

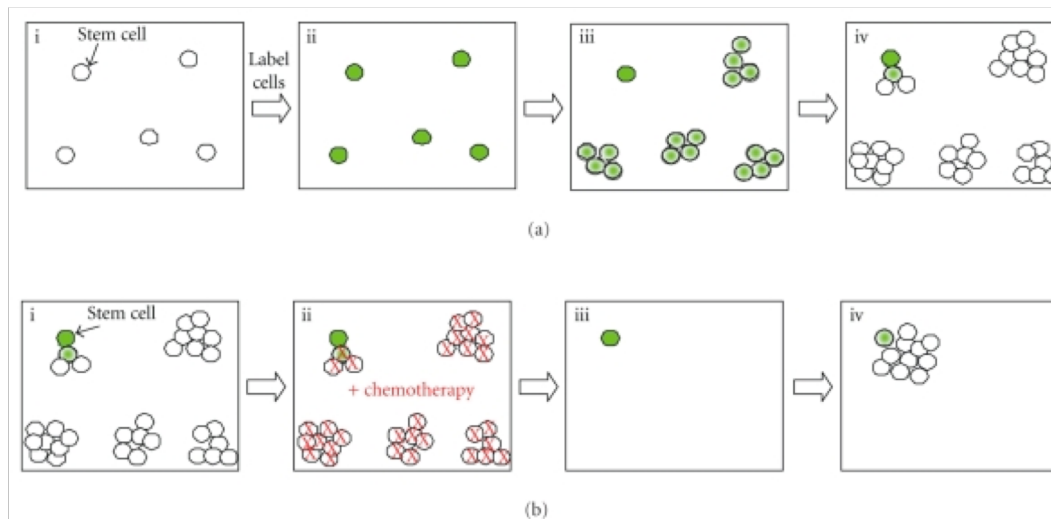
RELAZIONE FINALE STM 19 APRILE-19 MAGGIO DEL DR. ANIELLO CERRATO

Il sistema di marcatura lipidica con PKH26 permette il riconoscimento di cellule con basso indice di proliferazione; lo stesso sistema consente la individuazione di cellule "stem" che sono andate incontro a una divisione asimmetrica nel corso della proliferazione.

Fig1

Abbiamo marcato linee cellulari di cancro di mammella (MCF7 e MDA-MB231) con il PKH 26 per individuare, a 10 giorni di proliferazione, una popolazione cellulare capace di ritenere il marcatore. La marcatura con il PKH26 individua una popolazione, pari al 2%, che mantiene il marcatore indiluito.

PKH26 pulse and chase method



Time course of PKH retaining cells in breast cancer cell line MCF7

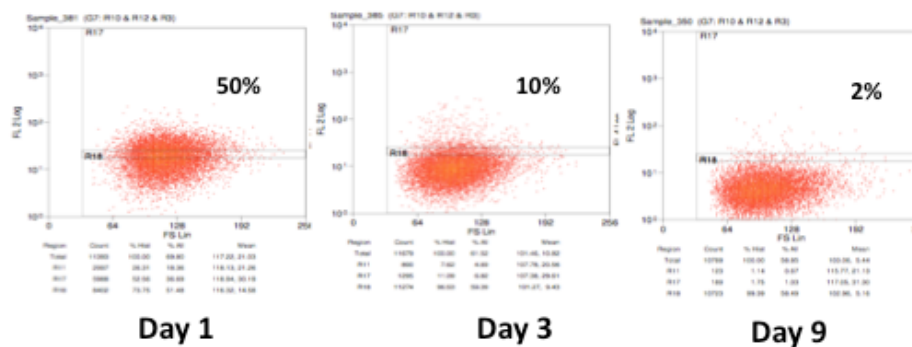


Fig.2

La popolazione che ritiene il marcatore PKH26 (popolazione PKH high), sebbene arricchita per cellule senescenti, e' capace di rigenerare una popolazione cellulare con lo stesso indice di proliferazione della popolazione di controllo (PKH low).

