



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

Induzione dell'apoptosi nelle cellule A431 del carcinoma
epidermoide umano ad opera del timochinone attraverso la
soppressione mediata dai ROS di STAT3

Thymoquinone induces apoptosis of human epidermoid
carcinoma A431 cells through ROS-mediated suppression of
STAT3

Tesi di Laurea di:

El Abbassi Kawtar

Docente referente

Dott.ssa Benedetti Maura

Sessione autunnale

A.A 2019/2020



Università Politecnica delle Marche
Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente
Corso di Laurea in Scienze Biologiche



**Induzione
dell'apoptosi nelle
cellule A431 del
carcinoma
epidermoide umano
ad opera del
timochinone
attraverso la
soppressione mediata
dai ROS di STAT3**

LAUREANDA: EL ABBASSI KAWTAR

RELATORE: DOTT.SSA BENEDETTI MAURA

SESSIONE AUTUNNALE

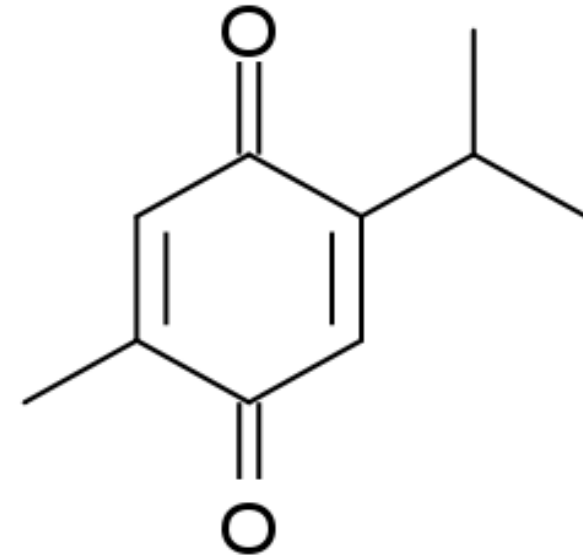
A. A. 2019-2020

ABSTRACT

Le cellule A431 del carcinoma a cellule squamose sono state trattate con TQ per monitorare l'apoptosi indotta dal trattamento. L'analisi con Western Blot è stata eseguita per determinare l'espressione delle proteine apoptotiche o anti-apoptotiche. La vitalità cellulare e l'apoptosi sono state rilevate usando il test MTT e l'analisi FACS. L'induzione intracellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte del TQ è stata valutata mediante colorazione con diacetato 2',7'-diclorofluoresceina. È stato effettuato uno studio sullo xenotrapianto in vivo per confermare l'effetto antiproliferativo del TQ. L'apoptosi è stata associata con l'induzione di p53 e Bax, l'inibizione dell'espressione di Mdm2, Bcl-2, Bcl-xl e l'attivazione delle caspasi-9, -7 e -3. Il TQ ha inibito la fosforilazione costitutiva e l'attività di legame di STAT3 al DNA nelle cellule A431. L'espressione dei prodotti del gene bersaglio STAT3, ciclina D1 e survivina, è stata attenuata dal trattamento con TQ. La generazione dei ROS è incrementata durante l'apoptosi e il pretrattamento con N-acetilcisteina, un ROS "spazzino", ha invertito l'effetto apoptotico del TQ. Uno studio in vivo con topi NOD scid gamma (NSG) ha confermato l'effetto inibitorio del TQ nella crescita delle cellule A431.

- L'incidenza del cancro alla pelle è cresciuta rapidamente negli ultimi decenni, con più di 2 milioni di casi ogni anno;
- Il carcinoma a cellule squamose (SCC) è una delle forme più comuni del cancro alla pelle, con il più alto rischio di metastasi;
- La causa principale dell'SCC è l'esposizione alla luce UV;
- Ricerca di un trattamento non chirurgico per curare e prevenire l'SCC.

Il Timochinone (TQ) è il composto bioattivo di *Nigella Sativa* ed è un potenziale agente antitumorale-neutraceutico.



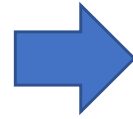
COLTURA E TRATTAMENTO DELLE CELLULE

Cellule A431 mantenute in:

- Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) integrato con 10% di siero bovino fetale;
- 100 U/ml di penicillina;
- 100 µg/ml di streptomicina;
- Incubazione a 37 °C in termostato umidificato contenente 5% di CO₂ e 95% di aria;
- Trattamento con TQ alla confluenza di 50-60%.



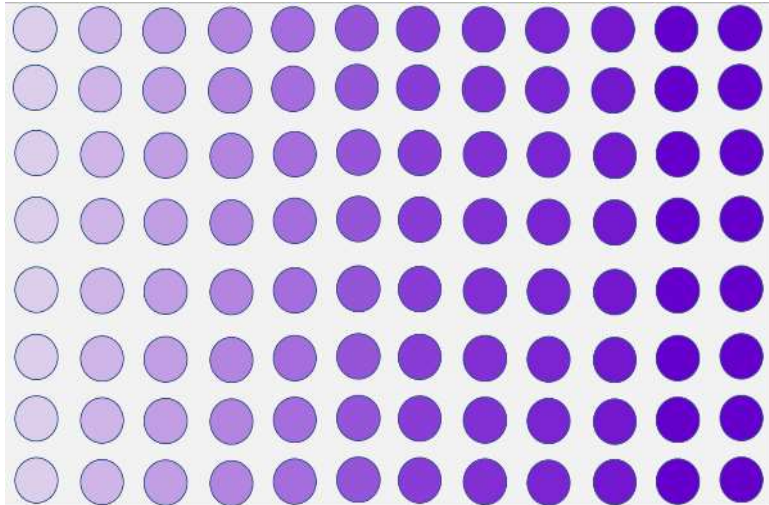
+



TEST DI VITALITA' CELLULARE

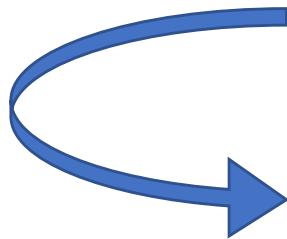
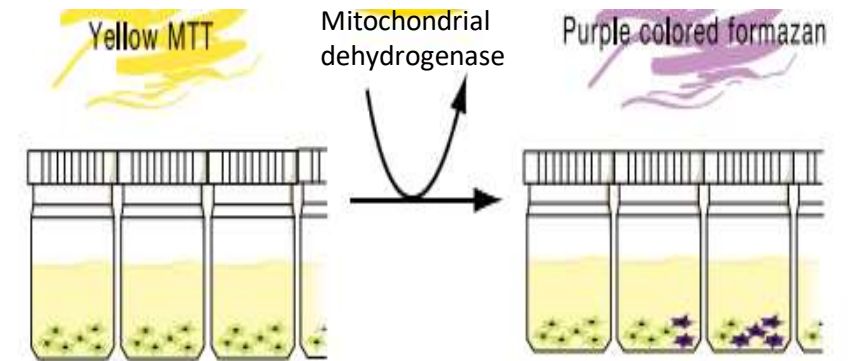
Determinazione vitalità cellulare attraverso dosaggio colorimetrico MTT:

