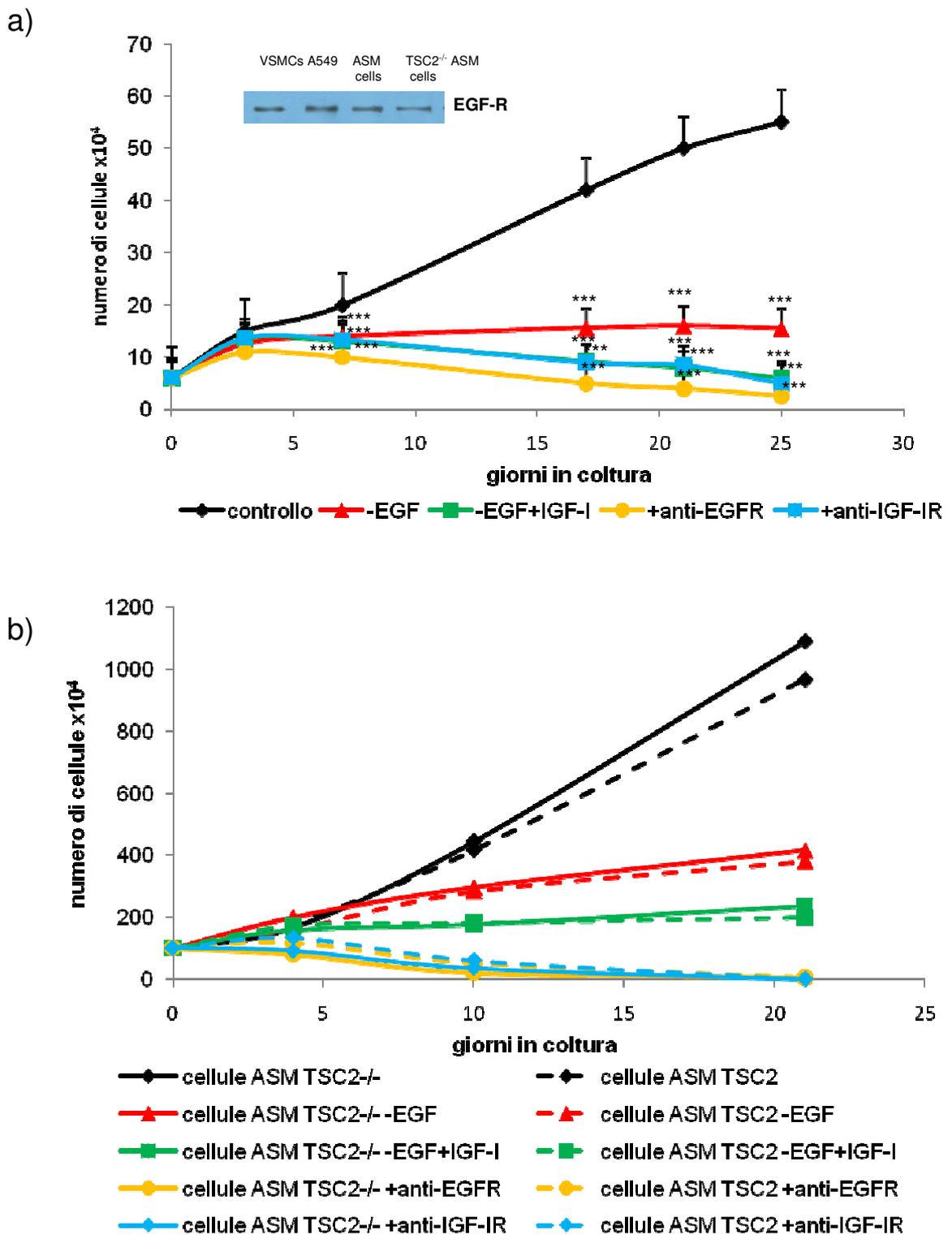
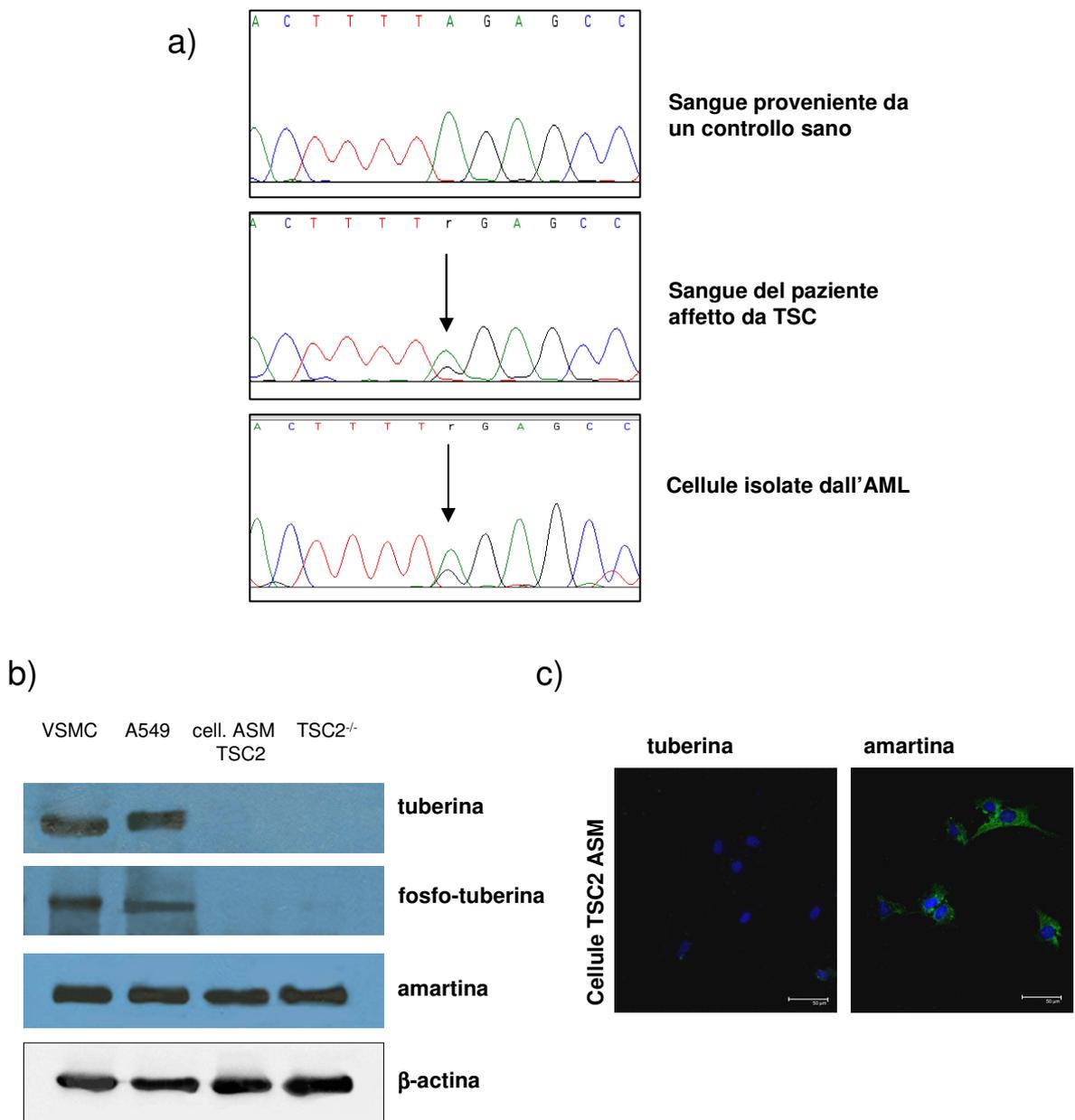


**Fig. 1** Caratterizzazione tramite immunofluorescenza delle cellule TSC isolate dall'AML. L'analisi è stata effettuata utilizzando un pannello di anticorpi che riconoscono le principali componenti cellulari dell'AML. Le cellule TSC sono risultate positive all'anticorpo anti  $\alpha$ -actina, marcatore di cellule muscolari lisce. Sono, invece, negative per gli anticorpi: S100, marcatore di cellule lipidiche; vimentina, marcatore di fibroblasti; e cheratina 8-18, marcatore di cellule epiteliali. Le cellule TSC esprimono inoltre i marcatori tipici della TSC e LAM, rispettivamente HMB45 e CD44V6.

