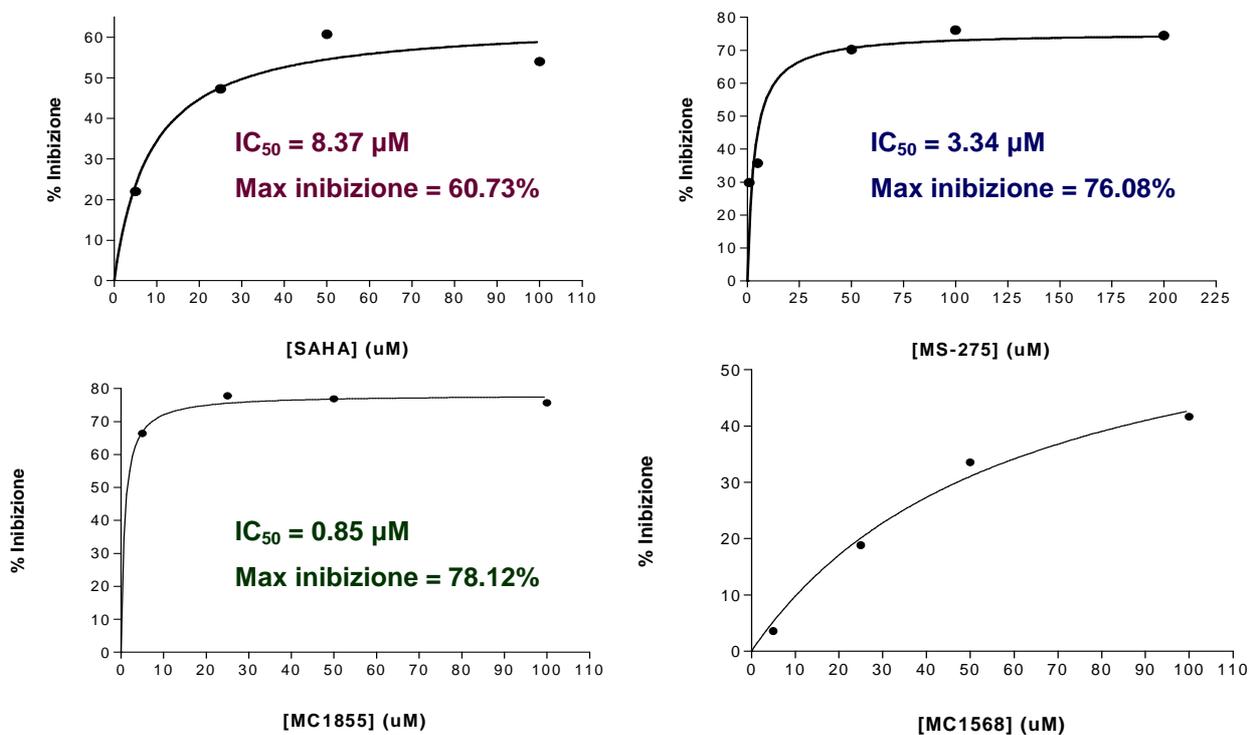


Figura 4.4. Variazioni della percentuale di inibizione dell'istone H4 in funzione della concentrazione di inibitore con cui sono trattate le cellule HT29.

Studi di tempo dipendenza. Lo stesso metodo usato per effettuare gli studi di dose dipendenza è stato usato per verificare anche la tempo dipendenza dopo trattamento delle cellule HT29 con i diversi inibitori somministrati a concentrazione 50 μ M per tempi diversi. Anche in questo caso gli effetti del trattamento con gli inibitori può essere valutato sia osservando come variano le trasformate (fig. 4.5) sia andando a leggere i valori relativi all'abbondanza delle varie isoforme istoniche nelle tabelle 4.VIII-4.XI.

Osservando gli spettri deconvoluti si può notare che, mentre per SAHA, MS275 e MC1855 all'aumentare del tempo di trattamento si ha un corrispondente netto incremento delle isoforme maggiormente acetilate, dopo trattamento MC1568 si ha solo un lieve incremento delle isoforme di e tri-acetilate (11.348 e 11.390 Da); le abbondanze relative alle isoforme tetra e penta-acetilate (11.432 e 11.474 Da) rimangono invece molto basse.

Va sottolineato il fatto che il trattamento delle cellule HT29 con MC1855 per 24 ore è stato effettuato ma non sono riportati i dati perché le cellule sono risultate essere tutte morte.

Per poter confrontare meglio gli effetti del trattamento a tempi crescenti con i diversi inibitori si possono costruire grafici simili a quelli sfruttati per ottenere le IC_{50} andando a valutare come diminuisce l'abbondanza relativa all'isoforma meno acetilate all'aumentare del tempo di trattamento con ogni inibitore (fig. 4.6). Si possono in questo modo confrontare i valori, espressi in ore, del tempo di trattamento con ogni inibitore necessario per ottenere l'effetto massimo.

L'inibitore che consente di ottenere più velocemente l'effetto massimo è risultato essere MC1855, che raggiunge il suo effetto massimo dopo 4 ore di trattamento. MS275 e SAHA hanno dimostrato di riuscire ad ottenere i loro rispettivi effetti massimi in tempi tra loro simili (8 ore circa).

Per quanto riguarda MC1568, come si può osservare dalla figura, non si riesce ad ottenere un profilo sufficientemente regolare per riuscire ad estrapolare il valore corrispondente al tempo necessario per ottenere l'effetto massimo.

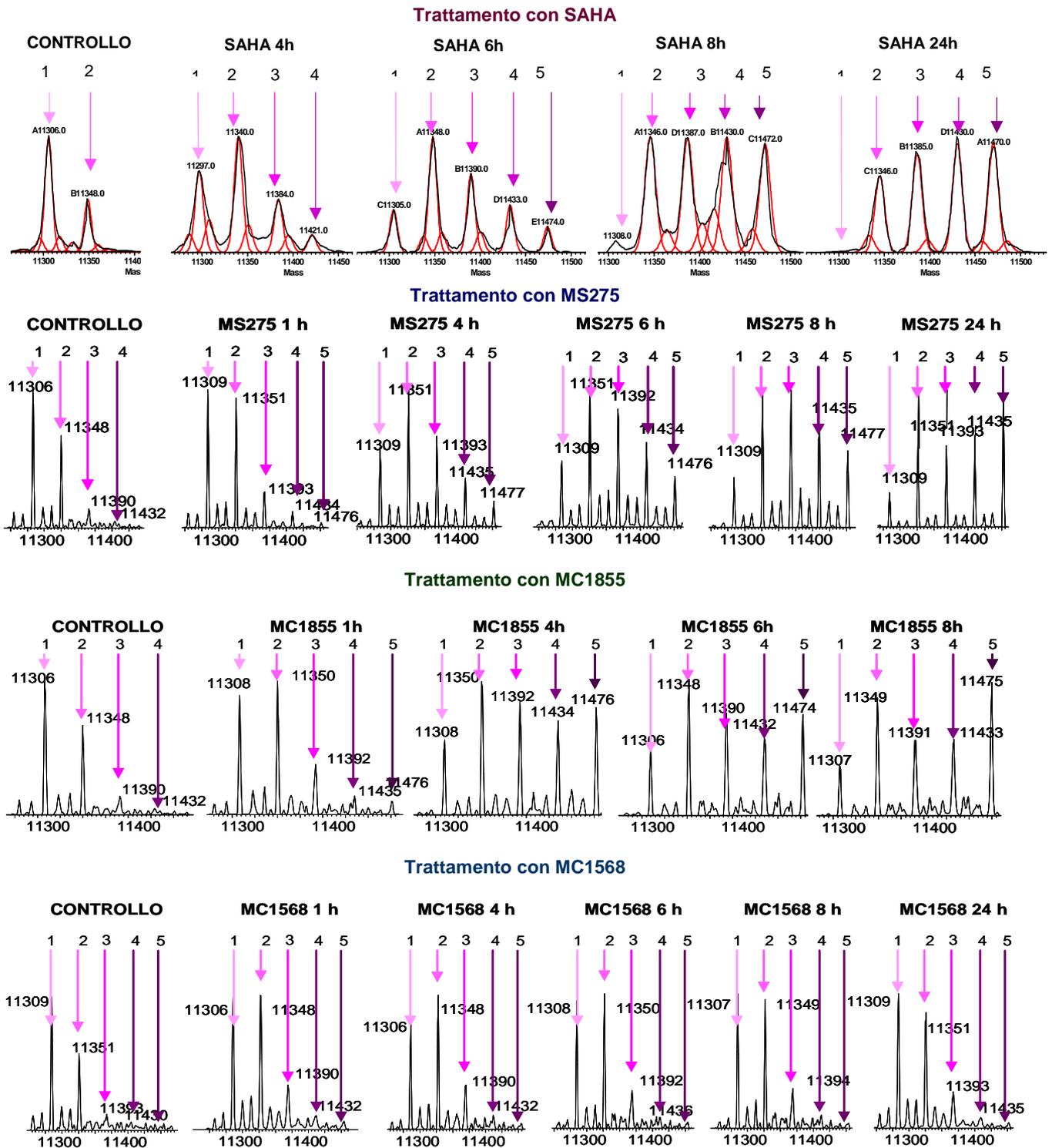


Figura 4.5. Spettri deconvolti relativi all'istone H4 estratto da cellule HT29 trattate con gli inibitori delle HDAC a concentrazione 50 μ M per diversi tempi.

Tabella 4.VIII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H4 prima e dopo trattamento con **SAHA** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi alla trappola ionica ed elaborati con il software Mag Tran 1.0.

PM	PTM	Controllo	SAHA 1h	SAHA 4h	SAHA 6h	SAHA 8h	SAHA 24h
11279	H4 + 1 Acet	1.63 \pm 0.67	n.d.	n.d.	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
11292	H4 + 1 Acet + 1Met	11.12 \pm 2.17	10.29 \pm 1.57	5.02 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
11306	H4 + 1 Acet + 2Met	49.58 \pm 0.25	31.79 \pm 2.35	22.39 \pm 0.23	15.01 \pm 0.73	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
11320	H4 + 2 Acet	7.58 \pm 0.69	5.96 \pm 2.01	8.97 \pm 0.09	3.00 \pm 0.21	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
11335	H4 + 2 Acet + 1Met	4.71 \pm 2,67	7.06 \pm 1.68	n.d.	3.99 \pm 1.38	0.00 \pm 0.00	4,37 \pm 0.76
11348	H4 + 2 Acet + 2Met	20.65 \pm 2.02	23.68 \pm 0.95	31.78 \pm 0.92	23.44 \pm 0.38	19,12 \pm 1.53	15,94 \pm 2.06
11362	H4 + 3 Acet	3.80 \pm 0.03	5.65 \pm 1.57	7.68 \pm 0.48	7.86 \pm 1.13	2,00 \pm 1.41	n.d.
11376	H4 + 3 Acet + 1Met	0.94 \pm 0.08	3.06 \pm 0.40	n.d.	2.82 \pm 1.15	4,18 \pm 0.28	n.d.
11390	H4 + 3 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	12.53 \pm 1.89	14.58 \pm 0.55	18.94 \pm 0.64	21,25 \pm 1.85	22,55 \pm 0.99
11405	H4 + 3 Acet + 3Met	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	4.73 \pm 0.12	5.37 \pm 1.70	6,52 \pm 1.98	3,42 \pm 0.69
11432	H4 + 4 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	n.d.	n.d.	6,09 \pm 2.20	1,36 \pm 0.13
11474	H4 + 5 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	4.86 \pm 0.75	12.20 \pm 0.24	21,57 \pm 2.08	23,15 \pm 1.29

Tabella 4.IX. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H4 prima e dopo trattamento con **MS275** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MS275 1h	MS275 4h	MS275 6h	MS275 8h	MS275 24h
11279	H4 + 1 Acet	3.98 \pm 0.24	3.01 \pm 0.07	1.06 \pm 0.10	0.50 \pm 0.35	0.37 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00
11292	H4 + 1 Acet + 1Met	3.09 \pm 0.04	3.11 \pm 0.89	2.11 \pm 0.78	0.83 \pm 0.15	0.64 \pm 0.03	1.51 \pm 0.68
11306	H4 + 1 Acet + 2Met	36.02 \pm 2.85	29.87 \pm 1.95	16.78 \pm 2.36	11.85 \pm 0.59	7.78 \pm 0.39	7.95 \pm 0.04
11320	H4 + 2 Acet	6.32 \pm 0.34	5.77 \pm 0.05	4.01 \pm 0.11	2.83 \pm 0.34	2.13 \pm 0.21	1.24 \pm 0.03
11335	H4 + 2 Acet + 1Met	9.04 \pm 0.88	5.81 \pm 0.02	4.18 \pm 0.23	3.34 \pm 0.25	2.11 \pm 0.06	1.45 \pm 0.16
11348	H4 + 2 Acet + 2Met	23.34 \pm 0.12	28.96 \pm 0.39	29.21 \pm 1.00	23.66 \pm 0.40	20.08 \pm 2.53	17.31 \pm 1.52
11362	H4 + 3 Acet	4.30 \pm 0.33	4.95 \pm 0.22	5.03 \pm 0.12	5.71 \pm 0.72	4.27 \pm 0.13	2.71 \pm 0.36
11376	H4 + 3 Acet + 1Met	5.23 \pm 0.87	3.52 \pm 0.12	4.71 \pm 1.07	5.64 \pm 0.39	4.25 \pm 0.06	2.42 \pm 0.41
11390	H4 + 3 Acet + 2Met	5.10 \pm 0.35	8.65 \pm 0.45	16.38 \pm 0.38	20.36 \pm 0.87	21.53 \pm 0.37	15.56 \pm 1.41
11405	H4 + 3 Acet + 3Met	1.58 \pm 0.44	1.50 \pm 0.16	3.45 \pm 0.14	5.19 \pm 0.05	6.47 \pm 0.43	2.00 \pm 0.68
11432	H4 + 4 Acet + 2Met	1.64 \pm 0.39	4.02 \pm 0.99	9.17 \pm 1.13	13.63 \pm 1.16	17.62 \pm 1.92	18.51 \pm 0.29
11474	H4 + 5 Acet + 2Met	0.37 \pm 0.02	0.81 \pm 1.09	3.91 \pm 0.42	6.46 \pm 1.25	12.74 \pm 0.70	29.35 \pm 3.43

Tabella 4.X. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H4 prima e dopo trattamento con **MC1855** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6 e 8 h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1855 1h	MC1855 4h	MC1855 6h	MC1855 8h
11279	H4 + 1 Acet	4.58 \pm 0.17	2.27 \pm 0.08	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
11292	H4 + 1 Acet + 1Met	3.93 \pm 0.10	2.68 \pm 0.24	0.83 \pm 0.04	0.54 \pm 0.07	0.00 \pm 0.00
11306	H4 + 1 Acet + 2Met	38.97 \pm 0.95	27.19 \pm 1.03	11.88 \pm 0.33	10.72 \pm 1.93	10.95 \pm 1.69
11320	H4 + 2 Acet	5.68 \pm 0.22	5.45 \pm 0.17	2.09 \pm 0.24	2.05 \pm 0.06	2.46 \pm 0.40
11335	H4 + 2 Acet + 1Met	6.52 \pm 0.26	5.68 \pm 0.50	2.80 \pm 0.06	2.25 \pm 0.18	2.00 \pm 0.14
11348	H4 + 2 Acet + 2Met	26.37 \pm 0.27	29.47 \pm 0.15	22.02 \pm 0.70	23.37 \pm 1.12	23.83 \pm 1.44
11362	H4 + 3 Acet	2.72 \pm 0.41	4.18 \pm 0.01	3.29 \pm 0.03	3.50 \pm 1.12	2.38 \pm 0.20
11376	H4 + 3 Acet + 1Met	1.94 \pm 0.17	2.76 \pm 0.16	2.42 \pm 0.25	2.08 \pm 0.25	2.83 \pm 0.45
11390	H4 + 3 Acet + 2Met	6.07 \pm 0.78	11.23 \pm 0.17	18.13 \pm 0.31	18.94 \pm 0.52	14.42 \pm 0.28
11405	H4 + 3 Acet + 3Met	1.31 \pm 0.39	2.35 \pm 0.02	3.43 \pm 0.31	1.29 \pm 0.22	4.01 \pm 0.74
11432	H4 + 4 Acet + 2Met	1.91 \pm 0.15	3.85 \pm 0.43	14.83 \pm 0.58	15.21 \pm 1.66	12.32 \pm 3.41
11474	H4 + 5 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	2.90 \pm 0.00	18.26 \pm 1.31	20.04 \pm 2.52	24.81 \pm 1.36

Tabella 4.XI. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H4 prima e dopo trattamento con **MC1568** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24 h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1568 1h	MC1568 4h	MC1568 6h	MC1568 8h	MC1568 24h
11279	H4 + 1 Acet	4.40 \pm 0.02	2.28 \pm 0.02	1.78 \pm 0.07	1.40 \pm 0.00	1.48 \pm 0.01	3.30 \pm 0.17
11292	H4 + 1 Acet + 1Met	4.57 \pm 0.93	3.32 \pm 0.31	2.19 \pm 0.28	2.12 \pm 0.01	2.46 \pm 0.01	4.57 \pm 0.11
11306	H4 + 1 Acet + 2Met	39.75 \pm 0.03	29.92 \pm 2.54	26.05 \pm 0.68	31.10 \pm 0.02	31.61 \pm 0.33	30.96 \pm 0.17
11320	H4 + 2 Acet	6.45 \pm 0.77	5.85 \pm 0.28	5.37 \pm 0.04	5.02 \pm 0.04	5.38 \pm 0.46	6.99 \pm 0.51
11335	H4 + 2 Acet + 1Met	6.32 \pm 0.01	6.61 \pm 0.55	6.31 \pm 0.37	5.60 \pm 0.04	6.28 \pm 0.53	6.61 \pm 0.24
11348	H4 + 2 Acet + 2Met	24.71 \pm 2.70	29.44 \pm 1.76	32.48 \pm 0.01	32.87 \pm 0.13	31.07 \pm 0.74	26.87 \pm 0.52
11362	H4 + 3 Acet	2.63 \pm 0.12	4.26 \pm 0.67	4.47 \pm 0.07	3.48 \pm 0.07	3.70 \pm 0.11	4.34 \pm 0.68
11376	H4 + 3 Acet + 1Met	2.14 \pm 0.41	3.22 \pm 0.90	3.57 \pm 0.26	2.75 \pm 0.16	2.90 \pm 0.81	2.97 \pm 0.48
11390	H4 + 3 Acet + 2Met	4.99 \pm 0.40	8.55 \pm 1.09	10.62 \pm 0.06	9.30 \pm 0.18	8.53 \pm 1.24	8.10 \pm 0.22
11405	H4 + 3 Acet + 3Met	1.83 \pm 0.48	2.41 \pm 0.22	2.62 \pm 0.03	2.30 \pm 0.05	2.17 \pm 0.26	1.84 \pm 0.09
11432	H4 + 4 Acet + 2Met	2.20 \pm 0.44	2.65 \pm 0.36	3.28 \pm 0.08	2.65 \pm 0.03	3.02 \pm 0.14	2.38 \pm 0.02
11474	H4 + 5 Acet + 2Met	0.00 \pm 0.00	1.50 \pm 0.34	1.26 \pm 0.14	1.42 \pm 0.00	1.41 \pm 0.34	1.07 \pm 0.22

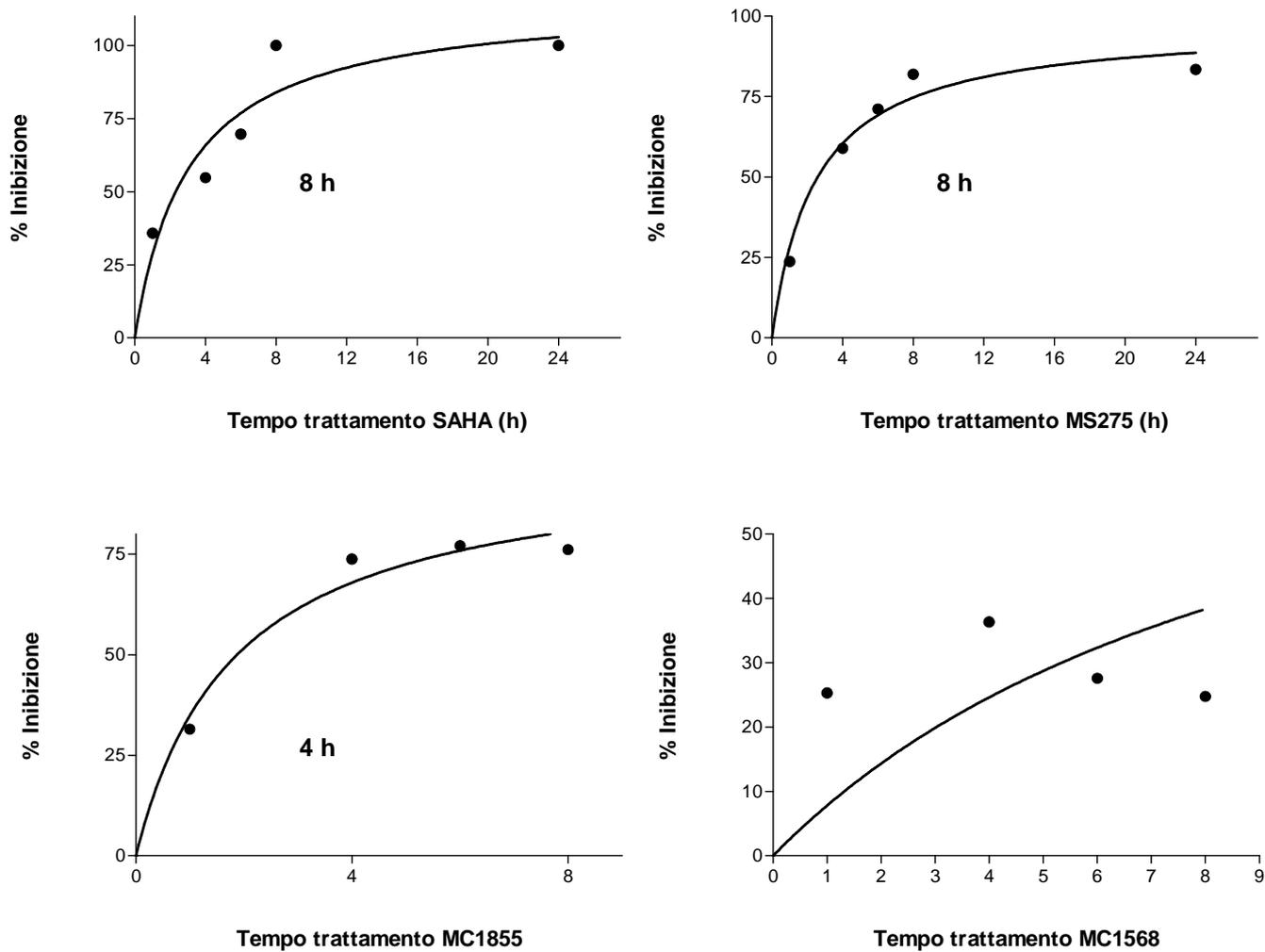


Figura 4.6. Variazione della percentuale di inibizione dell'istone H4 in funzione del tempo di trattamento con i diversi inibitori delle HDAC. Sono anche riportate le ore di trattamento che servono per ottenere l'effetto massimo.

Istone H2A-1

Studi di dose-dipendenza. Nella figura 4.7 sono riportati gli spettri deconvoluti relativi all'istone H2A-1 prima e dopo il trattamento delle cellule HT29 con gli inibitori delle HDAC somministrati a concentrazioni crescenti per effettuare, anche in questo caso, studi di dose-dipendenza.

Per l'istone H2A-1 era stata identificata un'unica forma acetilata avente massa molecolare pari a 14.049 Da e, come possiamo vedere in figura 4.5, è proprio l'abbondanza relativa di questa isoforma che aumenta man mano che aumentano le concentrazioni degli inibitori delle HDAC; in realtà un netto ed evidente aumento dell'isoforma acetilata si può osservare (fig. 4.7 e tab. 4.XII, 4.XIII e 4.XIV) dopo trattamento con SAHA, MS275 e MC1855, mentre dopo trattamento con MC1568 non si osserva alcuna sostanziale differenza.

Determinazione della IC_{50} . Per confrontare l'efficacia dei diversi inibitori, anche in questo caso si sono calcolate le loro IC_{50} caratteristiche e i valori massimi di inibizione che essi provocano (fig. 8). La percentuale di inibizione in questo caso è stata calcolata andando a valutare la diminuzione dell'abbondanza relativa dell'isoforma avente peso molecolare 14.007, ovvero dell'isoforma non acetilata. Mentre il composto più potente sia in termini di IC_{50} (3.29 μ M) che in termini di livello massimo di inibizione indotto (50.79%) è risultato essere MC1855, SAHA e MS275 hanno dimostrato di essere in grado di causare livelli massimi di inibizione simili (38.63% e 35.32%, rispettivamente), anche se il SAHA è caratterizzato da una IC_{50} nettamente più bassa (15.48 μ M) di MS275 (52.03 μ M). MC1568 è invece risultato inattivo su questa classe istonica.

