



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI ANATOMIA PATOLOGICA

**DOTTORATO DI RICERCA IN PATOLOGIA
ONCOLOGICA UMANA**

XX CICLO

**MECCANISMI MOLECOLARI
DELL'ATTIVITA' ANTITUMORALE ASSOCIATA
ALLA MODULAZIONE DEGLI IONI ZINCO IN
CELLULE DI ADENOCARCINOMA PANCREATICO**

S.S.D.: MED 08

Coordinatore: Ch.mo Prof. Fabio Menestrina

Tutor: Ch.mo Prof. Aldo Scarpa

Co-Tutor: Ch.mo Prof. Marta Palmieri

Dottorando: Dott.ssa Elisa Dalla Pozza

INDICE

1. RIASSUNTO	3.
2. INTRODUZIONE	5.
2.1. <i>L'adenocarcima pancreatico</i>	5.
2.2. <i>Approccio chemioterapico</i>	6.
2.3. <i>Genetica e biologia dell'adenocarcinoma pancreatico</i>	7.
2.4. <i>Lo zinco</i>	9.
2.5. <i>Lo stress ossidativo</i>	10.
2.6. <i>PDTC e TPEN</i>	12.
3. OBIETTIVI	14.
4. MATERIALI E METODI	16.
4.1. <i>Reagenti chimici</i>	16.
4.2. <i>Colture cellulari</i>	16.
4.3. <i>Saggio di proliferazione cellulare (Cristal Violetto)</i>	16.
4.4. <i>Analisi del ciclo cellulare</i>	17.
4.5. <i>Apoptosi</i>	17.
4.6. <i>Analisi del contenuto di zinco intracellulare</i>	18.
4.7. <i>Analisi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)</i>	18.
4.8. <i>Analisi del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$)</i>	19.
4.9. <i>Trasfezioni transienti del plasmide contenente il promotore di P21</i>	19.
4.10. <i>Estrazione dell'RNA e analisi di RT-PCR semiquantitativa</i>	19.
4.11. <i>Estrazione delle proteine e analisi di Western blot</i>	21.
4.12. <i>Immunocitochimica</i>	22.
4.13. <i>Xenograft in topi nudi</i>	22.
5. RISULTATI	24.
5.1. <i>Caratterizzazione degli effetti dell'aumento di zinco intracellulare sulla crescita di linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico umano e di fibroblasti primari</i>	24.
5.1.A. <i>Inibizione della crescita cellulare dopo trattamento delle cellule con zinco</i>	24.
5.1.B. <i>Inibizione della crescita cellulare dopo trattamento delle cellule con PDTC</i>	25.
5.1.B1. <i>La produzione di ROS e la conseguente fosforilazione di ERK1/2 sono la causa dell'azione citostatica del PDTC</i>	27.
5.1.B2. <i>Il PDTC induce l'espressione di P21 nelle cellule PaCa44</i>	28.
5.1.B3. <i>Il PDTC induce p53 e il gene antiossidante SESN2 nei fibroblasti</i>	31.
5.1.B4. <i>Il PDTC inibisce la crescita del tumore pancreatico in topi nudi</i>	33.

<i>5.1.C. Inibizione della crescita cellulare dopo trattamento delle cellule con PDTC e zinco</i>	34.
<i>5.1.C1. L'effetto anti-proliferativo dell'associazione PDTC e zinco dipende dallo stress ossidativo</i>	35.
<i>5.1.C2. Il PDTC in associazione a zinco esogeno non aumenta il blocco di ciclo determinato dal solo PDTC, ma induce una forte apoptosi caspasi-indipendente</i>	36.
<i>5.1.C3. Il trattamento con PDTC e zinco determina il danneggiamento ROS-dipendente del mitocondrio</i>	38.
<i>5.1.C4. Il trattamento con PDTC e zinco induce apoptosi associata alla traslocazione di AIF nel nucleo</i>	40.
<i>5.1.C5. Il trattamento con PDTC e zinco inibisce l'espressione di p53 nei fibroblasti normali</i>	42.
5.2 Caratterizzazione degli effetti della riduzione di zinco intracellulare sulla crescita di linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico umano e di fibroblasti	44.
<i>5.2.A. Il TPEN inibisce la crescita di cellule di adenocarcinoma pancreatico in modo più efficace rispetto ai fibroblasti</i>	44.
<i>5.2.A1. Il TPEN inibisce la crescita di cellule di adenocarcinoma pancreatico più efficacemente di un pannello di sette composti antitumorali</i>	47.
<i>5.2.A2. Il TPEN inibisce la progressione del ciclo cellulare</i>	48.
<i>5.2.A3. Il TPEN induce morte apoptotica</i>	50.
6. DISCUSSIONE	54.
6.1 Effetti e meccanismi molecolari coinvolti nell'aumento di zinco intracellulare	54.
6.2 Effetti e meccanismi molecolari coinvolti nella riduzione di zinco intracellulare	60.
7. BIBLIOGRAFIA	65.

1. RIASSUNTO

Lo zinco è il secondo metallo maggiormente abbondante nel corpo umano. Questo ione è essenziale in un'ampia varietà di processi cellulari, in quanto ha un ruolo sia funzionale agendo da cofattore per più di 300 enzimi, sia strutturale per la stabilizzazione della struttura terziaria di molte proteine. L'omeostasi dello zinco è un processo cellulare ben regolato dall'espressione di trasportatori di membrana e di proteine sequestranti zinco. A livello intracellulare esiste un "pool" labile di zinco, molto dinamico soggetto al flusso ionico ed influenzato dalla deprivazione e dalla "supplementazione" di questo ione; questo "pool" labile sembra essere importante per la citoprotezione e la regolazione dell'apoptosi.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), prodotte costantemente da una varietà di processi cellulari, causano, a bassi livelli, un aumento della progressione del ciclo cellulare, mentre a livelli più elevati, un arresto del ciclo cellulare e successivamente apoptosi o necrosi. L'utilizzo di molecole capaci di indurre stress ossidativo potrebbe essere un'efficace strategia terapeutica contro il cancro, in quanto, nelle cellule tumorali, aventi un livello basale di ROS più elevato, un ulteriore aumento di stress ossidativo determinerebbe lo scatenarsi di fenomeni di morte cellulare che non avverrebbero nelle cellule normali.

In questa tesi sono esposti gli effetti ottenuti in linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico umano trattate con due molecole: la pirrolidina ditiocarbammato (PDTC) [1] e l'*N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridilmetil)etilenediammina (TPEN) [2]. Il PDTC, grazie alla sua attività ionofora, è in grado di aumentare la quantità di zinco intracellulare, a bassi livelli se utilizzato da solo o a livelli più elevati se utilizzato in associazione con zinco esogeno. L'aumento di zinco intracellulare è direttamente proporzionale all'aumento di ROS nella cellula e causa fenomeni diversi a seconda dell'entità dell'incremento. Il PDTC causa l'attivazione di ERK1/2 e l'induzione di *P21*, con conseguente blocco della progressione del ciclo cellulare in fase S. Il trattamento associato PDTC e zinco determina il danneggiamento della membrana

mitocondriale con il rilascio di AIF, che trasloca nel nucleo e causa una forte apoptosi caspasi indipendente. Il TPEN, grazie alla sua attività chelate, è in grado di diminuire i livelli di zinco intracellulare, determinando lo scatenarsi di fenomeni indipendenti dallo stress ossidativo. La sua forte citotossicità è dovuta sia al blocco della progressione del ciclo cellulare in fase G1 sia a morte apoptotica. Il TPEN è in grado di regolare l'espressione di vari geni, in particolare, per quanto riguarda il ciclo cellulare, aumenta il rapporto tra i livelli di espressione dei geni inibitori dei complessi ciclina-cdk e i geni delle cicline, mentre per l'apoptosi, incrementa il rapporto tra i livelli di espressione dei geni mitocondriali apoptotici e quelli anti-apoptotici. Inoltre, il TPEN determina danno mitocondriale e attivazione delle caspasi. Sia il PDTC che il TPEN sono risultati essere più efficienti nell'inibizione della vitalità cellulare delle linee di adenocarcinoma pancreatico rispetto al chemioterapico standard, la gemcitabina, e inoltre risultano essere poco citotossiche su cellule normali di fibroblasti primari.

2. INTRODUZIONE

2.1 L'adenocarcinoma pancreatico

L'adenocarcinoma pancreatico è la più frequente neoplasia pancreatica, costituendo più del 85% dei tumori pancreatici. Si origina dalle cellule duttali del pancreas esocrino, sebbene queste rappresentino soltanto il 10-30% del parenchima pancreatico normale. E' un tumore estremamente aggressivo che causa circa 32000 decessi all'anno nel mondo e rappresenta la quarta causa di morte per cancro. Nonostante i continui miglioramenti nella diagnostica e nella clinica, il tasso di mortalità dovuto all'adenocarcinoma pancreatico non è significativamente migliorato nel corso degli anni. Infatti, il tasso di incidenza corrisponde, all'incirca, al tasso di mortalità: ad un anno dalla diagnosi sopravvive circa il 20% dei pazienti e dopo cinque anni meno del 5%.

Il sito predominante dello sviluppo tumorale è la testa del pancreas (80% dei casi), mentre il corpo e la coda del pancreas rappresentano il sito primario solo nel 20% dei casi. I sintomi più comuni variano notevolmente in dipendenza della localizzazione ed estensione del tumore. Infatti, quando il tumore è collocato alla testa, i segni si manifestano, generalmente, quando il tumore è localizzato ed ha dimensioni ancora relativamente ridotte, quando invece si sviluppa al corpo e alla coda, i sintomi divengono manifesti solo quando si è esteso a tessuti circostanti o ha dato metastasi. I sintomi principali sono: perdita di peso, dolore addominale o lombare, ittero, nausea, vomito, malessere generale e astenia. Valutando globalmente il corteo sintomatologico del carcinoma pancreatico, si può correttamente affermare che, quando i sintomi maggiori diventano clinicamente evidenti, nella maggioranza dei casi si è di fronte ad un tumore che è già andato oltre le attuali possibilità curative.

Al momento attuale, solo la resezione chirurgica offre la possibilità di un trattamento curativo dell'adenocarcinoma pancreatico. Poiché sfortunatamente lo sviluppo del tumore avviene

molto spesso in modo silente, solo il 15-20% dei casi di adenocarcinoma sono resecabili chirurgicamente al tempo della diagnosi. Dei rimanenti 80-85% dei pazienti, al momento della diagnosi il 40% presenta una malattia localmente avanzata (invasione di organi e strutture vasali peri-pancreatiche) e nel 45-50% dei casi sono già presenti lesioni metastatiche epatiche e/o sistemiche [3, 4].

2.2 Approccio chemioterapico

Studi clinici hanno dimostrato che per il trattamento chemioterapico dell'adenocarcinoma pancreatico la gemcitabina (2',2'-difluorodeossicitidina) è più efficace del 5-fluorouracile, ed è considerato da molti anni il chemioterapico per eccellenza, non solo come agente antitumorale ma anche nell'alleviamento dei sintomi associati al tumore, come dolore e perdita di peso [5]. Ulteriori studi clinici su un elevato numero di pazienti con adenocarcinoma pancreatico hanno dimostrato, inoltre, che il trattamento associato con gemcitabina e 5-fluorouracile non determina un significativo aumento della vita media rispetto al trattamento con la sola gemcitabina [6]. Attualmente, il trattamento chemioterapico con la sola gemcitabina continua quindi ad essere la terapia standard nel trattamento di questo tumore, anche se, a causa di meccanismi di resistenza, la percentuale di risposta obiettiva è inferiore al 20% [7, 8].

Il meccanismo d'azione della gemcitabina rispecchia quello della chemioterapia tradizionale, che mira ad inibire specificamente la crescita delle cellule tumorali, per definizione cellule ad alta attività replicativa, attraverso molecole che determinano danni al DNA. Infatti, la gemcitabina, dopo essere fosforilata all'interno della cellula, diventa un substrato per la DNA polimerasi che la utilizza per la sintesi del DNA al posto della deossicitidinatrifosfato (dCTP) con conseguente arresto della sintesi del DNA stesso [9]. L'incorporazione di gemcitabina nella sintesi del DNA blocca la polimerizzazione poiché permette l'aggiunta di un ulteriore nucleotide in modo da non attivare i meccanismi esonucleasici di riparo del DNA.

Vari sono i meccanismi di resistenza delle cellule tumorali all'azione della gemcitabina, come ad esempio il deficit nei sistemi di trasporto della gemcitabina all'interno della cellula [10], i bassi livelli di espressione della deossicitidina chinasi [11] che rappresenta l'enzima chiave del meccanismo di fosforilazione e attivazione della molecola, la perdita funzionale per mutazioni puntiformi del gene codificante p53 [12, 13], la quale riconosce i danni subiti dal DNA e provoca il suicidio della cellula danneggiata attraverso morte apoptotica. Alla luce dei limiti sopradescritti dell'azione della gemcitabina, appare necessaria la ricerca di nuove strategie chemioterapiche che abbiano bersagli molecolari diversi dall'inibizione della sintesi del DNA.

2.3 Genetica e biologia dell'adenocarcinoma pancreatico

Un'opportunità interessante nell'identificazione di nuove molecole chemioterapiche dell'adenocarcinoma pancreatico è stata compiuta negli ultimi vent'anni grazie a importanti scoperte sulle alterazioni genetiche presenti in questo tumore. In molti casi questi eventi genetici correlano con la progressione del tumore.

Le più note mutazioni sono quelle che coinvolgono *K-RAS*: esse avvengono sporadicamente nel tessuto di pancreas normale, con una frequenza del 30% in uno stato precoce della neoplasia e del quasi 100% dei casi nel tumore avanzato [14, 15]. Queste mutazioni puntiformi, collocate sul codone 12, causano uno stato di continua attivazione di questo oncogene che indipendentemente dai fattori di crescita promuove una proliferazione cellulare incontrollata [16].