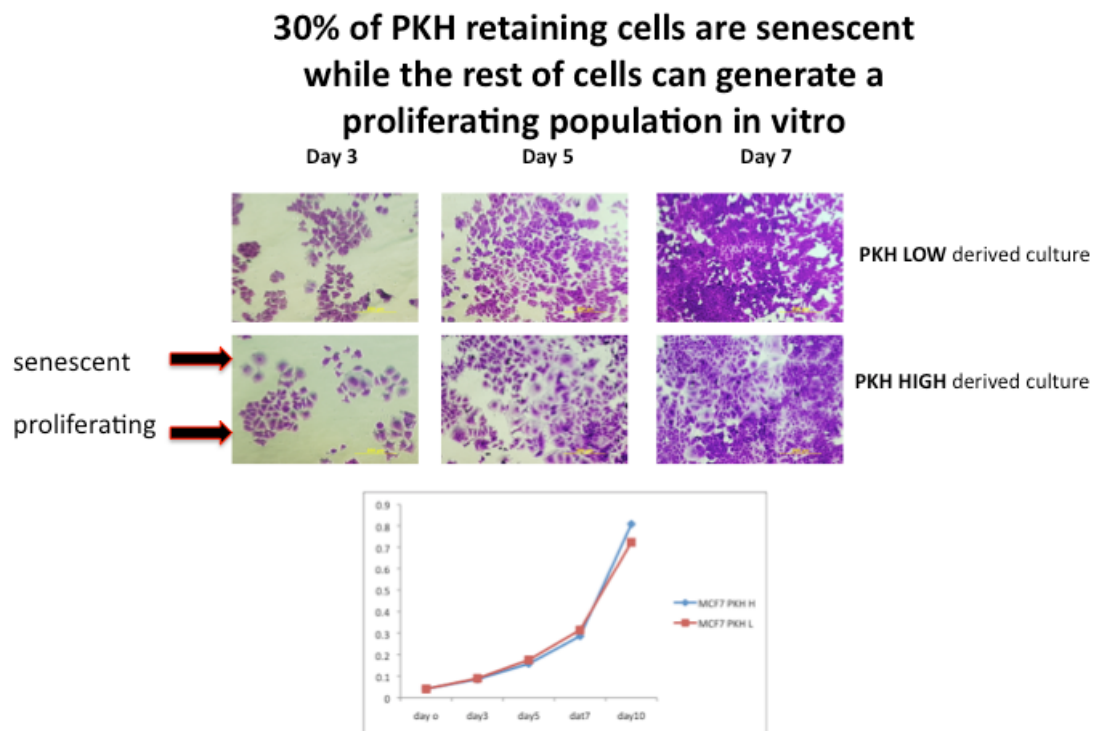


Fig 3
 La popolazione PKH high e' dotata di maggiore resistenza all'anoikis, e forma con maggiore efficienza mammosfere primarie.