Studi di tempo-dipendenza. Anche su questo istone sono stati effettuati studi di tempo-dipendenza andando a monitorare come variano le abbondanze relative delle diverse isoforme istoniche in funzione del tempo di trattamento con gli inibitori somministrati a concentrazione 50 μ M. Sia dalle trasformate (fig. 4.9) che dalle tabelle (tab. 4.XVI-4.XIX) si può osservare che l'abbondanza relativa dell'isoforma con un'acetilazione (14.049 Da) aumenta proporzionalmente al tempo di trattamento con gli inibitori SAHA, MS275 e MC1855; non vi sono al contrario modificazioni delle abbondanze relative delle varie isoforme in seguito a trattamento con MC1568, che era infatti risultato inattivo anche dagli studi di dose-dipendenza.

Andando ad osservare il tempo necessario per ottenere l'effetto massimo per i tre inibitori attivi su questa classe istonica si può osservare che i risultati ottenuti, espressi in ore, sono simili per i tre composti presi in esame (fig. 4.10).

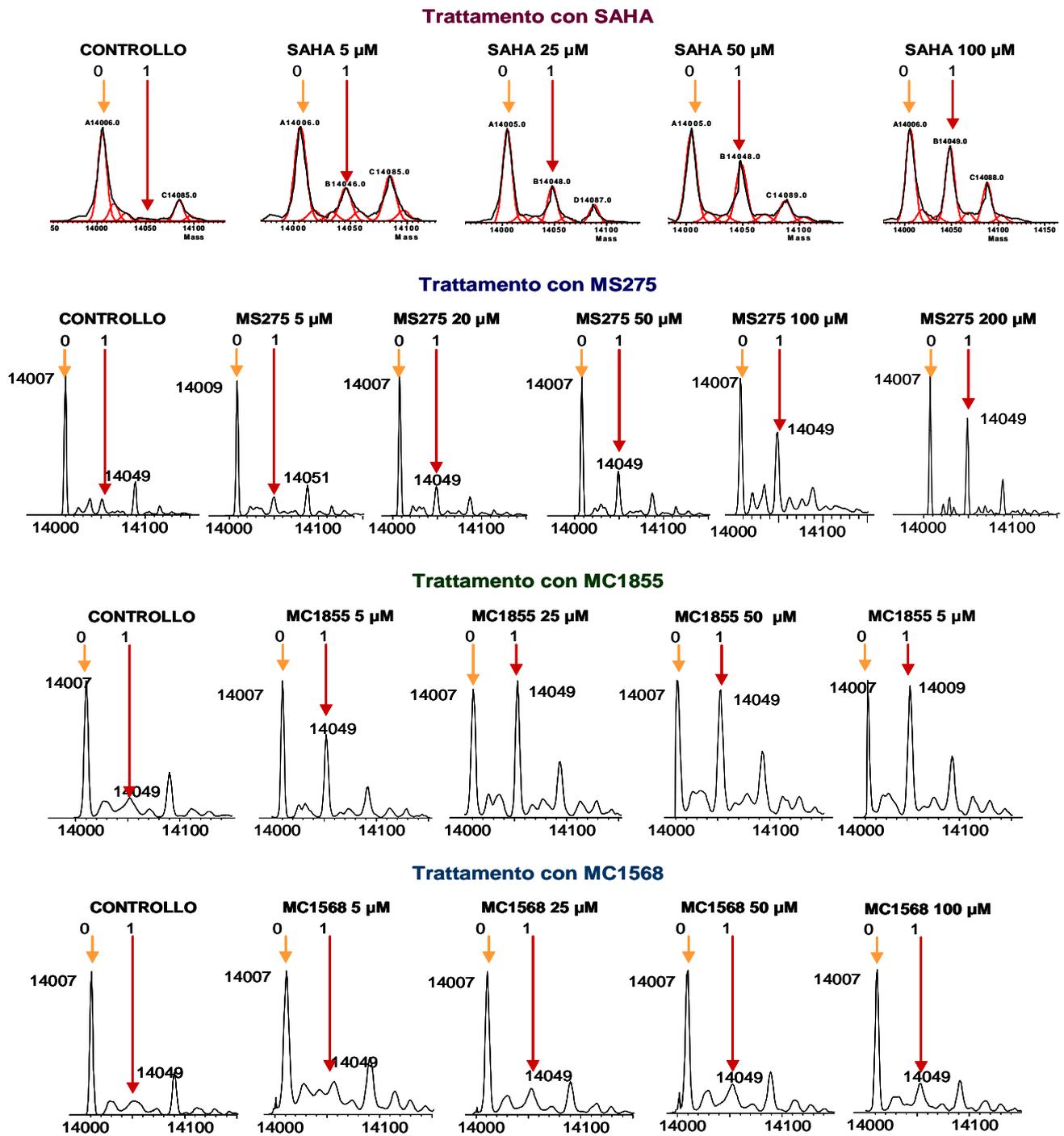


Figura 4.7. Spettri deconvolti relativi all'istone H2A-1 estratto da cellule HT29 trattate con gli inibitori delle HDAC a concentrazioni crescenti.

Tabella 4.XII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-1 prima e dopo trattamento con **SAHA** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi alla trappola ionica ed elaborati con il software MagTran 1.0.

PM	PTM	Controllo	SAHA 5 μ M	SAHA 25 μ M	SAHA 50 μ M	SAHA 100 μ M
14007		61.48 \pm 0.65	55.33 \pm 0.91	43.59 \pm 1.13	36.42 \pm 0.76	43.96 \pm 0.28
14020	H2A-1+ 1Me	11.21 \pm 1.53	8.34 \pm 0.35	5.20 \pm 0.45	7.67 \pm 0.16	5.23 \pm 0.30
14034	H2A-1+ 2 Me	6.37 \pm 1.57	4.17 \pm 0.16	3.56 \pm 0.35	3.71 \pm 0.47	3.52 \pm 0.40
14049	H2A-1+ 1Ac	2.07 \pm 0.09	26.35 \pm 0.90	31.72 \pm 0.69	27.41 \pm 0.16	28.42 \pm 0.71
14063	H2A-1+ 1Me + 1 Ac	1.93 \pm 0.08	4.01 \pm 0.52	3.40 \pm 0.56	3.88 \pm 0.58	3.89 \pm 0.47
14087	H2A-1+ 1P	14.77 \pm 0.99	20.43 \pm 0.04	10.95 \pm 0.68	14.99 \pm 0.67	11.49 \pm 0.18
14105	H2A-1+ 1Me + 2 Ac	2.17 \pm 1.65	5.39 \pm 0.74	1.60 \pm 0.23	5.93 \pm 1.33	3.50 \pm 1.39

Tabella 4.XIII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-1 prima e dopo trattamento con **MS275** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MS275 5 μ M	MS275 20 μ M	MS275 50 μ M	MS275 100 μ M	MS275 200 μ M
14007		49.01 \pm 5.81	56.59 \pm 1.75	56.33 \pm 0.32	51.88 \pm 0.58	38.29 \pm 3.59	44.97 \pm 1.15
14020	H2A-1+ 1Me	8.37 \pm 3.95	3.93 \pm 0.15	4.51 \pm 0.13	3.35 \pm 0.61	6.16 \pm 0.98	3.53 \pm 0.88
14034	H2A-1+ 2 Me	11.40 \pm 1,43	4.28 \pm 0.34	4.81 \pm 0.33	5.06 \pm 0.71	8.94 \pm 0.52	5.76 \pm 0.56
14049	H2A-1+ 1Ac	8.34 \pm 0.22	11.65 \pm 1.31	17.60 \pm 0.40	23.26 \pm 0.22	31.06 \pm 3.27	31.41 \pm 0.92
14063	H2A-1+ 1Me + 1 Ac	3.41 \pm 1.53	2.91 \pm 0.03	2.72 \pm 0.44	2.87 \pm 0.14	4.48 \pm 1.02	2.42 \pm 1.16
14087	H2A-1+ 1P	16.02 \pm 0.32	18.32 \pm 0.47	12.42 \pm 0.45	11.73 \pm 1.13	8.80 \pm 4.03	10.82 \pm 1.02
14105	H2A-1+ 1Me + 2 Ac	3.45 \pm 2.30	2.31 \pm 0.49	1.61 \pm 1.61	1.84 \pm 0.29	2.27 \pm 0.31	1.09 \pm 0.59

Tabella 4.XIV. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-1 prima e dopo trattamento con **MC1855** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1855 5 μ M	MC1855 25 μ M	MC1855 50 μ M	MC1855 100 μ M
14007		58.66 \pm 2.33	44.10 \pm 2.24	31.23 \pm 0.23	30.56 \pm 0.46	31.56 \pm 0.81
14020	H2A-1+ 1Me	3.33 \pm 2.91	7.58 \pm 3.31	6.86 \pm 0.64	6.19 \pm 1.72	7.48 \pm 0.11
14034	H2A-1+ 2 Me	4.50 \pm 0.66	5.07 \pm 0.37	6.64 \pm 0.74	6.81 \pm 0.67	4.39 \pm 0.22
14049	H2A-1+ 1Ac	6.73 \pm 0.61	25.81 \pm 3.38	35.09 \pm 1.30	35.38 \pm 1.06	34.45 \pm 0.32
14063	H2A-1+ 1Me + 1 Ac	2.46 \pm 0.24	3.26 \pm 0.89	4.08 \pm 0.26	3.66 \pm 0.35	3.19 \pm 0.03
14087	H2A-1+ 1P	21.86 \pm 0.75	12.10 \pm 0.39	15.18 \pm 0.63	15.89 \pm 1.15	17.34 \pm 0.04
14105	H2A-1+ 1Me + 2 Ac	2.46 \pm 0.18	2.08 \pm 0.67	0.91 \pm 1.05	1.50 \pm 0.28	1.59 \pm 0.53

Tabella 4.XV. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-1 prima e dopo trattamento con **MC1568** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1568 5 μ M	MC1568 25 μ M	MC1568 50 μ M	MC1568 100 μ M
14007		58.66 \pm 2.33	58.66 \pm 2.33	63.17 \pm 1.06	58.29 \pm 1.42	56,68 \pm 1.96
14020	H2A-1+ 1Me	3.33 \pm 2.91	3.33 \pm 2.91	5.09 \pm 2.01	5.53 \pm 0.62	6,15 \pm 0.29
14034	H2A-1+ 2 Me	4.50 \pm 0.66	4.50 \pm 0.66	3.60 \pm 0.10	7.49 \pm 1.43	6,58 \pm 0.10
14049	H2A-1+ 1Ac	6.73 \pm 0.61	6.73 \pm 0.61	9.11 \pm 0.16	7.52 \pm 0.42	10,31 \pm 0.51
14063	H2A-1+ 1Me + 1 Ac	2.46 \pm 0.24	2.46 \pm 0.24	2.76 \pm 0.53	4.32 \pm 3.53	2,28 \pm 0.02
14087	H2A-1+ 1P	21.86 \pm 0.75	21.86 \pm 0.75	13.99 \pm 0.52	14.51 \pm 2.97	14,59 \pm 0.96
14105	H2A-1+ 1Me + 2 Ac	2.46 \pm 0.18	2.46 \pm 0.18	2.29 \pm 0.37	2.35 \pm 0.35	3,41 \pm 0.32

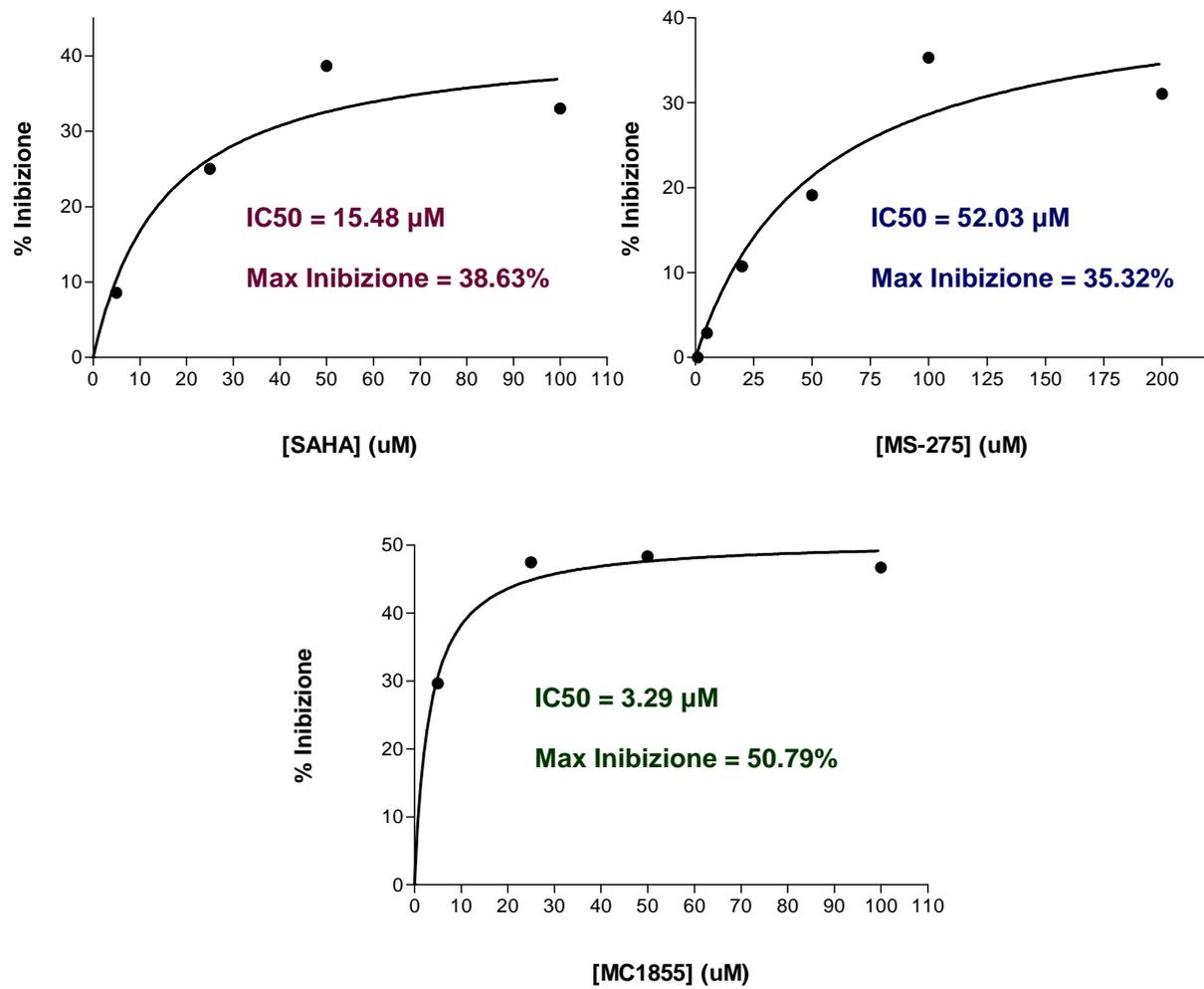


Figura 4.8. Variazione della percentuale di inibizione dell'istone H2A-1 in funzione della concentrazione di inibitore con cui sono trattate le cellule HT29.

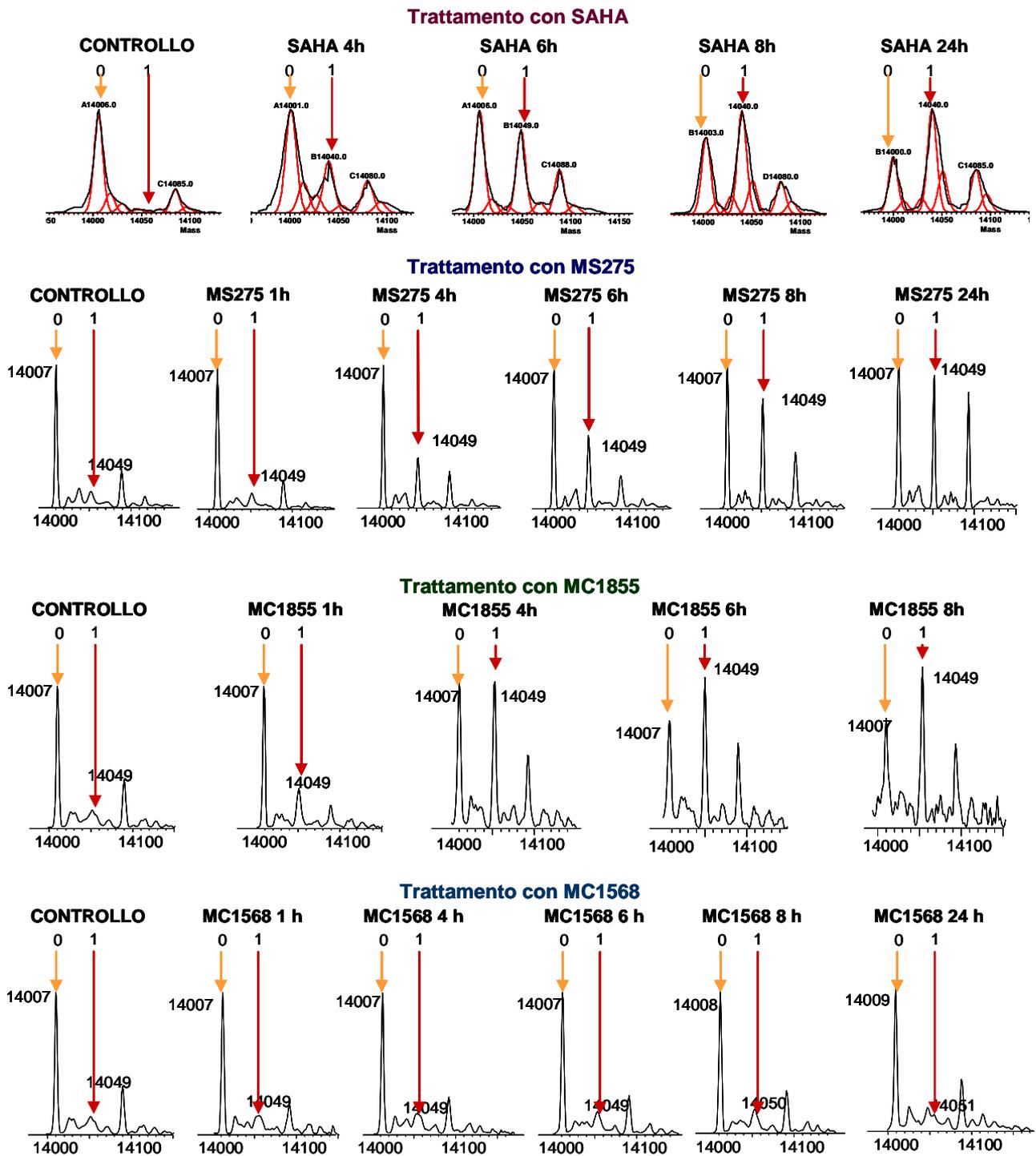


Figura 4.9. Spettri deconvolti relativi all'istone H2A-1 estratto da cellule HT29 trattate con gli inibitori delle HDAC a concentrazione $50 \mu\text{M}$ per diversi tempi.

Tabella 4.XVI. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-1 prima e dopo trattamento con **SAHA** a concentrazione 50 μM per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi alla trappola ionica ed elaborati con il software Mag Tran 1.0.

PM	PTM	Controllo	SAHA 1h	SAHA 4h	SAHA 6h	SAHA 8h	SAHA 24h
14007		61.48 \pm 0.65	49.11 \pm 0.73	39.20 \pm 1.99	36.42 \pm 0.76	27.56 \pm 1.30	20.39 \pm 1.23
14020	H2A-1+ 1Me	11.21 \pm 1.53	9.10 \pm 1.00	11.54 \pm 0.61	7.67 \pm 0.16	4.78 \pm 0.95	5.62 \pm 2.66
14034	H2A-1+ 2 Me	6.37 \pm 1.57	3.89 \pm 0.02	5.65 \pm 1.85	3.71 \pm 0.47	5.05 \pm 1.47	4.57 \pm 0.24
14049	H2A-1+ 1Ac	2.07 \pm 0.09	17.49 \pm 0.99	19.35 \pm 1.46	27.41 \pm 0.16	34.92 \pm 1.41	40.60 \pm 0.39
14063	H2A-1+ 1Me + 1 Ac	1.93 \pm 0.08	5.60 \pm 0.38	5.24 \pm 3.17	3.88 \pm 0.58	11.36 \pm 0.28	14.05 \pm 0.57
14087	H2A-1+ 1P	14.77 \pm 0.99	14.82 \pm 1.01	14.90 \pm 2.99	14.99 \pm 0.67	11.83 \pm 0.71	9.57 \pm 1.74
14105	H2A-1+ 1Me + 2 Ac	2.17 \pm 1.65	n.d.	4.14 \pm 0.25	5.93 \pm 1.33	4.52 \pm 0.19	5.21 \pm 1.73

Tabella 4.XVII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-1 prima e dopo trattamento con **MS275** a concentrazione 50 μM per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MS275 1h	MS275 4h	MS275 6h	MS275 8h	MS275 24h
14007		49.01 \pm 2.81	48.62 \pm 1.02	48.07 \pm 0.45	49.81 \pm 3.61	39.88 \pm 0.53	32.52 \pm 0.62
14020	H2A-1+ 1Me	8.37 \pm 1.95	8.46 \pm 2.01	4.17 \pm 0.29	3.61 \pm 0.63	3.54 \pm 0.27	3.22 \pm 0.62
14034	H2A-1+ 2 Me	11.40 \pm 1.43	11.27 \pm 0.42	6.01 \pm 0.49	5.16 \pm 0.53	5.23 \pm 0.85	5.26 \pm 1.00
14049	H2A-1+ 1Ac	8.34 \pm 0.22	7.94 \pm 0.84	22.91 \pm 0.45	24.63 \pm 2.38	30.82 \pm 0.38	30.25 \pm 0.51
14063	H2A-1+ 1Me + 1 Ac	3.41 \pm 1.53	2.00 \pm 0.34	1.43 \pm 1.09	2.58 \pm 0.51	2.60 \pm 0.18	2.49 \pm 0.88
14087	H2A-1+ 1P	16.02 \pm 0.32	18.86 \pm 0.45	16.33 \pm 2.78	12.38 \pm 1.39	16.33 \pm 1.45	24.48 \pm 0.28
14105	H2A-1+ 1Me + 2 Ac	3.45 \pm 2.30	2.85 \pm 0.24	1.08 \pm 0.09	1.82 \pm 0.21	1.59 \pm 0.00	1.78 \pm 0.34

Tabella 4.XVIII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-1 prima e dopo trattamento con **MC1855** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6 e 8h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1855 1h	MC1855 4h	MC1855 6h	MC1855 8h
14007		56.96 \pm 0.84	57.12 \pm 1.00	32.76 \pm 0.64	24.30 \pm 0.93	22.93 \pm 1.33
14020	H2A-1+ 1Me	6.71 \pm 0.22	5.93 \pm 0.00	7.41 \pm 0.51	8.50 \pm 1.54	8.20 \pm 3.59
14034	H2A-1+ 2 Me	6.21 \pm 0.08	5.55 \pm 0.04	5.59 \pm 0.70	5.96 \pm 1.80	6.21 \pm 1.24
14049	H2A-1+ 1Ac	6.50 \pm 0.95	15.76 \pm 0.54	30.77 \pm 1.83	33.36 \pm 2.46	32.68 \pm 3.38
14063	H2A-1+ 1Me + 1 Ac	3.27 \pm 0.06	3.31 \pm 0.13	3.96 \pm 0.77	3.07 \pm 0.36	5,55 \pm 0.59
14087	H2A-1+ 1P	19.16 \pm 0.04	10.19 \pm 1.05	15.47 \pm 0.66	19.47 \pm 0.50	17,40 \pm 1.25
14105	H2A-1+ 1Me + 2 Ac	1.19 \pm 0.21	2.14 \pm 0.40	4.04 \pm 0.14	5.33 \pm 0.20	7,04 \pm 0.54