Un'altra alterazione genetica che avviene in uno stadio precoce della progressione tumorale è quella localizzata sul locus 9q21. Mutazioni puntiformi, delezioni o ipermetilazione in questa regione sono state riscontrate nel 80-95% dei casi di adenocarcinoma pancreatico [15, 17]. Questa regione codifica per due proteine, la p16 e la p19, entrambe soppressori tumorali. La prima, p16, impedisce la fosforilazione della proteina del retinoblastoma (RB), legandosi al

complesso ciclina-CDK4 e determinando così un blocco del ciclo cellulare. La seconda, p19, stabilizza p53 inibendone la sua degradazione proteolitica e promuovendo così morte apoptotica. La perdita dell'attività di p16 e p19 determina la crescita incontrollata delle cellule, in quanto non sono più attivi sistemi di blocco del ciclo cellulare e apoptosi.

Un altro oncosoppressore che si trova mutato nel 60% degli adenocarcinoma pancreatici è *TP53*. Questa alterazione appare, in genere, in uno stadio avanzato della progressione tumorale e spesso è preceduta dalla perdita di funzione di p19, che causa la diminuzione dei livelli proteici di p53 attraverso degradazione proteosomale [18]; l'alterazione di *TP53* e *p19* coesiste nel 40% dei casi [19]. La perdita funzionale, derivante da mutazioni, generalmente puntiformi, o i diminuiti livelli proteici di p53 meritano particolare attenzione proprio per la funzione chiave di questa proteina, definita "il guardiano dell'integrità genomica". p53, infatti, è in grado di riconoscere i danni alla struttura del DNA e di indurre, prima, l'espressione di geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare per permettere alla cellula stessa di riparare i danni e, poi, se questi danni sono irreparabili, di indurre geni coinvolti nella morte cellulare apoptotica determinando così un vero e proprio suicidio cellulare e impedendo a cellule con l'integrità genomica compromessa di creare danni all'intero organismo [20]. In questi ultimi anni, è stato scoperto anche un ruolo diretto di p53 nell'apoptosi non derivante dalla sua classica attività di fattore di trascrizione. E' stato dimostrato che p53, in risposta a vari segnali di stress, trasloca nel mitocondrio dove promuove la permeabilizzazione della membrana mitocondriale, determinando il rilascio di proteine pro-apoptotiche come il citocromo c, AIF (apoptotic inducing factor) ed l'endonucleasi G [21]. La perdita di p53, quindi, oltre a permettere una crescita incontrollata di cellule con alterazioni genetiche, determina anche una resistenza delle cellule tumorali ai chemioterapici che promuovono danni al DNA.

Oltre a mutazioni di oncogeni e oncosoppressori, nell'adenocarcinoma pancreatico sono presenti alterazioni dell'espressione di fattori di crescita e dei rispettivi recettori, che

promuovono una crescita incontrollata di questo tumore. Esempi di questi circuiti autocrini sono: il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita tumorale (TGF- α), il fattore di crescita legante l'eparina (HB-EGF) con i corrispettivi recettori EGFR [22, 23]; il fattore di crescita simile all'insulina (IGF) con il relativo recettore IGFR; il fattore di crescita fibroblastico (FGF) con i relativi recettori FGFR; il fattore di crescita epatico (HGF) con il relativo recettore Met [24].

2.4 Lo zinco

Lo zinco è il metallo più abbondante nel corpo umano dopo il ferro, sebbene sia presente in tracce: un adulto di 70kg contiene in media 2,3g di zinco. Questo ione ha un ruolo essenziale in un'ampia varietà di processi cellulari, come la proliferazione e il differenziamento cellulare [25]. Infatti, lo zinco ha un ruolo sia come cofattore necessario per il funzionamento di più di 300 enzimi, appartenenti a tutte le sei classi funzionali di enzimi, sia strutturale per la stabilizzazione della struttura terziaria di molte proteine, come i fattori di trascrizione contenenti domini "zinc finger" [26].

A causa del suo ruolo essenziale, gli organismi devono mantenere una determinata concentrazione intracellulare di zinco per supportare la crescita cellulare sia quando il livello fornito dalla dieta è basso sia quando è elevato. Nell'uomo circa l'1% del contenuto totale di zinco nel corpo è rifornito quotidianamente dalla dieta ed è sottoposto a uno stretto controllo dal sistema di assorbimento intestinale e dalla escrezione attraverso le secrezioni pancreatiche e intestinali.

A livello cellulare lo zinco è localizzato per il 30-40% nel nucleo, per il 50% nel citoplasma e negli organelli cellulari e per la restante percentuale è associato alla membrana [27]. L'omeostasi dello zinco è un processo cellulare ben regolato: infatti, l'espressione dei trasportatori di membrana e delle proteine sequestranti zinco varia notevolmente e velocemente a seconda della concentrazione intracellulare dello zinco [28]. Negli eucarioti,

esistono due famiglie di trasportatori di zinco: la ZIP (Zrt-, Irt-like Protein) responsabile dell'ingresso e del trasporto di zinco dall'esterno della cellula al citoplasma e dall'interno di compartimenti intracellulari al citoplasma, la CDF (Cation Diffusion Facilitator) responsabile del trasporto nella direzione opposta, verso l'esterno della cellula e verso l'interno del lume degli organelli [29]. Tra le proteine definite detossificanti c'è la metallotioneina, la cui espressione è ubiquitaria ma è particolarmente abbondante nelle cellule parenchimali dell'intestino, pancreas, rene e fegato. Grazie alla sua sequenza proteica, ricca di cisteine, e alla sua struttura quaternaria la metallotioneina è in grado di legare 7 atomi di zinco, sequestrandoli dall'ambiente circostante, al fine di proteggere la cellula dalla sua azione tossica [30]. Il contenuto di zinco presente nella cellula può essere diviso in un "pool" fisso, che costituisce la maggior parte e si trova associato strettamente alla struttura terziaria delle proteine e un "pool" labile, molto più dinamico soggetto al flusso ionico ed influenzato dalla deprivazione e dalla supplementazione di questo ione. Questo "pool" labile sembra essere importante per la citoprotezione e la regolazione dell'apoptosi [31].

Studi in vitro indicano che la diminuzione di zinco, ottenuta tramite chelanti o tramite la crescita cellulare in terreno privo di zinco, induce apoptosi in varie linee cellulari tramite le classiche caratteristiche apoptotiche come la frammentazione del DNA, l'attivazione delle caspasi, la condensazione cromatidica e la formazione dei corpi apoptotici [32].

Dati contrastanti si trovano in letteratura per quanto riguarda gli effetti provocati da un aumento di zinco intracellulare. Alcuni lavori mostrano che lo zinco è in grado di proteggere la cellula da vari agenti induttori di apoptosi, influenzando lo stato redox cellulare e inibendo il processamento delle caspasi [33], mentre altri indicano che il suo eccesso porta a morte cellulare per apoptosi o necrosi, causando danno mitocondriale e un aumento di stress ossidativo [34, 35].

2.5 Lo stress ossidativo

Le ROS (reactive oxygen species) sono definite come specie chimiche contenenti ossigeno con proprietà chimiche reattive e comprendono radicali liberi, come il superossido (O_2^{\bullet}) e il radicale ossidrilico (OH^{\bullet}), e molecole non radicali, come il perossido d'idrogeno (H_2O_2). Le ROS sono prodotte costantemente da una varietà di processi cellulari, di cui il principale è la fosforilazione ossidativa. I mitocondri, infatti, sono considerati la maggiore fonte di produzione cellulare di ROS: si stima che il 2% di ossigeno consumato reagisce con elettroni che sfuggono dalla catena respiratoria producendo ione superossido, successivamente convertito in perossido d'idrogeno.

Un eccesso di ROS causa uno stress ossidativo che porta all'attivazione dei molti sistemi antiossidanti cellulari (es. superossido dismutasi, catalasi, il sistema del glutatione, tioredossina) al fine di evitare il danneggiamento del DNA, delle proteine e dei lipidi [36].

Negli ultimi anni si è scoperto che le ROS hanno anche un ruolo fisiologico all'interno della cellula attivando proteine come i recettori tirosin-chinasici, le MAP chinasi, fattori di trascrizione. Inoltre, è stato dimostrato che bassi livelli di ROS causano un aumento della progressione del ciclo cellulare, mentre livelli più elevati determinano arresto del ciclo cellulare e successivamente apoptosi o necrosi [37].

Studi ancora più recenti hanno mostrato che le cellule tumorali hanno un livello di ROS più elevato rispetto alle cellule normali, associato alla stimolazione oncogenica, ad alterazioni dell'attività metabolica e a malfunzionamento del mitocondrio. Le conseguenze dell'aumentato stress ossidativo tumorale sono la stimolazione della proliferazione cellulare, l'incremento delle mutazioni e dell'instabilità genetica e l'alterazione della sensibilità cellulare ad agenti anti-tumorali [38].

L'elevato stress ossidativo intrinseco delle cellule tumorali potrebbe essere una caratteristica sfruttabile a livello terapeutico. La figura 1 mostra un modello che spiega l'effetto differente di uno stesso aumento di stress ossidativo nelle cellule tumorali e normali [39]. Nelle cellule tumorali, che hanno un livello basale di ROS più elevato, un ulteriore aumento di stress

ossidativo determinerebbe lo scatenarsi di fenomeni di morte cellulare, mentre nelle cellule normali, aventi un livello basale di ROS più basso, lo stesso incremento porterebbe a un lieve aumento della proliferazione cellulare. L'ulteriore aumento di ROS esaurirebbe le capacità difensive degli enzimi antiossidati nelle cellule tumorali, mentre sarebbe ben tollerata dalle cellule normali in cui questi enzimi funzionano correttamente [39, 40].

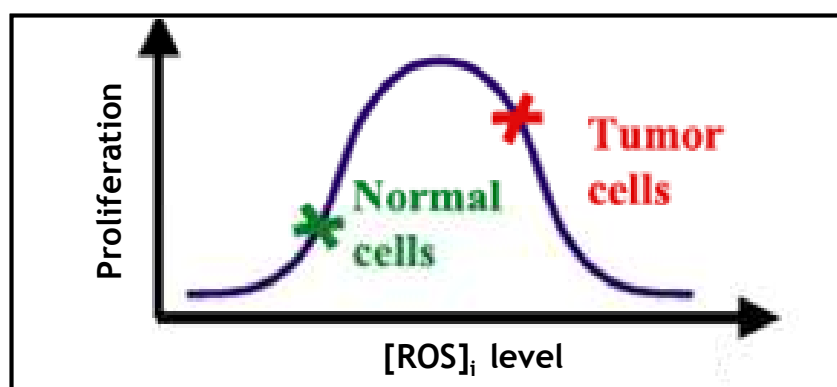


Figura 1. Modello proposto per spiegare l'effetto opposto sulla proliferazione cellulare dell'aumento di stress ossidativo in cellule normali e cellule tumorali.

2.6 PDTC e TPEN

La pirrolidina ditiocarbammato (PDTC) appartiene al gruppo dei ditiocarbammati, che sono composti tiolici di basso peso molecolare con attività chelante verso i metalli. In figura 2, è mostrata la struttura chimica del PDTC, il cui legame con gli ioni bivalenti (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) avviene tra i gruppi tiolici di due molecole di ditiocarbammati [41]. Questi composti sono stati impiegati clinicamente in trattamenti contro funghi patogeni e batteri [42], in avvelenamenti da rame e nichel [43] e in trattamenti sperimentali nell'AIDS [44].

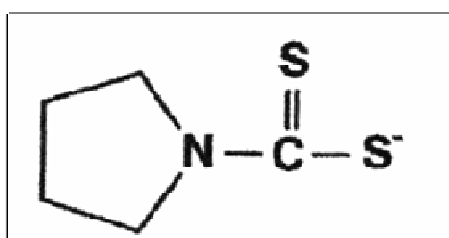


Figura 2. Struttura chimica della pirrolidina ditiocarbammato (PDTC).

Il PDTC è stato inizialmente descritto come agente antiossidante; tuttavia, a causa delle sue proprietà ionofore e della possibilità di essere convertito in acidi sulfenici, esso può agire anche come pro-ossidante. E' stato dimostrato che sia l'attività antiossidante che quella pro-ossidante del PDTC induce apoptosi in alcune linee cellulari tumorali, come nel carcinoma colo-rettale [45] o prostatico [46, 47], ma anche promuove la proliferazione cellulare [48].

L'*N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridilmetil)etilenediammina (TPEN) è un chelante con elevata affinità per lo zinco permeabile alla membrana cellulare. In figura 3 è mostrata la sua struttura chimica.

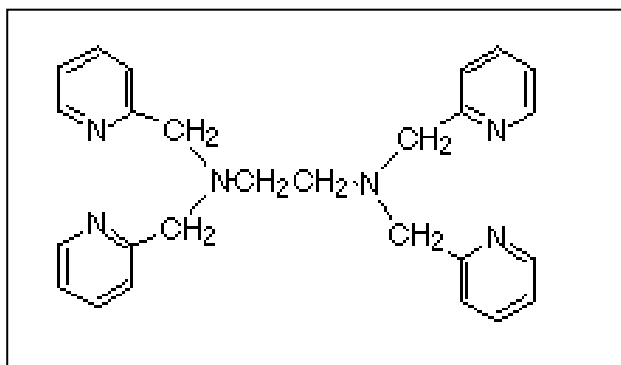


Figura 3. Struttura chimica dell'*N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridilmetil)etilenediammina (TPEN).

Questa molecola è stata impiegata sia *in vitro*, su varie linee cellulari, sia *in vivo*, su ratti o topi, proprio per la sua attività chelante. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il TPEN è in grado direttamente di indurre apoptosi e di aumentare in modo sinergico la risposta cellulare in associazione ad altri induttori di apoptosi [32]. Inoltre, è stato dimostrato che nei modelli murini ha un effetto protettivo contro l'ischemia [49] e contro l'azione letale delle neurotossine A e B del botulino [50].

3. OBIETTIVI

L'adenocarcinoma pancreatico è una neoplasia estremamente aggressiva in cui il tasso di incidenza coincide con il tasso di mortalità e la vita media dei pazienti dal momento della diagnosi è di soltanto pochi mesi. I trattamenti chemioterapici utilizzati correntemente, come la gemcitabina o il 5-fluorouracile, sono resi generalmente inefficaci soprattutto a causa delle frequenti alterazioni molecolari presenti in questo tumore che risulta così resistente al trattamento. Le mutazioni di *TP53* e la conseguente perdita funzionale del corrispondente prodotto proteico riducono sensibilmente la capacità di indurre apoptosi da parte di questi agenti chemioterapici, il cui obiettivo primario è, infatti, il danneggiamento della struttura del DNA in maniera diretta (terminazione di catena durante la replicazione) e in maniera indiretta (inibizione della sintesi dei nucleosidi trifosfato).