Cellule A431



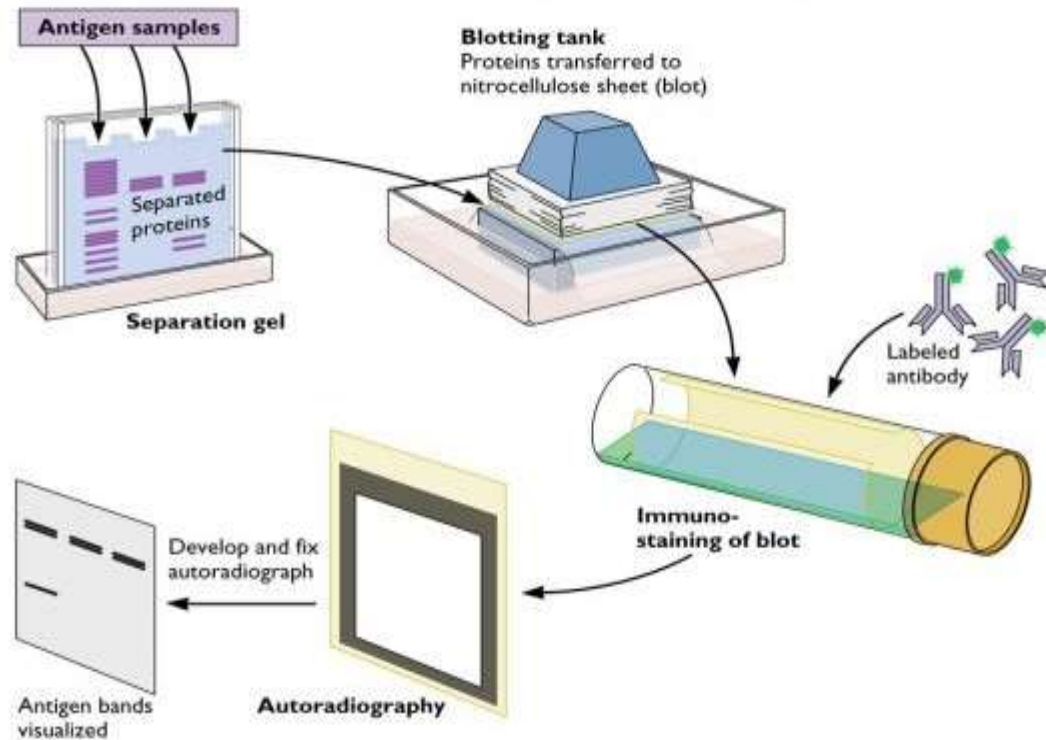
Concentrazione variabile di TQ/ diversi periodi di t

Soluzione MTT
5 mg/ml
Incubato per 4 ore

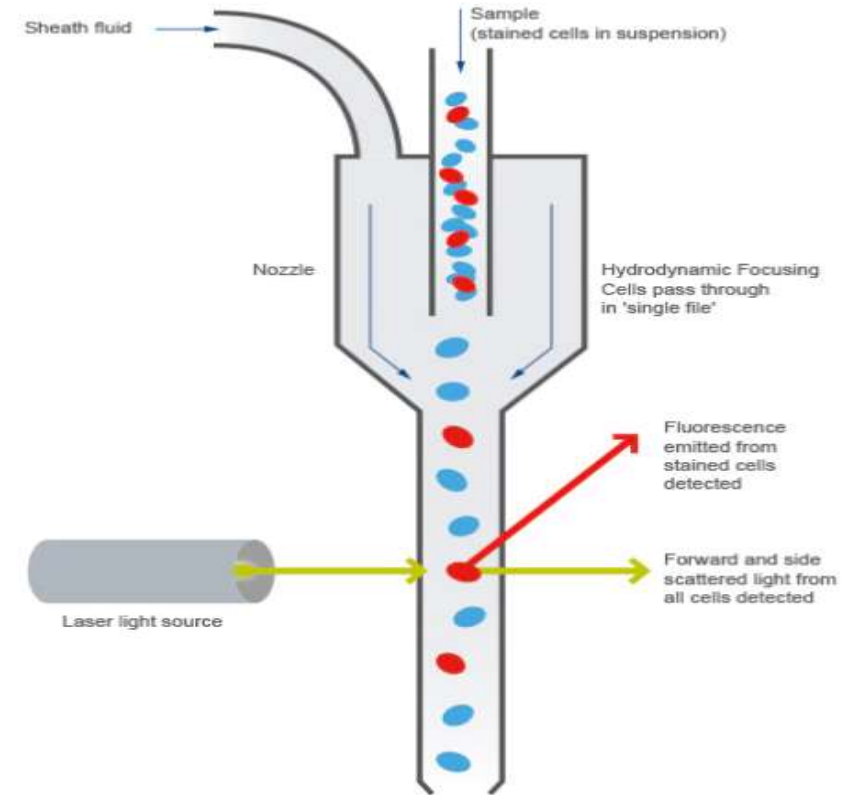


- Mezzo rimosso mediante aspirazione;
- Formazan risultante dissolto in dimetil sulfossido e assorbanza misurata a 570 nm;
- Vitalità cellulare espressa come percentuale.

