



**Università degli Studi “Carlo Bo” di Urbino
Facoltà di Scienze e Tecnologie**

**Corso di Laurea Specialistica in
Tecnologie Applicate alla Diagnostica di Laboratorio
Biomedico**

**“CLICK CHEMISTRY”: UNA NUOVA
STRATEGIA NELLO STUDIO DELLA
PROLIFERAZIONE CELLULARE**

Relatore: Chiarissimo Prof. Stefano Papa

**Tesi di Laurea di:
Paolo Elia Cappella
Matricola 224444**

Anno Accademico 2008-2009

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi è stato sviluppare un nuovo metodo analitico per l'analisi della bromodesossiridina (BrdU) che non richiede la denaturazione del DNA, come i metodi tradizionali basati su acidi, basi, nucleasi o raggi ultravioletti, evitando le limitazioni del metodo classico, nella misura multiparametrica di markers intracellulari o nucleari espressi nelle modificazioni fisiopatologiche quali l'apoptosi (clivaggio della caspasi) o la mitosi (fosforilazione dell'istone H3) nello studio del meccanismo d'azione di farmaci antitumorali.

Il metodo è stato basato sulla sostituzione della BrdU con EdU, etinil-desossiridina, nell'incorporazione del nucleotide durante la fase S del ciclo cellulare e la successiva derivatizzazione chimica mediante reazione di cicloadizione CuAAC denominata "click chemistry" usando probes azidici recanti BrdU come tag antigenico in confronto con fluorofori azidici. La formazione dell'addotto EdU-BrdU con la ciclizzazione del BrdU azide e l'alchino-dU in triazolo con catalisi rameosa è stata dimostrata, dopo l'isolamento, con metodi spettroscopici (MS e H-NMR).

Era stata verificata la non citossicità di questo analogo della BrdU in diverse linee cellulari e l'eventuale riduzione della stessa, mediante ottimizzazione dello schema di trattamento.

Era in seguito messo a punto il metodo di CuAAC per applicazioni multicolore in citometria a flusso e di screening in microscopia quali l'High Content Analysis (HCA). Con il metodo è stato possibile analizzare contemporaneamente sia l'espressione di caspase-3 clivata che dell'istone H3 fosforilato, a seguito di trattamento con Paclitaxel e Camptotecina.

Era quindi stata verificata la metodica per l'analisi in vivo in un modello xenograft e la determinazione di EdU in cellule isolate da tumori come da midollo, nella contemporanea analisi dell'EdU e della fosforilazione dell'istone H3.

La bioconiugazione con "tag" chimici

La più popolare strategia di tagging nell'imaging cellulare e in citometria comprende l'uso della Green Fluorescence Protein (GFP) e le sue varianti. Poiché la sua espressione è programmata geneticamente e non richiede cofattori ausiliari, il tag GFP può essere usato per analizzare l'espressione proteica e la relativa localizzazione nei compartimenti cellulari. Sono, infatti, riportate applicazioni nella dinamica del citoscheletro, nel trafficking nucleare, nella dinamica degli organelli cellulari. Per esempio proteine degli istoni, il Golgi, il RER, lisosomi e mitocondri contenenti chimere GFP sotto controllo di promotore possono essere visualizzabili mediante tecniche di imaging cellulare, time-lapse o citometria a flusso.

In contrasto, a causa dell'elevato peso molecolare, GFP può significativamente indurre alterazioni strutturali, influenzandone l'espressione, localizzazione e funzionalità delle proteine alle quali sono attaccate. Inoltre, non tutte le linee cellulari possono essere usate e la costruzione di linee stabili, necessitano il clonaggio e la separazione da quelle non trasfettate con dispendio di tempo e risorse. Infine la GFP non può essere applicata nella visualizzazione di glicani, lipidi e acidi nucleici o delle altre migliaia di metaboliti contenuti all'interno della cellula (9)

Un interessante approccio atto a risolvere alcune di queste limitazioni è quello di utilizzare piccole molecole che hanno una migliore accessibilità e una ridotta perturbazione nei processi cellulari per incorporate funzionalità chimiche "speciali" non esistenti in natura che possono essere in seguito "visualizzate" in un secondo tempo mediante reazioni chimiche "uniche" (**Figura 3**). Questi approcci sono definiti reporter chimici bio-ortogonali, dove amminoacidi, zuccheri e nucleotidi funzionalizzati, sono inglobati all'interno di macromolecole target utilizzando il normale funzionamento cellulare.

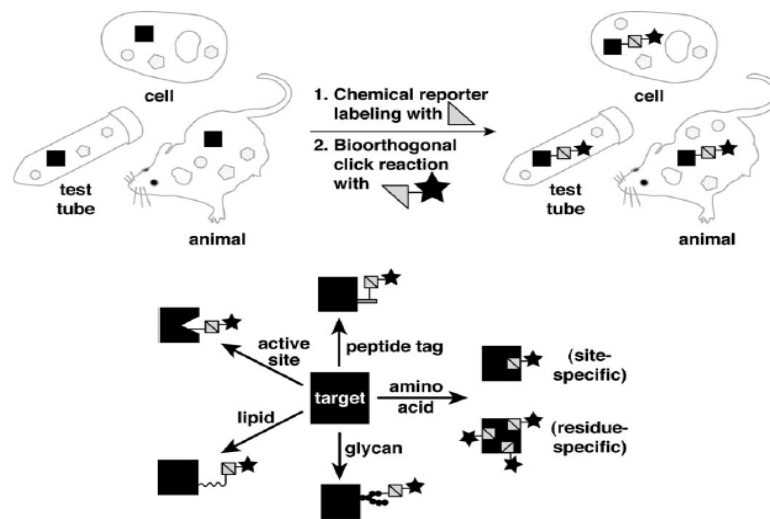


Figure 1: *Approccio biortogonale nei sistemi biologici come ipotizzato sin dal 2001 da Berry Sharpless (11)*

Questo processo di marcatura "in due step" può essere usato per la visualizzazione, l'isolamento o la purificazione, a secondo della natura del probe usato. Numerosi lavori scientifici che coinvolgono proteine, glicani e lipidi marcati con questo approccio ne hanno mostrato l'incredibile potenza analitica in sistemi viventi. La strategia dei reporter chimici deve portarne l'incorporazione interna dello "scaffold" target senza rilevanti tossicità o perturbazioni strutturali, perché per esempio aminoacidi taggati devono essere accettati dai meccanismi traduzionali così come monosaccaridi funzionalizzati possono essere introdotti all'interno dei glicani delle superfici cellulari dagli enzimi nei processi biosintetici di questi polimeri. Per questo, tipici probes come la fluoresceina non può essere direttamente usati come diretta modificazione, a causa della loro grandezza che ne interfererebbe le trasformazioni enzimatiche, come del resto l'uso di ammine, isotiocianati, tioli e maleimidi (tipicamente usati nelle bioconiugazioni dei probes fluorescenti) che porterebbero a marcature inadeguate o aspecifiche.