L'obiettivo generale di questo lavoro è l'identificazione di molecole il cui meccanismo d'azione sia in grado di indurre morte apoptotica delle cellule tumorali senza necessariamente inibire la sintesi del DNA. La strategia adottata è stata quella di agire sui livelli di zinco intracellulari, i quali sono fortemente regolati all'interno della cellula a causa del ruolo essenziale di questo ione in molteplici processi cellulari. Dati di letteratura sostengono una significativa correlazione tra la presenza di ioni metallici intracellulari, come lo zinco, e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'induzione di stress ossidativo può essere considerata, infatti, una strategia mirata ad indurre morte nelle cellule tumorali, senza determinare elevati effetti collaterali. Questo viene spiegato dal concetto, generalmente accettato, che un ulteriore aumento di stress ossidativo nelle cellule tumorali, aventi un livello basale di ROS più elevato, determinerebbe lo scatenarsi di fenomeni di morte cellulare che non avverrebbero nelle cellule normali protette da efficienti meccanismi di difesa antiossidanti.

Lo scopo specifico di questa tesi è stato quello di studiare gli effetti dell'alterazione dei livelli di zinco intracellulare utilizzando due molecole con opposta funzione: la pirrolidina ditiocarbammato (PDTC) con attività ionofora per aumentare la quantità di zinco intracellulare e l'*N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridilmetil)etilenediammina (TPEN) con attività chelante per diminuire la quantità di questo ione. L'obiettivo primario era verificare che queste molecole fossero in grado di inibire efficacemente la proliferazione di linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico e, in seguito, caratterizzare i loro meccanismi d'azione. Obiettivi ulteriori sono stati quelli di comparare l'efficacia di queste molecole ad altri composti con azione antitumorale e infine di testarne l'effetto citotossico anche su cellule normali di fibroblasti primari.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Reagenti chimici

Il ditiocarbammato di pirrolidina (PDTC), l'*N*-acetil-*L*-cisteine (NAC) (Sigma) e la gemcitabina (GEM; Gemzar, Lilly) sono solubilizzati in acqua sterile al momento dell'uso. Il solfato di zinco (ZnSO₄) e l'actinomicina D (Sigma) sono sciolti in acqua sterile e conservati a 4°C e a -20°C, rispettivamente. La tricostatina A (TSA), l'*N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridilmetil)etilenediammina (TPEN) (Sigma) sono solubilizzati in etanolo assoluto e conservati a -80°C fino all'uso. Gli inibitori PD98059, JNK Inhibitor II, SB203580 (Calbiochem) e Z-VAD-FMK (Biomol) sono sciolti in DMSO e conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

4.2 Colture cellulari

Sono state utilizzate le seguenti linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico: PaCa44, T3M4, Panc1, CFPAC1, HPAF II, PSN1 e PaCa3 (vedi [51] per la caratterizzazione genetica e l'origine del tessuto), e colture primarie di fibroblasti umani (Promocell). Tutte le linee cellulari crescono in adesione a 37°C con 5% CO₂. Le cellule di adenocarcinoma pancreatico crescono nel terreno di coltura RPMI 1640, i fibroblasti nel terreno DMEM; entrambi i mezzi di coltura sono addizionati con 20mM di glutammina, 10% di siero bovino fetale (FBS) e 50 µg/ml di gentamicina solfato (BioWhittaker).

4.3 Saggio di proliferazione cellulare (Cristal Violetto)

Le cellule (4 x 10³ cellule/pozzetto) sono piastrate in piastre da 96 pozzetti e dopo 24 h vengono trattate con i composti presi in esame per il tempo indicato nelle legende delle figure. In seguito, le cellule non più vitali, e quindi staccate, vengono eliminate insieme al

terreno mentre le cellule vitali, rimaste in adesione, vengono colorate con il Cristal Violetto (Sigma). Il colorante, che si lega al DNA, viene poi solubilizzato tramite PBS contenente 1% SDS. L'assorbanza (A_{595nm}) misurata è direttamente proporzionale alla proliferazione cellulare rapportata ai rispettivi controlli.

Il saggio con il Cristal Violetto è stato impiegato anche per gli esperimenti di silenziamento del gene di p21. La sequenza dell'oligonucleotide antisenso è 5'-TCCCCAGCCGGTTCTGACAT-3' (p21 AS), mentre quella dell'oligonucleotide senso, utilizzato come controllo, è 5'-ATGTCAGAACCGGCTGGGGA-3' (p21 S). Entrambi gli oligonucleotidi sono stati acquistati dalla ditta Invitrogen.

4.4 Analisi del ciclo cellulare

Le cellule (2×10^5) vengono lavate con PBS e incubate nella seguente soluzione: 0.1% citrato di sodio diidrato, 0.1% Triton X-100, 200 μ g/ml RNasi A, 50 μ g/ml ioduro di propidio (Roche Molecular Biochemicals). Quest'ultimo si intercala al DNA ed emette un segnale fluorescente proporzionale alla quantità di DNA presente nella cellula. Successivamente, viene effettuata l'analisi tramite citometro di flusso (FACScalibur, Becton Dickinson) e viene determinata la percentuale delle cellule nelle varie fasi del ciclo tramite il programma di software ModFitLT.

4.5 Apoptosi

Le cellule (2×10^5) vengono solubilizzate nel tampone di legame [10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 140 mM NaOH, and 2.5 mM $CaCl_2$] e successivamente colorate con annexina V-FITC (BD PharMingen) e 5 mg/ml ioduro di propidio per 10 min al buio. I campioni vengono analizzati tramite citometro di flusso (FACScalibur, Becton Dickinson) entro 1 ora. Viene così identificata la percentuale di cellule in apoptosi precoce (annexina V^+ /propidio iodruro $^-$) e quella in apoptosi tardiva (annexina V^+ /propidio iodruro $^+$).

Le attività delle caspasi-3 e -8 sono saggiate valutando il taglio dei rispettivi substrati fluorigenici, Ac-DEVD-AMC e Ac-IETD-AMC (Biomol). Dopo i trattamenti le cellule vengono lavate con PBS e lisate con un apposito tampone (100 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20mM CHAPS, 10% saccarosio). Successivamente, l'estratto proteico totale si ottiene con dei cicli di congelamento-scongelo e una centrifugazione a 14,000 x g per 10 min. Dal sovranatante si preleva un volume corrispondente a 100 µg di proteine, che vengono incubate con 10 µg dei substrati peptidici fluorigenici in un volume finale di 800 µl. Dopo un'incubazione a 30°C per 10 min (per la caspasi-3) o 20 min (per la caspasi-8), il rilascio di 7-amino-4-metilcumarina, che è proporzionale all'attività della caspasi analizzata, viene misurato con un fluorimetro utilizzando lunghezze d'onda di 380 nm (per l'eccitazione) e 460 nm (per l'emissione).

4.6 Analisi del contenuto di zinco intracellulare

Le cellule (2×10^5) vengono incubate a 37°C per 30 min con 2 µM di FluoZin-3 (Molecular Probes), una sonda che lega lo zinco. Il terreno di coltura viene poi sostituito con terreno non contenente la sonda per evitare segnali aspecifici e si lascia in incubazione per 10 min a 37°C. Il FluoZin-3 è in forma esterificata e, come tale, è permeabile alle membrane. All'interno della cellula, esso resta intrappolato in seguito a de-esterificazione e, se lega lo zinco, diventa fluorescente (lunghezza d'onda di eccitazione di 494 nm e di emissione di 516 nm). Alla fine del trattamento, le cellule vengono tripsinizzate, lavate in PBS e la fluorescenza emessa viene misurata tramite citometro di flusso (FACScalibur, Becton Dickinson).

4.7 Analisi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Le cellule (2×10^5) vengono incubate per 15 min a 37°C con 10 µM di 2',7'-diclorofluorescina (DCF, Sigma). Questa sonda, permeabile alle membrane, diventa

fluorescente solo dopo aver reagito con le specie reattive dell'ossigeno (ROS) presenti nella cellula. Le cellule vengono poi lavate in PBS e la fluorescenza emessa viene misurata tramite citometro di flusso (FACScalibur, Becton Dickinson).

4.8 Analisi del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$)

Le cellule (2×10^5) vengono incubate a 37°C per 20 min con 40 nM 3,3-dihexyloxacarbocianina (Molecular Probes). Le cellule vengono poi lavate in PBS e analizzate tramite citometro di flusso (FACScalibur, Becton Dickinson). La percentuale di cellule che mostrano una diminuzione nell'intensità di fluorescenza del fluoroforo corrisponde alla percentuale di cellule con un minor potenziale di membrana mitocondriale.

4.9 Trasfezioni transienti del plasmide contenente il promotore di P21

Le cellule sono seminate in piastre da coltura da 6 pozzetti alla densità di 2.5×10^5 cellule/pozzetto. Il giorno successivo, le cellule sono trasfettate utilizzando liposomi denominati FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) con 0.2 µg/pozzetto di un plasmide contenente 2400 pb del promotore di p21 (-2400p21) inserite a monte del gene reporter luc (luciferasi) nel vettore pGL3-Basic (Promega). Dopo 24 ore dalla trasfezione, il terreno di coltura è cambiato con terreno fresco senza o con PDTC o TSA; dopo altre 24 ore, la stessa quantità di lisato cellulare è utilizzata per saggiare l'attività dell'enzima luciferasi, con il metodo Luciferase Assay System (Promega). I dati presentati corrispondono ad almeno tre esperimenti indipendenti, e le volte di induzione rappresentano il rapporto tra l'attività della luciferasi in cellule trattate e in cellule non trattate.

4.10 Estrazione dell'RNA e analisi di RT-PCR semiquantitativa

L'RNA totale cellulare è estratto da 5×10^6 cellule utilizzando il metodo del TRIzol Reagent (Invitrogen). Per gli esperimenti di RT-PCR, 1 μ g di RNA è retrotrascritto utilizzando il metodo First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen).

Nell'analisi di RT-PCR semiquantitativa, per ogni campione, un decimo della miscela di cDNA è usata come stampo per le amplificazioni di PCR utilizzando le coppie di primer specifici riportate in Tabella 1. Il gene della β -actina è utilizzato come controllo di gene costitutivo. Alla fine della reazione di amplificazione, i prodotti di PCR di ogni campione sono separati elettroforeticamente mediante gel di agarosio all'1.5% contenente bromuro d'etidio. I gel sono fotografati e l'immagine è acquisita su computer. La quantificazione delle aree delle bande è calcolata in unità arbitrarie utilizzando il programma NIH Image (sviluppato nel National Institutes of Health e disponibile gratuitamente su Internet all'indirizzo <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

Tabella 1. Sequenze dei primer e descrizione dei cicli termici utilizzati in RT-PCR.

mRNA	Oligonucleotidi (5'-3')	Cicli termici
<i>CYCLIN B1</i> (S) (AS)	AAGAGCTTTAAACTTTGGTCTGGG CTTTGTAAGTCCTTGATTTACCATG	94°C(30 s) – 55°C(30 s) – 72°C(30 s); 30cycles
<i>CYCLIN A</i> (S) (AS)	GCCTGCGTTCACCATTCATG CCAGTCCACGAGGATAGCTC	94°C(30 s) – 55°C(30 s) – 72°C(30 s); 30cycles
<i>BAK</i> (S) (AS)	TGAAAAATGGCTTCGGGGCAAGGC TCATGATTTGAAGAATCTTCGTACC	94°C(30 s) – 55°C(30 s) – 72°C(30 s); 30 cycles
<i>BAX</i> (S) (AS)	ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC	94°C(30 s) – 55°C(30 s) – 72°C(30 s); 30 cycles
<i>BCL-2</i> (S) (AS)	TGCACCTGACGCCCTTCAC AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG	94°C(30 s) – 55°C(30 s) – 72°C(30 s); 30 cycles
<i>BCL-XL-S</i> (S) (AS)	CGGGCATTTCAGTGACCTGAC TCAGGAACCAGCGGTTGAAG	94°C(30 s) – 50°C(30 s) – 72°C(30 s); 35 cycles
<i>BCL-W</i> (S) (AS)	AAGCTGAGGCAGAAGGGTTA CCCAAAGACAAAGAAGGCTA	94°C(30 s) – 60°C(30 s) – 72°C(30 s); 28 cycles
<i>GPX</i> (S) (AS)	CCAGTTTGGGCATCAGGAG CGATGTCAATGGTCTGGAAG	94 °C(30 s) - 58 °C(30 s) - 72 °C(30 s); 30 cycles
<i>NOXA</i> (S) (AS)	TGTCCGAGGTGCTCCAGTTG TGCACCTTCACATTCCTCTC	94°C(30 s) – 55°C(30 s) – 72°C(30 s); 30 cycles

<i>P19</i> (S) (AS)	CTCAACCGCTTCGGCAAGAC CCTGAAGCAACGTGCACACT	94°C(30 s) – 55°C(30 s) – 72°C(30 s); 30 cycles
<i>P21</i> (S) (AS)	GCGCTAATGGCGGGCTGCAT GCCGGCGTTTGGAGTGGTAG	94°C(60 s) – 53°C(60 s) – 72°C(60 s); 25 cycles
<i>P53</i> (S) (AS)	CTGTGACTTGCACGTACTCC CCATGCAGGAACTGTTACAC	94°C(30 s) – 55°C(30 s) – 72°C(30 s); 30 cycles
<i>P57</i> (S) (AS)	TCGCTGCCCCGCGTTTGC CCGAGTCGCTGTCCACTTCGG	94°C(30 s) – 60°C(30 s) – 72°C(30 s); 30 cycles
<i>SESNI</i> (S) (AS)	CGACCAGGACGAGGAACTT CCAATGTAGTGACGATAATGTAGG	94 °C(30 s) - 58 °C(30 s) - 72 °C(30 s); 30 cycles
<i>SESNI2</i> (S) (AS)	TCCGCCACTCAGAGAAGGTC GTTCAGGAAGGCCACAACAC	94 °C(30 s) - 58 °C(30 s) - 72 °C(30 s); 30 cycles
<i>β-ACTIN</i> (S) (AS)	ACCAACTGGGACGACATGGAGAA GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC	94°C(60 s) – 55°C(60 s) – 72°C(60 s); 25 cycles

4.11 Estrazione delle proteine e analisi di Western blot

Le cellule sono lavate con PBS, raccolte e risospese nello specifico tampone di lisi cellulare: 20 mM Hepes pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, and 1x cocktail di inibitori di proteasi (Roche). Dopo tre cicli di congelamento-scongelo, i lisati cellulari sono centrifugati a 14000 x g per 10 minuti a 4°C e il sovrantante è usato per il Western blot. La concentrazione proteica è misurata utilizzando il Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce) e come “standard” l’albumina di siero bovino (BSA). 50 µg di estratto proteico cellulare sono fatti migrare in gel di poliacrilammide al 12% e poi trasferiti in membrane di polivinilidenedifluoruro (PVDF) (Millipore). Le membrane sono incubate a 4°C per la notte con una soluzione di bloccaggio (5% latte in TBST; TBST: 100 mM Tris pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20) e, il giorno successivo, sono incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi monoclonali anti-p21 (Upstate Biotechnology), anti-ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-P-ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology), anti-fosfo(ser15)p53 (Cell Signaling Technology) o anti-α-tubulina (Upstate Biotechnology). Gli anticorpi secondari (anti-mouse o anti-rabbit) sono coniugati con la perossidasi (HRP) e sono stati acquistati da Upstate

Biotechnology. L'identificazione delle proteine specifiche è effettuata utilizzando substrati chemiluminescenti (Pierce) e impressionando lastre Hyperfilm ECL (Amersham).