Tabella 4.XIX. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-1 prima e dopo trattamento con **MC1568** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1568 1h	MC1568 4h	MC1568 6h	MC1568 8h	MC1568 24h
14007		50.02 \pm 0.03	57.61 \pm 2.55	56.89 \pm 1.99	57.50 \pm 1.16	52.94 \pm 4.43	52.68 \pm 4.04
14020	H2A-1+ 1Me	8.17 \pm 0.90	7.81 \pm 0.13	7.23 \pm 0.14	5.26 \pm 0.13	5.69 \pm 0.83	7.51 \pm 1.55
14034	H2A-1+ 2 Me	6.83 \pm 1.22	5.41 \pm 0.30	6.37 \pm 0.31	5.06 \pm 0.23	5.41 \pm 0.66	5.78 \pm 1.38
14049	H2A-1+ 1Ac	6.40 \pm 0.06	9.15 \pm 1.81	9.16 \pm 1.31	9.16 \pm 0.11	10.28 \pm 1.10	8.16 \pm 0.04
14063	H2A-1+ 1Me + 1 Ac	3.49 \pm 0.23	3.42 \pm 0.27	2.59 \pm 1.94	3.35 \pm 0.43	4.73 \pm 2.29	4.07 \pm 0.67
14087	H2A-1+ 1P	20.92 \pm 0.67	12.37 \pm 0.16	14.39 \pm 0.35	15.46 \pm 0.06	15.80 \pm 1.36	17.23 \pm 1.32
14105	H2A-1+ 1Me + 2 Ac	4.18 \pm 2.00	4.23 \pm 0.11	3.36 \pm 1.46	4.20 \pm 0.32	5.15 \pm 0.92	4.58 \pm 0.91

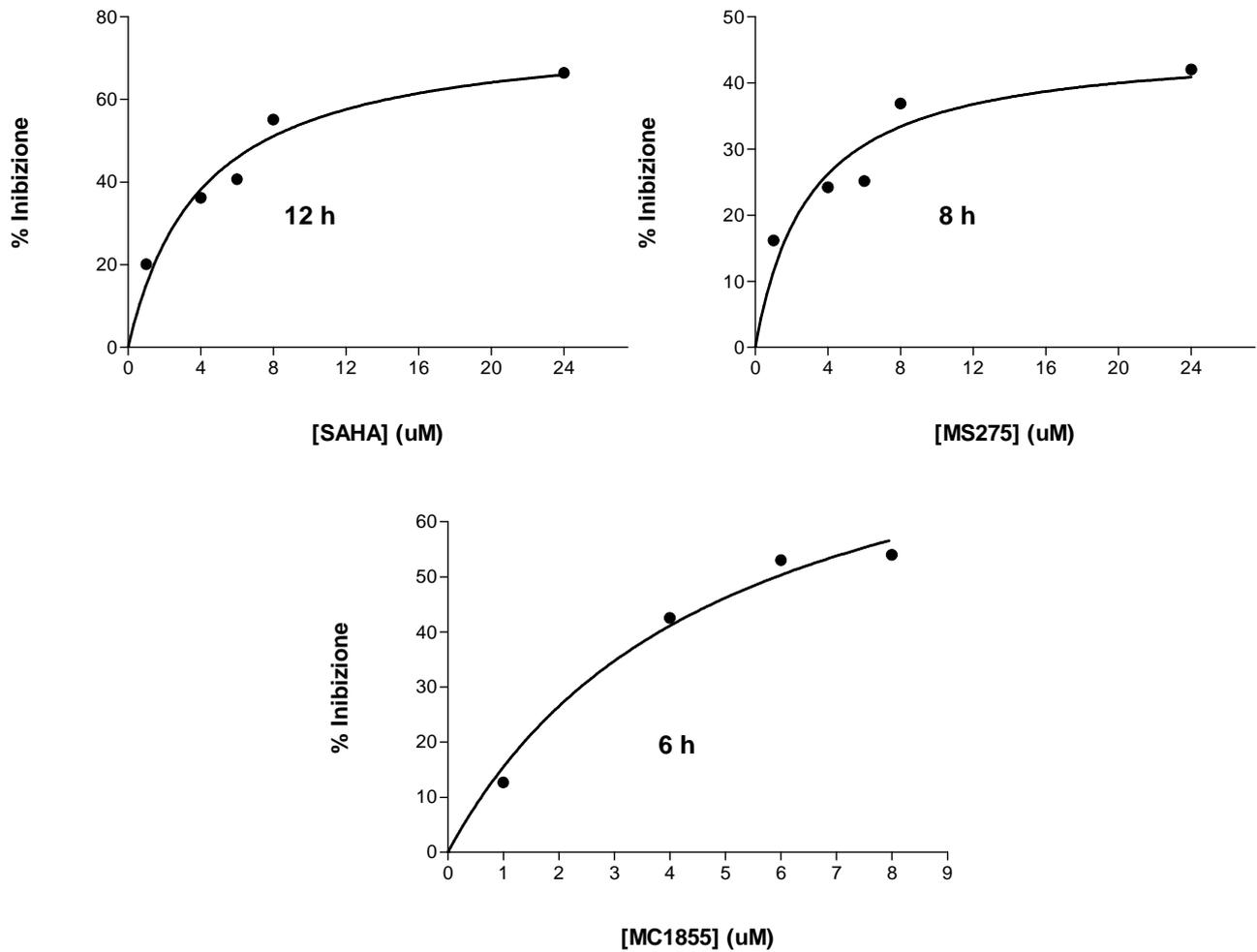


Figura 4.10. Variazione della percentuale di inibizione dell'istone H2A-1 in funzione del tempo di trattamento con i diversi inibitori delle HDAC. Sono anche riportate le ore di trattamento che servono per ottenere l'effetto massimo.

Istone H2A-2

Studi di dose-dipendenza. Anche per l'istone H2A-2 sono state effettuate le prove con gli inibitori usati a concentrazioni crescenti e i risultati sono riportati sia nella figura 4.11 che nelle tabelle 4.XX-4.XXIII.

Si può osservare che, come per gli istoni analizzati precedentemente, dopo trattamento con SAHA MS275 e MC1855 vi sia un effettivo incremento delle abbondanze percentuali delle isoforme acetilate. In particolare aumentano l'isoforma mono-acetilata (14.046 Da) e di-acetilata (14.088 Da). Come per l'istone H2A-1 e l'istone H4 il trattamento con MC1568 non ha invece indotto l'incremento delle isoforme acetilate.

Calcolo della IC_{50} . Anche in questo caso sono state determinate le IC_{50} per poter confrontare l'attività dei diversi inibitori e i risultati sono riportati in figura 4.12. Come si può osservare dai valori riportati nella figura, in questo caso sebbene MC1855 risulta avere il valore di IC_{50} più basso (1.54 μ M), la percentuale massima di inibizione è stata ottenuta dopo il trattamento con l'inibitore SAHA (66.26%). MS275 è invece caratterizzato da un valore di IC_{50} molto alto (119.1 μ M) e produce un'inibizione massima solo del 34.09%, più bassa di quelle ottenute con gli altri due inibitori.

Studi di tempo-dipendenza. Sono stati infine condotti gli studi di dose dipendenza per poter valutare quale degli inibitori sia in grado di provocare il massimo della risposta in tempi più brevi (fig. 4.13; tab. 4.XXIV-4.XXVII).

Dalle analisi dell'istone H2A-2, dopo trattamento con i quattro diversi inibitori a concentrazione 50 μ M per tempi di trattamento compresi tra 1 e 24 ore, è risultato che sia MS275 che MC1855 sono in grado di provocare il massimo di inibizione già a 4 ore, mentre il SAHA necessita di trattamenti di almeno 8 ore (fig. 4.14). Dopo trattamento con MC1855 per 24 ore non è stato possibile valutare lo stato di acetilazione degli istoni perché le cellule HT29 trattate sono risultate tutte morte.

Infine le analisi effettuate sull'istone H2A-2 estratto da cellule HT29 trattate con MC1568 hanno evidenziato la scarsa capacità di questo inibitore di indurre un aumento dei livelli di acetilazione delle proteine istoniche.

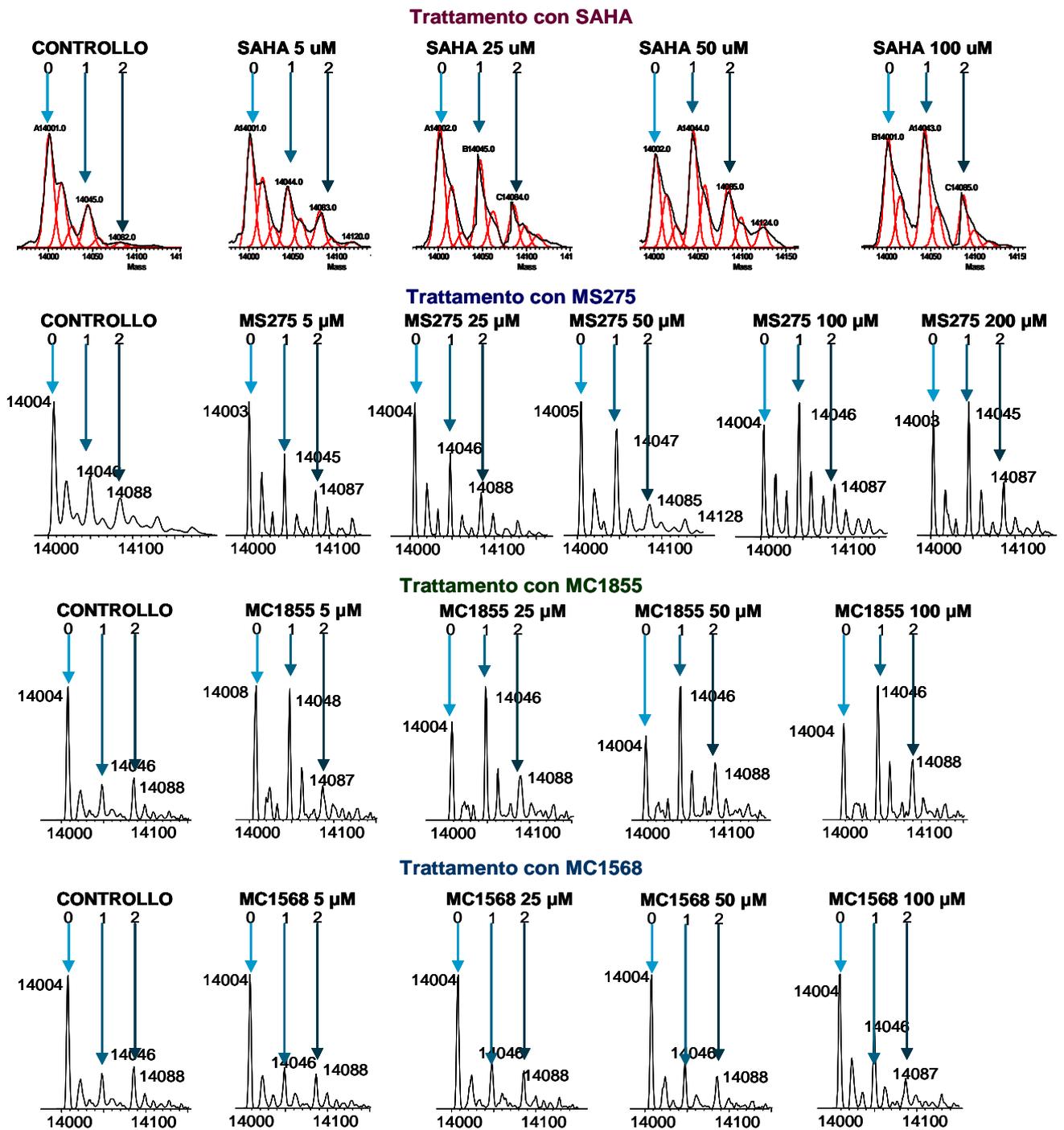


Figura 4.11. Spettri deconvolti relativi all'istone H2A-2 estratto da cellule HT29 trattate con gli inibitori delle HDAC a concentrazioni crescenti.

Tabella 4.XX. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-2 prima e dopo trattamento con **SAHA** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi alla trappola ionica ed elaborati con il software MagTran 1.0.

PM	PTM	Controllo	SAHA 5 μ M	SAHA 25 μ M	SAHA 50 μ M	SAHA 100 μ M
14004	H2A-2	45.58 \pm 0.30	30.05 \pm 1.36	29.57 \pm 1.06	24.71 \pm 0.24	23.35 \pm 0.63
14018	H2A-2+ 1Me	23.08 \pm 1.57	18.00 \pm 0.19	15.55 \pm 0.83	11.74 \pm 0.42	14.38 \pm 0.35
14032	H2A-2+ 2Me	9.18 \pm 0.98	4.11 \pm 0.16	3.97 \pm 0.13	4.01 \pm 1.33	3.11 \pm 1.56
14046	H2A-2+ 1Ac	15.18 \pm 1.09	18.53 \pm 0.08	22.44 \pm 1.57	29.27 \pm 0.53	27.03 \pm 1.32
14060	H2A-2+1 Me+1Ac	4.36 \pm 0.88	7.95 \pm 0.95	8.06 \pm 0.78	11.33 \pm 0.13	11.65 \pm 0.21
14088	H2A-2+ 2Ac	1.81 \pm 0.08	12.49 \pm 0.08	11.76 \pm 0.53	11.40 \pm 0.32	11.48 \pm 0.69
14102	H2A-2+1Me + 2 Ac	0.82 \pm 0.21	7.36 \pm 0.33	5.98 \pm 0.37	5.11 \pm 0.86	5.31 \pm 0.03
14130	H2A-2+ 3 Ac	n.d.	1.51 \pm 0.11	2.75 \pm 0.64	2.94 \pm 1.22	3.71 \pm 0.14

Tabella 4.XXI. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-2 prima e dopo trattamento con **MS275** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MS-275 5 μ M	MS-275 20 μ M	MS-275 50 μ M	MS-275 100 μ M	MS-275 200 μ M
14004		31.24 \pm 2.17	31.40 \pm 0.81	31.19 \pm 0.18	31.16 \pm 0.72	23.34 \pm 1.36	27.31 \pm 0.22
14018	+ 1Me	14.91 \pm 0.86	13.88 \pm 1.08	14.87 \pm 0.37	12.53 \pm 0.01	11.37 \pm 0.42	9.14 \pm 0.56
14032	+ 2Me	9.16 \pm 0.65	5.71 \pm 0.68	7.14 \pm 0.20	4.51 \pm 1.05	7.84 \pm 1.80	2.56 \pm 0.32
14046	+ 1Ac	21.34 \pm 0.94	21.54 \pm 0.10	23.35 \pm 0.15	26.46 \pm 0.23	24.88 \pm 1.56	30.28 \pm 0.89
14060	+1 Me+1Ac	3.99 \pm 0.07	4.59 \pm 0.08	9.26 \pm 1.63	8.03 \pm 0.41	12.28 \pm 0.93	9.97 \pm 0.79
14088	+ 2Ac	9.87 \pm 0.58	11.29 \pm 1.34	6.12 \pm 0.21	8.91 \pm 0.58	12.38 \pm 1.13	14.65 \pm 0.33
14102	+1Me + 2 Ac	5.48 \pm 0.44	7.45 \pm 0.15	4.44 \pm 0.17	4.72 \pm 0.24	5.43 \pm 0.61	4.16 \pm 1.01
14130	+ 3 Ac	4.00 \pm 0.06	4.14 \pm 0.26	3.64 \pm 0.35	3.68 \pm 0.32	2.49 \pm 0.30	1.92 \pm 0.43

Tabella 4.XXII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-2 prima e dopo trattamento con **MC1855** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1855 5 μ M	MC1855 25 μ M	MC1855 50 μ M	MC1855 100 μ M
14004	H2A-2	41.61 \pm 1.42	32.14 \pm 1.03	25.98 \pm 1.02	25.79 \pm 3.88	24.68 \pm 0.17
14018	H2A-2+ 1Me	10.35 \pm 0.74	5.91 \pm 1.68	5.16 \pm 0.03	4.55 \pm 0.22	4.67 \pm 0.19
14032	H2A-2+ 2Me	3.42 \pm 0.08	3.58 \pm 0.76	3.22 \pm 0.19	3.10 \pm 1.23	2.73 \pm 0.21
14046	H2A-2+ 1Ac	13.98 \pm 1.40	32.06 \pm 0.88	32.71 \pm 1.31	33.60 \pm 0.14	32.69 \pm 0.05
14060	H2A-2+1 Me+1Ac	5.04 \pm 0.67	11.42 \pm 0.02	13.78 \pm 0.67	11.07 \pm 2.41	14.01 \pm 0.78
14088	H2A-2+ 2Ac	17.49 \pm 0.71	8.58 \pm 0.39	11.52 \pm 0.30	14.17 \pm 0.81	13.83 \pm 0.04
14102	H2A-2+1Me + 2 Ac	5.73 \pm 0.11	3.06 \pm 0.01	4.13 \pm 0.22	4.01 \pm 0.48	4.23 \pm 0.05
14130	H2A-2+ 3 Ac	2.37 \pm 0.53	3.26 \pm 0.67	3.50 \pm 0.09	3.69 \pm 0.48	3.15 \pm 0.16

Tabella 4.XXIII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-2 prima e dopo trattamento con **MC1568** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1568 5 μ M	MC1568 25 μ M	MC1568 50 μ M	MC1568 100 μ M
14004	H2A-2	41.61 \pm 1.42	45.86 \pm 2.30	48.24 \pm 2.06	49.92 \pm 3.24	46.06 \pm 3.75
14018	H2A-2+ 1Me	10.35 \pm 0.74	11.85 \pm 0.75	11.65 \pm 0.79	10.68 \pm 0.51	11.11 \pm 0.45
14032	H2A-2+ 2Me	3.42 \pm 0.08	4.33 \pm 0.51	3.25 \pm 0.48	2.66 \pm 0.59	4.59 \pm 0.74
14046	H2A-2+ 1Ac	13.98 \pm 1.40	14.18 \pm 1.25	14.11 \pm 1.69	14.52 \pm 1.96	18.23 \pm 2.00
14060	H2A-2+1 Me+1Ac	5.04 \pm 0.67	5.55 \pm 0.55	5.11 \pm 0.52	4.59 \pm 0.17	5.32 \pm 0.97
14088	H2A-2+ 2Ac	17.49 \pm 0.71	10.76 \pm 1.20	10.87 \pm 0.12	10.94 \pm 0.58	8.29 \pm 0.94
14102	H2A-2+1Me + 2 Ac	5.73 \pm 0.11	4.69 \pm 0.60	4.13 \pm 0.49	3.85 \pm 0.46	3.43 \pm 0.07
14130	H2A-2+ 3 Ac	2.37 \pm 0.53	2.77 \pm 0.04	2.63 \pm 0.14	2.84 \pm 0.32	2.98 \pm 0.20

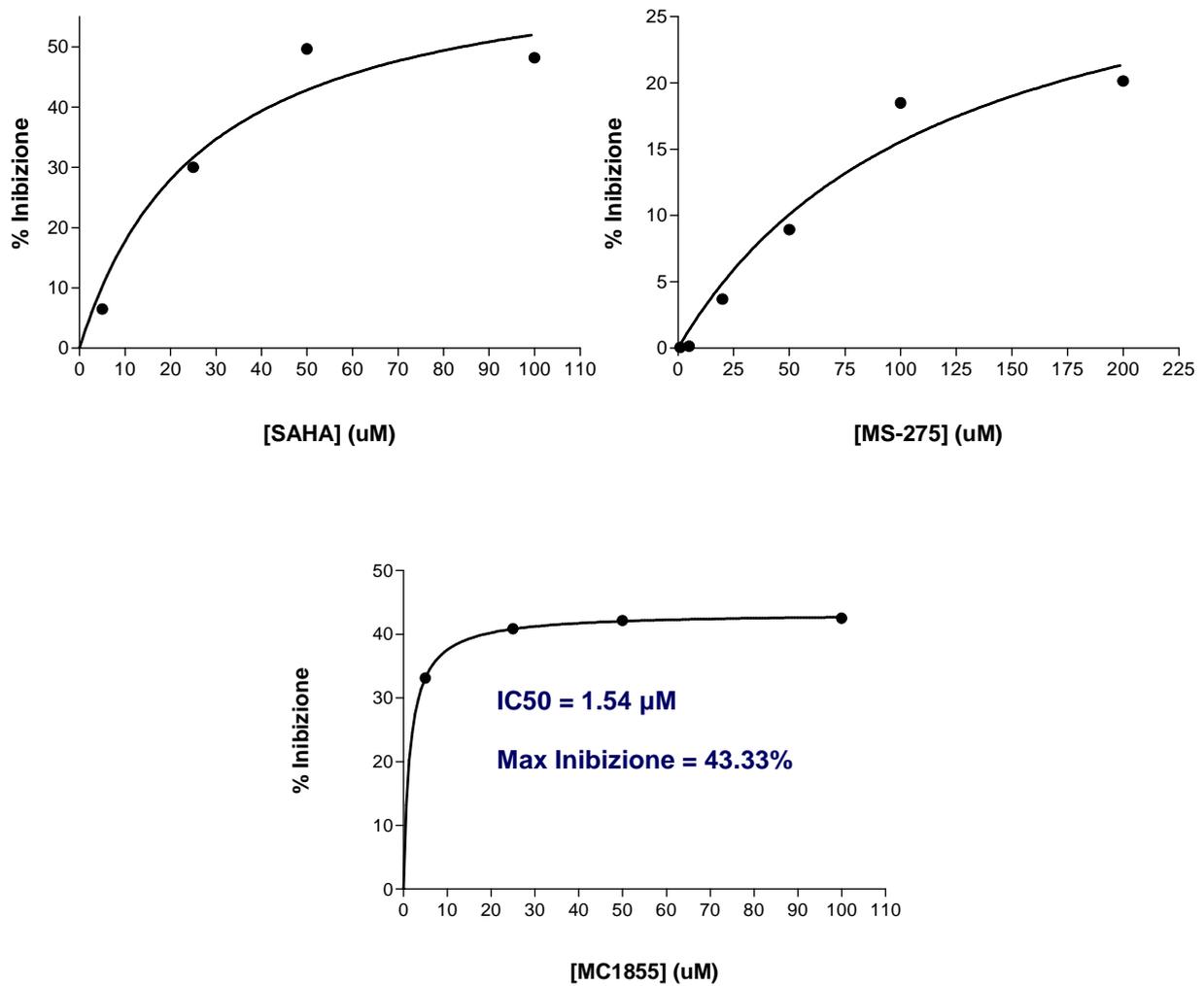


Figura 4.12. Variazione della percentuale di inibizione sull'istone H2A-2 in funzione della concentrazione di inibitore con cui sono trattate le cellule HT29.

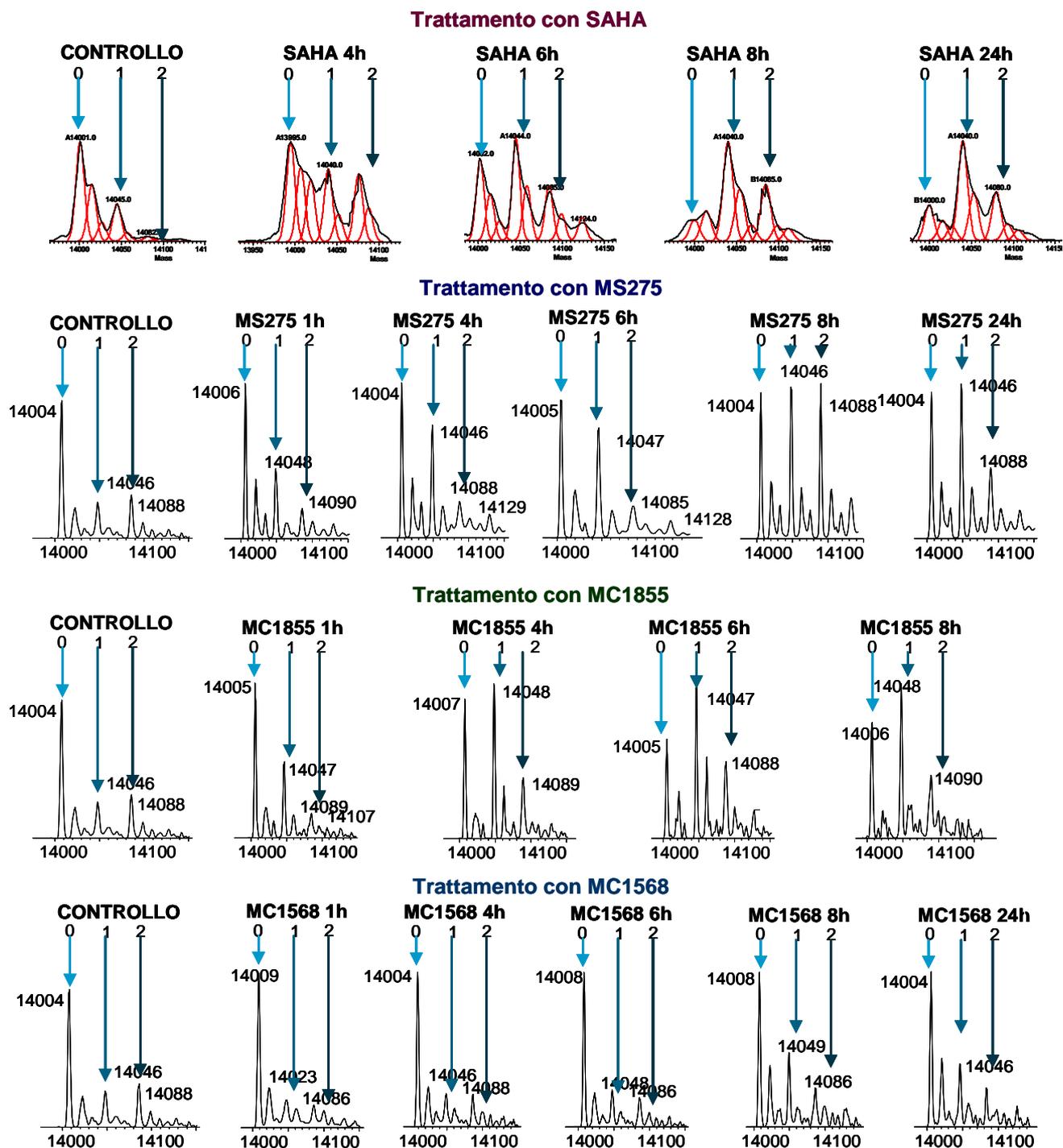


Figura 4.13. Spettri deconvolti relativi all'istone H2A-2 estratto da cellule HT29 trattate con gli inibitori delle HDAC a concentrazione 50 μ M per diversi tempi.