A seguito dell'installazione del motivo "non-nativo" all'interno del target, il reporter deve reagire con un probe chimicamente complementare mediante una reazione covalente. Quest'ultima deve essere mutualmente esclusiva per il tag, avvenire in condizioni fisiologiche, ma rapide rimanendo inerte per il resto della cellula. Qui di seguito in Figura 3 sono riportati i principali reporter chimici attualmente usati da svariati Autori.

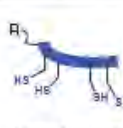
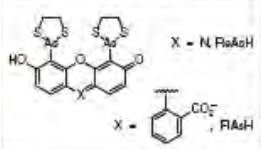
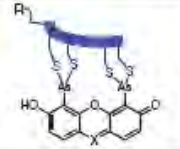
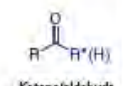
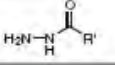
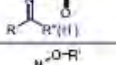
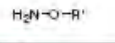
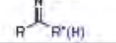
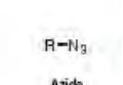
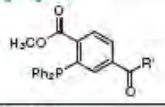
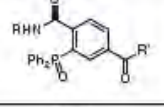
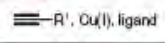
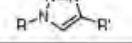

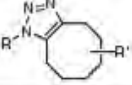
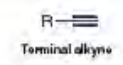
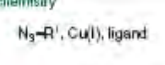
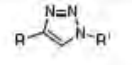
Chemical reporter	Reactive partner (R' = probe)	Ligation product	Target* (R)
 Tetracycysteine motif			Protein ^{19,21}
 Ketone/aldehyde			Protein ^{19,20}
			Glycan ²²
 Azide	Staudinger ligation 		Protein ^{17,23}
	"Click" chemistry 		Glycan ^{26,24}
	Strain-promoted cycloaddition 		Lipid ²⁵
 Terminal alkynes	"Click" chemistry 		Protein ²⁹

Figure 2: Possibili sistemi di introduzione di specifiche funzionalità come reporter chimici, utilizzabili per successive reazioni in situ.⁽¹⁰⁾

Si contano sulle dita di una mano le reazioni che incontrano i requisiti suddetti in termini di biocompatibilità, selettività ed efficienza utilizzabili per questo scopo. Questi comprendono i peptidi contenenti i "motivi a tetracisteina" che reagiscono con composti biarsenicali, proteine e glicani contenenti aldeidi e chetoni che reagiscono con probes idrazine e aminossi-derivati o azidi reagenti con la reazione di Staudinger o alchini terminali modificabili mediante Click Chemistry mediante azidi (**Figura 4**). Proprio questa reazione sarà usata nel presente studio nella determinazione di un nucleotide modificato incorporato in cellule con attiva sintesi di DNA (10).

La Click Chemistry e le applicazioni biologiche

Nel 2001 il termine di "click chemistry" fu coniato dal Premio Nobel B. Sharpless per descrivere reazioni definite tramite criteri: "la reazione deve essere modulare, dare alte rese, essere generata tramite prodotti inoffensivi che possono essere rimossi con metodi non cromatografici, essere stereospecifici, il processo deve essere condotto in maniera semplice, materiali e reagenti facilmente reperibili, nessun uso di solventi o quanto meno, solventi non dannosi (acqua) facilmente removibili" (12).

Allo stato attuale, la più popolare reazione che incontra pienamente questi criteri è la cicloaddizione 1,3-dipolare, conosciuta anche come cicloaddizione Huisgen, tra un azide e un alchino terminale costituendo un 1,2,3-triazolo (**Figura 5**). Infatti, gli azidi sono 1,3-dipoli che possono reagire con “dipolarofili” come gli alchini terminali. Questi sistemi π sono molto rari in natura e particolarmente inerti nei sistemi biologici e quindi particolarmente importanti nella strategia bio-ortogonale.

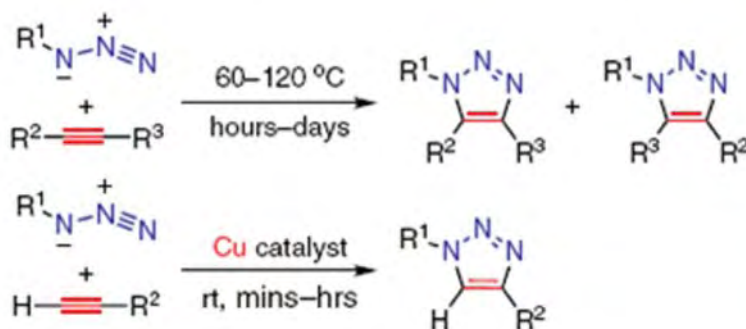


Figure 3: La catalisi con rame, scoperta da Sharpless nel 2001, consente di far reagire a temperatura ambiente azidi e alchini in minuti, portando direttamente alla formazione di un regioisomero 1,4 (15).

La cicloaddizione azide-alchino di Huisgen è ben nota sin dai primi anni '60, ma la vera svolta è arrivata dalla catalisi. Benchè la reazione sia termodinamicamente favorevole ($\Delta H^\circ = -45-55 \text{Kcal/mole}$) è però sfavorita dal punto di vista cinetico (ca. 26Kcal/mole) era necessario elevare la temperatura (e la pressione) per ottenere una miscela di isomeri 1,4 e 1,5-regioisomeri, quanto molto lenta a temperatura ambiente.

Nel 2002 la nuova era della cicloaddizione venne dal rame da due gruppi indipendenti.