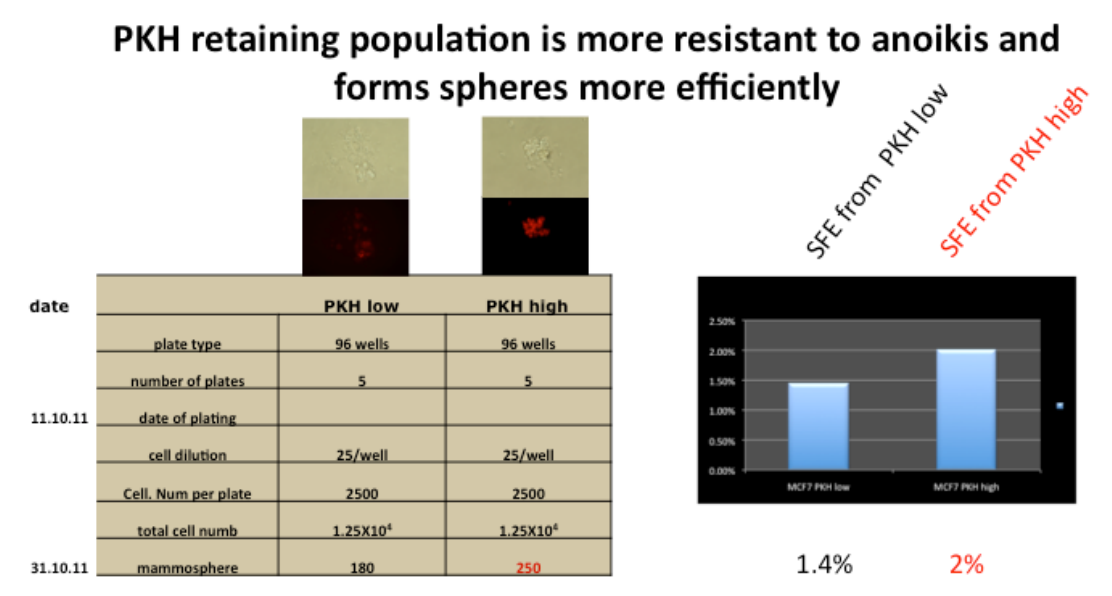
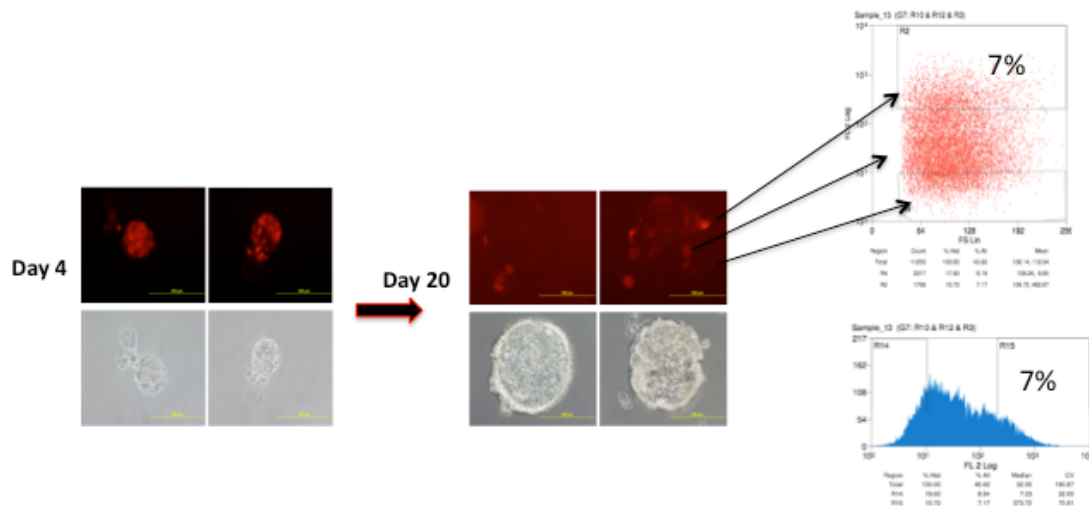


Fig.4

Le sfere generate da una popolazione PKH26 positiva includono cellule con ritenzione del marcatore PKH26; queste cellule sono dotate di una maggiore capacità a generare sfere secondarie.

Tracking PKH retaining cells in MCF7 primary spheres



Secondary spheres forming efficiency of the different PKH population (needs to be assayed in 10 ml plates to keep all the PKH retaining population)

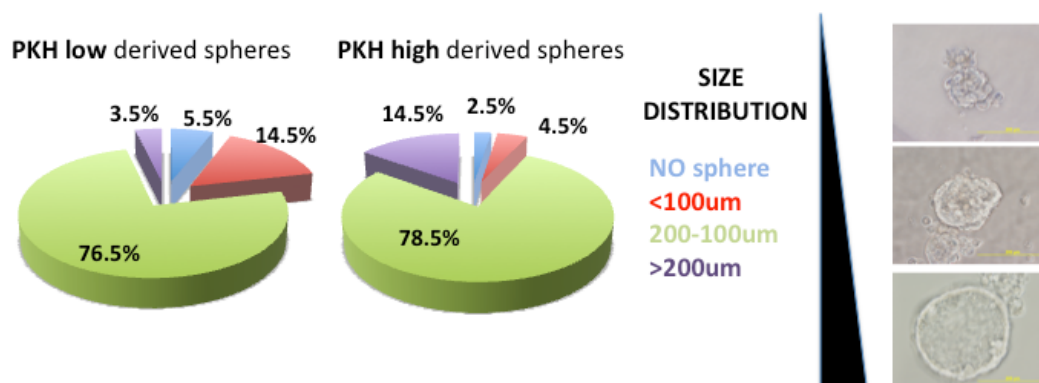


Fig. 5

La senescenza delle cellule tumorali e' stata descritta come un processo cellulare che puo' limitare o favorire la progressione tumorale. Secondo un modello di tumore di mammella in vivo proposto da Angelini et al. nel 2012, la Oncogene Iduced Senescence (activated HER2) favorisce la formazione e le metastasi tumorali. Tuttavia, il meccanismo di promozione tumorale da parte di cellule senescenti rimane ignoto e rimangono aperte molteplici ipotesi

(PD Angelini, 2012)

