

DOTTORATO DI RICERCA IN
Oncologia e Patologia Sperimentale

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 06/F4
Settore Scientifico disciplinare: MED/33

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA TERAPEUTICA DI AGENTI CHE
REGOLANO IL PROCESSO EPIGENETICO DI CONTROLLO
DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI SARCOMI OSSEI

Presentata da: Dott.ssa Cristalli Camilla

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. Pier-Luigi Lollini

Relatore

Chiar.mo Prof. Pier-Luigi Lollini

Correlatore

Chiar.ma Prof. Katia Scotlandi

Indice

Indice	3
1. Introduzione	6
1.1. Epigenetica	6
1.1.1. Definizione e aspetti generali	6
1.1.2. Struttura, organizzazione e modifiche della cromatina	7
1.1.2.1. Il nucleosoma	7
1.1.2.2. Modificazioni istoniche e meccanismi: ‘readers’, ‘writers’ e ‘erasers’	7
1.1.2.3. Il rimodellamento dei nucleosomi	10
1.1.2.4. Strutture cromatiniche di ordine superiore	11
1.1.2.5. La metilazione del DNA	11
1.1.2.5.1. Dnmt1: struttura, meccanismo e regolazione.....	14
1.1.2.5.2. Dnmt3: la metilazione <i>de novo</i>	18
1.1.2.5.3. Isole CpG e pattern di metilazione genomici.....	19
1.1.2.5.4. La demetilazione del DNA.....	20
1.1.2.6. La mappa dell’epigenoma	21
1.1.3. L’epigenetica del Cancro	22
1.1.3.1. Alterazioni nella metilazione del DNA	24
1.1.3.2. Alterazioni cromatiniche	28
1.1.3.3. La terapia epigenetica	28
1.1.3.3.1. Gli inibitori delle DNA-metiltransferasi (DNMTi).....	30
1.1.3.3.1.1. Gli inibitori non-nucleosidici.....	32
1.1.3.4. La terapia combinata	33
1.1.3.4.1. Combinazioni con terapie citotossiche.....	34
1.1.3.5. Terapie epigenetiche differenziative	34
1.2. I sarcomi ossei	35
1.2.1. L’osteosarcoma	36
1.2.1.1. Caratteristiche genetiche ed epigenetiche	38
1.2.1.2. Decorso clinico e terapia	38
1.2.1.3. Osteogenesi e tumorigenesi	40
1.2.1.4. La metilazione del DNA nel differenziamento osteoblastico	43

1.2.2. Il sarcoma di Ewing	43
1.2.2.1. L'origine cellulare e i difetti molecolari.....	45
1.2.2.2. L'assetto epigenetico.....	48
1.2.2.3. Decorso clinico e terapia.....	51
2. Scopo della tesi	53
3. Materiali e metodi	54
3.1. Farmaci.....	54
3.2. Saggi enzimatici cell-free (Dnmt1 e Dnmt3a).....	54
3.3. Saggi enzimatici cellulari (attività Dnmts totale).....	55
3.4. Linee cellulari e condizioni di coltura.....	56
3.5. Vitalità cellulare.....	56
3.6. Analisi del ciclo cellulare.....	57
3.7. Analisi della morte cellulare.....	57
3.8. Immunofluorescenza su cellule in aderenza.....	58
3.9. Estrazione proteica e western blotting.....	58
3.10. Differenziamento neurale.....	59
3.11. Differenziamento osteoblastico.....	59
3.12. Valutazione della fosfatasi alcalina.....	60
3.13. Estrazione di acidi nucleici.....	60
3.14. Retrotrascrizione dell'RNA.....	61
3.15. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	61
3.16. Real-time PCR.....	62
3.17. RT-PCR array.....	63
3.18. Analisi della metilazione del DNA.....	63
3.19. Studi <i>in vivo</i> : modello murino di xenotrapianto da osteosarcoma.....	65
3.20. Immunoistochimica.....	66
3.21. Colorazione Von Kossa (VK).....	66
3.22. Analisi statistica.....	66
4. Risultati	67
4.1. Azione demetilante dei nuovi composti.....	67
4.2. Effetto sulla crescita in monostrato delle cellule di sarcoma.....	68
4.3. Specificità d'azione: effetto sull'espressione e sull'attività enzimatica delle Dnmts.....	69
4.4. Effetto sul ciclo cellulare.....	73
4.5. Effetto sulla morte cellulare.....	75

4.6.	Induzione del differenziamento nelle cellule di sarcoma.....	77
4.6.1.	Effetto sul differenziamento neurale nelle cellule di ES.....	77
4.6.2.	Effetto sul differenziamento osteoblastico in linee OS.....	81
4.6.3.	Effetto sulla metilazione di ALPL.....	86
4.7.	Studi <i>in vivo</i>	87
4.7.1.	Creazione di un modello di xenotrapianto OS e derivazione di una coltura primaria.....	87
4.7.2.	Trattamenti con DNMTi <i>in vivo</i>	91
4.7.3.	Trattamenti di combinazione con i chemioterapici sulla linea da PDX OS.....	93
5.	Discussione	95
6.	Bibliografia	103

1. Introduzione

1.1. Epigenetica

1.1.1. Definizione e aspetti generali

C'è sempre stato posto in biologia per le parole che hanno significati diversi per persone diverse. L'epigenetica è un caso estremo, perché ha significati differenti con radici indipendenti. Per Conrad Waddington è stato lo studio dell'epigenesi: vale a dire, come i genotipi danno luogo ai fenotipi durante lo sviluppo[1, 2]. Al contrario, Arthur Riggs e colleghi definivano l'epigenetica come "lo studio dei cambiamenti funzionali dei geni, ereditabili alla mitosi e/o alla meiosi, ma che non possono essere spiegati da cambiamenti nella sequenza di DNA ": in altre parole, l'ereditarietà, ma non come la conosciamo[3]. Da qui, c'è quindi posto anche per una visione dell'epigenetica che mantiene il senso generale di utilizzo prevalente, ma che evita i vincoli stringenti imposti dal requisito di ereditarietà. Una definizione unificante potrebbe essere quella proposta da Adrian Bird, ossia che gli eventi epigenetici non sono altro che l'adattamento strutturale delle regioni cromosomiche in modo tale da registrare, segnalare o perpetuare stati di attività alterati[4]. Ora i meccanismi molecolari alla base di diversi processi epigenetici si stanno definendo con grande ritmo; strumenti e approcci nuovi hanno permesso di scoprire componenti chiave e pathways. Tuttavia rimangono molte sfide, James Watson afferma "il problema maggiore è la cromatina ... si può ereditare qualcosa al di là della sequenza di DNA. Ecco dov'è ora la vera emozione della genetica"[5]. Quasi tre quarti di secolo più tardi della definizione di Waddington, sappiamo che i meccanismi epigenetici sono quelli che permettono la trasmissione ereditaria dei pattern di espressione genica senza modificare la sequenza di DNA, ma attraverso l'adattamento della cromatina, che non è altro che la forma fisiologica delle informazioni genetiche. I meccanismi epigenetici operano quindi insieme al DNA stampo per rendere effettivi e stabili i programmi di espressione genica e, di conseguenza, indirizzano verso un tipo specifico di identità cellulare. L'importanza del controllo epigenetico è stata a lungo riconosciuta, ma la definizione enzimatica di stati cromatinici distinti che possono stimolare o reprimere l'attività dei geni mancava. Gli avanzamenti della tecnologia e le fertili scoperte sugli enzimi che modificano la cromatina in stati repressivi, ossia l'eterocromatina, e stati attivi, l'eucromatina, così come la comprensione dei

meccanismi che mantengono e regolano questi stati, la regolazione genica, il silenziamento trascrizionale e la reversibilità sia delle modifiche istoniche che della metilazione del DNA, hanno trasformato la nostra conoscenza di epigenetica negli ultimi vent'anni (1996-2016), culminando in quella che viene considerata l'era moderna della ricerca epigenetica[6]. La modulazione dinamica della struttura della cromatina, ossia il rimodellamento cromatinico, è una componente chiave nella regolazione dell'espressione genica, nell'apoptosi, nella replicazione e riparazione del DNA e nella condensazione e segregazione dei cromosomi. La natura ha sviluppato meccanismi elaborati per modulare dinamicamente la struttura della cromatina, tra cui il rimodellamento della cromatina attraverso complessi ATP-dipendenti, modificazioni covalenti degli istoni, l'utilizzo di varianti istoniche e la metilazione del DNA.

1.1.2. Struttura, organizzazione e modifiche della cromatina

1.1.2.1. Il nucleosoma

Studi di gruppi diversi hanno portato al modello ampiamente accettato dell'organizzazione cromatinica in nucleosomi [7], il primo ad essere articolato in una teoria provocatoria – il modello della subunità cromatinica - proposto nel 1974 [8] e visualizzato nel 1997 grazie alla cristallografia a raggi X della particella ottamero istonico-DNA [9]. Come veniva mostrato, l'unità di base della fibra cromatinica si configurava come il nucleosoma, composto da due copie di ognuna delle quattro proteine istoniche: H2A, H2B, H3 e H4 (un'ottamero di istoni) avvolte da 147 bp di DNA. La struttura cristallografica non ritrae però con precisione i ben caratterizzati domini delle code istoniche, che sporgono dalla superficie istone-DNA, e danno vita a una piattaforma flessibile che raccoglie molte, ma non tutte, le modificazioni post-traduzionali. Le code ammino-terminali degli istoni rappresentano circa un quarto della massa del nucleosoma.

1.1.2.2. Modificazioni istoniche e meccanismi: 'readers', 'writers' e 'erasers'

L'appropriata regolazione della cromatina orchestra tutte le reazioni basate sul DNA, come la trascrizione, la replicazione, la riparazione, la mitosi e l'apoptosi [10]. Le macromolecole che regolano la cromatina rientrano in classi distinte: proteine del rimodellamento ATP-dipendente che mobilizzano gli istoni all'interno della cromatina, chaperone degli istoni che inseriscono e rimuovono gli istoni generici o le varianti dalla cromatina, enzimi della modificazione post-traduzionale che aggiungono e rimuovono gruppi chimici al DNA o agli istoni [11], proteine di

riconoscimento della cromatina che riconoscono specificamente il DNA o gli istoni modificati [12], e l'RNA non codificante che si lega e modula le proteine regolatorie della cromatina [13]. Queste macromolecole lavorano in un modo altamente coordinato per regolare attività differenti. Gli enzimi delle modificazioni post-traduzionali includono sia le proteine che aggiungono che quelle che rimuovono i gruppi chimici. Gli enzimi che mediano l'aggiunta di gruppi chimici agli istoni, i 'writers', o 'scrittori', sono ad esempio le acetil-transferasi (HAT), le metil-transferasi (HMT), le chinasi, etc. Gli enzimi che rimuovono queste modifiche, gli 'erasers', o 'cancellatori', sono rappresentati dalle deacetilasi (HDAC), le fosfatasi edemetilasi (es. LSD1 e JHDM1) etc. [11]. Inoltre sono stati identificati enzimi con domini proteici in grado di riconoscere modificazioni specifiche degli istoni, i 'readers' o 'lettori', che sembrano avere una maggiore flessibilità di legame rispetto agli enzimi writers ed erasers.

Sulla base della sequenza amminoacidica, le proteine istoniche risultano altamente conservate dai lieviti all'uomo, confermando l'idea generale che queste proteine, ed in particolare i loro domini di coda, ricoprono probabilmente funzioni critiche. Le code, in particolare, degli istoni H3 e H4 contengono indicazioni importanti per la disposizione dei nucleosomi e di conseguenza della cromatina, infatti i loro residui amminoacidici sono soggetti ad ampie modificazioni post-traduzionali, così come lo sono anche alcuni dei residui nei domini globulari centrali più strutturati. In generale, i segnali attivi comprendono l'acetilazione o la metilazione dell'arginina, alcune metilazioni della lisina, come ad esempio H3K4 e H3K36, mentre H3K79, che si trova in un dominio globulare non di coda, ha una funzione di de-silenziamento. I segnali repressivi comprendono invece la metilazione di H3K9, H3K27, e H4K20. Oltre a queste, la lista delle modificazioni post-traduzionali è in crescita, soprattutto negli ultimi anni, grazie ai notevoli progressi in termini di disponibilità di reagenti anticorpali e di tecnologie quali array di peptidi o proteine e spettrometria di massa basata sulla proteomica [14].

I meccanismi molecolari alla base dell'utilizzo di ogni singola modificazione istonica possono essere raggruppati in due principali categorie, meccanismi '*cis*' e meccanismi '*trans*'. I meccanismi *cis* consistono in cambiamenti delle proprietà fisiche delle code istoniche modificate, come la modulazione della carica elettrostatica nella struttura della coda, che a sua volta, altera i contatti inter-nucleosomici e la spaziatura. Un esempio ben noto, è l'acetilazione, che neutralizza le cariche positive delle code istoniche altamente basiche, generando un'espansione localizzata della fibra cromatinica, e consentendo così un accesso migliore della macchina trascrizionale al DNA a doppia elica [15]. La fosforilazione, invece, con l'aggiunta di una carica netta negativa, è in grado di generare "gruppi di carica" [16], e si pensa che questo alteri l'avvolgimento dei nucleosomi o esponga la parte ammino-terminale degli istoni alterando lo stato di ripiegamento di ordine

superiore del polimero cromatinico [17, 18]. In modo analogo, gli istoni linker (cioè la famiglia H1) che vengono incorporati in corrispondenza dell'asse della diade dei nucleosomi (dove il DNA entra ed esce dal nucleosoma) si pensa promuovano l'avvolgimento in fibre di ordine superiore schermando la carica negativa del DNA linker tra nucleosomi adiacenti [19, 20]. Le modificazioni degli istoni possono anche comportare "effetti *trans*" sulla cromatina, ossia reclutando partner proteici non-istonici, i così detti 'readers', che "leggono" e si legano alle modificazioni traducendole nelle corrispondenti conseguenze funzionali. Esempi importanti sono la metilazione di H3K4, H3K9 e H3K27, riconosciute rispettivamente dalla proteina inibitrice della crescita (ING), la proteina eterocromatica 1 (HP1) e le proteine Polycomb. Alcuni motivi di legame (bromodomini, cromodomini, e domini Tudor) hanno una particolare affinità per una certa modificazione istonica e, di conseguenza, si legano a specifiche code istoniche modificate. Se si considerano i complessi enzimatici più grandi, questi motivi di legame spesso costituiscono una sorta di "velcro" per la cromatina, collegando l'intero complesso al polimero cromatinico con le successive conseguenze [21]. Per esempio, il bromodominio è un motivo che riconosce residui istonici acetilati, e spesso, ma non sempre, è parte dell'enzima acetil-transferasi (HAT) come porzione di un complesso più grande che rimodella la cromatina. L'acetilazione della lisina che modifica le proprietà elettrostatiche dell'istone neutralizzandone la carica, attualmente, è stata riscontrata su H3 (K4, K9, K14, K18, K23, K27, K36 e K56), H4 (K5, K8, K12, K16, K20 e K91), H2A (K5 e K9) e H2B (K5, K12, K15, K16, K20 e K120). In generale, questa modifica post-traduzionale porta ad una struttura della cromatina più aperta, in quanto indebolisce l'interazione con il DNA carico negativamente ed è in gran parte associata ad uno stato trascrizionalmente attivo. Il riconoscimento simultaneo di sequenze acetilate multiple, da parte di bromodomini singoli o legati covalentemente, può migliorare significativamente la capacità di legame. Allo stesso modo, i residui di lisina metilati nelle code degli istoni possono essere letti da "gabbie aromatiche" presenti nei cromodomini, o domini simili (ad esempio, MBT, Tudor) contenuti all'interno di complessi che facilitano eventi di modulazione della cromatina a valle [22]. A differenza di altre modifiche, la metilazione non cambia la carica complessiva, ma altera l'idrofobicità e le dimensioni del residuo modificato. La lisina viene metilata sul suo gruppo amminico ϵ e può essere mono-, di- e tri-metilata. I siti canonici di metilazione sono composti da sei residui di lisina dell'istone H3 (K4, K9, K26, K27, K36 e K79), K20 dell'istone H4 e K26 dell'istone H1. Con l'eccezione di H3K79, sono tutti situati nelle code N-terminali delle proteine istoniche. Fino ad oggi, i domini reader di metil-lisina sono il gruppo più caratterizzato e comprendono ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L), anchirina, omologia bromo-adiacente (BAH), cromo-barile, chromodominio, doppio chromodominio (DCD), MBT (tumore maligno del cervello), PHD (omeodominio delle piante), PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro),

dominio Tudor etc. Il riconoscimento dei motivi metilati di H3K9 e H3K27 è in gran parte associato alla formazione di eterocromatina costitutiva o facoltativa e silenziamento genico. H3K27me1 e H3K9me3 si trovano nelle regioni di eterocromatina pericentromeriche [23], mentre H3K27me3 e H3K9me2 co-localizzano nelle regioni di eucromatina repressa. I motivi K27me e K9me sono entrambi target delle proteine contenenti i cromodomini. Il primo recluta le proteine Polycomb e il loro complesso ospite PRC1 per reprimere la cromatina [24], mentre il secondo recluta le proteine HP1 coinvolte nella formazione e propagazione dell'eterocromatina [25].

1.1.2.3. Il rimodellamento dei nucleosomi

Un altro meccanismo importante nelle transizioni cromatiniche riguarda il reclutamento di complessi di rimodellamento che utilizzano energia (l'idrolisi dell' ATP) per cambiare la composizione dei nucleosomi in maniera non covalente. Le modificazioni istoniche sia della coda che delle regioni centrali globulari possono reclutare complessi di rimodellamento ATP-dipendenti per trasformare la cromatina da uno stato repressivo ad uno attivo e viceversa. Questo può essere realizzato attraverso (1) la mobilitazione dei nucleosomi, con lo slittamento dell'ottamero, (2) l'alterazione della struttura nucleosomica con il DNA loop, e (3) la sostituzione di istoni core con specifiche varianti istoniche. I rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti (come SWI / SNF, un esempio storicamente importante) idrolizzano l'energia per indurre cambiamenti significativi nei contatti istone-DNA e conseguente loop, torsione, e scorrimento dei nucleosomi. Alcune delle attività ATP-dipendenti assomigliano a quelle dei "complessi di scambio" deputati alla sostituzione degli istoni convenzionali con istoni specializzati definiti "varianti istoniche". Questo cambiamento che costa ATP può quindi essere un mezzo attraverso il quale gli istoni modificati esistenti vengono sostituiti con un "colpo di spugna" da varianti istoniche specializzate [26]. In alternativa, il reclutamento dei complessi di rimodellamento della cromatina, può essere amplificato da preesistenti modificazioni istoniche che garantiscono così la competenza trascrizionale dei promotori in questione [27].

Oltre a regolare l'inizio della trascrizione tramite l'attivazione o la repressione, i rimodellatori della cromatina interessano anche il processo di elongazione del trascritto. L'RNA polimerasi II deve affrontare i nucleosomi lungo tutto il corpo del gene e per facilitare il suo lavoro sono presenti un certo numero di fattori di elongazione, chaperone degli istoni, modificazioni istoniche, e rimodellatori della cromatina. In generale, gli istoni vengono acetilati e metilati durante l'elongazione, e tutto o parte dell'ottamero istonico avvolge e accompagna la polimerasi per essere poi ricomposto e deacetilato una volta passata. I rimodellatori quindi potrebbero giocare un ruolo

nello smontare i nucleosomi davanti alla polimerasi e nel rimontarli e distanziarli nella sua scia [28].

1.1.2.4. Strutture cromatiniche di ordine superiore

La struttura del polimero di cromatina di 11 nm, visualizzata al microscopio, è come una "collana di perle", ha una configurazione in gran parte aperta in cui il DNA viene periodicamente avvolto attorno alle unità nucleosomiche ripetute. La fibra di cromatina, tuttavia, non è sempre costituita da ordinati apparati nucleosomici spazati regolarmente. I nucleosomi possono essere avvolti irregolarmente e ripiegarsi in strutture di ordine superiore che solo recentemente stanno iniziando ad essere osservate con una risoluzione atomica [29]. Lungo tutto il genoma, si trovano conformazioni cromatiniche di ordine superiore differenti, inoltre cambiano leggermente durante la scelta del destino cellulare e in maniera sostanziale durante le fasi del ciclo cellulare (ad esempio cromatina in interfase vs. cromatina mitotica). L'organizzazione in domini cromatinici di loop più grandi (300-700 nm) si verifica, probabilmente, attraverso l'ancoraggio della fibra di cromatina alla periferia nucleare o ad altre impalcature nucleari tramite proteine associate, come ad esempio le lamine nucleari [30]. Il motivo per il quale queste associazioni danno luogo a "territori cromosomici" funzionali rimane poco chiara, ma una letteratura emergente sta cominciando a fornire prove convincenti sul posizionamento non casuale all'interno dei nuclei [31].

Centromeri e telomeri presentano firme molecolari che comprendono, ad esempio, la scarsa acetilazione degli istoni. I centromeri sono anche contraddistinti dalla presenza delle varianti istoniche CENP-A, che svolgono un ruolo attivo nella segregazione dei cromosomi. Il corretto assemblaggio e il mantenimento di zone eterocromatiniche distinte, centromeriche e pericentriche, è fondamentale per il completamento di mitosi e meiosi, e dunque per la sopravvivenza cellulare.

Risulta quindi necessario riuscire a comprendere la regolazione epigenetica di queste porzioni cromosomiche uniche, come evidenziato dai numerosi tumori umani caratterizzati da instabilità genomica, un chiaro segnale di progressione neoplastica.

1.1.2.5. La metilazione del DNA

Nei mammiferi e in altri vertebrati, la metilazione del DNA avviene in corrispondenza della posizione C5 della citosina, con la produzione di 5-metil-citosina (5MC), principalmente all'interno dei dinucleotidi CpG. Questa metilazione, insieme alle modificazioni degli istoni, gioca un ruolo importante nel modulare la struttura della cromatina, controllando l'espressione genica e molti altri

processi cromatina-dipendenti [32]. Gli effetti epigenetici che ne derivano servono a mantenere i vari pattern di espressione genica nei diversi tipi di cellule [33].

Il pattern di metilazione corretto è essenziale per lo sviluppo e per il differenziamento dei fenotipi cellulari, infatti la metilazione aberrante del DNA rappresenta una spinta importante nell'insorgenza e nella progressione di numerose malattie, in particolare il cancro [34-36]. La metilazione del DNA in citosina viene introdotta durante lo sviluppo precoce dei mammiferi e nella maturazione delle cellule germinali da parte di due DNA-metiltransferasi, Dnmt3a e Dnmt3b, con l'aiuto di Dnmt3L. Dnmt3a e Dnmt3b sono classicamente conosciute come metiltransferasi *de novo* e non mostrano alcuna preferenza significativa tra substrati di DNA emi-metilato e non metilato [37]. Sono altamente espresse nelle cellule indifferenziate e nei precursori delle cellule germinali, mentre sono presenti a livelli molto più bassi nelle cellule somatiche. Nel nucleo delle cellule, le Dnmt3 si localizzano a livello dell'eterocromatina pericentromerica [38], dove sono strettamente legate ai nucleosomi contenenti DNA metilato [39, 40]. Dopo la definizione, i pattern di metilazione vengono conservati per il resto della vita di un organismo, con piccoli cambiamenti tessuto-specifici. Durante la replicazione del DNA, i siti CpG completamente metilati vengono convertiti in siti emi-metilati, per poi essere ri-metilati dalla cosiddetta metiltransferasi di mantenimento, Dnmt1. Questo enzima è presente alle forche replicative e metila preferenzialmente i siti CpG emi-metilati, copiando così il pattern di metilazione dal filamento di DNA parentale su quello figlio di nuova sintesi [41]. La Dnmt1 è espressa ubiquitariamente, ha un'espressione elevata nelle cellule proliferanti, ed è la principale responsabile dell'attività DNA-metiltransferasica dei tessuti somatici durante tutto lo sviluppo dei mammiferi, mentre è presente solo a bassi livelli nelle cellule che non dividono[42]. La localizzazione sub-nucleare della Dnmt1, cambia dinamicamente durante il ciclo cellulare, ha una distribuzione diffusa nel nucleo durante l'interfase, mentre in fase S si localizza ai foci replicativi, creando un caratteristico pattern puntinato [43]. Tuttavia, la convinzione recente è che questa classificazione in 'de novo' e 'di mantenimento' rappresenta una semplificazione eccessiva e che è meglio descrivere la metilazione del DNA come un processo dinamico di continua metilazione e demetilazione, in cui la Dnmt1 e gli enzimi Dnmt3 regolano insieme entrambi i tipi di metilazione[44, 45]. Questo cambiamento concettuale nella percezione della metilazione del DNA come un processo dinamico ha importanti implicazioni, infatti, diventano la regolazione ed il targeting a controllare lo stato di metilazione di ciascun sito CpG, e non semplicemente il processo di copia specifico della Dnmt1 dopo la replicazione del DNA. Tuttavia, la preferenza della Dnmt1 per la metilazione dei siti CpG emi-metilati rimane un fattore importante nel controllo dei pattern di metilazione del DNA. Di conseguenza, il complesso ruolo della metilazione, nella biologia umana, dipende in modo critico dalla regolazione dinamica e dal targeting delle Dnmts attraverso le

modifiche post-traduzionali, l' interazione con altri fattori cromatinici (ad esempio gli istoni), o altre proteine e acidi nucleici.

L'architettura generale delle tre le Dnmts di mammifero è simile, sono proteine multi-dominio, in cui si distinguono due parti funzionali: una grande porzione N-terminale regolatoria e una porzione più piccola, C-terminale, che ospita il sito catalitico (Figura 1) [46]. I domini C-terminali delle

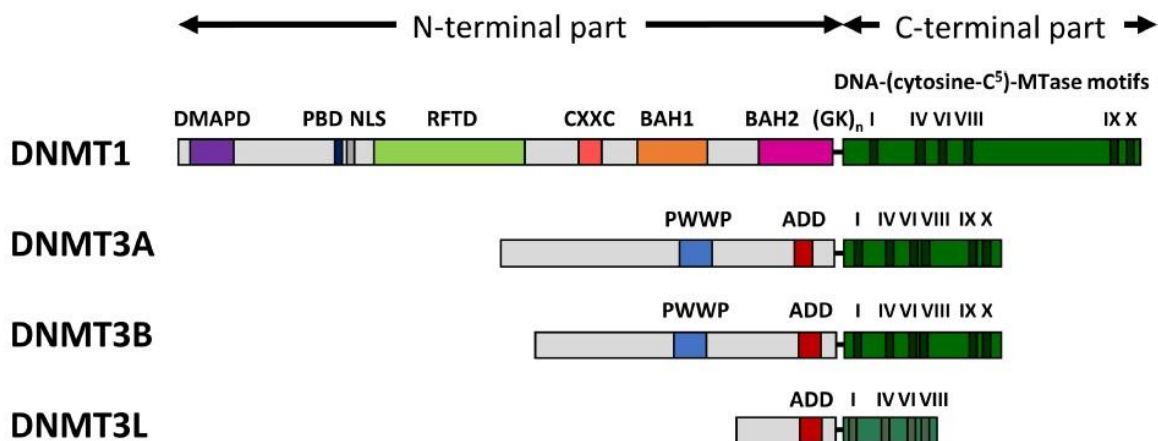


Figura 1. Struttura dei domini degli enzimi Dnmts di mammifero. La Dnmt1 umana e le metil-transferasi di tipo 3 Dnmt3a, Dnmt3b sono costituite da 1616, 912, 853 e 387 residui aminoacidici, rispettivamente. Abbreviazioni utilizzate: DMAPD – dominio di interazione con la proteina DNA-metiltransferasi-associata 1, PBD – dominio di legame con PCNA, NLS – segnale di localizzazione nucleare, RFTD – dominio di targeting ai foci replicativi, CXXC - dominio CXXC di legame al DNA, BAH1 e BAH2 - domini di omologia bromo-adiacente 1 e 2, GKN – segmento linker di glicina e lisina, PWWP - dominio PWWP di legame istonico, ADD - dominio ATRX-DNMT3-DNMT3L. (Da Jeltsch, A. et al 2016)

Dnmts contengono 10 motivi amminoacidici conservati e caratteristici delle DNA (citosina-C5) metil-transferasi; si ripiegano in una struttura ampiamente conservata presente in tutti gli enzimi di questa classe, il cosiddetto 'dominio metil-transferasi AdoMet-dipendente', che consiste in un β -foglietto di 7 file, 6 parallele e la settima inserita con orientamento anti-parallelo tra la quinta e la sesta e 6 alfa-eliche circondano il β -foglietto centrale su entrambi i lati. Il dominio C-terminale delle Dnmts è coinvolto nel legame con AdoMet, nel riconoscimento e successivo legame del DNA, nel flipping della base e nella catalisi, inoltre contiene una regione non conservata, il dominio cosiddetto di riconoscimento del target (TRD) che è coinvolto nel riconoscimento specifico del DNA. Il meccanismo catalitico è stato chiarito più di 20 anni fa, utilizzando la DNA-metil-transferasi procariotica come sistema modello [47]. Il trasferimento del gruppo metile dall'AdoMet alla posizione C5 dei residui di citosina è reso possibile dalla rotazione della base target al di fuori della doppia elica del DNA e la sua incorporazione in una tasca idrofobica nel sito attivo dell'enzima accanto all'AdoMet, in un meccanismo chiamato 'flipping della base'. Il flipping della

base è comune a tutte le DNA-metiltransferasi ed è stato recentemente osservato nella struttura cristallografica della Dnmt1, la prima Dnmt di mammifero co-cristallizzato con il DNA substrato [48]. La metilazione della posizione C5 della citosina consiste in un meccanismo di reazione a due fasi. Innanzitutto, un residuo cisteinico catalitico, attacca la posizione C6 dell'anello citosinico, formando un legame covalente tra l'enzima e la base substrato. Questo processo porta all'attivazione della posizione C5 e al trasferimento del gruppo metilico. L'aggiunta del gruppo metilico alla base è seguita da una deprotonazione dell'atomo C5 che a sua volta risolve il legame covalente tra l'enzima e la base in una reazione di eliminazione [47]. Le porzioni N-terminali delle Dnmts sono diverse tra la Dnmt1 e la famiglia Dnmt3; comprendono diversi domini con funzioni regolatorie che servono a guidare la localizzazione nucleare degli enzimi, a mediare l'interazione con altre proteine, con acidi nucleici regolatori (come i ncRNA) e con la cromatina; e sono soggetti a modifiche post-traduzionali. Inoltre, di recente, dati biochimici e strutturali hanno dimostrato che la disposizione di questi domini gioca un ruolo centrale nella regolazione delle funzioni biologiche delle Dnmts, perché sono coinvolti nella regolazione allosterica dell'attività enzimatica, nella specificità d'azione e nella localizzazione.

1.1.2.5.1. Dnmt1: struttura, meccanismo e regolazione

Dnmt1 è un enzima di grandi dimensioni ed è presente in diverse isoforme generate da splicing alternativo e dall'utilizzo di un promotore secondario [49]. La parte N-terminale della Dnmt1 contiene diversi domini funzionali ed è unita alla porzione C-terminale da un linker flessibile composto da ripetizioni di lisina-glicina (KG) (Figura 1). L'N-terminale funge da piattaforma per l'assemblaggio di varie proteine coinvolte nel controllo della replicazione e della riparazione del DNA, nella struttura della cromatina e nella regolazione genica. Si compone di diversi domini in ordine dall'N- al C-terminale. Il DMAP1 (DNA metiltransferasi proteina associata 1) è un dominio di interazione con il repressore trascrizionale DMAP1. Attraverso questa interazione, Dnmt1 porta DMAP1 sui foci replicativi durante tutta la fase S [50]. DMAP1 influenza il mantenimento della metilazione da parte di Dnmt1 nelle fasi precoci dello sviluppo e condiziona la stabilità dell'enzima stesso nelle cellule [51, 52]. Il dominio PBD di legame con PCNA (antigene nucleare della proliferazione cellulare) è coinvolto nel targeting e nel legame della Dnmt1 alla forca replicativa durante la fase S [53]. Il dominio RFTD è coinvolto nel reclutamento della Dnmt1 sui foci replicativi e sulla cromatina centromerica [43, 54]; interagisce con la proteina UHRF1 (ubiquitina-simile, contenente domini PHD e RING finger 1) che si lega al DNA emi-metilato, a modifiche cromatiniche e contiene anche un dominio di ligasi RING E3 [55, 56]. Dopo il dominio RFTD si

trova il dominio CXXC, che lega il DNA non metilato ed è costituito da uno zinc-finger contenente otto residui di cisteina e due ioni di zinco [57]. Infine, il BAH1 e BAH2 (bromo-adiacente omologia 1 e 2) sono domini necessari al ripiegamento della Dnmt1. Negli ultimi anni, diversi studi cristallografici, hanno dimostrato che i vari domini della porzione N-terminale della Dnmt1

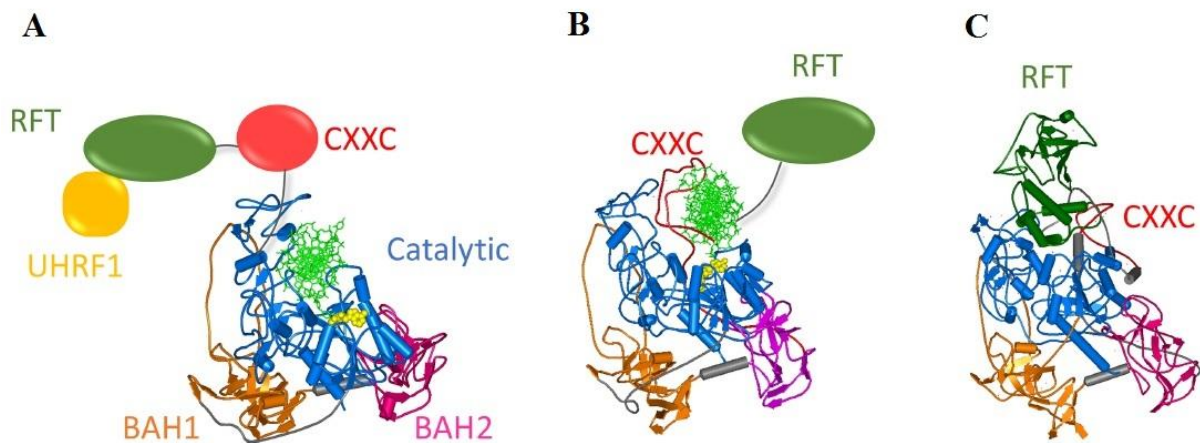


Figura 2. Strutture della Dnmt1 con i diversi domini N-terminali. Le regioni RFT, CXXC, BAH1, BAH2 e i domini catalitici sono mostrati in verde scuro, rosso, arancione, viola e blu, rispettivamente. (A) Dnmt1 in una conformazione attiva con il DNA (verde chiaro) legato nel sito attivo. La rimozione della porzione autoinibitoria RFTD può essere promossa da UHRF1. (B) Dnmt1 legata al DNA non metilato attraverso il dominio autoinibitorio CXXC. (C) Dnmt1 con il dominio RFT che blocca l'accesso al sito attivo. (Da Jeltsch, A. et al 2016)

circondano e prendono contatto con la porzione C-terminale del dominio catalitico, indicando quindi che il corretto ripiegamento del dominio catalitico richiede l'intervento del dominio N-terminale [48, 57-59]. Le strutture cristallografiche hanno anche rivelato che l'enzima subisce grandi riarrangiamenti di dominio, che a loro volta regolano allostericamente la sua attività catalitica (Figura 2). [55, 56]. In presenza di DNA non metilato, il dominio CXXC lega il DNA sul solco maggiore, con la proteina situata perpendicolarmente all'asse del DNA, questo permette al segmento loop di formare dei contatti specifici con ogni base e le interazioni fosfodiesteriche contribuiscono al riconoscimento del sito CpG non metilato. Questa osservazione propone quindi una funzione auto-inibitoria per il dominio CXXC della Dnmt1 che agirebbe come filtro di specificità impedendo al DNA non metilato di accedere al sito attivo (Figura 2B) [57]. In assenza di DNA substrato, la struttura cristallografica, ha rivelato come il dominio RFTD rimane inserito in profondità all'interno della tasca di legame del DNA nel sito catalitico, esercitando così una funzione inibitoria sull'enzima (Figura 2C) [60]. Studi *in vitro* hanno dimostrato che la Dnmt1 è un enzima altamente processivo, in grado di metilare lunghi tratti di DNA emi-metilato senza dissociarsi dal substrato [61]. Durante la metilazione processiva, i gruppi metilici vengono aggiunti su un solo filamento di DNA, quindi l'enzima non scambia i filamenti mentre si muove lungo il suo

substrato [62]. Grazie alla sua elevata processività, la Dnmt1 è un enzima molto efficace, ideale per seguire la replicazione del DNA e metilare il filamento di nuova sintesi prima che la cromatina venga riasssemblata. La struttura della Dnmt1 con il DNA substrato legato dimostra che l'enzima avvolge il DNA, consentendo lo scorrimento lungo il substrato mentre catalizza le reazioni di metilazione senza dissociarsi. Dunque la capacità di assumere una forma aperta o chiusa è responsabile non solo dell'attività dell'enzima ma anche della sua processività. Inoltre, le modifiche post-traduzionali alle quali è sottoposta la Dnmt1, tra cui la fosforilazione, l'acetilazione e l'ubiquitinazione, possono controllare direttamente il posizionamento dei suoi domini così come l'interazione con diversi partner specifici. Il reclutamento della Dnmt1 ai foci replicativi durante la fase S è mediato dal dominio di legame con PCNA [53], dal dominio RFTD [54] e dai domini BAH (Figura 3). Attraverso il dominio PBD, la Dnmt1 interagisce direttamente con PCNA, il fattore di processività del meccanismo di replicazione del DNA [43].

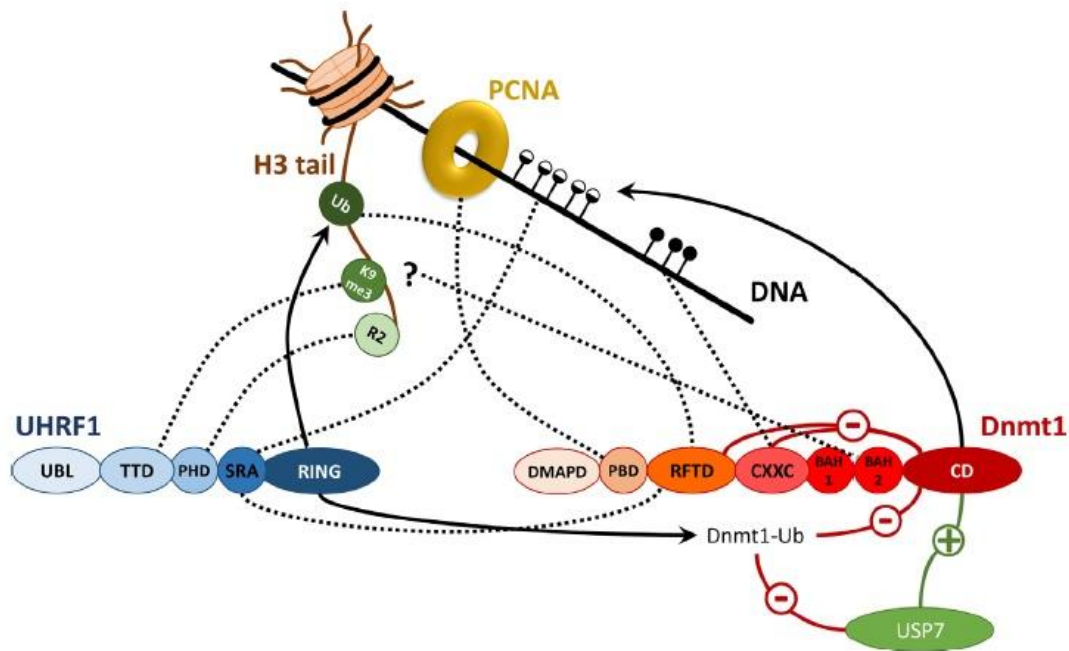


Figura 3. Meccanismi di regolazione che controllano l'attività, il targeting e la stabilità della Dnmt1. La figura illustra la complessa interazione tra Dnmt1, UHRF1, USP7, PCNA e cromatina. Le attività enzimatiche sono indicate dalle frecce. Le interazioni reader sono simboleggiate da linee tratteggiate. Per i dettagli vedi il testo. (Da Jeltsch, A. et al 2016)

Durante la progressione della fase S, il pattern di localizzazione sub-nucleare della Dnmt1 cambia, da abbondanti piccole punteggiature nelle fase S precoce, a poche grandi strutture toroidali in fase S avanzata, che co-localizzano con il DNA satellite eterocromatinico a replica tardiva [43, 54, 63]. Una parte degli enzimi Dnmt1 rimane associata ai centromeri eterocromatinici nelle fasi S tardiva e G2, e anche dopo la replica dell'eterocromatina. L'interazione Dnmt1-eterocromatina è mediata dal

dominio PBD, ma in maniera indipendente dalla replicazione [43], e almeno in parte, anche dal legame con UHRF1.

UHRF1 si lega specificamente al DNA emi-metilato tramite i domini SET e RING (SRA), e co-localizza con PCNA e la Dnmt1 a livello delle regioni di replicazione eterocromatiniche a metà della fase S [55]. Inoltre è stato visto che i domini TTD e PHD di UHRF1 contribuiscono ulteriormente al mantenimento della metilazione del DNA. Il dominio TTD lega H3K9me3 e K4 non metilata, una modifica caratteristica dell'eterocromatina, mentre il dominio PHD lega H3R2 [64]. UHRF1 ha anche la capacità di stimolare direttamente l'attività catalitica della Dnmt1, interagendo con il dominio RFTD, per sottrarlo al legame auto-inibitorio nel sito catalitico. Inoltre, il dominio RING di UHRF1 è stato dimostrato ubiquitinare H3K18 e K23. H3 ubiquitinato viene legato dalla Dnmt1, inducendone l'attività metiltransferasica [65]. Infine, UHRF1 è coinvolto nell'ubiquitinazione della Dnmt1 stessa riducendone l'attività. Diversi studi hanno dimostrato che la proteasi 7 ubiquitina-specifica (USP7), nota anche come proteasi ubiquitina-specifica Herpes virus-associata (HAUSP), si lega alla Dnmt1 e ne aumenta la stabilità deubiquitinandola (Figura 3) [66]. La Dnmt1 è in grado di legarsi anche a diversi RNA non codificanti. Studi iniziali rivelarono che l'enzima purificato da cellule di insetto conteneva RNA inibitorio [67]. In seguito, si è scoperto che l'RNA legato regola l'attività della Dnmt1 in maniera locus-specifica [68]. Un lncRNA proveniente dal locus CEBPA è stato dimostrato inibire la Dnmt1, impedendo la metilazione del locus stesso. Effetti simili sono stati osservati per diversi altri loci a livello genomico [68]. Sulla base di questi risultati, gli autori hanno proposto un modello, in cui i ncRNAs trascritti in un locus si comportano da scudo per la metilazione. In tal modo, l'espressione del locus verrebbe amplificata, causando un ciclo di feedback positivo che mantiene il locus non-metilato e trascrizionalmente attivo. Recentemente, si è visto che anche i microRNA (miRNA), come miR-155-5p, presentano funzioni inibitorie sulla Dnmt1 [69]. Il sito di legame degli RNA è stato mappato all'interno del dominio catalitico della Dnmt1, e i miRNA agiscono come inibitori competitivi diretti con il DNA substrato, per l'accesso al sito catalitico [68, 69]. Per quanto riguarda le modificazioni post-traduzionali, attualmente sono più di 100 quelle mappate sull'enzima umano e murino, ma solo poche sono state studiate dal punto di vista funzionale. La fosforilazione della S146 dell'enzima umano, da parte della caseina chinasi 1 Delta / Epsilon (CK1 δ/ϵ), ne riduce l'affinità di legame al DNA [70], mentre la fosforilazione di S127 e S143 regola l'interazione della Dnmt1 con PCNA e UHRF1 [71]. L'S143 della DNMT1 viene fosforilata da AKT1, che ne induce la stabilizzazione [72]. Di recente è stata identificata una proteina 14-3-3 specifica in grado di leggere questa modifica e inibire l'attività di Dnmt1 in vitro, provocando una ipometilazione del DNA [73]. Anche la proteina chinasi C (PKC) fosforila la Dnmt1, ma i siti bersaglio non sono stati ancora identificati

[74]. Inoltre, un meccanismo elegante regola la quantità di DNMT1 durante il ciclo cellulare: inizia con l'acetilazione dei residui di lisina nel segmento linker KG, catalizzata dall'acetiltransferasi Tip60; l'acetilazione porta all'ubiquitinazione UHRF1-mediata della Dnmt1, con conseguente degradazione via proteasoma alla fine della replicazione del DNA. A sua volta HDAC1 aumenta la stabilità della Dnmt1 [75, 76]. Questo effetto è mediato dalla deacetilazione del linker KG, seguita dal legame della deubiquitinasi USP7 alla Dnmt1, che impedisce la sua ubiquitinazione [77]. Inoltre, SIRT1 deacetila la Dnmt1 in diversi siti e in tal modo ne regola l'attività e la funzione [78]. Il primo esempio descritto di metilazione in lisina della Dnmt1 è la mono-metilazione di K142 da parte di SET7/9, che si verifica principalmente durante la tarda fase S e promuove la degradazione via proteasoma della metiltransferasi in maniera ciclo-dipendente [79]. Il livello di metilazione è superiore in assenza della LSD1 demetilasi, suggerendo che la metilazione della Dnmt1 è reversibile [80]. Inoltre, poiché K142 si trova proprio accanto alla S143, la sua metilazione è antagonista rispetto alla fosforilazione di S143 mediata da AKT. Questo fosfo-metil interruttore è l'ennesimo esempio di quali meccanismi complessi si sono evoluti per ottimizzare la funzione della Dnmt1.