Infatti, sali del rame(I) erano in grado di accelerare la reazione di più di 10^7 di volte tra azidi e alchini terminali. In maniera più importante, la catalisi con il rame(I) può permettere di condurre la reazione solo a temperatura ambiente, portando direttamente alla formazione di un solo regioisomero, il 1,4. In più la presenza del catalizzatore rendeva queste reazioni significativamente poco affetti dall'impedimento sterico né ambiente acquoso, tipico delle matrici biologiche e il triazolo formato è altamente stabile, inerte a ossidazioni e degradazioni enzimatiche (12,13).

Come menzionato, l'uso del rame come catalizzatore ha rinvigorito l'uso della reazione tipo Huisgen. Benchè la catalisi avvenga con rame(I), questo genere di sali sono instabili in soluzione acquosa ($E^\circ \text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+ = +0,159 \text{V}$), e in ambiente biologico può essere ossidato da O_2 disciolto, come glutatione o NADH, rendendolo inutilizzabile per la catalisi. Ne è quindi necessaria la generazione in situ usando sali di rame(II) come per esempio rame solfato in presenza di riducenti come l' AA (vitamina C). Questo riduce costantemente il rame(II) in rame(I) mantenendo significativamente alti i livelli della specie catalitica. La cicloaddizione 1,3 dipolare tra azidi e alchini è chiamata Cu-catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition (CuAAC) (14,15)

Benché la CuAAC abbia attualmente un notevole impatto in chimica combinatoria (sono stati prodotti inibitori della fucosil trasferasi, HIV-1 proteasi, acetilcolinesterasi basati su questo genere di sintesi) e nella scienza dei materiali, veramente interessante l'applicazione in biochimica (**Figura 6**), sia nelle bioconiugazioni, nell'immobilizzazione di ligandi e nella "click chemistry" in situ. Una delle prime applicazioni è stata l'immobilizzazione di piccole molecole all'interno di macromolecole, come nel 2003 quando un fluorocromo era attaccato al virus mosaico. Il capside era funzionalizzato mediante l'inserimento di azidi o alchini terminali e successivamente un alchino o un azide legata con il probe fluorescente veniva legato mediante la CuAAC (16).

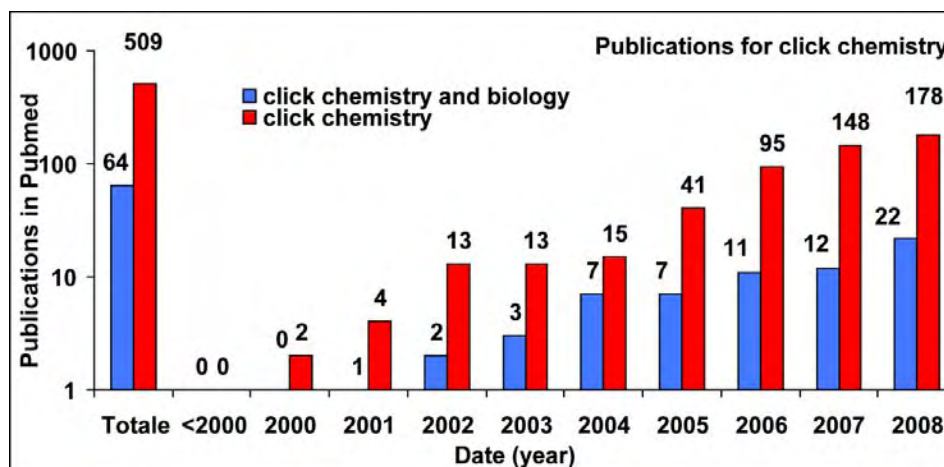


Figure 4: Si può notare il proliferare di articoli sulla CuAAC (click chemistry) e la parallela crescita di applicazioni in campo biologico. Fonte: pubmed.org, dati aggiornati a 10- 2008.

Nello stesso modo svariati approcci sono usati per seguire macromolecole in cellule di mammifero. Nei glicani presenti negli antigeni di membrana come il fucosio o la N-acetil-mannosoammina, è stato possibile l'inserimento di zuccheri innaturali analizzabili in seguito mediante azido-probes legati a biotina o coumarina sia in cellule, come in estratti cellulari.

A livello della traduzione proteica, la t-RNA sintetase della metionina può accettare innaturali metionine come substrati. L'aggiunta di azidohomoalanina (AHA) in linee batteriche deplete in metionina consente l'introduzione di tags azidici invece che di residui di metionina. Altri studi stanno investigando la possibilità di usare una nuova t-RNA sintetasi che riconosce un nuovo e unico anticodone consentendo un inserimento sito-specifico nella proteina di interesse. Ai giorni nostri però, i substrati (come la o-propargyltirosina o la p-azido-fenilalanina) devono essere ancora introdotti in organismi geneticamente modificati.

Ne è l'esempio della proteina di membrana OmpC che nel ceppo wt di E.Coli contiene 3 residui di metionina. Per aumentarne il numero di siti modificabile (fino a 6 per un totale di 9 metionine) e aumentare la sensibilità della reazione era necessario ricorrere la mutagenesi in situ.

Le proteine prodotte, estratte e analizzate in WB potevano essere visualizzate con l'approccio bio-ortogonale, eliminando l'uso di anticorpi monoclonali (17, 18).

Un altro uso della CuAAC nella chimica delle proteine era la coniugazione di omega-[18F]-fluoroalchini con peptidi contenenti gruppi azidici, nell'applicazione dell'imaging in vivo nei processi fisiologici e patologici usando la tomografia PET (19,20).

Un'altra applicazione della CuAAC è l'analisi degli acidi nucleici. La possibilità di inserire desossi-uridine (dU) funzionalizzate con gruppi alchinnici (per es. l'etinildesossouridina, EdU) nel sequenziamento di oligonucleotidi mediante la tecnica delle fosforamiditi, ne consente l'inserimento negli stessi, per esempio nella sintesi di DNA a doppio filamento funzionalizzato.

Con lo stesso approccio erano prodotti oligonucleotidi a singolo filamento, inserendo funzionalità azidiche (21). E ancora recentemente EdU trifosfato era usato nell'amplificazione del DNA sostituendo di timidina trifosfato nel pool di nucleotidi nella PCR (22,23) (**Figura 7**).