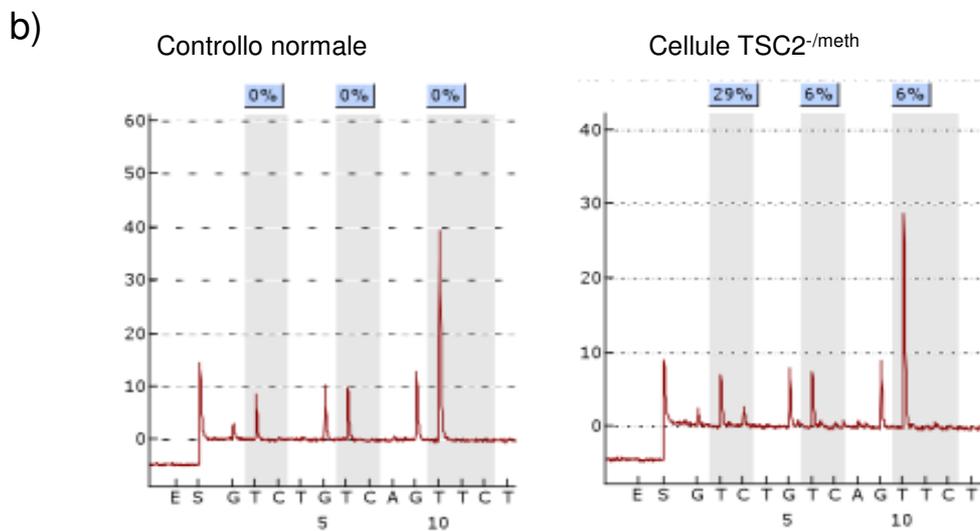
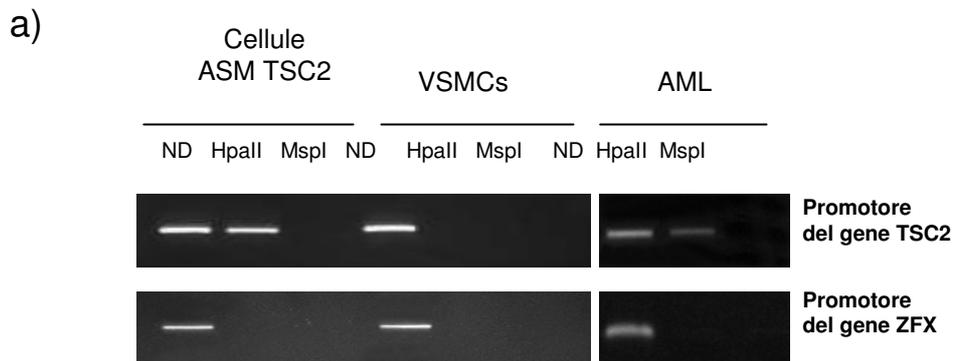


**Fig. 2 a)** Valutazione della proliferazione delle cellule TSC isolate dall'AML. Le cellule sono state incubate con IGF-1 (50ng/ml) e con gli anticorpi monoclonali anti EGFR (5 µg/ml) e anti IGF-1R (5 µg/ml). La proliferazione, inoltre, è stata valutata in presenza (10ng/ml) e in assenza di EGF nel terreno di coltura. Le cellule sono state contate dopo 4, 7, 17, 21 e 25 giorni. E' stata, inoltre, valutata l'espressione dell'EGFR nelle cellule VSMC, A549, ASM TSC2 e TSC2<sup>-/-</sup> tramite *western blotting*. *Test t-Student* \*\*\* $p < 0,001$  vs controllo **b)** Il tasso di proliferazione delle cellule TSC isolate dall'AML (linea tratteggiata) è stato paragonato al tasso di proliferazione delle cellule TSC2<sup>-/-</sup> ASM isolate precedentemente (linea continua) in presenza e in assenza di EGF e in seguito al trattamento con gli anticorpi anti-EGFR e anti-IGF-1R. Il tasso di crescita delle due linee cellulari risulta essere molto simile.

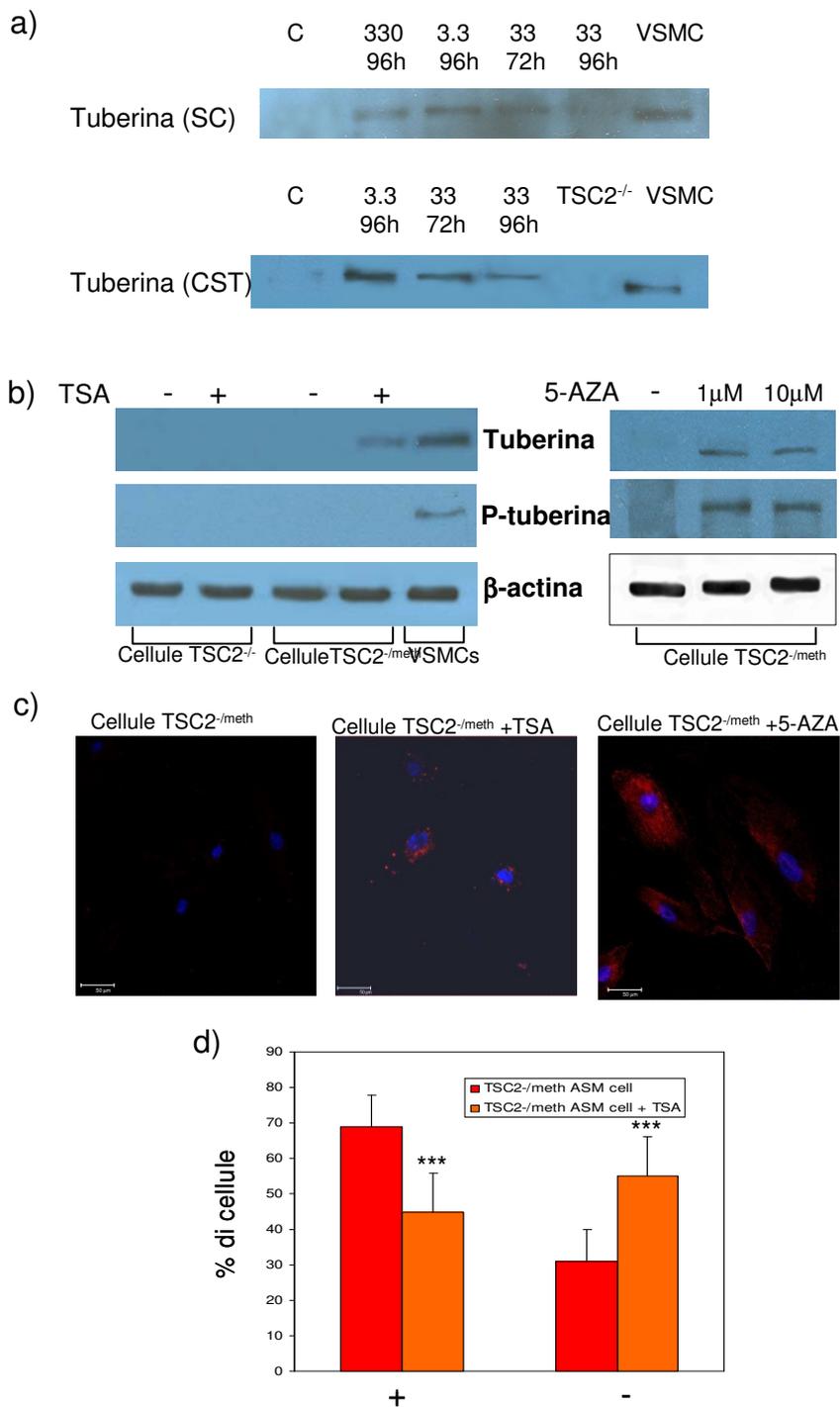


**Fig. 3** Analisi genetica e biochimica delle cellule TSC isolate dall'AML.

**a)** L'analisi della mutazione, tramite sequenziamento del DNA, è stata eseguita sul sangue di un controllo sano, sul sangue del paziente affetto da TSC e sulle cellule isolate dall'AML. Il sito di mutazione è indicato da una freccia verticale. L'analisi delle sequenze ha rilevato la presenza di una mutazione nella giunzione tra l'introne 8 e l'esone 9 del gene *TSC2* (867-2A>G). **b)** Analisi dell'espressione di tuberina e amartina tramite *western blotting*. Tuberina non è espressa nelle cellule TSC isolate dall'AML e nelle cellule TSC2<sup>-/-</sup> ASM isolate precedentemente, è presente, invece, nelle cellule VSMC e A549 utilizzate come controllo. Amartina è espressa in tutti i tipi cellulari analizzati. **c)** Valutazione dell'espressione di tuberina e amartina tramite immunofluorescenza. Tuberina non è presente nelle cellule TSC isolate dall'AML che invece esprimono amartina.

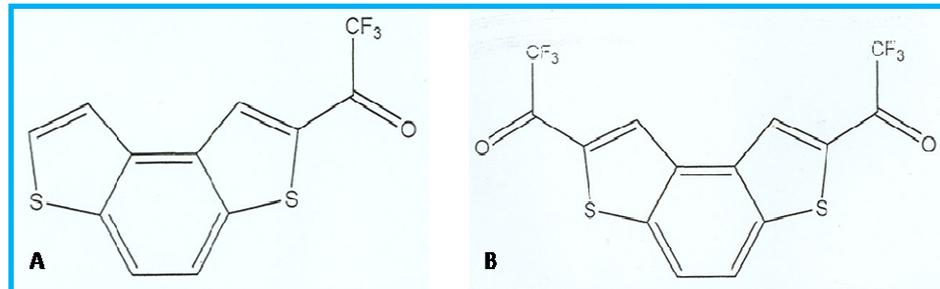


**Fig. 4** Valutazione della metilazione del promotore del gene TSC2 con gli enzimi di restrizione e con la tecnica del *pyro sequencing*. **a)** La perdita di tuberina nelle cellule TSC2 ASM è stata valutata dall'analisi della metilazione delle isole CpG all'interno del promotore del gene TSC2, utilizzando l'enzima di restrizione HpaII, sensibile alla metilazione, e il suo isoschizomero MspI che non riconosce i siti metilati. La metilazione delle isole CpG del promotore del gene TSC2 è presente nelle cellule TSC2 AML e nell'AML. Il promotore del gene ZTL è stato utilizzato come controllo. **b)** Il pirogramma indica la percentuale di metilazione di tre isole CpG, rappresentative, all'interno del gene TSC2 in un controllo sano e nelle cellule TSC2 ASM.