1.1.2.5.2. Dnmt3: la metilazione *de novo*

La metilazione del filamento di DNA non metilato avviene in momenti specifici dello sviluppo dei mammiferi, come durante lo stadio di blastocisti embrionale, e in sedi specifiche del genoma, ricoprendo funzioni in processi importanti come l'inattivazione del cromosoma X o l'imprinting genico. Sempre più evidenze dimostrano che l'attività di metilazione *de novo* è presente, seppure in misura ridotta, anche nelle cellule somatiche di diversi tessuti durante tutto l'arco della vita di un individuo. La metilazione *de novo* è resa possibile dalla famiglia di metil-transferasi 3, che comprende la Dnmt3a, Dnmt3b e Dnmt3l, accomunate da una notevole identità di sequenza (Figura1). Come la Dnmt1, Dnmt3a e Dnmt3b contengono il sito catalitico nel dominio C-terminale, mentre i siti regolatori risiedono nella porzione N-terminale. La parte N-terminale comprende il dominio ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L), responsabile del legame con le code di H3 non metilate su K4, e dell'interazione con altre proteine dei complessi cromatinici, oltre ad un diretto ruolo regolatorio sull'attività catalitica dell'enzima [81, 82]. Il dominio PWWP, assente nella Dnmt3l, consente l'attacco a H3K36me3, e risulta fondamentale per il targeting dell'enzima alle regioni pericentromeriche, così come lungo i corpi genici [38, 83]. La porzione meno conservata tra Dnmt3a e Dnmt3b all'N-terminale del dominio PWWP, consiste probabilmente in una sequenza di targeting su loci genici diversi, infatti lega il DNA e consente un importante

ancoraggio dell'enzima ai nucleosomi. Il dominio catalitico C-terminale è molto simile tra le Dnmt3a e 3b (81% di omologia), mentre quello di Dnmt3l riporta sostituzioni amminoacidiche e delezioni che lo rendono non funzionante. Per svolgere la funzione metiltransferasica le Dnmt3 formano dei complessi multimerici, infatti la creazione di interfacce specifiche fra le subunità è essenziale per la specificità di legame al DNA substrato, così come per l'alloggio dell'AdoMet e per l'attività catalitica stessa [84]. È interessante notare, inoltre, che due complessi adiacenti di Dnmt3 sul DNA, possono contattare i residui di citosina sia del filamento superiore che di quello inferiore dello stesso sito CpG, fornendo all'enzima la capacità di metilare entrambi i filamenti [85]. Diverse sono le proteine coinvolte nella biologia della cromatina che interagiscono con i domini ADD e PWWP, come le metil-transferasi (SUV39H1, SETDB1, EZH2) le HDAC, le proteine readers (HP-1, Mbd3, MeCP2), i rimodellatori della cromatina (HNF2 e SMARCA4) e i fattori trascrizionali (Myc, PU.1) [46].

1.1.2.5.3. Isole CpG e pattern di metilazione genomici

Il DNA di tutto il genoma dei tessuti somatici di mammifero viene metilato al 70% -80% dei siti CpG. Grazie ai continui progressi nella tecnologia il livello di dettaglio con cui si può misurare la metilazione del DNA è arrivato ad una risoluzione di singolo sito CpG in qualsiasi tipo cellulare. Gli studi di mappatura indicano che le sequenze altamente metilate coinvolgono il DNA satellite, gli elementi ripetitivi (compresi trasposoni e i loro residui inerti, sequenze LINE, SINE, ALU), DNA intergenico non ripetitivo, e esoni genici. La maggior parte delle sequenze sono metilate in base alla frequenza di dinucleotidi CpG, ma le principali eccezioni a questa metilazione globale del genoma dei mammiferi sono le isole CpG (CGI). Le CGI sono sequenze ricche di GC della lunghezza di circa 1 kb e risultano non metilate nelle cellule germinali, negli stadi precoci dell'embrione, e nella maggior parte dei tessuti somatici (Figura 4) [86]. È ormai evidente che la maggior parte, se non tutte, le CGI si trovano a livello dei promotori e delle regioni 5' dei geni, infatti, circa il 60% dei geni umani presenta promotori con CGI. I Geni con promotori CGI vengono espressi in maniera tessuto-specifica durante l'embriogenesi iniziale e nelle cellule somatiche, fatta eccezione per i geni silenziati a lungo termine, come quelli sul cromosoma X femminile, o alcuni geni soggetti ad imprinting dove le CGI vengono metilate *de novo*. Sono stati poi classificati ulteriori tipi di CGI, e cioè le CGI che contengono siti d'inizio della trascrizione e CGI orfane, situate nelle sequenze introniche e inter-geniche. Infine, sono note anche regioni differenzialmente metilate, a distanza di ~ 2 kb da una CGI, chiamate 'shores' e a distanza di 2-4 kb definite 'shelves' [87].

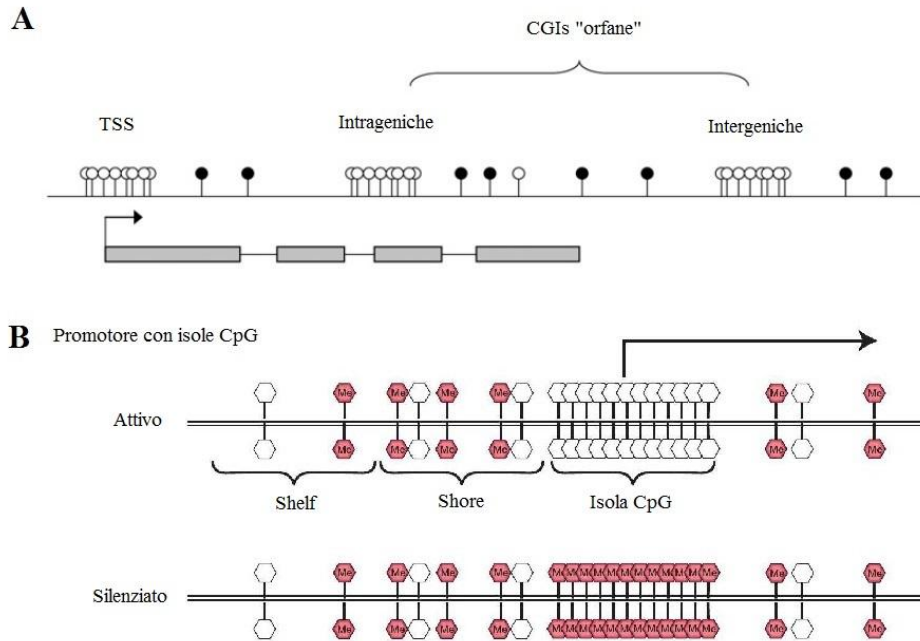


Figura 4. Le isole CpG, CGIs. (A) Le CGIs possono essere situate a livello dei promotori dei geni tessuto specifici (TSS), all'interno dei corpi genici (intrageniche), o tra i geni (intergeniche). Le CGIs che non sono intrageniche o intergeniche rivestono una funzione sconosciuta e sono classificate come "CGI orfane". I cerchi vuoti simboleggiano i residui CpG non metilati; I cerchi pieni sono i residui CpG metilati. (B) Le CGIs sono regioni ad alta densità di CpG (> 50%), di solito di 200 bp - 2 kb di lunghezza, generalmente non metilate, e si trovano a livello dei promotori della maggior parte dei geni umani. La metilazione delle CGIs induce il silenziamento a lungo termine del gene. La distanza dalle CGIs definisce regioni contenenti CpG metilate e non: "shores" a 2 kb e "shelf" a 2-4 kb dalle CGIs. (Riadattata da Deaton, M. A. and Bird, A., 2011 e Allis C. D. et al, Epigenetics 2nd edition, 2015)

1.1.2.5.4. La demetilazione del DNA

I biologi dello sviluppo hanno descritto come nella linea germinale e durante l'embriogenesi precoce, si verificassero ondate di demetilazione a livello del DNA, tuttavia, il processo attraverso il quale la metilazione viene cancellata rimane ancora poco chiaro. Scoperte recenti hanno però permesso di migliorare la comprensione di questo fenomeno. Durante le fasi precoci dello sviluppo, il genoma di mammifero, viene riprogrammato attraverso processi demetilazione del DNA sia di tipo attivo che passivo [88]. La demetilazione attiva si riferisce ad un processo enzimatico che comporta la rimozione del gruppo metilico dalla 5MC. Al contrario, la demetilazione passiva è dovuta ad una mancata metilazione di mantenimento durante i cicli di replicazione del DNA o per assenza della Dnmt1 o per la sua inibizione. La citosina metilata, 5MC, ha un'alta propensione a mutare spontaneamente, così, nel tempo, si verificano transizioni C-T attraverso la reazione di deaminazione. Tuttavia questa caratteristica può essere utile a proteggere il genoma da sequenze di

DNA ‘parassita’, come i trasposoni, in quanto viene disattivato permanentemente. Nel contesto dei linfociti B e T, la stessa reazione chimica viene catalizzata attivamente, mediante la deaminasi indotta da attivazione (AID), questa provoca la mutazione somatica dei loci di BCR e TCR; un meccanismo importante per ampliare il repertorio dei recettori per l'antigene e, di conseguenza, rafforzare l'immunità dei mammiferi [89]. L'espressione di AID, è stata osservata anche nei primi mesi dello sviluppo dei mammiferi, suggerendo un possibile percorso alternativo di demetilazione del DNA, anche se questo aumenta il rischio di mutazioni puntiformi. Il ciclo di metilazione del DNA prevede che le Dnmts convertano i nucleotidi di citosina in 5MC, che a sua volta può essere ossidata dall'enzima TET (ten eleven translocation) per produrre 5-idrossi-metil-citosina (5hmC), 5-formil-citosina (5FC), e 5-carbossil-citosina (5caC). L'azione combinata della glicosidasi timina-DNA (TDG) e i meccanismi di riparazione per escissione della base (BER) sui siti 5caC, riportano allo stato di citosina non modificata [88, 90].

1.1.2.6. La mappa dell'epigenoma

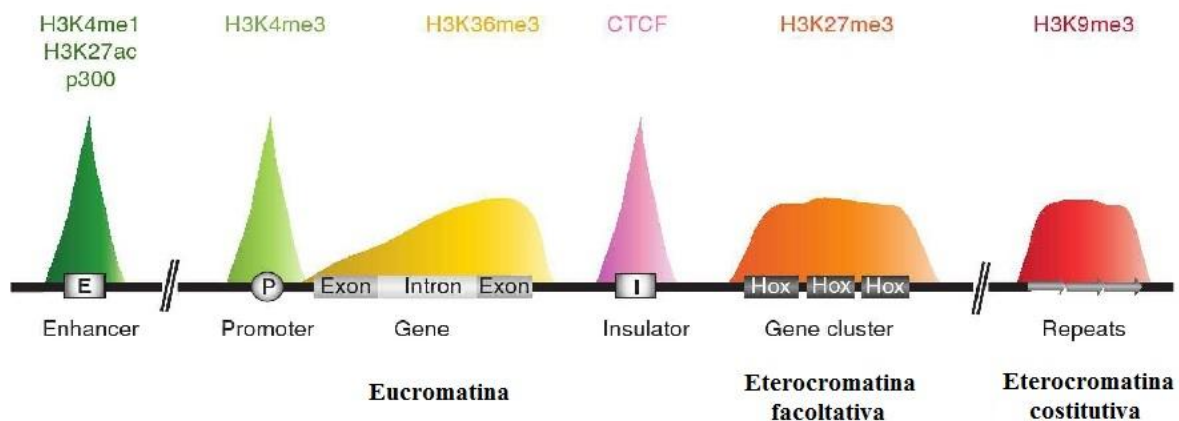


Figura 5. Modificazioni degli istoni che contraddistinguono elementi funzionali. La mappatura epigenomica è identificata da modifiche istoniche e fattori epigenetici che correlano con elementi genomici distinti: H3K4me1, H3K27ac, e p300 (HAT) presentano un picco sugli enhancers (E), mentre CTCF (un fattore zinc-finger) si accumula sugli insulators (I). I geni attivi, hanno H3K4me3 sul promotore (P) e H3K36me3 sul corpo genico. La cromatina repressa presenta H3K27me3 (eterocromatina facoltativa, ad esempio, sui geni Hox) e H3K9me3 (eterocromatina costitutiva, per esempio, sulle sequenze ripetute). (Modificata da Allis C. D. et al, Epigenetics 2nd edition, 2015).

La caratterizzazione dell'epigenoma deve considerare almeno 3 condizioni di input (1) le modifiche cromatiniche quali, il pattern di metilazione del DNA, le modificazioni degli istoni, le varianti istoniche, il posizionamento dei nucleosomi, l'occupazione da parte dei TF, e un high-coverage del trascrittoma sia per l'RNA codificante che per il ncRNA; (2) la definizione del tipo cellulare,

preferibilmente cellule primarie, per stabilire gli epigenomi di riferimento per tipo di cellula; e (3) un'attenta valutazione dello stato epigenetico specifico (cioè, confrontando l'epigenoma di cellule "geneticamente identiche" in condizioni distinte rispetto a segnali fisiologici o patologici). Così è stato fatto uno sforzo considerevole nello stabilire le linee guida e le raccomandazioni per standardizzare la mappatura di questi epigenomi di riferimento " nel tempo e nello spazio". Questo è stato in gran parte guidato dall'NIH, con il programma ENCODE, e dalla piattaforma European Blueprint, e si sta integrando nell' IHEC, un'alleanza mondiale che mette in collegamento le diverse attività nazionali. Grazie a queste iniziative sono stati descritti gli epigenomi di 60 tipi di cellule umane, con l'obiettivo di individuare 1000 epigenomi nel corso dei prossimi 5 anni. Gli sforzi di mappatura hanno identificato modifiche epigenomiche istruttive che correlano con elementi genomici distinti (Figura 5): H3K4me1, H3K27ac, e p300 (HAT) presenta un picco a livello degli enhancers, mentre CTCF (un fattore zinc-finger) si accumula negli insulators. Per i geni attivi, è presente un picco di H3K4me3 al promotore e un tracciato esteso di H3K36me3, che riflette la trascrizione da parte dell'RNA Pol II attraverso il corpo del gene. Le regioni di cromatina repressa presentano la signature H3K27me3 (eterocromatina facoltativa) e H3K9me3 (eterocromatina costitutiva) [91]. In linea di principio, la cromatina in forma attiva (H3K4me3 e acetilazione degli istoni) e repressa (ad esempio, H3K27me3) non dovrebbe coesistere nella stessa regione cromatinica localizzata. Tuttavia, è stata descritta una signature cromatinica altamente informativa, la " cromatina bivalente", che risulta arricchita sia di H3K4me3 che di H3K27me3. Tali domini di cromatina bivalente si trovano a livello dei promotori di geni regolati durante lo sviluppo, prevalentemente nelle cellule ES, ma anche in altri tipi cellulari [92-94]. Sebbene questa cromatina bivalente venga mantenuta in alcuni geni durante il differenziamento, la maggior parte evolve verso stati cromatinici attivi o repressi, consentendo o impedendo l'espressione dei loci genici associati.

1.1.3. L'epigenetica del Cancro

Nonostante i grandi progressi per comprendere le lesioni molecolari chiave nel controllo delle pathways cellulari che contribuiscono al cancro, l'esame microscopico della struttura nucleare da parte del patologo rimane un gold standard per la diagnosi del cancro. L'occhio umano può distinguere correttamente i cambiamenti dell'architettura nucleare, in larga parte dovuti allo stato di configurazione della cromatina, e di conseguenza diagnosticare definitivamente il fenotipo tumorale di una singola cellula. Fra i principali criteri utilizzati dai patologi si trova, la dimensione del nucleo, il contorno nucleare, la membrana nucleare condensata, i nucleoli prominenti, la cromatina densa e "ipercromatica", e un elevato rapporto nucleo/citoplasma. Queste caratteristiche strutturali,

visibili al microscopio (Figura 6), probabilmente sono correlate alle profonde alterazioni di struttura e funzione della cromatina, con conseguenti cambiamenti negli stati di espressione genica e/o stabilità cromosomica. La trasformazione neoplastica, o tumorigenesi, è considerata come il processo attraverso il quale le cellule subiscono un cambiamento che coinvolge una proliferazione cellulare incontrollata. Altre caratteristiche del tumore includono la perdita del controllo dei checkpoint che porta ad un accumulo di aberrazioni cromosomiche e genomiche, aneuploidie, alterato differenziamento, evasione dalla morte cellulare (apoptosi) e invasività dei tessuti [95]. Generalmente si ritiene che l'avvio della tumorigenesi sia riconducibile a diverse lesioni genetiche, quali mutazioni puntiformi, delezioni e traslocazioni, che inibiscono un gene oncosoppressore o attivano un proto-oncogene.

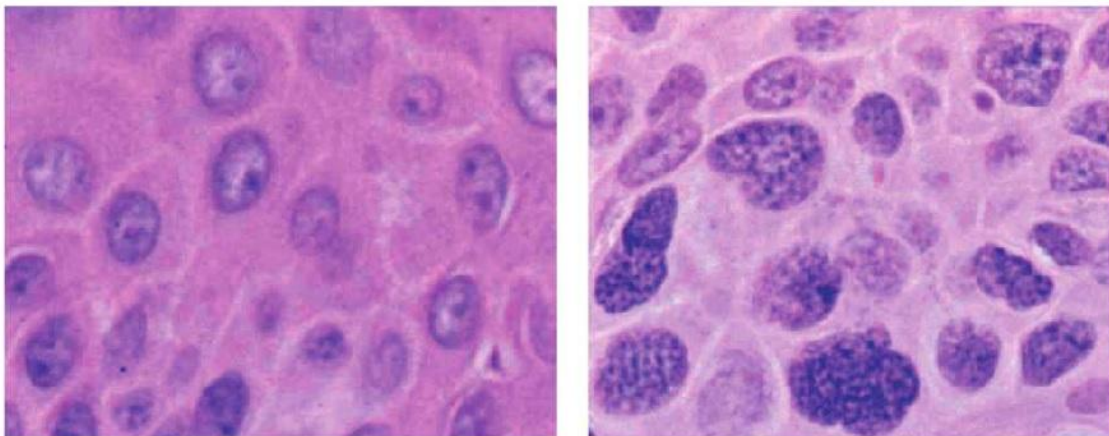


Figura 6. Cambiamenti strutturali della cromatina nelle cellule tumorali. Queste due microfotografie sono state prese da un paziente con un carcinoma a cellule squamose della pelle. Il pannello di sinistra mostra le cellule epidermiche e il tumore contiguo è mostrato allo stesso ingrandimento sulla destra. La cromatina appare molto più grossolana e granulare nelle cellule tumorali rispetto nell'epidermide normale. Tali cambiamenti nelle caratteristiche di colorazione della cromatina sono utilizzati dai patologi come criteri diagnostici per il tumore. (Modificata da Allis C. D. et al, Epigenetics 2nd edition, 2015).

Oggi, le evidenze sperimentali dimostrano ampiamente che anche l'accumulo di modificazioni epigenetiche aberranti è associato alla tumorigenesi [34, 96]. I cambiamenti epigenetici comportano alterati schemi di metilazione del DNA, modificazioni degli istoni e della struttura cromatinica. La trasformazione neoplastica è un quindi un complesso processo multistep, che coinvolge il silenziamento di geni oncosoppressori e/o l'attivazione casuale di proto-oncogeni, attraverso una combinazione di eventi genetici ed epigenetici. La scoperta che le disfunzioni epigenetiche contribuiscono alla tumorigenesi ha notevolmente esteso la teoria genetica di Knudson a "two-hit" per includere anche un "epigenetic hit" [97]. In un modello più recente, si propone che l'eterogeneità epigenetica all'interno di una popolazione di cellule geneticamente identiche può facilitare la transizione verso uno stato preneoplastico, e questo sarebbe coerente con il maggiore

"epigenetic noise" nelle cellule tumorali, come riscontrato nella grande variabilità dei pattern di metilazione del DNA e nelle signatures cromatiniche alterate [98]. L'ipometilazione del DNA è stata il primo tipo di deregolazione epigenetica ad essere stata associata al cancro [99], che è poi risultata essere un fenotipo diffuso delle cellule tumorali. A livello di singolo gene, l'ipometilazione del DNA può rappresentare un evento pro-tumorale dovuto all'attivazione di proto-oncogeni o alla ri-espressione di geni soggetti ad imprinting (perdita di imprinting). Su scala genomica globale, l'ampia ipometilazione del DNA, in particolare nelle regioni di eterocromatina costitutiva, predispone a traslocazioni e aneuploidie, e può comportare la riattivazione di trasposoni, contribuendo così alla progressione tumorale. L'ipermetilazione del DNA in molti tipi di tumore, invece, si concentra nelle regioni dei promotori di geni oncosoppressori. Il silenziamento dei geni oncosoppressori attraverso questa aberrante ipermetilazione del DNA risulta particolarmente critica nel progredire della malattia. Molti studi hanno inoltre rivelato che le alterazioni istoniche e cromatiniche possono anche contribuire alla tumorigenesi o alla progressione del cancro. In realtà, vi è un notevole cross-talk tra modificazioni della cromatina e metilazione del DNA, che si traduce nel coinvolgimento di più di un meccanismo epigenetico nel silenziamento di un gene oncosoppressore [100-102].

1.1.3.1. Alterazioni nella metilazione del DNA

I meccanismi principali con i quali la metilazione delle isole CpG può contribuire al fenotipo oncogenico sono almeno tre. Il primo consiste nell'ipometilazione generale del genoma; poi, si può verificare l'ipermetilazione localizzata sui promotori dei TSG; in terzo luogo, è possibile la mutagenesi diretta della 5MC tramite deaminazione, irradiazione da UV o esposizione ad altri agenti cancerogeni [34, 96]. E' interessante constatare che generalmente tutte e tre queste alterazioni si verificano simultaneamente, suggerendo che l'alterata omeostasi dei processi epigenetici è fondamentale per l'evoluzione dei tumori umani. Di solito, l'ipermetilazione del DNA si riscontra nelle regioni ricche di CpG che si trovano intorno al sito di inizio della trascrizione dei geni silenziati in modo anomalo nei tumori (Figura 7). Tipicamente, il 5% -10% di questi promotori risulta metilato nei tumori [34]. L'elenco dei geni correlati al cancro colpiti da ipermetilazione del DNA continua a crescere e coinvolge geni presenti in tutte le sedi cromosomiche. In un singolo tumore, l'ipermetilazione dei promotori può coinvolgere centinaia di geni e questo meccanismo vale praticamente per ogni tipo di tumore. Infatti, con l'approfondire delle analisi di metilazione del DNA in diversi tipi di tumore, è risultato che la frequenza di questo cambiamento epigenetico supera il numero di mutazioni geniche nei tumori umani, e si verifica nei promotori di geni

coinvolti praticamente in ogni via di segnalazione alterata nella tumorigenesi [103]. Un primo gruppo di geni ipermetilati è costituito da quelli in cui la perdita di funzione ha chiaramente un "ruolo driver" per tutte le fasi di evoluzione del cancro [34, 102]. In genere, le vere mutazioni driver coinvolgono un gruppo relativamente limitato di geni. I primi esempi di geni silenziati epigeneticamente sono stati fondamentali nel definire il silenziamento genico da ipermetilazione del promotore come meccanismo importante nella perdita di funzione dei TSG nel tumore. Questi geni erano facilmente riconoscibili, in quanto noti nel causare forme ereditarie di cancro se mutati nella linea germinale, spesso mutati in forme sporadiche di tumori e, in particolare, sono stati trovati frequentemente metilati su uno o entrambi gli alleli negli stessi tumori.

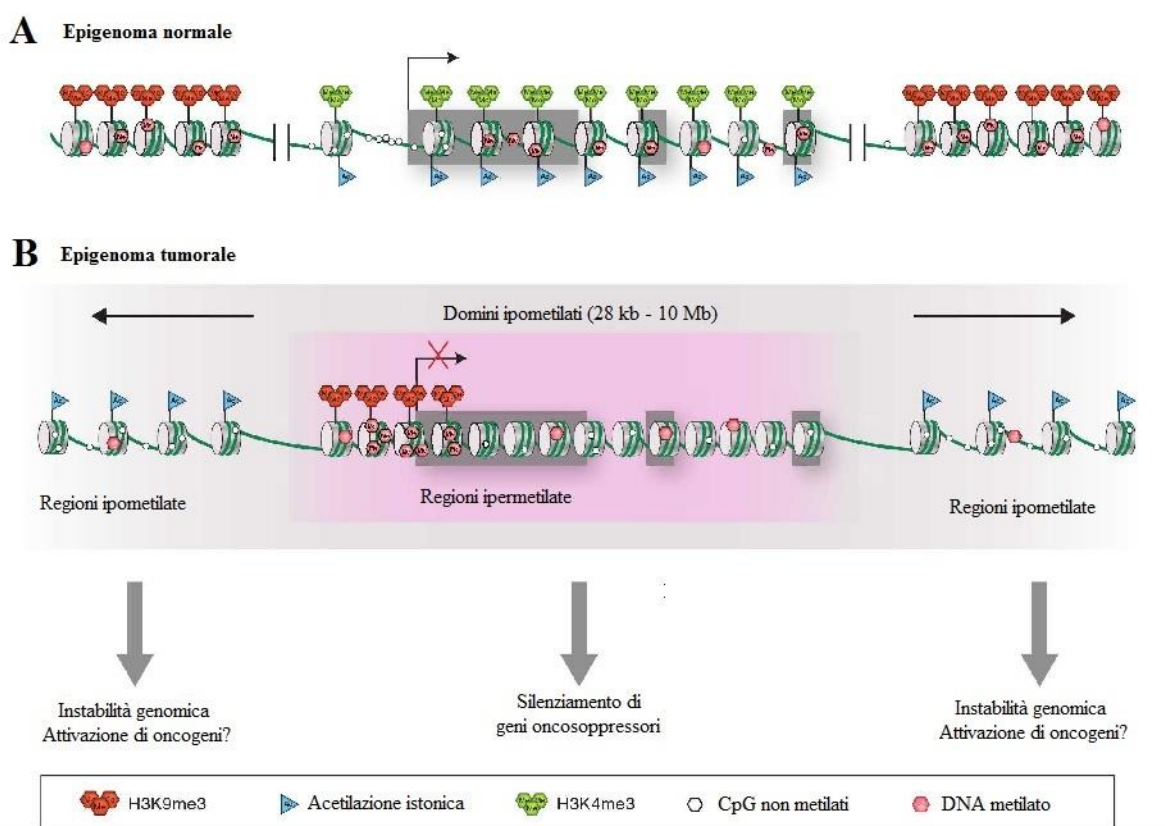


Figura 7. Cambiamenti cromatinici strutturali nelle cellule tumorali. (A) In cellula normale, il promotore di un gene attivo è caratterizzato da assenza di metilazione del DNA, H3K4me3 e acetilazione degli istoni lungo il locus genico. Le regioni fiancheggianti un gene attivo sono spesso contraddistinte da signature epigenetiche repressive, come H3K9me3 e 5MC. (B) L'epigenoma tumorale è caratterizzato sia da una perdita globale della metilazione del DNA (box grigio) e da un guadagno localizzato di metilazione sui siti CpG di geni normalmente silenziati, insieme a modifiche istoniche repressive a livello dei promotori con CGIs. Le regioni ipometilate presentano acetilazione istonica e deplezione dei nucleosomi. Al contrario nei promotori ipermetilati i nucleosomi sono posizionati in corrispondenza dei siti d'inizio della trascrizione. (Modificata da Allis C. D. et al, Epigenetics 2nd edition, 2015).

Il gene p16, per esempio, è un TSG classico che può essere mutato o silenziato epigeneticamente

nei tumori umani. Nel tumore al polmone, il silenziamento epigenetico di p16^{INK4a} si verifica molto precocemente in una popolazione di cellule pre-cancerose, prima della formazione del tumore [104]. Nel carcinoma mammario, piccole popolazioni di cellule epiteliali iperplastiche sono soggette a silenziamento epigenetico di p16^{INK4a} [105]. Questa perdita di funzione del gene attraverso un meccanismo epigenetico accompagna l'incapacità di alcune cellule mammarie nel raggiungere il checkpoint di morte cellulare, permettendo lo sviluppo di anomalie cromosomiche e la progressiva riespressione della telomerasi, mentre continuano a proliferare. Un secondo esempio riguarda il gene MLH1 (mismatch repair), in genere mutato nella linea germinale in condizioni di predisposizione familiare al tumore del colon; questa forma è caratterizzata da diverse alterazioni genetiche, dovuta all'instabilità dei microsattelliti [106, 107]. Tuttavia, il 10% -15% dei pazienti con questo fenotipo tumorale, presentano il gene MLH1 geneticamente integro, ma epigeneticamente silenziato [108, 109]. Ne consegue che la perdita di funzione comporta una mancata riparazione del DNA che a sua volta potrebbe causare molteplici alterazioni genetiche e l'instabilità dei micro satelliti. Questo illustra il legame chiaro tra genetica ed epigenetica per questi tipi di tumori del colon in cui MLH1 è epigeneticamente silenziato. Una questione chiave per comprendere i processi che portano all'alterazione della metilazione del DNA e della cromatina nella tumorigenesi precoce è risalire ai fattori causativi che la innescano. A questo proposito, alcuni dei fattori ambientali che inducono risposte cellulari allo stress, appaiono critici. Queste esposizioni sono legate a svariate patologie, compreso il tumore. Recenti evidenze sperimentali, per esempio, hanno collegato direttamente l'esposizione allo stress cellulare e la reversione verso uno stato staminale/progenitore per la sopravvivenza, con il reclutamento di complessi di silenziamento che coinvolgono le proteine PcG, HDAC e DNMTs, sui promotori ricchi di CpG, e il conseguente silenziamento genico [110]. Spesso, la metilazione del DNA progredisce sui geni poco espressi. Esempi di stimoli da stress, presenti negli stati di infiammazione cronica, sono le specie reattive dell'ossigeno (ROS) o le rotture del doppio filamento di DNA. I geni soggetti a metilazione del DNA o a modificazioni permanenti della cromatina dopo tali insulti, possono essere quelli per i quali la perdita di funzione pone le basi per la sopravvivenza cellulare. Tali cellule sono quindi pronte per l'espansione clonale sottoforma di cellule staminali/progenitori, predisposte a successivi eventi genetici ed epigenetici che guideranno la progressione del tumore [111]. Una caratteristica comune durante la tumorigenesi sembra essere l'iper-espressione delle DNA metiltransferasi, infatti da diversi studi emerge come la Dnmt1, la Dnmt3A e la Dnmt3B siano particolarmente importanti nel cancro (Tabella 1) [112].

La questione di come le Dnmts vengano reclutate per stabilire e mantenere i patterns anomali di metilazione del DNA nelle cellule tumorali, e soprattutto attraverso quali complessi possono modificare i pattern di metilazione del DNA, richiede ulteriori indagini. Alcuni studi suggeriscono

che la deregolazione dei macchinari cromatinici precede i cambiamenti di metilazione del DNA [110, 113]. Come menzionato sopra, i cambiamenti che avvengono in condizioni di rischio per la crescita neoplastica, come ad esempio l'infiammazione cronica e l'accumulo di ROS, appaiono in grado di innescare rapidamente l'assemblaggio di DNMTs con HDAC e MBD e il successivo reclutamento sulle isole CpG di determinati promotori. Durante questi eventi, vi è un rapido avvicinamento della Dnmt1 a Sirt1 (una HDAC) sulla cromatina. Il reclutamento della Dnmt1 sembra essere il primo evento in questo processo, evidenziando il potenziale multitasking di questa

DNA metiltransferasi	Importanza nello specifico tipo di tumore
DNMT1	Leucemia: iper-regolato di 5.3 volte Carcinoma gastrico: localizzata nel nucleo e nel citoplasma (64.8%) Carcinoma mammella: 16.6% Carcinoma epatocellulare: 100% Carcinoma pancreatico: altamente espresso Carcinoma del colon: altamente espresso Glioblastoma: iper-espresso
DNMT3A	Leucemia mieloide acuta: iper-regolato di 5.3 volte Carcinoma gastrico: localizzata nel nucleo e nel citoplasma (70.4%) Carcinoma mammella: 14% Carcinoma epatocellulare: 60% Carcinoma pancreatico: altamente espresso Carcinoma del colon: altamente espresso
DNMT3B	Leucemia: iper-regolato di 11.7 volte Carcinoma gastrico: localizzata nel nucleo e nel citoplasma (51.9%) Carcinoma mammella: cattiva prognosi (81.8%) Carcinoma epatocellulare: alti livelli di mRNA (60%) Carcinoma pancreatico: altamente espresso Carcinoma colon: altamente espresso Carcinoma prostata: sovra-espresso Glioblastoma: iper-espresso

Tabella 1. Le Dnmts e il loro ruolo nel cancro. (Modificata da Subramaniam et al., 2014).

proteina, oltre alla capacità di metilazione del DNA [110]. Studi di alterazione dei geni delle DNMTs in cellule tumorali del colon, indicano che il mantenimento della maggior parte della metilazione del DNA, e anche l'ipermetilazione dei promotori con conseguente silenziamento genico, richiede sia la Dnmt1 che la Dnmt3b [114]. I risultati in altri tipi di cellule tumorali sono più variabili [44]. Qualunque sia il meccanismo di progressione molecolare verso l'ipermetilazione dei promotori che risiedono nella cromatina bivalente nel cancro, bisogna ricordare che le Dnmts possono avere funzioni complesse, che comprendono non solo l'attività catalitica delle regioni carbossi-terminali, ma anche l'attività diretta di repressione trascrizionale dei domini N-terminali [50, 115-117].

1.1.3.2. Alterazioni cromatiniche

Le alterazioni più conosciute a livello degli istoni riguardano la globale riduzione delle signature attivatorie in corrispondenza dei promotori genici, quali l'acetilazione di H4K16, H4K9 e H4K14 mediata dalle HDACs [118]. Questi enzimi, infatti, risultano frequentemente iperespressi o mutati in diversi tipi di tumore come ad esempio quello alla mammella, alla prostata e al colon-retto [119, 120]. Oltre all'acetilazione degli istoni, si registra spesso una globale perdita della metilazione di H3K4, e un'acquisizione di marcatori repressivi su H3K9 e H3K27 [34]. Questa alterata distribuzione delle modificazioni istoniche è dovuta principalmente ad una deregolata espressione delle metil-transferasi istoniche (HMT). La proteina EZH2, che catalizza la metilazione di H3K27, viene iperespressa sia a livello trascrizionale che proteico in molti tipi di tumore come il tumore della prostata e della mammella ma anche nei linfomi e nei glioblastomi [35]. Anche enzimi readers di queste modificazioni istoniche possono risultare deregolati, ad esempio, BMI-1, un membro del complesso PRC1 della famiglia *Polycomb group* (PcG) *proteins* che lega la metilazione di H3K27, è stato trovato altamente espresso nei linfomi, nelle leucemie, nel cancro colon-rettale e in quello alla mammella [121, 122].

Esistono poi prodotti di traslocazione oncogenici che comportano errori di targeting dei meccanismi epigenetici, come spesso si riscontra nelle leucemie. Nella leucemia mieloide acuta (AML), il dominio di legame al DNA del fattore di trascrizione AML-1 è fuso ad una proteina chiamata ETO, che interagisce con una HDAC. L'HDAC reclutata in siti inappropriati, provoca una repressione genica aberrante, blocca il differenziamento cellulare, e infine porta alla leucemia [123]. Un'altra traslocazione che si verifica in una forma molto aggressiva di leucemia acuta, coinvolge il gene MLL, che codifica per una lisina metiltransferasi istonica (KMT). Il prodotto del gene MLL normalmente catalizza la formazione di H3K4me3, una signature attiva, che aiuta a respingere la metilazione *de novo* del DNA [124]. La traslocazione di MLL, tuttavia, inattiva l'enzima, che perde così la capacità di generare la modifica attivatoria. Questo prodotto di fusione risulta quindi associato all'ipermetilazione di alcuni promotori, contribuendo al fenotipo neoplastico [125].

1.1.3.3. La terapia epigenetica

La condizione di reversibilità delle modifiche epigenetiche, in contrasto con l'irreversibilità delle mutazioni genetiche, ha aperto un nuovo orizzonte per le terapie contro il cancro, offrendo la terapia epigenetica come nuovo approccio. Questo nuovo approccio è stato sviluppato grazie all'utilizzo di

farmaci che possono modificare i patterns di metilazione del DNA così come le modifiche cromatiniche, e vengono usati da soli o in combinazione per influenzare i risultati terapeutici.

1.1.3.3.1. Gli inibitori delle DNA-metiltransferasi (DNMTi)

Gli inibitori dell'attività DNA-metiltransferasica sono entrati già più di 40 anni fa negli studi clinici come agenti antitumorali classici, ma con scarso successo. E' solo negli ultimi due decenni che sono stati riutilizzati, in quanto è stato scoperto il loro meccanismo d'azione [126]. Gli studi clinici con il farmaco 5-aza-nucleoside, Azacitidina (conosciuto con il nome di 5-azacitidina; Vidaza, Celgene) e il suo derivato deossi-decitabina (noto anche come 5-aza-2'-deossicitidina; Dacogen, Otsuka) a dosi che sono state ottimizzate in base alla modulazione epigenetica, hanno dimostrato che il 15% o più dei pazienti con sindrome mielodisplastica (MDS) o leucemia mieloide acuta (AML) rispondono alla terapia epigenetica, con una riduzione del numero di cellule maligne, un miglioramento della conta cellulare da sangue periferico e un'aumentata sopravvivenza [127]. Questi dati hanno portato, negli Stati Uniti, all'approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA), dell'utilizzo di questi farmaci nel trattamento di tali condizioni. I DNMTi di questo tipo o i rispettivi derivati, vengono incorporati nel DNA delle cellule in replicazione dopo essere stati metabolizzati a deossinucleosidi trifosfato o scissi dalla fosfodiesterasi nel caso dell'SGI-110 [128]. Una volta incorporati nel DNA, interagiscono con tutte e tre le Dnmts, con le quali formano intermedi covalenti e inibiscono la metilazione durante i successivi cicli di sintesi del DNA. Il meccanismo d'azione di questi composti nel bloccare il sito catalitico delle Dnmts è stato ampiamente dimostrato e vengono spesso utilizzati per riattivare geni silenziati in modelli di coltura tissutale o xenotrapianto [129-131]. Quando vengono usati ad alte concentrazioni presentano effetti citotossici causati, soprattutto, dalla formazione di alti livelli di addotti enzima-DNA ma anche dall'inibizione della timidilato-sintasi [132]. Inoltre, la 5-azacitidina può anche essere incorporata nell'RNA portando all'inibizione della sintesi proteica [133]. Tuttavia, questi agenti demetilanti non inducono soltanto il blocco catalitico, ma possono comportare anche la degradazione delle Dnmts [134]. Quest'ultima azione si attiva rapidamente, anche a basse dosi di farmaco, ed è molto importante in quanto tutte e tre le Dnmts esercitano anche una repressione trascrizionale indipendente dall'attività DNA-metiltransferasica. Se si esamina la dinamica dei cambiamenti di metilazione dopo l'esposizione al farmaco si apprezza che, la metilazione degli elementi ripetitivi si ristabilisce abbastanza rapidamente nell'arco di alcuni giorni dallo stop del trattamento [135], mentre la ri-metilazione gene-specifica è variabile, con un sottogruppo di pazienti che mostra assenza di metilazione per parecchie settimane [136, 137]. In termini di correlazione clinica, la

demetilazione acuta correla con la risposta clinica in alcuni studi [138], ma non in altri [139], mentre la demetilazione continua di geni come p15, in generale correla bene con la risposta clinica [136, 137]. Tuttavia, questo effetto potrebbe, in parte, essere spiegato dall'eliminazione clonale delle cellule con metilazione aberrante. Questi dati, insieme alle osservazioni cliniche che le risposte più costanti si hanno a basse dosi di farmaco (favorendo l'ipometilazione) [140], e che alcuni pazienti rispondono a questi farmaci nonostante la resistenza ai potenti citotossici standard [138], supportano in modo convincente il meccanismo epigenetico di risposta clinica.

La capacità della 5-azacitidina di essere incorporata nel DNA e nell'RNA aumenta i suoi effetti collaterali *in vitro* e *in vivo*, perché può funzionare sia nelle cellule in divisione che non [80]. Inoltre gli inibitori nucleosidici vengono velocemente idrolizzati in soluzione acquosa e sono soggetti a deaminazione da parte della citidina deaminasi, un enzima particolarmente espresso a livello del filtro epatico. Le instabilità di questi composti presentano inevitabilmente una sfida alle loro applicazioni cliniche, rendendo necessaria la ricerca di inibitori più selettivi.

1.1.3.3.1.1. Gli inibitori non-nucleosidici

A differenza degli analoghi della citidina, gli inibitori non nucleosidici delle Dnmts (Figura 8) non richiedono l'incorporazione nel DNA, e quindi non presentano la stessa citotossicità. Alcuni dei composti che hanno dimostrato un potenziale di ipometilazione nei tumori solidi sono l'idralazina e la procainamide, ampiamente utilizzati come vasodilatatori e antiaritmici, rispettivamente [141].

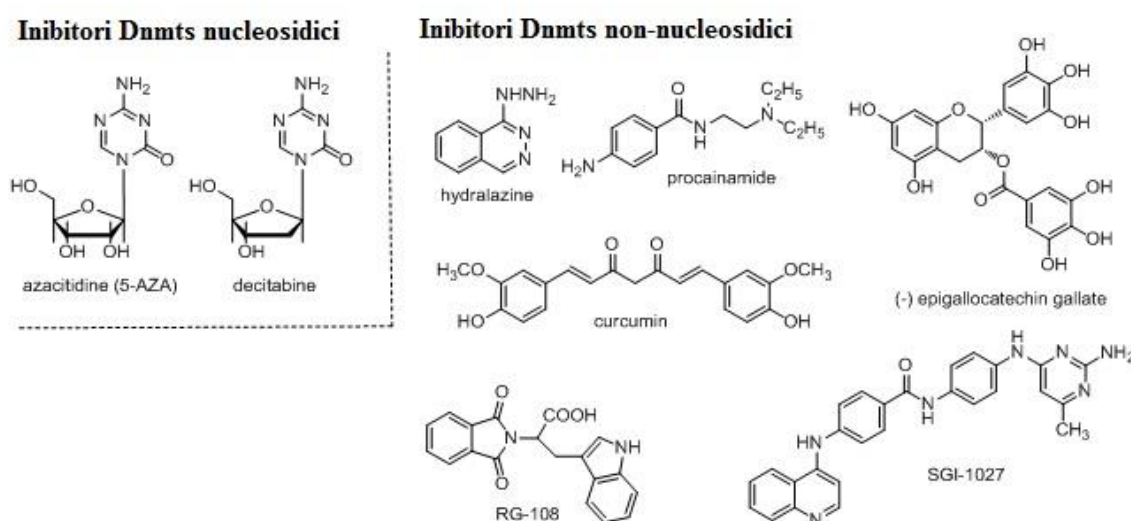


Figura 8. Strutture chimiche dei principali inibitori delle DNA-metiltransferasi di tipo nucleosidico e non nucleosidico.

L'idralazina blocca l'attività delle Dnmts attraverso l'interazione dei suoi atomi di azoto con i residui Lys-142 e Arg-240 dell'enzima, mentre la procainamide agisce in maniera simile come inibitore competitivo, ma legandosi preferenzialmente alla Dnmt1 [141]. La procainamide, secondo alcuni studi agisce diminuendo l'affinità della Dnmt1 per il DNA emi-metilato, facilitando così la dissociazione dell'enzima dal DNA che porterebbe a una perdita di metilazione su alcune sequenze [142]. Tuttavia idralazina e procainamide sembrano esercitare il loro effetto terapeutico su un numero molto limitato di tumori, infatti, la loro efficienza si limita ad una gamma ristretta di cellule. Questo potrebbe però circoscrivere gli effetti secondari e diminuire il rischio di indurre una demetilazione globale dell'intero DNA, dunque un'instabilità deleteria nelle cellule normali [143]. I flavonoidi (o bioflavonoidi) sono composti organici estratti principalmente dalle piante, dove soddisfano numerose funzioni, come la pigmentazione e l'attività antifungina [144]. Uno dei più studiati è l'epigallocatechina-3-O-gallato (EGCG), il polifenolo principale del tè verde, e le sue proprietà anti-tumorali sono note da tempo in letteratura [145]. Di recente è stato caratterizzato come inibitore enzimatico e cellulare delle Dnmts, capace di demetilare i promotori di RAR β , p16^{INK4a} e MGMT inducendo la ri-espressione di questi geni oncosoppressori [146]. Il meccanismo d'azione dei flavonoidi, si basa sull'inibizione indiretta delle Dnmts, più precisamente, rappresentano il substrato della catechina-O-Metiltransferasi (COMT), un enzima SAM-dipendente, e una volta metilati fanno sì che la concentrazione di S-adenosil-omocisteina (SAH) aumenti. Dal momento che l'equilibrio intracellulare S-adenosil-metionina, (SAM) : SAH è spostato a favore di SAH, quest'ultimo diventa un potente inibitore delle Dnmts [147]. Altri studi in vitro, invece, hanno dimostrato che EGCG agisce da inibitore competitivo diretto, impedendo alla citosina di entrare nel sito attivo [148]. Tuttavia, ad oggi, i flavonoidi, vengono considerati più come chemioterapia preventiva in quanto il loro metabolismo ne diminuisce drasticamente la biodisponibilità, riducendone così l'effettivo potenziale terapeutico [149]. La curcumina e i suoi derivati sono stati selezionati come inibitori delle Dnmts sulla base della reattività dei motivi carbonilici non saturati, dimostrando, in-silico, due modalità di legame al sito catalitico. La curcumina e i vari analoghi, sono noti per interagire con numerosi bersagli biologici *in vitro*, ma le prove di attività farmacologica *in vivo* sono risultate poco chiare, così come la terapia umana, nonostante il gran numero di studi clinici effettuati (clinicaltrials.gov) [150]. Un altro analogo non nucleosidico è l'RG-108 che è in grado di inibire l'attività catalitica delle Dnmts, bloccando il loro sito attivo, senza avviare processi di degradazione. Inoltre, esibisce un'alta specificità per i geni TSG ipermetilati. Nonostante presenti una bassa tossicità, la principale restrizione alle applicazioni cliniche è rappresentata dalla sua idrofobicità che quindi lo rende scarsamente solubile e di difficile utilizzo nella pratica clinica [151]. SGI-1027 è un composto lipofilo basato sulla chinolina. La

chinolina inibisce la Dnmt1, 3a e 3b,e inizialmente è stata sintetizzata per la sua attività antitumorale. Infatti, i sali chinolinici sono ligandi forti ma reversibili, del solco minore del DNA, e inducono morte cellulare attraverso un meccanismo ancora sconosciuto [152]. Al contrario, SGI-1027 è una base debole che si lega solo debolmente al DNA ricco in AT, ma è relativamente stabile in soluzione fisiologica. La sua attività è stata testata in vitro su Dnmts batteriche e di mammifero [153]. Ancora dibattuto rimane però il meccanismo d'azione di SGI-1027 e dei suoi derivati. Infatti secondo alcuni studi, compete con SAM ma non con il DNA [153, 154], mentre per altri, SGI-1027 e due analoghi di recente sintesi, dimostrano un'azione competitiva con il DNA ma non con SAM [155, 156]. Questi composti hanno dimostrato un effetto anti-proliferativo in diverse linee cellulari tumorali e anche in cellule staminali di tumore, parallelamente ad una scarsa citotossicità su cellule polimorfonucleate da sangue periferico umano [153, 156]. Inoltre è stata osservata una rapida degradazione della Dnmt1 via proteasoma dopo il trattamento di cellule HCT116 e RKO (carcinoma del colon) e la ri-espressione di TSG [153].