4.12 Immunocitochimica

Le cellule ($3-5 \times 10^5$) vengono fatte crescere adese a vetrini copri-oggetto. Dopo i trattamenti, le cellule vengono lavate con PBS e fissate incubando per 30 min a temperatura ambiente con una soluzione contenente 4% di paraformaldeide in PBS. Le cellule vengono poi permeabilizzate con acetone a -20°C per 3 min. Dopo due lavaggi in PBS, i vetrini sono incubati per 10 min con una soluzione bloccante (5% BSA in PBS) e di seguito per 1 ora con l'anticorpo anti-AIF (Chemicon International) diluito 1:100 nella soluzione bloccante. Dopo tre lavaggi, le cellule vengono incubate per 1 ora al buio con l'anticorpo secondario anti-rabbit fluorescente nel verde (Alexa Fluor 488, acquistato dalla ditta Invitrogen) (1:200 nella soluzione bloccante). Per valutare la morfologia del nucleo, le cellule sono incubate per 8 min al buio con 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) ($1\mu\text{g/ml}$) (Invitrogen). Infine, dopo tre lavaggi, i vetrini sono montati con 100% glycerol ed esaminati tramite un microscopio a fluorescenza Canon (40X). Per visualizzare la fluorescenza emessa dall'anticorpo secondario associato ad AIF si sono usate lunghezze d'onda corrispondenti a 488/520 nm, mentre per il DAPI lunghezze d'onda di 350/460 nm.

4.13 Xenograft in topi nudi

5×10^6 cellule PaCa44 sono iniettate sottocute in femmine di topi nudi di 4 settimane (Charles River Laboratories). Dopo una settimana dall'iniezione delle cellule, si formano, casualmente, gruppi da cinque topi ciascuno. Ogni gruppo, per 4 settimane, riceve uno tra i trattamenti predefiniti con i dosaggi e la frequenza di trattamento descritti. Bisettimanalmente è inoltre registrato il peso corporeo degli animali ed è stimata la massa tumorale utilizzando

un apposito calibro. I topi sono sacrificati alla fine delle 2 settimane di trattamento e le masse tumorali sono estratte, pesate e immediatamente congelate in azoto liquido per eventuali studi futuri. Il test statistico t di Student è utilizzato per paragonare i pesi dei tumori estratti da ogni topo ed è considerato statisticamente significativo il valore di $P < 0.05$.

5. RISULTATI

5.1 Caratterizzazione degli effetti dell'aumento di zinco intracellulare sulla crescita di linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico umano e di fibroblasti primari

5.1.A. Inibizione della crescita cellulare dopo trattamento delle cellule con zinco

Al fine di studiare l'effetto antiproliferativo dello zinco sull'adenocarcinoma pancreatico, quattro linee cellulari tumorali (PaCa44, CFPAC1, Panc1 e T3M4) e fibroblasti umani primari sono stati trattati con dosi crescenti di zinco per 24 ore. La figura 4 mostra che a 0.5mM lo zinco è in grado di determinare una forte inibizione della crescita di tutte le linee cellulari tumorali, mentre ha un effetto minore sui fibroblasti. La vitalità cellulare di tutte le linee analizzate aumenta a concentrazioni più elevate di zinco (10mM), suggerendo l'attivazione di meccanismi di resistenza al trattamento, come, per esempio, l'induzione di geni codificanti trasportatori per lo ione zinco in grado di ridurre le concentrazioni intracellulari.

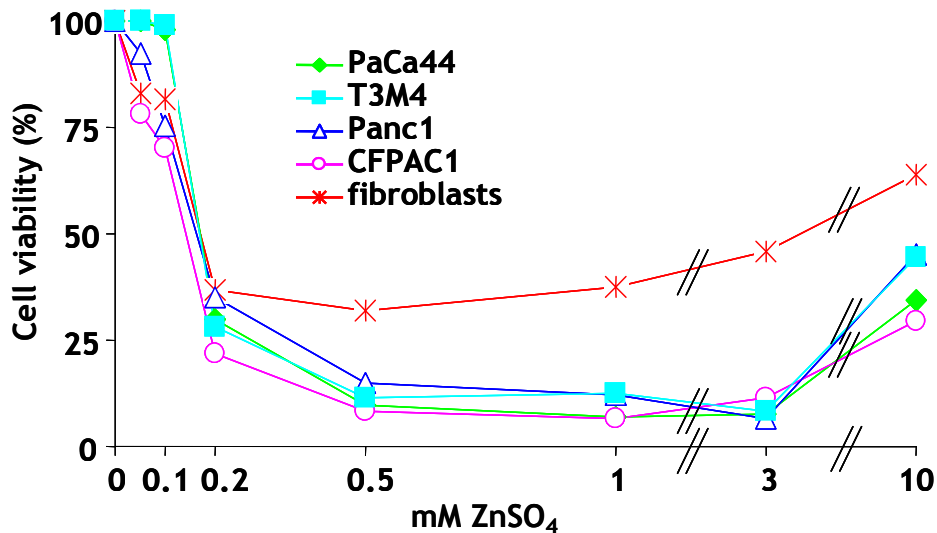


Figura 4. Lo zinco inibisce la crescita cellulare di quattro linee di adenocarcinoma pancreatico, mentre è meno efficiente nell'inibizione dei fibroblasti. Le cellule sono state trattate per 24 ore con ZnSO₄ alle concentrazioni indicate. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi) ed i valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

5.1.B. Inibizione della crescita cellulare dopo trattamento delle cellule con PDTC

Per valutare la possibilità di sfruttare l'attività ionofora del PDTC per inibire la crescita cellulare, è stata misurata la concentrazione di zinco a livello intracellulare su una linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico (PaCa44) e sui fibroblasti primari, trattati con PDTC (250 μ M) in assenza o in presenza di una dose non tossica di zinco (10 μ M). La figura 5 mostra che, in entrambe le linee, si verifica un aumento della concentrazione di zinco intracellulare ad opera del solo PDTC, probabilmente sfruttando tracce dello ione presenti nel siero; l'aumento è più marcato con l'aggiunta di zinco esogeno. Inoltre, è possibile notare la differenza di zinco intracellulare tra i due tipi cellulari: il livello basale nei fibroblasti è 8 volte inferiore a quello delle PaCa44 e il livello massimo di zinco intracellulare, ottenuto con PDTC e zinco, nei fibroblasti è paragonabile a quello basale delle PaCa44.

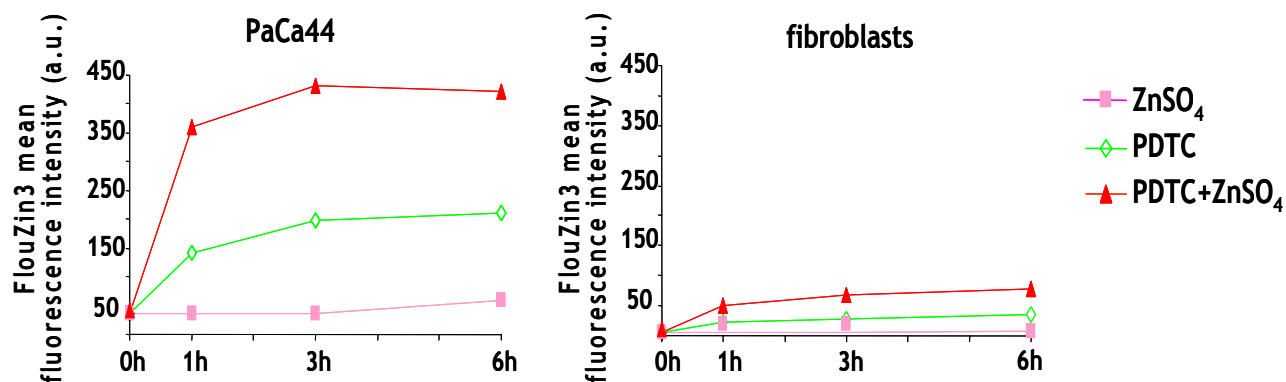


Figura 5. Il PDTC aumenta la concentrazione di zinco intracellulare. Le PaCa44 e i fibroblasti sono stati trattati per il tempo indicato con 10 μ M ZnSO₄ (■), 250 μ M PDTC (◇), o la loro associazione (▲). L'intensità della fluorescenza del FlouZin3, corrispondente ai livelli di zinco intracellulare, è stata misurata tramite citofluorimetria ed espressa in unità arbitrarie (a.u.), come descritto nei Materiali e Metodi. I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

Per verificare se il PDTC avesse sulle cellule tumorali un effetto antiproliferativo, le quattro linee tumorali e i fibroblasti sono stati trattati con dosi crescenti dello ionoforo per 24 ore. Il

PDTC inibisce, di circa il 50%, la crescita solo delle linee tumorali e non dei fibroblasti (Figura 6A).

Lo studio successivo è poi proseguito sulle PaCa44, prese come modello per l'adenocarcinoma pancreatico, e sui fibroblasti.

Per valutare se l'effetto antiproliferativo del PDTC fosse legato alla sua capacità di aumentare lo zinco intracellulare, le cellule PaCa44 sono state trattate con dosi non tossiche di TPEN, un chelante dello zinco, in associazione al PDTC. La figura 6B mostra che il TPEN è in grado di ridurre significativamente l'inibizione di crescita indotta dal PDTC, confermando che essa dipende dalla attività ionofora per lo zinco del PDTC.

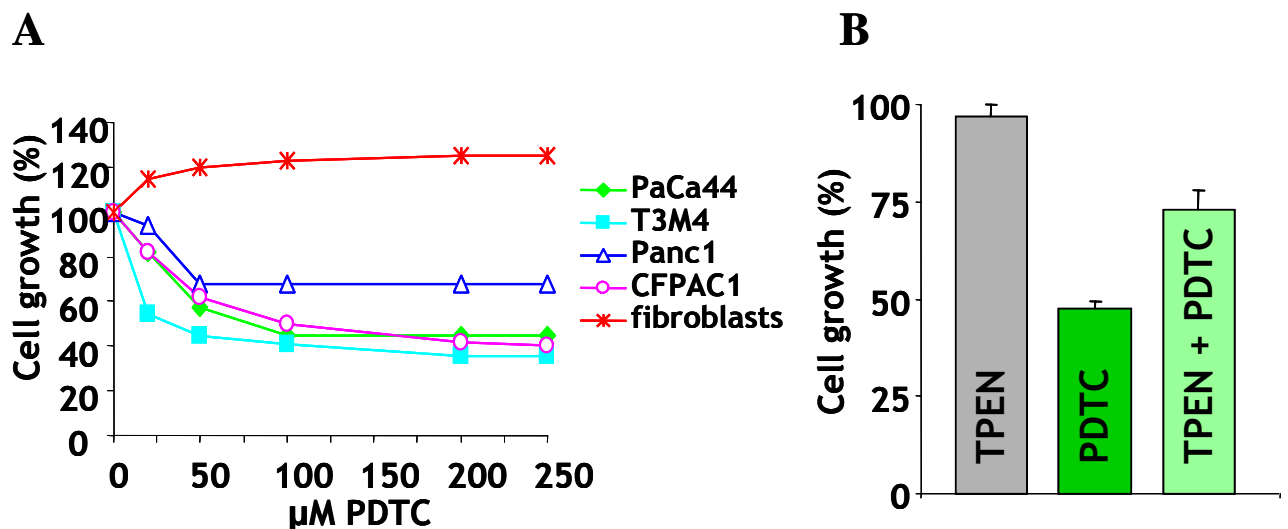


Figura 6. A) PDTC inibisce la crescita di quattro linee di adenocarcinoma pancreatico, ma non dei fibroblasti. Le cellule sono state trattate per 24 ore con PDTC alle concentrazioni indicate. B) L'inibizione di crescita cellulare da parte del PDTC dipende dalla sua attività ionofora. Le PaCa44 sono state trattate per 24 ore con 250μM di PDTC e/o 2,5 μM di TPEN. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi). I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

Le PaCa44 sono state analizzate tramite citofluorimetria per valutare la distribuzione del ciclo cellulare e l'apoptosi dopo il trattamento con PDTC. La figura 7 mostra che, rispetto a cellule non trattate, il PDTC determina un aumento del 20% delle cellule in fase S e una corrispondente diminuzione nella fase G1. Il trattamento con PDTC non determina, invece, morte per apoptosi (figura 18).