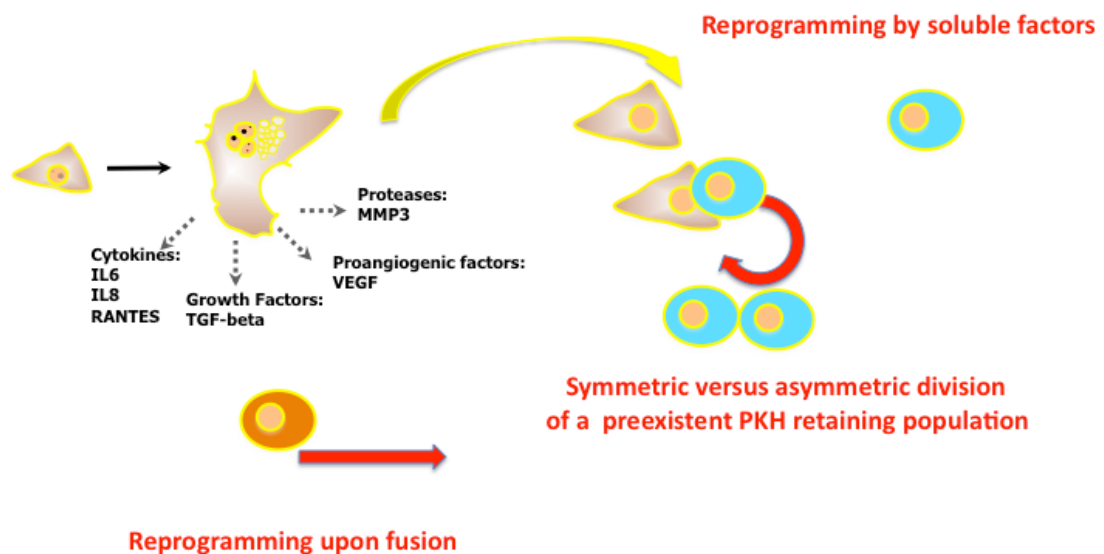
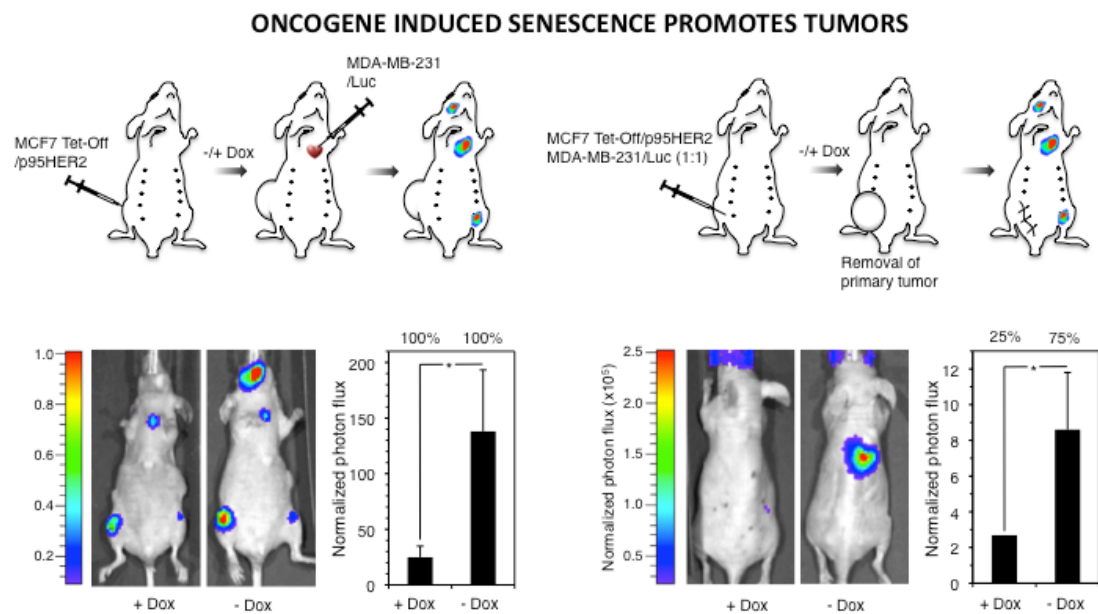
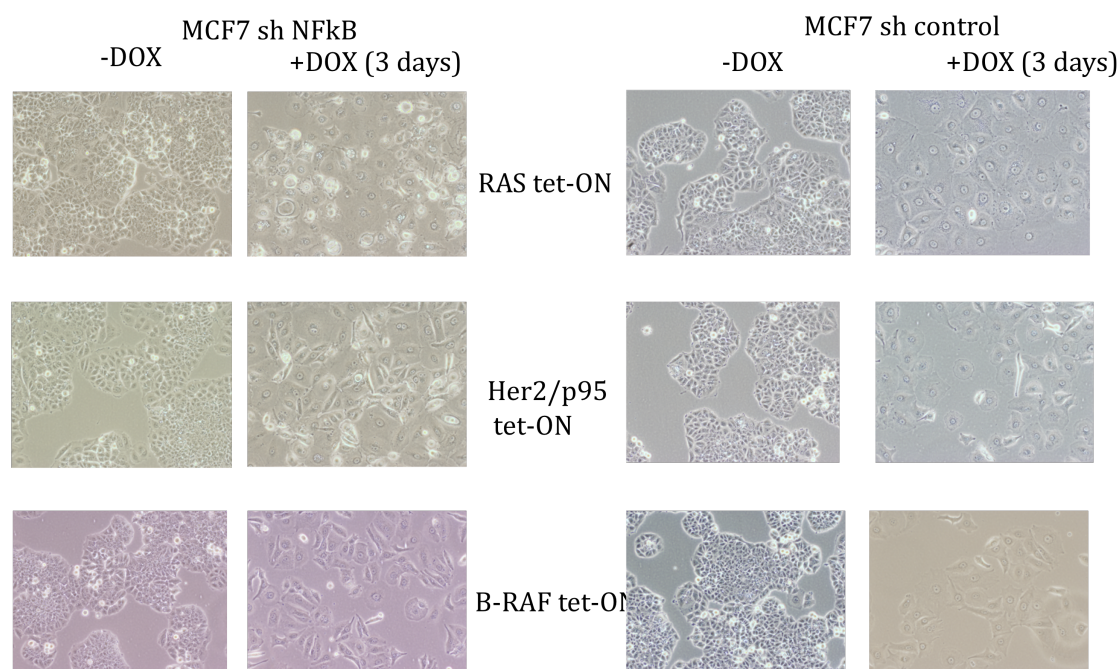