ANALISI MEDIANTE WESTERN BLOT E CITOMETRIA A FLUSSO



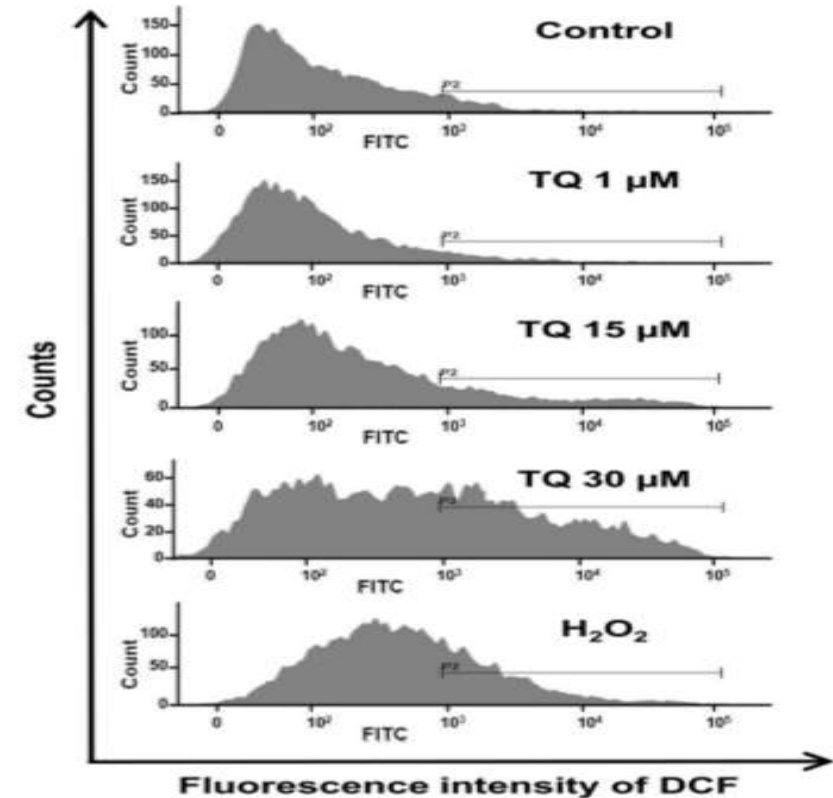
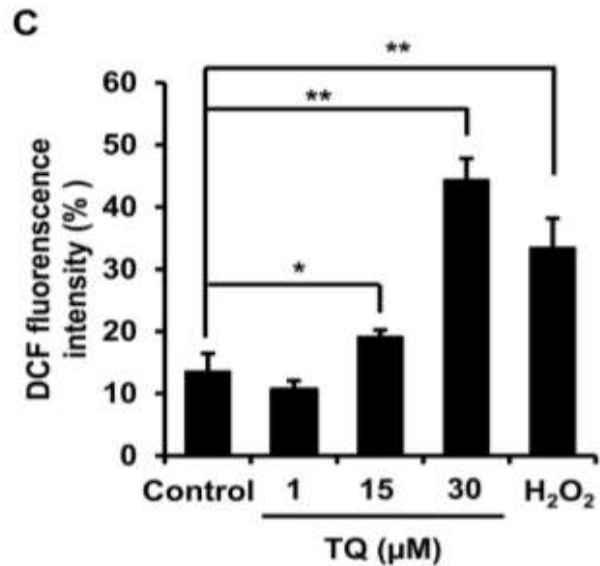
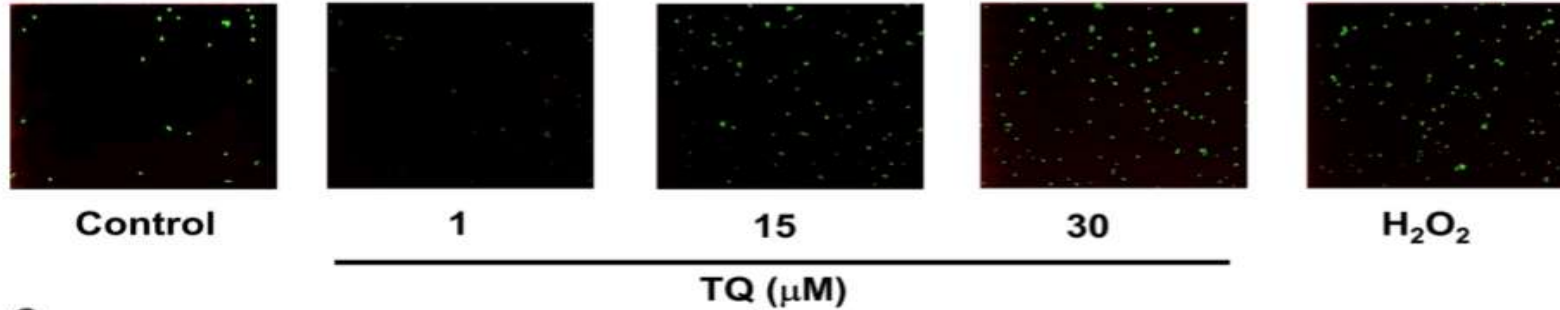
- Impiegato nella ricerca delle proteine apoptotiche ed antiapoptotiche.



- Utilizzato nella determinazione della popolazione di cellule apoptotiche e vive.

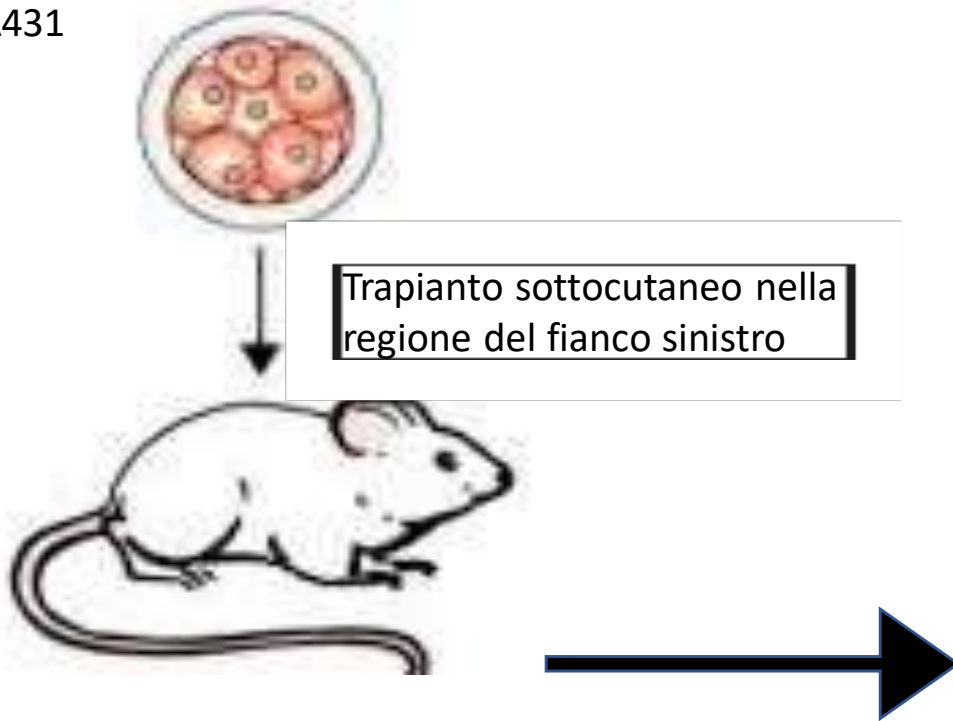
DETERMINAZIONE DEI ROS

- Livelli di ROS intracellulari misurati nelle cellule vive grazie alla conversione DCF-DA in DCF;
- La fluorescenza generata è direttamente proporzionale alla quantità di DCF-DA ossidato a DCF;
- Emissione misurata a 525 nm mediante citometria a flusso.