Negli ultimi anni, gli inibitori delle Dnmts, soprattutto gli analoghi non nucleosidici, stanno emergendo come classi di farmaci molto promettenti nel trattamento del cancro anche in combinazione con altri agenti, come gli inibitori delle HDAC, o i chemioterapici e i radioterapici.

1.1.3.4. La terapia combinata

Diversi studi hanno introdotto il concetto tuttora evidente che quasi tutti i tumori possono essere trattati in maniera più efficace attraverso combinazioni di farmaci. Le monoterapie risultano raramente efficaci, fatta eccezione per alcune terapie target, che danno luogo a risultati rapidi e impressionanti in pazienti con CML [157] e tumore gastrointestinale stromale (GIST) [158]; oppure l'utilizzo di inibitori di BRAF o EGFR in tumori con mutazioni specifiche [159]. Tuttavia la rapida e marcata riduzione del tumore è quasi sempre seguita dalla comparsa di recidive resistenti ai farmaci. Il futuro delle terapie epigenetiche, in particolare per i tumori solidi più comuni, dipenderà in buona parte dagli approcci di combinazione. La combinazione di farmaci più studiata è quella che prevede l'utilizzo simultaneo di farmaci che inibiscono la metilazione del DNA (DNMTi) e farmaci che inibiscono la deacetilazione istonica (HDACi). L'idea si basa sul fatto che il DNA densamente metilato, solitamente è associato ad un assetto cromatinico repressivo con una generale deacetilazione delle lisine istoniche. Diversi studi hanno stabilito in maniera inequivocabile che il trattamento iniziale con basse dosi di DNMTi seguito dal trattamento con HDACi, è capace di indurre la ri-espressione di geni silenziati epigeneticamente [160]. Questo tipo di trattamento combinato è stato esplorato in diversi studi preclinici, dimostrando quasi sempre l'aumento

d'espressione di geni silenziati, tra i quali diversi TSG, e l'aumento di risposte anti-tumorali che coinvolgono l'apoptosi [160]. Questo tipo trattamento attende la valutazione del contributo di ciascun agente singolo rispetto alla combinazione, così come l'indagine dei meccanismi di efficacia e l'individuazione di biomarcatori che possono aiutare a personalizzare l'approccio identificando la specifica tipologia di pazienti che sono in grado di rispondere.

1.1.3.4.1. Combinazioni con terapie citotossiche

Gli studi preclinici stanno cominciando a suggerire che DNMTi e HDACi presentano la massima efficacia quando utilizzati in combinazione con altre terapie anti-tumorali. Un particolare approccio promettente che è in fase di sperimentazione in studi clinici, prevede la combinazione di DNMTi con farmaci citotossici standard nel tentativo di risensibilizzare i tumori ovarici a questi chemioterapici [161]. Il concetto alla base di queste combinazioni è che la resistenza verso i chemioterapici classici spesso viene acquisita attraverso meccanismi epigenetici, dunque reversibili grazie all'utilizzo di farmaci che inibiscono la metilazione del DNA o le HDACs [162]. I risultati di una serie di studi clinici nei quali si utilizzano combinazioni di DNMTi e chemioterapia sembrano essere incoraggianti [160]. I meccanismi implicati nella resistenza ai farmaci citotossici includono alterazioni epigenetiche che regolano la trascrizione genica di trasportatori di farmaci (ABCB1), di geni pro-apoptotici (DAPK, APAF-1), di proteine del riparo del DNA (MLH1, MGMT, FANCF) e di modificatori degli istoni (KDM5A). La combinazione con farmaci epigenetici, come gli HDACi, DNMTi, inibitori delle istone metiltransferasi (HMTi) e inibitori delle proteine readers con bromo-dominio (BET-i), può revertire la resistenza epigenetica rendendo le cellule tumorali sensibili alla terapia citotossica o alla terapia a bersaglio molecolare [163].

Diversi dati biologici indicano che i composti capaci di inibire le DNA-metiltransferasi potrebbero agire anche come "radio-sensibilizzanti", cioè sensibilizzando le cellule tumorali agli effetti tossici delle radiazioni ionizzanti. La sensibilità al trattamento radioterapico convenzionale da parte delle cellule tumorali dipende dalla fase del ciclo cellulare. Infatti, le cellule in fase S sono le più resistenti mentre quelle in fase G2/M sono le più sensibili. I DNMTi possono sincronizzare le cellule tumorali preferenzialmente nella fase G1 o G2/M, potenziando così, l'efficacia della radioterapia. Effetti radio-sensibilizzanti sono stati dimostrati in cellule di carcinoma gastrico e di osteosarcoma [164, 165].

1.1.3.5. Terapie epigenetiche differenziative

Un campo particolare di applicazione delle terapie epigenetiche è quello del differenziamento cellulare, infatti è possibile riattivare il differenziamento di un *lineage* cellulare endogeno mediante il controllo epigenetico. Questo tipo di approccio ricopre un ruolo specifico nel trattamento ad esempio di quei tumori che presentano popolazioni cellulari bloccate nei vari stadi del differenziamento cellulare [166, 167]. Condizioni paradigmatiche di queste alterazioni del differenziamento riguardano i tumori del sangue, infatti è stato ampiamente dimostrato che le leucemie e i linfomi hanno origine da cellule staminali ematopoietiche bloccate nei vari stadi del processo differenziativo. Un concetto simile di differenziamento inadeguato delle cellule staminali adulte tissutali è stato accuratamente esaminato anche nei sarcomi, dove le cellule staminali mesenchimali (MSC) e i derivanti progenitori di lineage rappresentano le principali popolazioni cellulari dei vari fenotipi neoplastici come riportato nell'osteosarcoma [168], nell'istiocitoma fibroso maligno (MFH)[169], nel liposarcoma[170] e nel sarcoma di Ewing [171, 172]. In particolare i sarcomi mostrano un'alterazione dei pattern di metilazione del DNA, infatti studi *in vitro* hanno dimostrato che le linee cellulari di osteosarcoma presentano iper- e ipo-metilazione del DNA [113, 173], così come alterazioni epigenetiche alla base dell'inattivazione del pathway di Wnt, un signaling critico nello sviluppo dell'organismo e nella proliferazione delle cellule staminali [174-176]. Gli inibitori delle HDAC sono stati i primi ad essere studiati come agenti differenzianti [177], e attualmente, vengono utilizzati per indurre il differenziamento cellulare in vari tipi tumorali, anche se il meccanismo non è ancora stato completamente caratterizzato [166, 178]. Anche i DNMTi possono contribuire a ristabilire i meccanismi del differenziamento. Ad esempio, le linee cellulari dei tumori rabdoidi maligni, come il rabdomiosarcoma, trattate con la 5-azacitidina differenziano in cellule muscolari lisce [179], oppure le MSC trattate con lo stesso inibitore, possono differenziare rapidamente in senso osteogenico [180]. Inoltre, questi inibitori presentano effetti sinergici con gli HDACi, portando alla riattivazione di geni silenziati nel cancro [181]. Alla luce di quanto emerge dagli studi disponibili, i farmaci epigenetici, intesi come riattivatori del differenziamento, possiedono dunque un valido potenziale terapeutico e saranno fondamentali nell'avanzamento di terapie alternative, meno invasive e più selettive per quei tumori caratterizzati da un processo differenziativo aberrante.

1.2. I sarcomi ossei

I tumori ossei primari sono fra i tumori più rari, pari a meno dell'1% di tutti i tumori maligni che possono insorgere nel corpo umano (database EUROCCARE) [182], la bassa frequenza, tuttavia è accompagnata da un'alta morbilità e mortalità. I diversi tumori hanno modelli distinti di incidenza: Osteosarcoma e Sarcoma di Ewing (ES) hanno un'incidenza relativamente alta nella seconda decade di vita, mentre i condrosarcomi sono più comuni in fasce di età più avanzate [183]. I Sarcomi comprendono un gruppo eterogeneo di tumori maligni di origine mesenchimale e storicamente sono stati raggruppati in base alla localizzazione, in due tipi principali: sarcomi dei tessuti molli (STS) e sarcomi primitivi dell'osso [184]. Una classificazione alternativa basata sulla genetica si è evoluta grazie all'identificazione di alterazioni molecolari e genetiche associate a specifici sottotipi istologici. Secondo questa classificazione, i sarcomi rientrano in due categorie principali. Un gruppo, che comprende il rhabdomyosarcoma alveolare (ARMS), il liposarcoma mixoide (MLS), il sarcoma di Ewing e il sarcoma sinoviale, è caratterizzato dalla presenza di traslocazioni tumore-specifiche, mentre l'altro gruppo, rappresentato da leiomyosarcoma, istiocitoma fibroso maligno (MFH) e osteosarcoma, è caratterizzato dalla presenza di cariotipi complessi indicativi della grave instabilità genetica e cromosomica (Figura 9) [185]. Una chiave di lettura importante per comprendere questi tumori apparentemente diversi è la loro comune origine, infatti secondo questo modello tutti i tumori ossei derivano da una cellula mesenchimale alterata, e le caratteristiche del tumore finale sono dettate dall'interazione tra l'assetto genetico e il microambiente specifico al quale la cellula è esposta [186, 187]. Tuttavia, è anche possibile che ogni tipo di tumore sia il risultato di mutazioni all'interno popolazioni cellulari distinte nelle varie fasi di lineage-commitment (ad esempio i pre-osteoblasti nel caso dell'osteosarcoma). Questo modello prevede che lo stage specifico del differenziamento nel quale si verifica l'alterazione condiziona il fenotipo tumorale ultimo e i vari sottotipi che sono stati caratterizzati.

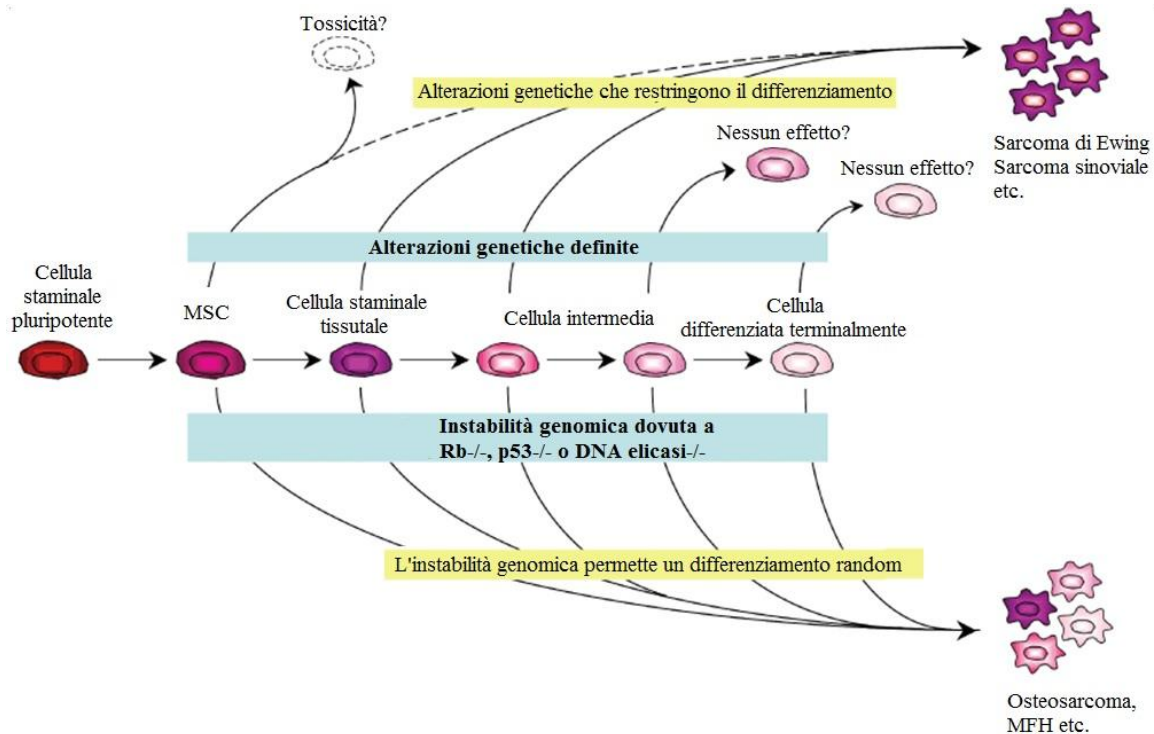


Figura 9. Alterazioni del differenziamento nei sarcomi. Due classi distinte di sarcomi emergono da alterazioni definite come in ES (traslocazione EWS-ETS) o da una generale instabilità genomica come nell'osteosarcoma. (Modificata da Toguchida et al., Cancer Science, 2007).

1.2.1. L'osteosarcoma

L'osteosarcoma rappresenta il più frequente tumore maligno primitivo dell'osso, ha un'incidenza di 2-3 casi per milione ogni anno in tutto il mondo, e nonostante la rarità, rappresenta il terzo tipo di tumore più comune nei bambini e negli adolescenti [188]. Presenta un primo picco di incidenza nella seconda decade di vita, in particolare dai 15 ai 19 anni, con una lieve predominanza per il sesso maschile (1.4:1). Circa il 60% dei tumori si presenta in pazienti con età al di sotto dei 20 anni, che corrisponde all'età critica dell'accrescimento osseo. Il secondo picco di incidenza si registra dopo i 50 anni, in genere come forma secondaria dovuta a radiazioni o a patologie ossee preesistenti, quali ad esempio, il morbo di Paget [189]. Fra i fattori di rischio per l'insorgenza dell'osteosarcoma rientrano anche alcune sindromi (Li-Fraumeni, Werner, Rothmund-Thomson, Bloom, e il Retinoblastoma ereditario) [190, 191]. Le sedi di insorgenza più comuni sono rappresentate dalle ossa lunghe (principalmente femore, tibia e omero) in corrispondenza della sede di accrescimento dell'osso vicino alla cartilagine metafisaria. A seconda delle caratteristiche anatomico-isto-patologiche viene classificato come a basso grado centrale, periosteale, parosteale e telangiectasico. Istologicamente si osserva una grande produzione di osso immaturo e matrice osteoide, e in base alla componente cellulare più rappresentata viene classificato principalmente, in

osteoblastico, fibroblastico e condroblastico [192]. Alcune di queste forme istologiche sono caratterizzate da profili molecolari distinti con specifici comportamenti biologici. La forma più frequente è rappresentata dall'istotipo osteoblastico, che rappresenta circa il 70% delle forme convenzionali. L'istologia è caratterizzata dalla presenza di cellule poligonali, fusate e anche elementi giganti multinucleati. La citologia è atipica, chiaramente anaplastica, con nuclei di grosse

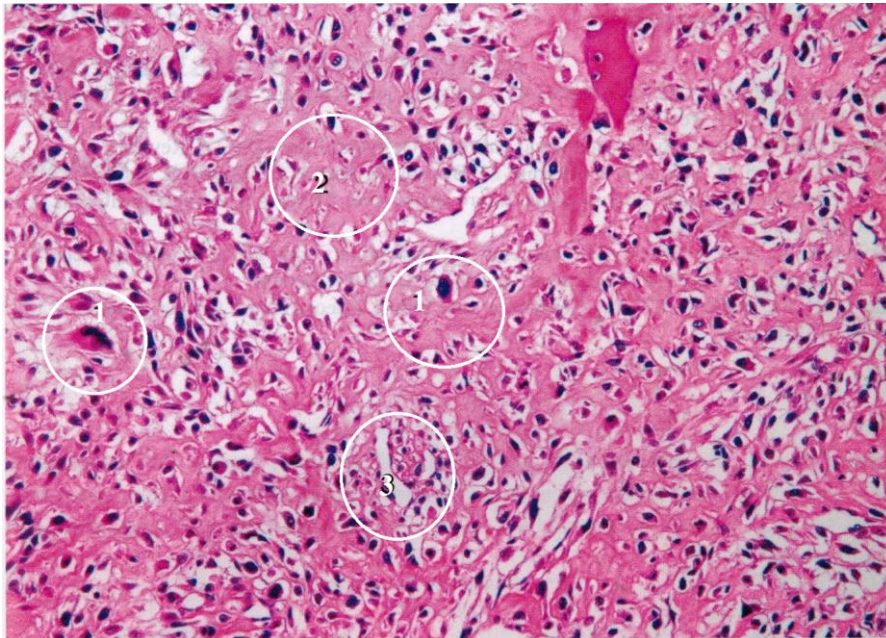


Figura 10. Aspetto dell'osteosarcoma ad alto grado di malignità. (1) cellule grandi, pleiomorfiche e ipercromatiche in grado di produrre matrice osteoide; (2) matrice osteoide completamente disorganizzata; (3) abbondanti vasi sanguigni con zone discontinue e malformate (Modificata da, Picci et al., Atlas of Musculoskeletal Tumors and Tumorlike lesions, 2014).

dimensioni, irregolari, ipercromatici, numerose figure mitotiche e nucleoli prominenti per via dell'intensa attività di sintesi proteica. Le cellule tumorali, simili agli osteoblasti per struttura e funzione, sono in grado di produrre matrice osteoide in grandi quantità, che a differenza del tessuto osseo sano, appare immatura e disorganizzata (Figura 10) [193]. Il 25% dei casi, presenta l'istotipo fibroblastico, caratterizzato da cellule fusate simil-fibroblasti e da uno stroma prevalentemente fibroso, con scarsa componente osteoide. La variante condroblastica è identificata dalla presenza di cartilagine neoplastica. Attorno ai caratteristici lobuli cartilaginei, è presente una componente di cellule fusate che producono matrice osteoide [194].

1.2.1.1. Caratteristiche genetiche ed epigenetiche

La rarità e la complessità genomica, così come l'eterogeneità intra-tumorale e inter-tumorale, rappresentano una sfida per la caratterizzazione molecolare degli osteosarcomi. Fatta eccezione per l'osteosarcoma parostale, un sottotipo indolente di osteosarcoma, facilmente individuabile per la presenza di un neocromosoma ad anello in forma episomiale che contiene elevati livelli di amplificazione del gene MDM2 e CDK4 [195], gli osteosarcomi classici ad alto grado sono geneticamente instabili e con un cariotipo complesso. Gli osteosarcomi sono caratterizzati da instabilità cromosomica, dove i cromosomi o parti di essi risultano duplicati o eliminati, e i livelli di variabilità somatica in termini di strutture e numero di copie sono elevati. Sono state descritte regioni ricorrenti di amplificazione e delezione del DNA, così come fenomeni di gain e loss of function o perdita di eterozigosi (LHO) [173]. Alcune di queste regioni contengono geni candidati ad avere un ruolo biologico driver nello sviluppo dell'osteosarcoma, e rappresentano quindi potenziali bersagli terapeutici. Le mutazioni somatiche più frequenti sono a carico di TP53 [196] ed RB1 [197] e sono state recentemente confermate anche in studi di sequenziamento genome-wide (WGS) [198]. TP53 risulta mutato su entrambi gli alleli in circa l'80% dei tumori e la maggior parte delle mutazioni ricade nell'introne 1 [198]. Altri geni mutati sono RecQ4, che codifica per un'elicasi RecQ e RUNX2. Un altro fattore che contribuisce all'instabilità genomica è l'alterazione del meccanismo della telomerasi ALT. In definitiva, quanto emerge dagli studi genetici genome-wide è che la ricerca di terapie per target molecolari comuni diventa inevitabilmente insoddisfacente, in quanto ci si trova di fronte ad alterazioni sempre diverse dovute alla poliedrica instabilità genomica di questi tumori. In questo contesto le modificazioni epigenetiche rivestono sicuramente un ruolo da non sottovalutare se si considera che sono alla base del controllo di diversi processi cromatinici e sono spesso target di quei prodotti proteici alterati con maggiore frequenza (p53 e Rb1). Studi epigenetici hanno rivelato sia ipermetilazione che ipometilazione del DNA in geni oncosoppressori (ARF, p16, RASSF1A, WIF1, TSSC3, GADD45) e in oncogeni (CDK4, RUNX2, IGF2, H19) [191]. Inoltre, l'importanza delle modificazioni istoniche è suggerita dalla risposta delle linee cellulari di osteosarcoma agli HDACIs [199-203].

1.2.1.2. Decorso clinico e terapia

Il decorso clinico dell'osteosarcoma è particolarmente sfavorevole, con una crescita locale molto rapida ed una spiccata tendenza alla metastatizzazione, infatti, al momento della diagnosi, circa il 15-20% dei pazienti presenta evidenze macroscopiche di malattia metastatica. La sede più frequente

di metastasi è rappresentata dal distretto polmonare (90% dei casi), seguito dall'osso (8-10%) e in rare circostanze dai linfonodi [204]. Tuttavia, sembra che nella maggior parte dei pazienti (80-90%) siano già presenti alla diagnosi delle micro-metastasi, a livello subclinico o non rivelabili con le attuali modalità diagnostiche [205].

Il principale trattamento curativo dell'osteosarcoma è rappresentato dalla chirurgia. In ogni caso, la sopravvivenza dei pazienti con osteosarcoma trattati con la sola chirurgia è di circa il 15-17% [206, 207]. Nei primi anni settanta, è stata introdotta la chemioterapia adiuvante per facilitare la resezione chirurgica, composta da alte dosi di metotrexato (HDMTX) e vincristina seguiti da acido folinico. Questo ha triplicato il tasso di sopravvivenza per i pazienti con malattia non metastatica. Le attuali terapie prevedono che la resezione chirurgica venga sempre accompagnata dalla chemioterapia (doxorubicina e cisplatino con o senza methotrexate), registrando la guarigione di circa il 70% dei pazienti. In pazienti con malattia localizzata, la risposta preoperatoria alla chemioterapia di combinazione è l'indice predittivo più forte per la sopravvivenza complessiva (OVS) [208]. Tuttavia, la sopravvivenza dei pazienti metastatici o con recidiva è rimasto praticamente invariato nel corso degli ultimi 30 anni, con un OVS a 5 anni di circa il 20% [207, 209]. Inoltre questo regime chemioterapico purtroppo è associato a effetti collaterali tossici anche di grave entità, sia a breve che a lungo termine [210]. Gli effetti acuti come l'alopecia, la mielo-soppressione, la mucosite, la nausea e il vomito rappresentano le complicanze più comuni [211]. La tossicità da doxorubicina può causare insufficienza cardiaca e in alcuni casi la morte [212]. Inoltre, possono presentarsi delle neoplasie maligne secondarie (SMN; Secondary Malignant Neoplasms), anche a distanza di molti anni dalla terapia come la leucemia, la sindrome mielodisplastica, il cancro al seno, i tumori del sistema nervoso centrale e ulteriori sarcomi ossei [211]. Si deve considerare inoltre che circa il 40% dei pazienti potrebbe essere intrinsecamente resistente o sviluppare una resistenza alla chemioterapia [210]. Le problematiche relative al plateau terapeutico, alla tossicità e alla resistenza ai regimi terapeutici disponibili, rende necessaria la ricerca di nuove strategie di cura. Attualmente sono state descritte diverse molecole con un potenziale clinico interessante in particolare nell'ambito dell'immunoterapia e delle terapie a bersaglio molecolare, in grado colpire di vie di segnalazione attive nell'osteosarcoma (Figura 11) [191]. Il trattamento epigenetico con DNMTi e/o HDACi è stato proposto nei tumori resistenti alla chemioterapia o alla radioterapia [165, 213]. Studi clinici di fase I e II (ClinicalTrials.gov, NCT01422499) stanno indagando la sicurezza e l'efficacia dell'HDACi vorinostat in diversi tumori pediatrici, tra cui l'osteosarcoma.

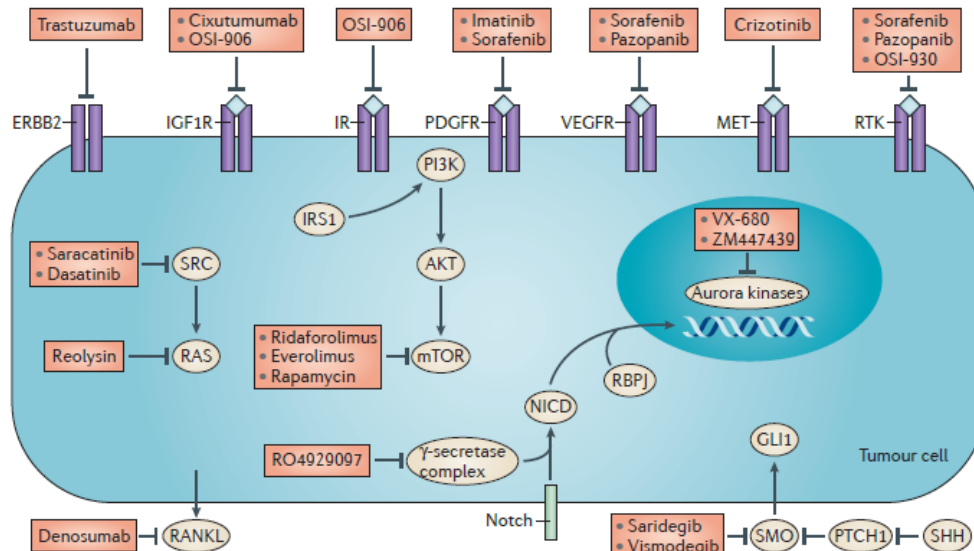


Figura 11. Terapie target nell'osteosarcoma. Questa figura mostra schematicamente i bersagli molecolari e i farmaci associati che sono stati identificati per l'intervento terapeutico nell'osteosarcoma. (Da Kansara M. et Al., Nature Reviews Cancer, 2014)

1.2.1.3. Osteogenesi e tumorigenesi

L'osso è un tessuto connettivo specializzato che supporta e protegge muscoli e organi vitali, permette la mobilità e i sollevamenti, fornisce un microambiente per il tessuto ematopoietico e immagazzina i minerali. In particolare è composto da due tipi di cellule, che sono responsabili della formazione ossea e del rimodellamento. Le cellule che formano l'osso, o osteoblasti, sono cellule mesenchimali che si trovano nello stroma del midollo osseo e sulle superfici periostali. Le cellule staminali mesenchimali (MSC), che sono in grado di dare origine a molteplici lineage cellulari del tessuto connettivo, si differenziano in preosteoblasti, che esprimono marcatori osteoblastici, come la fosfatasi alcalina (ALP), il recettore dell'ormone paratiroideo e il collagene di tipo I. Queste cellule mostrano una limitata capacità di self-renewal *in vitro*. Gli osteoblasti maturi, che esprimono RUNX2, Osterix (OSX, noto anche come SP7), osteopontina (OPN), sialoproteina ossea e osteocalcina (OCN), sintetizzano e depositano un pro-collagene di tipo I, che rappresenta il 95% della matrice organica dell'osteide ossea. Lo stadio terminale del lineage osseo è costituito da osteociti post-mitotici incorporati all'interno osteide mineralizzata [214].

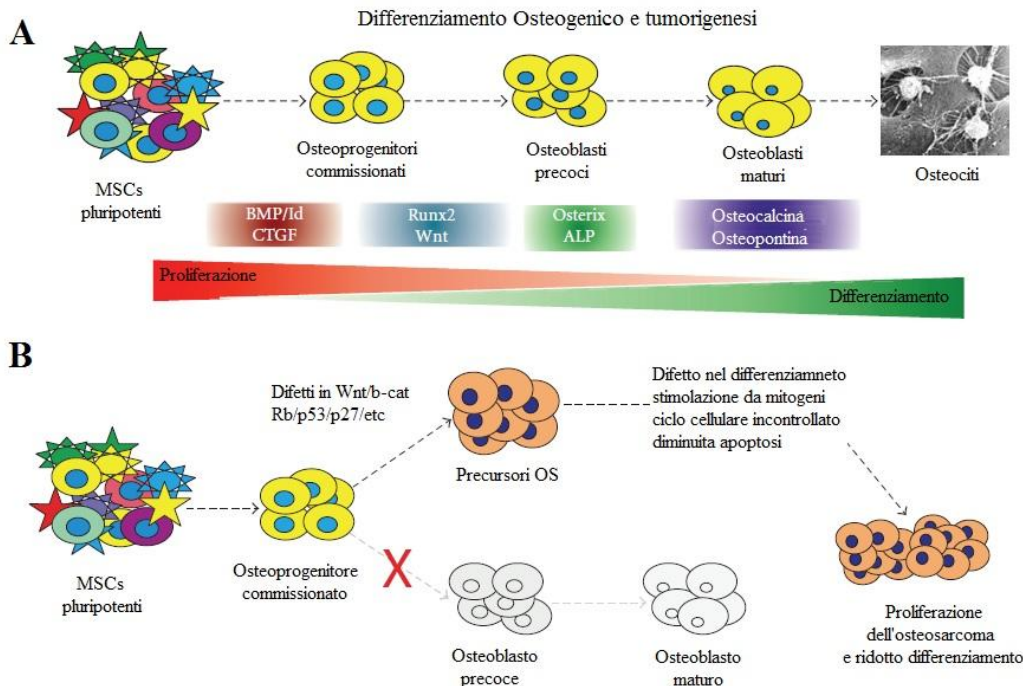


Figura 12. Differenziamento osteogenico e tumorigenesi. (A) Il processo di differenziamento delle MSCs in senso osteogenico è strettamente regolato da diverse vie di segnalazione. Le BMPs e i loro mediatori a valle sono marcatori precoci; Runx2 e le proteine Wnt sono importanti regolatori del commitment osteoblastico. ALP e Osterix sono espressi negli osteoblasti precoci, mentre osteocalcina e osteopontina sono marcatori tardivi. (B) Difetti dell'osteogenesi portano allo sviluppo dell'osteosarcoma (OS). I potenziali difetti includono alterazioni genetiche e/o cambiamenti epigenetici nella segnalazione di Wnt, Rb, p53 e p27. Questo si traduce in un alterato equilibrio tra proliferazione e differenziamento che porta al fenotipo tumorale. (Modificata da Wagner R. E. et al., Sarcoma, 2011)

Il riassorbimento osseo è opera degli osteoclasti, che possono essere considerati dei macrofagi altamente specializzati. Gli osteoclasti sono tipicamente grandi cellule multinucleate che si trovano sulle superfici ossee, derivano dal lineage monocitario e possiedono meccanismi di fagocitosi simili. Il differenziamento e le funzioni degli osteoclasti vengono regolate da segnali locali secreti dagli osteoblasti, i più importanti dei quali sono il ligando del recettore attivatore nucleare del fattore- κ B (RANKL) e l'osteoprotegerina (OPG) [215]. Il differenziamento e la funzione degli osteoclasti è anche indirettamente modulata dagli ormoni circolanti, come i fattori di crescita insulino-simili (IGFs), l'ormone paratiroideo e l'ormone paratiroideo-simile [216]. Le principali vie di segnalazione coinvolte nell'omeostasi osteoblastica riguardano le bone morphogenetic proteins (BMP), le diverse isoforme del transforming growth factor- β (TGF- β), i fattori di crescita come IGF ed FGF, i pathway di Notch, Wnt e Hedgehog. Tutte queste vie confluiscono sulla regolazione della trascrizione di geni target quali Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Distal-less homeobox 5 (Dlx5) e Osterix (Osx). Questi fattori trascrizionali attivano a loro volta geni specifici del fenotipo

cellulare osseo necessario [217]. Diverse evidenze sperimentali suggeriscono che l'osteosarcoma possa essere causato da aberrazioni nei meccanismi dell'osteogenesi.

Le alterazioni possono avvenire in differenti stadi del processo differenziativo, e di conseguenza, dare luogo a tumori più o meno aggressivi e indifferenziati (Figura 12). Di fatto le cellule staminali e quelle trasformate possiedono specifiche caratteristiche comuni, come la capacità di self-renewal, gli elevati livelli di telomerasi e presentano un fenotipo indifferenziato. Inoltre, è stato dimostrato che le cellule tumorali di osteosarcoma sono in grado di esprimere marcatori di staminalità come Nanog e Oct4 a discapito di quelli lineage-specifici [168]. È probabile quindi che i meccanismi e le vie di segnalazione coinvolte nella transizione da MSCs a osteoprogenitori vengano compromessi nel corso dello sviluppo tumorale [218]. Altri studi dimostrano che le cellule di osteosarcoma perdono la capacità di uscire dal ciclo cellulare e differenziare in senso terminale. Infatti, nei tumori primari e nelle linee cellulari di osteosarcoma si assiste ad una perdita netta dei marcatori tardivi dell'osteogenesi, come l'osteopontina (OPN) e l'osteocalcina (OCN) [219]. Alcuni studi dimostrano che la ridotta espressione di ALP, riscontrata nei tumori primari e nelle linee cellulari di osteosarcoma, è responsabile del fenotipo cellulare maligno e indifferenziato [220-222]. Runx2, che rappresenta il regolatore master del differenziamento osteoblastico, risulta frequentemente alterato nell'osteosarcoma. La sua espressione varia a seconda della fase del ciclo cellulare, inoltre può associarsi con p27^{KIP1}, l'inibitore della CDK2, e interagire fisicamente con la forma ipofosforilata di Rb per promuovere l'uscita dal ciclo cellulare [223]. La via di segnalazione di Wnt è importante nel determinare l'equilibrio tra proliferazione e differenziamento: inizialmente contribuisce alla fase di espansione ma, con il progredire del differenziamento, viene down-regolata dall'espressione di regolatori negativi come Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) [224]. Diverse alterazioni nel pathway di Wnt canonico sono state associate alla tumorigenesi dell'osteosarcoma [219]. Le cellule tumorali di osteosarcoma mantengono i loro fenotipi maligni promuovendo l'elevata proliferazione e la sensibilità ai fattori di crescita ma anche impedendo, probabilmente, il processo di differenziamento terminale. Dunque, la relazione tra il differenziamento osteoblastico e la tumorigenesi appare sempre più evidente; tuttavia anche se, ancora molto rimane da comprendere sia a livello di meccanismi molecolari sia dei regolatori.

1.2.1.3.1. La metilazione del DNA nel differenziamento osteoblastico

Nel tessuto osseo, la metilazione del DNA svolge un ruolo importante nel regolare l'espressione genica delle varie componenti cellulari (Tabella 2)

[225]. Diversi studi hanno dimostrato che, negli osteoblasti, la metilazione risulta il principale meccanismo coinvolto nella regolazione del gene che codifica per la fosfatasi alcalina (ALP). Infatti, il trattamento con agenti demetilanti, induce l'espressione e l'attività di questo enzima [226-228].

In particolare il grado di metilazione delle isole CpG localizzate nella regione del promotore prossimale di ALPL risulta inversamente proporzionale ai livelli trascrizionali. Inoltre, gli osteoblasti e gli osteociti

mostrano profili opposti di metilazione del DNA: il promotore di ALPL è ipo-metilato negli osteoblasti e iper-metilato negli osteociti [226]. Altri geni specifici degli osteoblasti che vengono regolati dalla metilazione del DNA comprendono i fattori di trascrizione OSX e DLX5, ma anche il recettore estrogenico α e OPN [229]. Per quanto riguarda l'influenza degli osteoblasti sull'osteoclastogenesi, RANKL sembra essere regolato dalla metilazione del DNA. Questo processo viene stabilito nei pre-osteoblasti e non varia durante il differenziamento [230]. Inoltre, l'osteoprotegerina (OPG), suo antagonista, può andare incontro ad una regolazione epigenetica di tipo simile [231]. Pertanto i meccanismi dipendenti dalla metilazione del DNA possono risultare critici anche nel processo di riassorbimento dell'osso. Ancora, durante la transizione da osteoblasti a osteociti, si assiste ad una diminuzione del grado di metilazione a livello del promotore di SOST. Questo gene, espresso ad alti livelli negli osteociti, codifica per la sclerostina, una proteina che inibisce la via di Wnt [232].

Per concludere, la metilazione del DNA, in particolare negli osteoblasti, riveste un ruolo evidente nella regolazione dell'omeostasi dell'osso. Tuttavia, sono ancora poche le informazioni a proposito degli elementi regolatori a valle di tale processo.

Gene	Nome
ALPL	Fosfatasi Alcalina
SOST	Sclerostina
OSX	Osterix
DLX5	Distal-less homeobox 5
ESR1	Recettore Estrogenico1 (ER α)
OPN	Osteopontina
RANKL	Ligando del recettore di NF- κ B
OPG	Osteoprotegerina
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
LEP	Leptina

Tabella 2. I geni co-regolati dalla metilazione del DNA negli osteoblasti. (Modificata da Vrtacnik et al., Clin Chem Lab Med ,2014)

1.2.2. Il sarcoma di Ewing

Nel 1921, il Dr. James Ewing descrive per la prima volta una lesione che definisce come un "endotelioma diffuso delle ossa" [233] e che oggi è conosciuto come il sarcoma di Ewing (ES). ES

appartiene ai tumori della famiglia del sarcoma di Ewing (ESFT) che comprende ES ossei, extra-scheletrici, tumori di Askin e tumori neuro-ectodermici primitivi periferici (PNET) [192]. ES è un tumore raro, scarsamente differenziato e ad alto grado di aggressività costituito da piccole cellule rotonde. Colpisce soprattutto l'osso, ma può coinvolgere anche i tessuti molli quali rene, polmone, vescica e prostata. Da un punto di vista biologico, gli ESFT sono caratterizzati da una traslocazione specifica che nella maggior parte dei casi, dà luogo al fattore di trascrizione chimerico EWS-FLI1 capace di trasformare le cellule. ES rappresenta il secondo tumore dell'osso più comune dopo l'osteosarcoma tra i bambini e gli adolescenti, con un tasso di incidenza annuale di 3 casi su un milione. Alcune evidenze indicano che i maschi sono più colpiti delle femmine (1,5: 1). Nel 90% dei casi, i pazienti sono di età compresa tra 5 e 20 anni, mentre è raro nei soggetti di età superiore ai 40 anni e inferiore ai 5 anni. Nessun fattore ambientale è stato identificato come fattore di rischio per questo tumore [234] e non vi è alcuna prova per quanto riguarda la predisposizione familiare [235], tuttavia alcuni studi hanno riportato un aumento del rischio di tumori neuro-ectodermici e carcinoma gastrico nei familiari di pazienti ES [236] o difetti mesenchimali congeniti nei pazienti ES [237, 238]. L'etnia rappresenta un importante fattore di rischio epidemiologico, infatti risulta più comune nella popolazione caucasica mentre appare molto raro in africani ed asiatici. Alcuni studi hanno dimostrato un aumento del rischio di sviluppo di tumori secondari legati alla terapia, tra cui osteosarcoma da radiazioni e AML, ma l'incidenza di ES come secondo tumore dopo la terapia è bassa [239]. Circa un quarto dei pazienti presenta metastasi rilevabili al momento della diagnosi, e i polmoni sono il sito più comune (50%), seguito dall'osso (25%) e dal midollo osseo (20%) [240]. In alcuni casi, la presenza lesioni ossee multiple alla diagnosi rende difficile distinguere tra metastasi e un tumore primitivo multicentrico. Il tasso di sopravvivenza a cinque anni è del 60% nei pazienti che presentano il tumore primitivo mentre diminuisce al 30% nei pazienti con metastasi. Il tasso di sopravvivenza a dieci anni è del 55% [241]. Le sedi più colpite dal tumore primitivo sono le ossa piatte, corte e lunghe; il femore rappresenta la localizzazione più comune seguito da tibia, omero, perone, e le ossa dell'avambraccio. Nel tronco, la localizzazione più frequente è il bacino, seguito da vertebre, osso sacro, scapola, costole e clavicola. Nelle ossa lunghe si presenta alla diafisi ma può coinvolgere anche una porzione più grande o addirittura l'intero osso. L'interessamento di cranio, mani e piedi è decisamente più raro. Solitamente si presenta come un'osteolisi permeante ed infiltrativa, non ben definita, ma può essere anche più distruttiva, uniforme o vagamente trabecolata. La corteccia ossea viene lesionata o distrutta dal tumore, che raramente rimane confinato in sede endomidollare. All'analisi anatomico-patologica risulta morbido, grigio e può essere iperemico o emorragico. Nel centro è normalmente necrotico, con un aspetto semiliquido. Microscopicamente, il tumore è composto da un tappeto di piccole cellule rotonde

impaccate strettamente le une vicine alle altre e senza matrice. Il citoplasma è scarso, pallido, granuloso, e chiaro per eosinofilia con limiti non definiti (Figura 13). I nuclei, due volte più grandi di quelli dei linfociti, sono rotondi o ovali, delle stesse dimensioni, con una membrana nucleare evidente ed una cromatina dall'aspetto puntinato, dove risultano evidenti uno o più piccoli nucleoli. Sono presenti numerosi piccoli vasi, molto sottili.

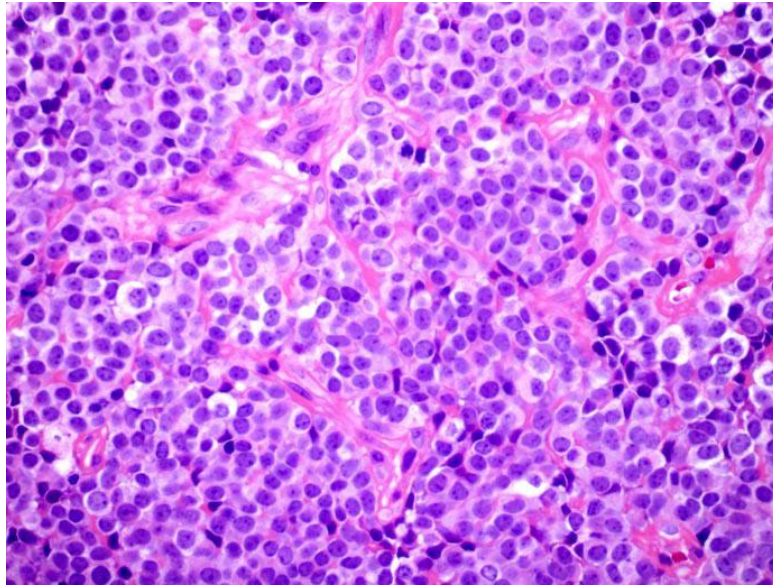


Figura 13. Istologia si ES. Tessuto molto cellulato, si osserva un tappeto di cellule uniformemente colorato con piccoli nuclei rotondi. Presenti rari vasi sanguigni sottili. (Da www.sarcomaimages.com)

A volte le cellule possono presentare processi dendritici, neurotubi e granuli neuro-secretori, sono positive a S-110 ed NSE, ed il tumore viene definito PNET [242]. La stadiazione attuale di ES proposta da Enneking è così articolata: EW I, lesione intraossea solitaria; EW II, lesione solitaria extra-ossea; EW III, lesione multicentrica, scheletrica; EW IV, metastasi a distanza [243]. La diagnosi richiede comunque un approccio multidisciplinare che coinvolge tecniche immunologiche, genetiche e di imaging. L'assenza di caratteristiche morfologiche esclusive di ES ha reso difficile la diagnosi di questo tumore fino agli anni '90 quando è stato scoperto il gene di fusione EWS-FLI1 [244], e di conseguenza, l'analisi molecolare è stata introdotta nella pratica clinica, in particolare è indicata la biopsia da almeno due siti del tumore per gli studi patologici, citogenetici e molecolari, insieme ad un ago-aspirato midollare da più siti, per evidenziare possibili metastasi al midollo osseo [245].