Fig. 6

Abbiamo generato, per infezione lentivirale, cloni TET-On e TET-Off di linee cellulari di carcinoma mammario MCF7, esprimenti differenti oncogeni (HER2, Ras, Raf), in presenza o assenza del fattore trascrizionale NFkB, importante per la induzione di fattori secreti durante il processo di senescenza indotta da oncogeni.

Gli oncogeni utilizzati hanno indotto la senescenza in maniera omogenea anche in assenza del fattore NFkB. Sono in corso studi di comparazione per il secretoma associato alla senescenza di questi cloni (SAS).



Tet on clones

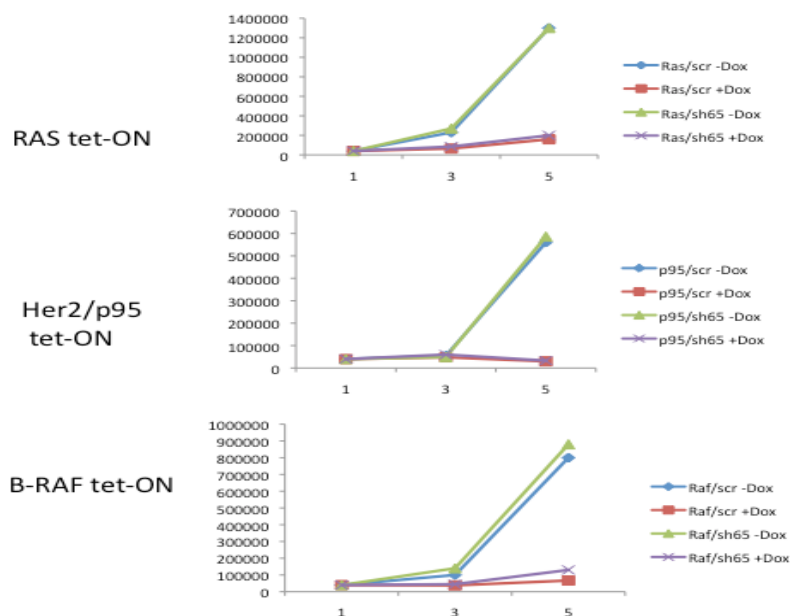
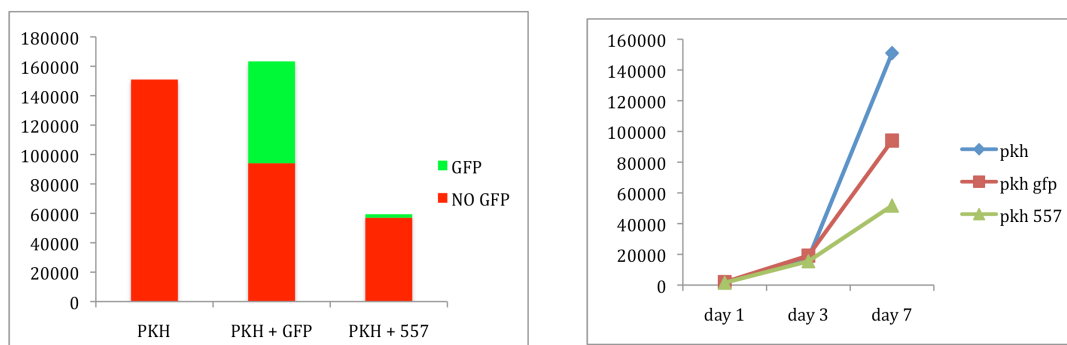