Tabella 4.XXIV. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-2 prima e dopo trattamento con **SAHA** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi alla trappola ionica ed elaborati con il software Mag Tran 1.0.

PM	PTM	Controllo	SAHA 1 h	SAHA 4h	SAHA 6h	SAHA 8h	SAHA 24h
14004		45.58 \pm 0.30	36.43 \pm 0.23	25.14 \pm 0.58	24.71 \pm 0.24	7.26 \pm 0.33	5.14 \pm 1.43
14018	+ 1Me	23.08 \pm 1.57	18.56 \pm 2.04	16.79 \pm 0.34	11.74 \pm 0.42	9.49 \pm 0.59	6.24 \pm 0.81
14032	+ 2Me	9.18 \pm 0.98	7.39 \pm 0.06	13.14 \pm 1.41	4.01 \pm 1.33	4.75 \pm 0.76	4.93 \pm 0.01
14046	+ 1Ac	15.18 \pm 1.09	20.09 \pm 0.86	21.69 \pm 0.18	29.27 \pm 0.53	32.53 \pm 0.28	34.42 \pm 0.64
14060	+1 Me+1Ac	4.36 \pm 0.88	6.70 \pm 0.51	7.04 \pm 0.96	11.53 \pm 0.13	17.65 \pm 0.70	17.59 \pm 1.90
14088	+ 2Ac	1.81 \pm 0.08	6.97 \pm 0.34	8.36 \pm 0.10	11.40 \pm 0.32	19.04 \pm 0.57	21.38 \pm 1.67
14102	+1Me + 2 Ac	0.82 \pm 0.21	3.88 \pm 0.18	7.84 \pm 0.12	5.11 \pm 0.86	4.67 \pm 0.71	5.62 \pm 0.20
14130	+ 3 Ac	n.d.	n.d.	n.d.	2.24 \pm 1.22	4.64 \pm 0.74	4.69 \pm 1.56

Tabella 4.XXV. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-2 prima e dopo trattamento con **MS275** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MS275 1 h	MS275 4h	MS275 6h	MS275 8h	MS275 24h
14004		31.24 \pm 2.17	29.91 \pm 2.45	28.16 \pm 0.11	26.19 \pm 1.76	23.61 \pm 0.83	21.43 \pm 0.13
14018	+ 1Me	14.91 \pm 0.86	11.91 \pm 1.70	12.17 \pm 0.18	12.46 \pm 0.13	9.05 \pm 1.30	8.46 \pm 0.47
14032	+ 2Me	9.16 \pm 0.65	4.17 \pm 0.26	7.00 \pm 0.22	4.98 \pm 1.11	2.60 \pm 1.68	3.77 \pm 0.45
14046	+ 1Ac	21.34 \pm 0.94	24.25 \pm 1.87	28.80 \pm 0.10	30.91 \pm 0.80	31.34 \pm 3.01	21.06 \pm 0.17
14060	+1 Me+1Ac	3.99 \pm 0.07	10.18 \pm 1.66	6.16 \pm 0.38	8.39 \pm 0.70	8.87 \pm 0.59	8.74 \pm 0.47
14088	+ 2Ac	9.87 \pm 0.58	12.03 \pm 1.61	8.80 \pm 0.54	9.12 \pm 0.54	14.95 \pm 1.63	24.45 \pm 0.17
14102	+1Me + 2 Ac	5.49 \pm 0.44	4.82 \pm 0.96	4.17 \pm 0.42	4.45 \pm 0.50	5.34 \pm 0.06	8.16 \pm 0.70
14130	+ 3 Ac	4.00 \pm 0.06	2.72 \pm 0.31	4.74 \pm 0.21	3.50 \pm 0.38	4.25 \pm 0.18	3.93 \pm 0.85

Tabella 4.XXVI. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-2 prima e dopo trattamento con **MC1855** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6 e 8h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1855 1 h	MC1855 4h	MC1855 6h	MC1855 8h
14004		47.88 \pm 3.87	45.08 \pm 0.09	27.58 \pm 1.92	19.74 \pm 1.71	24.08 \pm 1.59
14018	+ 1Me	10.39 \pm 0.29	9.05 \pm 0.39	4.96 \pm 0.56	8.43 \pm 0.52	6.60 \pm 0.90
14032	+ 2Me	3.16 \pm 0.64	4.14 \pm 0.33	3.33 \pm 0.00	2.55 \pm 0.37	3.98 \pm 0.60
14046	+ 1Ac	12.74 \pm 1.60	22.69 \pm 1.34	32.73 \pm 1.57	28.83 \pm 0.19	30.28 \pm 4.61
14060	+1 Me+1Ac	3.93 \pm 0.17	7.11 \pm 0.26	11.23 \pm 0.74	15.00 \pm 0.33	6.99 \pm 0.30
14088	+ 2Ac	13.59 \pm 0.07	6.58 \pm 0.82	12.69 \pm 0.06	15.20 \pm 1.12	16.28 \pm 3.76
14102	+1Me + 2 Ac	5.11 \pm 0.54	2.95 \pm 0.41	3.67 \pm 0.02	5.40 \pm 0.75	6.26 \pm 0.48
14130	+ 3 Ac	3.21 \pm 0.69	2.41 \pm 0.18	3.82 \pm 0.26	4.85 \pm 0.67	5.54 \pm 1.97

Tabella 4.XXVII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2A-2 prima e dopo trattamento con **MC1568** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1568 1 h	MC1568 4h	MC1568 6h	MC1568 8h	MC1568 24h
14004		51.55 \pm 3.00	49.83 \pm 2.95	49.43 \pm 1.00	50.98 \pm 0.73	42.27 \pm 5.84	41.26 \pm 3.79
14018	+ 1Me	11.55 \pm 0.56	12.76 \pm 0.69	12.29 \pm 0.26	7.70 \pm 4.85	13.07 \pm 2.97	17.48 \pm 0.67
14032	+ 2Me	3.80 \pm 0.57	3.90 \pm 1.34	4.74 \pm 0.07	4.53 \pm 0.92	4.59 \pm 0.28	3.66 \pm 0.36
14046	+ 1Ac	11.76 \pm 0.90	9.35 \pm 0.09	9.88 \pm 0.67	13.07 \pm 1.48	14.55 \pm 5.26	15.07 \pm 0.85
14060	+1 Me+1Ac	4.83 \pm 1.05	6.33 \pm 0.04	5.57 \pm 0.19	4.01 \pm 1.32	5.57 \pm 1.15	5.16 \pm 0.90
14088	+ 2Ac	10.11 \pm 0.81	8.67 \pm 1.58	9.65 \pm 0.69	12.62 \pm 4.42	10.16 \pm 0.82	8.54 \pm 1.57
14102	+1Me + 2 Ac	3.93 \pm 0.48	5.56 \pm 0.17	5.02 \pm 0.46	4.28 \pm 0.60	5.25 \pm 0.23	4.12 \pm 0.22
14130	+ 3 Ac	2.47 \pm 0.33	3.60 \pm 0.76	3.42 \pm 0.42	2.81 \pm 0.78	4.54 \pm 0.00	4.70 \pm 0.56

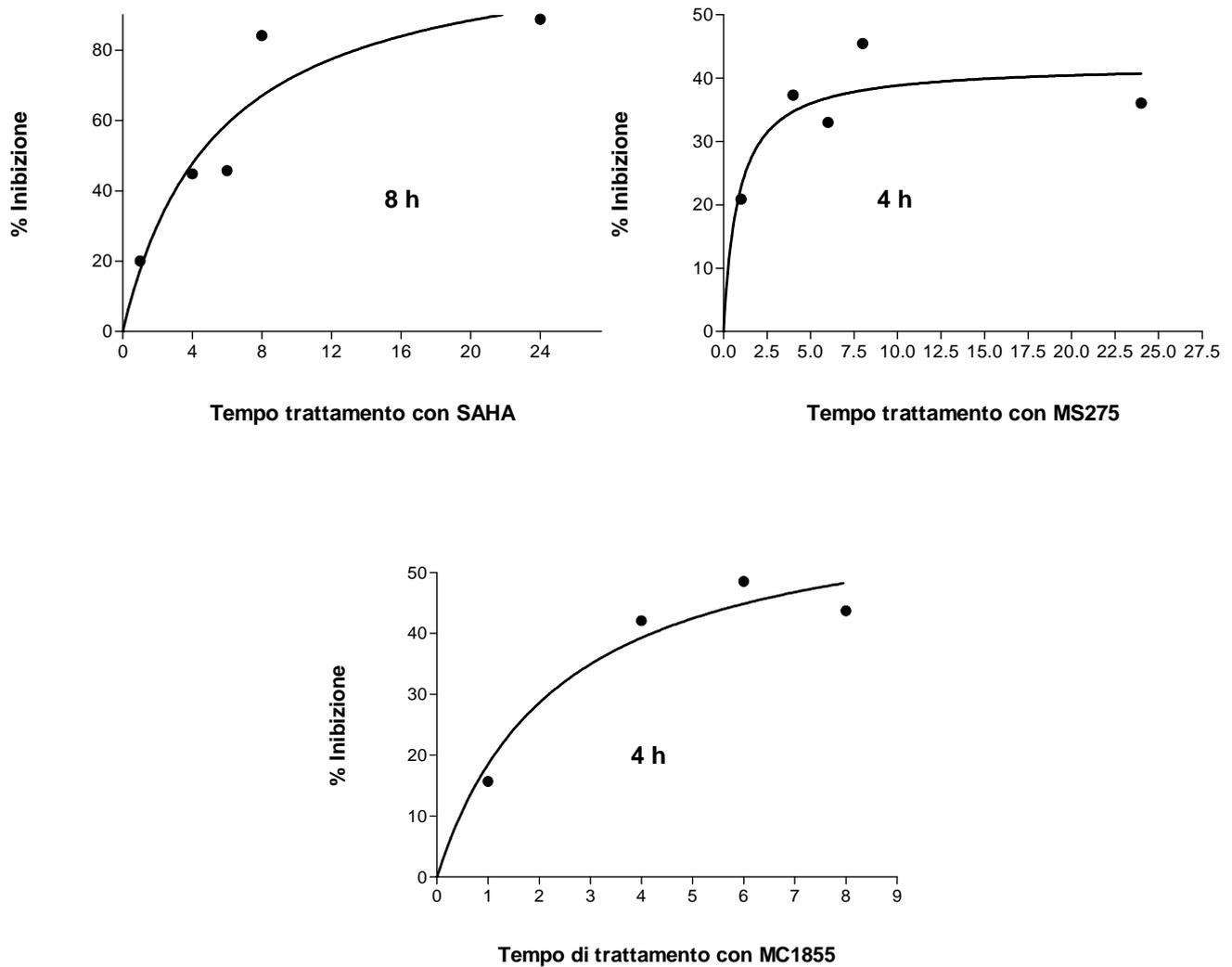


Figura 4.14. Variazione della percentuale di inibizione sull'istone H2A-2 in funzione del tempo di trattamento con i diversi inibitori delle HDAC. Sono anche riportate le ore di trattamento che servono per ottenere l'effetto massimo.

Istone H2B

Studi di dose dipendenza. Gli studi di dose dipendenza sono stati condotti anche sull'istone H2B; in questo caso però le informazioni che possono essere ricavate sono più approssimative per il fatto che non si riesce a definire un preciso profilo di acetilazione. Come si può infatti osservare sia dalle trasformate (fig. 4.15) che dalle tabelle (4.XXVIII-4.XXXI) questa proteina istonica è soggetta a numerosissime modifiche post-traduzionali che possono essere sia acetilazioni che metilazioni. Anche se non siamo in grado di attribuire le modifiche presenti sulle isoforme caratterizzate da diversi pesi molecolari, possiamo concludere dai risultati dopo trattamento con inibitori che probabilmente non sono tutte metilazioni ma che ci sono anche acetilazioni; infatti osservando sia gli spettri deconvoluti che le tabelle si può notare che all'aumentare della concentrazione degli inibitori consegue un incremento delle isoforme aventi i pesi molecolari più alti. Più precisamente dopo trattamento con SAHA, MS275 e MC1855 l'incremento delle abbondanze relative delle isoforme ad alto peso molecolare è ben evidente mentre dopo trattamento con MC1568 non si riscontrano differenze sostanziali.

Determinazione della IC_{50} . Anche la determinazione della IC_{50} risulta approssimativa: infatti mentre prima per le altre classi istoniche si sceglieva la forma meno acetilata e su di essa si monitorava la diminuzione percentuale in funzione della concentrazione di inibitore con cui venivano trattate le cellule, in questo caso si è scelta arbitrariamente l'isoforma con peso molecolare più basso (13.761 Da). In questo modo sono state trovate le IC_{50} riportate in figura 4.16.

L'inibitore caratterizzato dal valore di IC_{50} più basso in questo caso è MS275 (0.86 μ M) seguito da MC1855 (2.13 μ M) e infine dal SAHA (4.96 μ M). Il composto più potente in termini di inibizione massima raggiunta è invece risultato essere MC1855 (52.04%).

Studi di tempo dipendenza. Gli studi di tempo dipendenza, effettuati andando a monitorare come varia la percentuale di inibizione in funzione del tempo di trattamento delle cellule HT29 con i vari inibitori somministrati a concentrazione 50 μ M, hanno messo in luce ancora una volta come SAHA, MS275 e MC1855 siano in grado di provocare un drastico aumento dei livelli di acetilazione mentre MC1568 non provoca cambiamenti rilevanti nei valori delle abbondanze relative delle isoforme dell'istone H2B (tab. 4.XXXI-4.XXXV; fig. 4.17-4.18). Mentre il SAHA è in grado di provocare il massimo di inibizione dopo 8 ore, MC1855 necessita solo di 6 ore. Per quanto riguarda MS275 i valori ottenuti calcolando la percentuale di inibizione in funzione della diminuzione percentuale

dell'isoforma avente peso molecolare 13.761 Da non hanno permesso di ottenere un andamento regolare; osservando comunque le trasformate si può affermare che già a otto ore si sia ottenuto l'effetto massimo.

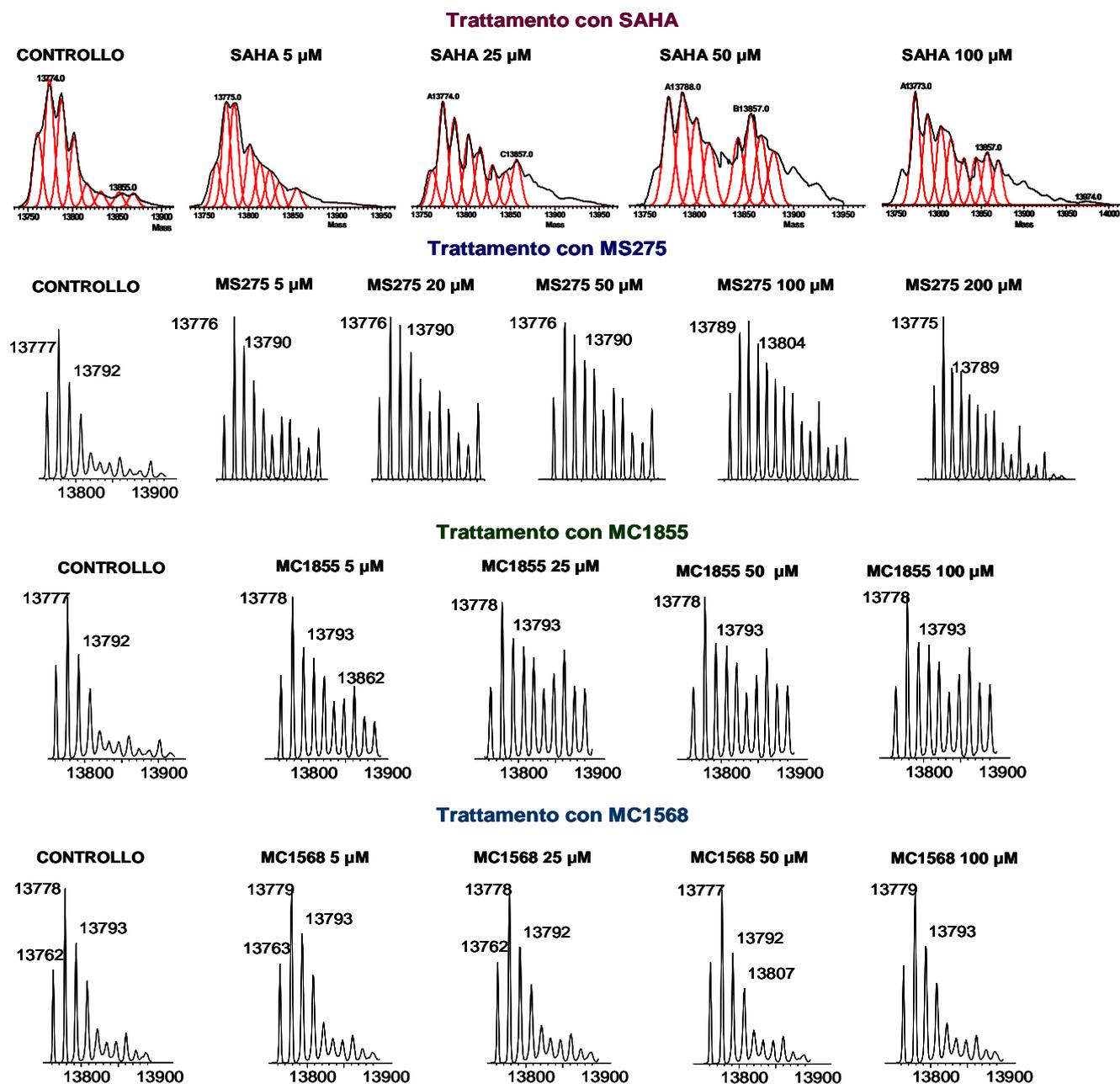


Figura 4.15. Spettri deconvolti relativi all'istone H2B estratto da cellule HT29 trattate con gli inibitori delle HDAC a concentrazioni crescenti.

Tabella 4.XXVIII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2B prima e dopo trattamento con **SAHA** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi alla trappola ionica ed elaborati con il software MagTran 1.0.

PM	PTM	Controllo	SAHA 5 μ M	SAHA 25 μ M	SAHA 50 μ M	SAHA 100 μ M
13761	H2B	11.51 \pm 0.58	9.45 \pm 1.05	7.78 \pm 0.47	7.69 \pm 0.60	8.54 \pm 0.35
13775	H2B + 1Me	26.64 \pm 0.49	22.70 \pm 1.60	21.65 \pm 0.03	19.58 \pm 1.30	23.55 \pm 0.57
13789	H2B +2Me	23.05 \pm 2.28	17.91 \pm 2.92	18.32 \pm 0.08	17.31 \pm 2.07	17.15 \pm 0.07
13803	H2B +3 Me o 1Ac	14.99 \pm 0.55	14.46 \pm 1.25	14.91 \pm 0.01	14.62 \pm 2.76	12.92 \pm 0.87
13817	H2B +4 Me o 1Ac+ 1Me	7.53 \pm 0.56	11.19 \pm 0.36	11.79 \pm 0.55	11.89 \pm 3.41	10.70 \pm 0.93
13831	H2B +5 Me o 1Ac+ 2Me	2.96 \pm 0.94	7.78 \pm 0.76	8.53 \pm 0.04	8.02 \pm 1.14	3.75 \pm 0.36
13845	H2B +6 Me o 1Ac+ 3Me o 2Ac	3.99 \pm 1.69	3.11 \pm 0.75	3.62 \pm 0.02	9.90 \pm 0.30	5.68 \pm 2.26
13859	H2B +7 Me o 1Ac+ 4Me o 2Ac+1Me	6.75 \pm 2.06	9.78 \pm 0.98	9.80 \pm 0.06	12.07 \pm 3.46	10.13 \pm 2.69
13873	H2B +8 Me o 1Ac+ 5Me o 2Ac+ 2Me	2.60 \pm 0.13	3.62 \pm 0.18	3.62 \pm 0.01	8.54 \pm 1.12	7.60 \pm 0.71
13887	H2B +9 Me o 1Ac+ 6Me o 2Ac+ 3Me o 3Ac	0.00 \pm 0.00	n.d.	n.d.	8.26 \pm 2.25	n.d.