Più recentemente, l'EdU è stato usato in sostituzione della Bromodesossouridina (BrdU) nell'analisi dell'incorporazione di nucleotidi nella sintesi di DNA, identificando le cellule in fase S (**Figura 8**) (24).

Una volta, incorporata la funzionalità alchinnica, le cellule in fase S potevano essere visualizzate con la CuAAC mediante fluorocromi della serie Alexa (come l'AlexaFluor 488) coniugati con il gruppo azidico (24,25).

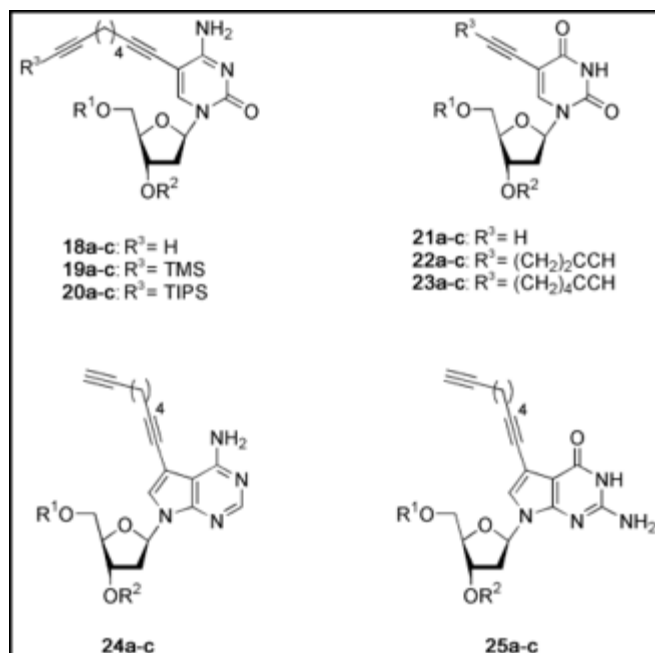


Figure 5: Overview delle diverse sostituzioni con gruppi alchinnici attualmente disponibili (23).

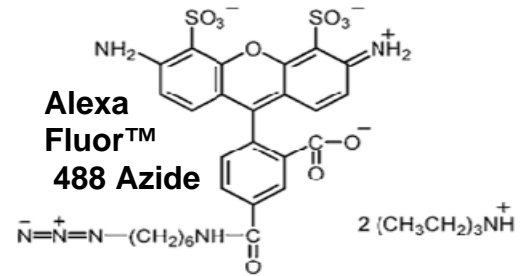
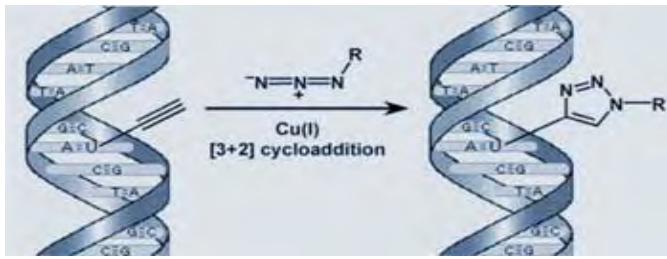


Figure 6: A) Approccio di derivatizzazione del DNA mediante click chemistry tra EdU all'interno del DNA e un fluoroforo portante un gruppo azidico e formazione mediante catalisi del triazolo. (24)

L'utilizzo di questo approccio è particolarmente utile nello screening di composti che alterano il ciclo cellulare con l'approccio della citometria a immagine e l'High Content Screening (HCS) dove l'analisi multiparametrica e spesso ipercromatica avviene direttamente su vetrino o piastra da 96 pozzetti (7) e devono essere evitate condizioni drastiche che causano perdita di cellule o alterazione delle proprietà antigeniche degli epitopi cellulari .

Fase "S" e incorporazione di BrdU

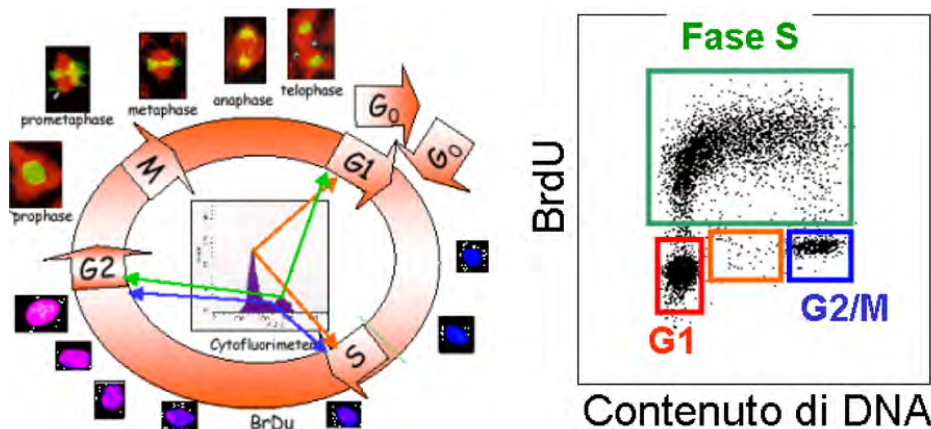


Figure 7: Ciclo cellulare e incorporazione di BrdU in cellule tumorali in FCM

La marcatura, la visualizzazione e la quantificazione di cellule sintetizzanti attivamente DNA, ovvero cellule in fase S del ciclo cellulare non è solo importante nello studio della biologia di base ma anche nella definizione della risposta cellulare ai trattamenti farmacologici, allo studio dell'integrità cellulare e per la determinazione della genotossicità. Infatti oltre al potere analitico della BrdU nello studio di nuovi (e vecchi) farmaci nel loro meccanismo d'azione e della combinazione con altri agenti (26,27), ai giorni d'oggi l'uso della tecnologia della BrdU sta consentendo la comprensione dei meccanismi fini nel differenziamento ematopoietico di sottopopolazioni poco abbondanti come la b-1 del lineage B (28), nello studio di modelli di cellule staminali tumorali intestinali nella generazione del cancro nel colon retto (29) come lo studio della dinamica della spermatogenesi umana, dal preleptotene alla produzione dello spermatozoo (30).