Fig.7

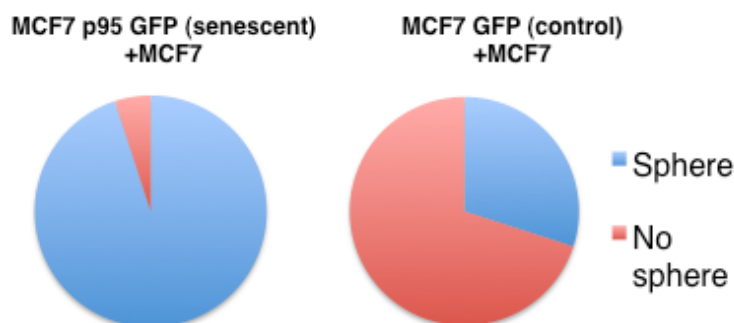
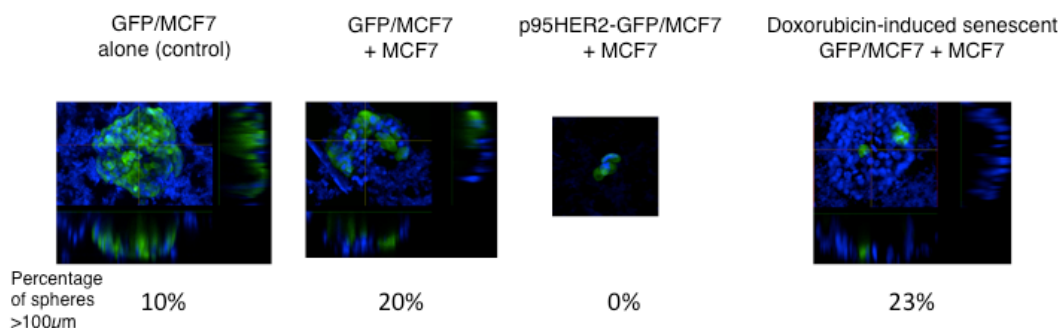
Abbiamo coltivato cellule MCF7 marcate con PKH26 (cellule rosse) in presenza di cellule MCF7 -GFP, in cui e' stato possibile indurre una OIS (cellule verdi), o in presenza di un mezzo condizionzto dalla senescenza, per valutare gli effetti provocati dalle differenti condizioni sulla proliferazione , la motilita' e la resistenza all'anoikis delle cellule non senescenti. La presenza diretta delle cellule senescenti ha un effetto negativo sulla proliferazione e la resistenza all' anoikis delle cellule non senescenti.

Viceversa, la incubazione con mezzo condizionato da cellule senescenti incrementa la popolazione PKH26 high non senescente, facilita la motilita' de queste cellule e potenzia la resistenza all'anoikis.