Tabella 4.XXIX. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2B prima e dopo trattamento con **MS275** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	Controllo	MS-275 1 μ M	MS-275 5 μ M	MS-275 20 μ M	MS-275 50 μ M	MS-275 100 μ M	MS-275 200 μ M
13761	10.00 \pm 2.38	9.77 \pm 0.48	9.24 \pm 0.36	8.43 \pm 0.47	8.43 \pm 0.39	8.34 \pm 0.08	10.84 \pm 0.64
13775	21.18 \pm 0.12	20.42 \pm 2.24	20.65 \pm 3.10	17.80 \pm 0.55	16.85 \pm 0.17	15.27 \pm 1.43	18.56 \pm 1.53
13789	19.59 \pm 0.64	17.57 \pm 0.46	18.35 \pm 0.50	16.38 \pm 0.24	15.58 \pm 0.19	14.51 \pm 1.24	12.66 \pm 1.12
13803	13.77 \pm 0.58	14.36 \pm 0.57	13.49 \pm 0.49	13.37 \pm 0.36	12.65 \pm 0.05	13.34 \pm 0.23	12.59 \pm 0.56
13817	9.37 \pm 0.58	9.54 \pm 0.33	9.68 \pm 0.30	11.04 \pm 0.46	11.80 \pm 0.03	11.28 \pm 0.04	10.03 \pm 0.27
13831	5.73 \pm 0.50	5.74 \pm 0.45	6.09 \pm 0.22	7.44 \pm 0.27	7.39 \pm 0.04	9.11 \pm 0.94	9.18 \pm 0.30
13845	7.97 \pm 0.36	7.50 \pm 0.52	4.59 \pm 5.24	9.80 \pm 0.46	9.71 \pm 0.05	8.84 \pm 0.24	8.61 \pm 1.04
13859	6.22 \pm 0.22	6.90 \pm 0.18	8.16 \pm 0.31	7.39 \pm 0.22	8.52 \pm 0.20	9.12 \pm 1.04	8.85 \pm 0.88
13873	3.68 \pm 0.26	4.66 \pm 0.30	5.57 \pm 0.33	4.74 \pm 0.32	4.95 \pm 0.01	5.58 \pm 0.06	5.07 \pm 0.94
13887	2.50 \pm 0.13	3.54 \pm 0.43	4.19 \pm 0.35	3.62 \pm 0.13	4.12 \pm 0.33	4.62 \pm 0.11	3.60 \pm 0.95

Tabella 4.XXX. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2B prima e dopo trattamento con **MC1855** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1855 5 μ M	MC1855 25 μ M	MC1855 50 μ M	MC1855 100 μ M
13761	H2B	12.98 \pm 0.41	8.35 \pm 1.33	6.33 \pm 0.53	6.57 \pm 0.26	6.62 \pm 0.24
13775	H2B + 1Me	28.68 \pm 0.19	19.56 \pm 1.46	13.15 \pm 0.78	15.24 \pm 1.04	14.51 \pm 0.80
13789	H2B +2Me	20.60 \pm 0.11	13.86 \pm 2.12	11.41 \pm 0.04	11.98 \pm 0.50	11.22 \pm 0.49
13803	H2B +3 Me o 1Ac	14.56 \pm 0.04	12.22 \pm 0.41	11.23 \pm 0.20	11.29 \pm 0.45	11.72 \pm 0.34
13817	H2B +4 Me o 1Ac+ 1Me	5.53 \pm 0.28	10.31 \pm 1.82	11.14 \pm 0.04	10.51 \pm 0.17	10.90 \pm 0.29
13831	H2B +5 Me o 1Ac+ 2Me	3.78 \pm 0.01	6.68 \pm 0.33	8.04 \pm 0.29	6.69 \pm 0.63	7.56 \pm 0.19
13845	H2B +6 Me o 1Ac+ 3Me o 2Ac	4.19 \pm 0.09	7.90 \pm 0.68	9.95 \pm 0.02	8.79 \pm 1.06	9.29 \pm 0.18
13859	H2B +7 Me o 1Ac+ 4Me o 2Ac+1Me	6.20 \pm 0.00	10.93 \pm 0.23	13.57 \pm 0.03	13.79 \pm 0.61	13.25 \pm 0.33
13873	H2B +8 Me o 1Ac+ 5Me o 2Ac+ 2Me	1.83 \pm 0.01	5.80 \pm 1.09	7.75 \pm 0.58	6.45 \pm 0.60	7.64 \pm 0.05
13887	H2B +9 Me o 1Ac+ 6Me o 2Ac+ 3Me o 3Ac	1.64 \pm 0.09	4.39 \pm 0.15	7.41 \pm 0.19	8.69 \pm 0.81	7.29 \pm 0.43

Tabella 4.XXXI. Abbondanze relative delle varie isoforma istoniche relative all'istone H2B prima e dopo trattamento con **MC1568** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1568 5 μ M	MC1568 25 μ M	MC1568 50 μ M	MC1568 100 μ M
13761	H2B	12.98 \pm 0.41	13.19 \pm 0.35	15.21 \pm 1.34	14.80 \pm 0.02	13.38 \pm 0.11
13775	H2B + 1Me	28.68 \pm 0.19	27.72 \pm 0.86	27.53 \pm 0.08	28.30 \pm 0.17	27.92 \pm 0.09
13789	H2B +2Me	20.60 \pm 0.11	20.25 \pm 0.37	19.82 \pm 0.77	19.29 \pm 0.42	19.53 \pm 0.00
13803	H2B +3 Me o 1Ac	14.56 \pm 0.04	14.44 \pm 0.52	13.42 \pm 0.19	13.09 \pm 0.49	14.10 \pm 0.03
13817	H2B +4 Me o 1Ac+ 1Me	5.53 \pm 0.28	6.68 \pm 0.17	6.15 \pm 0.01	5.98 \pm 0.30	6.90 \pm 0.03
13831	H2B +5 Me o 1Ac+ 2Me	3.78 \pm 0.01	4.54 \pm 0.13	4.56 \pm 0.46	4.85 \pm 0.09	4.99 \pm 0.15
13845	H2B +6 Me o 1Ac+ 3Me o 2Ac	4.19 \pm 0.09	4.12 \pm 0.24	4.09 \pm 0.60	4.58 \pm 0.19	4.21 \pm 0.03
13859	H2B +7 Me o 1Ac+ 4Me o 2Ac+1Me	6.20 \pm 0.00	5.30 \pm 0.06	5.44 \pm 0.48	5.51 \pm 0.15	5.29 \pm 0.09
13873	H2B +8 Me o 1Ac+ 5Me o 2Ac+ 2Me	1.83 \pm 0.01	2.14 \pm 0.18	2.22 \pm 0.43	2.08 \pm 0.05	2.11 \pm 0.02
13887	H2B +9 Me o 1Ac+ 6Me o 2Ac+ 3Me o 3Ac	1.64 \pm 0.09	1.62 \pm 0.29	1.55 \pm 0.03	1.53 \pm 0.04	1.58 \pm 0.05

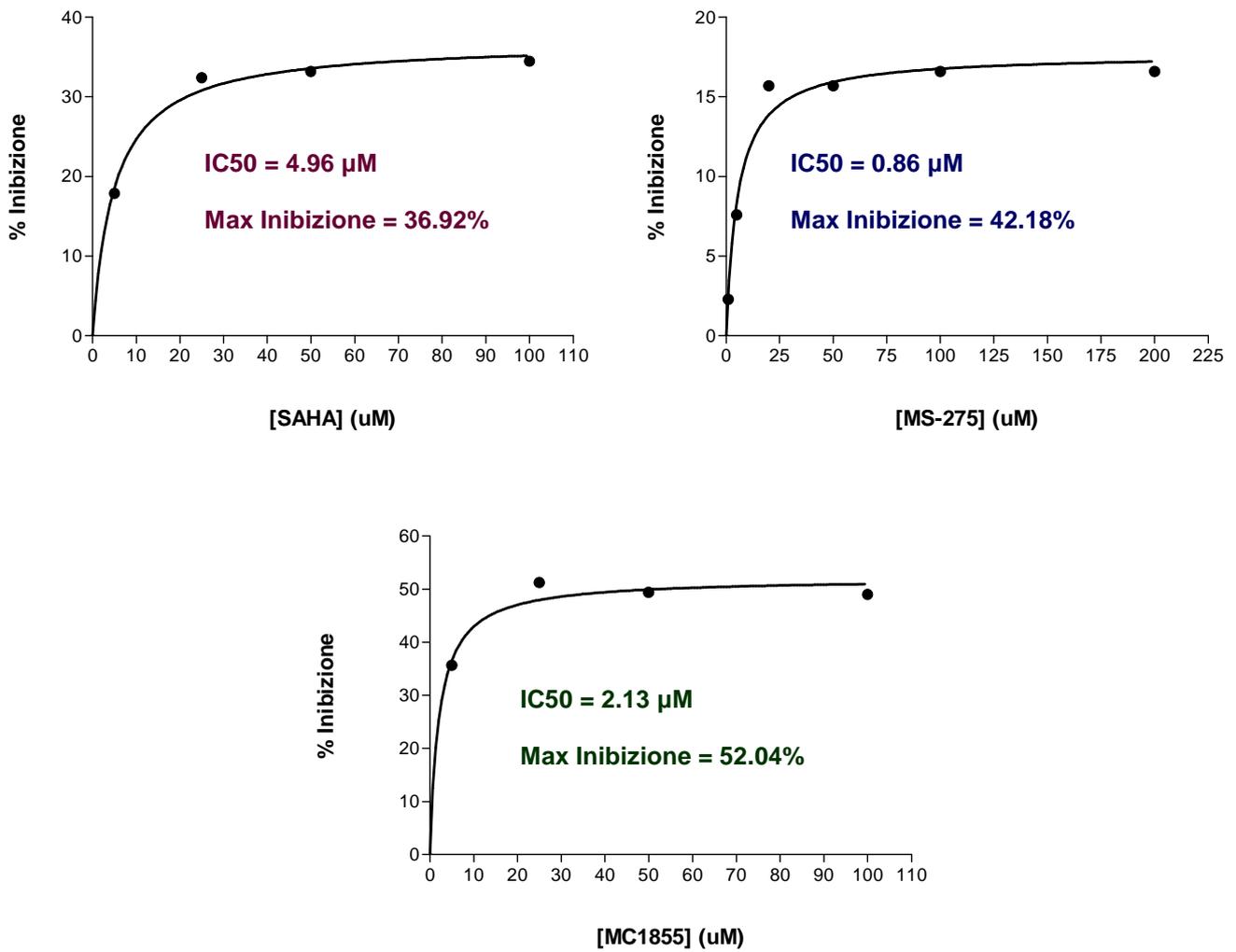


Figura 4.16. Variazioni della percentuale di inibizione sull'istone H2B in funzione della concentrazione di inibitore con cui sono trattate le cellule HT29.

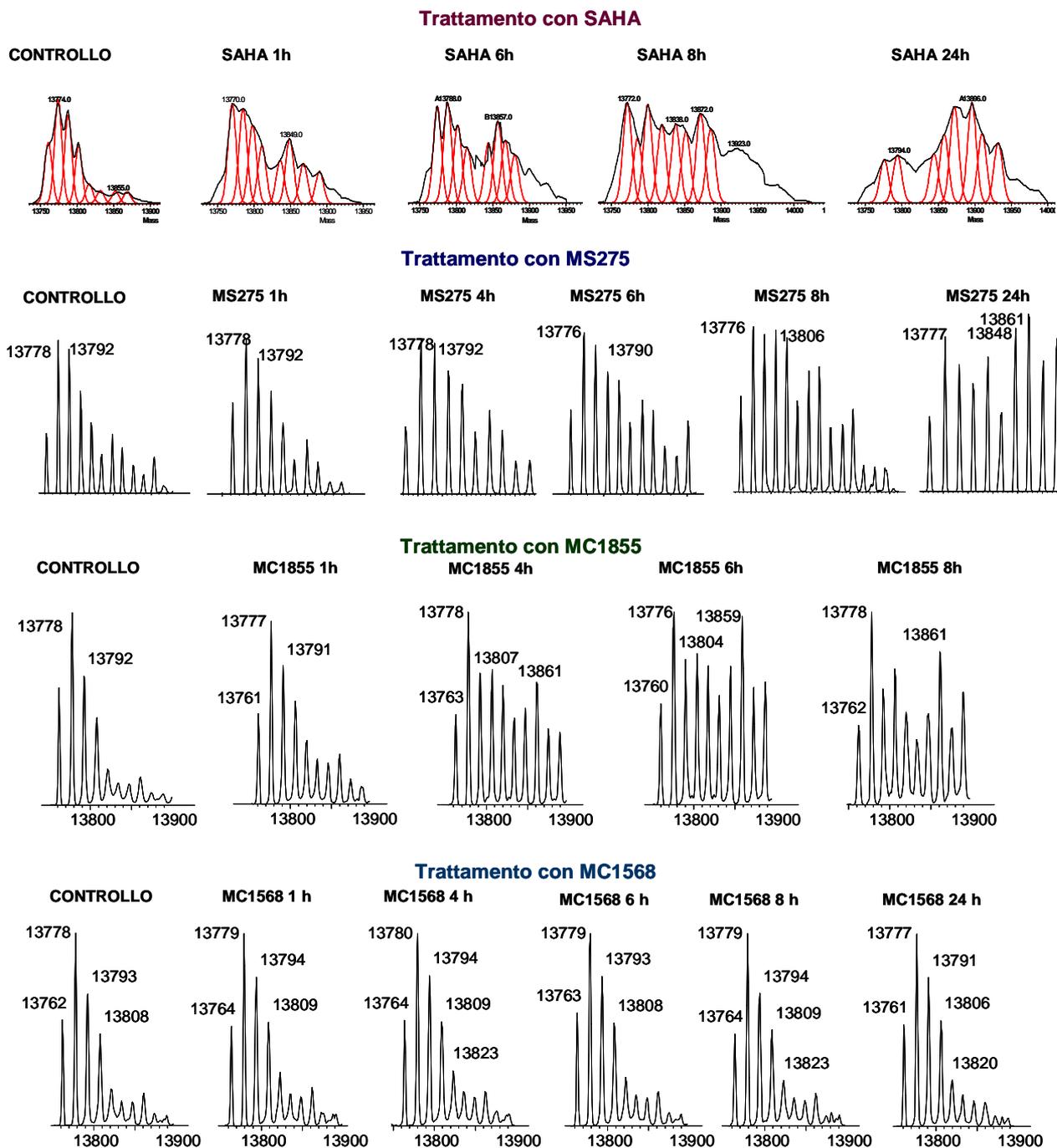


Figura 4.17. Spettri deconvolti relativi all'istone H2B estratto da cellule HT29 trattate con gli inibitori delle HDAC a concentrazione 50 μ M per diversi tempi.

Tabella 4.XXXII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2B prima e dopo trattamento con **SAHA** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi alla trappola ionica ed elaborati con il software Mag Tran 1.0.

PM	Controllo	SAHA 1h	SAHA 4h	SAHA 6h	SAHA 8h	SAHA 24h
13761	11.51 \pm 0.58	7.71 \pm 0.30	5.48 \pm 3.12	3.69 \pm 0.60	n.d.	1.80 \pm 0.05
13775	26.64 \pm 0.49	24.88 \pm 0.17	19.94 \pm 0.65	19.58 \pm 1.30	9.18 \pm 1.03	1.80 \pm 0.05
13789	23.05 \pm 2.28	16.13 \pm 0.13	17.32 \pm 1.66	17.31 \pm 2.07	6.16 \pm 0.63	5.04 \pm 0.18
13803	14.99 \pm 0.55	15.87 \pm 0.15	13.93 \pm 2.04	14.62 \pm 2.76	7.93 \pm 3.44	n.d.
13817	7.53 \pm 0.56	11.16 \pm 0.93	11.34 \pm 0.04	11.89 \pm 3.41	8.42 \pm 1.22	8.19 \pm 0.24
13831	2.96 \pm 0.94	7.44 \pm 0.12	8.10 \pm 0.57	8.02 \pm 1.14	10.73 \pm 1.03	11.69 \pm 1.46
13845	3.99 \pm 1.69	5.55 \pm 0.78	11.21 \pm 0.04	9.90 \pm 0.30	18.44 \pm 0.18	11.42 \pm 2.92
13859	6.75 \pm 2.06	7.60 \pm 0.44	7.63 \pm 0.37	12.07 \pm 3.46	18.37 \pm 1.94	18.05 \pm 0.06
13873	2.60 \pm 0.13	n.d.	n.d.	12.54 \pm 1.12	11.94 \pm 0.48	17.01 \pm 4.30
13887	0.00 \pm 0.00	3.68 \pm 0.95	5.00 \pm 2.83	8.26 \pm 2.25	8.85 \pm 0.16	25.00 \pm 0.30

Tabella 4.XXXIII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2B prima e dopo trattamento con **MS275** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	Controllo	MS275 1h	MS275 4h	MS275 6h	MS275 8h	MS275 24h
13761	10.00 \pm 2.38	9.62 \pm 2.00	7.70 \pm 0.43	8.85 \pm 0.77	7.51 \pm 0.61	4.53 \pm 1.71
13775	21.18 \pm 0.12	20.22 \pm 2.73	17.08 \pm 0.13	17.14 \pm 0.51	14.67 \pm 1.28	10.44 \pm 2.07
13789	19.59 \pm 0.64	18.89 \pm 3.56	16.60 \pm 0.41	16.08 \pm 0.87	13.18 \pm 0.12	7.65 \pm 2.93
13803	13.77 \pm 0.58	13.24 \pm 2.03	14.87 \pm 1.15	13.23 \pm 1.01	12.59 \pm 1.23	8.91 \pm 0.90
13817	9.37 \pm 0.58	10.65 \pm 0.71	12.62 \pm 0.08	11.99 \pm 0.33	12.66 \pm 0.13	11.95 \pm 2.31
13831	5.73 \pm 0.50	6.39 \pm 2.15	7.30 \pm 0.58	6.83 \pm 0.97	7.78 \pm 0.28	7.93 \pm 2.67
13845	7.97 \pm 0.36	8.37 \pm 0.94	9.74 \pm 0.49	9.09 \pm 1.08	9.87 \pm 0.26	13.17 \pm 0.87
13859	6.22 \pm 0.22	6.29 \pm 2.46	6.40 \pm 1.43	8.24 \pm 0.50	10.48 \pm 0.09	14.03 \pm 0.54
13873	3.68 \pm 0.26	3.35 \pm 2.29	3.79 \pm 0.08	4.52 \pm 0.75	5.58 \pm 0.35	10.05 \pm 0.01
13887	2.50 \pm 0.13	2.97 \pm 1.77	3.90 \pm 0.07	4.04 \pm 0.27	5.69 \pm 0.11	11.34 \pm 0.58

Tabella 4.XXXIV. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2B prima e dopo trattamento con **MC1855** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6 e 8h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	Controllo	MC1855 1h	MC1855 4h	MC1855 6h	MC1855 8h
13761	16.55 \pm 1.81	12.11 \pm 0.26	8.22 \pm 0.27	6.84 \pm 0.48	7.12 \pm 0.50
13775	29.89 \pm 0.84	24.31 \pm 0.18	16.56 \pm 0.85	14.48 \pm 1.06	17.29 \pm 0.65
13789	19.98 \pm 0.47	18.13 \pm 0.34	12.01 \pm 0.42	10.01 \pm 0.51	10.39 \pm 0.11
13803	13.50 \pm 0.27	13.66 \pm 0.02	11.61 \pm 0.61	10.47 \pm 0.22	12.16 \pm 0.00
13817	5.36 \pm 0.16	8.19 \pm 0.24	10.41 \pm 0.30	10.19 \pm 0.43	8.33 \pm 0.83
13831	3.51 \pm 0.18	6.01 \pm 0.12	7.74 \pm 0.06	7.60 \pm 0.29	5.86 \pm 0.88
13845	3.33 \pm 0.15	5.53 \pm 0.15	8.89 \pm 0.41	10.13 \pm 0.38	8.18 \pm 0.22
13859	4.51 \pm 0.31	6.57 \pm 0.03	11.13 \pm 0.30	13.07 \pm 0.51	13.72 \pm 0.98
13873	1.86 \pm 0.05	3.20 \pm 0.16	6.88 \pm 0.17	8.29 \pm 0.07	6.89 \pm 0.54
13887	1.52 \pm 0.20	2.30 \pm 0.02	6.54 \pm 0.12	8.93 \pm 0.22	10.09 \pm 1.09

Tabella 4.XXXV. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H2B prima e dopo trattamento con **MC1568** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6 e 8h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	Controllo	MC1568 1h	MC1568 4h	MC1568 6h	MC1568 8h	MC1568 24h
13761	15.97 \pm 0.20	14.29 \pm 0.64	14.05 \pm 0.85	15.64 \pm 0.99	14.64 \pm 1.27	15.48 \pm 1.17
13775	29.14 \pm 0.02	26.79 \pm 0.17	26.88 \pm 0.28	26.60 \pm 0.32	27.37 \pm 2.16	27.23 \pm 0.69
13789	19.92 \pm 0.67	20.47 \pm 0.14	20.80 \pm 0.00	20.65 \pm 0.28	20.19 \pm 0.45	20.97 \pm 0.64
13803	13.86 \pm 2.00	14.11 \pm 0.27	14.33 \pm 0.14	14.21 \pm 0.29	14.63 \pm 0.33	14.72 \pm 0.66
13817	5.51 \pm 0.21	7.28 \pm 0.20	7.76 \pm 0.23	6.67 \pm 0.57	6.68 \pm 0.20	6.39 \pm 0.33
13831	3.71 \pm 0.30	4.33 \pm 0.09	4.65 \pm 0.12	4.28 \pm 0.23	4.37 \pm 0.28	4.50 \pm 0.02
13845	3.57 \pm 0.66	3.95 \pm 0.09	3.18 \pm 0.67	3.90 \pm 0.67	3.96 \pm 0.25	3.69 \pm 0.07
13859	4.89 \pm 0.34	5.26 \pm 0.07	4.75 \pm 0.02	4.70 \pm 0.00	4.87 \pm 0.06	4.02 \pm 0.88
13873	1.86 \pm 0.43	1.87 \pm 0.06	2.00 \pm 0.05	1.78 \pm 0.18	1.60 \pm 0.13	1.69 \pm 0.27
13887	1.56 \pm 0.91	1.65 \pm 0.00	1.62 \pm 0.05	1.57 \pm 0.63	1.70 \pm 0.42	1.31 \pm 0.04

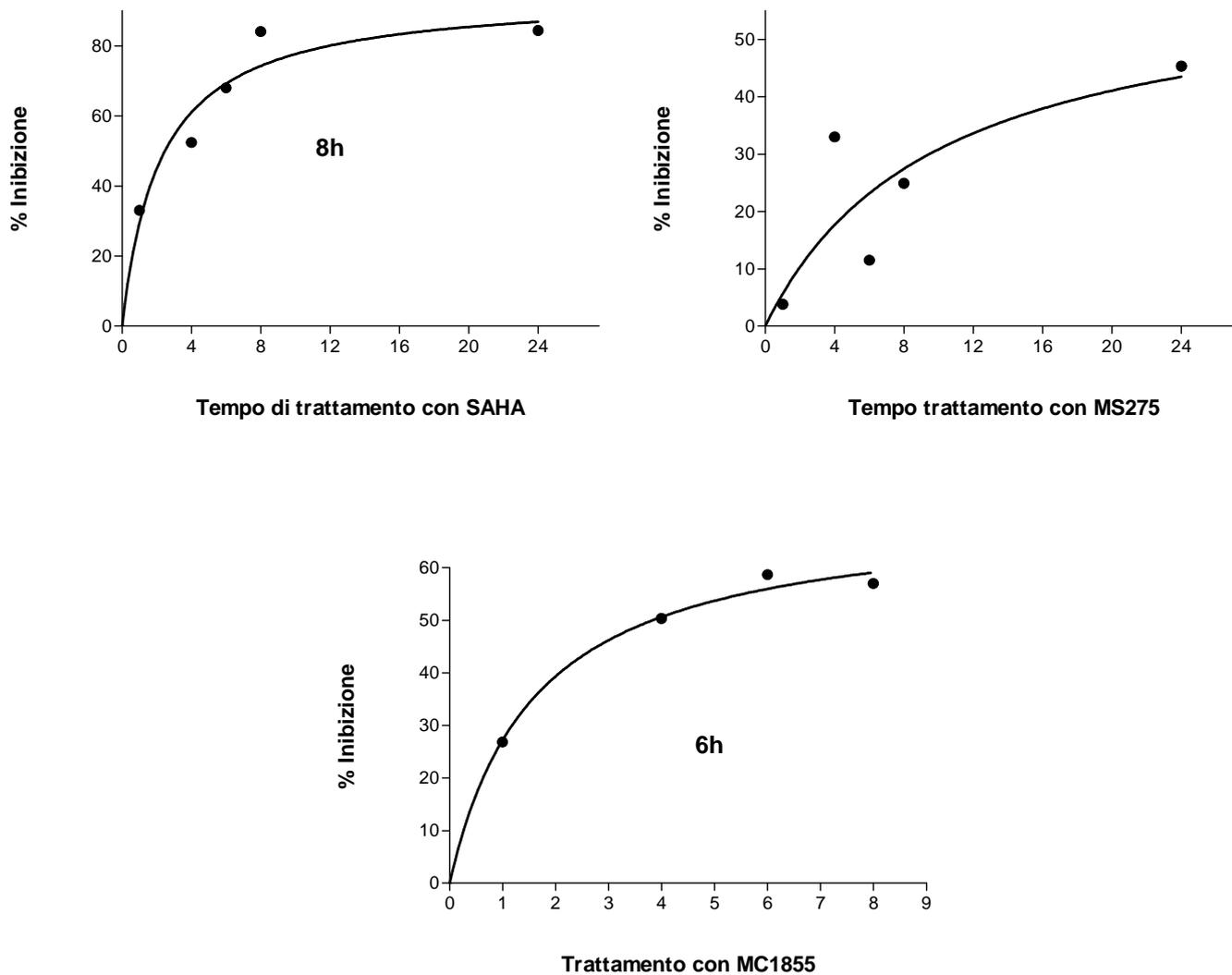


Figura 4.18. Variazione della percentuale di inibizione sull'istone H2B in funzione del tempo di trattamento con i diversi inibitori delle HDAC. Sono anche riportate le ore di trattamento che servono per ottenere l'effetto massimo.

Istone H3-1

Studi di dose dipendenza. Studi di dose dipendenza sono stati condotti anche su questa classe istonica anche se la complessità di questa proteina rende i risultati più approssimativi rispetto alle altre classi. In figura 19 si può osservare come effettivamente negli spettri deconvoluti relativi al trattamento con SAHA, MS275 e MC1855 aumentino i segnali corrispondenti alla forme maggiormente acetilate; come per le altre classi istoniche, le trasformate relative all'istone H3-1 estratto da cellule HT29 trattate con MC1568 mostrano che questo inibitore non provoca un effettivo aumento del livello di acetilazione. Nella tabelle 4.XXXVI-4.XXXIX sono riportate le percentuali relative alle isoforme dell'istone H3-1 prima e dopo il trattamento con i diversi inibitori.

Determinazione della IC_{50} . Determinare i valori di IC_{50} relativi ai diversi inibitori è stato in questo caso più difficoltoso appunto perché questo istone è caratterizzato da numerose isoforme. In questo caso per valutare la percentuale di inibizione si è monitorato l'aumento percentuale dell'isoforma avente peso molecolare 1.412 Da; questa isoforma è una di quelle con peso molecolare più alto e quindi ci aspettiamo che corrisponda ad un'isoforma acetilata: il trattamento con inibitori dovrebbe quindi comportare un aumento della sua abbondanza percentuale. I grafici in figura 20 riportano quindi la percentuale di inibizione, intesa come aumento percentuale dell'isoforma avente peso molecolare 1.412 Da, in funzione della concentrazione di inibitore. Nel caso delle analisi effettuate sull'istone estratto da cellule trattate con SAHA e analizzato alla trappola ionica, non è stato possibile determinare l'abbondanza relativa dell'isoforma avente massa molecolare 1.412 Da data la minore sensibilità dell'analizzatore e al fatto che solo 8 isoforme possono essere quantificate (tab. 4.XXXVI). Per calcolare il valore di IC_{50} si è arbitrariamente scelto di attribuirgli un'abbondanza relativa pari allo 0%, mentre non è stata calcolata l'inibizione massima che riesce a indurre perché il risultato sarebbe troppo poco affidabile.