XENOTRAPIANTO IN VIVO

Matrigel contenente
cellule A431

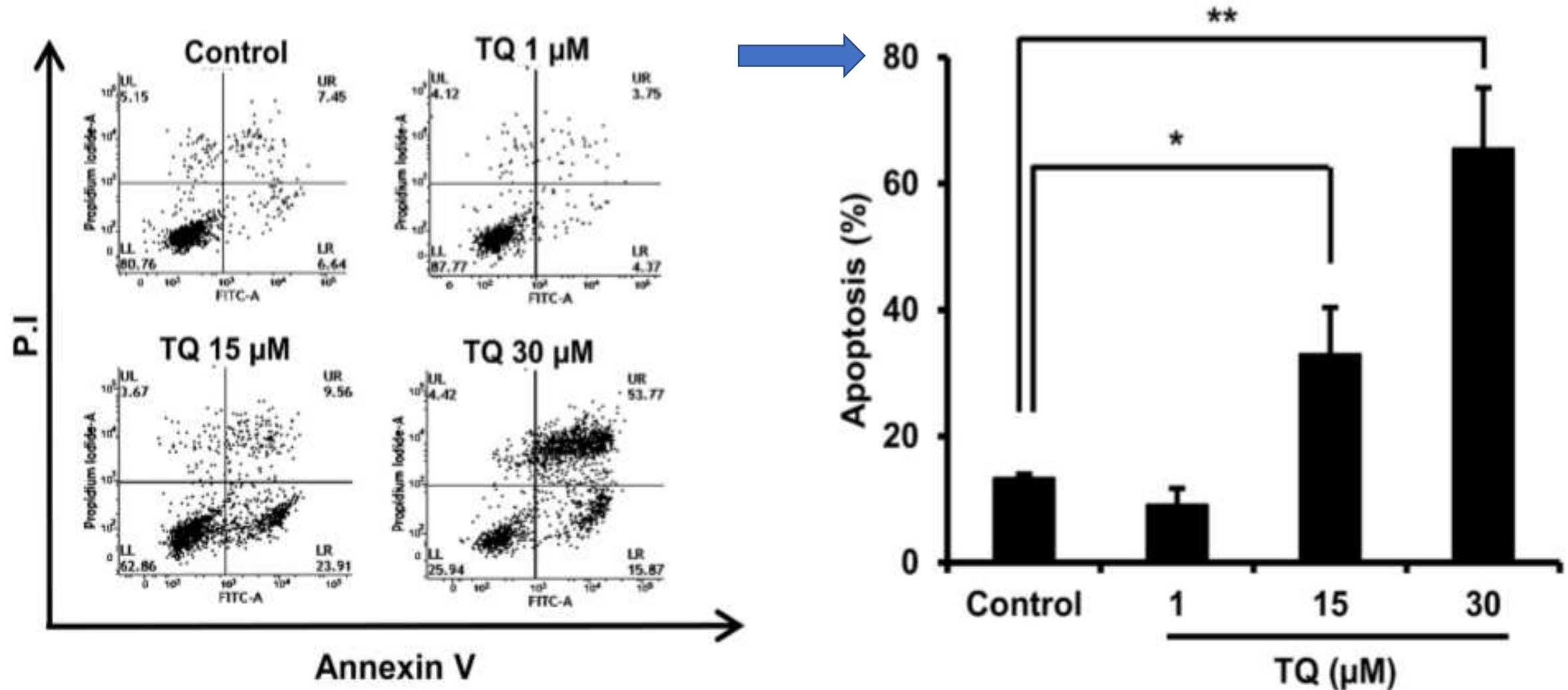


Dimensioni tumore misurate al momento del
trapianto e due volte a settimana in seguito.
Formula: $V = (\text{lunghezza} \times [\text{larghezza}]^2) / 2$.