1.2.2.1. L'origine cellulare e i difetti molecolari

A livello cellulare, ES risulta scarsamente differenziato, con un fenotipo simil-staminale e alcune caratteristiche neurogeniche. La famiglia di tumori ESFT comprende sia tumori con caratteristiche

mesenchimali che neurali come i PNET, accomunati però dalla presenza patognomonica della traslocazione cromosomica t(11; 22) e in misura meno frequente t(21;12)(22;12). Il gene EWS sul cromosoma 22 codifica una proteina RNA-binding ampiamente espressa e altamente conservata. Nell'85% degli ESFTs, l'N-terminale di EWS si fonde con il dominio DNA-binding di FLI1, un membro della famiglia dei fattori di trascrizione ETS (erythroblastalis transforming-virus-1), che sono coinvolti nella proliferazione cellulare, nello sviluppo e nella tumorigenesi. Gli ESFTs che non presentano la fusione EWS-FLI1, di solito hanno il gene EWS unito ad un altro membro della famiglia ETS, come ERG (10%), ETV1, o E1AF, anche se non è stata osservata nessuna differenza di sopravvivenza [246]. L'istogenesi rimane tuttora sconosciuta, nonostante gli sforzi e i numerosi studi condotti in questo campo. Molti gruppi hanno proposto diverse origini cellulari per questo tumore, ma le ipotesi più accreditate sono due: neurale e mesenchimale [247-249]. Diversi studi hanno evidenziato che le linee cellulari di ES sia della forma ossea [250] che di quella extra-ossea [251] possono andare incontro ad un differenziamento di tipo neurale in seguito a stimolazione con agenti differenzianti. In particolare, uno studio ha evidenziato che, in cinque linee cellulari di ES osseo, il trattamento con AMPc +/- NGF, induceva cambiamenti morfologici compatibili con il fenotipo neuronale, tra cui filamenti neurali, sintesi di enzimi specifici, come colinesterasi e NSE, e l'espressione di proteine citoscheletriche tipiche del tessuto neurale (NFTP). Questo studio suggerisce quindi una stretta relazione tra ES e tumori neurali periferici [250]. In un altro studio è stata valutata la capacità di tre linee cellulari di ES extra- osseo di differenziare in senso neurale o muscolare dopo stimolazione con dibutiril ciclina adenosina-monofosfato (cAMP db) e 5-azacitidina, rispettivamente. L'unico tipo di differenziamento ottenuto è stato quello neurale, infatti si registrava l'induzione di marcatori neurali come la cromogranina, la proteina S-100, e proteina silicea fibrillare gliale [251]. Più recentemente, è stato dimostrato che l'espressione forzata di EWS-FLI1 in una linea cellulare di rhabdomyosarcoma induce cambiamenti morfologici tipici delle cellule di ES, in particolare attraverso la modulazione di geni bersaglio coinvolti nella differenziamento della cresta neurale [252]. Per contro, altri studi hanno esplorato l'ipotesi dell'istogenesi mesenchimale attraverso la modulazione dell'espressione di EWS-FLI1 in diversi modelli cellulari. Studi condotti su MSCs hanno evidenziato che l'espressione forzata di EWS-FLI1 è in grado di bloccare il differenziamento in senso osteogenico e adipogenico, e di indurre un fenotipo indifferenziato compatibile con ES [172]. Anche in uno studio su linee cellulari di mioblasti il differenziamento in senso muscolare risultava bloccato dalla trasfezione con EWS-FLI1 [253]. Studi successivi hanno confermato che le MSCs derivate dal midollo possono essere i progenitori delle cellule ES, in quanto, con la sola espressione di EWS-FLI1 acquisiscono caratteristiche morfologiche ES-specifiche [254-257]. Uno studio, inoltre, dimostra che EWS-FLI1 blocca

l'espressione di geni osteoblastici in una linea cellulare di progenitori multipotenti, alterando l'attività del principale regolatore del differenziamento osteoblastico, Runx2 [258]. D'altra parte, il silenziamento di EWS-FLI1 in diverse linee cellulari di ES comporta l'espressione di marcatori specifici delle MSCs e il differenziamento in senso osteogenico / adipogenico in appropriate condizioni differenzianti [171]. Inoltre in modelli animali contenenti un costrutto inducibile di EWSR1-FLI1 è stato dimostrato lo sviluppo di diversi fenotipi tumorali, dai tumori maligni della guaina nervosa periferica alle leucemie [259, 260]. Queste osservazioni orientano verso l'ipotesi che molto probabilmente potrebbero essere necessari dei cambiamenti epigenetici, guidati da EWSR1-ETS, capaci di indurre fenotipi tumorali specifici.

La proteina di fusione agisce come un oncogene trasformante e, in condizioni sperimentali, la trasfezione di cellule dal background non alterato porta all'apoptosi anziché alla trasformazione. Studi recenti, tuttavia, hanno dimostrato che le cellule staminali di soggetti molto giovani con un background permissivo, sono suscettibili alla trasformazione da parte di EWS-FLI1. Questo spiega l'importanza del controllo epigenetico nel differenziamento cellulare/tissutale e nel fornire la nicchia cellulare necessaria per la trasformazione [249, 257, 261]. Anche se i tumori ES con un cariotipo complesso si verificano in una minoranza di casi, ci sono alcune alterazioni cromosomiche comuni, come l'amplificazione del cromosoma 1q (32%) del cromosoma 2 (29%), la trisomia dei cromosomi 8 (67%), e 12 (29%), le perdite di 9p (23%) e 16q (32%) [262, 263]. Inoltre, i pazienti con tumore primario che presentano meno variazioni di copy-number (≤ 3 copie) mostrano una prognosi statisticamente migliore in termini di OVS e EFS rispetto a quelli con un elevato numero di copie [263-265]. Per lungo tempo, ES è stato considerato un tumore geneticamente stabile, dove raramente si verificano ulteriori mutazioni. In una ridotta percentuale di casi si riscontrano mutazioni in TP53 o delezioni in CDKN2A/CDKN2B che risultano associate ad una prognosi peggiore [266, 267]. L'obiettivo dei recenti studi di sequenziamento del genoma con tecniche di nuova generazione come il whole genome sequencing (WGS) o il whole exome sequencing (WES) è stato quello di individuare mutazioni secondarie che forniscono un background genetico permissivo alla trasformazione cellulare da parte di EWSR1-ETS. Tuttavia tre differenti studi hanno rilevato un numero molto basso di mutazioni somatiche (0,65-0,15 per Mb) [268-270]. I risultati dimostrano che, a differenza di altri tumori, il genoma di ES è molto stabile. Infatti oltre alla conferma delle mutazioni già descritte, è stata evidenziata soltanto un'altra alterazione genetica. In particolare, sono state trovate mutazioni inattivanti sulla subunità STAG2 del complesso coesinico nel 21,5% dei tumori [268-270], con associazione ad una scarsa sopravvivenza (OVS) [270]. Nelle biopsie, il tipo più comune di mutazione rilevata è stata la transizione da C a T, legata al comune evento di deaminazione delle citosine metilate [270]. Inoltre un quarto dei casi di mutazione di

STAG2 presentano la R216X, che coinvolge un sito CpG probabilmente collegato al pattern di metilazione del DNA. Questo basso tasso di mutazione potrebbe essere dovuto al breve lasso di tempo che hanno i tumori pediatrici per accumulare mutazioni secondarie o probabilmente, perché la trasformazione viene guidata da driver di tipo epigenetico, una caratteristica specifica dei tumori con proteine di fusione [269]. Dal punto di vista clinico, tale scarsità di mutazioni rappresenta una limitazione per l'identificazione di pathway target [270].

Diversi studi, hanno esplorato inoltre la capacità trasformante della chimera da un punto di vista trascrizionale, cercando di identificare i geni bersaglio di EWS-ETS. Strumenti come l'RNA-interference (RNAi), i microarray e le analisi di ChIP, hanno permesso di identificare la regolazione alterata di un gran numero di geni. E' stato dimostrato che NR0B1, NKX2.2, e Gli1 vengono up-regolati da EWS-FLI1 e possiedono un ruolo fondamentale nella trasformazione neoplastica. D'altra parte, EWS-FLI1 è in grado di alterare la regolazione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare, nell'apoptosi, nella farmaco-resistenza, nel controllo del ciclo cellulare e nell'angiogenesi. In particolare, la chimera up-regola PDGFC, IGF-1, MYC, CCND-1 e NKX2.2 mentre down-regola p21, p57, TGFβRII [271]. Alcuni fattori critici influenzati dal microambiente e di importanza in ES sono il fattore di crescita insulino-simile (IGF) e l'espressione di CD99, una glicoproteina di membrana espressa nel 90% dei casi. EWS-FLI1 influisce direttamente a livello trascrizionale sull'espressione di importanti componenti del sistema IGF creando così un loop di IGF-1 / IGF-1R a sostegno della crescita cellulare [272]. CD99 agisce come un oncogene nelle cellule ES, in quanto il triggering di questa molecola induce apoptosi e inibizione della crescita *in vitro* e *in vivo* e previene il differenziamento neurale [273, 274]. Considerando l'elevata espressione, è considerato un biomarker diagnostico insieme all'enzolasi neurone-specifica (NSE), S-100, sinaptofisina e, a seconda del livello di differenziamento in senso neurale, vimentina, citocheratina e neurofilamento [275].

1.2.2.2. L'assetto epigenetico

Il coinvolgimento dell'epigenoma sembra quindi essere una caratteristica chiave nella trasformazione delle cellule di ES. Alcuni studi hanno cercato di delineare lo scenario epigenetico nel quale la chimera agisce e in che modo riesce ad alterarlo. Grazie all'utilizzo di tecniche complesse che richiedono dei trattamenti specifici, come l'immunoprecipitazione del DNA-metilato (MEdIP), il sequenziamento del genoma dopo conversione con bisolfito (WGBS), il ChIP seq per le varie modifiche istoniche oppure la detection dei siti sensibili alla DNasiI, è stato possibile ottenere informazioni importanti. Recentemente è stato pubblicato uno studio di overview che copre

l'epigenoma e il trascrittoma di una linea cellulare ES (A673) dove EWSR1-FLI1 è stato silenziato attraverso un costrutto inducibile. Il silenziamento di EWSR1-FLI1 ha evidenziato la presenza di quattro clusters di modifiche istoniche con effetti diversi [276]. Inoltre sono state individuate strutture aperte della cromatina in siti enhancer e super-enhancer a distanza, suggerendo un ruolo importante per la regolazione epigenetica [276]. Questo si collega a studi precedenti che dimostrano come EWSR1-ETS si serve del legame a elementi microsatellite, costituiti da sequenze GGAA, presenti a livello di siti enhancer, per regolare l'espressione di geni a valle [277-279]. Il legame con gli elementi GGAA è un effetto specifico di ETS che ha una preferenza per i promotori senza TATA box [280]. Alcuni esempi sono i geni CAV1, NR0B1 e FCGRT. Il legame di EWSR1-FLI1 ai microsatelliti GGAA porta alla formazione di un multimerico necessario ad attrarre un numero sufficiente di rimodellatori della cromatina che a loro volta inducono l'espressione genica [277, 279, 281]. Un importante rimodellatore della cromatina che viene reclutato per promuovere l'espressione genica è p300 che acetila H3K27 (H3K27ac). EWSR1-FLI1 in forma monomerica, legandosi a un singolo elemento GGAA, non riesce ad attivare la trascrizione e l'espressione genica, dunque la porzione cromatinica è contraddistinta da H3K9me3 (Figura 14) [276].

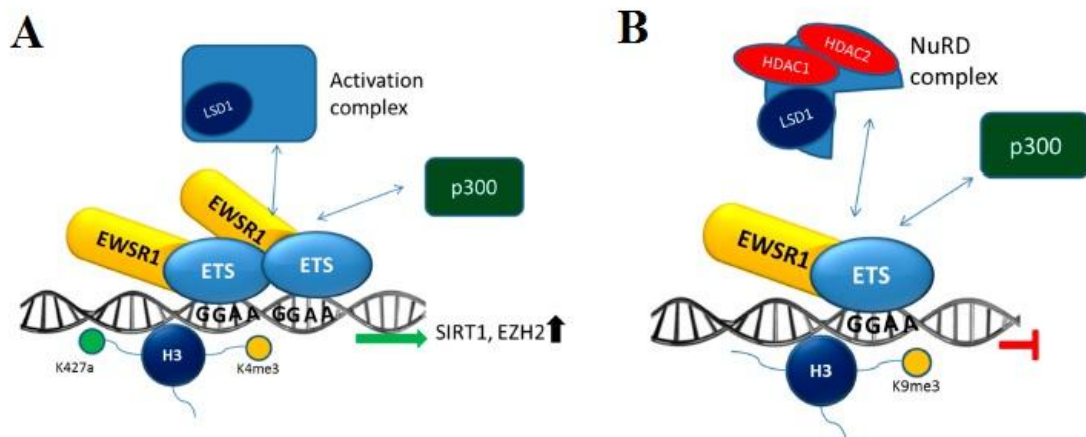


Figura 14. EWSR1-ETS media epigeneticamente l'attivazione e la repressione dell'espressione genica. (A) Complesso di attivazione: EWSR1-ETS si lega ai microsatelliti GGAA e recluta un complesso ancora sconosciuto che contiene LSD1 e p300 (necessaria per una trascrizione efficiente). Il complesso di attivazione può legarsi a H3K4me3 e H3K27ac, e indurre la trascrizione di SIRT1 e EZH2; (B) Complesso di repressione: EWSR1-ETS si lega ad elementi GGAA singoli, tuttavia questo legame non è sufficiente a creare un complesso attivante. Viene reclutato il complesso NuRD che reprime la trascrizione. Inoltre, questi siti di repressione presentano H3K9me3. (Modificata da Sand L.G. et al, Int J Mol Sci, 2015).

Nelle MSCs da soggetti pediatrici, l'induzione di EWSR1-FLI1 porta ad un assetto di modifiche istoniche, a livello dei microsatelliti GGAA, simile a quello delle linee cellulari ES. L'inibizione, invece comporta la diminuzione di H3K27ac, a supporto del ruolo attivo di EWSR1-FLI1 nel

rimodellamento della cromatina [276, 277]. L'acetilazione di H3K27 è stata associata principalmente agli enhancer legati da EWSR1-FLI1 [276]. Un altro complesso di rimodellamento della cromatina reclutato da EWSR1-FLI1 è NuRD, che contiene alcune HDACs. Queste se in contatto con CHD4, possono essere attivate e di conseguenza, il legame del complesso NuRD a EWSR1-FLI1 induce la repressione dell'espressione genica [282]. La repressione genica imposta da EWSR1-FLI1 viene infatti ripristinata dagli inibitori di HDACs e dell'istone demetilasi LSD1, un'altra proteina del complesso NuRD [283]. Un'ulteriore interazione di EWSR1-ETS con i rimodellatori epigenetici è data dal legame di EWSR1-ETS al promotore di EZH2 e SIRT1 che porta ad una up-regolazione di queste metiltransferasi e istone-deacetilasi [284, 285]. L'effetto mediato da EZH2 nella cellula è poi dipendente dall'attività di SIRT1, dimostrando un'interazione crociata tra due rimodellatori della cromatina entrambi modulati da EWSR1-ETS [284]. Sembra quindi necessaria una complessa interazione tra EWSR1-ETS, la cromatina e i rimodellatori perché si possa concretizzare l'effetto oncogeno responsabile del sarcoma di Ewing. Come descritto in precedenza, l'espressione transiente di EWSR1-ETS in cellule di diversa origine induce fenotipi diversi. Questo potrebbe essere, in parte, attribuito allo stato della cromatina a livello dei microsatelliti GGAA. Una struttura cromatinica aperta sui siti enhancer e super-enhancer, come riportato dal Tomazou et al. [276], può essere necessaria all'effetto trasformante di EWSR1-ETS nello sviluppo di ES, mentre se la cromatina è in una conformazione chiusa, EWSR1-ETS potrebbe indurre effetti diversi come la morte cellulare. Il microambiente, ad esempio, attraverso segnali proliferativi, potrebbe notevolmente influenzare lo stato della cromatina e promuovere le interazioni di EWSR1-ETS con proprietà oncogeniche. Tuttavia mancano ancora delle evidenze sperimentali.

La metilazione del DNA in ES è stata esaminata solo in pochi studi, con l'utilizzo di tecniche diverse. In un piccolo studio retrospettivo è stato dimostrato che i pazienti con una prognosi sfavorevole presentavano un maggior livello di metilazione delle isole CpG rispetto ai pazienti con una prognosi migliore, anche se il totale dei geni ipermetilati rappresentava solo il 10% dei geni in esame [286]. La stessa osservazione è stata fatta in un altro studio, dove si riporta una percentuale simile di geni metilati utilizzando una metodologia di micro-array [287]. Anche se le proporzioni sono simili, la maggior parte dei geni identificati sono diversi fra i due studi, con solo sei geni in comune (LYN, EPHA3, ESR1, MAP3K1, NGFR e SOX17). Nello studio già menzionato di indagine ad ampio spettro su epigenoma e trascrittoma, attraverso la metodologia di WGBS, è stata osservata una diminuzione della metilazione del DNA in corrispondenza dei geni attivamente espressi rispetto a quelli meno espressi, suggerendo il coinvolgimento della metilazione del DNA nell'effetto sull'espressione genica mediato da EWSR1-ETS. Tuttavia il silenziamento di EWSR1-ETS non ha prodotto cambiamenti nel pattern di metilazione del DNA [276]. Altri studi hanno

utilizzato un approccio funzionale che prevede il trattamento di linee cellulari ES con agenti de metilanti, per individuare i geni soggetti a ipermetilazione. Diversi studi hanno individuato il gene RASSF1 come ipermetilato in ES, e recentemente è stato identificato come un fattore prognostico negativo in particolare nei pazienti con età inferiore ai 18 anni [288-291]. Uno studio inoltre ha evidenziato 8 geni soggetti a ipermetilazione (CTHRC1, DNAJA4, ECHDC2, NEFH, NPTX2, PHF11, RARRES2, TSGA14) confermati anche nei tumori primari. Inoltre l'ipermetilazione di NPTX2 e PHF11 è stata associata ad una prognosi peggiore [292]. Un altro studio ha riportato ulteriori geni soggetti a ipermetilazione e down-regolazione trascrizionale, sia nelle linee cellulari che nei tumori primari (ACRC, CLU, MEST, e NNAT). La riespressione di questi geni nelle linee ES ha indotto l'arresto della crescita [293].

1.2.2.3. Decorso clinico e terapia

ES purtroppo è caratterizzato da una prognosi infausta, dovuta sia all'aggressività tumorale intrinseca associata ad un elevato tasso di recidiva e di metastasi, che alle patologie secondarie causate da chemioterapia e radioterapia [294]. Fino agli anni '70, con la chirurgia o la sola radioterapia, la sopravvivenza a 5 anni era minore del 10%, attualmente il trattamento in multi modalità tra cui la chemioterapia, ha portato la sopravvivenza a circa il 60% - 70% in caso di malattia localizzata e a circa il 20% - 40% nella malattia metastatica, a seconda del sito e dell'estensione [183]. Il trattamento di ES è basato su una combinazione di chemioterapia, chirurgia, radioterapia [295]. L'approccio standard consiste nel trattamento locale del tumore (chirurgia e / o radioterapia) e in cicli di chemioterapia sistemica (pre- e post-operatoria). La chirurgia gioca un ruolo essenziale nel trattamento del tumore primario, in particolare per evitare la radioterapia, ma non è sempre possibile. In caso di malattia localizzata, la chemioterapia neoadiuvante viene utilizzata per controllare la risposta locale e facilitare così la chirurgia. La risposta clinica alla chemioterapia viene monitorata per modulare poi la chemioterapia adiuvante. La chemioterapia è costituita dalla combinazione di sei farmaci: ciclofosfamide, ifosfamide, adriamicina, vincristina, dactinomicina D, ed etoposide. Studi clinici multicentrici hanno dimostrato un'efficacia superiore nell'associazione di 4 farmaci: ciclofosfamide, adriamicina, vincristina, e dactinomicina D piuttosto che l'associazione di 3 farmaci o l'utilizzo dei singoli farmaci da soli [296]. I pazienti con malattia metastatica rimangono una sfida terapeutica. I pazienti con metastasi al momento della diagnosi mostrano una prognosi peggiore quando trattati con lo stesso regime utilizzato per la malattia localizzata. Per questi pazienti è necessario un trattamento più aggressivo che si compone di dosi più elevate e una riduzione del tempo tra i cicli di trattamento, seguiti dalla

terapia mieloablattiva e trapianto di cellule staminali [183, 245]. In generale, tale trattamento aggressivo provoca gravi effetti collaterali. L'unico fattore prognostico identificato nei pazienti con recidiva invece, sembra essere il momento di ricaduta, ossia i pazienti che recidivano oltre i 2 anni dalla diagnosi iniziale presentano la prognosi migliore [297]. I regimi chemioterapici in situazioni di ricaduta non sono standardizzati e solitamente sono basati sull'utilizzo di agenti alchilanti (ciclofosfamide e ifosfamide ad alte dosi) [298], in associazione agli inibitori della topoisomerasi (etoposide e topotecan), o irinotecan con Temozolomide o gemcitabina più docetaxel [299, 300], ma i risultati rimangono scarsi. Il miglioramento della terapia rappresenta quindi un bisogno urgente in ES e in particolare per i pazienti con malattia metastatica o con recidiva. Il progredire delle conoscenze sulla biologia di ES fa crescere la speranza di trovare nuovi agenti più selettivi, efficaci e meno tossici. L'inibizione del prodotto di fusione o delle pathway che attiva rappresentano dei validi target terapeutici. Considerando il numero limitato di mutazioni secondarie in ES, è probabile che questi tumori possiedano un meccanismo di risposta al danno al DNA intatto. Gli agenti alchilanti che inducono la rottura del doppio filamento di DNA attivano questo meccanismo che porta infatti ad un arresto della crescita e all'apoptosi delle cellule di ES. A volte però, i meccanismi di resistenza alterano la risposta al danno, ad esempio nei casi di TP53 mutato [266]. Una strategia è quindi compromettere i meccanismi di riparo del DNA, ad esempio, l'inibizione di PARP1 porta ad un arresto della proliferazione in linee cellulari ES ed un potenziamento della risposta a temozolomide e irinotecan [301]. Altri farmaci che bypassano i meccanismi apoptotici di morte cellulare sembrano promettenti, come rampamicina e temozolomide che provocano autofagia [302]. Allo stesso modo, anticorpi anti CD99, hanno dimostrato di indurre morte cellulare caspasi-indipendente e nel trattamento combinato con doxorubicina *in vivo*, sono stati riportati anche casi di remissione completa [273, 303-305]. Altri trattamenti a bersaglio molecolare cercano di inibire IGF-1R e le tirosino-kinasi coinvolte nei pathway attivati a valle [296]. Inoltre un'ulteriore strategia risiede nell'impedire il legame della chimera al DNA. Farmaci quali Actinomicina D e il meno tossico Trabectedin hanno dimostrato un evidente effetto di interferenza con buoni risultati in ES e liposarcoma mixoide [306, 307]. Tuttavia gli studi clinici non sono stati altrettanto soddisfacenti, senza un effetto significativo in termini di OVS [308, 309]. Per quanto riguarda le terapie epigenetiche, è stato visto che il targeting dei rimodellatori della cromatina, come LSD1 e HDAC2, che attribuiscono a EWSR1-ETS il potenziale oncogenico, si è dimostrato efficace *in vitro* ed in xenotrapianti [283, 285, 310, 311]. Infine esistono terapie anti-angiogenesi o con effetto immunomodulatorio che sembrano essere promettenti.

2. Scopo della tesi

L'identificazione di nuove strategie terapeutiche nei pazienti refrattari ai comuni trattamenti chemioterapici rappresenta un obiettivo primario nella ricerca clinica oncologica. La presenza da un lato di comprovate aberrazioni dello stato epigenetico nelle cellule tumorali ma anche la condizione di reversibilità di questo stato hanno portato negli ultimi anni allo sviluppo di numerosi nuovi farmaci in grado di modulare i meccanismi di regolazione epigenetica agendo sui diversi attori di questo processo. Nonostante evidenze sporadiche, sono ancora pochi gli studi sui processi di regolazione epigenetica nei sarcomi e ancora meno sono gli studi che hanno valutato la potenziale efficacia di farmaci diretti contro questi processi. Questo lavoro si pone quindi come scopo quello di indagare come l'utilizzo di inibitori epigenetici possa modulare meccanismi molecolari alla base della trasformazione maligna in due fra i più frequenti tumori ossei, l'osteosarcoma e il sarcoma di Ewing. Diverse evidenze suggeriscono di guardare a questi due tipi di tumore come a patologie del differenziamento, dove alterazioni a livello della cellula staminale mesenchimale o nei progenitori osteoblastici diventano determinanti nel fenotipo neoplastico. A tal fine si cercherà di indagare, in modelli di studio appropriati *in vitro* e *in vivo*, l'effetto di farmaci specifici in grado di agire a livello epigenetico. In particolare verrà approfondito l'utilizzo di nuovi inibitori non-nucleosidici delle Dnmts. L'aspetto principale di indagine riguarda quindi la possibile terapia differenziativa. In primo luogo verrà analizzata l'efficacia dei composti in termini di inibizione della crescita e induzione di morte cellulare. Successivamente i modelli di osteosarcoma verranno valutati per l'effetto sul differenziamento osteoblastico, attraverso l'analisi d'espressione di specifici marcatori dell'osteogenesi insieme a saggi di mineralizzazione della matrice ossea. L'analisi di marcatori del differenziamento in senso neurale verrà invece utilizzata per studiare l'effetto dei farmaci epigenetici nei modelli di ES. Per gli studi *in vivo* verrà creato un modello murino di xenotrapianto di osteosarcoma umano in grado di costituire un valido modello preclinico esplorativo e di validazione per l'utilizzo di questi farmaci. Infine, si valuterà l'azione combinata con i chemioterapici utilizzati nelle terapie standard in modo da ottenere indicazioni importanti per possibili applicazioni cliniche.

3. Materiali e metodi

3.1. Farmaci

I composti MC 3343 e MC 3353 (forniti dal Prof. Antonello Mai, Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università La Sapienza di Roma) e il farmaco 5-Aza-2'-deossicitidina (DAC, Sigma-Aldrich), si presentano sotto forma di polvere e si conservano a temperatura ambiente. La polvere è stata ricostituita in DMSO, alla concentrazione di 10mM, oppure a 10mg/ml per praticità di utilizzo negli studi *in vivo*, aliquotata e conservata ad una temperatura di -20 °C. Le diluizioni utilizzate sono state preparate immediatamente prima dell'uso. I composti RG-108 e SGI-1027 (Sigma-Aldrich) utilizzati nei saggi enzimatici cell-free sono stati ricostituiti e diluiti in DMSO alle concentrazioni di utilizzo. I farmaci citotossici sono stati aliquotati e conservati alle concentrazioni stock come segue: Doxorubicina (DXR, Accord Healthcare, Italia) 2 mg/ml a -20°C, Vincristina (VCR, Pfizer, Italia) 1 mg/ml a +4°C, Cisplatino (CDDP, Teva, Italia) 0,5 mg/ml a +4°C, Metotrexato (MTX, Sigma-Algrich) 25mg/mL in NaOH 1M a -20°C, dalle quali sono state preparate le diluizioni direttamente in terreno di coltura immediatamente prima dell'uso.

3.2. Saggi enzimatici cell-free (Dnmt1 e Dnmt3a)

His-DNMT1 (182kDa, umana) è stata clonata, espressa e purificata come descritto da Lee et al. [142]. Il saggio sulla Dnmt1 è stato eseguito secondo Gros et al. [312]. Brevemente, la reazione è stata iniziata mediante aggiunta di 90 nM di Dnmt1 in una miscela contenente il composto in esame (fino a 1% DMSO), 1 mM di AdoMet / [metil-3H] -AdoMet in un rapporto di 3:1 (diluizione isotopica 1 *: 3) e 0,3 uM di DNA duplex biotinilato in 10 microlitri di volume finale. La soluzione è stata incubata a 37 ° C per 2 ore in tampone di reazione (20 mM HEPES pH 7,2, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 25 mg / ml BSA). 8 µl sono stati trasferiti in Flashplate PLUS (PerkinElmer) rivestite di streptavidina contenente 190 µl di AdoHcy (Sigma-Aldrich) 20 mM in 50 mM Tris-HCl pH 7,4. Il Flashplate è rimasto in agitazione a temperatura ambiente per 1 h, lavato tre volte con 200 µl di 0,05% Tween-20, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, ed è stato letto in 200 µl di 50 mM Tris-HCl pH 7,4 su TopCount NXT (PerkinElmer). Le percentuali di inibizione sono state calcolate con la stessa formula del saggio di Dnmt3a. Il saggio di inibizione dell'enzima Dnmt3a è stato adattato dal

protocollo descritto da Ceccaldi et al. [313]. In breve, un oligonucleotide biotinilato marcato in 5' è stato ibridato al suo filamento complementare marcato con 6-carboxyfluoresceina al 3' in micropiastra 384 (nero Optiplates; Perkin Elmer) pre-rivestita con avidina. Il duplex contiene un unico sito CpG in corrispondenza del sito di restrizione di un enzima sensibile alla metilazione. Il dominio catalitico C-terminale della dnmt3a umana (residui 623-908), prodotto come descritto [314], è stato aggiunto in ciascun pozzetto (200 ng / pozzetto) e miscelato con i composti chimici a concentrazioni desiderate preparati al momento; per avviare la reazione è stato aggiunto AdoMet (20 uM di concentrazione finale) in un volume totale di 50 µl. Dopo 1 ora di incubazione a 37 ° C, ogni pozzetto è stato lavato tre volte con PBS, 0,05% Tween-20, 500 mM NaCl e altre tre volte con PBST. I segnali fluorescenti specifici sono stati rilevati con l'enzima di restrizione metilazione sensibile HpyCH4IV (NEB), e misurati con un rivelatore Perkin Elmer Envision. La formula utilizzata per calcolare la percentuale di inibizione è $[(X-Y) / X] \times 100$, dove X è il segnale ottenuto in assenza di inibitore e Y è il segnale ottenuto in presenza dell'inibitore. La concentrazione alla quale si osserva il 50% di efficacia di inibizione (EC50) è stata determinata mediante l'analisi di un range di concentrazioni del composto, testato in triplicato. La regressione non-lineare dei risultati con la sigmoidale dose-risposta (pendenza variabile) è stata effettuata con GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software).

3.3. Saggi enzimatici cellulari (attività Dnmts totale)

L'attività DNA metil-transferasica totale è stata misurata utilizzando EpiQuik DNA metiltransferase Activity/ inhibition kit (Epigentek, Brooklyn, NY, USA). Le cellule sono state trattate in piastre da 100 mm e gli estratti nucleari sono stati isolati utilizzando EpiQuik Extraction Kit (Epigentek, Brooklyn, NY, USA). Ad ogni pozzetto di reazione in piastra da 96, rivestito dal DNA substrato, sono stati aggiunti 5 µg di estratto nucleare in duplicato. La reazione prevede il trasferimento enzimatico del gruppo metile alle citosine del substrato di DNA presente su piastra, il DNA metilato viene quindi riconosciuto incubando con un anticorpo anti-5-metilcitosina. La quantità di DNA metilato, che è proporzionale all'attività enzimatica, viene successivamente rivelata da una reazione colorimetrica e misurata l'assorbanza. Per la lettura è stato utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre a 450 nm (Glomax luminometro, Promega, Madison, WI, USA). Come specificato dal protocollo del produttore, l'attività enzimatica è stata poi ricavata con la seguente formula:

$$\text{Attività DNMT OD/h/mg} = \frac{(\text{OD campione} - \text{OD bianco})}{(\text{quantità proteina}(\mu\text{g}) * \text{tempo incubazione}(\text{h}))} * 1000$$

3.4. Linee cellulari e condizioni di coltura

Le linee cellulari di osteosarcoma umano Saos-2, U-2 OS e MG63, nonché le linee cellulari ES SKES-1e A673 e la linea PNET SK-N-MC, sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (Manassas, VA , Rockville, MD). Le linee di cellule di osteosarcoma IOR/OS9, IOR/OS10, IOR/OS14 e IOR/OS20 e la linea ES IOR/CAR così come la linea cellulare di PNET, LAP-35, sono state ottenute e caratterizzate dal Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna in Italia [315, 316]. Le linee cellulari di ES, 6647 e TC-71 sono state gentilmente fornite da T.J. Triche (Ospedale pediatrico, Los Angeles, CA). Tutte le linee cellulari sono state geneticamente autenticate e l'analisi STR è stata eseguita utilizzando genRESVRMPX-2 e genRESVR MPX-3 kit (Serac, Bad Homburg, Germania); i seguenti locus sono stati verificati: D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D8S1179, FGA, SE33, TH01, TPOX VWA (ultimo controllo: gennaio 2013). Le stesse linee sono state periodicamente verificate per l'assenza di micoplasma (ultimo controllo: giugno 2016) utilizzando un set di rilevamento MycoAlert micoplasma (Lonza, Nottingham, Ltd.). Le colture sono state mantenute a 37 ° C in atmosfera umidificata e 5% di CO₂. Il mezzo di coltura utilizzato è stato l'Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplementato con, 10% di FBS (Lonza, Nottingham, Ltd), inattivato al calore, penicillina (20U / ml) e streptomicina (100 ug / ml) (Sigma-Aldrich).

3.5. Vitalità cellulare

Per ogni linea cellulare la sensibilità ai farmaci è stata calcolata in base alla curva dose-risposta ed espressa come IC₅₀ (concentrazione del farmaco che inibisce del 50% la crescita cellulare delle cellule trattate rispetto ai corrispondenti controlli). Le cellule sono state seminate in piastre a 6 pozzetti ad una densità di 2x10⁵ cellule/pozzetto per tutte le linee e 5 x10⁵ cellule/pozzetto per la linea LAP-35, in terreno IMDM al 10% di FBS. Dopo 24 ore, sono state aggiunte varie concentrazioni di DNMTi (MC 3343: 1-100 µM; MC 3353: 0.1-5 µM; DAC 0.1-100 µM), e le cellule sono state esposte al trattamento fino al 72 h per ES e 96h per le linee di osteosarcoma. L'effetto dose-risposta sulla proliferazione è stato valutato tramite conta vitale in Trypan Blue (Sigma-Aldrich). Le cellule sono state trattate con terreno contenente DMSO come controllo. La concentrazione finale di DMSO nel mezzo era <0,005% (per le dosi più elevate), ed è stata riportata non avere alcun effetto sull'inibizione della crescita cellulare. Per i trattamenti combinati, le cellule sono state trattate per 72h (ES) e 96h (OS) con farmaci da soli o combinati in rapporti fissi. Negli esperimenti di combinazione le cellule di OS/14 PDX8 (vedi paragrafo 3.19 per i dettagli sulla

derivazione della linea) sono state trattate in rapporto fisso come segue: DXR:MC 3343 (1:500), DXR:DAC (1:10), CDDP:MC 3343 (1:20), CDDP:DAC (1:0.4), MTX:MC 3343 (1:166), MTX:DAC (1:3.3). I valori di IC₅₀ e gli indici di combinazione (CI) sono stati calcolati tramite il software Calculusyn (Byosoft) ed espressi come medie di almeno tre esperimenti indipendenti \pm errore standard (ES).

3.6. Analisi del ciclo cellulare

Le cellule sono state seminate e trattate come precedentemente descritto, dopo 24-48h dal trattamento, sono state incubate con la bromodeossiuridina a 10uM (BrdU) (Sigma) per 1h in un'atmosfera di CO₂ al 5% a 37 ° C, poi sono state fissate in etanolo al 70% per 30 minuti. Dopo denaturazione del DNA con HCl 2N e lavaggi con Na₂B₄O₇ 0.1 M pH 8.5, 1×10⁶ cellule sono state marcate per l'immunofluorescenza indiretta utilizzando anti-BrdU MAb (1:8, BD, San Jose, CA) come anticorpo primario, e anti-mouse FITC (1:100; Thermo Scientific, Sud Logan, OH, USA) come anticorpo secondario. Inoltre sono stati aggiunti 20 mg / ml di ioduro di propidio (PI) per l'analisi del contenuto di DNA. L'analisi di citometria a flusso è stata effettuata con FACSCalibur (BD Labs, Lexington, KY, USA).

3.7. Analisi della morte cellulare

La valutazione dell'apoptosi è stata condotta attraverso il test dell'annexina fluorescina (Annexin-V-Fluos Staining KIT, MBL, Giappone) che permette la discriminazione delle cellule apoptotiche da quelle necrotiche. L'annexina è una proteina di membrana calcio-dipendente in grado di legare con un'elevata affinità la fosfatidilserina. Quest'ultima, situata sul lato interno della membrana plasmatica in condizioni basali, viene esposta sul lato esterno già nelle fasi precoci del processo apoptotico. La marcatura simultanea con propidio ioduro (PI) permette di discernere fra le cellule apoptotiche e quelle necrotiche: le prime avranno soltanto la marcatura dell'annexina, nelle necrotiche, invece, ci sarà anche il segnale del PI, dovuto al danneggiamento della membrana cellulare che ne permette l'entrata e il legame al DNA. Le linee cellulari sono state seminate e trattate come sopra. Dopo 24-48 ore di trattamento, prelievi di 500.000 cellule sono stati risospesi in 85µl di binding buffer, ai quali sono stati aggiunti 10µl di anticorpo anti-Annessina V, coniugato con FITC, e 5µl di PI. Dopo 15 minuti di incubazione, ad ogni campione sono stati aggiunti 400µl di binding buffer, per poi procedere con l'analisi di citometria a flusso che è stata effettuata con FACSCalibur (BD Labs, Lexington, KY, USA).

3.8. Immunofluorescenza su cellule in aderenza

Le cellule sono state coltivate e trattate a vari tempi in petri 60 mm Ø contenenti un vetrino, che nel caso delle linee ES ,veniva pre-trattato con fibronectina (Sigma-Aldrich) in modo da permettere l'adesione. A vari tempi e dosi di trattamento, oppure in condizioni basali, le cellule sono state fissate con una soluzione al 4% di PBS-paraformaldeide per 10 minuti a temperatura ambiente nel caso di valutazione della β -III tubulina e Dnmt1; oppure metanolo/acetone 3: 7 per H-NF; o metanolo assoluto per Ki-67. Dopo permeabilizzazione con una soluzione 0.15% di PBS-Triton X-100, le cellule sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con una soluzione al 5% di PBS-BSA per bloccare i siti aspecifici di legame degli anticorpi. In seguito, l'incubazione con l'anticorpo primario è stata fatta overnight a 4°C in camera umida: anti-DNMT1 (1:50, Santa Cruz), anti- β -III tubulina (1:50, Sigma-Aldrich), anti-NF-H (1: 200, Cell Signaling), Ki-67 (1:50 Calbiochem, Merck Millipore). L'anticorpo secondario: anti-Mouse o anti-Rabbit IgG FITC (1:100, Thermo Fisher Scientific Inc) è stato incubato per un'ora a temperatura ambiente in camera umida. I nuclei sono stati contrastati con Hoechst 33258 (0,5 mg / ml, Sigma-Aldrich). Il segnale di fluorescenza è stato poi valutato al microscopio Nikon Eclipse 90i (Nikon Instruments). Per valutare contestualmente la proliferazione, la percentuale di cellule Ki-67-positivo è stata quantificata in almeno 500 cellule ed espressa come indice di marcatura al Ki-67. L'acquisizione e l'elaborazione delle immagini è stata possibile utilizzando il NIS-Elements R.C. 3.10 software.

3.9. Estrazione proteica e western blotting

Per la valutazione dell'espressione proteica dopo i trattamenti con i composti epigenetici e in condizioni basali, le proteine sono state estratte da cellule coltivate in petri da 100 mm di diametro a tempi ben precisi. La lisi è stata effettuata per 30 minuti in agitazione in ghiaccio mediante l'aggiunta al pellet cellulare di un buffer contenente Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, NP-40 1%, EGTA 1 mM, sodio deossicolato 0.25%, NaF 1mM, al quale sono stati addizionati gli inibitori delle proteasi (PMSF 1mM, sodio ortovanadato 0.2 mM, aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 0.1 mM, pepstatina 1 μ g/ml) e un cocktail di inibizione delle fosfatasi (Sigma-Aldrich). I lisati sono stati centrifugati ed è stato raccolto il surnatante contenente la frazione proteica delle cellule. La concentrazione proteica è stata determinata mediante Bio-rad Protein Assay (Biorad) e conseguente lettura spettrofotometrica, confrontando le densità ottiche dei campioni con quelle della curva standard della BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich) a concentrazione nota. Prelievi di 20-

40µg di proteine, a seconda dell'antigene, sono stati caricati su gel al 7.5-10% di SDS-PAGE. Dopo la corsa elettroforetica, è stato fatto il trasferimento su membrana di nitrocellulosa (0.45 µm, Bio-Rad). La colorazione con Rosso Ponceau (Sigma-Aldrich) è stata utilizzata per valutare il corretto trasferimento delle proteine e per una prima normalizzazione quantitativa. È seguita l'incubazione di 1 ora con una soluzione di TBST (Tris-HCl 10 mM ph 7.4, NaCl 150 mM e Tween20 0.1%) al 5% di non-fat dry milk (Bio-Rad), per saturare i possibili siti aspecifici. Le membrane sono state incubate in agitazione overnight a +4°C con i seguenti anticorpi: anti-DNMT1 (1:2000, Bethyl Laboratories, cat. no. A300-041A-M), anti-DNMT3a (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, cat no. sc-20703), anti-DNMT3b (1:1000 Santa Cruz Biotechnology, cat no. sc-130740), anti-CyclinD1 (1. 2000, Santa Cruz Biotechnology, cat no. sc-753), anti-GAPDH (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, cat no. sc-25778), anti-pRb (1:1000 clone S780, Cell Signaling, cat no. 9307), anti-Rb (1:1000, Cell Signaling, cat no. 9309), anti-PARP (1:3000, Cell Signaling, cat no. 9542), anti-Actin (1:100.000, Millipore, cat. no. MAB1501). L'incubazione con l'anticorpo secondario è stata per tutti di 1 ora, in agitazione a temperatura ambiente con anti-rabbit o anti-mouse (GE Healthcare) coniugato con l'enzima perossidasi di rafano. La rivelazione è stata quindi tramite reazione chemiluminescente mediante ECL (Euroclone) e successivo sviluppo del segnale su lastra fotografica.

3.10. Differenziamento neurale

Le linee cellulari di ES TC-71 e LAP-35 sono state seminate a bassa densità in petri da 60 mm di diametro (50×10^3 cellule per il TC-71 e 200×10^3 cellule per la LAP-35) e coltivate su vetrini precedentemente rivestiti con fibronectina (3 mg /cm^2 , Sigma-Aldrich) nel mezzo di coltura sopra descritto. Dopo 24 ore, le cellule sono state esposte al trattamento con i farmaci (MC 3343 2-4µM; MC 3353 1µM; DAC 30 µM) per 72h. In seguito sono state fissate,marcate e analizzate per l'immunofluorescenza come descritto sopra. Le cellule sono state classificate come differenziate in base all'espressione degli antigeni β-III tubulina e H-NF, e alla lunghezza dei neuriti che doveva essere di almeno 1.5 volte il diametro della cellula. Per la conta dei neuriti sono state considerate almeno 100 cellule da cinque campi diversi.

3.11. Differenziamento osteoblastico

Le cellule sono state seminate a una densità di 2×10^5 cellule per petri da 60 mm di diametro in IMDM come riportato sopra. Dopo 4 giorni sono state incubate in terreno osteogenico (terreno al 2% di FBS con β-glicerofosfato 5 mM e acido ascorbico 50 µg/ml) senza (controlli) o con MC 3343

(1-5 μ M), MC 3353 (0.5-1 μ M) o DAC (0.1 μ M), e tenute in tali condizioni per 21 giorni. Il terreno è stato sostituito ogni 4 giorni. Le cellule sono state fissate a diversi tempi (giorno 0, 7, 14 e 21) per i saggi di colorazione e per l'estrazione di RNA. La mineralizzazione ossea è stata saggiata mediante colorazione con rosso di alizarina (ARS, Sigma-Aldrich). Dopo la fissazione in etanolo 70% per 1 h a temperatura ambiente, le petri sono state trattate con ARS (40 mM pH 4) per 10' in agitazione. Al termine della colorazione sono stati fatti una serie di lavaggi prima in H₂O distillata, poi in PBS. Il colorante è stato quindi estratto dal monostrato cellulare mediante incubazione con cloruro di cetil-piridinio al 10% (CPC; Sigma-Aldrich). La soluzione colorata è stata poi rimossa e trasferita in una piastra a 96 pozzetti per la lettura al luminometro a 550 nm (Glomax, Promega). La quantificazione della produzione di matrice è stata effettuata normalizzando l'assorbanza così ottenuta, sul numero di cellule presenti nella petri, ottenuto mediante conta vitale in Trypan Blue.

3.12. Valutazione della fosfatasi alcalina

La fosfatasi alcalina è stata valutata attraverso un saggio enzimatico semi-quantitativo con kit ALP (Sigma-Aldrich). Le petri dei campioni in esame sono state incubate con una soluzione contenente il substrato fosfato, in seguito all'attività fosfatase da parte dell'enzima, viene liberato il naftolo fosfato. Questo si lega immediatamente al sale di diazonio per formare un pigmento visibile ed insolubile in corrispondenza dei siti di attività fosfatase. I nuclei sono stati contrastati con ematossilina e la valutazione è stata effettuata al microscopio Nikon Eclipse 90i in campo chiaro.

3.13. Estrazione degli acidi nucleici

Le cellule, seminate in piastre da 60 o 100 mm di diametro, sono state staccate meccanicamente mediante scraper, pellettate e lavate con PBS. Per l'estrazione del DNA il pellet cellulare è stato processato e poi purificato in colonna con il kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo fisher Scientific) secondo il protocollo del produttore. Per l'estrazione dell'RNA, il pellet è stato risospeso in TRIzol (Invitrogen Life Technologies), una soluzione monofasica costituita da fenolo, importante per la separazione dell'RNA, e guanidina isotiocianato, inibitore delle RNasi. Successivamente, è stato aggiunto cloroformio nella quantità di 1/5 del volume totale; il tutto è stato agitato con vortex per miscelare le due fasi e lasciato in ghiaccio per 15 minuti. Dopo centrifugazione a 12000 rpm per 15 minuti a +4°C, sono state ottenute due fasi separate da un'interfaccia: una organica e una acquosa. E' stata prelevata la fase acquosa contenente l'RNA ed è stato aggiunto un volume uguale di isopropanolo per la precipitazione. Dopo 15 minuti di

incubazione in ghiaccio e una centrifugazione a 12000 rpm per 15 minuti a +4°C, è stato rimosso il surnatante e lavato il pellet con etanolo 75%, risospeso in RNasi free water ed incubato per 10 minuti a 60°C in modo da facilitare la solubilizzazione dell'RNA. Per avere una maggiore purificazione degli RNA, i campioni sono stati sottoposti al *clean up* utilizzando lo specifico RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) seguendo il protocollo del produttore. La concentrazione dell'RNA è stata misurata mediante lettura spettrofotometrica al NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Sono stati considerati di buona qualità gli RNA con il rapporto 260/280 >1.8 (indica la contaminazione da proteine) e il rapporto 260/230 > 1.9 (indica la contaminazione da solventi). Come verifica complementare sulla qualità dell'RNA estratto, i campioni sono stati corsi su gel all'1% di agarosio in Tris-Borato EDTA (TBE). L'osservazione su gel ha evidenziato due bande predominanti di RNA ribosomiale 18S e 28S (2-5 kb) e RNA a basso peso molecolare (0.1-0.3 kb).