I risultati delle analisi hanno dimostrato che l'inibitore caratterizzato dal valore di IC_{50} più basso risulta essere MC1855 (0.49 μ M). Purtroppo dato che per il SAHA non si riesce a quantificare la percentuale massima di inibizione non possiamo stabilire quale sia l'inibitore in grado di provocare il massimo di tale inibizione.

Studi di tempo-dipendenza. Dagli studi di tempo dipendenza (fig. 4.21; tab. 4.XL-4.XLIII) risulta che per tutti gli inibitori, ovviamente escluso MC1568 che non provoca un aumento dei livelli di acetilazione, le 24 ore di trattamento non state sufficienti per ottenere la risposta massima.

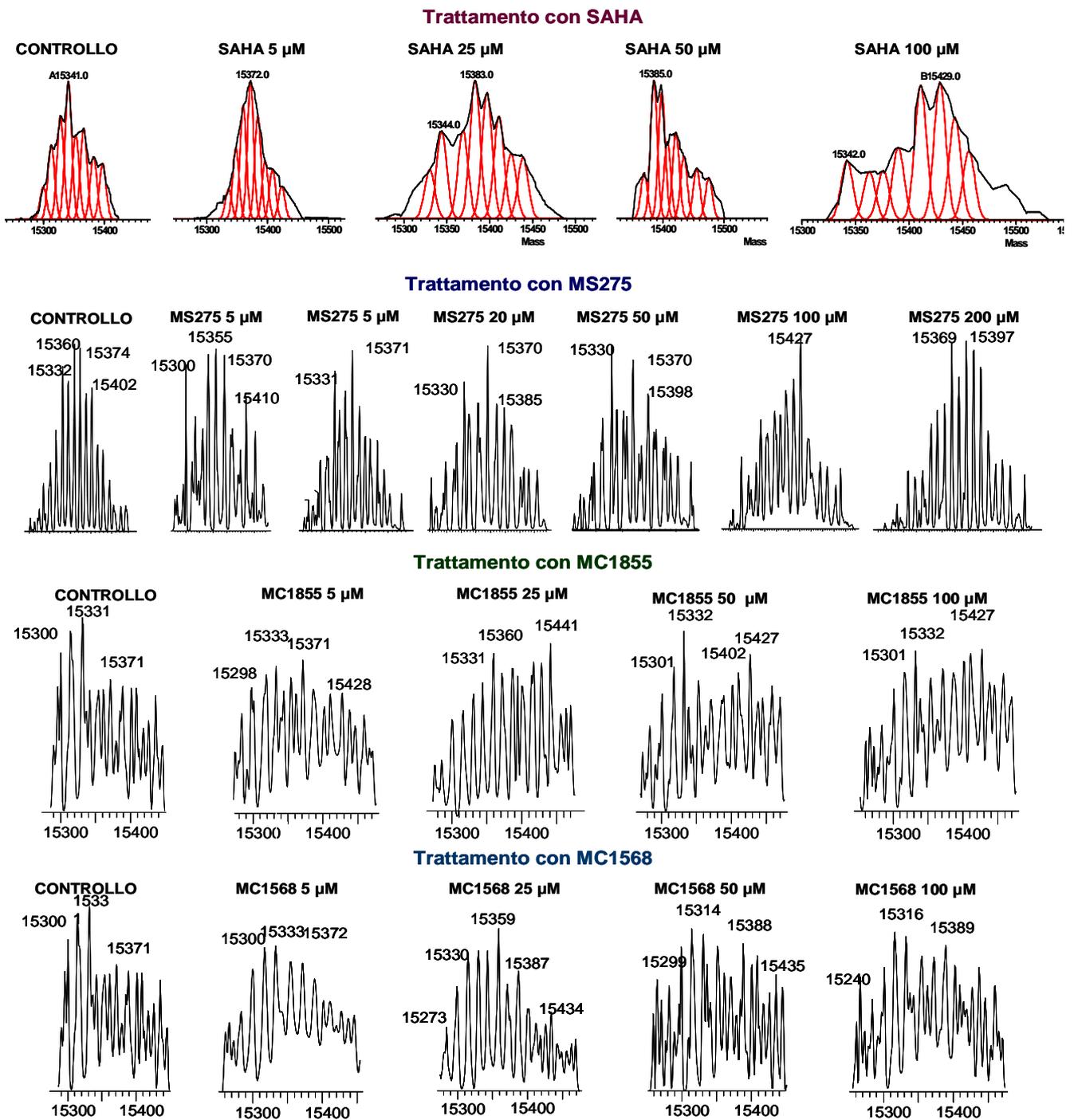


Figura 4.19. Spettri deconvolti relativi all'istone H3-1 estratto da cellule HT29 trattate con gli inibitori delle HDAC a concentrazioni crescenti.

Tabella 4.XXXVI. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H3-1 prima e dopo trattamento con **SAHA** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi alla trappola ionica ed elaborati con il software MagTran 1.0.

PM	PTM	Controllo	SAHA 5 μ M	SAHA 25 μ M	SAHA 50 μ M	SAHA 100 μ M
15284	H3-1	7.89 \pm 1.00	n.d.	n.d.	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
15299	H3-1 +1Me	11.42 \pm 0.51	n.d.	n.d.	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
15313	H3-1 +2Me	17.57 \pm 0.45	4.43 \pm 1.53	3.92 \pm 0.94	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
15328	H3-1 +3 Me o 1Ac	17.92 \pm 0.55	13.38 \pm 2.19	12.19 \pm 0.06	10.72 \pm 1.74	9.53 \pm 2.00
15341	H3-1 +4 Me o 1Ac+1Me	14.66 \pm 1.80	14.17 \pm 0.93	15.35 \pm 1.61	10.07 \pm 1.74	8.23 \pm 1.40
15355	H3-1 +5 Me o 1Ac+2Me	12.58 \pm 0.69	11.00 \pm 2.44	8.02 \pm 2.63	8.00 \pm 2.50	8.67 \pm 2.33
15369	H3-1 +6 Me o 1Ac+3Me o 2Ac	9.30 \pm 1.14	18.00 \pm 1.38	12.22 \pm 1.24	13.64 \pm 0.46	14.37 \pm 2.21
15384	H3-1 +7 Me o 1Ac+4Me o 2Ac+1Me	8.68 \pm 0.17	19.69 \pm 1.27	16.00 \pm 2.91	16.41 \pm 2.04	13.25 \pm 1.31
15398	H3-1 +8 Me o 1Ac+5Me o 2Ac+2Me	n.d.	11.32 \pm 0.59	14.78 \pm 2.41	16.91 \pm 1.86	15.25 \pm 2.65
15412	H3-1 +9 Me o 1Ac+6Me o 2Ac+3Me o 3Ac	n.d.	8.01 \pm 2.03	17.52 \pm 4.06	13.40 \pm 2.28	19.53 \pm 2.97
15426	H3-1 +10 Me o 1Ac+7Me o 2Ac+4Me o 3Ac+1Me	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	10.85 \pm 3.16	11.17 \pm 2.11
15440	H3-1 +11 Me o 1Ac+8Me o 2Ac+5Me o 3Ac+2Me	0.00 \pm 0.00	n.d.	n.d.	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

Tabella 4.XXXVII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H3-1 prima e dopo trattamento con **MS275** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	Controllo	MS-275 1 μ M	MS-275 5 μ M	MS-275 20 μ M	MS-275 50 μ M	MS-275 100 μ M	MS-275 200 μ M
15284	3.92 \pm 0.70	2.71 \pm 0.11	1.95 \pm 0.08	2.26 \pm 0.51	2.72 \pm 0.35	1.94 \pm 0.49	4.44 \pm 0.02
15299	5.58 \pm 1.00	4.47 \pm 1.46	7.11 \pm 1.94	6.12 \pm 0.76	6.00 \pm 1.20	6.22 \pm 0.43	5.92 \pm 2.08
15313	7.86 \pm 0.92	12.03 \pm 0.24	7.88 \pm 2.60	7.81 \pm 0.93	6.97 \pm 2.34	4.55 \pm 0.25	4.93 \pm 0.95
15328	10.72 \pm 1.43	11.17 \pm 3.89	12.46 \pm 0.74	13.44 \pm 1.88	12.71 \pm 2.25	5.13 \pm 0.42	5.63 \pm 0.92
15341	10.84 \pm 0.20	13.55 \pm 0.77	11.63 \pm 2.57	10.19 \pm 0.96	9.60 \pm 0.43	11.07 \pm 2.99	8.04 \pm 0.74
15355	13.05 \pm 0.39	11.20 \pm 3.09	10.56 \pm 1.10	9.43 \pm 1.34	8.54 \pm 0.90	8.34 \pm 0.71	9.28 \pm 1.23
15370	12.80 \pm 0.33	11.61 \pm 1.84	11.37 \pm 4.63	15.12 \pm 0.08	13.54 \pm 0.59	11.64 \pm 2.83	11.80 \pm 2.03
15384	9.51 \pm 0.43	6.97 \pm 0.78	9.09 \pm 1.39	8.38 \pm 2.76	7.74 \pm 1.76	8.43 \pm 1.32	8.86 \pm 2.00
15398	10.08 \pm 0.22	6.62 \pm 0.93	7.96 \pm 0.47	10.14 \pm 0.18	11.38 \pm 1.25	10.46 \pm 1.24	11.20 \pm 1.34
15412	5.78 \pm 0.56	9.18 \pm 0.87	6.98 \pm 0.67	7.85 \pm 1.07	7.97 \pm 0.28	11.84 \pm 0.62	11.04 \pm 1.45
15426	6.03 \pm 0.31	7.06 \pm 0.37	6.97 \pm 0.48	4.28 \pm 0.06	6.95 \pm 0.30	13.82 \pm 2.85	11.97 \pm 2.19
15440	3.82 \pm 0.24	3.43 \pm 0.02	6.05 \pm 1.52	4.97 \pm 0.06	5.86 \pm 0.06	6.55 \pm 1.26	6.89 \pm 0.54

Tabella 4.XXXVIII. Abbonanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H3-1 prima e dopo trattamento con **MC1855** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1855 5 μ M	MC1855 25 μ M	MC1855 50 μ M	MC1855 100 μ M
15284	H3-1	7.78 \pm 0.14	5.21 \pm 1.12	3.58 \pm 0.54	3.00 \pm 0.18	2.41 \pm 1.20
15299	H3-1 +1Me	10.20 \pm 1.73	7.22 \pm 0.46	4.69 \pm 1.58	5.46 \pm 0.73	6.45 \pm 0.23
15313	H3-1 +2Me	15.27 \pm 1.81	10.90 \pm 2.72	4.84 \pm 3.76	11.21 \pm 1.51	10.95 \pm 3.32
15328	H3-1 +3 Me o 1Ac	14.31 \pm 1.81	10.78 \pm 0.39	9.91 \pm 0.43	10.88 \pm 1.31	11.09 \pm 2.26
15341	H3-1 +4 Me o 1Ac+1Me	8.40 \pm 1.72	7.00 \pm 1.07	6.10 \pm 0.37	4.33 \pm 0.56	6.39 \pm 0.15
15355	H3-1 +5 Me o 1Ac+2Me	10.79 \pm 1.51	9.98 \pm 2.05	7.96 \pm 4.61	11.58 \pm 0.36	9.66 \pm 1.88
15369	H3-1 +6 Me o 1Ac+3Me o 2Ac	8.65 \pm 0.31	7.54 \pm 2.03	8.25 \pm 0.47	8.02 \pm 0.16	9.32 \pm 0.57
15384	H3-1 +7 Me o 1Ac+4Me o 2Ac+1Me	4.22 \pm 1.21	6.94 \pm 2.61	11.05 \pm 0.57	5.71 \pm 0.04	7.48 \pm 1.34
15398	H3-1 +8 Me o 1Ac+5Me o 2Ac+2Me	5.38 \pm 1.09	8.54 \pm 1.85	10.25 \pm 1.35	10.47 \pm 0.54	8.71 \pm 1.01
15412	H3-1 +9 Me o 1Ac+6Me o 2Ac+3Me o 3Ac	3.19 \pm 0.85	10.23 \pm 1.09	11.26 \pm 0.17	8.39 \pm 0.03	10.63 \pm 1.58
15426	H3-1 +10 Me o 1Ac+7Me o 2Ac+4Me o 3Ac+1Me	6.50 \pm 1.57	8.08 \pm 1.39	11.40 \pm 0.15	11.62 \pm 0.17	9.72 \pm 0.81
15440	H3-1 +11 Me o 1Ac+8Me o 2Ac+5Me o 3Ac+2Me	5.32 \pm 3.70	7.58 \pm 0.04	10.71 \pm 1.18	9.32 \pm 0.41	7.19 \pm 2.48

Tabella 4.XXXIX. Abbonanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H3-1 prima e dopo trattamento con **MC1568** a diverse concentrazioni. I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	PTM	Controllo	MC1568 5 μ M	MC1568 25 μ M	MC1568 50 μ M	MC1568 100 μ M
15284	H3-1	7.78 \pm 0.14	4.31 \pm 0.48	3.49 \pm 1.40	4.47 \pm 0.63	4.20 \pm 0.17
15299	H3-1 +1Me	10.20 \pm 1.73	7.39 \pm 0.13	6.36 \pm 3.21	8.40 \pm 1.04	7.23 \pm 1.03
15313	H3-1 +2Me	15.27 \pm 1.81	12.18 \pm 0.26	10.11 \pm 2.37	11.56 \pm 1.00	11.31 \pm 0.57
15328	H3-1 +3 Me o 1Ac	14.31 \pm 1.81	13.27 \pm 0.33	10.59 \pm 0.24	10.69 \pm 0.51	11.08 \pm 0.03
15341	H3-1 +4 Me o 1Ac+1Me	8.40 \pm 1.72	8.17 \pm 1.05	12.50 \pm 0.86	8.14 \pm 0.86	8.32 \pm 0.58
15355	H3-1 +5 Me o 1Ac+2Me	10.79 \pm 1.51	9.55 \pm 2.04	12.17 \pm 0.58	12.30 \pm 0.16	9.35 \pm 0.75
15369	H3-1 +6 Me o 1Ac+3Me o 2Ac	8.65 \pm 0.31	8.18 \pm 1.06	10.87 \pm 2.79	8.41 \pm 0.69	10,14 \pm 0.18
15384	H3-1 +7 Me o 1Ac+4Me o 2Ac+1Me	4.22 \pm 1.21	9.46 \pm 0.50	10.78 \pm 0.47	10.62 \pm 0.02	9,99 \pm 0.57
15398	H3-1 +8 Me o 1Ac+5Me o 2Ac+2Me	5.38 \pm 1.09	6.93 \pm 0.70	8.20 \pm 2.95	7.32 \pm 0.05	8,19 \pm 1.48
15412	H3-1 +9 Me o 1Ac+6Me o 2Ac+3Me o 3Ac	3.19 \pm 0.85	8.67 \pm 0.89	6.08 \pm 1.31	6.01 \pm 1.26	7,20 \pm 3.58
15426	H3-1 +10 Me o 1Ac+7Me o 2Ac+4Me o 3Ac+1Me	6.50 \pm 1.57	6.63 \pm 0.02	4.89 \pm 0.05	6.19 \pm 0.13	6,65 \pm 0.69
15440	H3-1 +11 Me o 1Ac+8Me o 2Ac+5Me o 3Ac+2Me	5.32 \pm 3.70	5.27 \pm 0.20	3.95 \pm 0.00	5.89 \pm 0.31	6,34 \pm 1.09

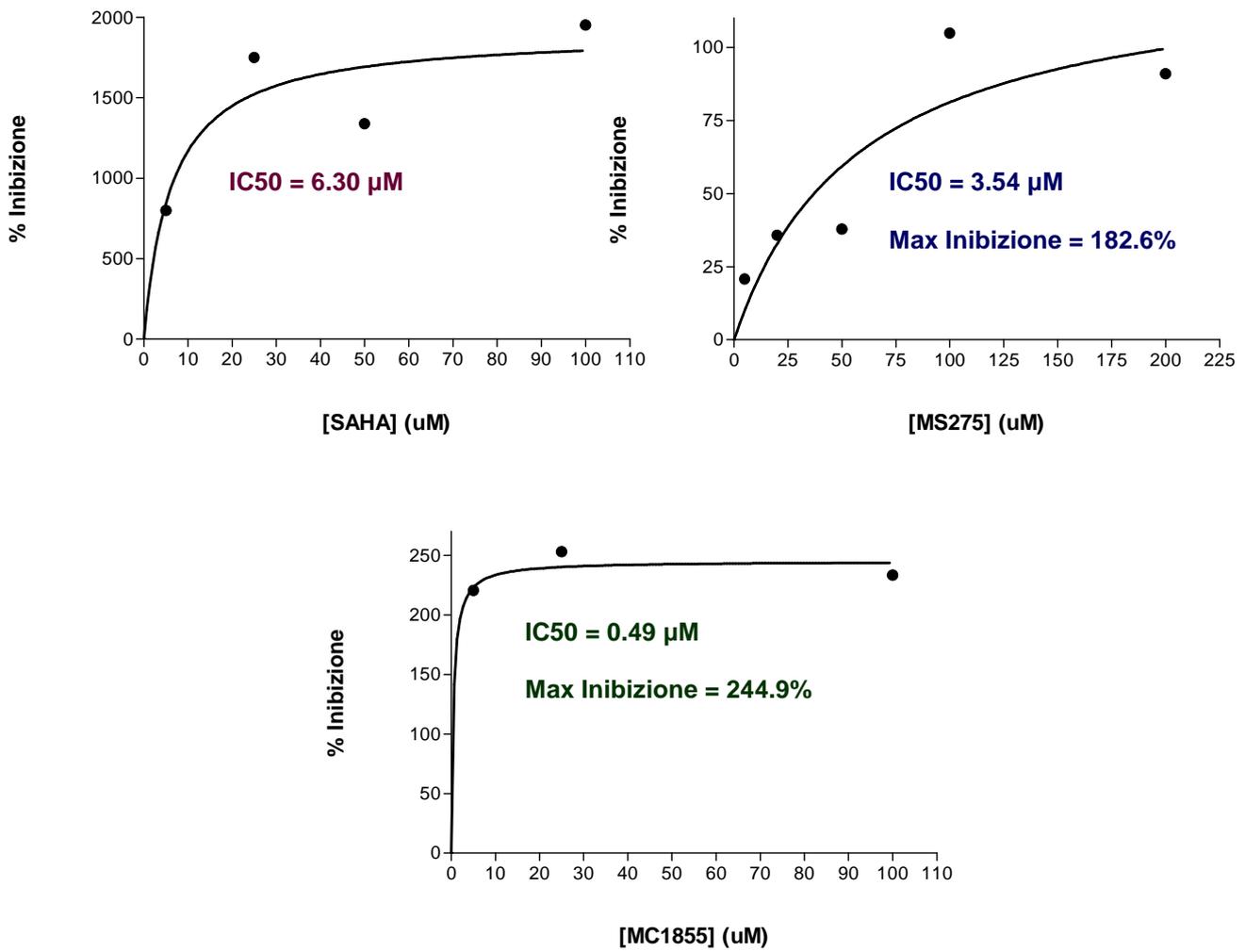


Figura 4.20. Variazione della percentuale di inibizione sull'istone H3-1 in funzione della concentrazione di inibitore con cui sono trattate le cellule HT29.

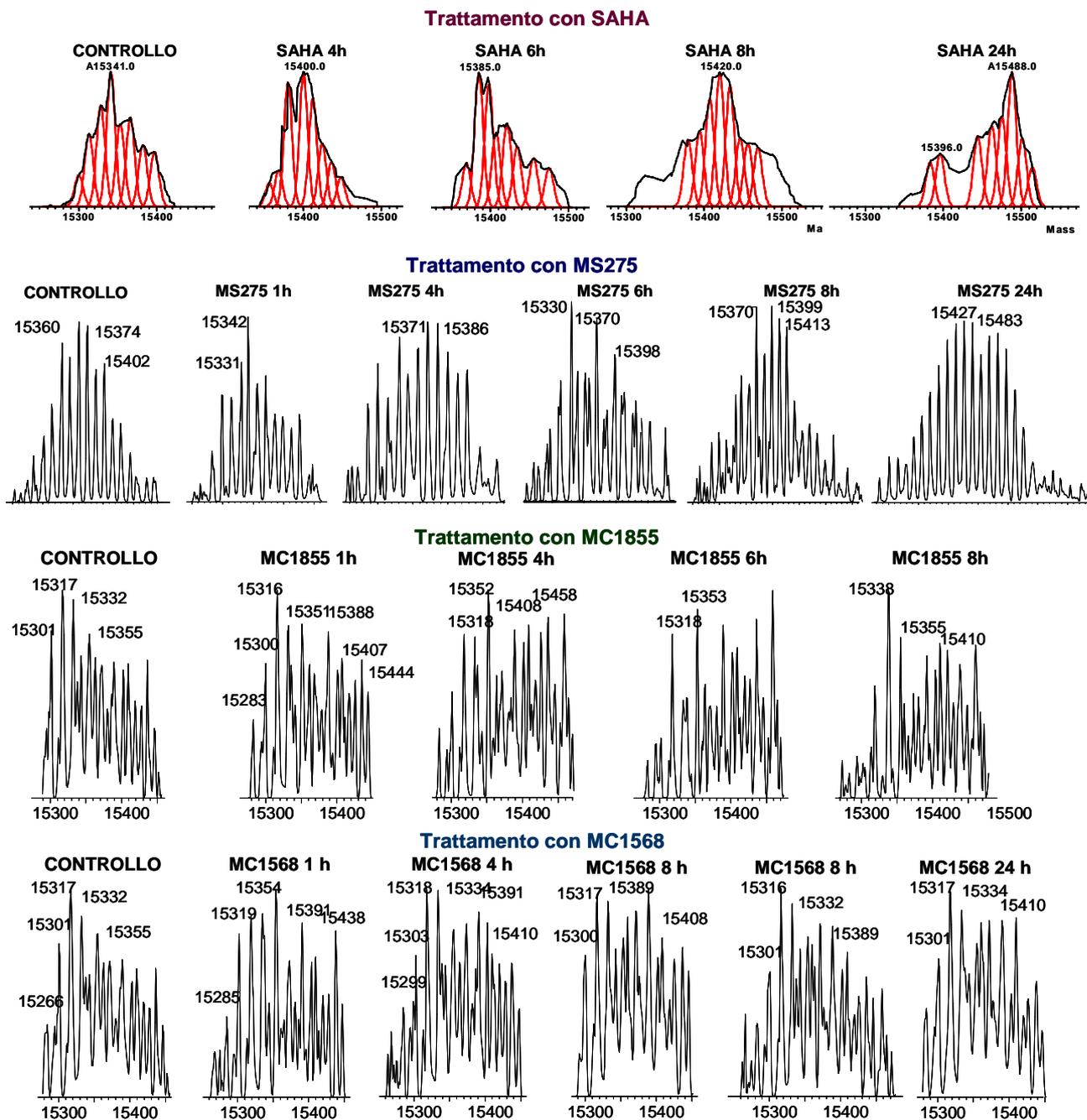


Figura 4.21. Spettri deconvoluti relativi all'istone H3-1 estratto da cellule HT29 trattate con gli inibitori delle HDAC a concentrazione 50 μ M per diversi tempi.