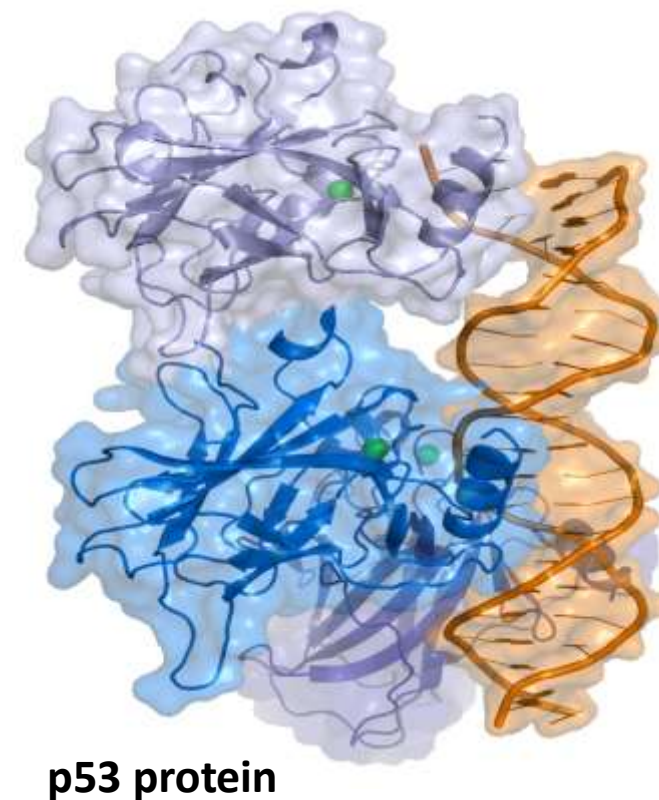
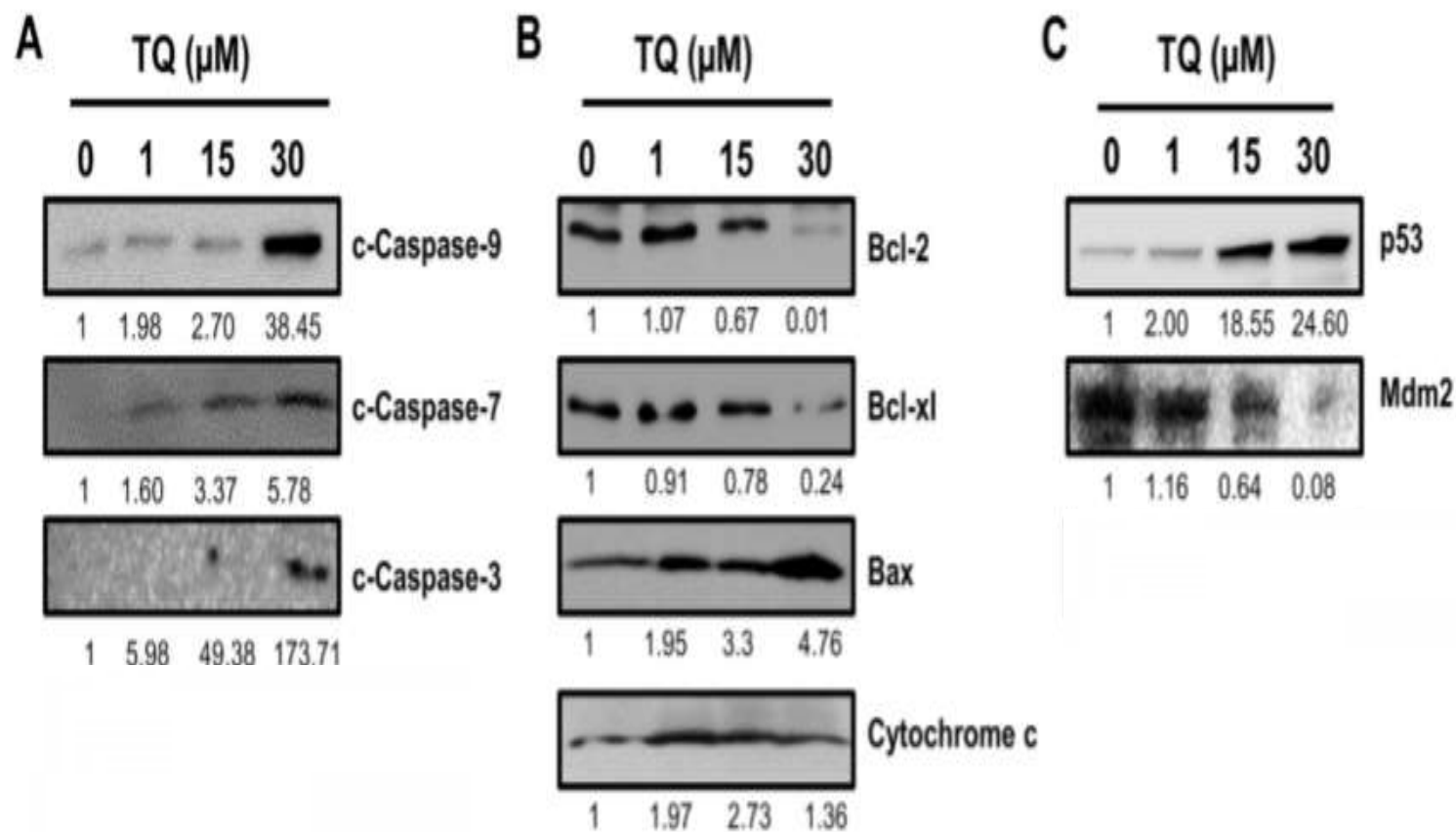
- Topi maschi NSG di 7 settimane;
- In gabbie ventilate e sterili (T 25 +/- 2 °C, umidità relativa 50 +/- 10%);
- Accesso a cibo standard e acqua.

Due settimane dopo
xenotrapianto, iniezione
intraperitoneale con olio di mais o
TQ (1 o 5 mg/kg), tre volte a
settimana per due settimane.

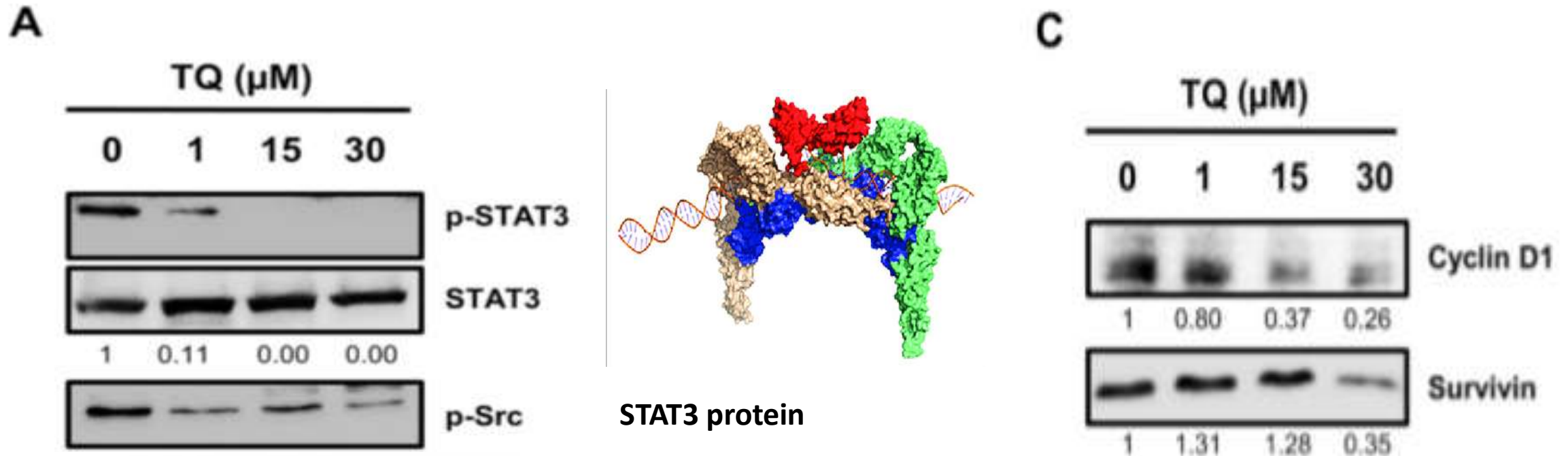
EFFETTO CITOTOSSICO DEL TQ NELLE CELLULE A431