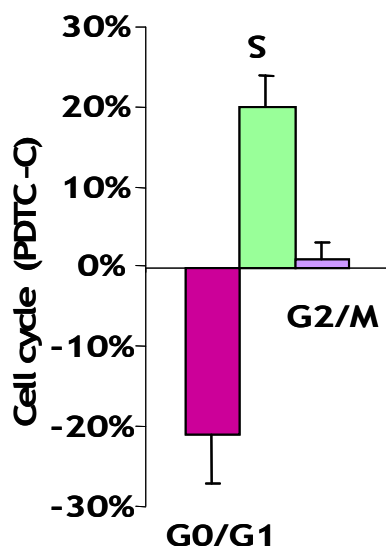


Figura 7. Il PDTC determina un arresto del ciclo cellulare in fase S. Le PaCa44 sono state trattate con 250 μ M di PDTC per 24 ore. I valori mostrati rappresentano la differenza tra cellule trattate e non trattate e sono la media di tre esperimenti indipendenti. Le indicazioni sull'analisi della distribuzione del ciclo cellulare sono riportate nei Materiali e Metodi.

5.1.B1. La produzione di ROS e la conseguente fosforilazione di ERK1/2 sono la causa dell'azione citostatica del PDTC

Per studiare i meccanismi molecolari di azione del PDTC, sono stati valutati i livelli di ROS dopo trattamento con PDTC sia nelle PaCa44 che nei fibroblasti. La figura 8A mostra che, solo nelle PaCa44, il PDTC è in grado di determinare stress ossidativo, aumentando di circa 2 volte i livelli di ROS intracellulari. Lo stress ossidativo prodotto dal PDTC ha un ruolo importante nella sua azione citostatica, infatti, l'utilizzo dell'antiossidante NAC, che riporta i livelli di ROS paragonabili a quelli basali, è in grado di ridurre significativamente l'inibizione di crescita a ciascuna dose di PDTC testata (la figura 8B mostra che l'azione del NAC determina un aumento di circa il 20% di vitalità cellulare in cellule trattate con la dose massima di PDTC).

È noto che il PDTC, in altri sistemi cellulari come nel muscolo liscio e nelle cellule di cancro della prostata [52, 53], è in grado di ritardare il ciclo cellulare tramite l'attivazione di MAP chinasi. Per verificare se le vie di traduzione del segnale delle MAP chinasi JNK, p38 ed ERK1/2, fossero coinvolte nell'inibizione della crescita delle linee cellulari di

adenocarcinoma pancreatico da parte del PDTC, sono stati testati sulle PaCa44 gli inibitori delle tre chinasi. Solamente il PD98059, un inibitore di MEK/ERK1/2 è in grado di aumentare la vitalità di cellule trattate con PDTC (Figura 8B). L'aggiunta del NAC al PD98059 non incrementa ulteriormente la vitalità cellulare, suggerendo che le ROS possano essere responsabili dell'attivazione di ERK1/2. Sulla base di questa indicazione è stata fatta un'analisi di Western blot della forma fosforilata e non-fosforilata di ERK1/2. La figura 8C mostra che nelle PaCa44 il PDTC è in grado di fosforilare notevolmente ERK1/2 e che questa fosforilazione dipende dalla produzione di ROS da parte del PDTC, in quanto l'aggiunta di NAC è in grado di annullare questa modificazione post-traduzionale.

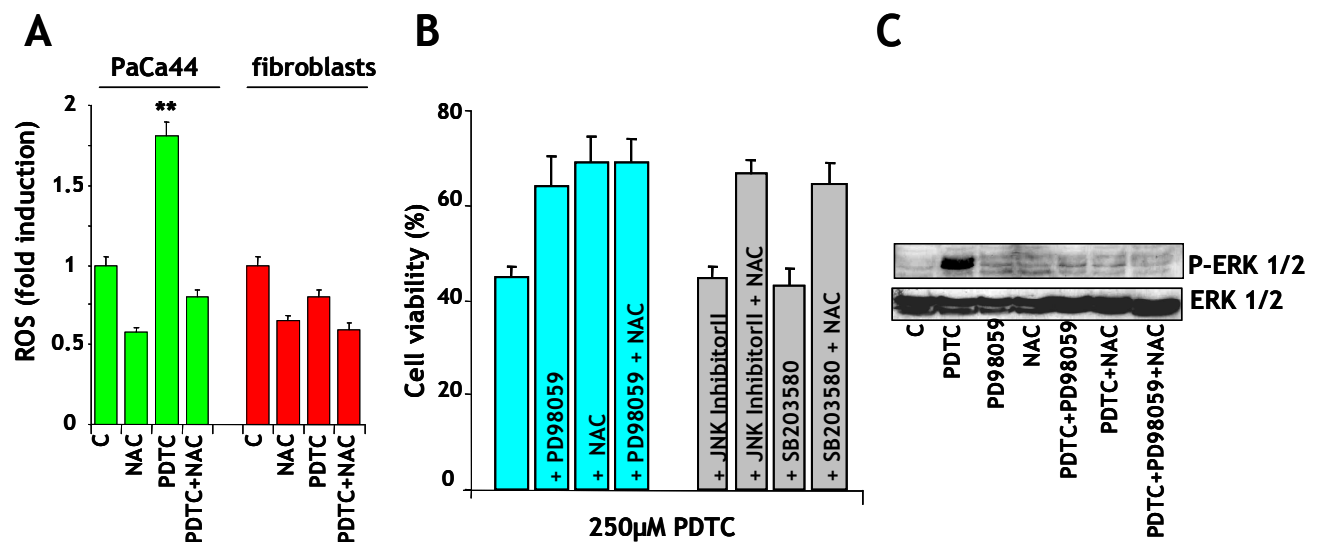


Figura 8. A) Il PDTC aumenta la produzione di ROS nelle PaCa44, ma non nei fibroblasti. Le cellule sono state trattate con 250µM di PDTC e/o 10mM di NAC per 6 ore. L'intensità della fluorescenza di 2',7'-diclorofluorescina (DCF) corrisponde ai livelli di ROS intracellulari, come descritto nei Materiali e Metodi. ** $p < 0.01$. B) Sia il PD98059 che il NAC riducono l'inibizione di crescita da parte del PDTC. Le PaCa44 sono state trattate con 250µM di PDTC in assenza e presenza di 50µM di PD98059 (inibitore di MEK/ERK), 3µM di JNK inhibitor II (inibitore di JNK), 30µM di SB203580 (inibitore di p38) e/o 10mM di NAC per 24 ore. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi). I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti. C) Il PDTC, tramite l'aumento di ROS, induce la fosforilazione di ERK1/2. Le PaCa44 sono state trattate per 1 ora con 250µM di PDTC in assenza o presenza di 50µM di PD98059 e/o 10mM di NAC. L'analisi Western blot è stata eseguita su un estratto proteico totale con anticorpi anti-P-ERK1/2 e anti-ERK1/2. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo.

5.1.B2. Il PDTC induce l'espressione di P21 nelle cellule PaCa44

Per studiare se *P21* fosse coinvolto nell'arresto del ciclo cellulare, è stata impiegata un'analisi di RT-PCR sull'RNA totale estratto da PaCa44 e fibroblasti in seguito al trattamento con PDTC.

La figura 9A mostra che *P21* è fortemente indotto dal PDTC solo nelle PaCa44, mentre rimane invariato nei fibroblasti. La figura 9B mostra un Western blot di p21, ottenuto dopo l'induzione con PDTC nelle PaCa44, in linea con l'analisi di RT-PCR.

Per valutare il ruolo funzionale di p21 nell'inibizione della crescita cellulare da parte del PDTC, si è utilizzato un opportuno oligonucleotide antisense fosforotioato (p21AS) che inibisce l'espressione di *P21*. Il saggio di proliferazione cellulare ha mostrato che p21AS, utilizzato assieme a PDTC, è in grado di aumentare notevolmente la vitalità delle PaCa44, se paragonata a quella ottenuta con il PDTC da solo. In questo saggio si è impiegato come controllo negativo un oligonucleotide senso (p21 S), che, in associazione al PDTC, non altera l'inibizione di crescita ottenuta con il solo PDTC (Figura 9C).

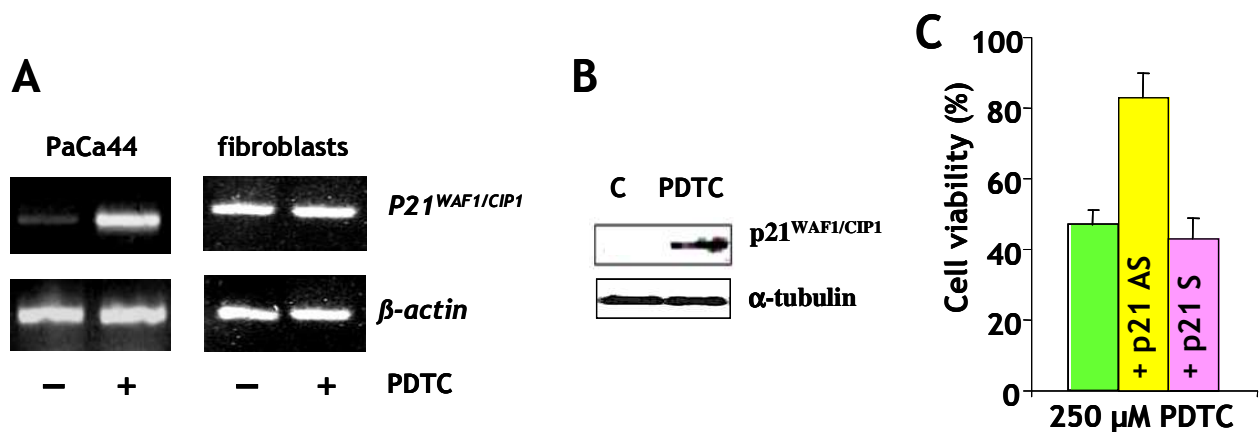


Figura 9. A) Il PDTC induce l'mRNA di *P21* nelle PaCa44. Le PaCa44 e i fibroblasti sono stati trattati per 8 ore con 250 μ M di PDTC. Sull'RNA totale è stata eseguita un'analisi di RT-PCR. Le sequenze dei primer e le condizioni di PCR sono descritte nei Materiali e Metodi. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo. B) Il PDTC induce l'espressione della proteina p21 nelle PaCa44. Le PaCa44 sono state trattate per 18 ore con 250 μ M PDTC. L'analisi di Western blot è stata eseguita su un estratto proteico totale con anticorpi anti-p21 e anti- α -tubulina. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo. C) L'oligonucleotide antisense di *P21* riduce l'inibizione di crescita da parte del PDTC. Le PaCa44 sono state trattate per 24 ore con 0,2 μ M di oligonucleotide antisense di *P21* (p21AS) o di oligonucleotide senso di *P21* (p21S) in presenza di 250 μ M di PDTC. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e

Metodi). I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti. I singoli trattamenti con p21AS e p21S non interferiscono con la crescita (dati non mostrati).

Ipotizzando che il meccanismo molecolare alla base dell'induzione di *P21* fosse l'attivazione del gene da parte di PDTC, si è utilizzata una tecnica di trasfezione transiente delle PaCa44 con un plasmide contenente il promotore "wild-type" di *P21* fuso al gene reporter della luciferasi. Dopo un trattamento di 8 ore con PDTC, l'attività della luciferasi è risultata paragonabile a quella delle cellule non trattate (Figura 10A). Come controllo della qualità della tecnica, si è riportato in figura l'aumento dell'attività della luciferasi indotta da TSA, un noto induttore della trascrizione di *P21*.

Poichè l'induzione di *P21* da parte di PDTC non dipende dall'aumento della trascrizione del gene, si è valutato se sia dovuta ad un aumento della stabilità del suo RNA messaggero. Per verificare ciò si è usata l'actinomicina D, un noto inibitore della trascrizione genica, in un'analisi di RT-PCR. La figura 10B e C mostra che il PDTC è in grado di indurre *P21* anche in presenza dell'actinomicina D e che, inoltre, il rapporto di espressione di *P21* tra cellule non trattate e trattate con actinomicina D è paragonabile a quello ottenuto in presenza di PDTC. Questi dati suggeriscono fortemente che il PDTC aumenta i livelli di mRNA di *P21*, prolungandone la stabilità.

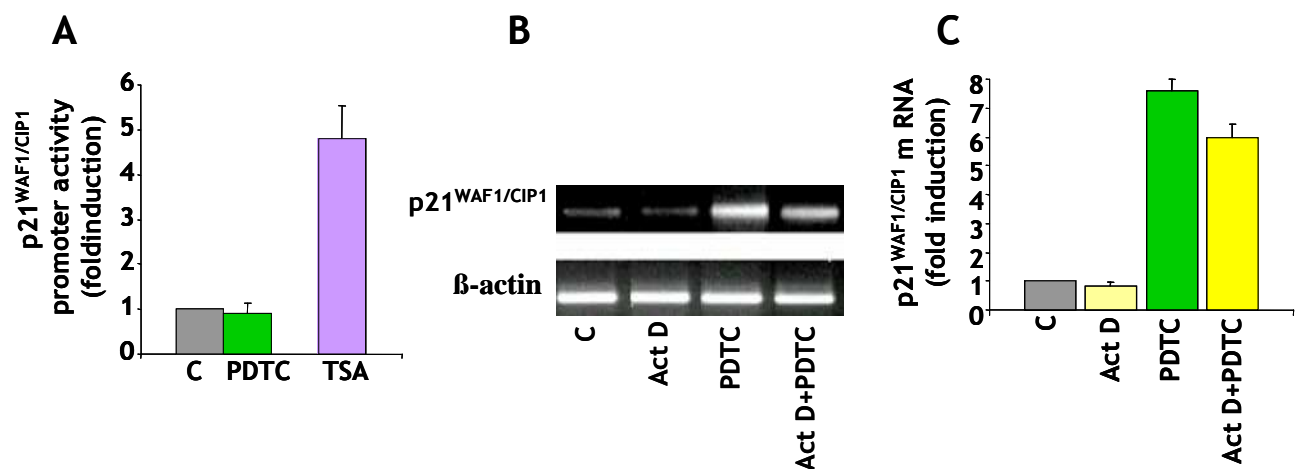


Figura 10. A) PDTC non determina un'induzione del promotore di *P21*. Dopo trasfezione transiente con il plasmide reporter contenente il promotore di *P21*, le PaCa44 sono state trattate con PDTC o TSA per 8 ore. Il grafico mostra la media dei valori di tre esperimenti indipendenti. Il plasmide utilizzato è descritto nei Materiali e Metodi. B) PDTC aumenta la

stabilità dell'mRNA di *P21*. Le PaCa44 sono state pre-trattate per 1h con actinomicina D e successivamente trattate con PDTC per 8 ore. Sull'RNA totale è stata eseguita un'analisi di RT-PCR. Le sequenze dei primer e le condizioni di PCR sono descritte nei Materiali e metodi. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo. C) Analisi densitometrica delle bande di *P21* normalizzate su β -actina. I valori sono la media di tre esperimenti indipendenti.