3.14. Retrotrascrizione dell'RNA

La tecnica di RT-PCR prevede la conversione dell'RNA in cDNA. Si parte per ogni campione da una quantità nota di RNA totale, 500 ng, che sono stati retro-trascritti utilizzando l'High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystem). Il programma di retrotrascrizione utilizzato è stato quello indicato dal produttore: 25°C per 10', 37°C per 120' e 85°C per 5'. La reazione è stata allestita in 50 µl di volume finale in una mix di retrotrascrizione come segue: dNTPs (500 µM), MultiScribe Reverse Transcriptase (125 U), TaqMan RT Buffer 1X e Random primers 1X.

3.15. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Per verificare il successo della retrotrascrizione è stata effettuata una PCR di controllo per il gene housekeeping β -ACTINA (479 bp). Le sequenze dei primers utilizzati sono: senso: 5'-CGA GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT TAA GGA GA -3, e antisenso: 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'. Le condizioni di amplificazione sono le seguenti: hot-start a 95°C per 5', seguito da 30 cicli a 94°C per 30" (denaturazione), 60°C per 30" (annealing) e 72°C per 30" (allungamento). I prodotti di amplificazione sono stati controllati tramite elettroforesi su gel al 2% di agarosio in TBE 1X, poi visualizzati e fotografati al Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad).

3.16. Real-time PCR

L'analisi quantitativa dei geni coinvolti nel differenziamento è stata dapprima eseguita mediante Real time Polymerase Chain Reaction (PCR quantitativa). Il gene della gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH) è stato utilizzato come controllo per normalizzare il livello di espressione dei diversi target genici. La reazione di PCR per GAPDH è stata eseguita utilizzando la chimica TaqMan con Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem), composta da AmpliTaq Gold DNA Polymerase (0.025 U/ μ l), AmpErase UNG (0.01 U/ μ l), dATP (200 μ M), dCTP (200 μ M), dGTP (200 μ M) e dUTP (400 μ M), MgCl₂ (5.5 mM), TaqMan Buffer 1X; insieme a primers e probe ad una concentrazione di 200 nM. Le sequenze dei primers e del probe usati per la GAPDH sono i seguenti: senso, 5' - GAA GGT GAA GGT CGG AGTC - 3', antisenso, 5' - GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC - 3' e probe: 5' - CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC - 3'. Gli assay dei target utilizzati (Applied Biosystems) sono i seguenti: ALPL (Hs01029144_m1), COL1A2 (Hs01028970_m1), RUNX2 (Hs00231692-m1). Per quanto riguarda la chimica SYBR Green sono stati usati gli stessi primers di GAPDH. Questa chimica prevede l'uso di SYBR Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems) contenente SYBR Green I, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTP Mix con dUTP e Passive Reference I. Ogni coppia di primers è stata ottimizzata per ciascuna reazione; le concentrazioni finali dei primers utilizzate nelle reazioni di amplificazione e la loro sequenza sono le seguenti: OCN, senso 5'-GGGCTCCCAGCCATTGAT- 3' (800 nM) e antisenso 5'-CAAAGCCTTTGTGTCCAAGCA- 3' (800 nM); Tutti i primers sono stati disegnati usando il software Primer Express (Applied Biosystems). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con lo strumento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies) in un volume totale di 25 μ l con un programma standard di 40 cicli (10 minuti a 95°C, 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C). Tutti i campioni sono stati amplificati in triplicato; i controlli negativi senza il template di cDNA sono stati impiegati in ogni saggio. L'analisi dei risultati è stata eseguita secondo il metodo comparativo con valutazione del ciclo soglia (Ct), vale a dire il numero di cicli in cui il prodotto specifico di PCR in fluorescenza comincia ad essere rilevato. Il Ct della GAPDH, gene di riferimento per la normalizzazione, è stato sottratto al Ct dei geni d'interesse in tutti i campioni, ottenendo così il Δ Ct : Ct gene X – Ct GAPDH = Δ Ct. Ogni Δ Ct (Δ Ct campione) ricavato per ciascuno dei campioni viene poi sottratto a quello del calibratore (Δ Ct calibratore), cioè quello ricavato dalla linea cellulare usata come controllo: Δ Ct campione - Δ Ct calibratore = $\Delta\Delta$ Ct. L'espressione relativa di ogni gene viene espressa come: $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ che indica la misura d'espressione del campione analizzato rispetto al calibratore. L'espressione di ciascun gene per ogni punto del trattamento è stato calibrato sul controllo dello stesso tempo, impostato come 1.

3.17. RT-PCR array

Lo studio molecolare sul differenziamento è stato condotto anche mediante Human Osteogenesis RT² Profiler™ PCR Array (PAHS-026; SABiosciences). Si tratta di CARD per real-time PCR che consentono di valutare simultaneamente l'espressione del trascritto di molti geni coinvolti nelle pathways specifiche dell'osteogenesi. La chimica utilizzata è SYBR Green come descritto sopra. La GAPDH è stata utilizzata come controllo per normalizzare il livello di espressione dei diversi geni target. Le reazioni di amplificazione per ciascun campione sono state eseguite con lo strumento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies) in un volume totale di 25 µl con un programma standard di 40 cicli (10 minuti a 95°C, 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C). L'analisi dei risultati è stata eseguita secondo il metodo comparativo con valutazione del ciclo soglia (Ct) come sopra descritto.

3.18. Analisi della metilazione del DNA

La PCR metilazione-specifica (MS-PCR) e la sua versione quantitativa (qMS-PCR), si basa sul metodo di amplificazione del DNA convertito con bisolfito [12]. Il trattamento del DNA con bisolfito di sodio converte le citosine non metilate in uracili, mentre le citosine metilate non vengono modificate, in questo modo è possibile distinguere il DNA metilato da quello non metilato. Brevemente, una coppia di primers riconosce la versione convertita metilata del DNA, mentre l'altra coppia riconosce la versione convertita non metilata. Per la conversione con bisolfito, sono stati utilizzati 2 µg del DNA genomico estratto come descritto sopra ed è stato impiegato il kit EpiTect Fast Bisulfite Conversion (Qiagen) seguendo il protocollo del produttore. Il DNA convertito è stato eluito in 10 microlitri di tampone di eluizione. Per reazione di amplificazione sono stati utilizzati 20 ng di DNA convertito. Le reazioni di amplificazione sono state condotte in duplicato. Le coppie di primers sono state scelte per coprire una regione ricca in di CpG sul promotore del gene ALPL come descritto in precedenza da Delgado-Calle et al. [226] e utilizzando il software Metil Primer Express (Applied Biosystems). Le regioni dei primers sono mostrate in figura (Figura 15) e le sequenze insieme alle condizioni di amplificazione in tabella (Tabella 3). Per verificare la specificità delle reazioni di amplificazione sono stati utilizzati i seguenti DNA di controllo: DNA convertito metilato e non metilato (EpiTect PCR control DNA Set, Qiagen). Nella qMS-PCR le percentuali di metilazione del DNA sono state calcolate interpolando i ΔC_t (C_t non metilato – C_t metilato) in una curva standard. La curva standard è stata costruita miscelando il DNA di controllo

metilato con il DNA di controllo non metilato in percentuali note 0%, 33%, 66%, 100% (Figura 15bis).

Promotore ALPL

TAAAGACAGAGACCCAGAGAAA GCCAGATATGTTGACAGACACAGAGACAGACGCCAGAGAGGAAGGCAGACAAAGAGA
 CGGGTGGAGACAAAGACTCCCACCAAGAGACGCAGAAGGAAGATGCCGACGGTAAAGACAAAACAGGAGACGCGCGCAA
 GGAGCAGGTCAGAGCCCAGGCTCGCTGAGAGAGGAAGGGCTGGGCTGGGGCAGCCCGGAGGCAGAGAGACCAGAGTGC
 GGGCGGGCGAGGGACGCCAGGGCCGCGTCACCCAGCCC GTTCCTAGCTCCGCTCCCGGCAGGGGGCGCCCTGGCCTC
 GTGGCACGACCCGGCCCGGGGGCGCGGGCTCGGGCCGGGGCGGGGCCGGGGCCGGGCTGGGGAGGGGTGGGGCCGG
 GGGCGGGGAGGGGGCGGGCTGCCCGGGCCTCACTCGGGCCCCGCGGCCGCTTTATAAGGCAGGGGGTGGTGGCCC
 GGGCCGCGTTGCGCTCCCGCCACTCCGCGCCCGCTATCCTGGTCCGTGCTCCACGCGCTTGTGCTGGACGGACCCT

-289bp_-218bp da sito d'inizio della trascrizione

Figura 15. Mappa dei primers di MS-PCR. Localizzazioni dei primers di MS-PCR sul promotore di ALPL.

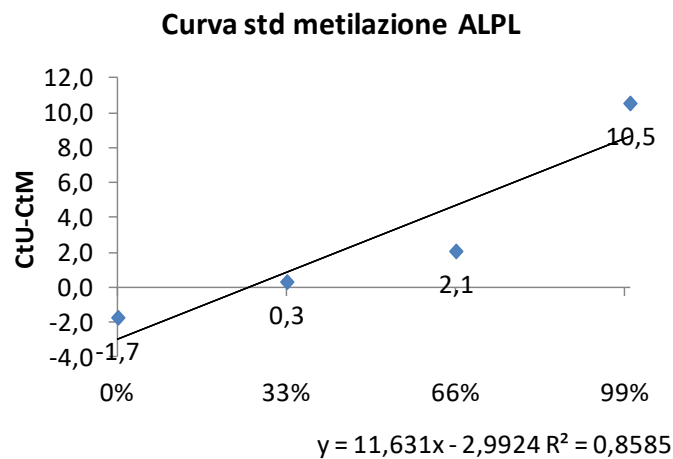


Figura 15bis. Curva standard della metilazione di ALPL. Curva standard di riferimento per l'interpolazione dei dati, ottenuta dai ΔCt (Ct non metilato - Ct metilato) delle reazioni di amplificazione in RT-PCR di 4 mix di DNA genomico umano metilato e non metilato in percentuali note.

Set di primers	Sequenza (5'-3')	T (A)	Mix (x1)
U	S	58	H ₂ O..... X µL
	AS		SYBR Gr Master Mix 2x
M	S		Primers2.5 µL
	AS		DNA conv... 10-20 ng
			Vol tot.25 µL

Tabella 3. Primers e condizioni di MS-PCR per ALPL. Per ogni reazione sono stati utilizzati 40 cicli di amplificazione. U, non metilato; M, metilato; S, senso; AS, antisenso; T(A), temperatura di annealing in °C.

3.19. Studi *in vivo*: modello murino di xenotrapianto da osteosarcoma

Questo studio è stato condotto in collaborazione con il laboratorio di immunologia e biologia delle metastasi dell'istituto di cancerologia di Bologna, diretto dal Prof. Pier-Luigi Lollini.

Topi NSG (NOD-SCID-gamma, Charles River laboratories, UK), di 5-11 settimane di vita, hanno ricevuto uno xenotrapianto sottocutaneo di un frammento bioptico derivato da paziente con diagnosi di osteosarcoma. Il protocollo di ricerca è stato approvato dal comitato etico e il paziente ha firmato un consenso informato. I topi sono stati mantenuti in specifiche condizioni in base alle linee guida dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (IRFMN, Milano, Italia): esenti da microrganismi patogeni, a temperatura e umidità costanti. Dopo l'attecchimento, la crescita tumorale è stata monitorata. Le dimensioni dei tumori sono state misurate utilizzando un calibro a corsoio, e i volumi sono stati calcolati secondo la formula: volume del tumore in mm³ = (larghezza² × lunghezza) / 2. Il tumore è stato propagato per almeno 4 generazioni di topi e controllato di volta in volta per le caratteristiche istologiche, tramite fissazione, inclusione in paraffina, taglio e colorazione in Ematossilina/Eosina. Per quanto riguarda i trattamenti, sono stati utilizzati i topi dell'ottava generazione. Dai frammenti tumorali di questa generazione è stata derivata e caratterizzata anche una coltura cellulare, denominata OS/14 PDX8, che è stata fatta crescere *in vitro* per almeno 20 passaggi; i trattamenti con i farmaci sono stati eseguiti come per le linee cellulari di osteosarcoma sopra descritti. Una volta che i tumori hanno raggiunto un volume di 100 mg, gli animali (almeno 4 per gruppo) sono stati randomizzati per ricevere i trattamenti, 5 volte a settimana, sottoforma di iniezioni intraperitoneali del veicolo di controllo (PBS: DMSO 1: 1), DAC 0,8 mg / kg o iniezioni intra-peritumorali di MC 3343 20 mg/kg. Il peso corporeo e i volumi tumorali sono stati misurati in ogni momento del trattamento. Gli esperimenti sono stati terminati dopo 21 giorni di trattamento, salvo superamento dei valori limite stabiliti per legge. I frammenti tumorali sono stati in parte congelati a -80°C per le analisi di biologia molecolare e in parte fissati

in formaldeide, inclusi in paraffina e tagliati per le colorazioni e le analisi immunistochemiche. Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati approvati in anticipo dal Comitato Etico.

3.20. Immunoistochimica

I campioni tumorali da xenotrapianti sono stati fissati in formaldeide al 10% e inclusi in paraffina. Dalle inclusioni sono state tagliate delle sezioni di 5 μm di spessore e poste su vetrini rivestiti di poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Per la procedura di immunocolorazione è stato utilizzato il metodo avidina-biotina-perossidasi, come descritto in precedenza [317]. Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti: anti-DNMT1 (1:50, Santa Cruz, cat no. sc 271.729) anti-Ki-67 (1:50, Calbiochem, cat no. NA21-2). I nuclei sono stati contrastati con Ematossilina (Sigma-Aldrich). L'analisi delle cellule positive a Ki-67 come indice di proliferazione è stata effettuata tramite conta semiautomatica con software Nis Elements, sono stati acquisiti 3-4 campi per un totale di circa 1000 cellule per campione.

3.21. Colorazione Von Kossa (VK)

La colorazione Von Kossa è stata usata per la valutazione dei depositi di matrice ossea sui vetrini dei campioni tumorali da xenotrapianto. I vetrini hanno seguito il processo di sparaffinatura con gli alcoli e poi sono stati trattati con una soluzione acquosa di AgNO_3 2% sotto luce diretta per 60'. Successivamente sono stati trattati con tiosolfato di sodio al 5% per 2' e lavati con H_2O distillata. Il contrasto nucleare è stato effettuato con rosso neutro 1%.

3.22. Analisi statistica

La differenza tra le medie dei singoli esperimenti è stata calcolata usando il test del t Student a due code o il test χ^2 . Gli indici di combinazione (CI) per le interazioni farmaco-farmaco sono stati calcolati con l'equazione di isobologramma di Chou-Talalay [318], utilizzando il software CalcuSyn (Biosoft). Le correlazioni sono state effettuate utilizzando il test di Pearson con il software Sigma Stat.

4. Risultati

4.1. Azione demetilante dei nuovi composti

Gli inibitori epigenetici MC 3343 e MC 3353 sono inibitori non-nucleosidici delle Dnmts che sono stati sintetizzati come dei regioisomeri derivanti da un composto basato sulla chinolina, SGI-1027 (Figura 16) [153].

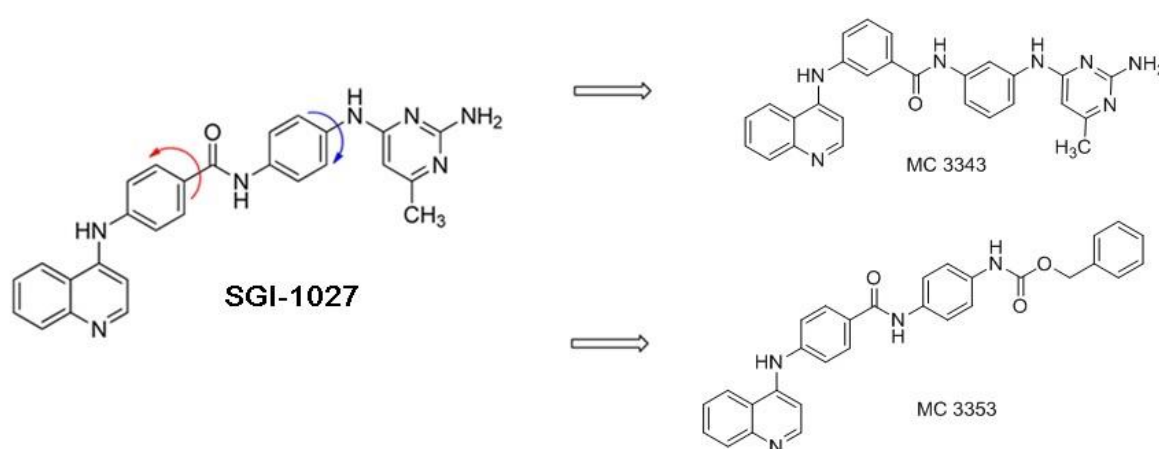


Figura 16. Sintesi chimica che ha portato alla formazione dei composti MC 3343 e MC3353 a partire dal farmaco SGI-1027.

Inizialmente i due composti sono stati testati tramite saggi enzimatici cell-free per valutarne l'attività inibitoria nei confronti dell'enzima Dnmt1 umano (hDNMT1) e del dominio catalitico C-terminale della Dnmt3a umana (hDNMT3A). I farmaci non-nucleosidici RG-108 e SGI-1027 sono stati utilizzati come farmaci di riferimento (Tabella 4).

Nei saggi inibitori su entrambi gli enzimi, MC 3343 e in misura minore anche MC 3353, mostrano un'efficacia decisamente maggiore rispetto a RG-108. MC 3353 risulta meno efficace rispetto a MC3343 e SGI-1027. È interessante notare che nei confronti della Dnmt1 MC 3343 rappresenta l'inibitore più potente, di 2 volte più efficace anche

Composto	EC ₅₀ ± SD (µM)	
	hDNMT1	hDNMT3A
RG-108	390 ± 50	> 500
SGI-1027	11.9 ± 2.3	0.84 ± 0.20
MC3343	5.7 ± 0.30	1.7 ± 0.40
MC3353	67 (59 – 75) ^a	17 ± 3

Tabella 4. Attività inibitoria di MC 3343 e MC3353. I valori di EC₅₀, corrispondono alla concentrazione del composto tale da determinare l'inibizione del 50% dell'attività enzimatica. ^a Intervallo di confidenza 95%.

di SGI-1027 .

4.2. Effetto sulla crescita in monostrato delle cellule di sarcoma

Per studiare l'effetto di questi nuovi composti nel contesto dei sarcomi ossei, il percorso è iniziato con la valutazione degli effetti sulla crescita *in vitro* di un pannello di linee cellulari rappresentativo dei due più comuni tumori primari dell'osso, l'osteosarcoma e il ES (Tabella 5). Le linee di osteosarcoma e ES umano sono state coltivate in presenza di concentrazioni crescenti di MC 3343 (0.5-30 μM) e MC 3353 (0.1-5 μM). Parallelamente è stato valutato anche l'effetto di un inibitore del tipo non-nucleosidico di riferimento come la 5-aza-deossicitidina (DAC), sempre a dosi crescenti (0.1- 100 μM). L'esposizione a ciascun composto ha indotto una notevole inibizione della crescita in maniera dose-dipendente in tutte le linee cellulari analizzate. Per quanto riguarda il trattamento con MC 3353, i valori di IC_{50} (concentrazione necessaria ad inibire la crescita cellulare del 50%) sono risultati nel range 0.6 - 3 μM , dimostrando un'efficacia maggiore rispetto al trattamento con MC 3343 che presentava un' IC_{50} nel range di 2.4-30 μM (Tabella 5).

Linea cellulare	Fenotipo tumorale	IC_{50} DNMTi (μM)			Dnmt1 (espressione proteica)
		non-nucleosidici		nucleosidici	
		MC 3343	MC 3353	DAC	
Saos-2	OS	5.06 \pm 1.78	0.91 \pm 0.28	0.9 \pm 0.2	0.46 \pm 0.2
IOR/OS14	OS osteoblastico	5.33 \pm 0.23	1.79 \pm 0.48	> 100	0.41 \pm 0.01
MG-63	OS fibroblastico	6 \pm 0.7	3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.05	1.27 \pm 0.3
IOR/OS9	OS osteoblastico	8.6 \pm 1.5	2.9 \pm 0.1	6.5 \pm 3.9	0.51 \pm 0.1
IOR/OS10	OS fibroblastico	9.45 \pm 1.7	2.5 \pm 0.3	0.1 \pm 0.04	0.50 \pm 0.22
U-2 OS	OS	24.52 \pm 3.61	0.65 \pm 0.26	0.6 \pm 0.2	0.51 \pm 0.03
IOR/OS20	OS osteoblastico	29.38 \pm 3.18	1.43 \pm 0.05	12.8 \pm 3.5	0.03 \pm 0.01
IOR/CAR	ES	2.44 \pm 0.3	0.67 \pm 0.2	6.9 \pm 1.2	1.02 \pm 0.01
SK-N-MC	PNET	2.96 \pm 0.16	0.64 \pm 0.1	1.2 \pm 0.6	1.13 \pm 0.42
A673	ES	3.7 \pm 1.10	1.15 \pm 0.63	4.6 \pm 0.2	1.24 \pm 0.3
6647	ES	3.9 \pm 0.76	1.95 \pm 0.45	1.4 \pm 0.3	1.06 \pm 0.06
TC-71	ES	4.01 \pm 0.39	1.88 \pm 0.19	36.1 \pm 3.1	1.73 \pm 0.52
LAP-35	PNET	4.64 \pm 0.98	1.12 \pm 0.12	> 100	0.57 \pm 0.27

Tabella 5. IC_{50} DNMTi su linee cellulari di OS e ES ed espressione Dnmt1. I valori si riferiscono a saggi di vitalità cellulare (trypan blu) a 72 e 96 ore di trattamento per le linee OS ed ES, rispettivamente. I valori di espressione della Dnmt1 sono indicati come record di densitometria (normalizzazione: OD x mm^2 Dnmt1 / OD x mm^2 Actina). I dati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti \pm l'errore standard. IC_{50} = concentrazione di farmaco che induce il 50% di inibizione della crescita rispetto al controllo (cellule non trattate). I fenotipi tumorali sono stati descritti in Ottaviano L. et al., Genes Chromosomes Cancer, 2010.

Inoltre, mentre la sensibilità a MC 3353 presentava una variazione minima da linea a linea, sia nell'osteosarcoma che nel ES, i risultati ottenuti con MC 3343 hanno dimostrato un certo grado di variabilità. Infatti, il range di IC_{50} osservato è risultato sicuramente più ampio, e alcune linee di

osteosarcoma sono risultate più resistenti a questo trattamento con valori anche 6 volte maggiori alla media delle altre cellule, come nel caso di U-2 OS e IOR/OS20. Il trattamento con DAC ha evidenziato un effetto ancora più variabile con valori di IC₅₀ che vanno da 0.1 a oltre 100 µM, senza distinzione fra OS ed ES. Fra le linee più sensibili 4 OS e fra quelle più resistenti IOR/OS14, TC-71 e LAP-35. Per comprendere le ragioni di questa variabilità abbiamo valutato l'espressione proteica delle Dnmts nello stesso pannello di linee cellulari (Tabella 5) ed è emersa una sola correlazione statisticamente significativa, di tipo negativo, tra l'IC₅₀ di MC 3343 e l'espressione della Dnmt1 (Spearman, coefficiente di correlazione = -0,610, p = 0,0254). Questo indica che, nelle linee utilizzate, il livello di espressione dell'enzima Dnmt1 influisce sulla sensibilità al composto MC 3343, dimostrandone una buona specificità in questi contesti cellulari. In particolare tanto più alto è il livello di espressione della Dnmt1, quanto minore risulta l'IC₅₀ del composto.

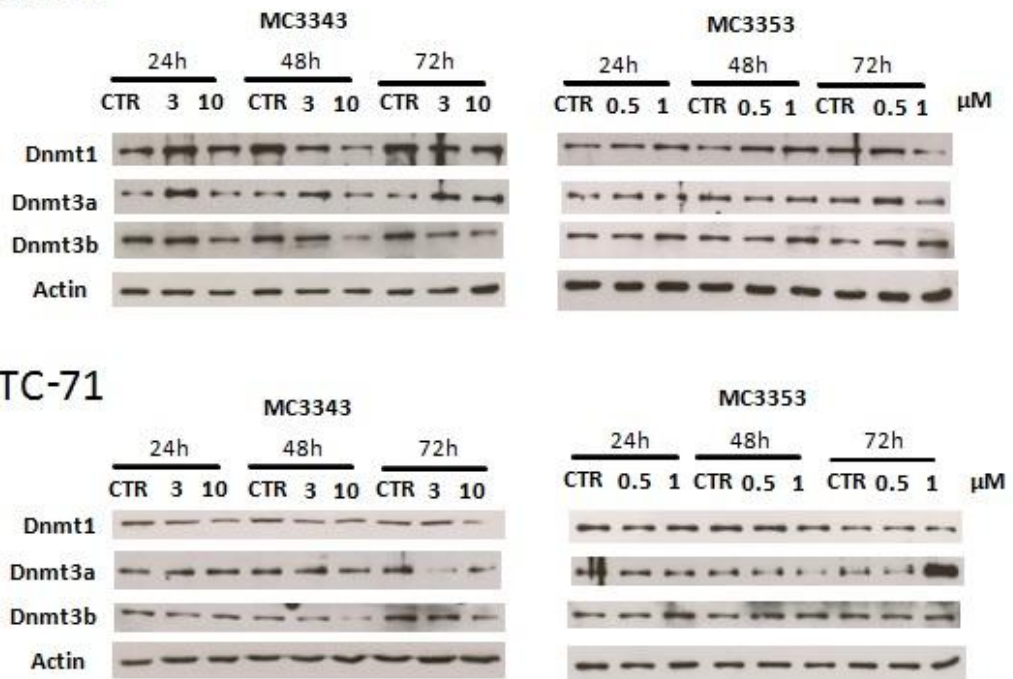
4.3. Specificità d'azione: effetto sull'espressione e sull'attività enzimatica delle Dnmts

Per approfondire quanto l'efficacia dei due composti potesse essere influenzata dall'espressione proteica del target enzimatico, è stato scelto di trattare due linee, una per tipo tumorale (OS e ES), fra quelle con l'espressione basale più alta e buona sensibilità ai trattamenti. Le linee cellulari Saos-2 e TC-71 sono state quindi trattate per 24,48 e 72h, con dosi crescenti di MC 3343 e MC 3353. Quindi l'espressione delle Dnmts è stata valutata in western blot. Come si vede in figura (Figura 17A), il trattamento con MC 3343 dimostra un effetto sull'espressione della Dnmt1 di tipo dose-dipendente, più evidente a 48 ore sulla linea Saos-2 e a 24 ore sulla linea TC-71. L'effetto del farmaco è specifico per Dnmt1, in quanto l'espressione delle Dnmt3 non sembra essere influenzata né dalle dosi né dai tempi di somministrazione di entrambi i composti. Per quanto concerne il composto MC 3353, non è stato rilevato un effetto apprezzabile sull'espressione della Dnmt1, né sulle Dnmt3. La specificità d'azione dei composti ha però trovato parziale conferma nei saggi di attività enzimatica DNA-metiltransferasica. Tale saggio analizza l'attività globale, senza evidenziare effetti enzima-specifici, ed è pertinente con il meccanismo d'azione proposto per SGI-1027 e per questi composti di sua derivazione, riguarda la capacità di bloccare l'attività enzimatica attraverso la competizione con AdoMet nella reazione di metilazione del DNA substrato [153, 155]. Il composto MC 3343 ha dimostrato, anche in questo caso un effetto più pronunciato rispetto a MC 3353 (Figura 17B). L'inibizione dell'attività DNA-metiltransferasica ha infatti raggiunto la significatività statistica in entrambe le linee con la maggior parte delle dosi utilizzate. MC 3353 ha mostrato un effetto più limitato con risultati non sempre significativi nelle due linee cellulari, a conferma della minore selettività d'azione. Un ulteriore completamento e conferma degli effetti sul

target è stato poi fornito dagli esperimenti di immunofluorescenza condotti sugli stessi modelli cellulari. Come si vede in figura (Figura 18), l'espressione della Dnmt1, che si localizza a livello nucleare, diminuisce in intensità in seguito al trattamento con le dosi di IC₅₀ e IC₇₀, del composto MC 3343, sia nel modello OS Saos-2 che in quello ES, TC-71. L'effetto sul livello di espressione della Dnmt1 è comunque transiente, come dimostra la parziale ri-espressione dell'enzima dopo 72 ore di trattamento con il composto MC 3343 nella linea di osteosarcoma Saos-2. Anche con questa analisi il trattamento con MC 3353 non risulta avere effetti apprezzabili sul livello di espressione dell'enzima Dnmt1, indicando un'azione citotossica generica sulle linee di sarcoma senza una precisa azione bersaglio-specifica.

A

Saos-2



B

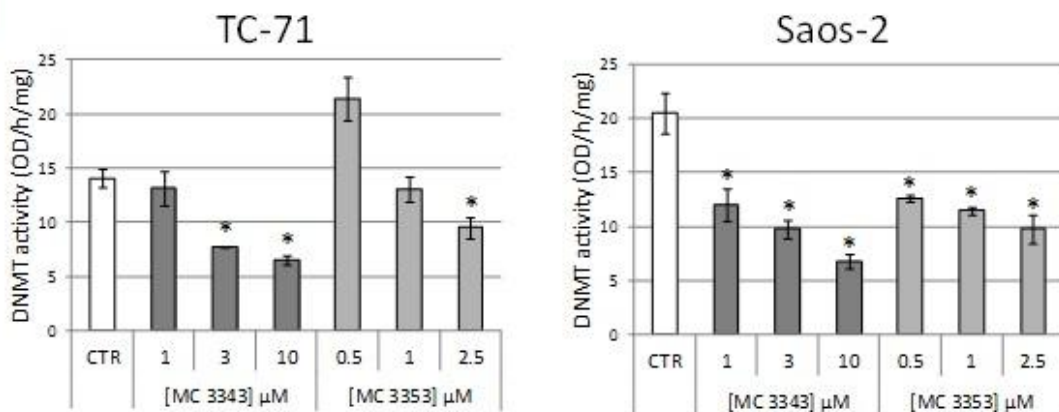


Figura 17. Effetto MC 3343 e MC 3353 su espressione e attività Dnmts. (A) Effetto dei composti sul livello proteico d'espressione di Dnmt1, Dnmt3a e Dnmt3b a 24-48-72 h di trattamento su Saos-2 e TC-71. Il dato è rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti. (B) Effetto sull'attività enzimatica a 24h di trattamento per TC-71 e 48h su Saos-2. I dati sono espressi come attività DNA metiltransferasica globale, (OD / h / μg di proteina), test t di student = * p < 0.05 .

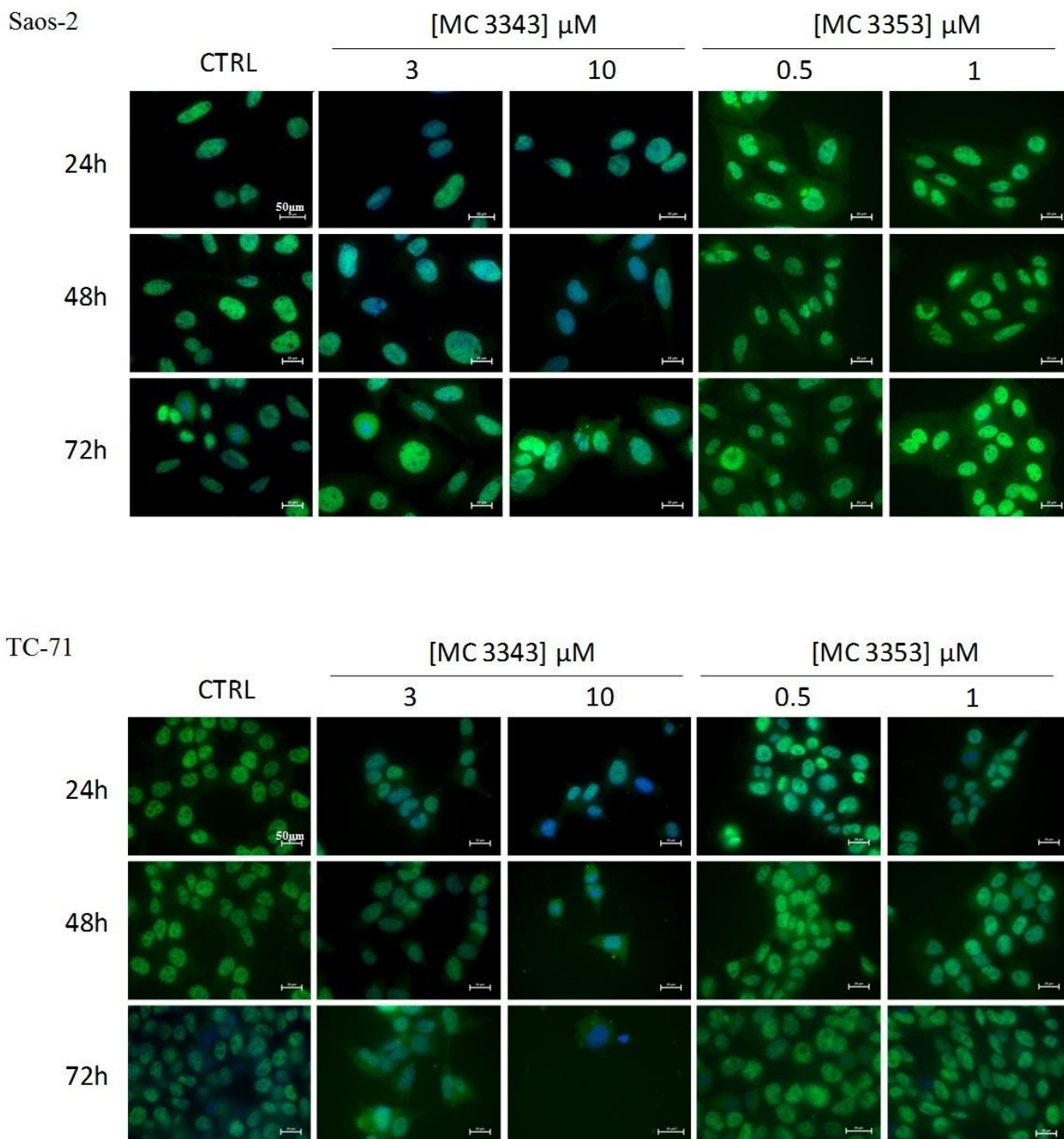
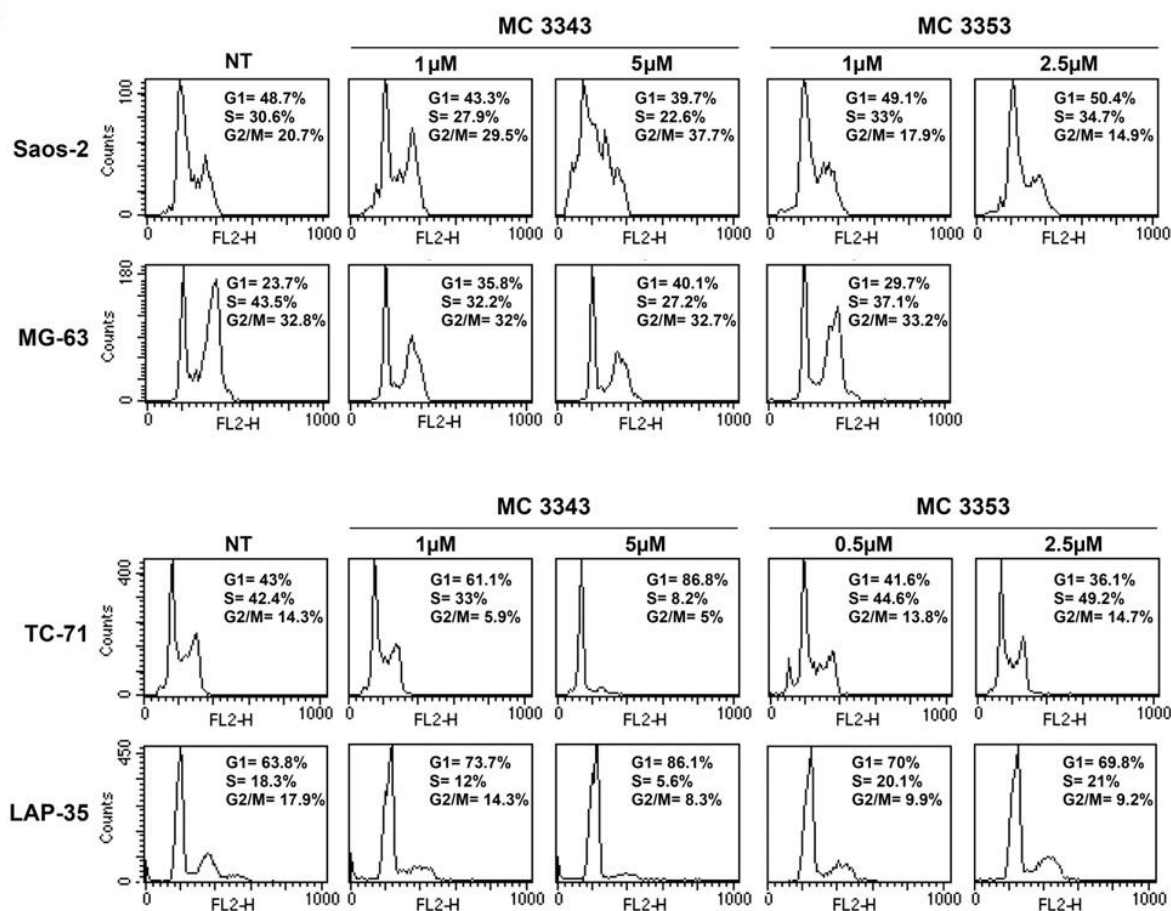


Figura 18. Effetto di MC 3343 e MC 3353 sull'espressione di Dnmt1 in Immunofluorescenza. L'espressione nucleare di Dnmt1 diminuisce in maniera dose dipendente con MC 3343 in Saos-2 e TC-71, in Saos-2 il segnale risale a 72h. MC 3353 non induce una diminuzione apprezzabile di Dnmt1. Le immagini sono rappresentative di esperimenti condotti in triplicato. Le acquisizioni di almeno 5 campi di osservazione per campione, sono state effettuate ad un ingrandimento di 60x (microscopio a fluorescenza in immersione a olio, fotocamera DigitalColor (Nikon DS5MC), software NIS-Elements AR3.10 (Nikon)), le barre di scala sono di 50 μm .

4.4. Effetto sul ciclo cellulare

Dopo aver dimostrato gli effetti sul target enzimatico si è cercato di delineare quali meccanismi potevano influenzare l'effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare evidenziato nell'ampio pannello di linee. Per verificare se quanto osservato potesse essere collegato ad un effetto sul ciclo cellulare, è stato utilizzato il test di incorporazione della bromodesossitimidina (BrdU). L'indagine è stata effettuata nelle stesse linee cellulari dove era stato approfondito l'effetto sul target, ma anche su altri due modelli cellulari, uno di OS fibroblastico (MG-63) e uno di ES PNET (LAP-35) che presentavano livelli intermedi di sensibilità ai composti MC 3343 e MC 3353. Le linee OS ed ES sono state analizzate rispettivamente a 48 e 24 ore di trattamento, nel rispetto dei differenti tempi di raddoppiamento delle popolazioni cellulari. Il composto MC 3343 ha determinato un rallentamento della crescita in tutte le linee analizzate, inducendone un blocco del ciclo cellulare (Figura 19A). Nelle linea Saos-2 si evidenzia un significativo accumulo delle cellule in fase G2/M più evidente alla dose di 5 μ M corrispondente alla IC₅₀. Per quanto riguarda la linea MG-63, si evidenzia invece un accumulo delle cellule nella fase G0/G1 ad entrambe le dosi utilizzate, un effetto ancora più evidente nelle linee ES TC-71 e LAP-35. L'analisi in western blot di alcuni regolatori chiave del ciclo cellulare ha confermato i dati di incorporazione della BrdU. Infatti come si vede in figura (Figura 19B), sia nella linea OS MG-63 che nella linea ES TC-71, solo il trattamento con MC 3343 risulta in grado di down-regolare la ciclina D1 e i livelli di fosforilazione di Rb (S780), a dimostrazione dell'incapacità delle cellule di entrare nella fase S del ciclo cellulare [319, 320]. Sembra quindi plausibile che l'inibizione della proliferazione, indotta dal trattamento con il composto MC 3343 sia legata, ad un blocco del ciclo cellulare. MC 3353 non sembra avere come effetto la capacità di modulare il ciclo cellulare in nessuno dei contesti cellulari analizzati (Figura 19A e B)

A



B

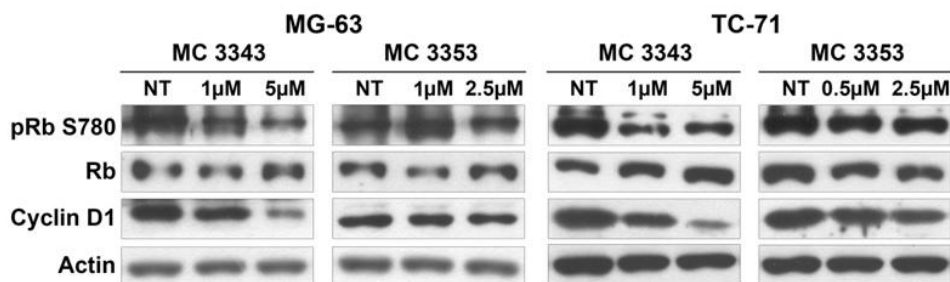
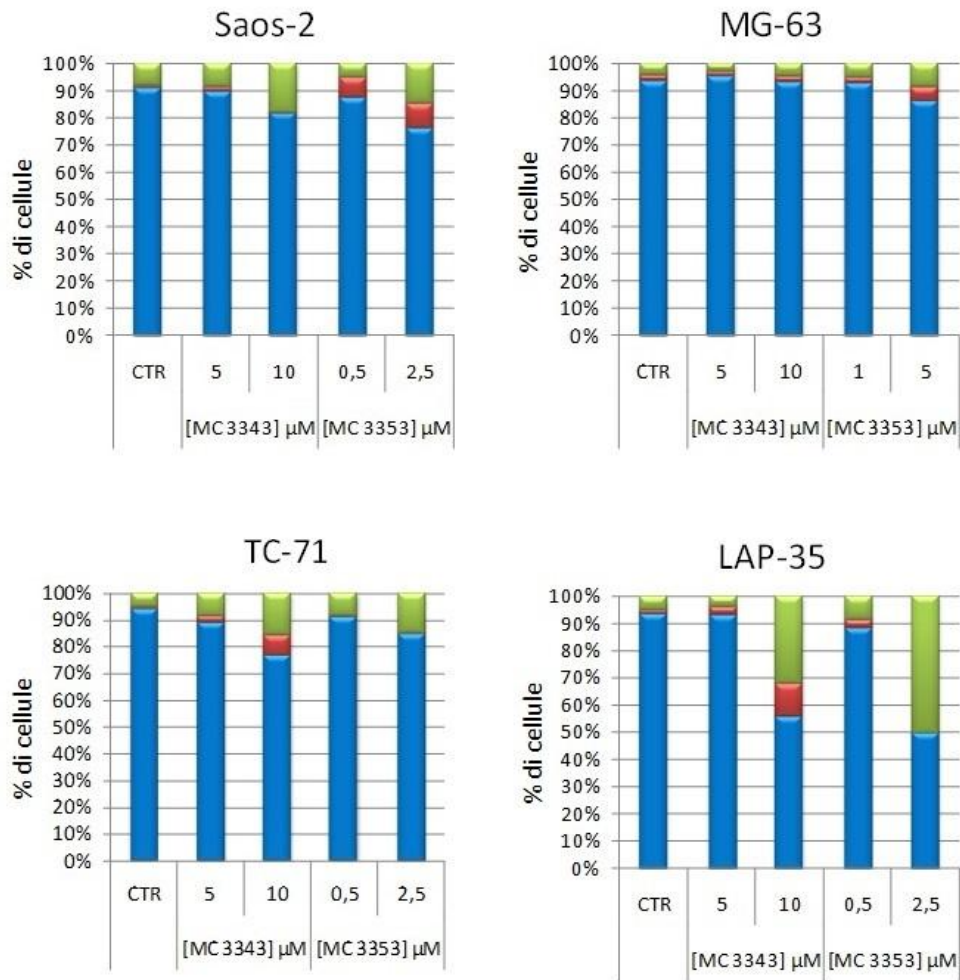


Figura 19. Effetti sul ciclo cellulare. (A) Effetto di MC 3343 e MC 3353 sul ciclo cellulare valutato in citofluorimetria. I dati provengono da un esperimento rappresentativo di due esperimenti indipendenti. (B) Analisi in Western Blot della ciclina D1, e pRb (Ser780) su lisati cellulari ottenuti da cellule non trattate (controllo, NT) o trattate con MC 3343 o MC 3353 per 24-48h.

4.5. Effetto sulla morte cellulare

Per valutare un eventuale effetto sull'apoptosi o più in generale sulla morte cellulare dopo trattamento con i composti in esame, è stato scelto di utilizzare il test dell'anessina (AnV fluorescinata) unito a marcatura con ioduro di propidio (PI) e rilevazione citofluorimetrica. In tutte le linee testate, il composto MC 3343 non ha evidenziato alcun effetto sull'apoptosi se non alla dose più elevata, in TC-71, LAP-35 e Saos-2, dove però prevale soprattutto la necrosi, con un aumento delle cellule PI positive e AnV negative. Anche il trattamento con MC 3353 non sembra avere effetti apprezzabili sull'apoptosi, e nelle linee prevale l'effetto necrotico alla dose più alta come per MC 3343. In parallelo è stato valutato il clivaggio di PARP in western blot, per cercare di evidenziare anche eventi precoci di apoptosi innescati dalla cascata delle caspasi. Tuttavia, la forma clivata è presente esclusivamente alle dosi più alte dei farmaci dove coincide con eventi principalmente necrotici, legati alla tossicità aspecifica dei composti.