L' APOPTOSI INDOTTA DA TQ E' MEDIATA DALL'INDUZIONE DI p53 E DALL' ATTIVAZIONE DELLE CASPASI

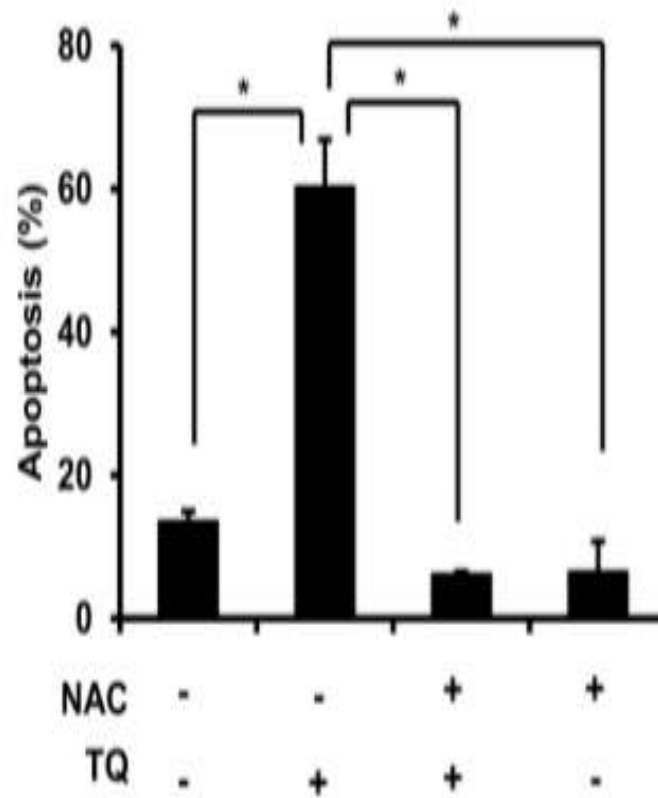
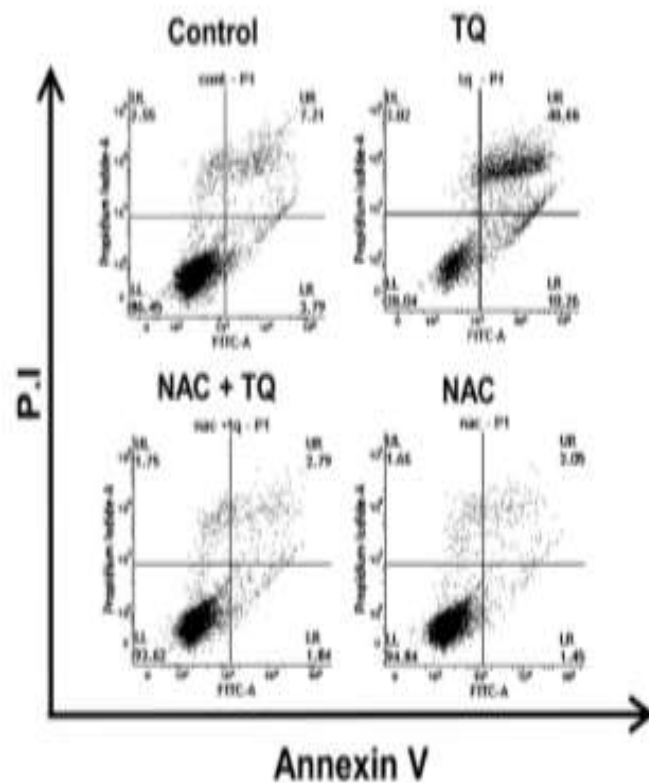


ATTENUAZIONE DELLA FOSFORILAZIONE DI STAT3 NELL'APOPTOSI INDOTTA DA TQ NELLE CELLULE A431



- Livello di STAT3 invariato;
- Fosforilazione di STAT3 ridotta;
- Riduzione legame tra DNA e STAT3.