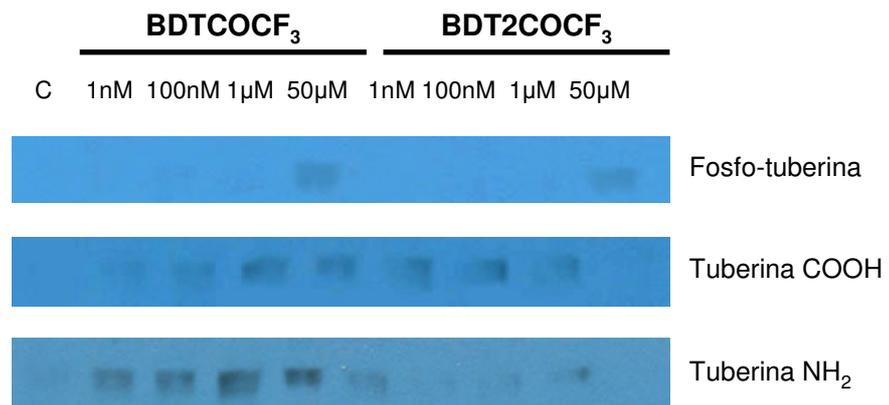


**Fig. 5** Effetto della Tricostatina (TSA) e della 5-aza-citidina (5-AZA) sulla metilazione del promotore del gene *TSC2* **a)** Valutazione tramite *western blotting* dell'efficacia del trattamento con TSA a diverse dosi (330nM, 3,3μM e 33μM) e tempi (96 e 72 ore) nelle cellule TSC2 ASM. Le cellule TSC2<sup>-/-</sup> e VSMC sono state utilizzate come controllo **b)** Valutazione tramite *western blotting* della riattivazione trascrizionale di tuberina in seguito a trattamento con TSA (3.3μM per 72 ore) e 5-AZA (1μM e 10μM per 96 ore) nelle cellule TSC2 ASM **c)** Analisi d'immunofluorescenza dell'espressione di tuberina in seguito all'incubazione con TSA (3.3μM per 72 ore) e 5-AZA (1μM per 96 ore) nelle cellule TSC2 ASM **d)** Effetto della TSA (3.3μM) sui livelli di espressione di HMB45 nelle cellule TSC2 ASM dopo 72 ore di esposizione al farmaco. *Test t-Student* \*\*\**p*<0,01 vs controllo

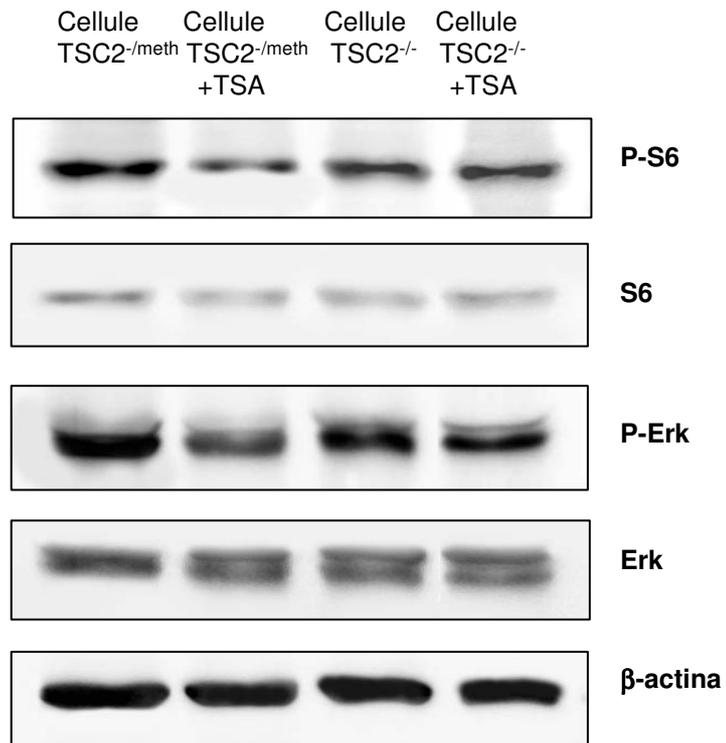
a)



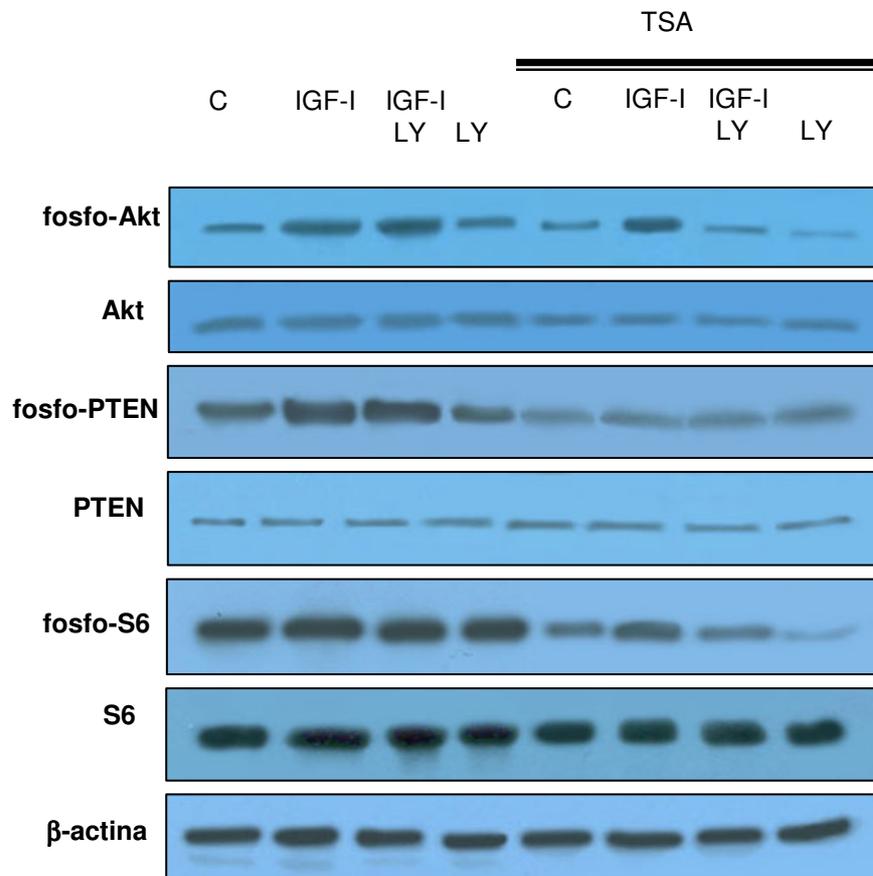
b)



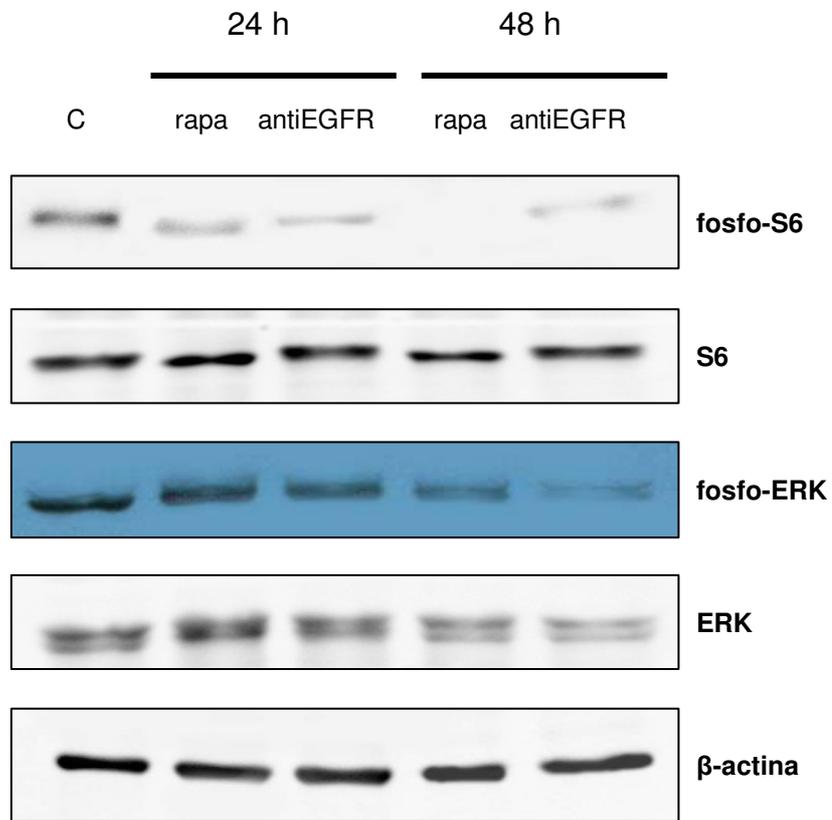
**Fig. 6 a)** Formula chimica dei composti BDTCOCF<sub>3</sub> (A) e BDT2COCF<sub>3</sub> (B) utilizzati come rimodellanti della cromatina **b)** Valutazione tramite western blotting dell'espressione di tuberina e della sua forma fosforilata in seguito al trattamento con i composti sintetici BDTCOCF<sub>3</sub> e BDT2COCF<sub>3</sub> alle concentrazioni di 1nM, 100nM, 1μM e 50μM per 72 ore. Entrambi i composti sono efficaci nel riattivare la trascrizione di TSC2.