A



B

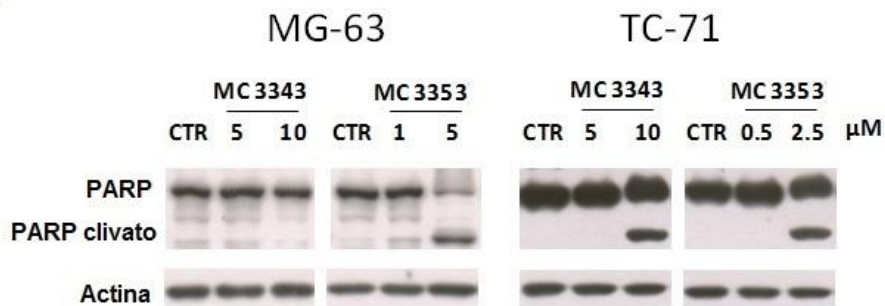


Figura 20. Induzione di apoptosi e morte cellulare. (A) Apoptosi e necrosi dopo trattamento con MC 3343 e MC 3353, valutate come esposizione di annessina V in membrana e incorporazione di ioduro di propidio (PI), detection citofluorimetrica. (B) Analisi di apoptosi mediante Western blotting per PARP dopo 24-48 ore di trattamento, la forma clivata è indice di attivazione delle caspasi.

4.6. Induzione del differenziamento nelle cellule di sarcoma

Insieme alla regolazione di geni coinvolti nel ciclo cellulare e nell'apoptosi, le modificazioni epigenetiche rivestono un ruolo chiave anche nei processi di *commitment* e differenziamento. Un aspetto che risulta particolarmente importante in questo tipo di tumori, è rappresentato dai meccanismi differenziativi, spesso compromessi, dove i fenotipi trasformati presentano caratteristiche proprie dei vari stadi cellulari del differenziamento delle MSCs o delle cellule staminali della cresta neurale, come nel caso di OS ed ES. Per cercare di valutare l'effetto dei composti sul differenziamento, le linee cellulari di ES ed OS sono state trattate con basse dosi dei DNMTi per tempi prolungati. Nel caso di ES è stata poi valutata la morfologia e l'espressione di marcatori neurali mentre nei modelli OS è stata monitorata la produzione di matrice ossea mineralizzata e l'espressione dei vari marcatori del lineage osteoblastico.

4.6.1. Effetto sul differenziamento neurale nelle cellule ES

Considerando che ES sembra derivare da cellule staminali di origine mesenchimale o neuroectodermica deviate verso un differenziamento neurale di tipo aberrante da parte di EWS-FLI1 [252, 321], è stata valutata la capacità di MC 3343 e MC 3353, in comparazione con DAC, di ripristinare l'espressione di marcatori terminali del differenziamento neurale, come β -III tubulina e neurofilamento pesante (200 kDa H-NF) nelle linee TC-71 e LAP-35. L'esposizione delle cellule a dosi di IC_{30} e IC_{50} per 72 ore ha comportato un'importante modifica della morfologia cellulare, con corpi cellulari che si riducono in dimensione e lunghi processi citoplasmatici che si estendono in varie direzioni alla ricerca di contatti con altre cellule, particolarmente evidenti nel trattamento con MC 3343 (Figura 21). Le immagini di fluorescenza mostrano inoltre come venga indotta l'espressione dei marcatori neurali in entrambe le linee. Nel trattamento con MC 3343 si apprezza un'intensità di segnale elevata insieme ad una localizzazione, sia della β -III tubulina che di H-NF, su tutta la lunghezza dei neuriti. Il trattamento con MC 3353 ha dimostrato un'induzione più attenuata dei marcatori, che tuttavia all'analisi quantitativa non è risultata significativa. DAC invece sembra indurre un fenotipo diverso, con nuclei molto dilatati, scarsa presenza di neuriti ed una marcatura della β -III tubulina non in tutte le cellule. Inoltre la localizzazione rimane diffusa e quasi esclusivamente nel corpo cellulare, indicando un citoscheletro organizzato non secondo un fenotipo neurale. L'analisi quantitativa ha dimostrato una modulazione del numero dei neuriti a seconda del trattamento (Figura 22 B). Nello specifico l'aumento delle cellule con lunghe estensioni citoplasmatiche ha raggiunto una significatività statistica solo dopo il trattamento con MC 3343

(Figura 22B, ** p <0,001, test χ^2). Contestualmente al differenziamento neurale, nei trattamenti con MC3343 e DAC, è stato osservato un blocco proliferativo, come dimostrato dalla riduzione della marcatura nucleare per Ki-76 (Figura 22C, ** p <0,001, Test χ^2). I dati suggeriscono quindi che, in questi contesti cellulari, dei due inibitori non-nucleosidici, soltanto MC 3343 dimostra la capacità di spingere verso il differenziamento neurale in maniera specifica, unendo all'effetto di inibizione della proliferazione, anche quello di induzione genica del processo differenziativo. La DAC non ha mostrato questa capacità, confermando soltanto l'effetto anti-proliferativo.

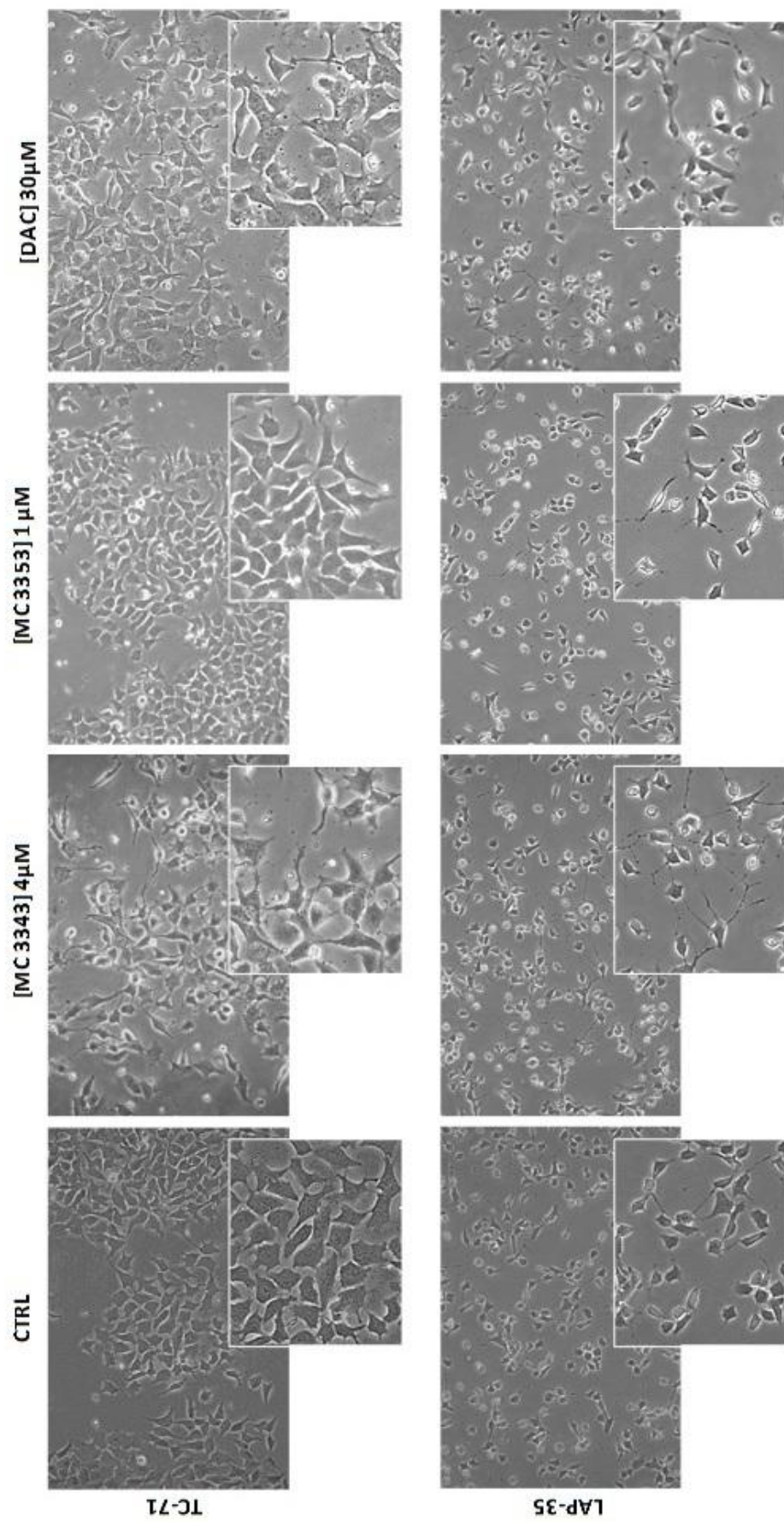
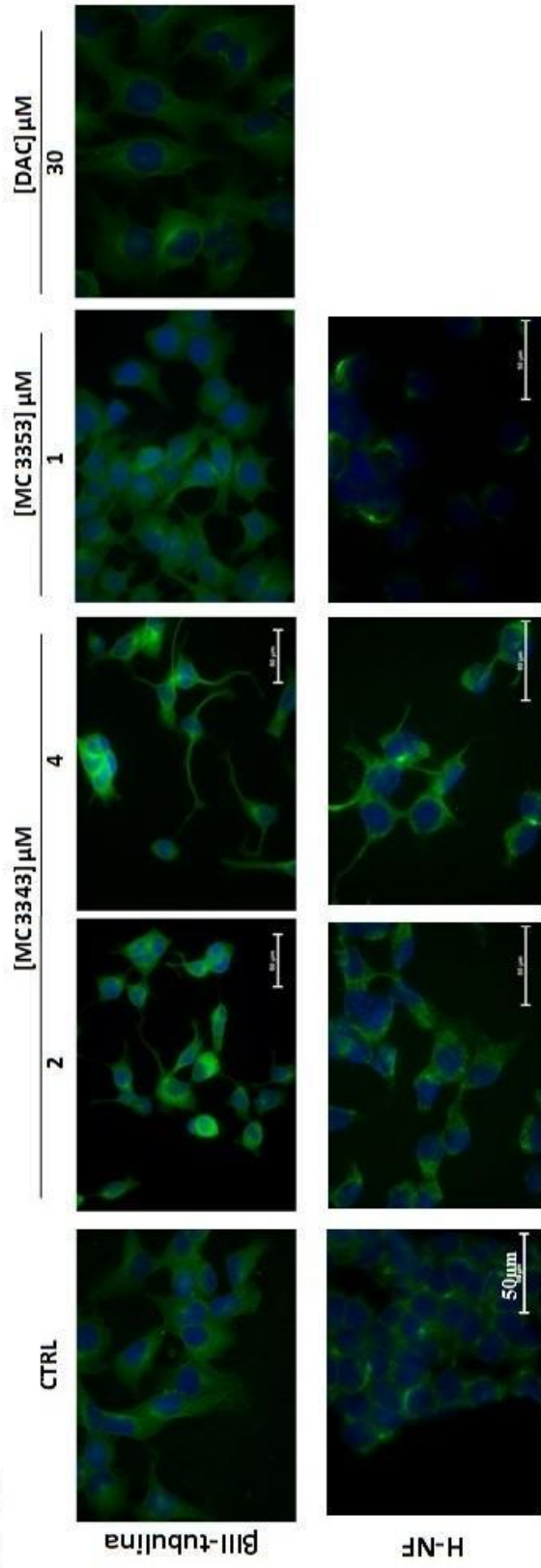
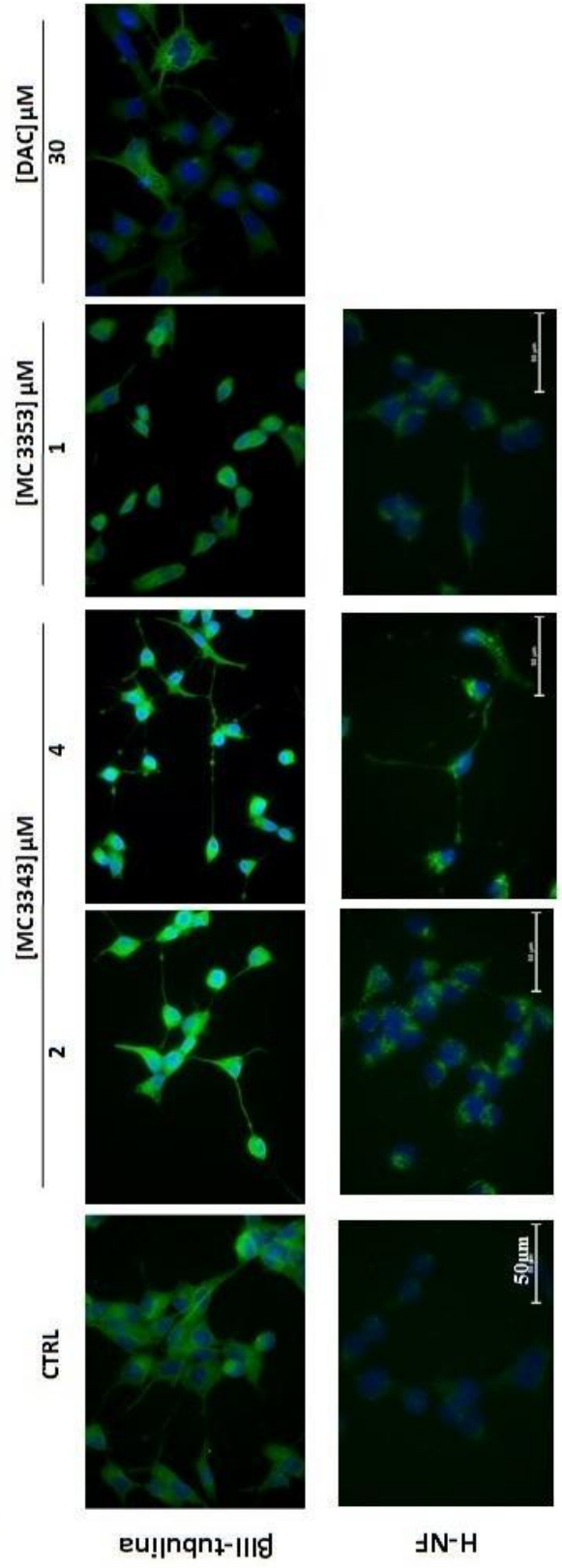


Figura 21. Cambiamenti morfologici in senso neurale dopo trattamento con DNMTi in linee ES. Le immagini mostrano il cambiamento di morfologia delle cellule TC-71 e LAP-35 in seguito ai trattamenti, negli ingrandimenti si evidenziano i lunghi processi citoplasmatici molto evidenti con MC 3343. Le immagini sono rappresentative di 5 campi diversi per campione e sono state acquisite su cellule vive attraverso un microscopio a luce rovesciata con un ingrandimento a 20x. Gli ulteriori ingrandimenti sono stati ottenuti dalle immagini acquisite. L'esperimento è rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti.

A TC-71



LAP-35



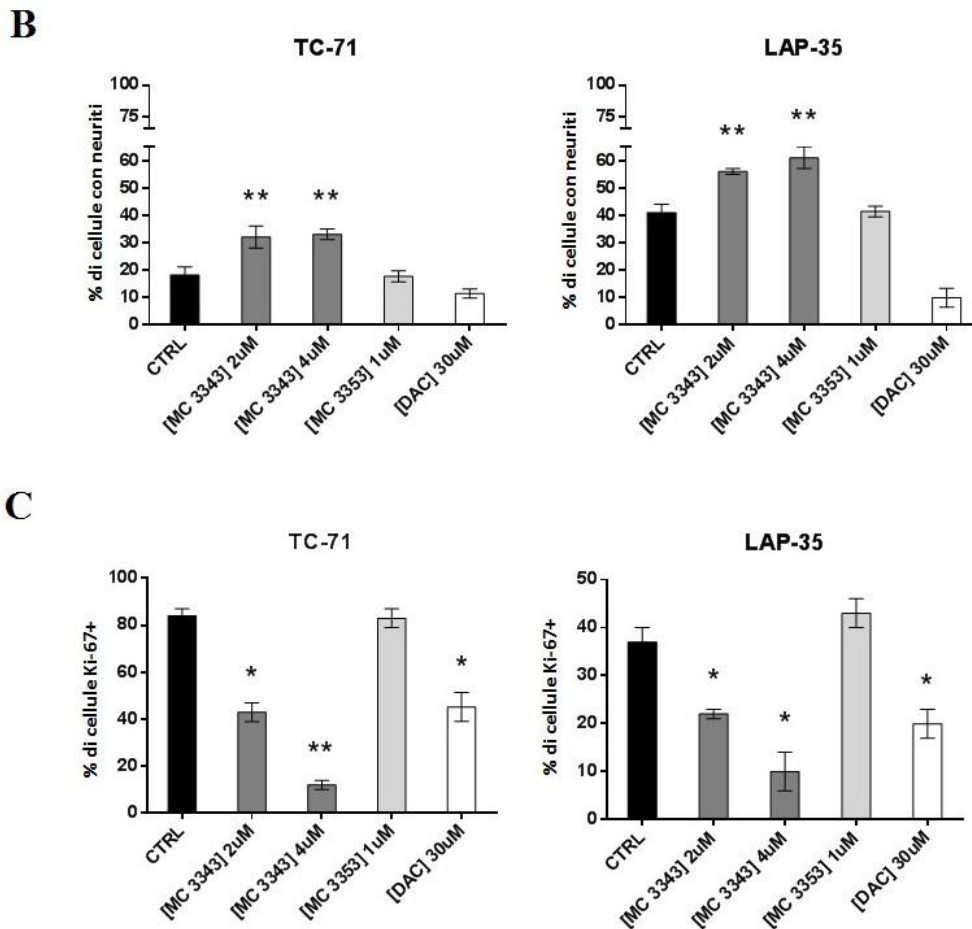


Figura 22. Induzione di marcatori del differenziamento neurale terminale. (A) Marcatura in IF con β - III tubulina e H-NF delle linee ES TC-71 e LAP-35 dopo 72 ore di trattamento con MC 3343, MC 3353 e DAC. (B) conta dei neuriti. (C) Analisi degli effetti su Ki-67 come indice di proliferazione. I dati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti e sono indicati come percentuali di cellule positive dalla conta di 5 campi diversi. La significatività (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.001$ come indicato, è stata calcolata con il test χ^2 . Le acquisizioni di almeno 5 campi di osservazione per campione, sono state effettuate ad un ingrandimento di 60x. Le barre di scala sono di 50 μ m.

4.6.2. Effetto sul differenziamento osteoblastico in linee OS

E' stato già evidenziato che i DNMTi sono in grado di riattivare il differenziamento nell'OS, infatti sembrano agire nei contesti cellulari alterati dei vari stadi dell'osteogenesi [166, 322]. Allo stesso modo, per indagare gli effetti dei composti sperimentali sul differenziamento delle cellule di OS, è stato utilizzato il modello cellulare Saos-2 che mostra caratteristiche simil-osteoblastiche e ha la capacità di differenziare in senso osteogenico quando mantenuto in mezzo differenziante (basso siero, acido ascorbico e β glicerofosfato) [323]. Gli osteoblasti producono e secernono proteine che

costituiscono la matrice ossea, come il collagene e l'osteocalcina (OCN), essenziali per la mineralizzazione dell'osteide, un processo mediato dalla fosfatasi alcalina (ALP). Di conseguenza, sono stati valutati gli effetti di MC 3343 e MC 3353, sempre in comparazione con DAC, sulla produzione di matrice mineralizzata (colorazione Alizarin Red, ARS) e sull'espressione dei marcatori del differenziamento che scandiscono le varie fasi (COL1A2, ALPL, OCN in qRT-PCR). Le cellule di Saos-2 sono state coltivate in mezzo differenziante per 21 giorni, in presenza o in assenza dei DNMTi. Sono state utilizzate basse dosi di entrambi i farmaci, corrispondenti alle IC₂₀-IC₃₀, in quanto gli esperimenti pilota avevano evidenziato una prevalente azione tossica alla dose di IC₅₀ per entrambi i farmaci (dato non mostrato). In seguito ai trattamenti, già a 7 giorni si è assistito ad un aumento della produzione di matrice e alla sua mineralizzazione. Questo fenomeno è continuato progressivamente nell'arco di tutti i 21 giorni. In concomitanza la proliferazione cellulare veniva inibita in maniera tempo-dipendente (Figura 23 A). L'estrazione del colorante ARS e la normalizzazione sul numero di cellule ha evidenziato, nel tempo, un effetto progressivo per il trattamento con MC 3343, non particolarmente rilevabile con MC 3353 e DAC (Figura 23 B). All'analisi in real-time dei marcatori di differenziamento osteoblastico a 7, 14 e 21 giorni, è emersa, per quanto riguarda MC 3343, un'induzione iniziale di RUNX2, che rappresenta il fattore trascrizionale master del differenziamento osteogenico, in grado di regolare diversi geni specifici. Inoltre si assiste ad una riduzione progressiva dell'espressione del collagene 1, che contraddistingue gli osteoblasti precoci, parallelamente ad un graduale aumento di ALP e OCN, marcatori invece di un'osteoblastogenesi matura (Figura 23 C). Il trattamento con MC 3353 ha dimostrato modulazioni più contenute, non significative, ed in linea con l'azione aspecifica evidenziata con i tests precedenti. Anche il quadro evidenziato dal trattamento con DAC risulta poco specifico, in quanto nessun marcatore osteoblastico risulta indotto, se non il collagene con andamento persistente nel tempo, a dimostrazione dell'imaturità del fenotipo osteoblastico. Per quanto riguarda l'espressione del trascritto delle DNMTs, non è stato rilevato alcun cambiamento evidente (dato non mostrato).

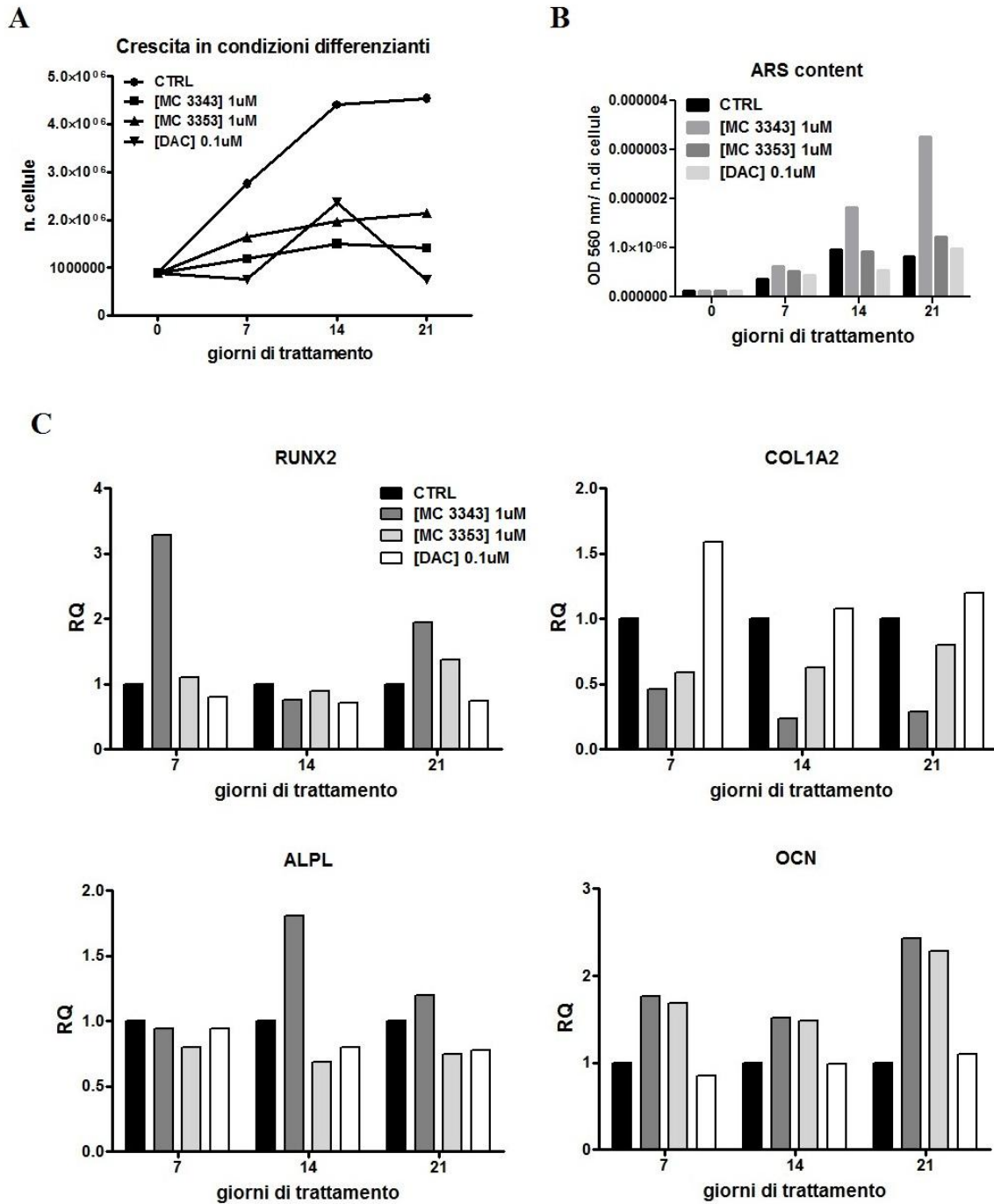


Figura 23. DNMTi e differenziamento osteoblastico in Saos-2. (A) Vitalità cellulare durante i 21 giorni di differenziamento (trypan blue). (B) Quantificazione colorimetrica del Rosso di Alizarina (ARS) normalizzato sul numero di cellule, indica la quantità di matrice mineralizzata. Assorbanza a 560 nm. I dati sono espressi come ARS OD / numero di cellule. (C) qRT-PCR dei marcatori degli osteoblasti: RUNX-2, COL1A2, ALPL e OCN, specifici dell'osteoblastogenesi iniziale intermedia e matura, rispettivamente. I dati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di 2 esperimenti indipendenti.

Per caratterizzare ulteriormente l'effetto di MC3343 e di DAC sul differenziamento del modello OS Saos-2, è stata analizzata l'espressione di un pannello più ampio di geni coinvolti nell'osteogenesi utilizzando una card array di qRT-PCR. L'analisi ha rivelato una modulazione genica di tipo differente fra MC 3343 e DAC. Come si vede in figura (Figura 24), nel trattamento con MC 3343 si conferma l'effetto specifico sul processo di osteoblastogenesi. Infatti il composto determina la modulazione di marcatori precoci del lineage osteoblastico: induce la down-regolazione dei collagene di tipo 1 α , un moderato aumento di espressione di ALPL al giorno 14 e una forte induzione di osteopontina (OPN). Allo stesso tempo si osserva la forte up-regolazione di RUNX2 al giorno 7 ed anche il mantenimento dell'up-regolazione di OCN nel tempo. In maniera quasi opposta, il trattamento con DAC determina un debole incremento dei collagene di tipo 1 α , la riduzione di ALPL, una lieve down-regolazione di RUNX2 e nessun effetto su OCN (Figura 24 A). Tra i geni modulati, inoltre, è stato possibile individuare molti componenti coinvolti del pathway delle BMPs (Figura 24 B). MC 3343 ha determinato un aumento dell'espressione della proteina morfogenetica ossea 2 (BMP2) insieme ad una debole induzione dei recettori BMPR1A e BMPR1B al giorno 7. Mentre il trattamento con MC 3343 favorisce l'induzione dei ligandi solubili, allo stesso tempo inibisce l'espressione di alcuni antagonisti del pathway BMP: Cordin (CHRD) risulta down-regolata dal giorno 7, mentre Noggin (NOG) ha mostrato una riduzione graduale nel tempo. Il profilo indotto da DAC, tuttavia, è meno specifico, infatti, oltre alla riduzione di BMP2, è stata osservata una debole up-regolazione dei recettori accompagnata però da un'importante induzione degli antagonisti CHRD e NOG. Il fattore di trascrizione RUNX2 non è risultato modulato. Parallelamente all'azione specifica sull'osteoblastogenesi, il composto MC 3343 ha comportato una diminuzione dei marcatori condroblastici (Figura 24C). E' possibile apprezzare la down-regolazione dei geni specifici di questo lineage come il collagene 2 α , il biglicano (BGN), che agisce nell'organizzazione strutturale della matrice extracellulare cartilaginea, e COMP, una proteina oligomerica sempre della cartilagine, che, dopo un'iniziale up-regolazione, viene spenta al giorno 14. L'azione di DAC rimane ambigua e sostanzialmente aspecifica, come indicato dalla modulazione operata sui geni del lineage cartilagineo e osteoclastico (Figura 24D). Dal momento che è stato utilizzato un modello *in vitro* di una linea cellulare OS già commissionata in senso osteoblastico, non si dovrebbero osservare modulazioni sui geni degli osteoclasti in quanto derivanti da un lineage completamente differente (mieloide) [324]. Tra i geni analizzati c'erano CTSK, che codifica per la catepsina K, e CALCR, il recettore di calcitonina. Mentre il composto MC3343 non

modula l'espressione di questi geni, DAC ne induce una consistente up-regolazione (Figura 24D).

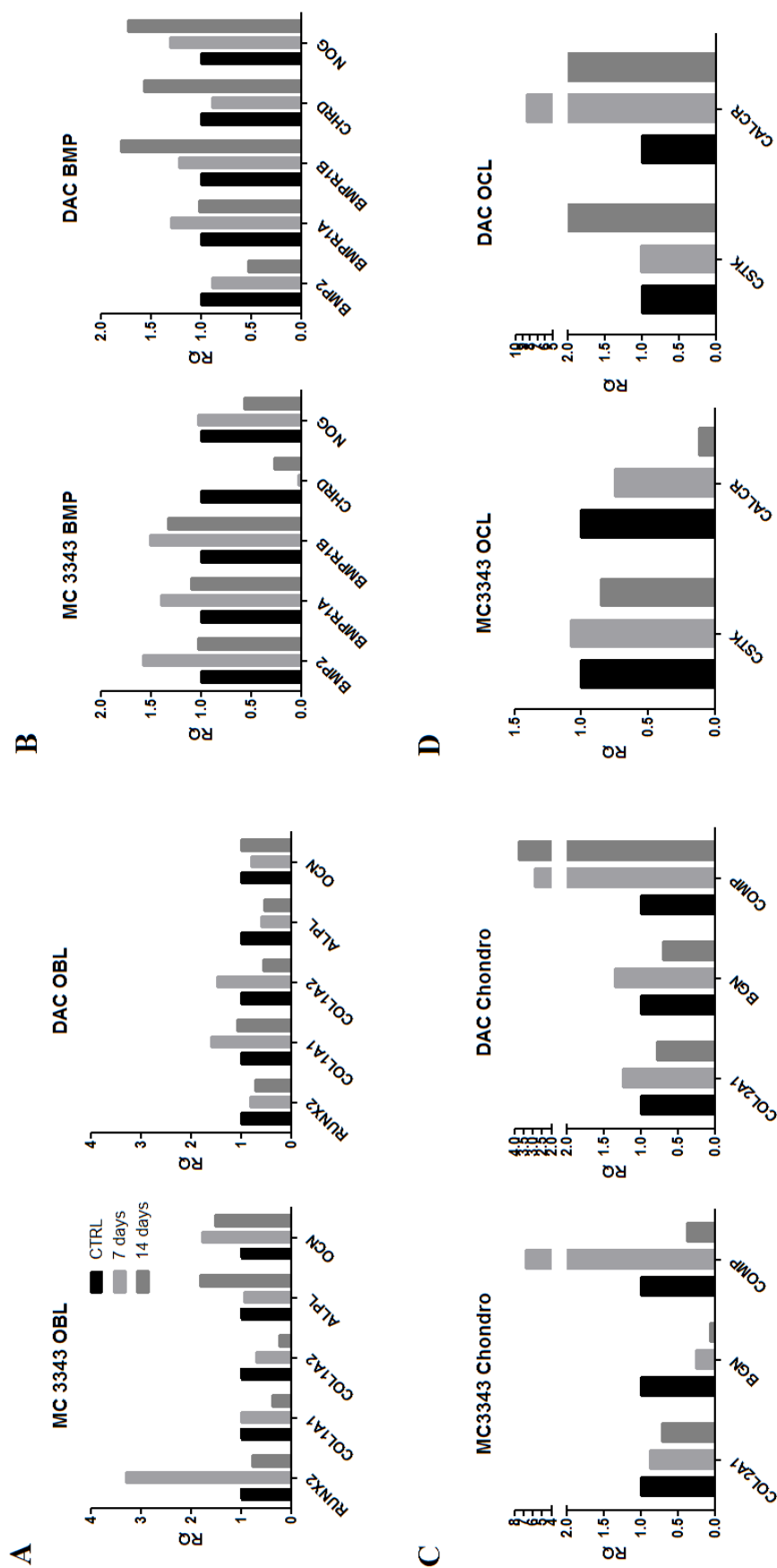


Figura 24. Marcatori dell'osteogenesi, analisi array di espressione genica. (A) espressione di marcatori osteoblastici; (B) BMP pathway; (C) marcatori condroblastici (D) e osteoclastici. L'espressione relativa dell'mRNA è stata calibrata su cellule non trattate (CTR) per ogni tempo ($2^{-\Delta\Delta CT} = 1$). I dati provengono da un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti.

4.6.3. Effetto sulla metilazione di ALPL

A conferma della specificità di azione del composto MC 3343 si è inoltre proceduto ad analizzarne l'azione sul livello di metilazione del gene codificante l'enzima per la fosfatasi alcalina specifica per osso, fegato e rene (liver/bone/kidney phosphatases, ALP L/B/K/ o ALPL). ALPL fa parte di una famiglia di glicoproteine di membrana che catalizzano l'idrolisi di fosfomonoesteri con liberazione di fosfato inorganico, partecipando così alla mineralizzazione delle ossa. Già altri studi hanno riportato come la metilazione del promotore di ALPL sia coinvolta nel silenziamento genico [226, 227]. Una valutazione quantitativa del livello percentuale di metilazione del promotore è stata ottenuta utilizzando un saggio di qMS-RT-PCR per una CGI a monte del sito di inizio della trascrizione e già descritta come soggetta a questa modifica epigenetica [226]. L'analisi è stata condotta in un pannello più ristretto di linee, ma comunque rappresentativo del contesto OS. Come si vede in figura (Figura 25A) i livelli di metilazione sono risultati diversi, ed è stato deciso di studiare un modello di OS osteoblastico con livelli intermedi di questa modifica epigenetica, come IOR/OS9. Il trattamento è stato condotto in condizioni non differenzianti, ma a dosi più alte di MC 3343 (IC_{50} e IC_{70}) in modo da poter apprezzare un effetto legato alla sola attività del composto ma in tempi più brevi necessari a rilevare precocemente la mancata metilazione del DNA substrato. Il trattamento ha indotto una moderata demetilazione del target già a 24 ore, parallelamente all'aumento del trascritto più evidente alle 48 ore (Figura 25B). Pur non portando a risultati esaustivi, questa analisi conferma ulteriormente la specificità d'azione del composto MC 3343.

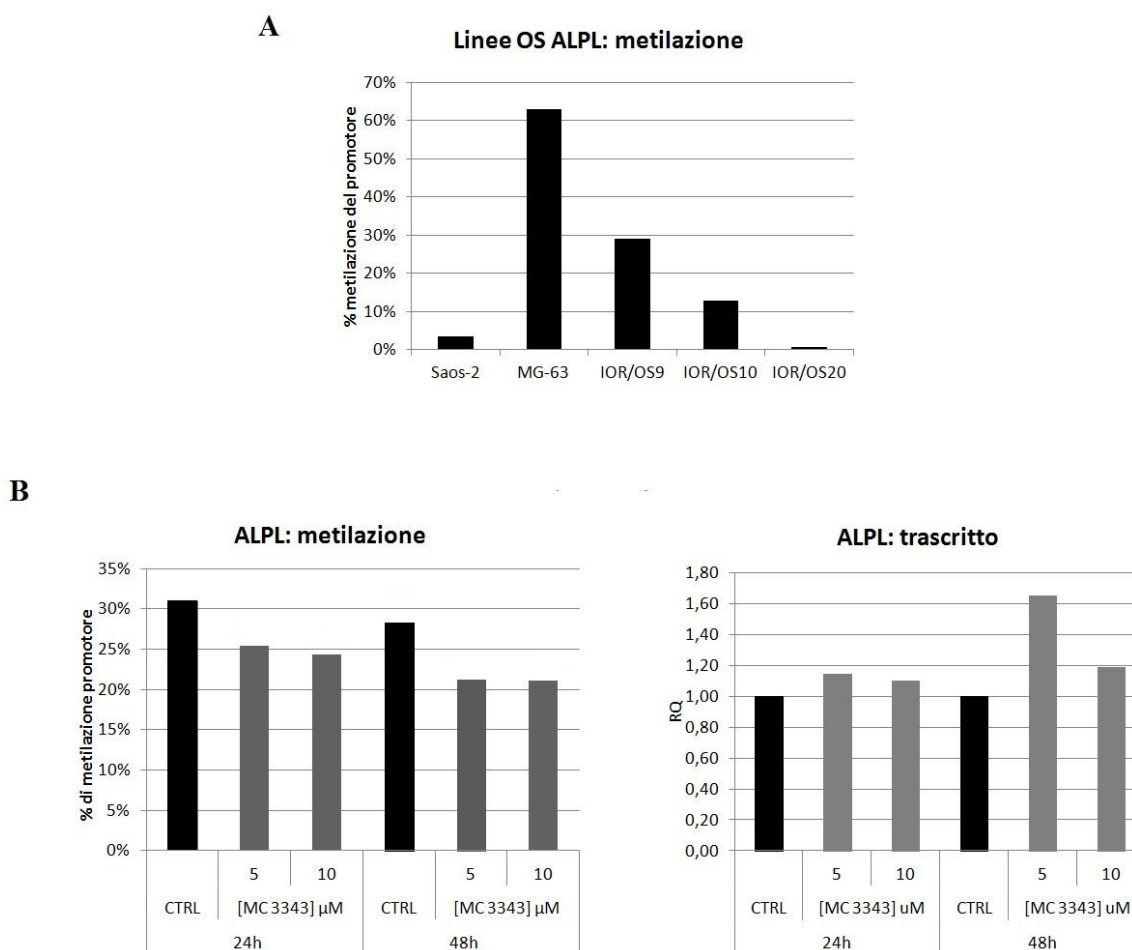


Figura 25. Metilazione del promotore di ALPL. (A) Livelli di metilazione del promotore in un pannello di linee OS. (B) Effetto del trattamento su IOR/OS9 in termini di metilazione ed espressione genica in qRT-PCR. . L'espressione relativa dell'mRNA è stata calibrata su cellule non trattate (CTRL) per ogni tempo ($2^{-\Delta\Delta CT} = 1$). I dati provengono da un esperimento rappresentativo di 2 esperimenti indipendenti.

4.7. Studi *in vivo*

4.7.1. Creazione di un modello di xenotrapianto OS e derivazione di una coltura primaria

Per poter studiare l'effetto del composto in un contesto sistemico, il più possibile fedele allo scenario che si verifica nei pazienti con OS è stato creato un modello murino, permissivo alla crescita di un tumore umano (NSG). Il frammento tumorale derivato da una biopsia di paziente affetto da OS è stato trapiantato nell'animale. Dopo un periodo iniziale di attecchimento e poi di crescita, il tumore è stato ulteriormente trapiantato per almeno 4 generazioni successive di topi.

L'istologia dei campioni è stata controllata ed è risultata corrispondente al tumore di origine per caratteristiche morfologiche e di organizzazione tissutale (figura 26).

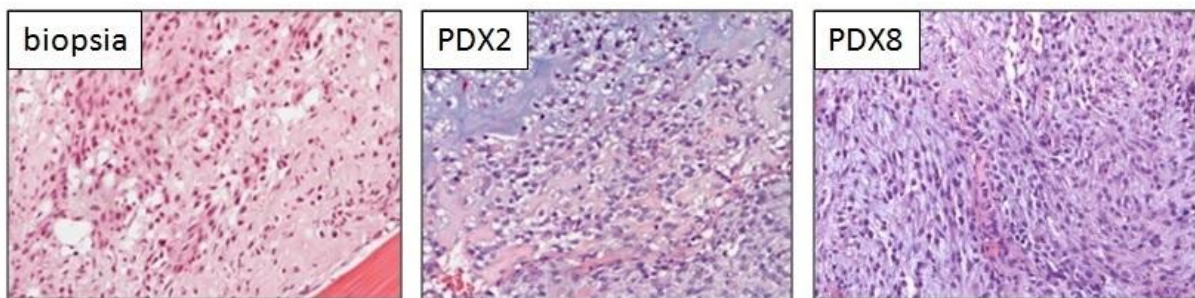


Figura 26. Istologia delle generazioni di xenotrapianto OS. Microfotografie dei tessuti tumorali di sezioni colorate con Ematossilina/Eosina. Ingrandimento 20x.

Dall'ottava generazione è stata derivata una coltura cellulare, e dopo un tempo necessario di passaggi per la stabilizzazione del fenotipo cellulare, è stata caratterizzata per parametri di crescita e risposta ai farmaci. Come si vede in tabella (Tabella 6) la linea è risultata sensibile al trattamento con i composti in esame e le dosi di IC_{50} sono in linea con i valori ottenuti dal pannello di linee OS utilizzate per gli studi precedenti. La risposta ai composti epigenetici è stata valutata anche in condizioni differenzianti (mezzo di coltura osteogenico) per 7, 14 e 21 giorni. Le dosi di IC_{20-30} dei DNMTi hanno dimostrato un effetto di inibizione della crescita anche in questo contesto (Figura 27B). Tuttavia all'analisi dei marcatori di differenziamento, solo il trattamento con MC 3343 è risultato avere un'azione pro-differenziativa specifica, in analogia con quanto precedentemente riportato sulla linea Saos-2. In particolare MC 3343 induce down-regolazione di COL1A2 e up-regolazione di ALPL a 14 giorni (Figura 27C), marcatori specifici del differenziamento osteoblastico. L'induzione di ALPL è confermata anche a livello proteico dall'aumentata attività enzimatica della fosfatasi alcalina. Si possono infatti apprezzare diverse zone di pigmentazione anche intensa, in corrispondenza dei siti di attività fosfataseica (Figura 27C) dopo trattamento con il composto. Questo quadro è evidente in seguito a trattamento con gli altri composti. In particolare l'esposizione alla DAC induce un forte effetto anti-proliferativo alla dose analizzata, ma non è in grado di determinare la modulazione specifica dei marcatori osteoblastici. Si presenta sempre l'induzione aspecifica di COL1A2 a 14 giorni, come nel modello Saos-2, ma non si rileva alcun incremento dell'attività della fosfatasi alcalina (Figura 27C).

Linea cellulare	IC ₅₀ (μM)			Dt (ore)
	MC 3343	MC 3353	DAC	
OS/14 PDX8	6.4 ± 0.3	1.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	57.35 ± 3.8

Tabella 6. IC₅₀ DNMTi linea cellulare da PDX. I valori si riferiscono al saggio di vitalità cellulare (trypan blue) a 96 ore di trattamento. I dati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti ± l'errore standard. IC₅₀ = concentrazione di farmaco che induce il 50% di inibizione della crescita rispetto al controllo (cellule non trattate); Dt, tempo di raddoppiamento espresso in ore.