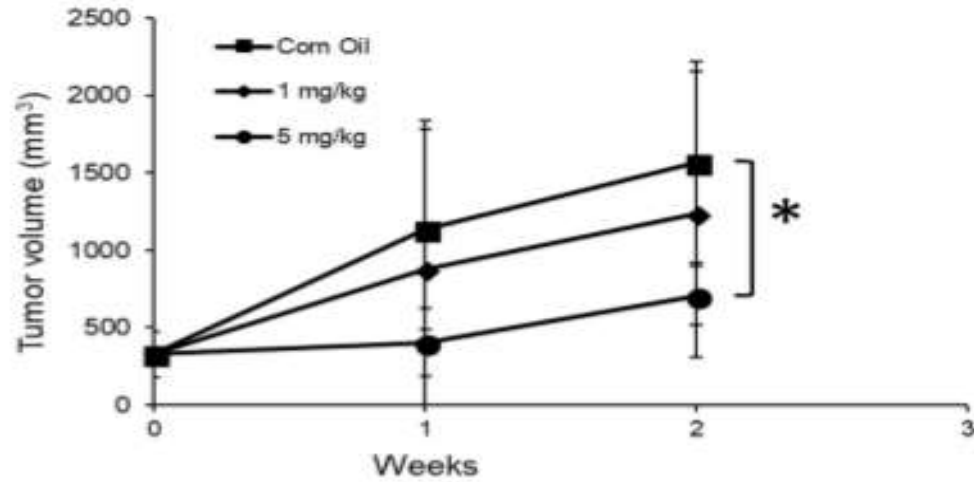
L'INDUZIONE DELLA GENERAZIONE DEI ROS NELLE CELLULE A431 TRATTATE CON TQ



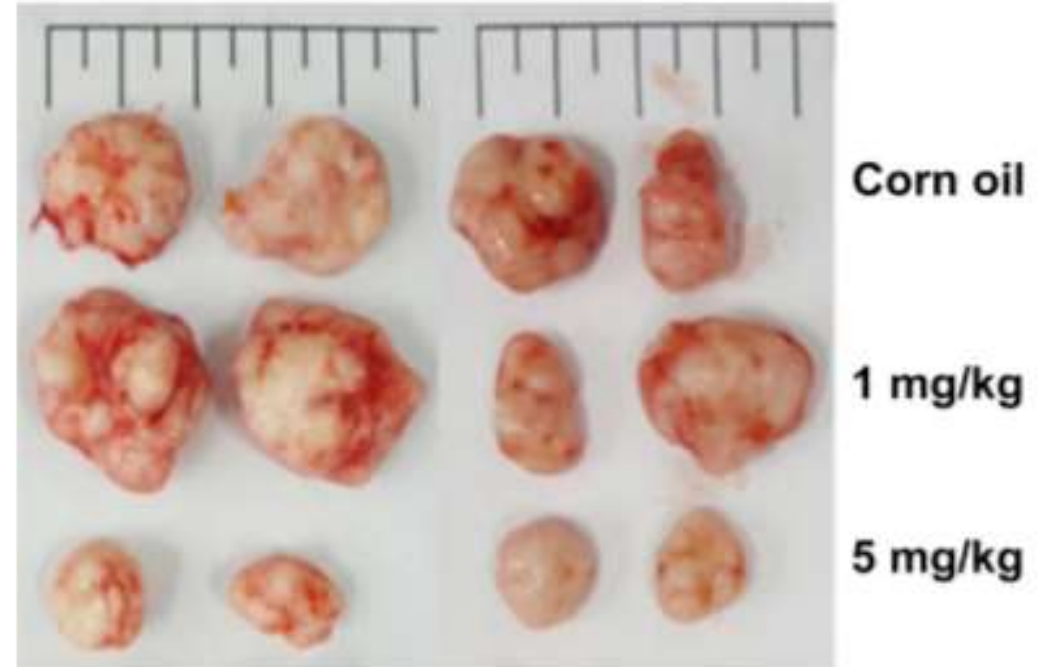
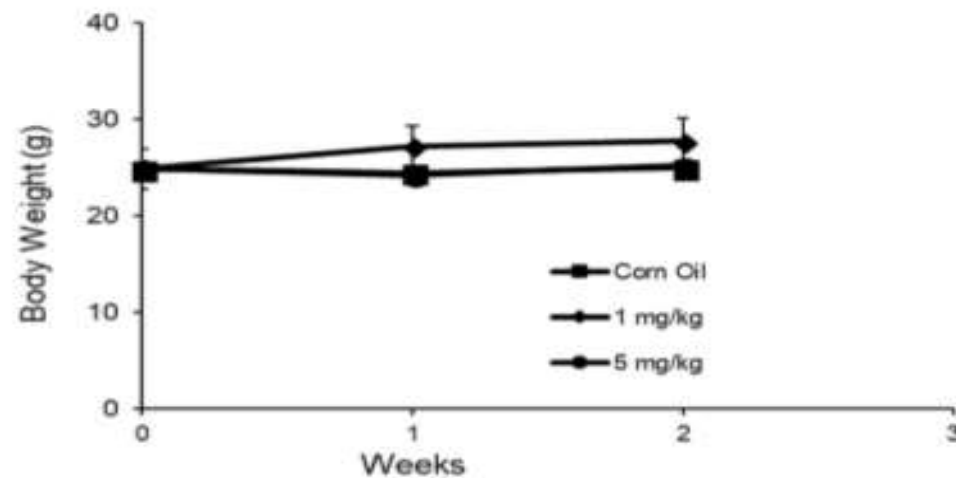
- Utilizzo di un ROS "spazzino";
- Induzione dei ROS diminuita significativamente;
- Doppia colorazione con Annesina e Ioduro di Propidio.

GLI EFFETTI ANTITUMORALI DEL TQ IN VIVO

A



B



- Assenza di tossicità apparente;
- Elevata tollerabilità.

CONCLUSIONI

- Il TQ induce l'apoptosi nelle cellule A431 in associazione con l'attivazione delle caspasi -9, -7 e -3, attraverso la via intrinseca.
- Il TQ modula l'espressione dei regolatori chiave della membrana mitocondriale Bcl-2, Bcl-xl, e Bax; la sovraespressione di Bcl-2 o Bcl-xl inibisce l'apoptosi e promuove la sopravvivenza delle cellule. L'aumento dei livelli di p53 e una diminuzione di Mdm2.
- STAT3 è uno degli obiettivi di regolazione nella sopravvivenza delle cellule del carcinoma. Lo STAT3 interagisce con i geni bersaglio che codificano per varie proteine pro-sopravvivenza, incluse Bcl-2, Bcl-xl, e la survivina.
- Il trattamento delle cellule A431 con TQ riduce la fosforilazione di STAT3 il che diminuisce il legame al DNA, spiegando l'espressione ridotta dei geni bersaglio.
- I risultati indicano che l'effetto apoptotico del TQ è mediato dalla generazione di ROS. Il pretrattamento con NAC, un ROS "spazzino", ha invertito l'effetto apoptotico di TQ.

BIBLIOGRAFIA

Park, Ji Eun - Kim, Do- Hee - Ha, Eunyong - Choi, Seung Mi - Choi, Joon-Seok - Chun, Kyung-Soo - Joo, Sang Hoon. 2019. Thymoquinone induces apoptosis of human epidermoid carcinoma A431 cells through ROS-mediated suppression of STAT3. *Chemico-Biological Interactions* 312, 108799
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279719302765?via%3Dihub>)

[1] *Nigella sativa*, <https://www.phytomed.co.nz/site/phytomed/Phytomed%20Trade%20Article%20-%20Antiviral%20Herbal%20Approaches%20FINAL%2013.03.20.pdf>

[2] Thymoquinone molecule, <https://en.wikipedia.org/wiki/Thymoquinone#/media/File:Thymoquinone.png>

[3] Multi- well plate, <https://www.alamy.de/fotos-bilder/multiwell.html>

[4] Cell culture room, <https://www.alamy.com/incubator-cell-culture-room-cleanroom-bioengineering-and-microbiology-image60492899.html>

[5] Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM), https://www.rndsystems.com/products/dmem-high-glucose-no-glutamine-sodium-pyruvate-no-phenol-red_m18450

[6] Fetal bovine serum, <https://www.fishersci.it/shop/products/corning-premium-fetal-bovine-serum-2/p-2712323>

[7] Mtt test plate, <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>

[8] Mtt assay, <http://www.biopcr.com/Shop/cellbioch/60990.html>

[9] Western Blot, <https://www.mybiosource.com/learn/westernblotting>

[10] Flow cytometry, <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>

[11] Mice xenograft, https://www.centropiaggio.unipi.it/sites/default/files/course/material/genetically_modified_animals.pdf

[12] p53 protein, <https://it.wikipedia.org/wiki/P53#/media/File:P53.png>

[13] STAT3 protein with DNA, https://www.researchgate.net/figure/StAt3-may-regulate-chromatin-topology-through-bending-and-looping-of-DnA-A-Modeled_fig1_259651078