Nella storia della proliferazione cellulare e della sua misura si può annoverare nei primi anni 60 l'uso dell'incorporazione della [3H]-timidina come analogo radioattivo

per determinare la sintesi del DNA (labelling index) e/o la frazione di cellule in mitosi marcate (**Figura 9**). Naturalmente la metodica aveva problemi inerenti all'uso di radioisotopi (^3H β -emettitore con un tempo di dimezzamento di 12.3 anni) e l'uso di β -counter negli eluati come delle autoradiografie rendeva problematica, lenta e tecnicamente difficoltosa l'analisi.

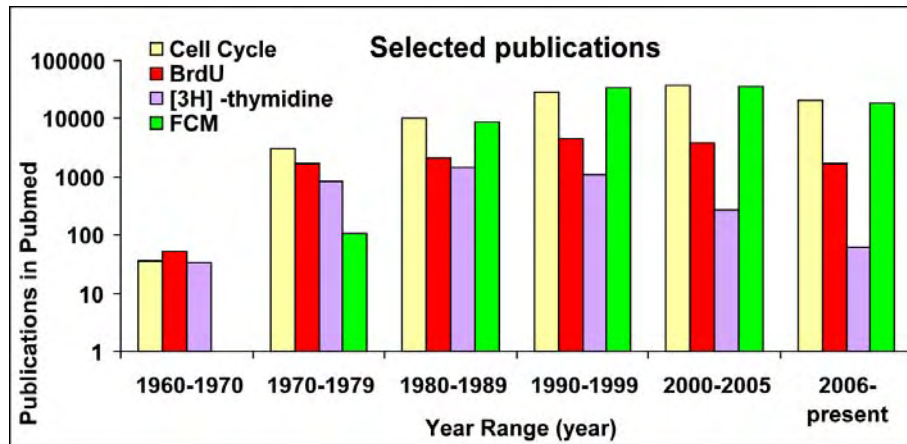


Figure 8: Si può notare che l'uso di timidina triziata è progressivamente abbandonata alla fine degli anni '80 dopo l'esplosione della BrdU in FCM. Fonte: pubmed.org, dati aggiornati a 10- 2008.

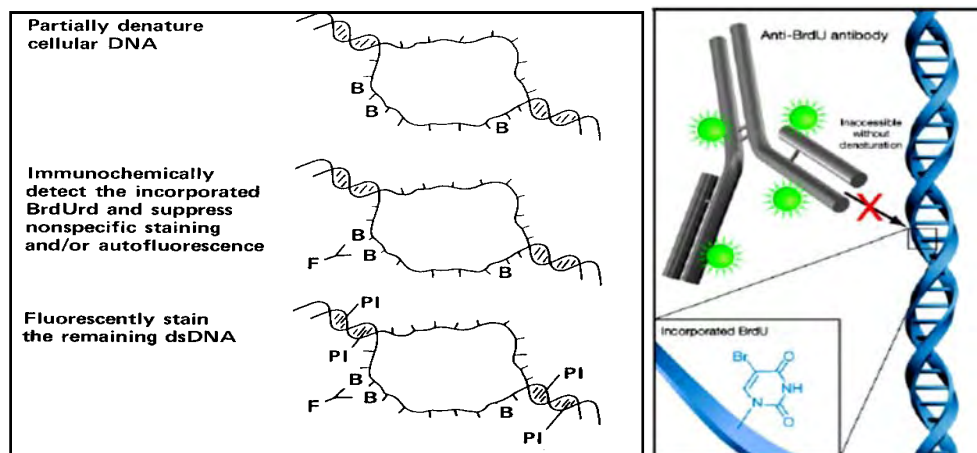


Figure 9: Meccanismo di funzionamento della tecnica classica della bromodesossitimidina, dove è richiesta la denaturazione del dsDNA

In seguito la metodica era implementata mediante colorazione di Feulgen. Si era inoltre determinato che in popolazioni cellulari normali sussistevano due predominanti picchi nella distribuzione del DNA, in rapporto 1:2 come contenuto di DNA e che le cellule che sintetizzano DNA stanno in mezzo. Un'ulteriore evoluzione venne dalla scoperta che la fluorescenza di determinanti coloranti come Hoechst 33342 ne veniva alterata (quenching) quando era incorporato un analogo della timidina, la BrdU (31).

La soluzione venne finalmente dallo sviluppo di un anticorpo contro la 5-bromodesossitimidina (BrdU), in grado di legare il DNA marcato a seguito di parziale denaturazione (32,33) (**Figura 10**).

Svariate metodiche sono state applicate per la misura dell'incorporazione di BrdU utilizzando la denaturazione del DNA, poiché solo la denaturazione della doppia elica, o comunque l'introduzione di specifiche rotture del DNA, dove era stata introdotta la BrdU durante la fase di sintesi rendeva possibile il riconoscimento e la rivelazione della stessa mediante anticorpo monoclonale anti-BrdU. Per dovere di cronaca ne descriveremo in breve.

1) **Trattamento termico** da 90-100°C per 10 min in soluzioni a basso contenuto di sali previa estrazione parziale degli istoni (Triton X-100 e HCl 0.1N). (31). Il metodo era usato negli anni '80, poi abbandonato poiché ha bisogno di ottimizzazione in linee cellulari diverse e particolarmente distruttivo per la morfologia e costituenti cellulari.

2) **Trattamento acido** o alcalino con HCl/NaOH 3N per 30 min, seguito da neutralizzazione con sodio tetraborato 0.1M pH 8.5. E' il metodo "storico" più usato dagli Autori negli studi sul ciclo cellulare. La denaturazione è parziale e può essere modulata con il tempo, consentendo l'uso ottimale dei probes per il DNA come ioduro di propidio (PI), 7-AAD o TOPRO-3 che richiedono il mantenimento della conformazione del DNA a doppia elica (33). L'uso della denaturazione acida può non essere il metodo più appropriato, qualora sia necessaria mantenere la morfologia e lo scatter, l'antigenicità di superficie e l'analisi multiparametrica delle costituenti cellulari come le cicline (34) o la fosforilazione di proteine nel signalling molecolare (35).

