



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

---

*Dipartimento di Medicina Molecolare  
e dello Sviluppo*



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

---

**Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare  
Direttore: Prof.ssa Antonella Naldini  
XXXI ciclo**

## **RELAZIONE DEL SECONDO ANNO DI CORSO**

**Tutor:**

**Prof. Fabio Carraro**

**Dottorando:**

**Dott. ssa Giuditta Guerrini**

**ANNO ACCADEMICO 2016-2017**

Dott. ssa Giuditta Guerrini  
e-mail: [guerrini12@student.unisi.it](mailto:guerrini12@student.unisi.it)  
via A. Moro, 2-53100 Siena (Italia)  
Tel. +39 0577/234219



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

## *Dipartimento di Medicina Molecolare e dello Sviluppo*

Nel corso del secondo anno di dottorato ho ampliato la mia conoscenza delle tecniche e dei protocolli utilizzati in laboratorio. Il mio progetto di ricerca si basa sull'importanza della via di segnalazione di Hedgehog e dell'ambiente ipossico nel carcinoma mammario. Le linee cellulari utilizzate sono le MDA-MB-231 e le 8701-BC ovvero carcinoma duttale infiltrante, non esprimenti i recettori per estrogeni, progesterone e per il fattore di crescita epidermico (triple negative) e le MCF-7, adenocarcinoma mammario esprimente recettore per estrogeni.

Inoltre ho collaborato con il dipartimento di dermatologia ed analizzato fibroblasti primari espianati da pazienti affette da sclerodermia (Morfee) e da fascite eosinofila.

Ho contribuito al progetto riguardante l'importanza della proteina adattatrice RAI nel promuovere la sopravvivenza di cellule di neuroblastoma in condizioni ipossiche ed al progetto riguardante il ruolo della via di segnalazione di Hedgehog in cellule di mieloma K-562 e KU-812 in condizioni ipossiche.

### **INTRODUZIONE**

Il cancro al seno è attualmente uno dei tipi di cancro maggiormente espressi tra le donne e la seconda causa di morte da cancro dopo quello al polmone. Chirurgia, radioterapia, terapie chemio/ormonali e misure di prevenzione sono gli attuali strumenti per combatterlo. Nonostante gli enormi sviluppi raggiunti sulle strategie terapeutiche, la mortalità associata a questo tipo di tumori rimane elevata a causa di ricadute e metastasi le quali sono connesse alla presenza di cellule tumorali staminali all'interno della massa tumorale che conferiscono resistenza e permettono una ricrescita del tumore stesso. La via di segnalazione di Hedgehog fu inizialmente scoperta da Nüsslein-Volhard come fondamentale nello sviluppo embrionale della *Drosophila Melanogaster*. Studi successivi hanno dimostrato l'importanza di tale via di segnalazione anche nell'uomo, dove controlla lo sviluppo del tubo neurale, l'asse antero-posteriore degli arti e il mantenimento della staminalità cellulare. Tale via è quindi soprattutto attiva durante lo sviluppo embrionale, dove promuove la divisione cellulare, il differenziamento, l'organogenesi. Nell'adulto la via è attiva in alcuni tipi di tessuto con il ruolo di mantenerne l'omeostasi. Data l'importanza di tale via, una mancata regolazione può comportare lo sviluppo di alcuni tipi di malattie dello sviluppo (Sindrome di Gorlin, syndrome di Greig) e di alcuni tipi di tumore (Carcinoma baso-cellulare, medulloblastoma, rhabdomyosarcoma). La massa tumorale in via di accrescimento, inoltre, presenta regioni dove l'alta capacità proliferativa delle cellule causa una scarsa disponibilità di nutrienti ed ossigeno, condizioni che stimolano il processo di angiogenesi e dunque di metastasi. La condizione di ipossia comporta cambiamenti genetici ed epigenetici nelle cellule tumorali e conferisce resistenza alle terapie. Sapendo che l'ipossia aumenta fortemente la capacità di migrazione delle cellule e che la via di segnalazione di Hh gioca un ruolo fondamentale nello stesso processo biologico, abbiamo investigato il meccanismo attraverso il quale tale via controlla la capacità di migrazione ed invasività in linee di carcinoma mammario, attraverso il silenziamento del principale trasduttore del segnale di tale via, Smoothened (SMO).