RIASSUNTO

- L'incidenza del cancro alla pelle è cresciuta rapidamente negli ultimi decenni, con più di due milioni di casi ogni anno. Il carcinoma a cellule squamose (SCC) è una delle forme più comuni del cancro della pelle e possiede il più alto rischio di metastasi. La causa principale dell'SCC è la continua esposizione alla luce ultravioletta e si presenta frequentemente tra gli anziani. I pazienti anziani trovano complicato accettare un intervento chirurgico, è stato cercato un trattamento non chirurgico che è l'opzione per curare e prevenire l'SCC.
- Il timochinone (TQ), il composto bioattivo di *Nigella Sativa*, è un potenziale agente antitumorale-neutraceutico.
- Le cellule A431 sono state mantenute nel terreno Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) integrato con 10% di siero bovino fetale e antibiotici (100 U/ml di penicillina G) e 100 microgrammi/ml di streptomina a 37 °C in un termostato umidificato contenente 5% di CO₂ e 95% di aria. Il trattamento con TQ è stato fatto alla confluenza di 50-60%.
- Per determinare la vitalità cellulare è stato utilizzato il dosaggio colorimetrico MTT. Le cellule sono state incubate in una piastra da 96 pozzetti ed esposte a varie concentrazioni di TQ per diversi periodi di tempo. Dopo il trattamento con TQ, la soluzione MTT (5 mg/ml) sono state aggiunte a ciascun pozzetto, e le cellule incubate per 4 ore. Il mezzo è stato rimosso mediante aspirazione, quindi il formazan risultante è stato dissolto in dimetil solfossido per la misurazione dell'assorbanza a 570 nm. la vitalità cellulare è stata espressa come percentuale.

- Per la microscopia a fluorescenza, DCF-DA è stato aggiunto alla piastra di coltura dopo il trattamento con i ROS ed è stato osservato al microscopio a fluorescenza. Per l'analisi della citometria a flusso, la fluorescenza di DCF ossidato è stata misurata a una lunghezza d'onda eccitata di 480 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 525 nm.
- Topi maschi NSG di sette settimane. I topi sono stati acclimatati per una settimana in gabbie ventilate in condizioni ambientali sterili (temperatura ambiente 25 ± 2 ° C, umidità relativa $50 \pm 10\%$) e hanno il permesso a l'accesso a cibo standard e acqua. Matrigel contenente le cellule A431 sono stati trapiantati per via sottocutanea nella regione del fianco sinistro dei topi nel giorno sperimentale zero. Due settimane dopo lo xenotrapianto, i topi sono stati trattati per via intraperitoneale con olio di mais o TQ (1 or 5 mg/kg) tre volte a settimana per due settimane. Le dimensioni del tumore sono state misurate al momento dell'iniezione e due volte a settimana in seguito. I volumi individuali del tumore (V) sono stati calcolati con la formula $V = (\text{lunghezza} \times [\text{larghezza}]^2) / 2$.
- Le cellule trattate con TQ mostrano un restringimento cellulare, un cambiamento morfologico caratteristico associato alle cellule che hanno subito l'apoptosi. A 30 microM, il TQ inibisce la vitalità cellulare di circa l'80% rispetto alle cellule non trattate dopo 24 ore di incubazione. E' stata eseguita l'analisi FACS per vedere se la citotossicità mediata da TQ derivasse dall'induzione dell'apoptosi. Le cellule A431 trattate con TQ (1, 15 o 30 microM) per 24 ore sono stati analizzati mediante citometria a flusso utilizzando doppia colorazione con Annessina V e PI per quantificare la popolazione di cellule in fase di apoptosi. I risultati hanno mostrato che il trattamento delle cellule con TQ drammaticamente ha aumentato le percentuali delle cellule apoptotiche rispetto alle cellule di controllo non trattate.

- Il trattamento delle cellule A431 con TQ (1, 15 O 30 microM) induce l'attivazione delle caspasi-9, -7 e -3. Questo risultato indica il coinvolgimento della via mitocondriale dell'apoptosi, abbiamo quindi esaminato l'espressione delle proteine della famiglia Bcl-2. È interessante notare che TQ non solo ha sottoregolato l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 e Bcl-xl, ma ha anche aumentato l'espressione di Bax, una proteina pro-apoptotica, rilasciando così il citocromo c nel cytosol. Abbiamo quindi misurato il livello di p53, un regolatore trascrizionale di diverse proteine coinvolte nell'apoptosi. Come visto in Fig. 2C, il trattamento delle cellule con TQ ha aumentato l'espressione di p53 e diminuito il livello di Mdm2, un repressore citosolico di p53.
- Abbiamo studiato la regolazione di STAT3, una chiave nota che gioca nella sovraregolazione dei geni pro-sopravvivenza. Sebbene il livello di STAT3 è rimasto invariato, la fosforilazione di STAT3 si è ridotta nelle cellule A431 durante il trattamento con TQ. Allo stesso tempo, l'attività di legame al DNA di STAT3 è stata ridotta anche dal trattamento con TQ. TQ ha attenuato l'espressione del gene bersaglio STAT3 prodotti come la survivina, ciclina D1. Per chiarire il meccanismo di inattivazione di STAT3 indotto dal TQ, abbiamo esaminato l'effetto del TQ nella fosforilazione delle chinasi Src, che è nota fosforilare STAT3.
- Per verificare che la generazione dei ROS è stata coinvolta nell'apoptosi indotta da TQ, abbiamo utilizzato il ROS scavenger NAC. L'induzione dei ROS da parte del TQ è diminuita significativamente con il pretrattamento con NAC. Per determinare se un ROS elevato è coinvolto nell'apoptosi indotta da TQ, la proporzione delle cellule apoptotiche è determinata mediante la colorazione con Annessina V-propidio ioduro. Le percentuali delle cellule apoptotiche nelle cellule trattate con NAC erano notevolmente inferiori a quelle delle cellule non trattate.

- Il peso corporeo è stato determinato a partire dal primo giorno di somministrazione del TQ (settimana 0) fino alla fine del periodo sperimentale (settimana 2) e nessuna differenza è stata rilevata nel peso corporeo, decessi correlati al trattamento o comportamenti anormali tra i gruppi sperimentali, il che implica l'assenza di tossicità apparente e un'elevata tollerabilità del TQ ai livelli di dose di 1 e 5 mg / kg. I tumori derivati dalle cellule A431 erano visibili e misurabili dopo due settimane di trapianto, a quel punto il trattamento con TQ è stato avviato per determinare se gli effetti in vitro del TQ si traducono nell'ambiente in vivo. Anche una settimana dopo il trattamento, la crescita del tumore nei topi trattati con TQ è stata ritardata rispetto a quella in topi di controllo trattati con olio di mais. L'effetto inibitorio del TQ sulla crescita tumorale ha raggiunto la significatività statistica nella settimana 2 nel gruppo 5 mg/kg. Le foto rappresentative dei tumori due settimane dopo il trattamento con TQ sono mostrate in Fig. 7C.