Oncogene induced senescent cells reduce the number of surrounding cells



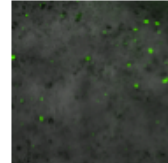
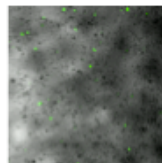
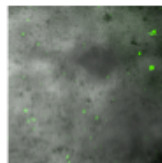
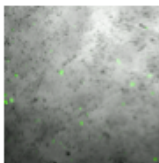
Sphere formation is inhibited by the contact with oncogene induced senescent cells



Il mezzo condizionato delle cellule senescenti e' capace, di promuovere la motilita delle cellule tumorali, di incrementare la popolazione PKH high e di favorire la formazione di mammosfere primarie.

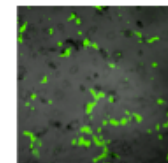
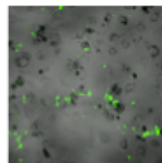
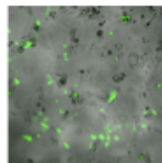
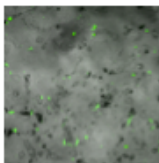
MCF7-GFP transwell migration assay induced by senescent cell monolayer

Control monolayer

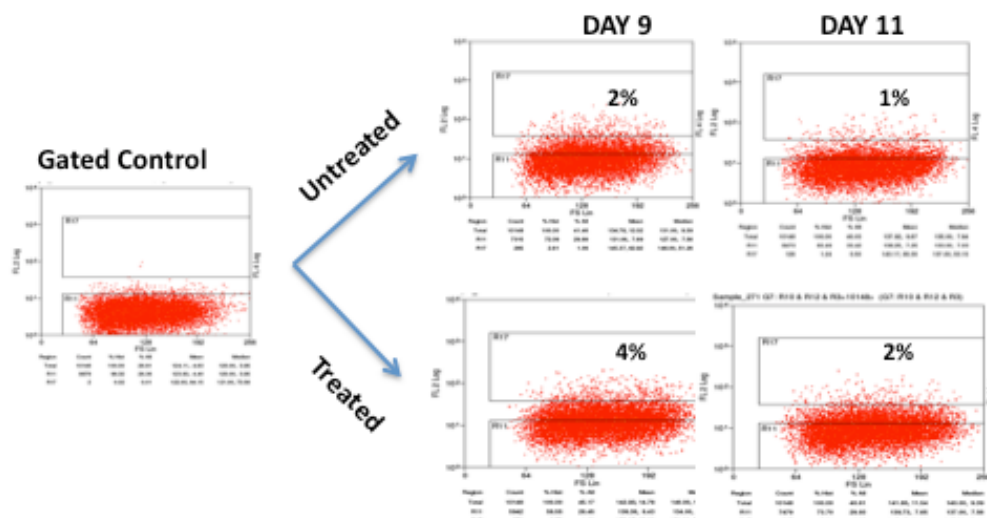


48 h confocal

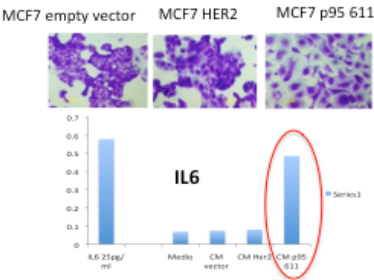
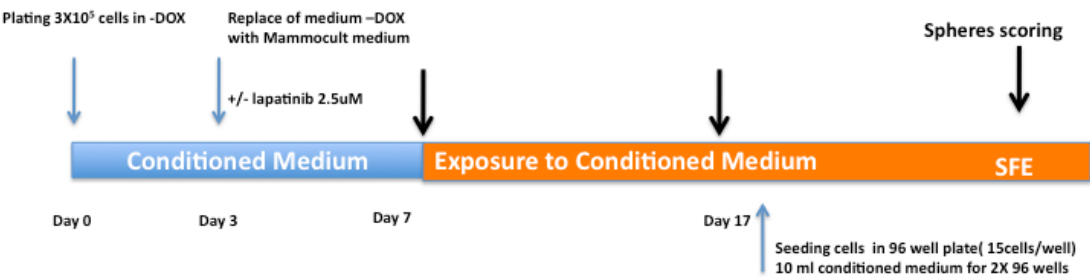
MCF7p95 monolayer



SAS induces a relative increase of PKH retaining cell population



SAS enhances the formation of spheres



Primary Spheres Forming in Conditioned Medium

	Absolute	Diluted
Regular Medium	4.3%	4.3%
Control Medium (MCF7 empty vector)	4%	3.6%
Conditioned Medium (MCF7 p95 611)	11%	5.6%

Pretreatment of MCF7 cells with conditioned medium of senescent cells enhances the efficiency of spheres formation