3) **Trattamento enzimatico** mediante DNAsi I contro i siti ipersensibili all'enzima (digestione a 37°C), eventualmente in combinazione con esonucleasi III (per aumentare l'efficienza nella generazione di ssDNA e nell'esposizione di BrdU al mAb anti-BrdU (36). Questo metodo si è rivelato di particolare interesse per la possibilità di mantenere antigenicità, morfologia e fosforilazioni inalterate nell'analisi multiparametrica in microscopia, laser scanning cytometry e high content screening (HCS) (7).

4) **Trattamento con radiazioni** ad alta energia in particolare **UV** alla presenza di Ho 33342 in grado di generare ssDNA mediante fotolisi e quindi consentire l'analisi della BrdU (37,38). Lo svantaggio di questa tecnica è insito proprio nella generazione di rotture sul DNA; infatti la fotolisi avviene mediante lampada/crosslinker UV (254-360nm) e richiede particolari ottimizzazioni durante l'esposizione (e.g. tempo, potenza della lampada, distanza dalla sorgente). Comunque anche quest'ultimo consentirebbe l'analisi multiparametrica come al punto 3).

5) **Aumento o quencing della fluorescenza di coloranti** in presenza di BrdU. In cellule asincrone continuamente marcate con BrdU, la fluorescenza ottenuta dalla marcatura con Ho 33342 veniva diminuita (quencing) mentre usando TOPRO-3 veniva aumentata (enhancement) mediante processo di "energy transfer". Si tratta comunque di un metodo elegante, ma poco usato (39).

6) **Anti-BrdU mAb legati a lantanidi in luminescenza**. Coniugando il mAb anti-BrdU con un macrociclo Eu (III) isotiocianato (QuantumDye™) in condizioni saturanti era possibile osservare un elevato incremento della luminescenza nel rosso (λ 620nm) con elevato rapporto segnale/rumore >100) a seguito dell'aggiunta

di una soluzione acquosa di Gd (III) dopo eccitazione nell' UV (λ 370nm) (40). Il metodo consentirebbe di eseguire analisi multiparametriche, perché modificando il centro del macrociclo contenente Eu con altre terre rare come Sm, Tb e Dy si modificano le proprietà spettrali di emissione. Il metodo non ancora usato in citometria, viene impiegato in piattaforme ad alto throughput (HTS) nello screening di farmaci in piastre 96/384 pozzetti).

7) **Smascheramento epitopo** (antigen-retrieval) BrdU in immunisto chimica **mediante vapore** (steam) in soluzione di citrato. Un recente studio (35) pubblica la possibilità di rendere visibile l'epitopo mediante l'uso di vapore a bassa pressione e trattamento con soluzione ipotonica di citrato di sodio nell' analisi di immunisto chimica nel campo della neurobiologia (Figura 11).

Relative labeling intensity for antibodies as a function of pretreatment protocol

J. Neurosci., May 30, 2007 • 27(22):5837–5844 • 5841

Target (against)	Quality of labeling			
	Steamer/citrate	No pretreatment	HCl	Microwave (low)
BrdU	4	–	2	–
PCNA	4	0–1	0–2	4
Phospho-H3	4	0	1–2	4
Pax6	4	2–3	2–3	4
p27Kip1	4	0	0–1	3
S100	4	3–4	2–3	4
Type III β -tubulin	4	3	2–3	4
DAPI	4	3–4	–	4
Hoechst 33342	4	3	–	4
Syto 24	4	4	–	4

4, Equal or almost equal to label intensity with citrate/steamer pretreatment; 3, distinctly weaker than citrate steamer, but still quite satisfactory; 2, quite weak relative to citrate/steamer, but still satisfactory; 1, very weak, but some specific label detectable; 0, no specific label observed (at 10 \times); –, no specific label detected or marked reduction in labeled cell number, even when viewed at high power.

Figure 10 : Adattato da (33). Come si può evincere dal confronto tra i diversi sistemi di smascheramento, il trattamento acido con HCl danneggia gli epitopi quali l'istone H3 fosforilato e PCNA.

Benché quindi esista una pleora di metodiche per l'analisi dell'incorporazione di BrdU, quest'ultime non garantiscono il loro pieno utilizzo nell'analisi multiparametrica tipica della citometria a flusso e per immagini. Infatti, se la denaturazione termica distrugge la quasi totalità degli antigeni, la denaturazione con "chemicals" come acidi o basi rende impossibile l'analisi di svariati antigeni (estrazione degli istoni, idrolisi e denaturazione di molte proteine, modifica del punto isoelettrico, ...). Procedure più blande come l'uso di nucleasi o UV mostrano problemi metodologici in termini di esecuzione del metodo e della riproducibilità, nonché la riduzione significativa della sensibilità (ridotto rapporto segnale/rumore o aumento del background), senza comunque dimenticare la diversa sensibilità osservabile nelle linee cellulari. Infine altre metodiche come l'uso di coloranti della serie Hoechst o TOPRO richiedono specifiche condizioni d'uso, riducendo la possibilità di analisi policromatiche, mentre l'applicazione di metodi alternativi agli acidi come per esempio citrato e vapore (pentola a pressione,...) riducono l'utilizzo alla solo immunisto chimica.

Più recentemente è stata introdotta la “click chemistry” come tool analitico della proliferazione cellulare (**Figura 12**).

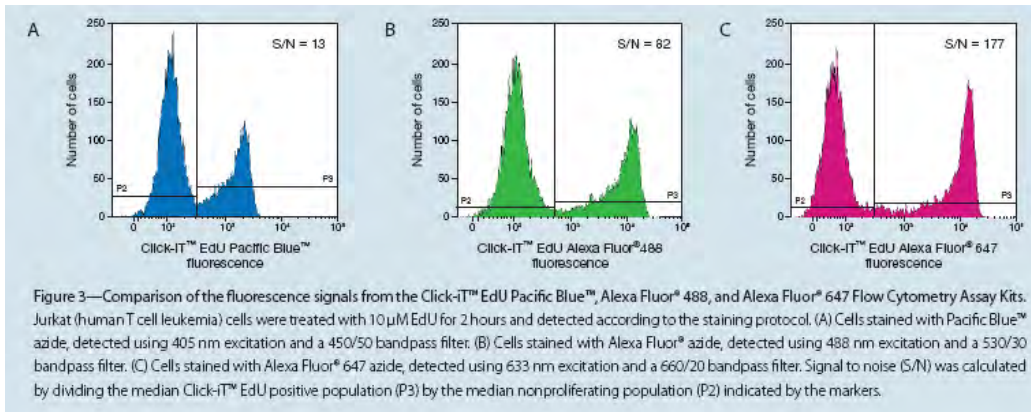


Figure 11: *Uso di diversi fluorocromi nell'approccio Click-IT di Invitrogen nello studio della proliferazione cellulare (Blu, Pacific Blu; verde, AlexaFluor 488; viola, AlexaFluor 647)*

In un lavoro (24) pubblicato in PNAS era mostrato che la etinil-desossitridina (EdU) poteva essere incorporata in vivo al posto della BrdU e senza bisogno di alcuna denaturazione o smascheramento era possibile rilevarne la presenza mediante CuAAC usando un fluorocromo AlexaFluor portante un gruppo azidico (il presente metodo è parte di una serie di kit della Invitrogen-brand Click-IT).