**Fig. 7** Valutazione tramite *western blotting* dei livelli di fosforilazione di S6 e di ERK e dell'espressione di S6 e di ERK in seguito a trattamento con TSA (3.3  $\mu$ M) per 72 ore, nelle cellule TSC2<sup>-meth</sup> e TSC2<sup>-/-</sup>. I livelli di  $\beta$ -actina indicano un corretto caricamento dei campioni



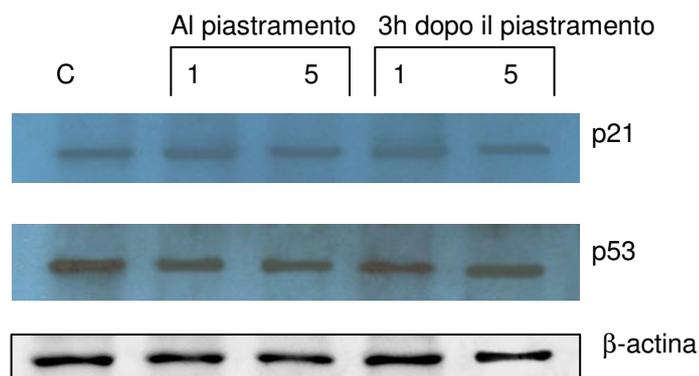
**Fig. 8** Effetto della TSA sulla via di traduzione del segnale di PI3K/Akt. le cellule TSC<sup>-/meth</sup> sono state incubate con e senza TSA (3,3 $\mu$ M) per 72 ore, e in seguito con IGF-1 (50ng/ml) ed LY294002 (LY) (20 $\mu$ M) per 2 ore. Sono stati valutati i livelli di fosforilazione di Akt, S6 e PTEN, e i livelli di espressione di Akt, S6 e PTEN tramite *western blotting*. I livelli di  $\beta$ -actina indicano un corretto caricamento dei campioni.



**Fig. 9** Valutazione tramite *western blotting* dei livelli di fosforilazione di S6 e di ERK e dell'espressione di S6 e di ERK dopo 24 e 48 ore di trattamento con rapamicina (rapa 1ng/ml) e anti-EGFR (5μM). I livelli di β-actina indicano un corretto caricamento dei campioni.

Giorni	5	8	10
cellule TSC2 <sup>-</sup> /meth ASM	180%	230%	286%
rapamicina 1ng/ml al piastramento	143%	143%	125%
rapamicina 1 ng/ml 3 ore dopo il piastramento	152%	160%	168%
rapamicina 5ng/ml al piastramento	89%	89%	45%
rapamicina 5 ng/ml 3 ore dopo il piastramento	116%	125%	45%

**Tab. 1** Percentuale del tasso di proliferazione delle cellule TSC2<sup>-</sup>/meth in presenza di rapamicina (1ng/ml e 5ng/ml) addizionata al terreno standard al momento del piastramento e 3 ore dopo. Sono state pilastrate 2,8X10<sup>4</sup> cellule e la proliferazione è stata valutata a 5, 8 e 10 giorni dall'inizio dei trattamenti.

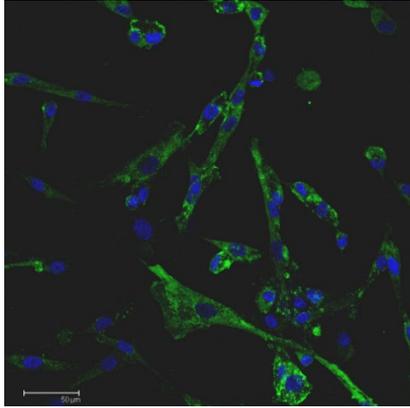


**Fig. 10** Studio dell'apoptosi in seguito al trattamento con rapamicina (1ng/ml e 5ng/ml) addizionata al terreno al momento del piastramento e 3 ore dopo. Valutazione dei livelli di p21 e p53 tramite *western blotting*. I livelli di  $\beta$ -actina indicano un corretto caricamento dei campioni.

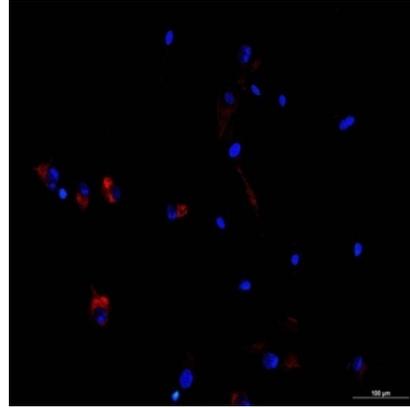
	% di cellule TUNEL-positive
TSC2 <sup>-/meth</sup> ASM cell.	4.5
TSC2 <sup>-/meth</sup> ASM cell. + 1 ng/ml rapamicina al piastramento	6.1
TSC2 <sup>-/meth</sup> ASM cell. + 5 ng/ml rapamicina al piastramento	6.9
TSC2 <sup>-/meth</sup> ASM cell. + 1 ng/ml rapamicina 3 ore dopo il piastramento	4.4
TSC2 <sup>-/meth</sup> ASM cells + 5 ng/ml rapamycin 3 ore dopo il piastramento	5.2
VSMC	5.1
VSMC + staurosporina	57.3

**Tab. 2** Valutazione delle cellule TSC2<sup>-/meth</sup> positive al TUNEL in seguito al trattamento con rapamicina (1ng/ml e 5ng/ml) somministrata al piastramento e 3 ore dopo il piastramento dopo 10 giorni. Le cellule VSMC, utilizzate come controllo, sono state incubate con staurosporina alla concentrazione di 100 Mm per un'ora e 30 minuti.