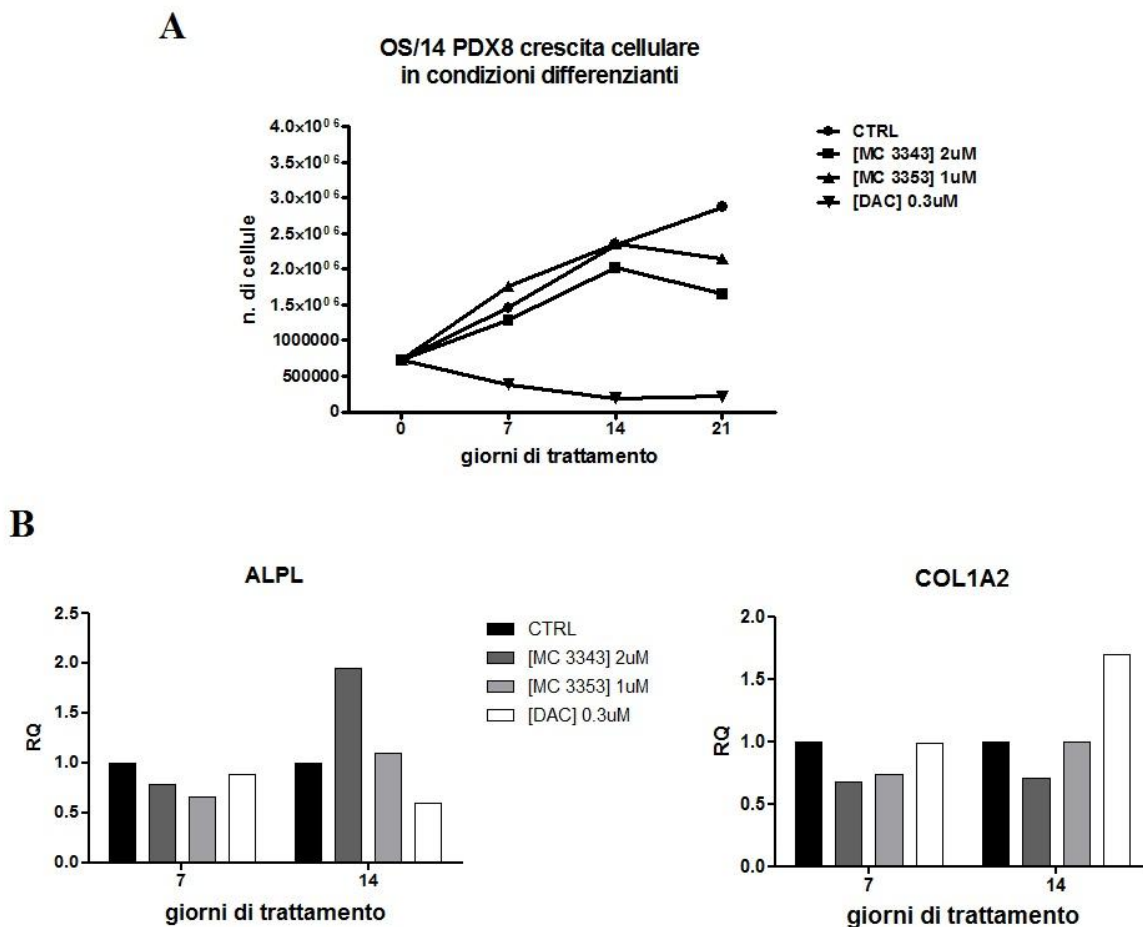
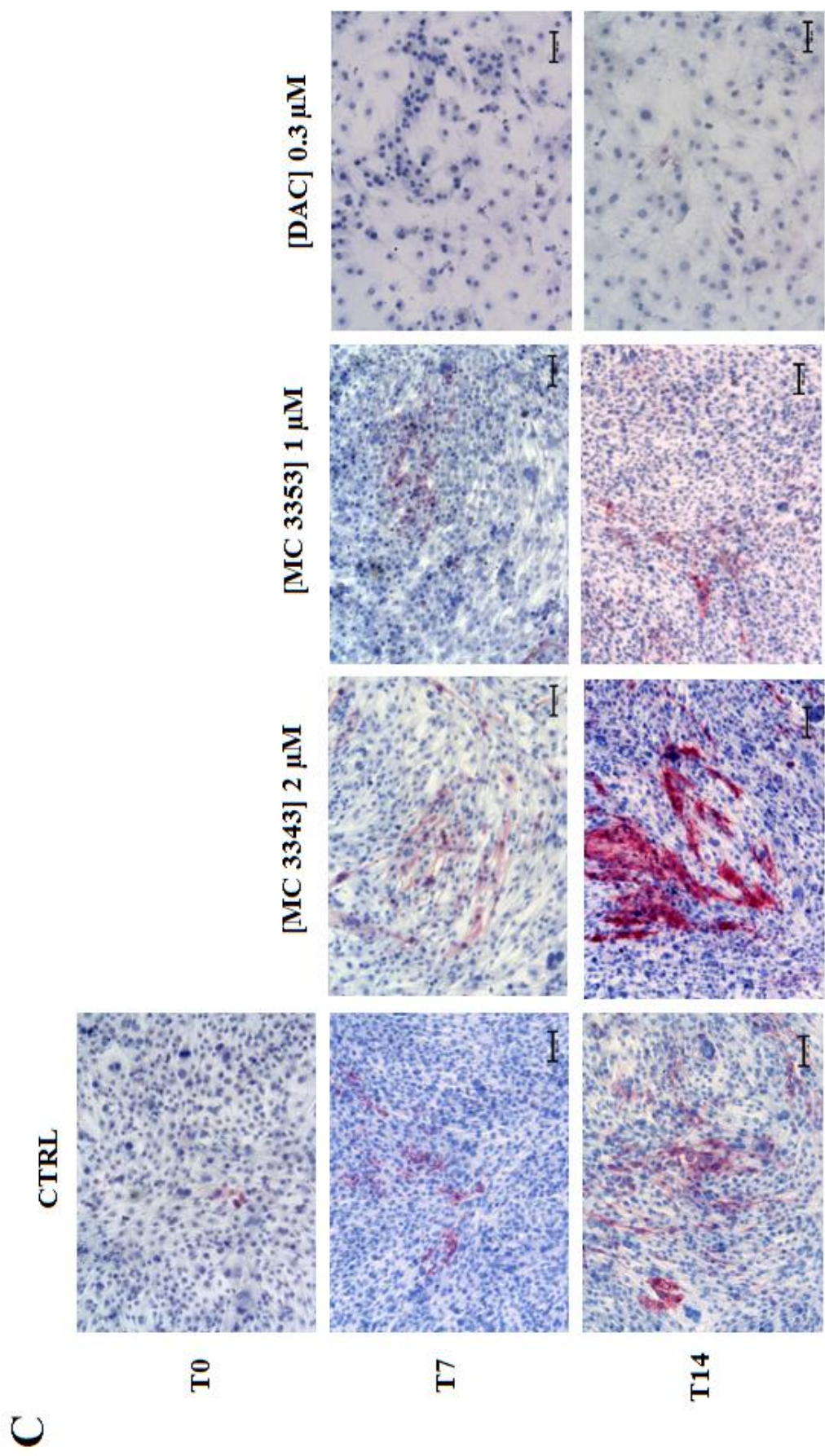


Figura 27. Linea cellulare da PDX OS, crescita in condizioni differenzianti. (A) Vitalità cellulare durante i 21 giorni di differenziamento (trypan blu). (B) Marcatori di differenziamento osteoblastico in qRT-PCR. L'espressione relativa dell'mRNA è stata calibrata su cellule non trattate (CTR) per ogni tempo ($2^{-\Delta\Delta CT} = 1$). (C) Test di attività della fosfatasi alcalina. La colorazione viola è indicativa del pigmento precipitato in corrispondenza dei siti di attività enzimatica. Le microfotografie sono state acquisite ad un ingrandimento di 20X, le barre di scala indicano 100 μm. I dati provengono da un esperimento rappresentativo di 2 esperimenti indipendenti.



4.7.2. Trattamenti con DNMTi *in vivo*

Per studiare il potenziale terapeutico di MC 3343 sulla osteosarcoma *in vivo* è stato utilizzato il modello animale descritto in precedenza. I topi della stessa generazione dalla quale è stata derivata e caratterizzata la coltura cellulare descritta sopra, sono stati trattati, 5 per gruppo, o con il solo veicolo di risospensione, con 20 mg/kg di MC 3343 oppure con 0,8 mg Kg di DAC per 21 giorni, con somministrazioni ripetute 5 giorni a settimana. L'analisi volumetrica delle masse tumorali a 1, 5, 9, 12 e 19 giorni ha dimostrato, come si vede in figura (figura 28A) un chiaro effetto di inibizione della crescita tumorale, da parte di entrambi i composti (t test, $p < 0.001$). Un'ulteriore conferma dell'effetto anti-proliferativo dei composti è stato ottenuto dalla marcatura per Ki-67. Come si vede in figura (Figura 28B), il trattamento con MC 3343 ha comportato la riduzione di Ki-67, con una significatività statistica (test χ^2 , $p < 0.0001$), anche maggiore del trattamento con DAC (test χ^2 , $p < 0.05$). Inoltre l'effetto sul target enzimatico è stato evidenziato dalla marcata riduzione della marcatura per Dnmt1 (Figura 28C). Per valutare l'effetto sul differenziamento osservato negli studi *in vitro* è stata effettuata la colorazione Von Kossa, che permette di rivelare i depositi di calcio sulle sezioni tissutali. Coerentemente con i risultati ottenuti *in vitro*, nel trattamento con MC 3343, è stato possibile individuare zone particolarmente ricche di depositi e indicative di un processo attivo di mineralizzazione ossea (Figura 28C). Anche la marcatura per l'osteocalcina, è risultata positiva nei tumori trattati con MC 3343. Il modello *in vivo* ha confermato quindi l'efficacia terapeutica sia per il composto MC 3343 che per DAC. Tuttavia solo il trattamento con MC 3343 ha dimostrato un effetto sul differenziamento, promuovendo anche in questo contesto, un quadro complessivo proprio dell'osteogenesi matura.

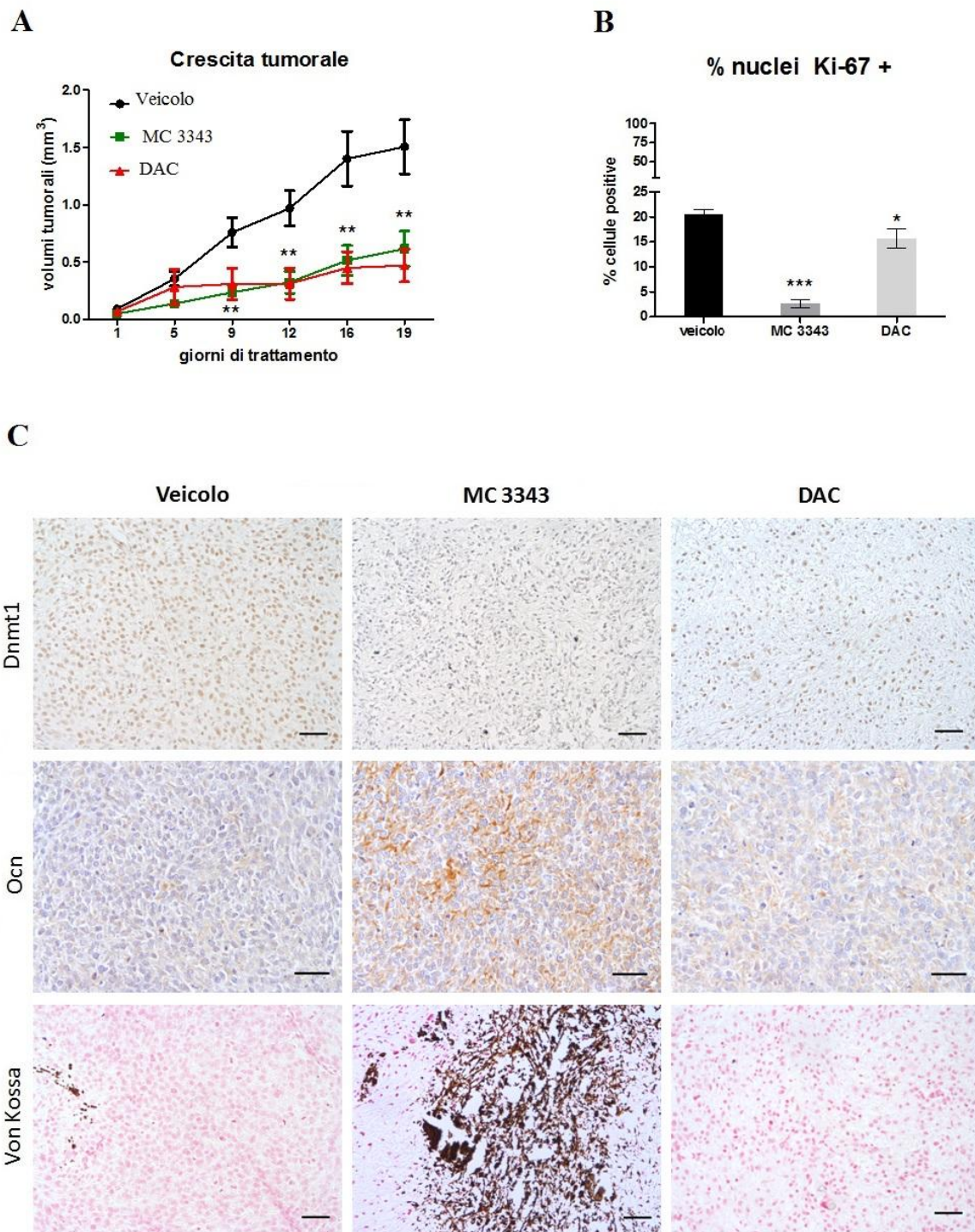
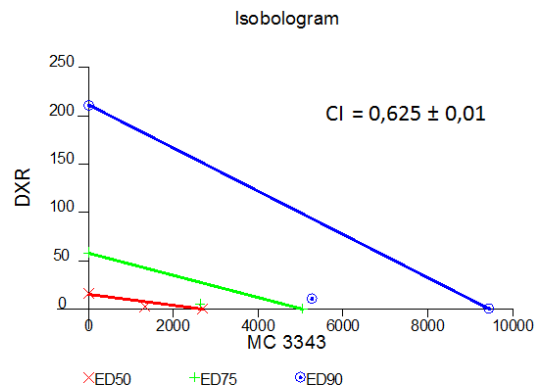
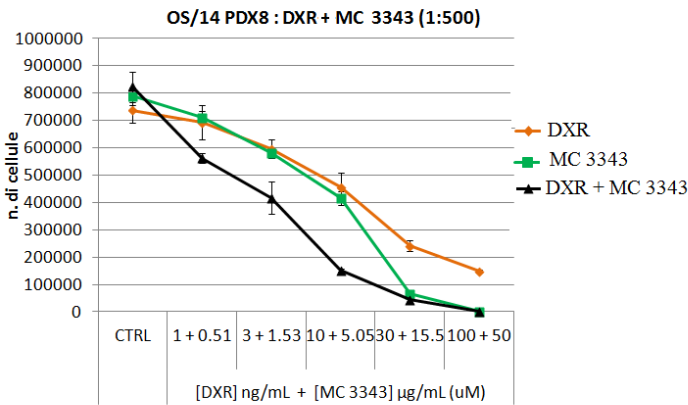


Figura 28. Efficacia *In vivo* di MC 3343 e DAC su PDX OS. (A) Volumi tumorali a 1, 3, 5, 9, 12 e 19 giorni di trattamento. (B) Analisi quantitativa della marcatura per Ki-67. I dati sono indicati come percentuali di cellule positive dalla conta di 5 campi diversi. La significatività (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.001$ come indicato, è stata calcolata con il test χ^2 . (C) Valutazione immunohistochimica di Dnmt-1, osteocalcina (Ocn) e colorazione Von Kossa per depositi di calcio. Immagini rappresentative dei diversi tessuti tumorali per ogni gruppo di trattamento. Ingrandimento 20x. Le barre di scala indicano 100 μm .

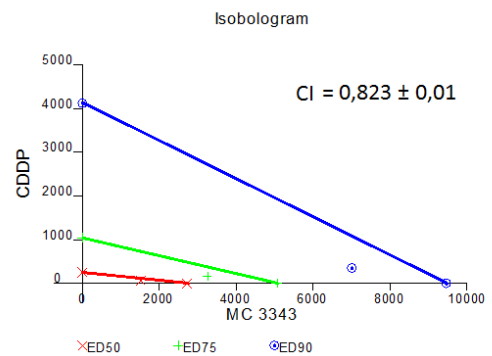
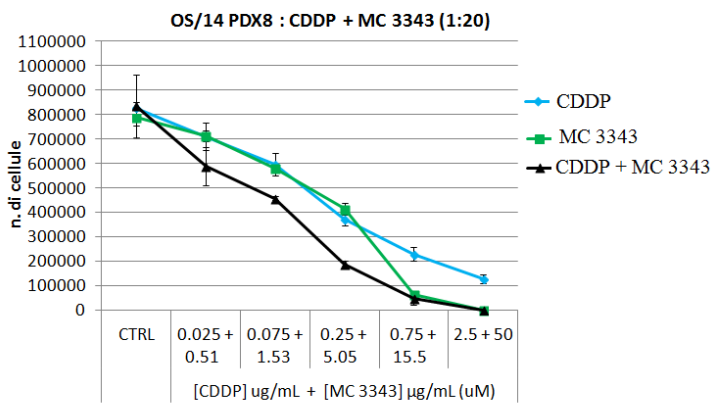
4.7.3. Trattamenti di combinazione con i chemioterapici sulla linea da PDX OS

Esistono già in letteratura studi che dimostrano la capacità degli agenti demetilanti nel risensibilizzare le cellule tumorali verso il trattamento con farmaci citotossici comunemente usati nella terapia dei tumori solidi, in particolare uno studio clinico chiave ha dimostrato che la combinazione con DAC a basse dosi induce la reversione della resistenza al cisplatino nel trattamento del carcinoma ovarico [161]. L'ultima parte di questo studio ha cercato dunque di valutare l'effetto del composto MC 3343 in combinazione con quelli che sono i farmaci d'elezione nella terapia dei sarcomi e in particolare nell'osteosarcoma, ossia Doxorubicina (DXR), Cisplatino (CDDP) e Metotrexato (MTX). Inizialmente è stata stabilita la concentrazione di IC_{50} dei tre farmaci per la linea cellulare OS/14 PDX8 e poi sono stati condotti gli esperimenti di combinazione utilizzando rapporti costanti fra i binomi di farmaco. La somministrazione simultanea di DXR e MC 3343, e in misura minore anche la combinazione CDDP:MC 3343, ma non la combinazione con MTX, un inibitore del metabolismo dei folati e quindi della sintesi del DNA, ha indotto effetti anti-proliferativi sinergici nelle linea di PDX. Nella figura (Figura 29), le singole dosi dei farmaci, per ottenere l'inibizione del 90% della crescita cellulare (linea blu; ED90), l'inibizione del 75% della crescita (linea verde; ED75) e del 50% (linea rossa; ED50) sono tracciate sugli assi x e y. L'effetto dell'interazione farmaco-farmaco è stato classificato come sinergico quando l'indice di combinazione (CI) è risultato inferiore a 0.90, come additivo quando compreso fra 0.90 e 1.10, e come sub-additivo se maggiore di 1.10.

A



B



C

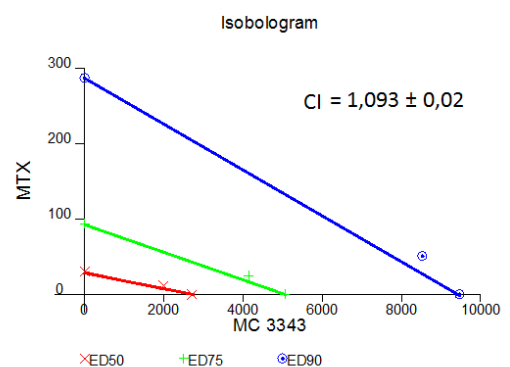
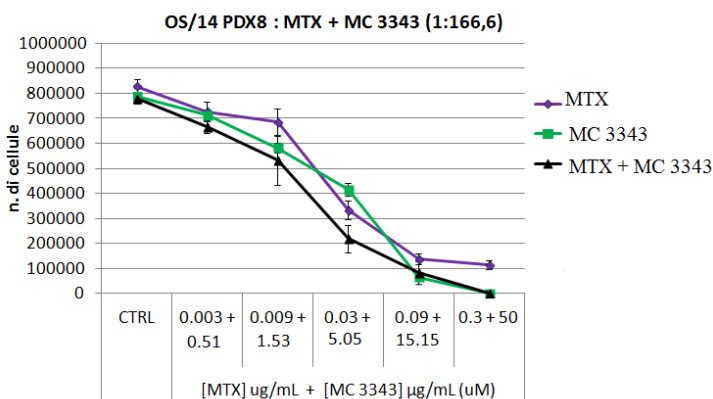


Figura 29. Combinazioni di MC 3343 con i farmaci chemioterapici. (A) La combinazione di DXR con MC 3343 e (B) CDDP con MC 3343 comportano effetti sinergici. (C) La combinazione MTX e MC 3343 ha un effetto sub-additivo. Negli isobologrammi le dosi dei farmaci sono espresse in ng/ml. Per ogni combinazione sono riportati sulla sinistra i grafici di crescita cellulare. I valori medi dei CI fra ED90, ED75 e ED50 sono riportati con \pm l'errore standard. I dati sono relativi a 2 esperimenti indipendenti.

5. Discussione

Nel corso degli ultimi 20 anni, le scoperte rivoluzionarie sui meccanismi e gli enzimi coinvolti nella struttura e nella funzione della cromatina, e dei cambiamenti ai quali viene esposta in risposta a segnali fisiologici o patologici, hanno trasformato la nostra conoscenza sull'epigenetica da una collezione di fenomeni biologici curiosi ad un settore di ricerca intensamente analizzato nel quale si sono evoluti settori sempre più specializzati di indagine funzionale e applicativa. In particolare queste scoperte e gli sviluppi tecnologici che le hanno accompagnate ci hanno permesso di tradurle nel concetto di "terapia epigenetica". Un importante settore applicativo riguarda le alterazioni delle interazioni epigenetiche che si verificano nel cancro e che vengono comunemente definite come l'epigenoma del tumore" [34, 100, 111]. Le anomalie nella metilazione del DNA e negli stati funzionali della cromatina sono infatti coinvolti sia negli stadi di iniziazione che durante la progressione tumorale, ma anche negli stati di rischio oncologico [325, 326]. Utilizzare i patterns epigenetici tumorali per guidare gli approcci al trattamento, sarà dunque fondamentale per un ulteriore sviluppo di terapie sempre più personalizzate. L'approvazione da parte dell'FDA (Food and drugs administration), nel 2004, per l'utilizzo in clinica degli agenti demetilanti, Azacitidina e DAC nelle sindromi mielodipastiche, ha aperto la strada ad una serie di studi preclinici e sperimentazioni cliniche per vari farmaci epigenetici. Se nelle neoplasie liquide questi sforzi hanno trovato successo e diverse condizioni applicative specifiche, nei tumori solidi l'applicazione risulta più difficile a causa di quadri patologici più complessi ed eterogenei. Tuttavia sono stati raggiunti risultati molto promettenti, come nel caso del tumore avanzato al polmone NSCLC [327], e nei carcinomi ovarici resistenti al cisplatino [161]. I farmaci ad azione demetilante sul DNA come DAC, sono stati inizialmente sviluppati come agenti chemioterapici e utilizzati a dosi elevate dimostrando una tossicità significativa [129]. Negli anni '90 le dosi sono state sensibilmente ridotte e i tempi di esposizione prolungati, portando ad una riduzione significativa della tossicità e promuovendo l'effetto di "riprogrammazione" dello stato epigenetico tumorale [129]. Gli effetti tossici e l'instabilità in soluzione, di questo tipo di farmaci continua però ad essere uno dei principali limiti al loro impiego. Infatti il meccanismo d'azione degli analoghi nucleosidici come la DAC risiede nella loro capacità di bloccare l'attività enzimatica delle Dnmts incorporandosi nel filamento di DNA. La ricerca di inibitori delle Dnmts di tipo non-nucleosidico ha portato alla scoperta di composti più specifici e meno tossici, tra i quali si distingue il composto lipofilo SGI-1027 per la sua elevata stabilità, selettività e specificità d'inibizione [153]. In questo studio di tesi si

è cercato di valutare come agenti derivati da SGI-1027 potessero essere in grado di bloccare la crescita tumorale e ripristinare il differenziamento nel contesto tumorale dei sarcomi. La finalità più ampia di queste analisi è stata quella di indagare la possibile applicazione terapeutica dei nuovi composti sperimentali MC 3343 e MC3353, in due fra i più frequenti tumori primitivi delle ossa, l'osteosarcoma e il sarcoma di Ewing. Per questo tipo di tumori di origine mesenchimale, esistono diverse condizioni, come la malattia metastatica, la resistenza alla chemioterapia e lo sviluppo di patologie secondarie, che rendono necessario lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Seppure altre condizioni tumorali hanno potuto beneficiare di terapie a target molecolare, come nel caso delle leucemie e dei GIST, purtroppo, da più di 20 anni, la sopravvivenza dei pazienti di OS ed ES, che manifestano condizioni più gravi, non ha registrato miglioramenti significativi. Lo studio della biologia di questi sarcomi ha delineato nel tempo un quadro più preciso nel quale, la forte instabilità genetica caratteristica dell'OS da un lato e il ruolo esclusivo ed aberrante della chimera EWS-FLI1 in ES dall'altro, convergono su di un controllo epigenetico alterato. Tuttavia la reversibilità propria delle alterazioni a livello epigenetico, come la metilazione aberrante del DNA, rende lo studio di nuovi composti epigenetici particolarmente importante in questo scenario di malattia. I test enzimatici iniziali hanno dimostrato un'efficacia differente fra i due composti. In particolare MC 3343 è risultato più efficace di MC 3353 e 2 volte più potente del suo derivato SGI-1027, e con effetto preferenziale sull'enzima Dnmt1. Entrambi i composti hanno comunque presentato un'efficacia sicuramente superiore rispetto a RG-108, un inibitore non nucleosidico con meccanismo d'azione simile sull'attività catalitica dell'enzima. Il trattamento di un ampio pannello di linee sia di OS che di ES ha dimostrato un chiaro effetto di inibizione della proliferazione, anche se sono state evidenziate alcune differenze in termini di IC_{50} da linea a linea. Un fenomeno ancora più evidente nel trattamento con DAC dove alcuni modelli cellulari sia di OS che di ES risultano praticamente resistenti. Questa azione così diversa a seconda del contesto potrebbe trovare spiegazione sia nel meccanismo d'azione specifico dei singoli farmaci, che nelle diverse interazioni epigenetiche delle Dnmts, come nel cross-talk fra le alterazioni genetiche ed epigenetiche che evolve e si instaura in ogni modello cellulare. Ad esempio un'alterata regolazione trascrizionale e post-trascrizionale delle Dnmts può influire sull'espressione e sull'attività dell'enzima. Sia p53 che Rb, i geni più soggetti ad alterazione nell'osteosarcoma, sono stati descritti nel tumore al polmone come dei regolatori negativi, a livello trascrizionale dell'espressione delle Dnmts [328]. Dnmt1, inoltre è soggetta ad una fine regolazione a livello post-traduzionale, ad esempio, l'acetilazione da parte di Tip-60 ne promuove la degradazione via proteasoma [329], mentre la de-acetilazione di lisine diverse da parte di SIRT1, oltre ad aumentarne la stabilità, sembra indurne l'attività catalitica [78]. Inoltre lo stato metabolico influenza direttamente gli enzimi epigenetici, infatti molti dei

cofattori e dei modulatori enzimatici di Dnmts, HDACs, KMTs e altri rimodellatori della cromatina, sono rappresentati da metaboliti come SAM, FAD, NAD⁺, acetyl-CoA etc [330]. Un studio recente sottolinea l'importanza dell'acidosi nella sensibilità ad un inibitore di HDAC in modelli cellulari di OS [331]. Dagli esperimenti di vitalità cellulare emerge comunque una correlazione inversa soltanto fra l'espressione di Dnmt1 e l'IC₅₀ di MC 3343 (Spearman, coefficiente di correlazione = -0,610, p = 0,0254) a dimostrazione della specificità del composto in questi modelli cellulari. I dati ottenuti inoltre hanno confermato che MC 3343 ha un'azione sia sull'attività enzimatica che sui livelli proteici di Dnmt1 nei modelli Saos-2 e TC71. MC 3353 dimostra un'inibizione dell'attività enzimatica inferiore, soprattutto in TC-71. Per quanto riguarda l'inibizione della crescita cellulare, i dati di analisi del ciclo e dell'apoptosi evidenziano, per MC 3343, ma non per MC 3353, un effetto principalmente di tipo citostatico, in quanto le cellule non vanno incontro a morte cellulare, bensì ad un rallentamento della crescita. La riduzione del numero di cellule in fase S di replicazione del DNA coincide in un accumulo nelle fasi del ciclo, dipendente dal modello cellulare: G0/G1, per le linee ES e per la linea OS MG-63, e G2/M, per la linea Saos-2. Sempre più studi sembrano inoltre deporre a favore dell'ipotesi che questi tumori derivino da cellule bloccate in vari stadi del differenziamento della cellula staminale mesenchimale per OS, o mesenchimale/neuroectodermica per ES. In ES il fattore trascrizionale chimerico EWS-FLI1, è in grado di trasformare le cellule verso un differenziamento neurale di tipo aberrante [252]. Se si considera inoltre che questo tumore è caratterizzato da un genoma molto stabile, come hanno dimostrato in maniera praticamente definitiva recenti studi genome-wide [268-270], il coinvolgimento epigenetico risulta fondamentale per l'effetto trasformante. In particolare EWS-FLI1 attraverso la regolazione ed il reclutamento delle proteine PcG, è in grado di reprimere l'espressione di diversi geni del differenziamento [284, 332]. EZH2 che fa parte del complesso repressivo PRC2 interagisce con le Dnmts e le recluta a livello dei promotori genici bivalenti, tessuto specifici, per promuovere il silenziamento genico [333, 334]. Alcuni studi riportano inoltre come nei carcinomi mammario e renale H-NF venga silenziato epigeneticamente, anche attraverso la metilazione delle isole CpG a livello del suo promotore genico [335, 336]. Il trattamento con MC 3343 o DAC sulle linee TC-71 e LAP-35 ha indotto una riduzione della proliferazione (Ki-67), tuttavia soltanto con MC 3343 è stato possibile osservare un fenotipo neurale terminalmente differenziato, come evidenziato dall'induzione dei marcatori β -III tubulina e H-NF, a dimostrazione della specificità di questo composto nel contesto ES. L'incapacità di DAC nel modulare l'espressione di questi marcatori è confermata inoltre dalle analisi di espressione genica degli studi funzionali sulle linee ES, che non riportano questi geni fra quelli influenzati dal trattamento con demetilanti nucleosidici [292, 293]. Per quanto riguarda OS, l'80% dei tumori viene classificato come scarsamente differenziato e presenta una sopravvivenza

del 15-20% [322]. Inoltre sono state descritte diverse alterazioni della metilazione a carico di geni coinvolti nelle principali vie di segnalazione attive durante l'osteogenesi, dunque il trattamento con i DNMTi servirebbe, anche in questo caso, a riattivare il differenziamento verso un'osteogenesi matura. Nel modello Saos-2 di OS osteoblastico mantenuto in condizioni differenzianti per 21 giorni, il trattamento con i composti in esame ha dimostrato un chiaro effetto antiproliferativo. Il composto MC 3343 si è rivelato anche in questo contesto l'agente più specifico. Infatti è stata osservata la produzione in grandi quantità di matrice mineralizzata in maniera progressiva nel tempo, e all'analisi di espressione genica è stato possibile apprezzare la riattivazione selettiva di un effettivo programma di differenziamento osteogenico. In particolare dopo trattamento con MC 3343, le cellule OS sono andate incontro ad una down-regolazione dei collagene di tipo 1, unitamente all'up-regolazione di ALP, un quadro caratteristico degli osteoblasti precoci. L'induzione del fattore di trascrizione Runx-2, un regolatore master del programma di differenziamento osteoblastico, si osserva chiaramente a 7 giorni compatibilmente con la necessità di avviare la trascrizione di marcatori osteoblastici specifici. MC 3343 è inoltre capace di promuovere l'espressione di marcatori del differenziamento terminale come si vede dall'up-regolazione di OCN, questa proteina, infatti, viene prodotta principalmente dagli osteoblasti maturi e nel 75% degli OS non è rilevabile [337]. Per l'inibitore nucleosidico DAC, nonostante il rallentamento della proliferazione, l'espressione genica non testimonia un programma di differenziamento coerente. I marcatori osteoblastici mostrano un andamento quasi opposto a quello osservato con MC3343, registrando un debole aumento dei collagene di tipo 1 e una riduzione sia di ALP che del fattore di trascrizione Runx2. I dati di espressione genica su MC 3343 sembrano convergere inoltre sulla via di segnalazione delle BMPs, una delle vie più importanti nello sviluppo osseo [338]. MC 3343 porta ad un'up-regolazione sia del ligando, BMP2, che dei recettori, BMPR1A e BMPR1B, insieme ad una down-regolazione degli antagonisti CHRD e NOG [339]. Tuttavia il trattamento con DAC non sembra modulare questo circuito in maniera specifica dimostrando più che altro lo spegnimento di questa via. Oltre ad evidenziare l'attivazione del programma di differenziamento osteoblastico, MC 3343 inibisce il differenziamento verso lineage differenti. Infatti induce la progressiva diminuzione di marcatori condrocitari, come il collagene di tipo 2, COMP e BGN e marcatori osteoclastici, un lineage di tutt'altra derivazione, come CTSK e CALCR. DAC invece up-regola in maniera aspecifica sia i marcatori condrocitari che quelli osteoclastici. Da questo punto di vista, sebbene DAC a basse concentrazioni ha dimostrato un'azione differenziante in altri modelli cellulari come nel rhabdomyosarcoma [179] e nelle MSCs [180], nel caso dell'osteosarcoma si è rivelato scarsamente specifico.

L'effetto di MC 3343 sul differenziamento osteoblastico ci ha suggerito un meccanismo di demetilazione a livello dei promotori del lineage modulati, infatti evidenze di letteratura dimostrano come la metilazione contribuisce alla regolazione di vari componenti che scandiscono l'osteogenesi, come il sistema RANKL-OPG, la sclerostina (SOST), un potente inibitore della formazione ossea e ALPL [226, 231, 232]. Inoltre, la regolazione di ALPL, attraverso la metilazione è stata proposta anche in contesti differenti, come nella calcificazione vascolare, dove il trans-differenziamento in senso osteoblastico, al quale vanno incontro le cellule muscolari lisce dei vasi, viene revertito dal trattamento con DAC [227]. La mancata espressione di ALPL, rappresenta inoltre un fattore di malignità nell'osteosarcoma, infatti cellule di osteosarcoma trasfettate con il gene di ALPL presentano una reversione delle caratteristiche di invasività [221, 222]. Per valutare lo status di metilazione di ALPL, è stata condotta un'analisi quantitativa di MS-PCR, specifica per una regione del promotore, ricca in CpG, precedentemente descritta [226]. Il saggio ha fatto emergere la presenza di livelli diversi di questa modifica nei diversi modelli cellulari di OS, relativi probabilmente a differenti stadi del differenziamento osteoblastico nei quali sono rimasti bloccati. Il trattamento con MC 3343 sulla linea IOR/OS9, che presentava livelli intermedi di metilazione, è risultato in una diminuzione della percentuale di prodotto metilato rispetto ai controlli, corrispondente ad un aumento del trascritto. Le modulazioni risultano comunque lievi, forse a causa delle condizioni non differenzianti nelle quali è stato condotto l'esperimento, tuttavia evidenti già a tempi brevi. Questo suggerisce un meccanismo specifico d'azione del composto MC 3343 sulla regolazione dell'espressione di questo marcatore dell'osteoblastogenesi precoce, tuttavia sono necessarie maggiori indagini per valutare la modulazione di questa modifica durante il processo differenziativo e definirne più in dettaglio i meccanismi anche a livello cromatinico che possono spiegare l'eterogeneità riscontrata sul pannello di linee OS.

Una delle ragioni più frequenti dell'alto tasso di fallimento dei nuovi agenti terapeutici in oncologia è la mancanza di modelli-preclinici sufficientemente adeguati a ricapitolare l'eterogeneità dei tumori nei pazienti [340]. Tuttavia recentemente, è aumentato l'utilizzo di modelli preclinici di xenotrapianti derivati da paziente (PDX), che prevedono il trapianto di un frammento tumorale in roditori immuno-compromessi, come i topi nudi atimici o i NOD/SCID [341]. Questi modelli tumorali risultano biologicamente stabili nei passaggi fra generazioni successive di topi, con una buona corrispondenza al tumore d'origine in termini di espressione genica, stato mutazionale, potenziale metastatico e risposta ai farmaci [341]. Uno studio recente ha riportato l'utilità di questi modelli nella sperimentazione preclinica di nuovi farmaci nel contesto dei sarcomi indifferenziati polimorfici (UPS), dimostrando quanto la fedeltà nel riprodurre il fenotipo tumorale iniziale sia necessaria a valutare correttamente la risposta ai farmaci [342]. Anche per quanto riguarda il

modello di osteosarcoma che è stato creato in questo lavoro di tesi, le caratteristiche tumorali si sono conservate nelle varie generazioni di trapianto. Insieme alle caratteristiche istologiche, anche i dati di espressione genica (dato non mostrato) ne hanno confermato la riproducibilità rispetto al tumore di origine. La linea cellulare derivata dallo xenotrapianto si è dimostrata un modello utile di studio *in vivo* per la sensibilità ai farmaci. La caratterizzazione di questo modello cellulare ha permesso di evidenziare caratteristiche di crescita simili alle linee OS utilizzate, ed una buona sensibilità ai composti DNMTi in esame, con valori di IC₅₀ paragonabili alle altre linee. E' stato possibile inoltre valutare gli effetti dei farmaci in condizioni differenzianti con mezzo di coltura osteogenico, ed anche in questo caso è stata confermata l'efficacia e la specificità di MC 3343 nell'indurre i marcatori del differenziamento osteoblastico, anche in termini di attività della fosfatasi alcalina. DAC per contro ha determinato l'inibizione della proliferazione cellulare, anche in maniera molto marcata, senza mostrare però segnali di attivazione del programma di differenziamento osteoblastico. I trattamenti *in vivo*, sul modello PDX di osteosarcoma, hanno confermato in maniera praticamente definitiva l'effetto di MC 3343 e DAC sulla crescita tumorale. Mentre i tumori degli animali di controllo hanno continuato a crescere durante tutti i 21 giorni dell'esperimento, i volumi tumorali degli animali trattati con i DNMTi sono rimasti significativamente inferiori. L'analisi istologica e immunohistochimica ha documentato invece scenari distinti a seconda del trattamento. La somministrazione di MC 3343 ha indotto anche in questo modello, un fenotipo differenziato, come testimoniato dalla massiccia produzione di osteocalcina e dalla presenza di ampie zone calcificate, rivelate dai sali di argento della colorazione Von Kossa. Anche l'effetto sul target è risultato specifico, con una marcatura per la Dnmt1 praticamente negativa. Il fenotipo indotto da DAC è invece opposto confermando uno scarso effetto differenziante anche *in vivo*. L'instabilità genetica che caratterizza l'osteosarcoma rende questo tipo di modelli *in vivo*, particolarmente utili a valutare la risposta ai farmaci, in quanto ogni singolo paziente può avere alterazioni molto diverse, pur presentando la stessa patologia neoplastica. La strada verso una terapia personalizzata non può prescindere da questo tipo di modelli, in particolare l'assetto epigenetico risulta specifico per ogni fenotipo tumorale e quanto mai fondamentale per valutare la risposta ai farmaci. In ultima istanza, la proprietà citostatica di MC 3343 lo ha reso un ottimo candidato da abbinare ai più comuni trattamenti citotossici. I dati di combinazione con i chemioterapici d'elezione nel trattamento dell'osteosarcoma hanno indicato infatti binomi sinergici di trattamento. Gli esperimenti di combinazione sono stati effettuati nel modello cellulare da xenotrapianto, in modo da avere un contesto, pur sempre *in vitro*, ma il più possibile vicino alle caratteristiche del tumore iniziale. I CI dimostrano che il trattamento combinato di MC 3343 e DXR ha un effetto di tipo sinergico così come quello con CDDP, mentre la combinazione MC 3343 e

MTX ha un effetto sub-additivo. I diversi effetti delle combinazioni con i chemioterapici possono trovare spiegazione nei differenti meccanismi d'azione dei farmaci o nelle specifiche funzioni dei geni inattivati geneticamente o epigeneticamente in questo contesto tumorale. La sinergia con DXR potrebbe essere giustificata dal fatto che questo citotossico agisce intercalandosi nel DNA e provocando rotture nel doppio filamento attraverso il blocco della topoisomerasi II [343]. L'azione demetilante del farmaco potrebbe rendere più accessibile il DNA e promuovere quindi inneschi multipli dei meccanismi di riparo che vengono bloccati dall'azione dell'intercalante, convergendo quindi in un effetto citotossico amplificato. Inoltre l'effetto citostatico di MC 3343 porterebbe ad un accumulo delle cellule in fase G0/G1 o G2/M compatibile con l'attivazione di pathway apoptotici in caso di mancata riparazione degli estesi danni al DNA. Uno studio su cellule di osteosarcoma resistenti alla DXR dimostra che il trattamento combinato con agenti epigenetici (DNMTi e HDACi) risulta nella risensibilizzazione a questo farmaco grazie alla riattivazione di vie apoptotiche intrinseche ed estrinseche [213]. Il trattamento con MC 3343 potrebbe quindi potenziare l'effetto citotossico di DXR promuovendo la trascrizione di geni proapoptotici spesso silenziati dall'ipermetilazione. Per CDDP, che ha come meccanismo d'azione la capacità di interferire con la replicazione del DNA creando degli addotti principalmente a livello dei dinucleotidi CpG [344], la combinazione con MC 3343 potrebbe riguardare gli stessi effetti proposti per DXR. Inoltre nei carcinomi ovarici avanzati, resistenti a CDDP, il meccanismo di reversione della resistenza promosso dagli agenti demetilanti coinvolge la riattivazione di pathway apoptotici [161]. In uno studio su linee cellulari di carcinoma della vescica il meccanismo sinergico tra DAC e CDDP viene dimostrato sia dal blocco del ciclo cellulare che dall'effetto di DAC sull'ulteriore up-regolazione delle caspasi già indotta da CDDP [345]. La mancata sinergia con MTX invece si potrebbe spiegare con l'incompatibilità fra i meccanismi d'azione. MTX, infatti è un inibitore dell'enzima diidrofolato reduttasi (DHFR), in questo modo altera il metabolismo dei folati, e dunque inibisce la sintesi del DNA [346]. L'effetto citotossico necessita quindi di cellule in attiva sintesi, tuttavia MC 3343 è un citostatico.

In conclusione, da questo lavoro di tesi emerge che MC 3343, un DNMTi di tipo non-nucleosidico di nuova sintesi, risulta efficace e specifico nel bloccare la proliferazione e promuovere il differenziamento delle cellule di sarcoma sia *in vitro* che *in vivo*, e che la sua combinazione con due dei chemioterapici d'elezione nel trattamento dell'OS ne potenzia l'effetto. Resta comunque da valutare l'effetto di combinazione *in vivo* e indagare quali meccanismi intervengono nell'attività sinergica, in modo da individuare dei possibili fattori predittivi di risposta al trattamento.

Nella prospettiva di una possibile applicazione clinica, non sono da trascurare anche gli effetti di combinazione con altri farmaci epigenetici come gli HDACi o i composti che agiscono sui

rimodellatori della cromatina o sui “readers” di modificazioni specifiche, che hanno dimostrato spesso un’azione sinergica [160, 181]. Le strategie per l’applicazione della terapia epigenetica, inoltre prevedono varie finestre di utilizzo, come trattamento primario, singolarmente o in combinazione, con lo scopo di riattivare la sensibilità ai farmaci chemioterapici o di immunoterapia, oppure come trattamento secondario per indurre il differenziamento delle cellule staminali tumorali refrattarie al trattamento chemioterapico primario. Sempre più evidenze inoltre, suggeriscono che sia i DNMTi che gli HDACi sono in grado di revertire l’evasione immunitaria, in quanto aumentano le risposte tumorali all’interferone, promuovono l’espressione degli antigeni tumorali di superficie e delle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), che a loro volta presentano l’antigene alle cellule immunitarie [347, 348]. Recenti studi hanno dimostrato che le cellule tumorali trattate con i DNMTi inducono uno stato che viene definito 'mimetismo virale' [349, 350], con conseguente produzione di interferone da parte delle cellule tumorali che a sua volta innesca il reclutamento del sistema immunitario. Questo potrebbe risultare efficace nell’impedire la tolleranza immunitaria alle terapie dei checkpoint immunologici[349-352]. Tuttavia per poter testare gli effetti sul sistema immunitario *in vivo* sarebbero necessari modelli sofisticati di PDX in cui le cellule staminali del midollo osseo del paziente vengono trapiantate insieme al tumore. In conclusione diversi ambiti di ricerca continuano ad offrire nuove applicazioni per i farmaci epigenetici in oncologia e i risultati ottenuti con questo nuovo inibitore si dimostrano promettenti nel trattamento dei sarcomi ossei.

Ringraziamenti

Ringrazio il Dott. Piero Picci e la Dott.ssa Katia Scotlandi del laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna per avermi consentito di svolgere l'attività di ricerca di dottorato; il Prof. Pier-Luigi Lollini del laboratorio di Immunologia e Biologia delle metastasi dell'Istituto di Cancerologia di Bologna che insieme all'Anatomia Patologica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli, ha consentito una preziosa collaborazione per gli studi *in vivo*. Un ringraziamento particolare all'associazione Onlus "Il pensatore: Matteo Amitrano" che ha sostenuto con una borsa di studio una parte importante del mio percorso di dottorato.

6. Bibliografia

1. Waddington, C.H., *The Strategy of the Genes*. Allen & Unwin, London, 1957.
2. Waddington, C.H., *The epigenotype. 1942*. Int J Epidemiol, 2012. **41**(1): p. 10-3.
3. Russo, V.E.A., R.A. Martienssen, and A.D. Riggs, *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, 1996.
4. Bird, A., *Perceptions of epigenetics*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 396-8.
5. Watson, J.D., *Celebrating the genetic jubilee: a conversation with James D. Watson. Interviewed by John Rennie*. Sci Am, 2003. **288**(4): p. 66-9.
6. Allis, C.D. and T. Jenuwein, *The molecular hallmarks of epigenetic control*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(8): p. 487-500.
7. Olins, D.E. and A.L. Olins, *Chromatin history: our view from the bridge*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(10): p. 809-14.
8. Kornberg, R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, 1974. **184**(4139): p. 868-71.
9. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
10. Williamson, W.D. and I. Pinto, *Histones and genome integrity*. Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: p. 984-95.
11. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. Cell Res, 2011. **21**(3): p. 381-95.
12. Yap, K.L. and M.M. Zhou, *Keeping it in the family: diverse histone recognition by conserved structural folds*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010. **45**(6): p. 488-505.