Il metodo si mostrava particolarmente interessante nello studio del ciclo cellulare in FCM come in citometria per immagini (HCA).

Bibliografia

(La bibliografia è formattata in base allo stile editoriale della rivista Cytometry)

1. Green MR. Targeting Targeted Therapy. *The New England Journal of Medicine* 2004; 350:2191-2193.
2. Corbellini G. Farmaci a misura d'uomo. *Il Sole 24 Ore*; (27/08/2006):38.
3. Gasparri F, Sola F, Bandiera T, Moll J, Galvani A. High-content analysis of kinase activity in cells. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2008;7:523-536.
4. Cohen P.: Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews Drug Discovery* 2002;1:309-315.
5. Carpinelli P, Moll J. Aurora kinase inhibitors: identification and preclinical validation of their biomarkers. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12:69-80.
6. Cucchi U, Gianellini L, De Ponti A, Sola F, Alzani R, Giorgini L, Patton V, Troiani S, Cappella P, Saccardo B, Rizzi S, Valsasina B. Biochemical and cellular characterization of TCTP phosphorylation by polo-like kinases. *Biochemistry J* (2009), *submitted*
7. Gasparri F, Cappella P, Galvani A. Multiparametric cell cycle analysis by automated microscopy. *J Biomol Screen* 2006;11:586-598.

8. Tárnok A, Bocsi J, Brockhoff G. Cytomics - importance of multimodal analysis of cell function and proliferation in oncology. *Cell Prolif* 2006;39:495-505.
9. Sullivan KF, Kevin F, Steve A, Kay SA, Wilson L, Matsudaira PT. Green Fluorescent Proteins. *Methods in Cell Biology* 2006;58
10. Prescher JA, Bertozzi CR. Chemistry in living systems. *Nature Chemical Biology* 2005;1;13 – 21.
11. Swieten PF, Leeuwenburgh MA, Kessler BM, Overkleeft HS. Bioorthogonal organic chemistry in living cells: novel strategies for labeling biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* 2005;3:20 – 27.
12. Kolb HC, Sharpless KB. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov Today* 2003;8:1128-1137.
13. Breinbauer R, Kohn M. Azide-alkyne coupling: a powerful reaction for bioconjugate chemistry. *ChemBiochem* 2003;4:1147-1149.
14. Rodionov VO, Fokin VV, Finn MG. Mechanism of the ligand-free CuI-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005;44:2210-2215.
15. Wu P, Fokin VV. Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications. *Aldrichimica ACTA* 2007;40:7-17.
16. Tron GC, Pirali T, Billington RA, Canonico PL, Sorba G, Genazzani AA. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1, 3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Medicinal Research Reviews* 2007; 28: 278-308.
17. Link J, Tirrell DA Cell Surface Labeling of Escherichia coli via Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 11164 – 11165.
18. Hsu TL, Hanson SR, Kishikawa K, Wang SK, Sawa M, Wong CH. Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells *PNAS* 2007;104:2614-2619.
19. Lin TS, Neenan JP, Cheng YC, Prusoff WH. Synthesis and antiviral activity of 5- and 5'-substituted thymidine analogs. *J Med Chem* 1976;19:495-498.
20. Marik J, Sutcliffe JL. Click for PET: rapid preparation of [18F] fluoropeptides using CuI catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition *Tetrahedron Lett.* 2006;47:6681-6684.
21. Seo TS, Li Z, Ruparel H, Ju J. Click chemistry to construct fluorescent oligonucleotides for DNA sequencing. *J Org Chem* 2003;68:609-612.
22. Gierlich J, Gutmiedl K, Gramlich PM, Schmidt A, Burley GA, Carell T. Synthesis of highly modified DNA by a combination of PCR with alkyne-bearing triphosphates and click chemistry. *Chemistry* 2007;13:9486-9494.
23. Gramlich PME, Wirges CT, Manetto A, Carell T. Postsynthetic DNA Modification through the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008.
24. Salic A, Mitchison TJ. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2415-2420
25. Young DW, Bender A, Hoyt J, McWhinnie E, Chirn GW, Tao CY, Tallarico JA, Labow M, Jenkins JL, Mitchison TJ, Feng Y. Integrating high-content screening and ligand-target prediction to identify mechanism of action. *Nat Chem Biol* 2008;4:59-68.
26. Cappella P, Tomasoni D, Faretta M, Ubezio P. Cell cycle effects of Gemcitabine, *International Journal of Cancer.* 2001;93:401-408