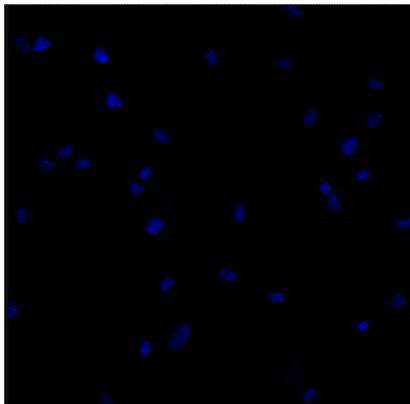
$\alpha$ -actina



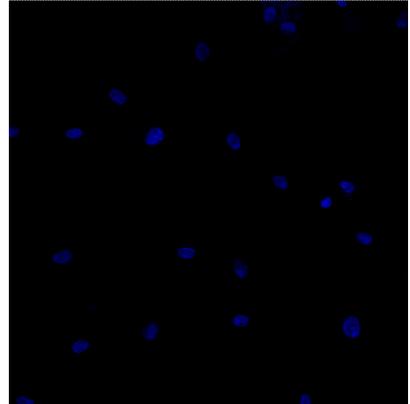
Vimentina



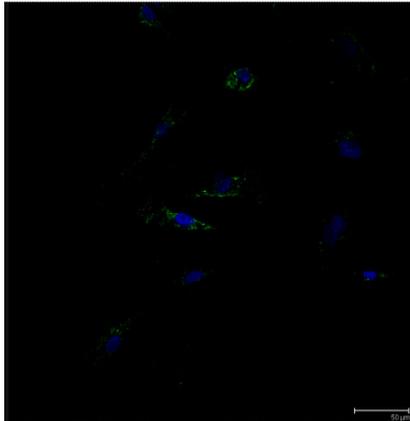
Cheratina 8/18



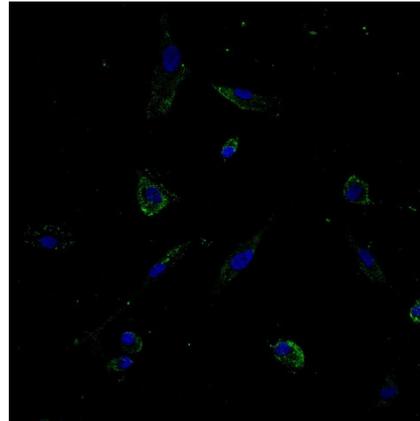
S100



HMB45

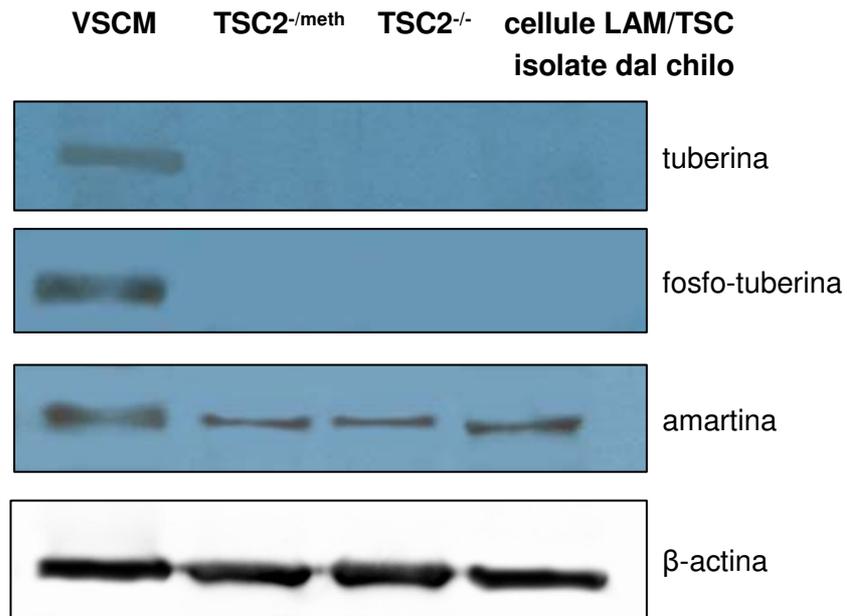


CD44v6

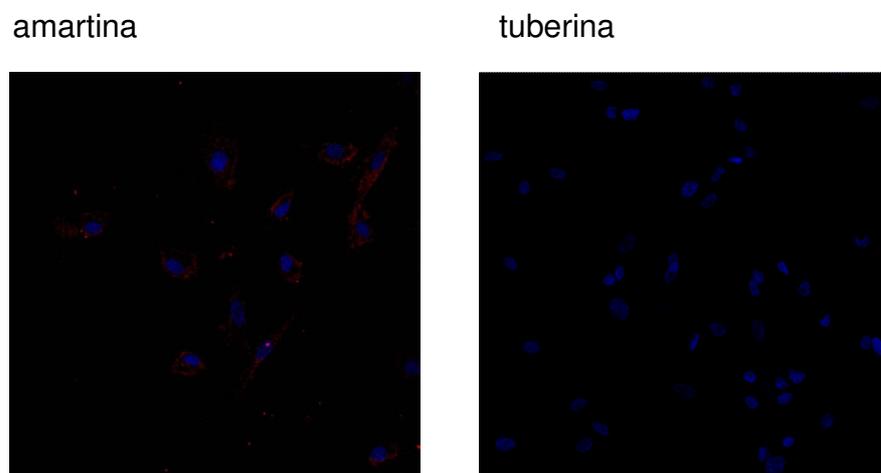


**Fig. 11** Caratterizzazione con immunofluorescenza delle cellule isolate dal chilo di una paziente affetta da TSC e LAM. Le cellule sono risultate positive all'anticorpo anti  $\alpha$ -actina, marcatore di cellule muscolari lisce. Sono, invece, negative per gli anticorpi S100, marcatore di cellule lipidiche e cheratina 8-18, marcatore di cellule epiteliali. Le cellule isolate dal chilo esprimono inoltre i marcatori tipici della TSC e LAM, rispettivamente HMB45 e CD44V6.

a)

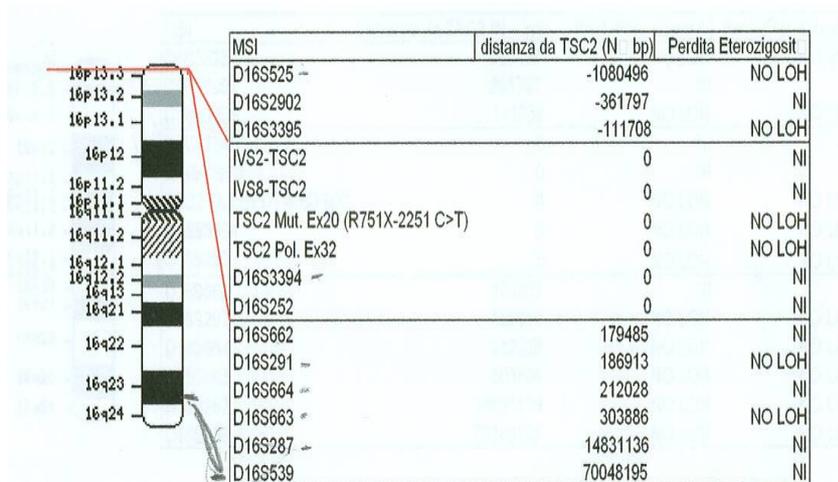


b)

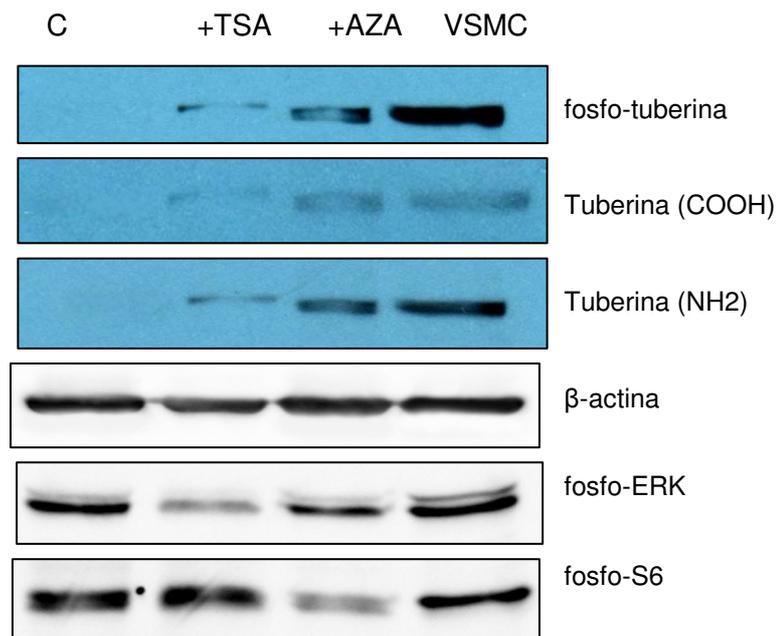


**Fig. 12 a)** Valutazione dell'espressione di amartina, di tuberina e della sua forma fosforilata nelle cellule LAM/TSC isolate dal chilo tramite *western blotting*. Le cellule VSMC, TSC2<sup>-/-</sup> e TSC2<sup>-/meth</sup> sono state utilizzate come controllo. I livelli di  $\beta$ -actina indicano un corretto caricamento dei campioni **b)** analisi immunocitochimica dell'espressione delle preteine che formano il complesso TSC, tuberina e amartina