Per verificare se nella stabilizzazione del messaggero di *P21* fosse coinvolto l'aumento di ROS e quindi l'attivazione di ERK1/2, si è utilizzata nuovamente una RT-PCR su PaCa44 trattate con NAC e PD98059 in associazione al PDTC. La figura 11 mostra che questi composti sono in grado di ridurre significativamente l'induzione di *P21* da parte del PDTC, e che la loro associazione non aumenta ulteriormente questo effetto.

Questi risultati, in linea con quelli della figura 8, dimostrano che le ROS e ERK1/2 sono coinvolte nell'induzione di *P21* da parte di PDTC e che entrambi i segnali si trovano sulla stessa via di traduzione del segnale. Come atteso, il trattamento con gli inibitori di JNK e p38 non riducono l'induzione di *P21* da parte di PDTC (dati non mostrati).

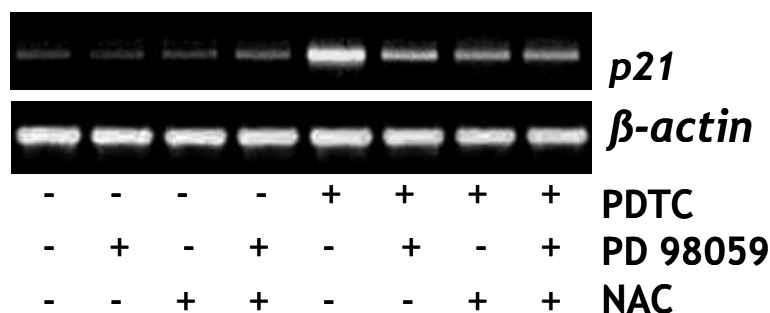


Figura 11. NAC e PD98059 riducono l'induzione dell'mRNA di *P21* da parte di PDTC. Le PaCa44 sono state pre-trattate per 1 ora con NAC (10mM) e PD98059 (50 μ M) e successivamente trattate con PDTC (250 μ M) per 8 ore. Sull'RNA totale è stata eseguita un'analisi di RT-PCR. Le sequenze dei primer e le condizioni di PCR sono descritte nei Materiali e metodi. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo.

5.1.B3. Il PDTC induce p53 e il gene antiossidante SESN2 nei fibroblasti

Essendo noto un coinvolgimento di *TP53* nello stress ossidativo [54], si è voluto valutare se questo gene, funzionale nei fibroblasti, fosse coinvolto nella resistenza di queste cellule all'azione citotossica del PDTC. Tramite un'analisi di Western blot su un estratto di proteine totali ottenute da fibroblasti trattati con PDTC, si è valutato lo stato di fosforilazione di p53

nella serina15, sito specifico fosforilato in seguito ad aumento dei livelli di ROS. Come mostrato in figura 12, il PDTC è in grado di fosforilare fortemente questa serina già dopo 6 ore di trattamento.

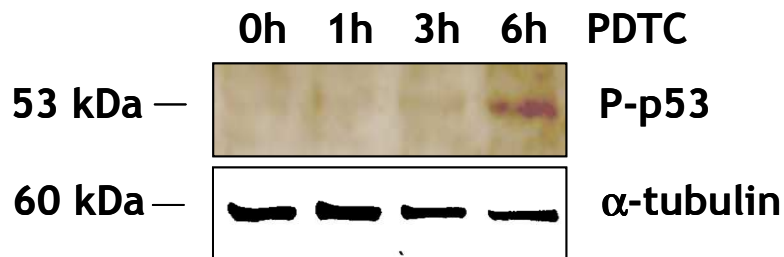


Figura 12. Il PDTC promuove la fosforilazione della serina 15 nella p53 dei fibroblasti. I fibroblasti sono stati trattati per il tempo indicato con PDTC alla concentrazione di 250 μ M. L'analisi Western blot è stata eseguita su un estratto proteico totale con anticorpi anti-p53-fosfoSer15 e anti- α -tubulina. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo.

Come mostrato precedentemente (vedi figura 8A), nei fibroblasti non è stato riscontrato un aumento di ROS dopo trattamento con PDTC. E' stato quindi analizzato il livello di espressione di geni con attività antiossidante, la glutatione perossidasi I (*GPX1*), la sestrina 1 (*SESN1*) e la sestrina 2 (*SESN2*), che è stato descritto essere indotti da p53. Il PDTC determina, nei fibroblasti, un aumento dell'mRNA di *SESN2* di 5,5 volte, lasciando inalterati i livelli degli altri due geni (figura 13A e B). Nelle PaCa44, che contengono *TP53* non funzionante, il PDTC non è in grado di indurre nessuno dei tre geni presi in esame.

Questi risultati suggeriscono che la resistenza dei fibroblasti all'azione citotossica del PDTC potrebbe essere spiegata dall'attivazione di geni antiossidanti dipendenti da p53, che riescono a neutralizzare la produzione di ROS indotta da PDTC.

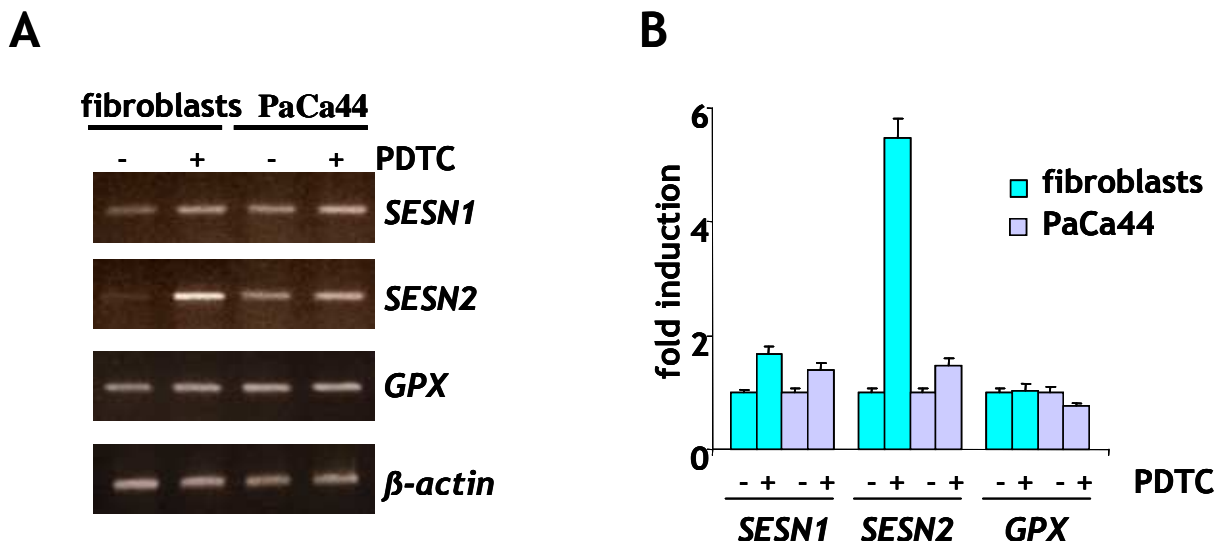


Figura 13. Il PDTC induce l'mRNA di *SESN2* nei fibroblasti. A) L'analisi di RT-PCR sui geni *SESN1*, *SESN2* e *GPX* è stata eseguita sull'RNA totale estratto da fibroblasti e PaCa44 trattati per 8 ore con 250µM di PDTC. Le sequenze dei primer e le condizioni di PCR sono descritte nei Materiali e Metodi. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo. B) Analisi densitometrica delle bande di *SESN1*, *SESN2* e *GPX* normalizzate su *β-actina*. I valori sono la media di tre esperimenti indipendenti.

5.1.B4. Il PDTC inibisce la crescita del tumore pancreatico in topi nudi

Gli effetti del PDTC sull'inibizione della crescita di cellule di adenocarcinoma pancreatico *in vivo* sono stati esaminati utilizzando xenograft di cellule di PaCa44 che crescono sottocute in topi nudi. Sette giorni dopo l'iniezione sottocute di 5×10^6 cellule, gruppi di cinque topi ciascuno sono stati trattati con PBS (soluzione di controllo) e PDTC a 100 e 200mg/kg. Il composto è stato somministrato con iniezione peritumorale e frequenza bisettimanale per un totale di due settimane. La figura 14A e B mostra che, alla fine del periodo di studio, il PDTC, alle due dosi utilizzate, determina una riduzione del volume tumorale di circa il 30% e 60% rispetto al controllo. I trattamenti non hanno evidenziato tossicità apparente, come suggerito dalla sopravvivenza di tutti gli animali studiati e dalla mancanza della perdita di peso corporeo degli animali stessi (figura 14C).

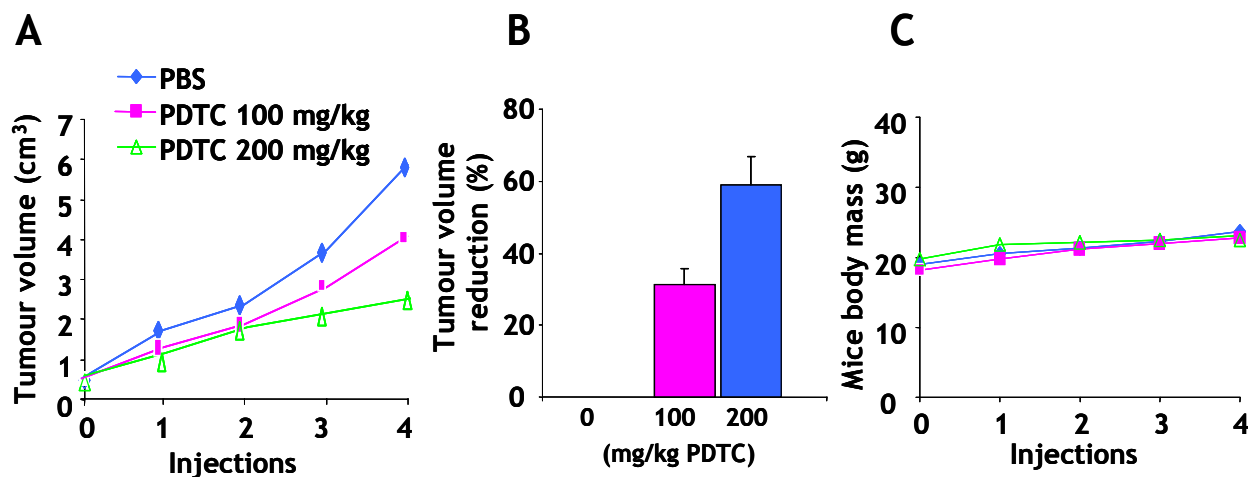


Figura 14. A) Il PDTC inibisce la crescita cellulare delle PaCa44 *in vivo*. Le PaCa44 sono state iniettate sottocute in topi nudi. Dopo 1 settimana, i topi sono stati sottoposti ad iniezioni peritumorali di PBS e PDTC alle condizioni indicate bisettimanalmente per due settimane. I valori rappresentano la media del volume tumorale misurato tre giorni dopo l'iniezione. B) Riduzione del volume tumorale dopo quattro iniezioni riferito al controllo. I valori indicati rappresentano la media calcolata sul gruppo di cinque topi. C) Media della massa corporea dei topi misurata dopo tre giorni dall'iniezione.

5.1.C. Inibizione della crescita cellulare dopo trattamento delle cellule con PDTC e zinco

Come mostrato in figura 5, l'uso associato di PDTC ($250\mu\text{M}$) e dosi non tossiche di zinco esogeno ($10\mu\text{M}$) determina un forte aumento di zinco intracellulare. La figura 15 mostra che questo trattamento, rispetto al solo PDTC, inibisce fortemente la crescita delle quattro linee tumorali testate, mentre risulta meno efficace sui fibroblasti. Il trattamento Zn/PDTC è inoltre molto più efficace del trattamento con gemcitabina, il chemioterapico "standard" contro il cancro del pancreas.

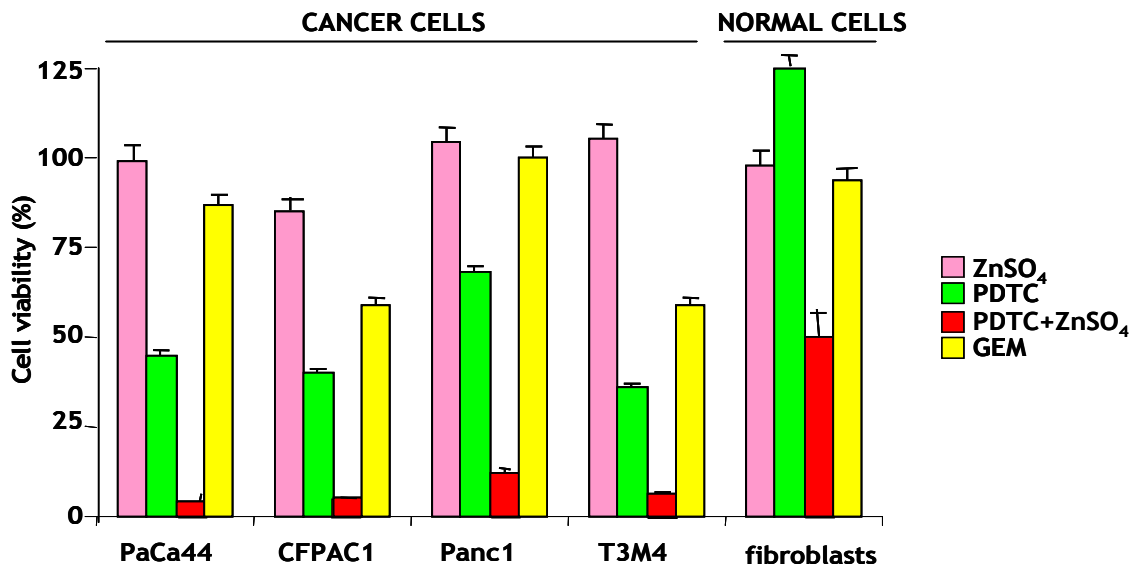


Figura 15. Zn/PDTC inibisce più efficacemente la crescita cellulare delle linee di adenocarcinoma pancreatico rispetto ai fibroblasti. Le cellule sono state trattate per 24 ore con 10 μ M ZnSO₄ e/o 250 μ M PDTC, o 2 μ M gemcitabina. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi). I valori presentati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.