13. Kurth, H.M. and K. Mochizuki, *Non-coding RNA: a bridge between small RNA and DNA*. RNA Biol, 2009. **6**(2): p. 138-40.
14. Karch, K.R., et al., *Identification and interrogation of combinatorial histone modifications*. Front Genet, 2013. **4**: p. 264.
15. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
16. Dou, Y., et al., *Phosphorylation of linker histone H1 regulates gene expression in vivo by mimicking H1 removal*. Mol Cell, 1999. **4**(4): p. 641-7.
17. Wei, Y., et al., *Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation*. Cell, 1999. **97**(1): p. 99-109.
18. Rossetto, D., N. Avvakumov, and J. Cote, *Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events*. Epigenetics, 2012. **7**(10): p. 1098-108.
19. Izzo, A., K. Kamieniarz, and R. Schneider, *The histone H1 family: specific members, specific functions?* Biol Chem, 2008. **389**(4): p. 333-43.
20. Happel, N. and D. Doenecke, *Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function*. Gene, 2009. **431**(1-2): p. 1-12.
21. Musselman, C.A., et al., *Perceiving the epigenetic landscape through histone readers*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(12): p. 1218-27.
22. Allis, C.D., Caparros, M., Jenuwein, T. & Reinberg, D., *Epigenetics 2nd edn*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015.
23. Rice, J.C., et al., *Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1591-8.
24. Fischle, W., et al., *Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains*. Genes Dev, 2003. **17**(15): p. 1870-81.
25. Canzio, D., et al., *Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly*. Mol Cell, 2011. **41**(1): p. 67-81.
26. Schwartz, B.E. and K. Ahmad, *Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3*. Genes Dev, 2005. **19**(7): p. 804-14.
27. Hassan, A.H., et al., *Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes*. Cell, 2002. **111**(3): p. 369-79.
28. Petesch, S.J. and J.T. Lis, *Overcoming the nucleosome barrier during transcript elongation*. Trends Genet, 2012. **28**(6): p. 285-94.
29. Song, F., et al., *Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units*. Science, 2014. **344**(6182): p. 376-80.
30. Amendola, M. and B. van Steensel, *Mechanisms and dynamics of nuclear lamina-genome interactions*. Curr Opin Cell Biol, 2014. **28**: p. 61-8.
31. Bickmore, W.A., *The spatial organization of the human genome*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2013. **14**: p. 67-84.
32. Cheng, X. and R.M. Blumenthal, *Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation*. Biochemistry, 2010. **49**(14): p. 2999-3008.
33. De Carvalho, D.D., J.S. You, and P.A. Jones, *DNA methylation and cellular reprogramming*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(10): p. 609-17.
34. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(10): p. 726-34.
35. Suva, M.L., N. Riggi, and B.E. Bernstein, *Epigenetic reprogramming in cancer*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1567-70.
36. Bergman, Y. and H. Cedar, *DNA methylation dynamics in health and disease*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(3): p. 274-81.
37. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 219-20.

38. Chen, T., N. Tsujimoto, and E. Li, *The PWWP domain of Dnmt3a and Dnmt3b is required for directing DNA methylation to the major satellite repeats at pericentric heterochromatin*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(20): p. 9048-58.
39. Jeong, S., et al., *Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(19): p. 5366-76.
40. Sharma, S., et al., *Nucleosomes containing methylated DNA stabilize DNA methyltransferases 3A/3B and ensure faithful epigenetic inheritance*. PLoS Genet, 2011. **7**(2): p. e1001286.
41. Klose, R.J. and A.P. Bird, *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 89-97.
42. Robertson, K.D., et al., *The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(11): p. 2291-8.
43. Easwaran, H.P., et al., *Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases*. EMBO Rep, 2004. **5**(12): p. 1181-6.
44. Jones, P.A. and G. Liang, *Rethinking how DNA methylation patterns are maintained*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(11): p. 805-11.
45. Jeltsch, A. and R.Z. Jurkowska, *New concepts in DNA methylation*. Trends Biochem Sci, 2014. **39**(7): p. 310-8.
46. Jeltsch, A. and R.Z. Jurkowska, *Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(18): p. 8556-8575.
47. Cheng, X. and R.J. Roberts, *AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(18): p. 3784-95.
48. Song, J., et al., *Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation*. Science, 2012. **335**(6069): p. 709-12.
49. Hermann, A., H. Gowher, and A. Jeltsch, *Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2571-87.
50. Rountree, M.R., K.E. Bachman, and S.B. Baylin, *DNMT1 binds HDAC2 and a new corepressor, DMAP1, to form a complex at replication foci*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 269-77.
51. Mohan, K.N., F. Ding, and J.R. Chaillet, *Distinct roles of DMAP1 in mouse development*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(9): p. 1861-9.
52. Ding, F. and J.R. Chaillet, *In vivo stabilization of the Dnmt1 (cytosine-5)-methyltransferase protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14861-6.
53. Chuang, L.S., et al., *Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1*. Science, 1997. **277**(5334): p. 1996-2000.
54. Leonhardt, H., et al., *A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei*. Cell, 1992. **71**(5): p. 865-73.
55. Berkyyurek, A.C., et al., *The DNA methyltransferase Dnmt1 directly interacts with the SET and RING finger-associated (SRA) domain of the multifunctional protein Uhrf1 to facilitate accession of the catalytic center to hemi-methylated DNA*. J Biol Chem, 2014. **289**(1): p. 379-86.
56. Bashtrykov, P., et al., *The UHRF1 protein stimulates the activity and specificity of the maintenance DNA methyltransferase DNMT1 by an allosteric mechanism*. J Biol Chem, 2014. **289**(7): p. 4106-15.
57. Song, J., et al., *Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation*. Science, 2011. **331**(6020): p. 1036-40.
58. Syeda, F., et al., *The replication focus targeting sequence (RFTS) domain is a DNA-competitive inhibitor of Dnmt1*. J Biol Chem, 2011. **286**(17): p. 15344-51.
59. Zhang, Z.M., et al., *Crystal Structure of Human DNA Methyltransferase 1*. J Mol Biol, 2015. **427**(15): p. 2520-31.

60. Takeshita, K., et al., *Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(22): p. 9055-9.
61. Jeltsch, A., *On the Enzymatic Properties of Dnmt1: Specificity, Processivity, Mechanism of Linear Diffusion and Allosteric Regulation of the Enzyme*. Epigenetics, 2014. **1**(2): p. 63-66.
62. Hermann, A., R. Goyal, and A. Jeltsch, *The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48350-9.
63. O'Keefe, R.T., S.C. Henderson, and D.L. Spector, *Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences*. J Cell Biol, 1992. **116**(5): p. 1095-110.
64. Rothbart, S.B., et al., *Multivalent histone engagement by the linked tandem Tudor and PHD domains of UHRF1 is required for the epigenetic inheritance of DNA methylation*. Genes Dev, 2013. **27**(11): p. 1288-98.
65. Qin, W., et al., *DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination*. Cell Res, 2015. **25**(8): p. 911-29.
66. Felle, M., et al., *The USP7/Dnmt1 complex stimulates the DNA methylation activity of Dnmt1 and regulates the stability of UHRF1*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(19): p. 8355-65.
67. Glickman, J.F., J. Flynn, and N.O. Reich, *Purification and characterization of recombinant baculovirus-expressed mouse DNA methyltransferase*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **230**(2): p. 280-4.
68. Di Ruscio, A., et al., *DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation*. Nature, 2013. **503**(7476): p. 371-6.
69. Zhang, G., et al., *Small RNA-mediated DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 inhibition leads to aberrant DNA methylation*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(12): p. 6112-24.
70. Sugiyama, Y., et al., *The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated by phosphorylation with casein kinase 1delta/epsilon*. Biochem J, 2010. **427**(3): p. 489-97.
71. Hervouet, E., et al., *Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11333.
72. Esteve, P.O., et al., *A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(1): p. 42-8.
73. Esteve, P.O., et al., *Binding of 14-3-3 reader proteins to phosphorylated DNMT1 facilitates aberrant DNA methylation and gene expression*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(4): p. 1642-56.
74. Lavoie, G., et al., *PKC isoforms interact with and phosphorylate DNMT1*. BMC Biol, 2011. **9**: p. 31.
75. Du, Z., et al., *DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination*. Sci Signal, 2010. **3**(146): p. ra80.
76. Qin, W., H. Leonhardt, and F. Spada, *Usp7 and Uhrf1 control ubiquitination and stability of the maintenance DNA methyltransferase Dnmt1*. J Cell Biochem, 2011. **112**(2): p. 439-44.
77. Cheng, J., et al., *Molecular mechanism for USP7-mediated DNMT1 stabilization by acetylation*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7023.
78. Peng, L., et al., *SIRT1 deacetylates the DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein and alters its activities*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(23): p. 4720-34.
79. Esteve, P.O., et al., *Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5076-81.
80. Wang, J., et al., *The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 125-9.
81. Zhang, Y., et al., *Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(13): p. 4246-53.

82. Guo, X., et al., *Structural insight into autoinhibition and histone H3-induced activation of DNMT3A*. Nature, 2015. **517**(7536): p. 640-4.
83. Baubec, T., et al., *Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation*. Nature, 2015. **520**(7546): p. 243-7.
84. Emperle, M., et al., *Cooperative DNA binding and protein/DNA fiber formation increases the activity of the Dnmt3a DNA methyltransferase*. J Biol Chem, 2014. **289**(43): p. 29602-13.
85. Rajavelu, A., et al., *Function and disruption of DNA methyltransferase 3a cooperative DNA binding and nucleoprotein filament formation*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(2): p. 569-80.
86. Deaton, A.M. and A. Bird, *CpG islands and the regulation of transcription*. Genes Dev, 2011. **25**(10): p. 1010-22.
87. Irizarry, R.A., et al., *The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores*. Nat Genet, 2009. **41**(2): p. 178-86.
88. Wu, S.C. and Y. Zhang, *Active DNA demethylation: many roads lead to Rome*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010. **11**(9): p. 607-620.
89. Pavri, R. and M.C. Nussenzweig, *AID targeting in antibody diversity*. Adv Immunol, 2011. **110**: p. 1-26.
90. Maiti, A. and A.C. Drohat, *Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites*. J Biol Chem, 2011. **286**(41): p. 35334-8.
91. Roadmap Epigenomics, C., et al., *Integrative analysis of 111 reference human epigenomes*. Nature, 2015. **518**(7539): p. 317-30.
92. Mikkelsen, T.S., et al., *Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 553-60.
93. Fisher, C.L. and A.G. Fisher, *Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells*. Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(2): p. 140-6.
94. Charlet, J., et al., *Bivalent Regions of Cytosine Methylation and H3K27 Acetylation Suggest an Active Role for DNA Methylation at Enhancers*. Mol Cell, 2016. **62**(3): p. 422-31.
95. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
96. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
97. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.
98. Pujadas, E. and A.P. Feinberg, *Regulated noise in the epigenetic landscape of development and disease*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1123-31.
99. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. **301**(5895): p. 89-92.
100. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell, 2012. **150**(1): p. 12-27.
101. You, J.S. and P.A. Jones, *Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?* Cancer Cell, 2012. **22**(1): p. 9-20.
102. Shen, H. and P.W. Laird, *Interplay between the cancer genome and epigenome*. Cell, 2013. **153**(1): p. 38-55.
103. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma*. Nature, 2013. **499**(7456): p. 43-9.
104. Swafford, D.S., et al., *Frequent aberrant methylation of p16INK4a in primary rat lung tumors*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1366-74.
105. Holst, C.R., et al., *Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia*. Cancer Res, 2003. **63**(7): p. 1596-601.

106. Fishel, R., et al., *The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer*. Cell, 1993. **75**(5): p. 1027-38.
107. Liu, B., et al., *Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability*. Nat Genet, 1995. **9**(1): p. 48-55.
108. Herman, J.G., et al., *Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6870-5.
109. Veigl, M.L., et al., *Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8698-702.
110. O'Hagan, H.M., et al., *Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands*. Cancer Cell, 2011. **20**(5): p. 606-19.
111. Easwaran, H., H.C. Tsai, and S.B. Baylin, *Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance*. Mol Cell, 2014. **54**(5): p. 716-27.
112. Subramaniam, D., et al., *DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 80.
113. Sproul, D., et al., *Tissue of origin determines cancer-associated CpG island promoter hypermethylation patterns*. Genome Biol, 2012. **13**(10): p. R84.
114. Robert, M.F., et al., *DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 61-5.
115. Robertson, K.D., et al., *DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 338-42.
116. Fuks, F., et al., *DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 88-91.
117. Clements, E.G., et al., *DNMT1 modulates gene expression without its catalytic activity partially through its interactions with histone-modifying enzymes*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(10): p. 4334-46.
118. Fraga, M.F., et al., *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 391-400.
119. Krusche, C.A., et al., *Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis*. Breast Cancer Res Treat, 2005. **90**(1): p. 15-23.
120. Weichert, W., et al., *Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(6): p. 1669-77.
121. Pietersen, A.M., et al., *EZH2 and BMI1 inversely correlate with prognosis and TP53 mutation in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(6): p. R109.
122. Bea, S., et al., *BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2409-12.
123. Amann, J.M., et al., *ETO, a Target of t(8;21) in Acute Leukemia, Makes Distinct Contacts with Multiple Histone Deacetylases and Binds mSin3A through Its Oligomerization Domain*. Molecular and Cellular Biology, 2001. **21**(19): p. 6470-6483.
124. Popovic, R. and J.D. Licht, *Emerging epigenetic targets and therapies in cancer medicine*. Cancer Discov, 2012. **2**(5): p. 405-13.
125. Stumpel, D.J., et al., *Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options*. Blood, 2009. **114**(27): p. 5490-8.
126. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell, 1980. **20**(1): p. 85-93.

127. Fenaux, P., et al., *Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(3): p. 223-32.
128. Yoo, C.B., et al., *Delivery of 5-aza-2'-deoxycytidine to cells using oligodeoxynucleotides*. *Cancer Res*, 2007. **67**(13): p. 6400-8.
129. Azad, N., et al., *The future of epigenetic therapy in solid tumours--lessons from the past*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013. **10**(5): p. 256-66.
130. Kelly, T.K., D.D. De Carvalho, and P.A. Jones, *Epigenetic modifications as therapeutic targets*. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(10): p. 1069-78.
131. Ghoshal, K., et al., *5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(11): p. 4727-41.
132. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. *Nature*, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
133. Hollenbach, P.W., et al., *A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines*. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9001.
134. Ahuja, N., H. Easwaran, and S.B. Baylin, *Harnessing the potential of epigenetic therapy to target solid tumors*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(1): p. 56-63.
135. Yang, A.S., *DNA Methylation Changes after 5-Aza-2'-Deoxycytidine Therapy in Patients with Leukemia*. *Cancer Research*, 2006. **66**(10): p. 5495-5503.
136. Kantarjian, H., et al., *Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia*. *Blood*, 2007. **109**(1): p. 52-7.
137. Shen, L., et al., *DNA Methylation Predicts Survival and Response to Therapy in Patients With Myelodysplastic Syndromes*. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. **28**(4): p. 605-613.
138. Issa, J.-P.J., et al., *Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, dose-escalation phase I study*. *The Lancet Oncology*, 2015. **16**(9): p. 1099-1110.
139. Fandy, T.E., et al., *Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies*. *Blood*, 2009. **114**(13): p. 2764-2773.
140. Issa, J.P., et al., *Phase I study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies*. *Blood*, 2004. **103**(5): p. 1635-40.
141. Yang, X., et al., *Targeting DNA methylation for epigenetic therapy*. *Trends Pharmacol Sci*, 2010. **31**(11): p. 536-46.
142. Lee, B.H., et al., *Procainamide is a specific inhibitor of DNA methyltransferase 1*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(49): p. 40749-56.
143. Chuang, J.C., et al., *Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine*. *Mol Cancer Ther*, 2005. **4**(10): p. 1515-20.
144. Galeotti, F., et al., *Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity*. *Phytochemistry Letters*, 2008. **1**(1): p. 44-48.
145. Yang, C.S., et al., *Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(6): p. 429-39.
146. Fang, M.Z., et al., *Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(19 Pt 1): p. 7033-41.
147. Lee, W.J., J.Y. Shim, and B.T. Zhu, *Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids*. *Mol Pharmacol*, 2005. **68**(4): p. 1018-30.

148. Fang, M., D. Chen, and C.S. Yang, *Dietary polyphenols may affect DNA methylation*. J Nutr, 2007. **137**(1 Suppl): p. 223S-228S.
149. Li, Y. and T.O. Tollefsbol, *Impact on DNA methylation in cancer prevention and therapy by bioactive dietary components*. Curr Med Chem, 2010. **17**(20): p. 2141-51.
150. Burgos-Moron, E., et al., *The dark side of curcumin*. Int J Cancer, 2010. **126**(7): p. 1771-5.
151. Brueckner, B., et al., *Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6305-11.
152. Denny, W.A., et al., *Potential antitumor agents. 29. Quantitative structure-activity relationships for the antileukemic bisquaternary ammonium heterocycles*. J Med Chem, 1979. **22**(2): p. 134-50.
153. Datta, J., et al., *A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation*. Cancer Res, 2009. **69**(10): p. 4277-85.
154. Fagan, R.L., et al., *Laccaic acid A is a direct, DNA-competitive inhibitor of DNA methyltransferase 1*. J Biol Chem, 2013. **288**(33): p. 23858-67.
155. Gros, C., et al., *New insights on the mechanism of quinoline-based DNA Methyltransferase inhibitors*. J Biol Chem, 2015. **290**(10): p. 6293-302.
156. Valente, S., et al., *Selective non-nucleoside inhibitors of human DNA methyltransferases active in cancer including in cancer stem cells*. J Med Chem, 2014. **57**(3): p. 701-13.
157. Druker, B.J., et al., *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1031-7.
158. Tuveson, D.A., et al., *STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications*. Oncogene, 2001. **20**(36): p. 5054-8.
159. Parums, D.V., *Current status of targeted therapy in non-small cell lung cancer*. Drugs Today (Barc), 2014. **50**(7): p. 503-25.
160. Jones, P.A., J.-P.J. Issa, and S. Baylin, *Targeting the cancer epigenome for therapy*. Nature Reviews Genetics, 2016. **17**(10): p. 630-641.
161. Matei, D., et al., *Epigenetic resensitization to platinum in ovarian cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(9): p. 2197-205.
162. Sharma, S.V., et al., *A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations*. Cell, 2010. **141**(1): p. 69-80.
163. Wilting, R.H. and J.H. Dannenberg, *Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance*. Drug Resist Updat, 2012. **15**(1-2): p. 21-38.
164. Qiu, H., et al., *DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-CdR enhances the radiosensitivity of gastric cancer cells*. Cancer Sci, 2009. **100**(1): p. 181-8.
165. Li, Y., et al., *Enhancement of radiosensitivity by 5-Aza-CdR through activation of G2/M checkpoint response and apoptosis in osteosarcoma cells*. Tumour Biol, 2014. **35**(5): p. 4831-9.
166. Siddiqi, S., J. Mills, and I. Matushansky, *Epigenetic remodeling of chromatin architecture: exploring tumor differentiation therapies in mesenchymal stem cells and sarcomas*. Curr Stem Cell Res Ther, 2010. **5**(1): p. 63-73.
167. Polak, P., et al., *Cell-of-origin chromatin organization shapes the mutational landscape of cancer*. Nature, 2015. **518**(7539): p. 360-4.
168. Mutsaers, A.J. and C.R. Walkley, *Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells?* Bone, 2014. **62**: p. 56-63.
169. Matushansky, I., et al., *MFH classification: differentiating undifferentiated pleomorphic sarcoma in the 21st Century*. Expert Rev Anticancer Ther, 2009. **9**(8): p. 1135-44.
170. Matushansky, I., et al., *A Developmental Model of Sarcomagenesis Defines a Differentiation-Based Classification for Liposarcomas*. The American Journal of Pathology, 2008. **172**(4): p. 1069-1080.

171. Tirode, F., et al., *Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(5): p. 421-9.
172. Torchia, E.C., S. Jaishankar, and S.J. Baker, *Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(13): p. 3464-8.
173. Sadikovic, B., et al., *In vitro analysis of integrated global high-resolution DNA methylation profiling with genomic imbalance and gene expression in osteosarcoma*. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2834.
174. Matushansky, I., et al., *Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(11): p. 3248-57.
175. Kansara, M., et al., *Wnt inhibitory factor 1 is epigenetically silenced in human osteosarcoma, and targeted disruption accelerates osteosarcomagenesis in mice*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(4): p. 837-51.
176. Barker, N., *The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway*. *Methods Mol Biol*, 2008. **468**: p. 5-15.
177. Ebert, P.S. and G.I. Malinin, *Induction of erythroid differentiation in Friend murine erythroleukemic cells by inorganic selenium compounds*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979. **86**(2): p. 340-9.
178. Nalabothula, N. and F. Carrier, *Cancer cells' epigenetic composition and predisposition to histone deacetylase inhibitor sensitization*. *Epigenomics*, 2011. **3**(2): p. 145-55.
179. Kato, H., et al., *Expression of pericyte, mesangium and muscle markers in malignant rhabdoid tumor cell lines: differentiation-induction using 5-azacytidine*. *Cancer Sci*, 2003. **94**(12): p. 1059-65.
180. Zhou, G.S., et al., *5-Azacytidine facilitates osteogenic gene expression and differentiation of mesenchymal stem cells by alteration in DNA methylation*. *Cytotechnology*, 2009.
181. Cameron, E.E., et al., *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*. *Nat Genet*, 1999. **21**(1): p. 103-7.
182. Stiller, C.A., et al., *Survival of children with bone sarcoma in Europe since 1978: results from the EURO CARE study*. *Eur J Cancer*, 2001. **37**(6): p. 760-6.
183. Group, E.S.E.S.N.W., *Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2014. **25 Suppl 3**: p. iii113-23.
184. Skubitz, K.M. and D.R. D'Adamo, *Sarcoma*. *Mayo Clin Proc*, 2007. **82**(11): p. 1409-32.
185. Helman, L.J. and P. Meltzer, *Mechanisms of sarcoma development*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(9): p. 685-94.
186. Xiao, W., et al., *Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis*. *Clin Sarcoma Res*, 2013. **3**(1): p. 10.
187. Toguchida, J. and T. Nakayama, *Molecular genetics of sarcomas: applications to diagnoses and therapy*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(9): p. 1573-80.
188. Ottaviani, G. and N. Jaffe, *The epidemiology of osteosarcoma*. *Cancer Treat Res*, 2009. **152**: p. 3-13.
189. Hansen, M.F., M. Seton, and A. Merchant, *Osteosarcoma in Paget's disease of bone*. *J Bone Miner Res*, 2006. **21 Suppl 2**: p. P58-63.
190. Fuchs, B. and D.J. Pritchard, *Etiology of osteosarcoma*. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(397): p. 40-52.
191. Kansara, M., et al., *Translational biology of osteosarcoma*. *Nat Rev Cancer*, 2014. **14**(11): p. 722-35.
192. Jo, V.Y. and C.D. Fletcher, *WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition*. *Pathology*, 2014. **46**(2): p. 95-104.
193. Campanacci, M., *Bone and Soft Tissue Tumors: Clinical Features, Imaging, Pathology and Treatment 2nd Edition*. Springer, 1999.
194. Klein, M.J. and G.P. Siegal, *Osteosarcoma*. *American Journal of Clinical Pathology*, 2006. **125**(4): p. 555-581.

195. Szymanska, J., et al., *Ring chromosomes in parosteal osteosarcoma contain sequences from 12q13-15: a combined cytogenetic and comparative genomic hybridization study*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1996. **16**(1): p. 31-4.
196. Wunder, J.S., et al., *TP53 mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(7): p. 1483-90.
197. Toguchida, J., et al., *Preferential mutation of paternally derived RB gene as the initial event in sporadic osteosarcoma*. *Nature*, 1989. **338**(6211): p. 156-8.
198. Chen, X., et al., *Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma*. *Cell Rep*, 2014. **7**(1): p. 104-12.
199. Sowa, Y., et al., *Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **886**: p. 195-9.
200. Watanabe, K., K. Okamoto, and S. Yonehara, *Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through downregulation of cellular FLIP*. *Cell Death Differ*, 2005. **12**(1): p. 10-8.
201. Al-Romaih, K., et al., *Modulation by decitabine of gene expression and growth of osteosarcoma U2OS cells in vitro and in xenografts: identification of apoptotic genes as targets for demethylation*. *Cancer Cell Int*, 2007. **7**: p. 14.
202. Cain, J.E., et al., *Sustained Low-Dose Treatment with the Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 Induces Terminal Differentiation of Osteosarcoma Cells*. *Sarcoma*, 2013. **2013**: p. 608964.
203. Di Pompo, G., et al., *Novel histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in sarcoma cancer stem cells*. *J Med Chem*, 2015. **58**(9): p. 4073-9.
204. Bacci, G., et al., *Bone metastases in osteosarcoma patients treated with neoadjuvant or adjuvant chemotherapy: the Rizzoli experience in 52 patients*. *Acta Orthop*, 2006. **77**(6): p. 938-43.
205. Geller, D.S. and R. Gorlick, *Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies*. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2010. **8**(10): p. 705-18.
206. Bernthal, N.M., et al., *Long-term results (>25 years) of a randomized, prospective clinical trial evaluating chemotherapy in patients with high-grade, operable osteosarcoma*. *Cancer*, 2012. **118**(23): p. 5888-93.
207. Link, M.P., et al., *The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity*. *N Engl J Med*, 1986. **314**(25): p. 1600-6.
208. Collins, M., et al., *Benefits and adverse events in younger versus older patients receiving neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma: findings from a meta-analysis*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(18): p. 2303-12.
209. Meyers, P.A., et al., *Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma*. *Cancer*, 2011. **117**(8): p. 1736-44.
210. Hattinger, C.M., et al., *Emerging drugs for high-grade osteosarcoma*. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2010. **15**(4): p. 615-34.
211. Janeway, K.A. and H.E. Grier, *Sequelae of osteosarcoma medical therapy: a review of rare acute toxicities and late effects*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(7): p. 670-8.
212. Luetke, A., et al., *Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review*. *Cancer Treat Rev*, 2014. **40**(4): p. 523-32.
213. Capobianco, E., et al., *Separate and combined effects of DNMT and HDAC inhibitors in treating human multi-drug resistant osteosarcoma HosDXR150 cell line*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e95596.
214. Grabowski, P., *Physiology of Bone*. *Endocr Dev*, 2015. **28**: p. 33-55.
215. Roodman, G.D., *Cell biology of the osteoclast*. *Exp Hematol*, 1999. **27**(8): p. 1229-41.
216. Kaji, H., et al., *Insulin-like growth factor-I mediates osteoclast-like cell formation stimulated by parathyroid hormone*. *J Cell Physiol*, 1997. **172**(1): p. 55-62.

217. Chau, J.F., W.F. Leong, and B. Li, *Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function*. *Histol Histopathol*, 2009. **24**(12): p. 1593-606.
218. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
219. Wagner, E.R., et al., *Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma*. *Sarcoma*, 2011. **2011**: p. 325238.
220. Ali, N.N., J. Rowe, and N.M. Teich, *Constitutive expression of non-bone/liver/kidney alkaline phosphatase in human osteosarcoma cell lines*. *J Bone Miner Res*, 1996. **11**(4): p. 512-20.
221. Manara, M.C., et al., *Reversal of malignant phenotype in human osteosarcoma cells transduced with the alkaline phosphatase gene*. *Bone*, 2000. **26**(3): p. 215-20.
222. Zucchini, C., et al., *Identification of candidate genes involved in the reversal of malignant phenotype of osteosarcoma cells transfected with the liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene*. *Bone*, 2004. **34**(4): p. 672-9.
223. Thomas, D.M., et al., *Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27KIP1, is disrupted in osteosarcoma*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(5): p. 925-34.
224. Vaes, B.L., et al., *Microarray analysis reveals expression regulation of Wnt antagonists in differentiating osteoblasts*. *Bone*, 2005. **36**(5): p. 803-11.
225. Vrtacnik, P., J. Marc, and B. Ostanek, *Epigenetic mechanisms in bone*. *Clin Chem Lab Med*, 2014. **52**(5): p. 589-608.
226. Delgado-Calle, J., et al., *Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage*. *Bone*, 2011. **49**(4): p. 830-8.
227. Azechi, T., et al., *5-aza-2'-Deoxycytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, facilitates the inorganic phosphorus-induced mineralization of vascular smooth muscle cells*. *J Atheroscler Thromb*, 2014. **21**(5): p. 463-76.
228. El-Serafi, A.T., R.O. Oreffo, and H.I. Roach, *Epigenetic modifiers influence lineage commitment of human bone marrow stromal cells: Differential effects of 5-aza-deoxycytidine and trichostatin A*. *Differentiation*, 2011. **81**(1): p. 35-41.
229. Gordon, J.A., et al., *Epigenetic pathways regulating bone homeostasis: potential targeting for intervention of skeletal disorders*. *Curr Osteoporos Rep*, 2014. **12**(4): p. 496-506.
230. Kitazawa, R. and S. Kitazawa, *Methylation status of a single CpG locus 3 bases upstream of TATA-box of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) gene promoter modulates cell- and tissue-specific RANKL expression and osteoclastogenesis*. *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(1): p. 148-58.
231. Delgado-Calle, J., et al., *Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone*. *Epigenetics*, 2012. **7**(1): p. 83-91.
232. Delgado-Calle, J., et al., *DNA methylation contributes to the regulation of sclerostin expression in human osteocytes*. *J Bone Miner Res*, 2012. **27**(4): p. 926-37.
233. Ewing, J., *Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. James Ewing. Proceedings of the New York Pathological Society, 1921*. *CA Cancer J Clin*, 1972. **22**(2): p. 95-8.
234. Khoury, J.D., *Ewing sarcoma family of tumors*. *Adv Anat Pathol*, 2005. **12**(4): p. 212-20.
235. Buckley, J.D., et al., *Epidemiology of osteosarcoma and Ewing's sarcoma in childhood: a study of 305 cases by the Children's Cancer Group*. *Cancer*, 1998. **83**(7): p. 1440-8.
236. Novakovic, B., et al., *Increased risk of neuroectodermal tumors and stomach cancer in relatives of patients with Ewing's sarcoma family of tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1994. **86**(22): p. 1702-6.
237. McKeen, E.A., et al., *Birth defects with Ewing's sarcoma*. *N Engl J Med*, 1983. **309**(24): p. 1522.
238. Narod, S.A., et al., *Congenital anomalies and childhood cancer in Great Britain*. *Am J Hum Genet*, 1997. **60**(3): p. 474-85.

239. Schiffman, J.D. and J. Wright, *Ewing's Sarcoma and Second Malignancies*. Sarcoma, 2011. **2011**: p. 736841.
240. Grier, H.E., *The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors*. *Pediatr Clin North Am*, 1997. **44**(4): p. 991-1004.
241. Bacci, G., et al., *Prognostic factors in nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone treated with adjuvant chemotherapy: analysis of 359 patients at the Istituto Ortopedico Rizzoli*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(1): p. 4-11.
242. Picci, P., et al., *Atlas of Musculoskeletal Tumors and Tumorlike lesions - The Rizzoli Case Archive*. Springer, 2014.
243. Enneking, W.F., *Musculoskeletal tumor staging: 1988 update*. *Cancer Treat Res*, 1989. **44**: p. 39-49.
244. Delattre, O., et al., *Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours*. *Nature*, 1992. **359**(6391): p. 162-5.
245. Arndt, C.A. and W.M. Crist, *Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(5): p. 342-52.
246. Le Deley, M.C., et al., *Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(12): p. 1982-8.
247. Kovar, H., *Context matters: the hen or egg problem in Ewing's sarcoma*. *Semin Cancer Biol*, 2005. **15**(3): p. 189-96.
248. Riggi, N., et al., *EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells*. *Cancer Res*, 2008. **68**(7): p. 2176-85.
249. Tanaka, M., et al., *Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors*. *J Clin Invest*, 2014. **124**(7): p. 3061-74.
250. Cavazzana, A.O., et al., *Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone*. *Am J Pathol*, 1987. **127**(3): p. 507-18.
251. Noguera, R., et al., *Patterns of differentiation in extraosseous Ewing's sarcoma cells. An in vitro study*. *Cancer*, 1994. **73**(3): p. 616-24.
252. Hu-Lieskovan, S., et al., *EWS-FLII fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors*. *Cancer Res*, 2005. **65**(11): p. 4633-44.
253. Eliazer, S., et al., *Alteration of mesodermal cell differentiation by EWS/FLI-1, the oncogene implicated in Ewing's sarcoma*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(2): p. 482-92.
254. Riggi, N., et al., *Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(24): p. 11459-68.
255. Miyagawa, Y., et al., *Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(7): p. 2125-37.
256. Castillero-Trejo, Y., et al., *Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells Results in EWS/FLI-1-dependent, ewing sarcoma-like tumors*. *Cancer Res*, 2005. **65**(19): p. 8698-705.
257. Riggi, N., et al., *EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells*. *Genes Dev*, 2010. **24**(9): p. 916-32.
258. Li, X., et al., *The Ewing's sarcoma fusion protein, EWS-FLI, binds Runx2 and blocks osteoblast differentiation*. *J Cell Biochem*, 2010. **111**(4): p. 933-43.
259. Torchia, E.C., et al., *EWS/FLI-1 induces rapid onset of myeloid/erythroid leukemia in mice*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(22): p. 7918-34.
260. Leacock, S.W., et al., *A zebrafish transgenic model of Ewing's sarcoma reveals conserved mediators of EWS-FLII tumorigenesis*. *Dis Model Mech*, 2012. **5**(1): p. 95-106.

261. von Levetzow, C., et al., *Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19305.
262. Armengol, G., et al., *Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization*. Br J Cancer, 1997. **75**(10): p. 1403-9.
263. Savola, S., et al., *Combined use of expression and CGH arrays pinpoints novel candidate genes in Ewing sarcoma family of tumors*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 17.
264. Hattinger, C.M., et al., *Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing tumours*. Br J Cancer, 2002. **86**(11): p. 1763-9.
265. Mackintosh, C., et al., *1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma*. Oncogene, 2012. **31**(10): p. 1287-98.
266. Huang, H.Y., et al., *Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse*. J Clin Oncol, 2005. **23**(3): p. 548-58.
267. de Alava, E., et al., *Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma*. Cancer, 2000. **89**(4): p. 783-92.
268. Brohl, A.S., et al., *The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation*. PLoS Genet, 2014. **10**(7): p. e1004475.
269. Tirode, F., et al., *Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations*. Cancer Discov, 2014. **4**(11): p. 1342-53.
270. Crompton, B.D., et al., *The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma*. Cancer Discov, 2014. **4**(11): p. 1326-41.
271. Sankar, S. and S.L. Lessnick, *Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma*. Cancer Genet, 2011. **204**(7): p. 351-65.
272. Herrero-Martin, D., et al., *Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs IGF-1/IGF-1R signalling and reveals TOPK as a new target*. Br J Cancer, 2009. **101**(1): p. 80-90.
273. Scotlandi, K., et al., *CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors*. Cancer Res, 2000. **60**(18): p. 5134-42.
274. Rocchi, A., et al., *CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis*. J Clin Invest, 2010. **120**(3): p. 668-80.
275. Riggi, N. and I. Stamenkovic, *The Biology of Ewing sarcoma*. Cancer Lett, 2007. **254**(1): p. 1-10.
276. Tomazou, E.M., et al., *Epigenome mapping reveals distinct modes of gene regulation and widespread enhancer reprogramming by the oncogenic fusion protein EWS-FLI1*. Cell Rep, 2015. **10**(7): p. 1082-95.
277. Riggi, N., et al., *EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma*. Cancer Cell, 2014. **26**(5): p. 668-81.
278. Patel, M., et al., *Tumor-specific retargeting of an oncogenic transcription factor chimera results in dysregulation of chromatin and transcription*. Genome Res, 2012. **22**(2): p. 259-70.
279. Gangwal, K., et al., *Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 10149-54.
280. Uchiumi, F., S. Miyazaki, and S. Tanuma, *The possible functions of duplicated ets (GGAA) motifs located near transcription start sites of various human genes*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(12): p. 2039-51.
281. Guillon, N., et al., *The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4932.
282. Sankar, S., et al., *Mechanism and relevance of EWS/FLI-mediated transcriptional repression in Ewing sarcoma*. Oncogene, 2013. **32**(42): p. 5089-100.

283. Sankar, S., et al., *Reversible LSD1 inhibition interferes with global EWS/ETS transcriptional activity and impedes Ewing sarcoma tumor growth*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(17): p. 4584-97.
284. Richter, G.H., et al., *EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5324-9.
285. Ban, J., et al., *Suppression of deacetylase SIRT1 mediates tumor-suppressive NOTCH response and offers a novel treatment option in metastatic Ewing sarcoma*. Cancer Res, 2014. **74**(22): p. 6578-88.
286. Park, H.R., et al., *Microarray-based DNA methylation study of Ewing's sarcoma of the bone*. Oncol Lett, 2014. **8**(4): p. 1613-1617.
287. Patel, N., et al., *DNA methylation and gene expression profiling of ewing sarcoma primary tumors reveal genes that are potential targets of epigenetic inactivation*. Sarcoma, 2012. **2012**: p. 498472.
288. Harada, K., et al., *Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines*. Oncogene, 2002. **21**(27): p. 4345-9.
289. Avigad, S., et al., *Aberrant methylation and reduced expression of RASSF1A in Ewing sarcoma*. Pediatr Blood Cancer, 2009. **53**(6): p. 1023-8.
290. Gharanei, S., et al., *RASSF2 methylation is a strong prognostic marker in younger age patients with Ewing sarcoma*. Epigenetics, 2013. **8**(9): p. 893-8.
291. Wong, I.H., et al., *Ubiquitous aberrant RASSF1A promoter methylation in childhood neoplasia*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 994-1002.
292. Alholle, A., et al., *Functional epigenetic approach identifies frequently methylated genes in Ewing sarcoma*. Epigenetics, 2013. **8**(11): p. 1198-204.
293. Nestheide, S., et al., *Pharmacologic inhibition of epigenetic modification reveals targets of aberrant promoter methylation in Ewing sarcoma*. Pediatr Blood Cancer, 2013. **60**(9): p. 1437-46.
294. Tucker, M.A., et al., *Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children*. N Engl J Med, 1987. **317**(10): p. 588-93.
295. Bernstein, M., et al., *Ewing's sarcoma family of tumors: current management*. Oncologist, 2006. **11**(5): p. 503-19.
296. Balamuth, N.J. and R.B. Womer, *Ewing's sarcoma*. Lancet Oncol, 2010. **11**(2): p. 184-92.
297. Stahl, M., et al., *Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma*. Pediatr Blood Cancer, 2011. **57**(4): p. 549-53.
298. Ferrari, S., et al., *Response to high-dose ifosfamide in patients with advanced/recurrent Ewing sarcoma*. Pediatr Blood Cancer, 2009. **52**(5): p. 581-4.
299. Wagner, L.M., et al., *Temozolomide and intravenous irinotecan for treatment of advanced Ewing sarcoma*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **48**(2): p. 132-9.
300. Hunold, A., et al., *Topotecan and cyclophosphamide in patients with refractory or relapsed Ewing tumors*. Pediatr Blood Cancer, 2006. **47**(6): p. 795-800.
301. Smith, M.A., et al., *Synergistic activity of PARP inhibition by talazoparib (BMN 673) with temozolomide in pediatric cancer models in the pediatric preclinical testing program*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(4): p. 819-32.
302. Lefranc, F., V. Facchini, and R. Kiss, *Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas*. Oncologist, 2007. **12**(12): p. 1395-403.
303. Sohn, H.W., et al., *Engagement of CD99 Induces Apoptosis Through a Calcineurin-Independent Pathway in Ewing's Sarcoma Cells*. The American Journal of Pathology, 1998. **153**(6): p. 1937-1945.
304. Scotlandi, K., et al., *Targeting CD99 in association with doxorubicin: an effective combined treatment for Ewing's sarcoma*. Eur J Cancer, 2006. **42**(1): p. 91-6.

305. Guerzoni, C., et al., *CD99 triggering in Ewing sarcoma delivers a lethal signal through p53 pathway reactivation and cooperates with doxorubicin*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(1): p. 146-56.
306. Ludwig, J.A., *Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future*. Curr Opin Oncol, 2008. **20**(4): p. 412-8.
307. Di Giandomenico, S., et al., *Mode of action of trabectedin in myxoid liposarcomas*. Oncogene, 2014. **33**(44): p. 5201-10.
308. Baruchel, S., et al., *A phase 2 trial of trabectedin in children with recurrent rhabdomyosarcoma, Ewing sarcoma and non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas: a report from the Children's Oncology Group*. Eur J Cancer, 2012. **48**(4): p. 579-85.
309. Cesne, A.L., et al., *Interruption versus continuation of trabectedin in patients with soft-tissue sarcoma (T-DIS): a randomised phase 2 trial*. The Lancet Oncology, 2015. **16**(3): p. 312-319.
310. Sakimura, R., et al., *Antitumor effects of histone deacetylase inhibitor on Ewing's family tumors*. Int J Cancer, 2005. **116**(5): p. 784-92.
311. Bennani-Baiti, I.M., et al., *Lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1A/AOF2/BHC110) is expressed and is an epigenetic drug target in chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, osteosarcoma, and rhabdomyosarcoma*. Hum Pathol, 2012. **43**(8): p. 1300-7.
312. Gros, C., et al., *Development of a universal radioactive DNA methyltransferase inhibition test for high-throughput screening and mechanistic studies*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(19): p. e185.
313. Ceccaldi, A., et al., *C5-DNA methyltransferase inhibitors: from screening to effects on zebrafish embryo development*. ChemBiochem, 2011. **12**(9): p. 1337-45.
314. Jia, D., et al., *Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation*. Nature, 2007. **449**(7159): p. 248-51.
315. Benini, S., et al., *Redundancy of autocrine loops in human osteosarcoma cells*. Int J Cancer, 1999. **80**(4): p. 581-8.
316. Bagnara, G.P., et al., *Establishment and characterization of a primitive neuroectodermal tumor of bone continuous cell line (LAP-35)*. Int J Cell Cloning, 1990. **8**(6): p. 409-24.
317. Manara, M.C., et al., *NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(2): p. 530-40.
318. Chou, T.C., et al., *Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(20): p. 1517-24.
319. Lundberg, A.S. and R.A. Weinberg, *Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(2): p. 753-61.
320. Rubin, S.M., *Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(1): p. 12-9.
321. Rorie, C.J., et al., *The Ews/Fli-1 fusion gene switches the differentiation program of neuroblastomas to Ewing sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1266-77.
322. Haydon, R.C., H.H. Luu, and T.C. He, *Osteosarcoma and osteoblastic differentiation: a new perspective on oncogenesis*. Clin Orthop Relat Res, 2007. **454**: p. 237-46.
323. Sciandra, M., et al., *CD99 drives terminal differentiation of osteosarcoma cells by acting as a spatial regulator of ERK 1/2*. J Bone Miner Res, 2014. **29**(5): p. 1295-309.
324. Vaananen, H.K. and T. Laitala-Leinonen, *Osteoclast lineage and function*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 132-8.
325. Feinberg, A.P., M.A. Koldobskiy, and A. Gondor, *Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(5): p. 284-99.

326. Esteller, M., *Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No 1**: p. R50-9.
327. Juergens, R.A., et al., *Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer*. Cancer Discov, 2011. **1**(7): p. 598-607.
328. Lin, R.K. and Y.C. Wang, *Dysregulated transcriptional and post-translational control of DNA methyltransferases in cancer*. Cell Biosci, 2014. **4**: p. 46.
329. Huang, J., et al., *RGS6 suppresses Ras-induced cellular transformation by facilitating Tip60-mediated Dnmt1 degradation and promoting apoptosis*. Oncogene, 2014. **33**(27): p. 3604-11.
330. Gut, P. and E. Verdin, *The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 489-98.
331. Chano, T., et al., *Tumour-specific metabolic adaptation to acidosis is coupled to epigenetic stability in osteosarcoma cells*. Am J Cancer Res, 2016. **6**(4): p. 859-75.
332. Burdach, S., et al., *Epigenetic maintenance of stemness and malignancy in peripheral neuroectodermal tumors by EZH2*. Cell Cycle, 2009. **8**(13): p. 1991-6.
333. Vire, E., et al., *The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation*. Nature, 2006. **439**(7078): p. 871-4.
334. Negishi, M., et al., *Bmi1 cooperates with Dnmt1-associated protein 1 in gene silencing*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(4): p. 992-8.
335. Dubrowskaja, N., et al., *Neurofilament Heavy polypeptide CpG island methylation associates with prognosis of renal cell carcinoma and prediction of antivascular endothelial growth factor therapy response*. Cancer Med, 2014. **3**(2): p. 300-9.
336. Calmon, M.F., et al., *Epigenetic silencing of neurofilament genes promotes an aggressive phenotype in breast cancer*. Epigenetics, 2015. **10**(7): p. 622-32.
337. Hopyan, S., et al., *Expression of osteocalcin and its transcriptional regulators core-binding factor alpha 1 and MSX2 in osteoid-forming tumours*. J Orthop Res, 1999. **17**(5): p. 633-8.
338. Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura, *BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(3): p. 251-63.
339. Canalis, E., A.N. Economides, and E. Gazzerro, *Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton*. Endocr Rev, 2003. **24**(2): p. 218-35.
340. Johnson, J.I., et al., *Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials*. Br J Cancer, 2001. **84**(10): p. 1424-31.
341. Tentler, J.J., et al., *Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development*. Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(6): p. 338-50.
342. Becker, M., et al., *Xenograft models for undifferentiated pleomorphic sarcoma not otherwise specified are essential for preclinical testing of therapeutic agents*. Oncol Lett, 2016. **12**(2): p. 1257-1264.
343. Tacar, O., P. Sriamornsak, and C.R. Dass, *Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems*. J Pharm Pharmacol, 2013. **65**(2): p. 157-70.
344. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. Eur J Pharmacol, 2014. **740**: p. 364-78.
345. Shang, D., et al., *Demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine enhances susceptibility of bladder transitional cell carcinoma to Cisplatin*. Urology, 2008. **71**(6): p. 1220-5.
346. Rajagopalan, P.T., et al., *Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13481-6.
347. Heninger, E., T.E. Krueger, and J.M. Lang, *Augmenting antitumor immune responses with epigenetic modifying agents*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 29.
348. Karpf, A.R., *A potential role for epigenetic modulatory drugs in the enhancement of cancer/germ-line antigen vaccine efficacy*. Epigenetics, 2006. **1**(3): p. 116-20.

349. Chiappinelli, K.B., et al., *Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses*. Cell, 2015. **162**(5): p. 974-86.
350. Roulois, D., et al., *DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts*. Cell, 2015. **162**(5): p. 961-973.
351. Chiappinelli, K.B., et al., *Combining Epigenetic and Immunotherapy to Combat Cancer*. Cancer Res, 2016. **76**(7): p. 1683-9.
352. Dear, A.E., *Epigenetic Modulators and the New Immunotherapies*. N Engl J Med, 2016. **374**(7): p. 684-6.