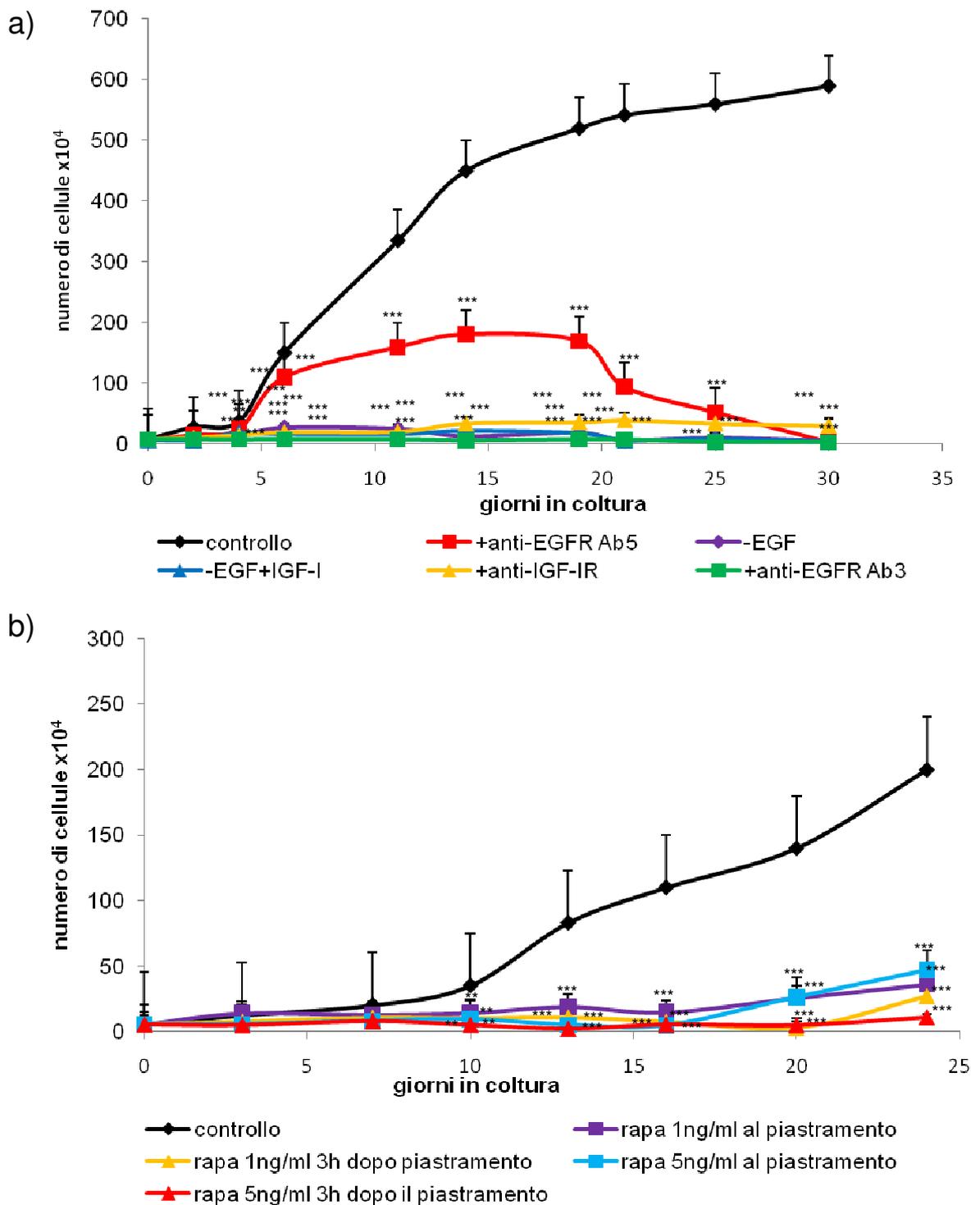
a)



b)

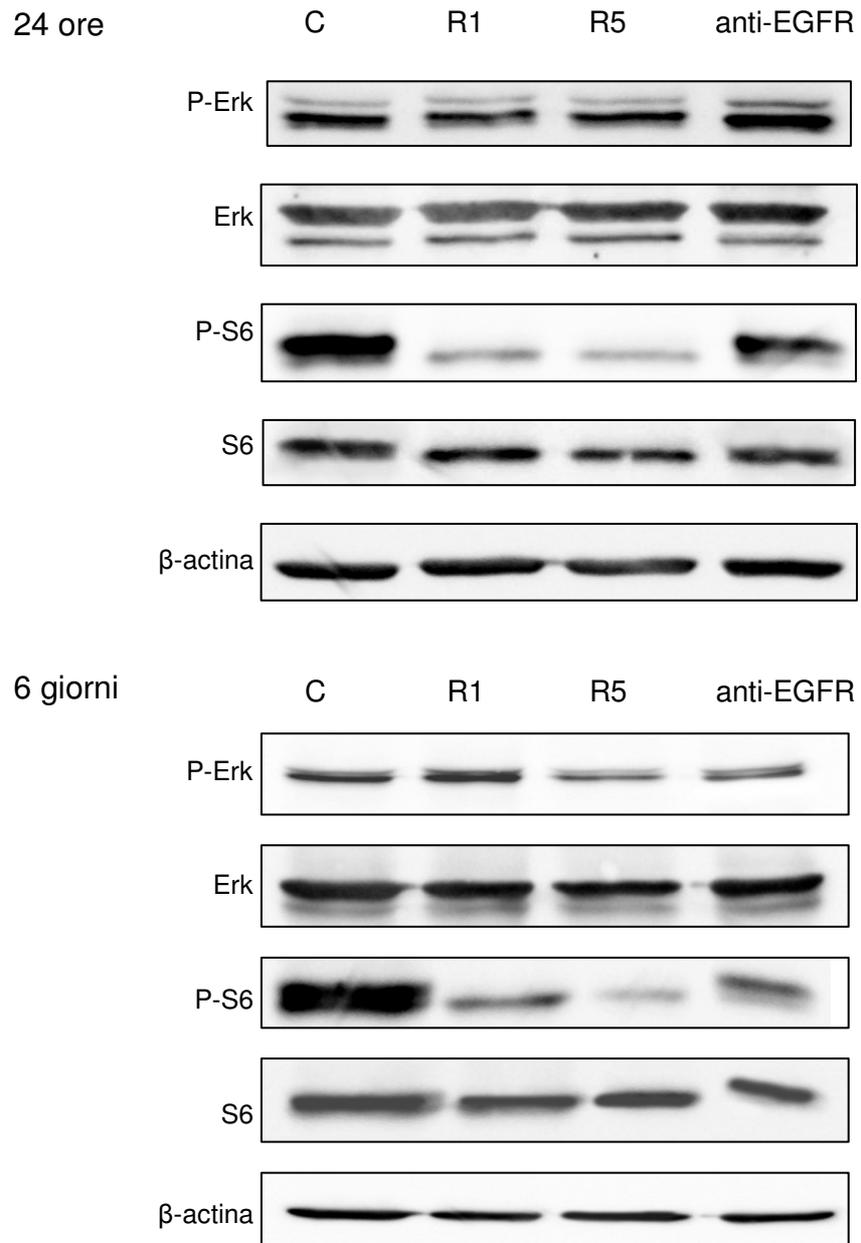


**Fig. 13 a)** Analisi di mutazione del gene TSC2 nelle cellule isolate dal chilo tramite l'utilizzo di microsatelliti e sequenziamento genico **b)** Valutazione tramite *western blotting* della riattivazione trascrizionale di tuberina in seguito a trattamento con TSA (3.3 $\mu$ M per 72 ore) e 5-AZA (1 $\mu$ M per 96 ore) nelle cellule LAM/TSC. Sono stati analizzati i livelli di fosforilazione di ERK ed S6 in seguito al trattamento con i rimodellanti della cromatina. I livelli di  $\beta$ -actina indicano un corretto caricamento dei campioni.

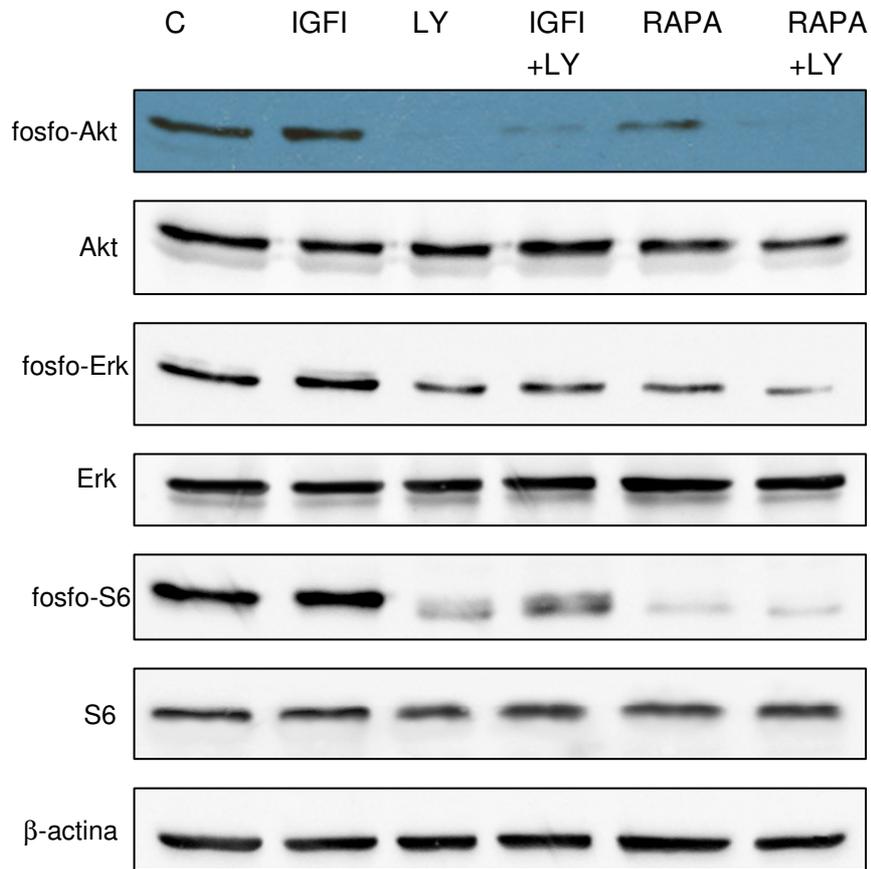


**Fig. 14 A** Valutazione delle proliferazione nelle cellule LAM/TSC isolate dal chilo  
**a)** Le cellule sono state incubate con IGF-1 (50ng/ml) e con gli anticorpi monoclonali anti-EGFR (5 µg/ml) e anti-IGF-1R (5 µg/ml). La proliferazione, inoltre, è stata valutata in presenza (10ng/ml) e in assenza di EGF nel terreno di coltura. Le cellule sono state contate a 5, 10, 15,20,25 e 30 giorni di trattamento. **b)** Le cellule sono state trattate con la rapamicina alle concentrazioni di 1ng/ml e 5ng/ml. Il farmaco è stato aggiunto al terreno di crescita al momento del piastramento e 3 ore dopo il piastramento. Le cellule sono state contate dopo 5, 10, 15, 20 e 30 giorni dall'inizio del trattamento.  
*Test t-Student \*\*\*p<0,001 \*p<0,05 vs controllo*

c)