Tabella 4.XL. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H3-1 prima e dopo trattamento con **SAHA** a concentrazione 50 μM per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi alla trappola ionica ed elaborati con il software Mag Tran 1.0

PM	Controllo	SAHA 1h	SAHA 4h	SAHA 6h	SAHA 8h	SAHA 24h
15284	5.73 \pm 1.00	n.d.	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	n.d.	0.00 \pm 0.00
15299	11.95 \pm 0.51	11.20 \pm 1.11	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	n.d.	0.00 \pm 0.00
15313	15.80 \pm 0.45	17.65 \pm 0.78	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	n.d.	0.00 \pm 0.00
15328	21.05 \pm 0.55	10.35 \pm 1.02	4.15 \pm 0.76	7.44 \pm 0.46	9.60 \pm 0.23	7.57 \pm 1.23
15341	15.44 \pm 1.80	13.90 \pm 0.67	6.35 \pm 1.05	21.84 \pm 2.04	10.82 \pm 0.34	19.13 \pm 1.53
15355	12.64 \pm 0.69	17.32 \pm 0.59	22.05 \pm 2.00	20.99 \pm 1.86	15.49 \pm 1.29	12.12 \pm 1.67
15370	3.00 \pm 1.14	13.69 \pm 0.03	23.89 \pm 0.88	12.90 \pm 2.28	19.28 \pm 2.31	13.99 \pm 1.39
15384	8.63 \pm 0.17	n.d.	19.30 \pm 1.23	12.49 \pm 3.16	17.34 \pm 0.72	15.51 \pm 0.96
15398	5.77 \pm 0.04	8.50 \pm 0.52	11.12 \pm 1.69	9.16 \pm 2.09	9.86 \pm 1.09	13.16 \pm 1.45
15412	n.d.	7.40 \pm 0.04	7.93 \pm 2.12	7.60 \pm 1.40	9.10 \pm 2.00	11.75 \pm 2.99
15426	n.d.	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	7.30 \pm 0.50	8.51 \pm 1.87	6.76 \pm 0.56
15440	5.73 \pm 1.00	n.d.	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	n.d.	0.00 \pm 0.00

Tabella 4.XLI. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H3-1 prima e dopo trattamento con **MS275** a concentrazione 50 μM per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	Controllo	MS275 1h	MS275 4h	MS275 6h	MS275 8h	MS275 24h
15284	3.92 \pm 0.70	4.22 \pm 0.65	6.10 \pm 2.87	2.84 \pm 0.32	3.20 \pm 0.95	1.95 \pm 1.67
15299	5.58 \pm 1.00	8.88 \pm 0.98	8.58 \pm 2.63	5.25 \pm 1.56	4.67 \pm 0.24	3.63 \pm 1.11
15313	7.86 \pm 0.92	8.70 \pm 0.29	6.46 \pm 2.59	6.19 \pm 2.14	3.94 \pm 0.15	3.54 \pm 0.99
15328	10.72 \pm 1.43	11.61 \pm 1.14	10.23 \pm 1.82	10.91 \pm 3.51	8.73 \pm 2.50	3.05 \pm 1.04
15341	10.84 \pm 0.20	15.40 \pm 2.09	7.96 \pm 1.27	9.99 \pm 0.74	8.51 \pm 0.45	5.22 \pm 2.10
15355	13.05 \pm 0.39	9.83 \pm 3.00	9.53 \pm 1.34	8.46 \pm 0.65	7.98 \pm 0.46	6.89 \pm 1.09
15370	12.80 \pm 0.33	10.49 \pm 2.05	11.16 \pm 1.41	12.66 \pm 1.59	12.54 \pm 0.16	8.80 \pm 0.45
15384	9.51 \pm 0.43	7.28 \pm 0.45	11.08 \pm 1.11	8.41 \pm 1.70	8.52 \pm 1.56	10.93 \pm 0.93
15398	10.08 \pm 0.22	7.08 \pm 0.61	9.29 \pm 0.74	11.85 \pm 1.19	12.09 \pm 0.89	12.96 \pm 0.77
15412	5.78 \pm 0.56	6.15 \pm 0.83	7.98 \pm 0.67	9.35 \pm 2.39	11.23 \pm 0.91	14.24 \pm 0.81
15426	6.03 \pm 0.31	7.27 \pm 0.28	8.20 \pm 0.28	7.89 \pm 1.65	12.29 \pm 1.33	14.45 \pm 0.79
15440	3.82 \pm 0.24	3.10 \pm 0.24	3.42 \pm 0.95	6.21 \pm 0.60	6.31 \pm 0.36	14.33 \pm 0.54

Tabella 4.XLII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H3-1 prima e dopo trattamento con **MC1855** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6 e 8h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	Controllo	MC1855 1h	MC1855 4h	MC1855 6h	MC1855 8h
15284	4.52 \pm 0.17	4.41 \pm 0.32	3.83 \pm 0.07	2.42 \pm 0.20	1.74 \pm 0.56
15299	8.80 \pm 1.89	6.90 \pm .155	5.93 \pm 0.00	3.82 \pm 0.13	2.95 \pm 0.99
15313	12.76 \pm 0.21	12.35 \pm 0.01	9.48 \pm 0.44	10.98 \pm 0.35	3.62 \pm 0.02
15328	12.26 \pm 0.31	10.43 \pm 0.24	8.58 \pm 0.59	10.79 \pm 0.14	7.97 \pm 0.02
15341	8.08 \pm 0.75	10.67 \pm 0.46	7.59 \pm 1.07	12.23 \pm 0.99	14.76 \pm 0.59
15355	10.30 \pm 0.49	7.94 \pm 0.01	11.54 \pm 0.16	6.45 \pm 0.16	11.42 \pm 0.19
15370	9.78 \pm 1.03	7.92 \pm 0.72	7.05 \pm 0.06	12.20 \pm 0.50	7.39 \pm 0.44
15384	7.44 \pm 1.12	9.77 \pm 0.15	9.68 \pm 0.37	9.13 \pm 1.19	10.11 \pm 0.23
15398	7.62 \pm 0.21	7.92 \pm 0.46	9.37 \pm 0.94	10.80 \pm 0.67	9.09 \pm 0.00
15412	7.09 \pm 0.07	7.59 \pm 1.02	10.80 \pm 1.74	12.43 \pm 0.41	12.50 \pm 0.90
15426	5.60 \pm 0.01	7.39 \pm 0.57	9.01 \pm 0.35	8.75 \pm 0.71	8.47 \pm 1.04
15440	5.75 \pm 2.15	6.71 \pm 0.59	7.15 \pm 1.19	2.42 \pm 0.20	8.99 \pm 2.00

Tabella 4.XLIII. Abbondanze relative delle varie isoforme istoniche relative all'istone H3-1 prima e dopo trattamento con **MC1568** a concentrazione 50 μ M per diversi tempi (1, 4, 6, 8 e 24h). I dati sono stati ottenuti elaborando gli spettri di massa multicarica ottenuti mediante analisi al Q-TOF ed elaborati con il software Mass Lynx.

PM	Controllo	MC1568 1h	MC1568 4h	MC1568 6h	MC1568 8h	MC1568 24h
15284	4.68 \pm 0.09	5.11 \pm 0.51	5.07 \pm 0.26	4.,42 \pm 0.05	4.15 \pm 0.13	5,20 \pm 0.55
15299	9.95 \pm 0.25	9.71 \pm 0.12	8.09 \pm 0.48	7.51 \pm 0.43	7.14 \pm 0.19	8,16 \pm 0.12
15313	13.47 \pm 0.94	10.61 \pm 0.22	10.99 \pm 0.64	10.74 \pm 0.65	11.27 \pm 1.22	12,24 \pm 0.11
15328	11.72 \pm 1.08	10.24 \pm 0.83	11.73 \pm 0.53	10.37 \pm 0.99	11.58 \pm 0.48	11,00 \pm 0.01
15341	7.93 \pm 0.63	6.25 \pm 0.99	7.16 \pm 0.05	7.83 \pm 0.34	7.87 \pm 1.04	7,26 \pm 0.99
15355	10.59 \pm 0.46	12.06 \pm 0.32	8.83 \pm 0.49	8.43 \pm 0.75	10.38 \pm 1.50	9,05 \pm 0.87
15370	8.78 \pm 1.00	8.15 \pm 0.14	9.85 \pm 0.50	9.87 \pm 0.91	9.56 \pm 0.72	10,39 \pm 0.89
15384	8.89 \pm 1.04	9.56 \pm 1.06	10.23 \pm 0.11	11.05 \pm 1.00	9.63 \pm 0.43	10,38 \pm 0.13
15398	7.46 \pm 0.55	7.59 \pm 0.54	9.76 \pm 0.30	7.37 \pm 1.12	7.25 \pm 0.24	6,07 \pm 0.04
15412	6.14 \pm 0.41	9.15 \pm 1.21	7.17 \pm 0.97	8.43 \pm 0.67	10.05 \pm 2.62	10,57 \pm 2.00
15426	5.75 \pm 0.99	6.01 \pm 0.10	6.14 \pm 0.27	7.30 \pm 0.00	6.02 \pm 0.23	5,77 \pm 0.67
15440	4.64 \pm 1.00	5.56 \pm 0.10	4.98 \pm 0.24	6.66 \pm 0.45	5.12 \pm 0.87	3,91 \pm 0.55

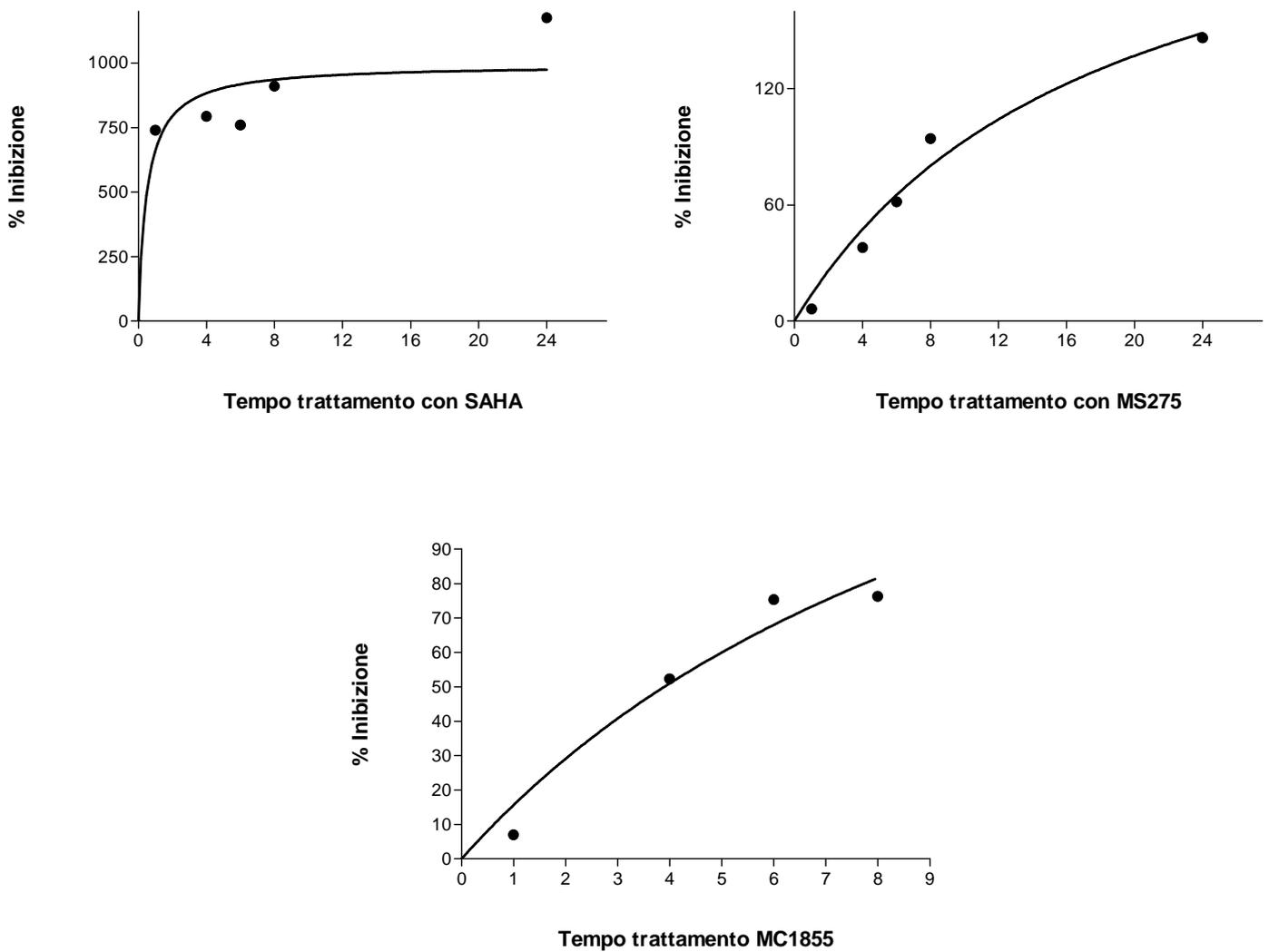


Figura 4.22. Variazione della percentuale di inibizione sull'istone H3-1 in funzione del tempo di trattamento con i diversi inibitori delle HDAC. Sono anche riportate le ore di trattamento che servono per ottenere l'effetto massimo.

4.3.2 Discussione

Poiché spesso l'insorgenza del tumore è stata associata ad un'attività aberrante delle HDAC, non sorprende che gli inibitori di questa classe enzimatica siano diventati promettenti agenti terapeutici antitumorali. Infatti questi composti, inducendo l'iperacetilazione delle proteine istoniche, sono in grado di indurre numerosi effetti antitumorali quali apoptosi, arresto del ciclo cellulare, differenziamento e inibizione dell'angiogenesi del tumore sia *in vitro* che *in vivo* (Cap. 1). Per questo motivo molti gruppi di ricerca sono impegnati nello sviluppo di potenziali inibitori delle HDAC.

Inoltre si sta sempre più spesso cercando di progettare e sintetizzare molecole che siano in grado di inibire selettivamente le varie HDAC. Gli enzimi appartenenti a questa famiglia possono essere suddivisi in varie classi a seconda di diverse caratteristiche quali la localizzazione cellulare, la dimensione, l'omologia strutturale e il meccanismo d'azione. Questi enzimi vengono suddivisi in quattro principali classi: la prima comprende gli enzimi HDAC 1, 2, 3 e 8 che hanno localizzazione nucleare e meccanismo d'azione Zn^{2+} dipendente; la seconda classe comprende le HDAC 4, 5, 6, 7, 9 e 10 in grado di spostarsi tra nucleo e citoplasma ma che conservano comunque, come quelle appartenenti alla classe I, un meccanismo d'azione Zn^{2+} dipendente; le sirtuine invece costituiscono la terza classe e sono caratterizzate da un diverso meccanismo d'azione e dal fatto che non sono inibite dalle stesse molecole che inibiscono le altre classi; infine al quarto gruppo appartiene solo la HDAC11 che ha una sequenza troppo diversa dalle HDAC di classe I e II per essere inclusa nelle suddette classi. Tutti questi enzimi esplicano la loro azione se associati a complessi multiproteici. Lo sviluppo di nuove molecole in grado di inibire selettivamente enzimi appartenenti alle varie classi può risultare molto interessante per chiarire la funzione delle diverse HDAC in questi complessi [7]. La difficoltà incontrata nei vari tentativi di isolare le singole HDAC funzionanti rende però arduo il tentativo di stabilire il profilo di selettività dei vari inibitori [8].

Per valutare l'attività delle HDAC, e quindi l'eventuale efficacia dei loro inibitori, si utilizzano sia saggi *in vitro* con l'enzima isolato che, come detto precedentemente, difficilmente conserva la sua capacità catalitica, che analisi in Western Blot [9]. Negli studi *in vitro* si sfruttano substrati marcati con radio-isotopi oppure con sonde fluorescenti e si determinano le costanti di inibizione caratteristiche dei vari inibitori [10]; questo metodo consente di valutare l'efficacia di un inibitore nei confronti della specifica HDAC su cui si effettua il saggio, ma non permette di valutare come

l'inibizione dell'enzima vada poi effettivamente ad influenzare il profilo di acetilazione delle diverse proteine istoniche.

Informazioni più specifiche si ricavano dai saggi che utilizzano anticorpi diretti verso specifiche modificazioni a livello delle diverse proteine istoniche, come nel caso dell'anticorpo diretto verso l'acetilazione delle lisine 9 e 14 dell'istone H3 [6]. Resta comunque dubbia l'effettiva efficacia degli anticorpi che potrebbe essere inficiata dalla presenza contemporanea di più modificazioni [11].

La scopo del nostro lavoro è stato quello di applicare il metodo cromatografico, ottimizzato per la separazione delle otto classi di istoni, accoppiato all'analisi con gli spettrometri di massa aventi sorgente di ionizzazione ESI e analizzatori sia a trappola ionica che Q-TOF, per analizzare istoni estratti da cellule HT29 trattate con inibitori comprovati delle HDAC dotati di diversi spettri di selettività nei confronti delle HDAC stesse. Questo metodo ci consente con un'unica analisi di ottenere dettagliate informazioni riguardanti tutte le classi istoniche.

Gli inibitori su cui sono stati condotti gli studi sono stati SAHA, MS275, MC1855 e MC1568 (fig. 1.1). Come detto precedentemente il SAHA è un noto inibitore delle HDAC, già utilizzato in trial clinici; questa molecola è in grado di inibire le HDAC appartenenti alla classe I, IIa, IIb e IV e appartiene alla famiglia degli acidi idrossamici [12]. MS275 è invece un inibitore appartenente alla famiglia delle benzamidi ed è risultato selettivo verso le HDAC di classe I e più precisamente verso la HDAC1, 2 e 3, mentre l'attività verso la HDAC8 è nettamente più bassa [13].

MC1855 e MC1568 sono invece molecole aventi entrambe la struttura di acidi idrossamici ma con profili di selettività diversi verso le HDAC. MC1855 è in grado di inibire selettivamente le HDAC appartenenti alla classe I, mentre MC1568 inibisce selettivamente quelle della classe II [14].

Per effettuare studi di dose dipendenza questi inibitori sono stati somministrati a diverse concentrazioni alle colture cellulari di HT29. Le concentrazioni scelte sono state 5, 25, 50 e 100 μ M e il trattamento delle cellule è durato, con tutti gli inibitori, 6 ore.

Gli istoni estratti dalle cellule trattate sono stati quindi analizzati con il metodo proposto e i risultati ottenuti sono stati riportati nelle tabelle del paragrafo 4.3.1.

Per poter confrontare la potenza dei vari inibitori è stata calcolata per ognuno di essi una IC_{50} che, come detto precedentemente, è intesa come la concentrazione di inibitore necessaria per ottenere il 50% dell'effetto massimo. Oltre al confronto sulla base del valore di IC_{50} , i vari inibitori sono anche stati confrontati in base all'effetto massimo, inteso come aumento dei livelli di acetilazione, che riescono a produrre. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 4.XLIV.

Tabella 4.XLIV. Valori di IC₅₀ e della percentuale dell'inibizione massima ottenuti per i diversi inibitori delle HDAC.

Istone	IC ₅₀ (μM)				Max. Inibizione			
	SAHA	MS275	MC1855	MC1568	SAHA	MS275	MC1855	MC1568
H4	8.37	3.34	0.85	n.d.	60.73	76.08	78.12	n.d.
H2A-1	15.48	52.03	3.29	/	38.63	52.03	50.79	/
H2A-2	27.35	119.10	1.54	/	66.26	34.09	43.33	/
H2B	4.96	5.49	2.13	/	36.92	16.60	52.04	/
H3-1	6.30	3.54	0.49	/	n.d.	182.60	244.9	/

Si può osservare che tutti questi inibitori sono caratterizzati da valori di IC₅₀ compresi nel range 0,49-119,10 μM, e questi risultati confermano quelli riportati in letteratura [9, 12, 15]. Dalla tabella si può osservare che il composto caratterizzato dai valori più bassi di IC₅₀ verso tutte le proteine istoniche è MC1855 e che è anche lo stesso che provoca per quasi tutti gli istoni la percentuale più alta di inibizione (tab. 4.XLIV).

Considerando il profilo di selettività e la struttura chimica di questi composti, il fatto che MC1855 sia più potente di MS275 è spiegabile in base al fatto che notoriamente i composti a struttura idrossamica sono più potenti di quelli a struttura benzammidica [16]. Sorprende di più il fatto che questo composto sia anche più potente del SAHA che, oltre ad essere un acido idrossamico, è anche in grado di inibire, al contrario di MC1855, le HDAC appartenenti alla seconda classe. Evidentemente MC1855 è comunque più affine verso il sito catalitico delle HDAC di classe I rispetto al SAHA e quindi per indurre un aumento dei livelli di acetilazione sembrerebbe più importante riuscire a inibire in maniera più efficace le HDAC appartenenti alla prima classe piuttosto che inibire tutte le HDAC. Questa conclusione può essere supportata dal fatto che MC1568, inibitore a struttura idrossamica selettivo verso le HDAC di classe II, non provoca un significativo incremento dei livelli di acetilazione se non nei confronti dell'istone H4.

Un altro aspetto interessante è il fatto che tutti gli inibitori siano in grado di indurre un significativo incremento dei livelli di acetilazione dell'istone H4; evidentemente questo istone è il substrato preferenziale di tutte le HDAC e quindi è anche quello maggiormente inibito.

Classificando gli inibitori studiati in base alla loro capacità di indurre iperacetilazione delle proteine istoniche, il più potente è risultato essere MC1855 seguito da SAHA, MS275 e MC1568. Questi risultati sono confermati anche dagli studi di tempo dipendenza (tab. 4.XLV). Anche per quanto riguarda il tempo necessario per ottenere l'effetto massimo, MC1855 si è dimostrato il composto più veloce a indurre iperacetilazione delle proteine istoniche.

Tabella 4.XLV. Dipendenza dal tempo della massima inibizione ottenibile con i composti studiati.

Istone	Tempo necessario per ottenere l'effetto massimo (ore)			
	SAHA	MS275	MC1855	MC1568
H4	8	8	4	n.d.
H2A-1	12	8	6	/
H2A-2	8	4	4	/
H2B	8	n.d.	6	/
H3-1				/

4.4 Saggi biologici su cellule di tumore intestinale trattate con gli inibitori delle HDAC

Sulle cellule trattate con gli inibitori sono stati eseguiti anche saggi biologici per poter valutare i diversi effetti che questi inibitori hanno sulla sopravvivenza della cellula tumorale.

4.4.1 Saggio dell'MTT

Il saggio MTT è un saggio colorimetrico, che dopo trattamento delle cellule con concentrazioni crescenti di inibitore, ci consente di ottenere una IC_{50} intesa come concentrazione di inibitore in grado di ridurre del 50% la crescita cellulare. I risultati dopo trattamento di linee cellulari di tumore del colon con SAHA e MS275 sono già noti in letteratura e sono riportati in tabella 4.XLVI [16-18]. In tabella è riportato anche il risultato ottenuto con esperimenti condotti con MC1855 su HT29. Non è stato invece possibile effettuare questo saggio con MC1568 che, essendo una molecola colorata, interferisce con la metodica. Dalla tabella è possibile notare che questi inibitori sono caratterizzati da valori di IC_{50} molto simili.

Tabella 4.XLVI. IC_{50} determinate grazie al saggio dell'MTT su cellule di tumore intestinale trattate con concentrazioni crescenti di inibitori.

Inibitore	IC_{50} (μ M)
SAHA	1.8-4.4
MS275	2-6.1
MC1855	1.2-5.7
MC1568	n.d.

4.4.2 Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

Differenze nel comportamento *in vivo* di questi inibitori possono essere osservate anche monitorando la distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare, dopo trattamento con gli inibitori 50 μ M.

SAHA e MC1855 hanno dimostrato di essere citotossici perché inducono rispettivamente il 70 e il 78% di morte cellulare. MC1568, inibitore selettivo della classe II delle HDAC, non ha prodotto sostanziali variazioni nella distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. I risultati più

interessanti sono stati quelli ottenuti con MS275 che ha indotto un accumulo di cellule nella fase G0/G1 del ciclo cellulare (tab. 4.XLVII). Questo effetto potrebbe essere ricondotto alla selettività di questo inibitore verso le HDAC di classe I.

Tabella 4.XLVII. Distribuzione delle cellule HT29 nelle fasi del ciclo cellulare (G0/G1; S, G2/M), dopo trattamento con MS275 a dose 50 μ M.

Fase del ciclo cellulare	MS275	
	Controllo	MS275 (50 μ M)
G0/G1	47.8%	60.2%
S	40.2%	3.2%
G2/M	13.1%	36.6%

I dati ottenuti da questi saggi biologici possono essere correlati agli studi sui livelli di acetilazione degli istoni mediante LC-ESI-MS.

In tabella 4.XLVIII sono riportati i valori di inibizione ottenuti analizzando gli istoni estratti da cellule HT29 trattate con gli inibitori a dose 50 μ M. Possiamo notare che SAHA e MC1855 sono quelli risultati più potenti, fatta eccezione per l'istone H4. Tutti gli inibitori infatti si sono dimostrati in grado di indurre un notevole incremento dei livelli di acetilazione di questo istone; in questo caso MS275 si è dimostrato anche più potente del SAHA, mentre MC1568 è in grado di indurre un aumento dei livelli di acetilazione solo a carico di questa classe istonica. Dato che MS275 e MC1568 non si sono dimostrati citotossici a queste dosi, è possibile concludere che l'iperacetilazione di questo istone non è direttamente correlata alla vitalità cellulare.

Per avere effetti citotossici quindi gli inibitori devono indurre un aumento dei livelli di acetilazione anche delle altre classi istoniche: infatti osserviamo che, fatta eccezione per l'istone H4, a dosi 50 μ M SAHA e MC1855 inducono uno stato di iperacetilazione generalizzato delle varie classi istoniche.