Dott. ssa Giuditta Guerrini  
e-mail: [guerrini12@student.unisi.it](mailto:guerrini12@student.unisi.it)  
via A. Moro, 2-53100 Siena (Italia)  
Tel. +39 0577/234219



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

*Dipartimento di Medicina Molecolare  
e dello Sviluppo*

## **MATERIALI E METODI**

Clonaggio di plasmidi in cellule batteriche *E. coli*

Trasfezione di colture cellulari tramite metodi fisici (elettroporazione mediante Neon transfection system) e chimici (Lipofectamine 2000, Interferin)

Estrazione di proteine, RNA e miRNA da colture cellulari

Dosaggio di proteine e RNA

Retrotrascrizione ed amplificazione di acidi nucleici (qRT-PCR)

Elettroforesi su gel d'agarosio

Western blot con utilizzo di ChemiDoc XRS (BIORAD)

Immunofluorescenza

Camera di Boyden modificata (matrigel)

Wound healing scratch assay

Utilizzo del microscopio ottico ed a fluorescenza

## **RISULTATI**

Saggi di migrazione evidenziano un'aumentata migrazione delle linee cellulari MDA-MB-231, 8701-BC in condizioni ipossiche. Le cellule di carcinoma mammario sono state trasfettate con un plasmide contenente la sequenza di un siRNA diretto contro l'mRNA di Smoothed ed il gene per la resistenza ad un antibiotico. Dunque sono state selezionate in terreno addizionato con Puomicina ed il silenziamento è stato confermato tramite Western blot e qRT-PCR. Il silenziamento stabile della via di Hedgehog ed il trattamento con inibitori (Ciclopamina) od agonisti (Sag) di Smoothed o inibitori di Gli1 (GANT61), evidenziano come la via di segnalazione di Hh sia importante nel controllare la migrazione cellulare e la sopravvivenza. Tali controlli avvengono anche attraverso la modulazione dell'espressione di regolatori del pH intracellulari. Il silenziamento della via di Hedgehog riduce la capacità di migrazione ed invasione anche in presenza di IL1 $\beta$ , che simula un ambiente infiammatorio, elemento chiave nel processo di formazione ed accrescimento del tumore stesso. Ulteriori studi sono necessari per confermare il ruolo della via di segnalazione di Hh nella migrazione delle cellule di carcinoma mammario in condizioni ipossiche e delle vie di segnalazione da essa controllate.

Dott. ssa Giuditta Guerrini  
e-mail: [guerrini12@student.unisi.it](mailto:guerrini12@student.unisi.it)  
via A. Moro, 2-53100 Siena (Italia)  
Tel. +39 0577/234219



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

*Dipartimento di Medicina Molecolare  
e dello Sviluppo*

### **PARTECIPAZIONE A CONVEGNI E SEMINARI**

- Seminario: "Between life and death: The dual function of mitochondrial ATP synthase". Paolo Bernardi, MD 25/01/2017
  - Webinar: "The intersection of epigenetics, metabolism and tumorigenesis". Euroclone 22/03/2017
  - Webinar: "Taking Control of the Unknown: Nanoparticle Hazard Containment" David Wasescha, B.S. Microbiology and Matt Hull, PhD Labroots, 28/09/2017
  - Webinar: "Development of anti-cancer gene therapies through understanding of cytokine-induced programmed cell" Leah Persaud Thermo Fisher Scientific/Gibco 28/09/2017
  - Webinar: "Structure and Function of Epigenetic Regulators in Human Disease" Cigall Kadoch, PhD and Chris Fry, PhD 19/09/2017
  - Webinar: "Deciphering cancer: Understanding tumor invasion and the metastatic microenvironment" David C. Lyden, M.D., Ph.D. and Shahin Rafii, M.D. 19/09/2018 (visto il giorno 11/10/2018).
- 
- Criscuoli M., Filippi I., Aldinucci C., Guerrini G., Pelicci G., Carraro F., Naldini A., (2017) THE SHC PROTEIN RAI PROMOTES AN ADAPTIVE CELL SURVIVAL PROGRAM IN HYPOXIC NEUROBLASTOMA CELLS, Journal of cellular Physiology, Manuscript ID JCP-17-0211, submitted.
  - Guerrini G. et al., (2017) Inhibition of Smoothed reduces Breast Cancer cell migration through the downregulation of CAIX and CAXII expression, manuscript in preparation.