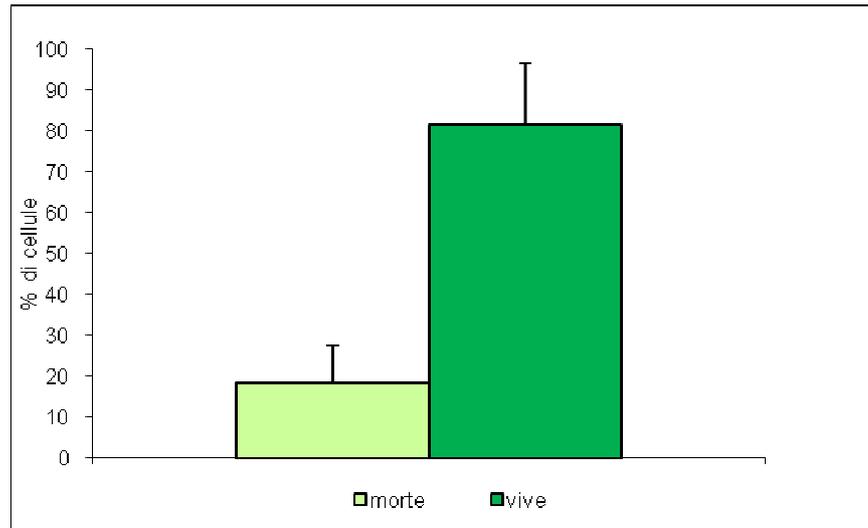


**Fig. 14 c)** Valutazione tramite *western blotting* della fosforilazione di ERK ed S6 e dei livelli delle proteine nella forma non fosforilata, nelle cellule LAM/TSC dopo 24 (a) ore e 6 giorni (b) di trattamento con la rapamicina (R1 1ng/ml, R5 5 ng/ml) e l'anticorpo anti-EGFR (5  $\mu$ g/ml). I livelli di  $\beta$ -actina indicano un corretto caricamento dei campioni.



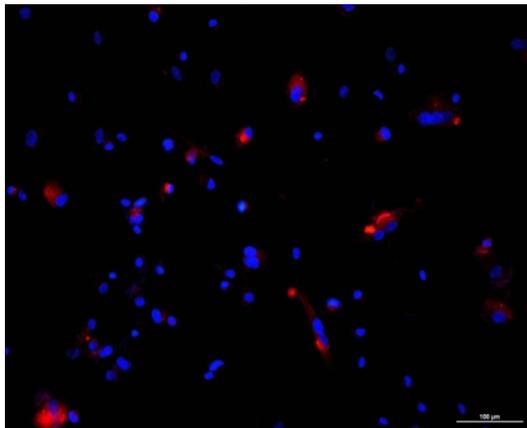
**Fig. 15** Valutazione della via di trasduzione del segnale di PI3K/Akt nelle cellule isolate dal chondrocyte. Le cellule sono state incubate con IGF-1 (50ng/ml), LY294002 (LY) (20 $\mu$ M) e rapamicina (RAPA, 1ng/ml) per 2 ore. Sono stati valutati i livelli di fosforilazione di Akt, ERK ed S6, e i livelli di espressione di Akt, S6 e PTEN. I livelli di  $\beta$ -actina indicano un corretto caricamento dei campioni.

a)

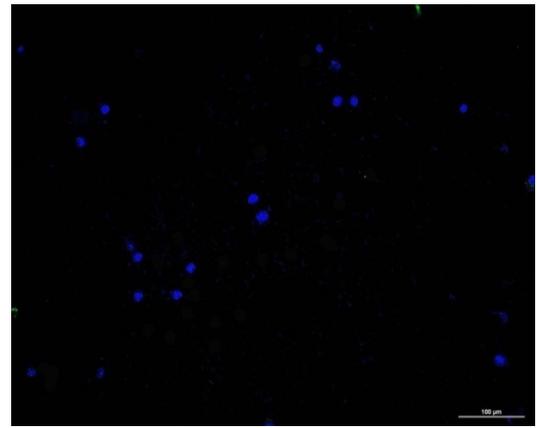


b)

cellule LAM adese

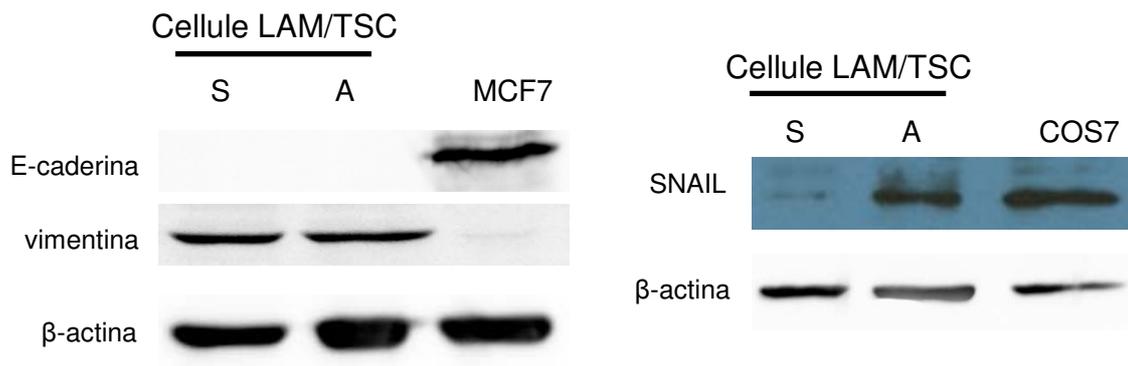


cellule LAM *floating*



**Fig. 16 a)** Valutazione della vitalità con *trypan blu* delle cellule LAM/TSC in sospensione isolate dal chilo. **b)** Valutazione del ciclo di adesione delle cellule LAM/TSC *floating* isolate dal chilo. Le cellule in sospensione sono state marcate con PKH26 e piastrate su un vetrino. Dopo 1 giorno il terreno è stato raccolto e piastrato in un altro vetrino. Sono state valutate le cellule marcate con PKH26 (rosso), che si sono adese al vetrino. I nuclei delle cellule sono stati marcati con DAPI (blu).

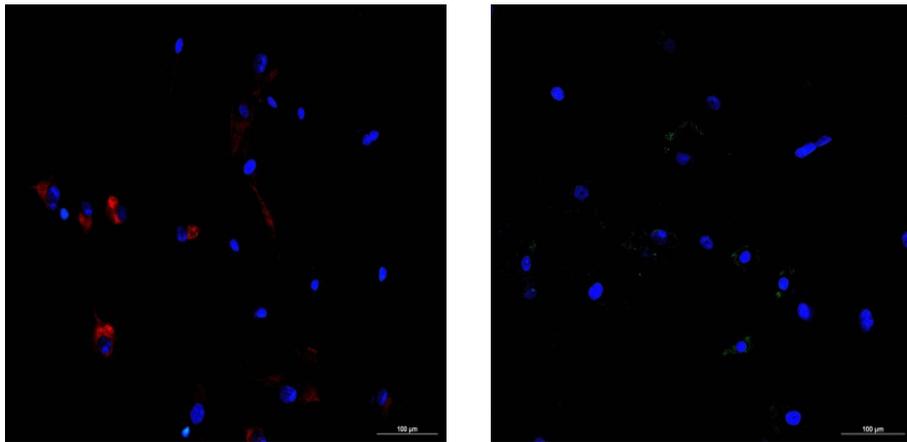
a)