27. Lupi M, Cappella P, Matera G, Natoli C, Ubezio P. Interpreting cell cycle effects of drugs: the case of melphalan. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006; 57:443-457.
28. Rothaeusler K, Baumgarth N. Evaluation of intranuclear BrdU detection procedures for use in multicolor flow cytometry. *Cytometry* 2006,69A:249 - 259
29. McDonald SAC, Preston SL, Lovell MJ, Wright NA and Jankowski JA Mechanisms of Disease: from stem cells to colorectal cancer *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 2006;3:267-274.
30. Amann RP. The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit? *Journal of Andrology* 2008;29:5.
31. Dolbeare F, Beisker W, Pallavicini MG, Vanderlaan M, Gray W. Cytochemistry for Bromodeoxyuridine/DNA analysis: stoichiometry and sensitivity. *Cytometry* 1985;6:521–530
32. Gratzner HG, Leif RC, An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry* 1981;1:385-389.
33. Leif RC, Stein JH, Zucker RM. A short history of the initial application of anti-5-BrdU to the detection and measurement of S phase. *Cytometry A* 2004;58:45-52.
34. Faretta M, Bergamaschi D, Taverna S, Ronzoni S, Pantarotto M, Mascellani E, Cappella P, Ubezio P, Erba E Characterization of cyclin B1 expression in human cancer cell lines by a new three-parameter BrdUrd/cyclin B1/DNA analysis. *Cytometry* 1998;31:53-59.
35. Tang X, Falls DL, Li X, Lane T, and Luskin MB Antigen-Retrieval Procedure for Bromodeoxyuridine Immunolabeling with Concurrent Labeling of Nuclear DNA and Antigens Damaged by HCl Pretreatment. *J Neurosc* 2007;27:5837–5844.
36. Dinjens WNM, Kate J, Lenders MH, Bosman FT. Bromodeoxyuridine (BrdU) immunocytochemistry by exonuclease III (Exo III) digestion. *Histochemistry and Cell Biology* 1992;98:199-205.
37. Li X, Traganos, F, Melamed, MR, and Darzynkiewicz Z. Detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporated into DNA by labeling strand breaks induced by photolysis (SBIP). *Int. J. Oncol* 1994;4:1157-1161.
38. Hammers HJ, Kirchner H, Schlenke P. Ultraviolet-induced detection of halogenated pyrimidines: simultaneous analysis of DNA replication and cellular markers. *Cytometry* 2000; 40:327-335.
39. Beisker W, Weller-Mewe EM, Nüsse M. Fluorescence enhancement of DNA-bound TO-PRO-3 by incorporation of bromodeoxyuridine to monitor cell cycle kinetics. *Cytometry* 1999;37:221-229
40. Vallarino LM and Leif RC. Macrocyclic complexes of yttrium, the lanthanides and the actinides having peripheral coupling functionalities. US Patent 5373093/5696240.
41. De Clercq E Antiviral activity of 5-substituted pyrimidine nucleoside analogues *Pure Appl Chem* 1983;55:623-636
42. Cristofoli WA, Wiebe LI, De Clercq E, Andrei G, Snoeck R, Balzarini J, Knaus EE. 5-alkynyl analogs of arabinouridine and 2'-deoxyuridine: cytostatic activity against herpes simplex virus and varicella-zoster thymidine kinase gene-transfected cells. *J Med Chem* 2007;50:2851-2857.
43. Barr PJ, Hamor A, and Walker RT. Antiviral nucleic acid derivatives. III. Crystal structure of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine. *Acta Cryst.* 1978;B34:2799-2802 .

44. Kocalka P, Andersen NK, Jensen F, Nielsen P. Synthesis of 5-(1,2,3-triazol-4-yl)-2'-deoxyuridines by a click chemistry approach: stacking of triazoles in the major groove gives increased nucleic acid duplex stability. *Chembiochem* 2007;8:2106-2116
45. Porter DJ, Chestnut WG, Merrill BM, Spector T. Mechanism-based inactivation of dihydropyrimidine dehydrogenase by 5-ethynyluracil. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:5236-5242.
46. Meneni S, Ott I, Sergeant CD, Sniady A, Gust R, Dembinski R. 5-Alkynyl-2'-deoxyuridines: chromatography-free synthesis and cytotoxicity evaluation against human breast cancer cells. *Bioorg Med Chem* 2007;15:3082-3088.
47. Sebolt-Leopold J. S., and English J. M.: Mechanism of drug inhibition of signalling molecule. *Nature* 2006;441:457-462.
48. Thurston DE, *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs (Book)* , CRC Press 2007.
49. Pochet S, Dugue L, Labesse G, Delepierre M, Munier-Lehmann H. Comparative study of purine and pyrimidine nucleoside analogues acting on the thymidylate kinases of *Mycobacterium tuberculosis* and of humans. *Chembiochem* 2003;4:742-747.
50. Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, Hartmann DM, Linder D, Harel G, Gleiberman I, Caruso PA, Ricks SH, Untch M. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:5276-5282.
51. Schilt AA. *Analytical applications of 1,10-phenanthroline and related compounds.* Pergamon Press, Oxford 1969
52. Jacobberger JW, Frisa PS, Sramkoski RM, Stefan T, Shults KE, Soni DV. A new biomarker for mitotic cells. *Cytometry A* 2008;73:5-15.
53. Gonchoroff NJ, Katzmann JA, Currie RM, Evans EL, Houck DW, Kline BC, Greipp PR, Loken MR. S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine. Role of DNase pretreatment. *J Immunol Methods* 1986;93:97-101.
54. Tkatchenko AV. Whole-mount BrdU staining of proliferating cells by DNase treatment: application to postnatal mammalian retina. *Biotechniques* 2006;40:29-32.
55. Balzarini J, De Clercq E, Ayusawa D, Seno T. Thymidylate synthetase-deficient mouse FM3A mammary carcinoma cell line as a tool for studying the thymidine salvage pathway and the incorporation of thymidine analogues into host cell DNA. *Biochem J* 1984;217:245-252.
56. Mittag A, Lenz D, Gerstner AO, Tárnok A. Hyperchromatic cytometry principles for cytomics using slide based cytometry. *Cytometry A* 2006;69:691-703.
57. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4:648-655.
58. Chehrehasa F, Meedeniya A, Patrick Dwyer P, Abrahamsen G, Mackay-Sim A. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J Neurosc Meth* 2009;177:122–130.
59. Deiters A, Cropp TA, Mukherji M, Chin JW, Anderson JC, Schultz PG. Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Chem Soc* 2003; 125:11782-11783.

60. Baskin JM, Prescher JA, Laughlin ST, Agard NJ, Chang PV, Miller IA, Lo A, Codelli JA, Bertozzi CR. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104:16793-16797.

Estratto da tesi di Paolo Cappella.

Ogni diritto sui contenuti è riservato ai sensi della normativa vigente. La riproduzione, la pubblicazione e la distribuzione, totale o parziale, di tutto il materiale originale contenuto (tra cui, a titolo esemplificativo e non esaustivo, i testi, le immagini e le elaborazioni grafiche) sono espressamente vietate in assenza di autorizzazione scritta. © 2009