5.1.C1. L'effetto anti-proliferativo dell'associazione PDTC e zinco dipende dallo stress ossidativo

Per valutare il ruolo dell'incremento di zinco intracellulare e dello stress ossidativo nell'effetto antiproliferativo ottenuto con Zn/PDTC, le cellule tumorali e quelle normali sono state trattate con TPEN e NAC in associazione a Zn/PDTC. Sia il chelante dello zinco che l'antiossidante sono in grado di annullare l'inibizione della crescita in entrambe le linee cellulari (Figura 16).

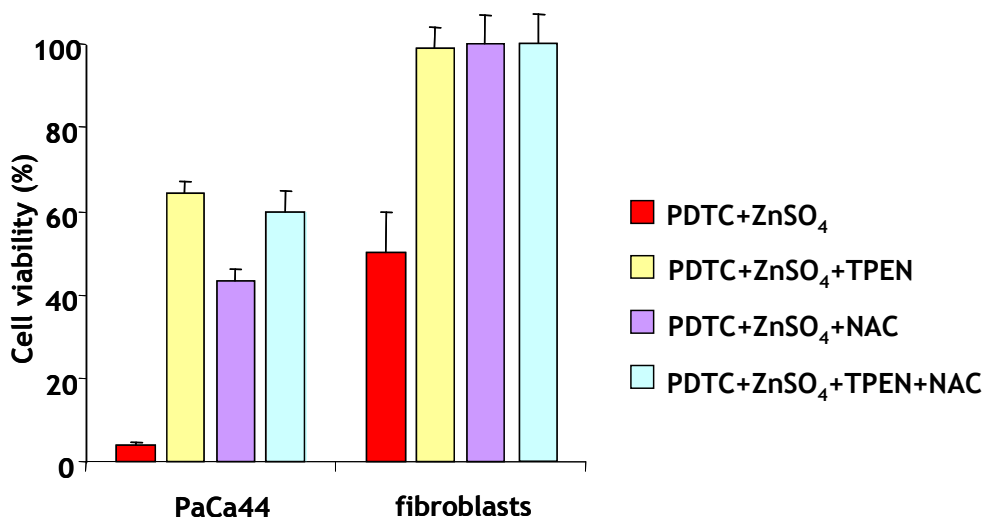


Figura 16. NAC e TPEN annullano l'effetto citotossico del trattamento Zn/PDTC. Le PaCa44 e i fibroblasti sono stati trattati con 250 μ M PDTC e 10 μ M ZnSO₄ in assenza o in presenza di 10 μ M TPEN e/o 20mM NAC per 24 ore. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi). I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

La figura 17 mostra che, nelle PaCa44, il trattamento con Zn/PDTC determina un aumento delle ROS di 5,5 volte e che sia l'aggiunta di NAC che di TPEN inibisce totalmente questo effetto. Questo risultato assieme al precedente conferma il ruolo cruciale dello stress ossidativo nella crescita cellulare e indica che l'induzione di stress ossidativo è una conseguenza diretta dell'incremento di zinco intracellulare.

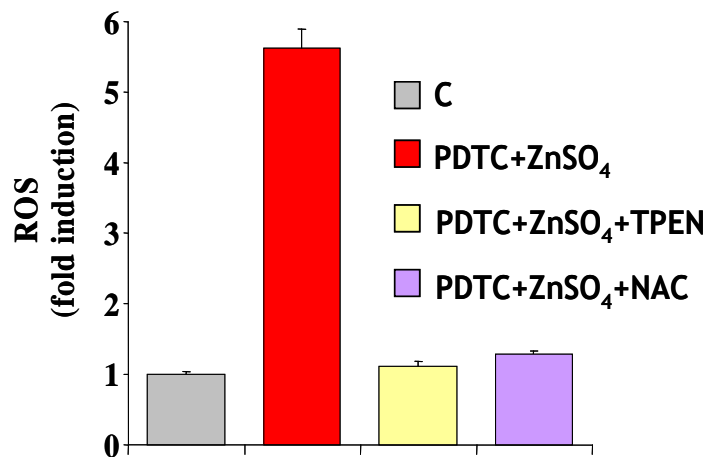


Figura 17. Il trattamento con PDTC e zinco determina una forte produzione di ROS nelle PaCa44. Le cellule sono state trattate con 250 μ M PDTC e 10 μ M ZnSO₄ in assenza o in presenza di 10 μ M TPEN e/o 20mM NAC per 6 ore. L'intensità della fluorescenza di 2',7'-diclorofluorescina (DCF) corrisponde ai livelli di ROS intracellulari, come descritto nei Materiali e Metodi. I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

5.1.C2. Il PDTC in associazione a zinco esogeno non aumenta il blocco di ciclo determinato dal solo PDTC, ma induce una forte apoptosi caspasi-indipendente

Le PaCa44 sono state analizzate al citofluorimetro per valutare la distribuzione del ciclo cellulare. L'analisi (dati non inseriti) ha mostrato che il trattamento con Zn/PDTC non determina ulteriore blocco di ciclo cellulare rispetto al solo PDTC come si era osservato in

figura 7, indicando che la quasi totale inibizione di crescita data dall'aggiunta di zinco esogeno non è causata da un effetto citostatico.

Per capire se il trattamento con Zn/PDTC determini morte cellulare apoptotica, le PaCa44 sono state analizzate tramite citofluorimetria con annexina V-FITC e ioduro di propidio. La figura 18 mostra che il trattamento con Zn/PDTC determina una quasi totale morte per apoptosi, che non è stata osservata a seguito del trattamento con il solo PDTC o con lo zinco. L'apoptosi indotta da Zn/PDTC è totalmente annullata dal TPEN o NAC.

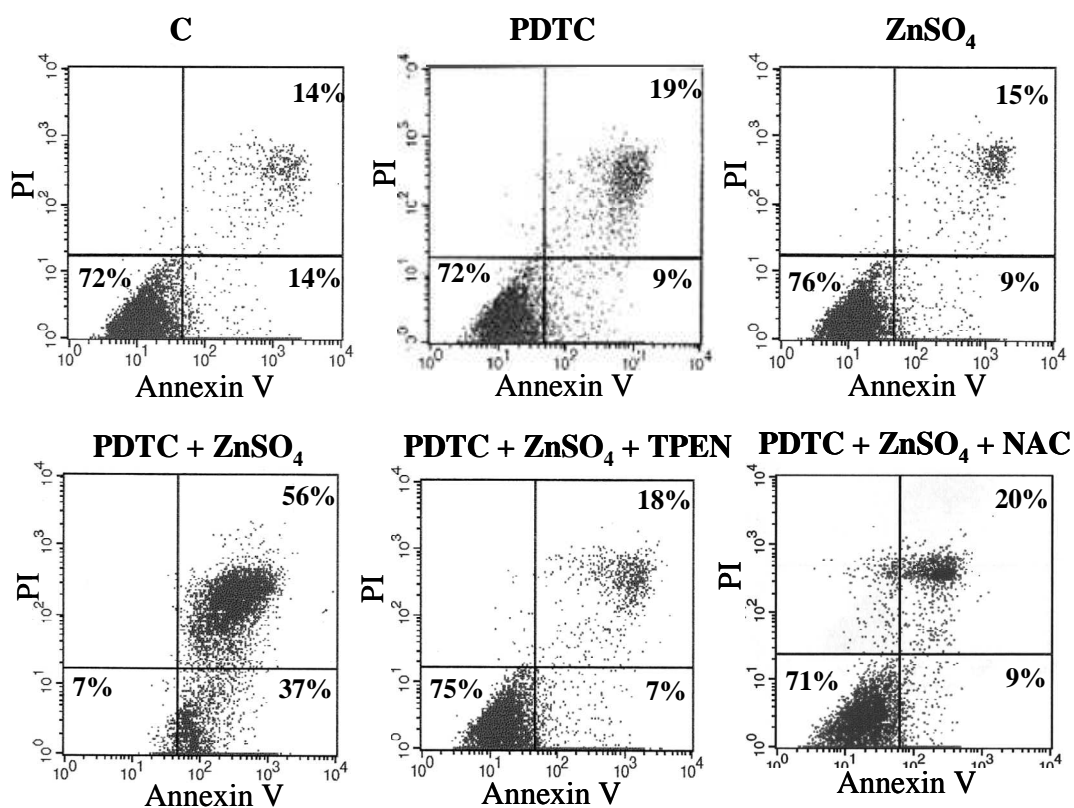


Figura 18. L'associazione Zn/PDTC induce una forte apoptosi ROS-dipendente. Le PaCa44 e i fibroblasti sono stati trattati con 250µM PDTC e 10µM ZnSO₄ in assenza o in presenza di 10µM TPEN e/o 20mM NAC per 24 ore. 2 x 10⁵ cellule sono state analizzate tramite citofluorimetria per determinare la percentuale di cellule mostranti annexina V⁺/propidio ioduro⁻ (apoptosi precoce) o annexina V⁺/propidio ioduro⁺ (apoptosi tardiva). Qui è mostrato un esperimento rappresentativo.

Per esaminare il “pathway apoptotico”, sono stati eseguiti saggi di attività delle caspasi. La figura 19A mostra che il trattamento Zn/PDTC non attiva né la caspasi 3 né la caspasi 8. Inoltre, l'inibitore delle pan-caspasi, Z-VAD-FMK, non è in grado di annullare l'effetto

citotossico determinato dal trattamento di Zn/PDTC (figura 19B), confermando che, nel processo apoptotico indotto da un forte incremento di zinco intracellulare, non sono coinvolte le caspasi.

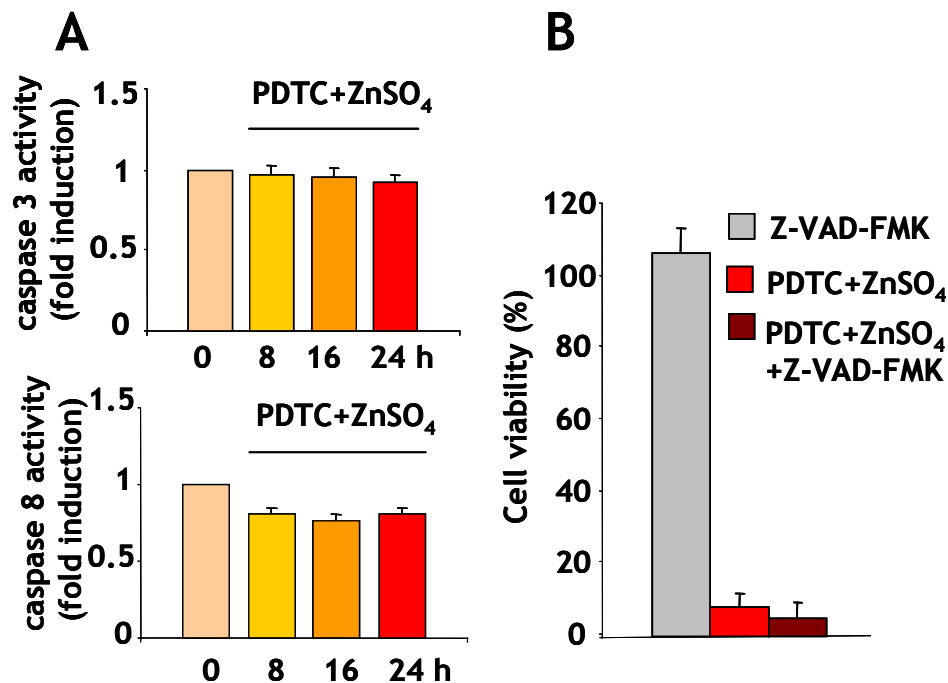


Figura 19. L'associazione Zn/PDTC induce una forte apoptosi caspasi-indipendente. A) Le PaCa44 sono state esposte a 250 μ M PDTC e 10 μ M ZnSO₄ per il tempo indicato. Le attività delle caspasi 3 e 8 sono state saggiate come descritto nei Materiali e Metodi. I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti. B) Le PaCa44 sono state trattate con 250 μ M PDTC e 10 μ M ZnSO₄ e/o 100 μ M Z-VAD-FMK, un inibitore di pan-caspasi, per 24 ore. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi). I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

5.1.C3. Il trattamento con PDTC e zinco determina il danneggiamento ROS-dipendente del mitocondrio

E' stato dimostrato che la produzione di ROS può aumentare la permeabilità della membrana mitocondriale, promuovendo una morte cellulare mediata dal mitocondrio [55]. Per determinare se il mitocondrio fosse coinvolto nell'apoptosi indotta da Zn/PDTC, è stata valutata, tramite citofluorimetria, la percentuale di cellule che presentavano un potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) ridotto. In accordo con l'analisi di apoptosi, né il PDTC né lo zinco sono in grado di aumentare la percentuale di cellule con un $\Delta\Psi_m$ ridotto rispetto al

controllo, mentre il trattamento combinato determina una riduzione del $\Delta\Psi_m$ in più del 50% delle cellule (Figura 20A). Inoltre, il trattamento con TPEN o NAC previene il danno mitocondriale, dimostrando che questo evento dipende dall'incremento di zinco intracellulare e quindi dalla produzione di ROS.