Livelli di inibizione intermedia come quelli ottenuti dopo trattamento con MS275 sembrano essere importanti per ottenere effetti sul ciclo cellulare, come l'accumulo delle cellule in fase G0/G1, senza provocare però morte cellulare. I risultati ottenuti con questo inibitore sono molto interessanti e

potrebbero essere la base di nuove indagini quali ad esempio l'analisi del profilo di trascrizione indotto dal trattamento con questo inibitore.

Tabella 4.XLVIII. Percentuale di inibizione di diversi istoni misurata dopo trattamento con alcuni inibitori somministrati a dose 50 μ M

Istone	Inibizione a dose 50 μ M di inibitore			
	SAHA	MS275	MC1855	MC1568
H4	60.73	70.21	76.84	33.58
H2A-1	38.63	19.15	48.34	/
H2A-2	49.62	8.93	42.15	/
H2B	33.19	15.70	49.38	/
H3-1	n.d.	37.89	250.99	/

4.5 Analisi MALDI-TOF e LC-ESI-MSMS dell'istone H4 estratto da cellule trattate con SAHA

4.5.1 Risultati e discussione

Gli istoni estratti da cellule HT29 trattate con SAHA a concentrazione 50 μM per tempi diversi (1, 8 e 24h) sono stati separati cromatograficamente e raccolti come descritto nel capitolo precedente (paragrafo 3.3.1). Anche in questo caso la frazione corrispondente all'istone H4 è stata portata a secco sotto vuoto e sottoposta a digestione enzimatica con endoproteinasi Arg-C.

In un primo momento sul digerito sono state effettuate delle analisi MALDI-TOF e gli spettri ottenuti sono riportati nella figura 4.23.

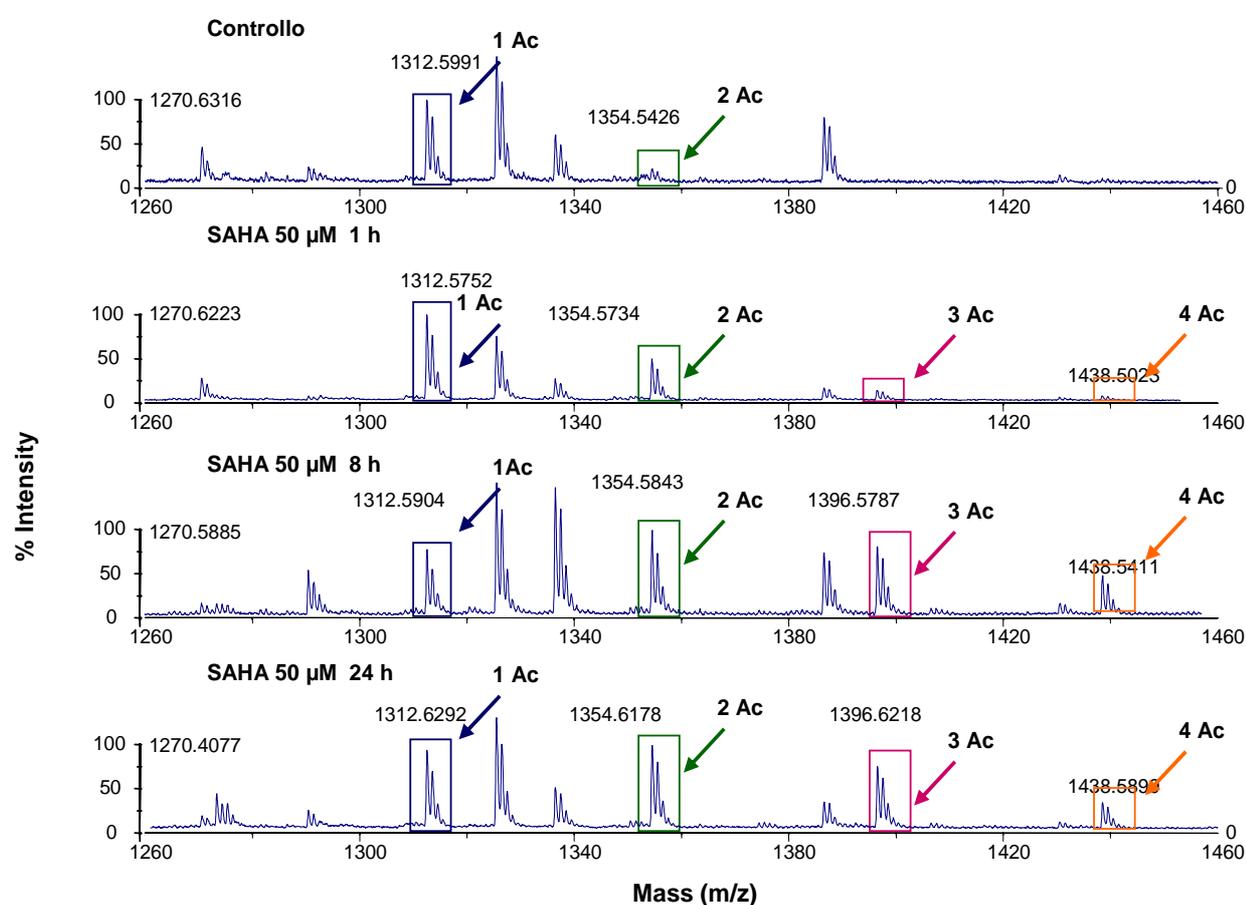


Figura 4.23. Spettri MALDI-TOF relativi al digerito di istone H4 estratto da cellule HT29 trattate per tempi crescenti (1, 8, e 24h) con SAHA μM .

Nella figura sono indicati i segnali relativi al peptide 4-17 nella forma mono, di e tri-acetilata. Come si può notare dallo spettro, all' aumentare del tempo di trattamento con l'inibitore aumentano anche le intensità dei segnali corrispondenti alle forme con più acetilazioni. Nel campione di controllo si osservano solo la forma mono e di-acetilata; dopo un'ora di trattamento compare la forma tri-acetilata e dopo 8 ore quella tetra-acetilata. L'andamento delle abbondanze relative segue quello ottenuto dopo analisi della proteina intatta; anche questo metodo può essere utile quindi per evidenziare aumenti dei livelli di acetilazione dopo trattamento delle cellule con inibitori delle HDAC.

Per individuare invece l'ordine di acetilazione delle varie lisine della coda N-terminale dopo trattamento con SAHA, la miscela di peptidi ottenuta dalla digestione dell'istone H4, dopo trattamento con l'inibitore a dose 50 μM per 8 ore, è stata analizzata mediante analisi LC-ESI-MSMS descritte nel capitolo precedente.

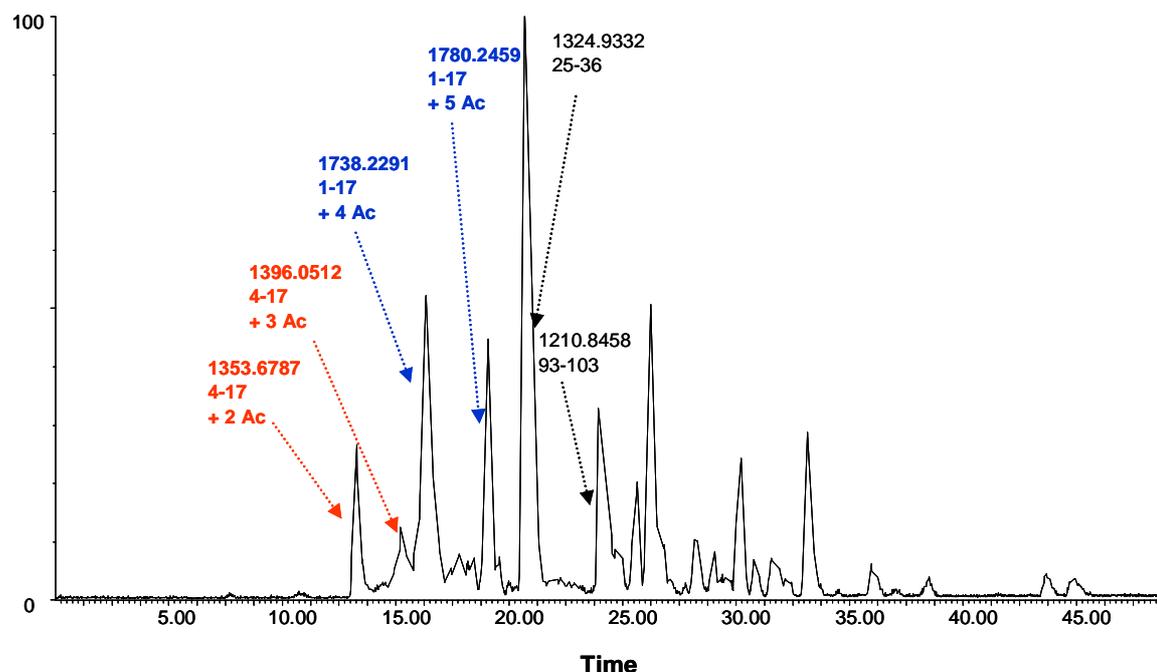


Figura 4.24. Cromatogramma relativo alla separazione degli istoni estratti da cellule HT29 trattate con SAHA 50 μM per 8 ore. Il gradiente di eluizione è il seguente: da [acqua:FA (100:0.1 v/v)]/B [acetonitrile:FA (100:0.1, v/v)] 95/5 (v/v), a A/B 40/60 (v/v) in 100 min.

Nella figura 4.24 è riportato il cromatogramma relativo alla separazione dei peptidi dell'istone H4 ottenuti dopo digestione con endoproteinase Arg-C. Come si può osservare diversi picchi cromatografici corrispondono a peptidi della coda N-terminale arrecanti acetilazioni. Tra i peptidi più abbondanti ritroviamo in questo caso quelli aventi peso molecolare 1.353,6787 Da e 1.395,0512 Da che corrispondono al peptide 4-17 rispettivamente di-acetilato e tri-acetilato; il peptide 1-17 è stato invece individuato sia tetra che penta-acetilato (1.738,2291 Da e 1.780,2459 Da).

Anche in questo caso per individuare quali siano gli specifici siti di acetilazione ogni peptide è stato frammentato e dallo spettro di MSMS è stato possibile risalire alla sua sequenza amminoacidica e individuare i siti di acetilazione. Nella tabella 49 sono riportati i peptidi della coda N-terminale dell'istone H4 estratto da cellule HT29 trattate con SAHA 50 μ M per 8 ore e i relativi siti di acetilazione individuati sottomettendo i dati ottenuti dalle analisi MSMS in banca dati online (Mascot).

L'ordine di acetilazione che si ricava dall'osservazione dei dati riportati in tabella vede come primo residuo acetilato la lisina 16, seguita dalla lisina 12. Le lisine 5 e 8 sono state ritrovate acetilate alternativamente quando l'istone H4 risulta tri-acetilato.

Osservando i dati relativi al peptide 1-17 si può invece concludere che la tetra-acetilazione interessa le lisine 16, 12, 5 e 8 mentre l'ultimo residuo ad essere acetilato sembra essere la serina N-terminale.

Tabella 4.XLIX. Peptidi della coda N-terminale arrecanti acetilazioni e relativi residui interessati nella modificazione post-traduzionale.

Massa misurata e stato di carica	Peptide e stato di acetilazione	Sequenza	Siti di acetilazione
438.3130 (3)	1311.9171; 4-17 + 1Ac	GKGGKGLGKGGAKR	k16
452.2416 (3)	1353.7030; 4-17 + 2Ac	GKGGKGLGKGGAKR	K16 e K12
466.2458(3)	1395.7156; 4-17 + 3Ac	GKGGKGLGKGGAKR	K16, K12, K8 o K5
719.8666 (2)	1437.7186; 4-17 + 4Ac	GKGGKGLGKGGAKR	K16, k12, k8 e K5
580.2987 (3)	1737.8742; 1-17 + 4Ac	SGRGKGGKGLGKGGAKR	K16, k12, k8 e K5
594.3109 (3)	1780.8849; 1-17 + 5Ac	SGRGKGGKGLGKGGAKR	K16, k12, k8, K5 e S1

Ovviamente questo ordine di acetilazione è caratteristico dopo trattamento con SAHA, potrebbe però essere interessante analizzare allo stesso modo gli istoni H4 estratti da cellule trattate con altri inibitori e vedere se tale ordine cambia.

4.6 Conclusioni

Gli studi di dose e tempo dipendenza hanno permesso di ottenere dettagliate informazioni sullo stato di acetilazione delle diverse proteine istoniche in seguito a trattamento con inibitori a diversa struttura chimica e a diversa selettività di inibizione nei confronti delle diverse classi di HDAC. In questo modo è stato possibile stabilire quali inibitori siano effettivamente in grado di indurre un aumento dei livelli di acetilazione delle proteine istoniche (SAHA, MS275 e MC1855) e quali invece siano invece solo in grado di provocare un lieve incremento di tali livelli (MC1568). Inoltre è stato possibile correlare la potenza dei vari inibitori, intesa come aumento dei livelli di acetilazione, alla selettività di questi inibitori nei confronti delle diverse proteine istoniche ed è stato possibile chiarire che è importante inibire le HDAC appartenenti alla classe I per ottenere un forte incremento dei livelli di acetilazione.

Quindi l'analisi del profilo di acetilazione degli istoni può fornire importanti indicazioni sul destino della cellula tumorale; una marcata acetilazione dell'istone H4 non sembra sufficiente per ottenere la morte cellulare, per la quale è necessario che tutte le classi istoniche vengano iperacetilate.

D'altra parte, una moderata acetilazione degli istoni, come quella indotta dal trattamento di MS275 a dose 50 μ M, sembra importante per ottenere un accumulo delle cellule in fase G0/G1, risultato questo molto interessante come premessa per ulteriori indagini, quali l'analisi del profilo di trascrizione indotto dal trattamento delle cellule tumorali con questa molecola.

Il profilo di acetilazione degli istoni può quindi fornire importanti informazioni sul meccanismo d'azione di nuovi composti, sulla selettività inibitrice nei confronti delle diverse classi di HDAC e sugli effetti biologici delle cellule tumorali.

Inoltre, le analisi effettuate sull'istone H4 digerito enzimaticamente hanno consentito di confermare i risultati ottenuti sulle proteine intatte. In aggiunta a questa conferma, si è avuta evidenza che l'iperacetilazione avviene sulle code terminali delle proteine e inoltre sono stati identificati gli amminoacidi coinvolti nelle acetilazioni. Infatti, tramite analisi MALDI-TOF è stato possibile caratterizzare la miscela peptidica proveniente dalla digestione enzimatica, tramite attribuzione della massa molecolare, e quindi riconoscere un peptide specifico della sequenza N-terminale,

appartenente alla cosiddetta coda istonica. E' stato poi osservato un netto incremento dell'intensità dei segnali corrispondenti a questo peptide con un grado maggiore di acetilazioni dopo trattamento delle cellule con SAHA, sia tramite le analisi MALDI-TOF, sia mediante analisi LC-ESI-MSMS.

Infatti tramite l'analisi LC-ESI-MS dei peptidi digeriti, è stata ottenuta la separazione e l'identificazione della massa dei peptidi isolati. E' stato poi possibile ricavare in modalità MSⁿ la sequenza dei peptidi della coda N-terminale e individuare gli AA che risultano coinvolti come siti di acetilazione. Inoltre è stato ottenuto l'ordine temporale di acetilazione caratteristico delle lisine dell'istone H4 dopo trattamento con l'inibitore SAHA.

Questi metodi forniscono perciò un importante contributo per una caratterizzazione completa di nuovi e potenziali inibitori delle HDAC.

4.7 Bibliografia

- [1] J. Wiltse. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**, 727 (2005).
- [2] D.C. Marchion, E. Bicaku, A.I. Daud, D.M. Sullivan, P.N. Munster. *Cancer Res.* **65**, 3815 (2005).
- [3] C.J. Phiel, F. Zang, E.Y. Huang, M.G. Guenther, M.A. Lazar, P.S. Klein. *J. Biol. Chem.* **39**, 36734 (2001).
- [4] M. Göttlicher, S. Minucci, P. Zhu, O.H. Krämer, A. Shimpf, S. Giavara, J.P. Sleeman, F. Lo Coco, C. Nervi, P. Pelicci, T. Heinzel. *EMBO J.* **20** 6969 (2001).
- [5] N. Gurvich, O.M. Tsygankova, J.L. Meinkoth, P.S. Klein. *Cancer Res.* **64** 1079 (2004).
- [6] Beckers T, Burkhardt C, Wieland H, Gimmnich P, Ciossek T, Maier T, Sanders K. *Int. J. Cancer.* **121** (5), 1138 (2007).
- [7] Ragno R, Simeoni S, Rotili D, Caroli A, Botta G, Brosch G, Massa S, Mai A. *Eur. J. Med. Chem.* (2007) in stampa.
- [8] Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5** (9), 769 (2006).
- [9] Iacomino G, Medici MC, Napoli D, Russo GL. *J. Cell. Biochem.* **99**, 1122 (2006).
- [10] Beutler AS, Li S, Nicol R, Walsh MJ. *Life Sci.* **76**, (26), 3107 (2005).
- [11] Su X, Ren C, Freitas MA. *Expert Rev. Proteomics.* **4** (2), 211 (2007).
- [12] Marks PA, Breslow R. *Nat. Biotechnol.* **25** (1), 84 (2007).
- [13] Hess-Stumpff H, Bracker TU, Henderson D, Politz O. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **39** (7-8), 1388 (2007).
- [14] R. Ragno, S. Simeoni, D. Rotili, A. Caroli, G. Botta, G. Brosch, S. Massa, A. Mai. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 621 (2008).
- [15] Furchert SE, Lanvers-Kaminsky C, Juürgens H, Jung M, Loidl A, Frühwald MC. *Int. J. Cancer.* **120** (8), 1787 (2007).
- [16] C. Monneret. *European Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 1 (2005)
- [17] Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R. *Med. Res. Rev.* **25** (3), 261 (2005).

Appendici

Pubblicazioni riguardanti gli argomenti trattati nella tesi

- M. Naldi, V.Andrisano, J. Fiori, N. Calonghi, E. Pagnotta, C. Parolin, G. Pieraccini, L. Masotti, **"Histone proteins determined in a human colon cancer by High-Pressure Liquid Chromatography and Mass Spectrometry"**, (2006) *Journal of chromatography. A*, 1129(1), 73-81
- S. Olmo, R. Gotti, M. Naldi, V. Andrisano, N. Calonghi, C. Parolin, L. Masotti, V. Cavrini **"Analysis of H4 human histone by CE in a pullan-coated capillary and LC-ESI-MS"** *Anal Bioanal Chem*, in stampa.
- C. Parolin, N. Calonghi, E. Pagnotta, M. Naldi, C. Aangeloni, S. Hrelia, P. Biagi, L. Masotti. (2006). **The cell cycle arrest induced by sulforaphane in human colon carcinoma cells HT29 is associated with the hyperacetylation of histone H4.** *Italian Journal of Biochemistry*. 55, 65

Comunicazioni a congresso riguardanti gli argomenti trattati nella tesi

- V. ANDRISANO, NALDI M., N. CALONGHI, E. PAGNOTTA, C. PAROLIN, C. BOGA, L. MASOTTI. (2005). **Identification of histones modifications involved in HDAC1 inhibition by 9-HSA.** CNB8. (vol. 8, pp. 122). SIENA.
- NALDI M., V.ANDRISANO, J. FIORI, N. CALONGHI, E. PAGNOTTA, L. MASOTTI. (2005). **HISTONE POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS DETERMINED BY HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY.** Massa 2005 an international symposium on mass spectrometry. MASSA 2005 - An International Symposium on Mass Spectrometry. 28 giugno - 1 luglio 2005. (vol. 1, pp. 55). ROMA.
- NALDI M., V.ANDRISANO, J. FIORI, N. CALONGHI, E. PAGNOTTA, G. PIERACCINI, L. MASOTTI. (2005). **Hystones' isoforms determined by HPLC-MS.** The 16th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis PBA 2005. August 28-31. (vol. 1, pp. 56). BALTIMORA MARYLAND (UNITED STATES).

-
- S.OLMO, NALDI M., V.CAVRINI, R. GOTTI. (2006). **Coating idrofili nell'analisi di proteine istoniche mediante elettroforesi capillare**. S.A.Y.C.S. 9-11 Ottobre 2006.
 - NALDI M., ANDRISANO V, CALONGHI N, PAGNOTTA E, PAROLIN C, MASOTTI L. (2006). **LC-ESI/Ion Trap analysis of core histone proteins validated by LC-ESI/Q-TOF analysis**. 19a Riunione dei dottorandi in Discipline Biochimiche.
 - C. PAROLIN, N. CALONGHI, E. PAGNOTTA, NALDI M., C. ANGELONI, S. HRELIA, P.L. BIAGI, L. MASOTTI. (2006). **Cell cycle arrest induced by sulforaphane in human colon carcinoma cells HT29 is associated with the hyperacetylation of histone H4**. Aspetti Biochimici e Nutrizionali dell'Interazione Geni-Nutrienti. Giornata di Studio Congiunta SIB-SINU. 5 maggio. (pp. 7). BOLOGNA.
 - C. PAROLIN, N CALONGHI, E. PAGNOTTA, NALDI M., C. BOGA, L.MASOTTI. (2006). **Identificazione delle modificazioni post-traduzionali degli istoni indotte dall'inibizione di HDAC1 da 9-HSA**. 19a Riunione dei dottorandi in Discipline Biochimiche.
 - V.ANDRISANO, NALDI M., N. CALONGHI, C.PAROLIN, E. PAGNOTTA, L. MASOTTI. (2007). **Histone post-translational modifications in colon cancer cell line determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-Tof for the characterization of deacetylases inhibitors**. [RELAZIONE] CHIFARM. 19 Settembre.
 - S. OLMO, R. GOTTI, NALDI M., V. ANDRISANO, N. CALONGHI, V. CAVRINI. (2007). **CE ANALYSIS OF BASIC PROTEINS AND H4 HUMAN HISTONES USING A PULLULAN-COATED CAPILLARY**. RDPA (Recent Developments in Pharmaceutical Analysis), 23-27 Settembre.
 - NALDI M., N. CALONGHI, C. PAROLIN, L. MASOTTI, V. ANDRISANO. (2007). **Peptide Mass Mapping of Acetylated Isoforms of Histone H4 from HT29 colon cancer cells**. RDPA (Recent Developments in Pharmaceutical Analysis), 23-27 Settembre.
 - N. CALONGHI, C. PAROLIN, E. PAGNOTTA, NALDI M., C. MANGANO, F. DI GIORGIO, C. BOGA, C. ANGELONI, S. HRELIA, L. MASOTTI. (2007). **9-Hydroxystearic acid and sulforaphane: two natural HDAC inhibitors with distinct effects on HT29 cells**. Effetti biochimici e nutrizionali della

trasformazione degli alimenti. Incontro di studio congiunto SINU-SIB. 31 maggio-1 giugno. (vol. unico, pp. 48). [RELAZIONE].

- G. FARRUGGIA, C. MANGANO, F. DE GIORGIO, C. BOGA, V. ANDRISANO, NALDI M., L. MASOTTI, N. CALONGHI. (2007). **IDENTIFICATION OF HISTONE MODIFICATIONS INVOLVED IN HDACs INHIBITION BY SUBEROYLANILIDE HYDROXAMIC ACID**

Altre pubblicazioni

- Capobianco M. L., Naldi, M., Zambianchi M., Barbarella G. **“Oligothiophene phosphoramidites for oligonucleotide labeling”** Tetrahedron Letters (2005), 46(47), 8181-8184.
- Barbarella, Giovanna; Zambianchi, Massimo; Ventola, Alfredo; Fabiano, Eduardo; Della Sala, Fabio; Gigli, Giuseppe; Anni, Marco; Bolognesi, Andrea; Polito, Letizia; Naldi, Marina; Capobianco, Massimo **“Bright Oligothiophene N-Succinimidyl Esters for Efficient Fluorescent Labeling of Proteins and Oligonucleotides”** Bioconjugate Chemistry (2006), 17(1), 58-67.
- F. Mancini, M. Naldi, V. Cavrini, V. Andrisano **“MULTIWELL fluorometric and colorimetric MICRO-ASSAYS FOR the EVALUATION OF beta-secretase (BACE-1) inhibitors”**, (2007) Anal Bioanal Chem, 388(5-6):1175-83.
- F. Mancini, M. Naldi, V. Cavrini, V. Andrisano **“Development and characterization of Beta-secretase monolithic micro-immobilized enzyme reactor for on-line high performance liquid chromatography studies”**, Journal of Chromatography A, disponibile on-line.
- M. Candela, J. Fiori, S. Dipalo, M. Naldi, R. Gotti, P. Brigidi. **“A rapid MALDI-TOF analysis to study the interaction between whole bacterial cells and human target molecules, binding of *Bifidobacterium* to human plasminogen”** *Journal of microbiological methods*, disponibile on-line.