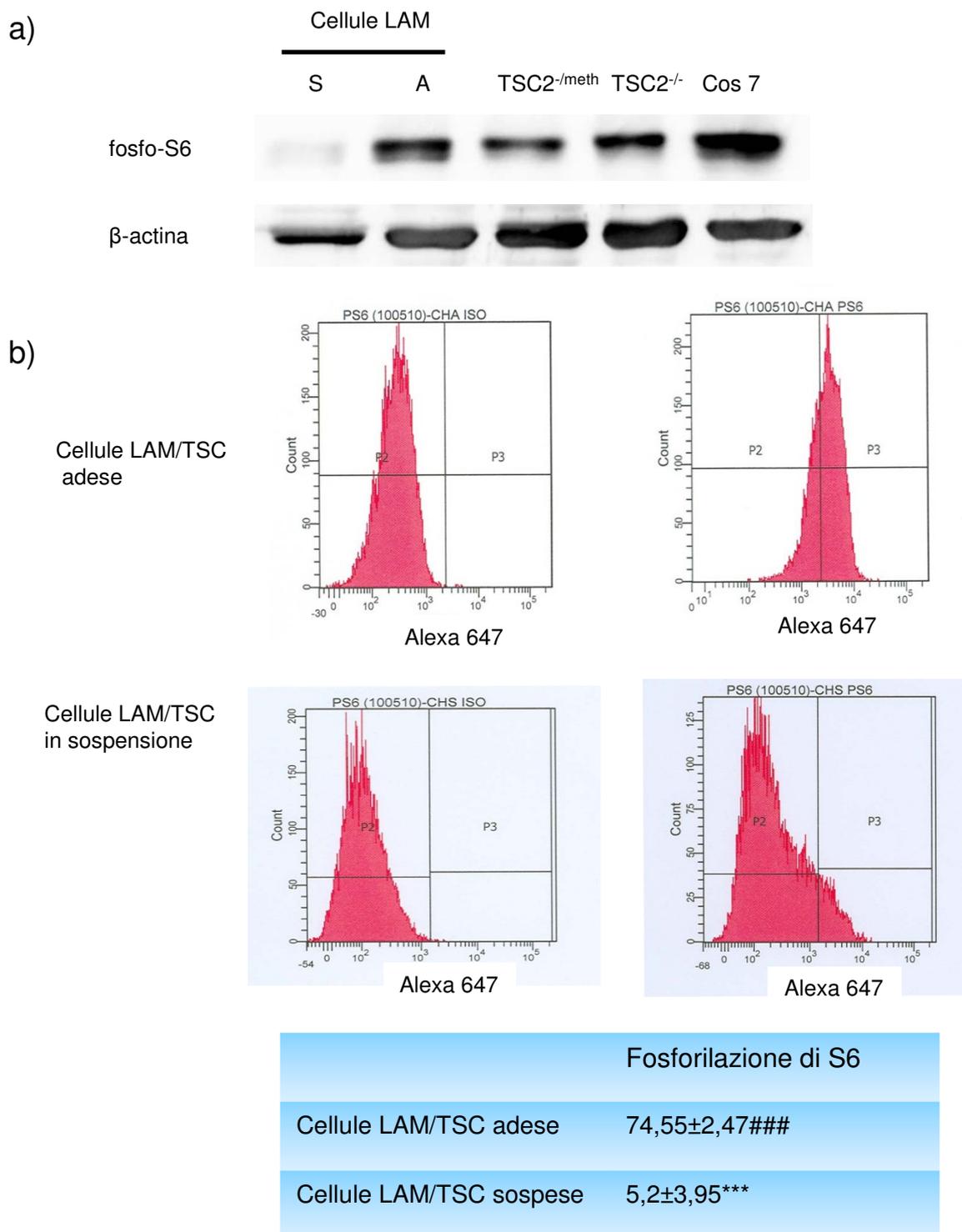
b)

*Rosso*: vimentina

*Verde*: E-caderina

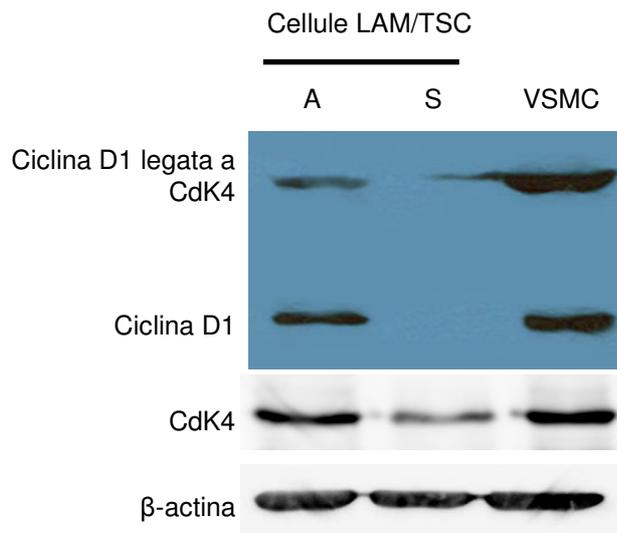


**Fig. 17** Valutazione dei marcatori di *Endothelial Mesenchimal Transition (EMT)* nelle cellule LAM/TSC isolate del chilo in sospensione e nelle cellule che crescono adese alla piastra di coltura. **a)** Valutazione tramite *western blotting* dell'espressione di E-caderina, vimentina e SNAIL nelle cellule in sospensione (S) e adese (A) isolate dal chilo. Le cellule MCF-7 e COS7 sono state utilizzate come controllo interno dell'esperimento. I livelli di  $\beta$ -actina indicano un corretto caricamento dei campioni **b)** Analisi d'immunofluorescenza dell'espressione di vimentina ed E-caderina nelle cellule LAM/TSC isolate dal chilo che crescono adese alla piastra di coltura.

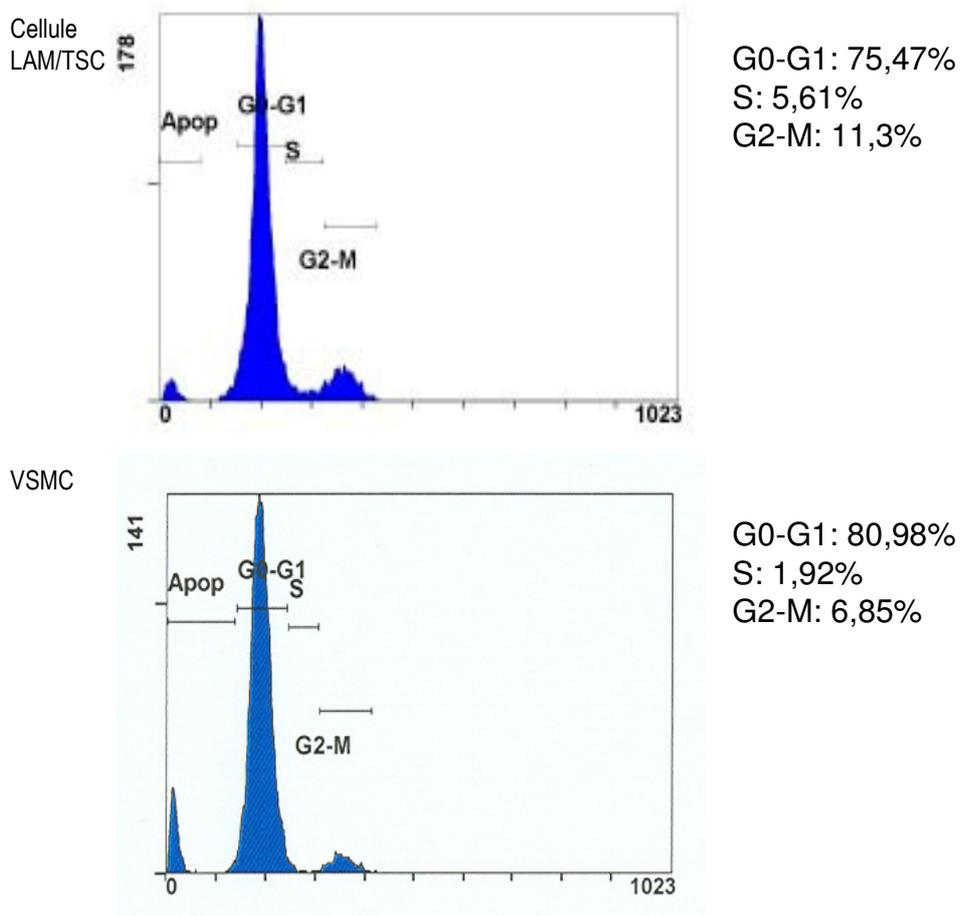


**Fig. 18** Valutazione dei livelli di fosforilazione di S6 tramite *western blotting* e analisi con il citofluorimetro **a)** I livelli di fosforilazione di S6 nelle cellule in sospensione (S) e adese (A) sono stati paragonati ai livelli di fosforilazione della proteina nelle cellule TSC2<sup>-/-</sup> ASM, TSC2<sup>-/meth</sup> ASM e nelle cellule COS7 utilizzate come controllo. I livelli di β-actina indicano un corretto caricamento dei campioni. **b)** Valutazione dei livelli di fosforilazione di S6 nelle cellule in sospensione e in quelle che crescono adese alla petri. *Test t-Student* \*\*\**p*<0,001 vs cellule LAM adese; ###*p*<0,001 vs cellule LAM in sospensione.

a)



b)



**Fig. 19** Analisi del ciclo cellulare nelle cellule LAM/TSC isolate dal chilo **a)** Valutazione dell'espressione della ciclina D1 e di CdK4 nelle cellule LAM in sospensione (S) e che crescono adese alla petri (A). Le cellule VSMC sono state utilizzate come controllo. I livelli di  $\beta$ -actina indicano un corretto caricamento dei campioni **b)** Analisi con citofluorimetro del ciclo cellulare tramite marcatura con ioduro di propidio nelle cellule LAM/TSC che crescono adese alla petri. Le cellule VSMC sono state utilizzate come controllo.