Per valutare se il trattamento con PDTC e zinco regolasse l'espressione di geni implicati nel promuovere o inibire il danno alla membrana mitocondriale, sono stati valutati, tramite RT-PCR, i livelli dell'mRNA dei geni apoptotici *BAK*, *BAX*, *BCL-XS* e *NOXA* e anti-apoptotici *BCL-2*, *BCL-W* e *BCL-XL*. La figura 20B mostra che il trattamento associato PDTC e zinco non è in grado di regolare l'espressione di tali geni, indicando che il danno al mitocondrio deriva dall'aumento di stress ossidativo e non dalla regolazione di geni generalmente responsabili dell'apoptosi mediata dal mitocondrio.

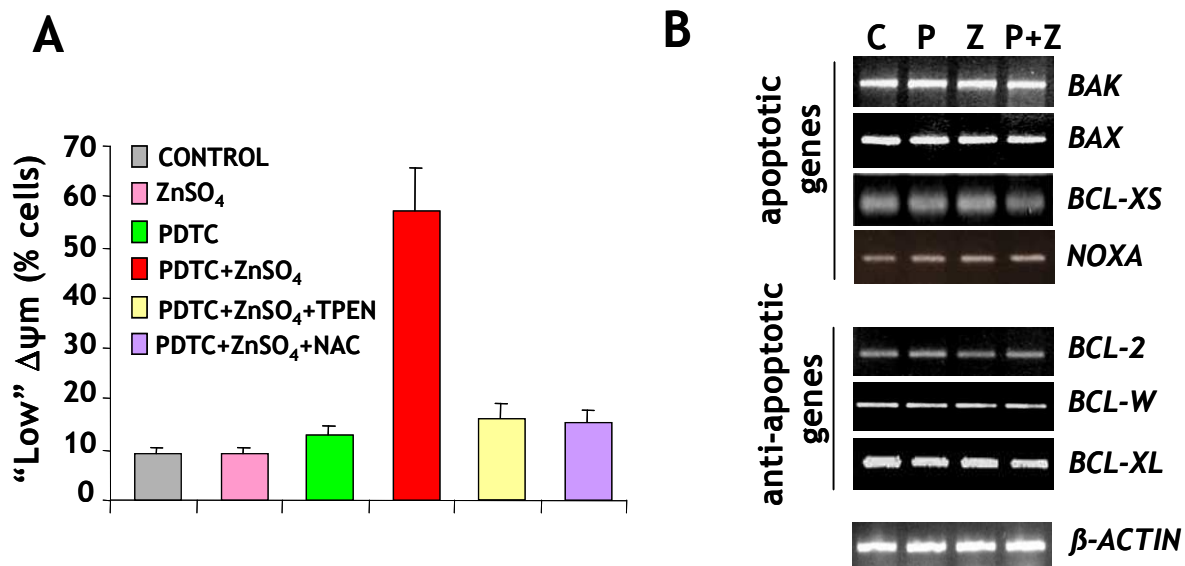


Figura 20. L'associazione Zn/PDTC danneggia la membrana mitocondriale mediante l'aumento di ROS. A) Le PaCa44 sono state trattate con 250 μ M PDTC e/o 10 μ M ZnSO₄ in assenza o presenza di 10 μ M TPEN o 20 mM NAC per 24 ore. La percentuale di cellule che mostrano un ridotto $\Delta\Psi_m$ è determinata tramite citofluorimetria usando la sonda 3,3-dihexyloxocarbocyanine come descritto nei Materiali e Metodi. I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti. B) L'analisi di RT-PCR dei geni indicati è stata eseguita sull'RNA totale estratto da PaCa44 trattate per 8 ore con 250 μ M PDTC e/o 10 μ M ZnSO₄. Le sequenze dei "primers" e le condizioni di PCR sono descritte nei Materiali e Metodi. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo.

5.1.C4. Il trattamento con PDTC e zinco induce apoptosi associata alla traslocazione di AIF nel nucleo

AIF (apoptotic inducing factor) è una proteina mitocondriale che, quando rilasciata dal mitocondrio, trasloca nel nucleo e promuove una degradazione del DNA in modo indipendente dalle caspasi [56]. La figura 21 mostra che il trattamento con Zn/PDTC determina una traslocazione di AIF dal mitocondrio al nucleo (colocalizzazione dei due coloranti di AIF e del nucleo), che è totalmente abolita dal TPEN e dal NAC dimostrandone l'attività Zn/ROS_dipendente. Al contrario, lo zinco e il PDTC singolarmente non sono in grado di promuovere la traslocazione di AIF, in accordo con la loro incapacità di indurre apoptosi (figura 18) e danno mitocondriale (figura 20A). Questi risultati sono stati confermati da saggi di Western blot su estratti proteici nucleari (dati non mostrati).

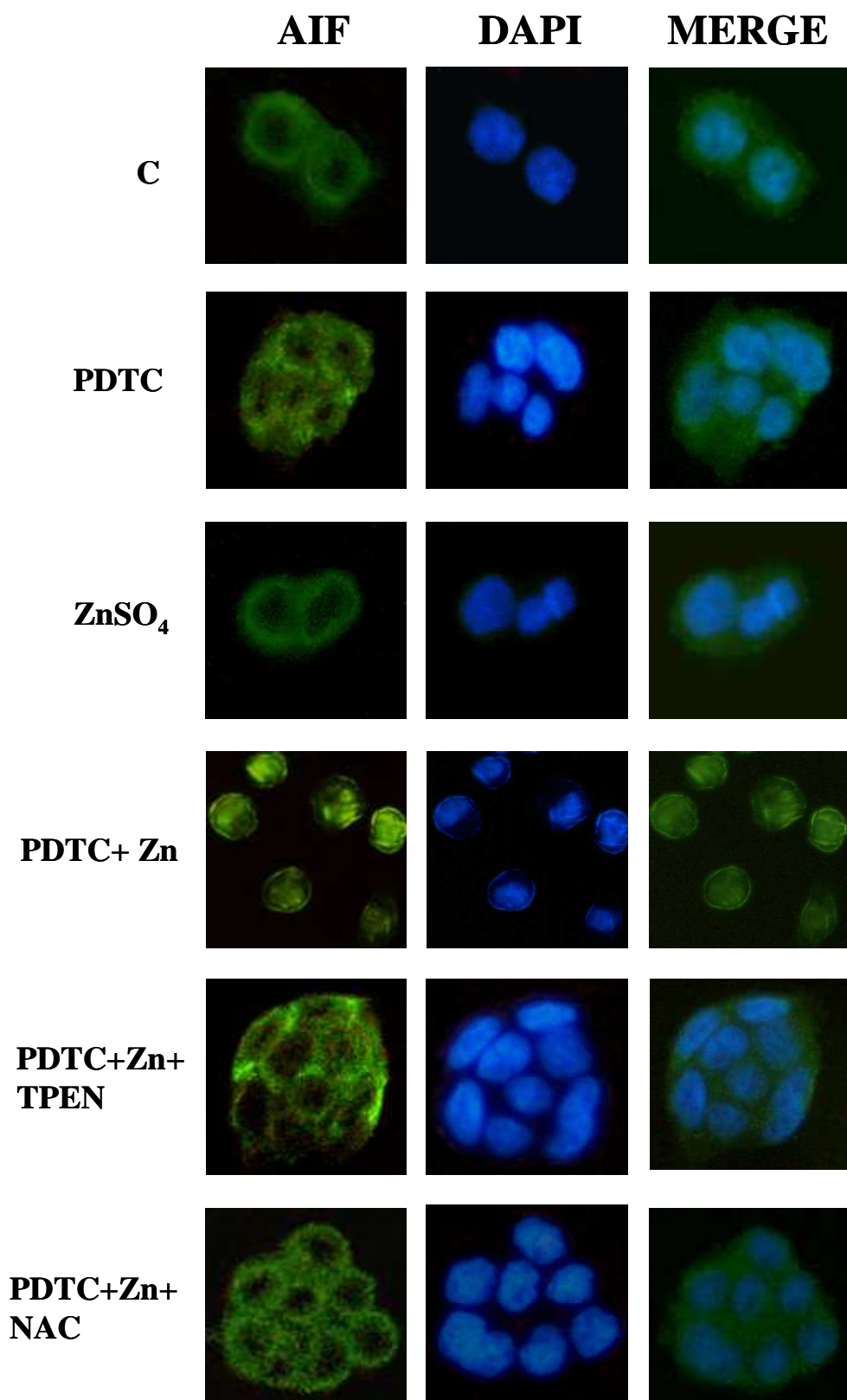


Figura 21. L'associazione Zn/PDTC induce il rilascio di AIF dai mitocondri. Le PaCa44 sono state trattate con 250µM PDTC e/o 10µM ZnSO₄ in assenza o presenza di 10µM TPEN o 20mM NAC per 24 ore. L'immunoreattività di AIF, in verde, appare all'interno dei nuclei (colorati in blu con il DAPI) solo nelle cellule esposte a PDTC e zinco. Maggiori dettagli sulla tecnica sono presenti nei Materiali e Metodi. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo.

L'insieme di questi dati dimostra che l'aumento di zinco intracellulare nelle PaCa44 determina una forte produzione di ROS che causa danno mitocondriale e traslocazione di AIF al nucleo, con una conseguente apoptosi caspasi indipendente.

5.1.C5. Il trattamento con PDTC e zinco inibisce l'espressione di p53 nei fibroblasti normali

Poiché un piccolo aumento di zinco intracellulare determina l'attivazione di p53 (figura 12), che inducendo il gene antiossidante *SESN2* (figura 13) protegge i fibroblasti da stress ossidativo, si è voluto studiare se la parziale resistenza dei fibroblasti ad un aumento ulteriore di zinco intracellulare, coinvolgesse la regolazione di p53. La figura 22A mostra che il trattamento con Zn/PDTC riduce il livello proteico di p53, non alterandone i livelli di mRNA (figura 22B). L'inibizione di p53 è dipendente dall'aumento di zinco intracellulare e dalla produzione di ROS, infatti, come mostra la figura 22C, l'utilizzo del TPEN e del NAC annullano l'effetto del Zn/PDTC. Nel caso di un elevato aumento di zinco intracellulare non avviene una fosforilazione di p53 in serina 15, come invece accade con il solo PDTC.

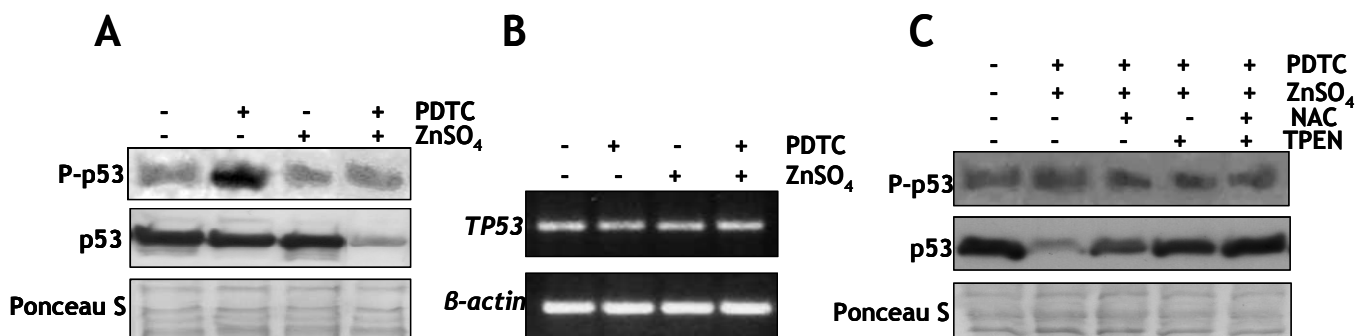


Figura 22. L'associazione Zn/PDTC determina una riduzione dei livelli della proteina p53 nei fibroblasti. A) I fibroblasti sono stati trattati per 6 ore con 250μM di PDTC e/o 10μM ZnSO₄. L'analisi di Western blot è stata eseguita su un estratto proteico totale con anticorpi anti-p53-fosfoSer15 e anti-p53. B) L'analisi di RT-PCR su *TP53* è stata eseguita sull'RNA totale estratto da fibroblasti trattati per 6 ore con 250μM PDTC e/o 10μM ZnSO₄. Le sequenze dei "primers" e le condizioni di PCR sono descritte nei Materiali e Metodi. C) L'analisi di Western blot è stata eseguita su un estratto proteico totale di fibroblasti trattati per 6h con 250μM di PDTC e/o 10μM ZnSO₄ in assenza o presenza di 10μM TPEN o 20 mM NAC. Qui sono mostrati degli esperimenti rappresentativi.

In accordo con la mancata attivazione di p53, il trattamento con Zn/PDTC non regola l'espressione di alcuni importanti geni antiossidanti (*SESNI*, *SESN* e *GPX1*) e apoptotici (*BAX*, *BAK* e *NOXA*) regolati da p53 (dati non mostrati).

Successivamente, lo studio è continuato al fine di capire con quale meccanismo l'associazione Zn/PDTC riducesse i livelli di p53 e se questo effetto avesse un ruolo nella parziale resistenza dei fibroblasti alla citotossicità indotta da un forte aumento di zinco intracellulare. È stata effettuata un'analisi di Western blot su fibroblasti trattati con Zn/PDTC in presenza di un inibitore del proteasoma, MG132, ipotizzando che la riduzione dei livelli di p53 dipendesse da una minor stabilità della proteina piuttosto che da una diminuzione dell'efficienza di traduzione. Come si può osservare nella figura 23A, l'aggiunta di MG132 non permette la riduzione dei livelli di p53 da parte di Zn/PDTC: questo risultato ci dimostra che l'elevato aumento intracellulare di zinco e l'associata induzione di stress ossidativo attivano un meccanismo di degradazione di p53 dipendente dal proteasoma. È stato quindi valutato il ruolo della degradazione di p53 nella crescita cellulare, tramite l'uso associato di MG132 e Zn/PDTC. La figura 23B mostra che l'inibizione del proteasoma associata all'aumento di zinco e ROS riducono ulteriormente, rispetto al solo Zn/PDTC, la vitalità cellulare dei fibroblasti. I dati mostrati nella figura 20 suggeriscono che la riduzione di p53, determinata da Zn/PDTC, abbia un ruolo nella resistenza dei fibroblasti all'apoptosi indotta da stress ossidativo.

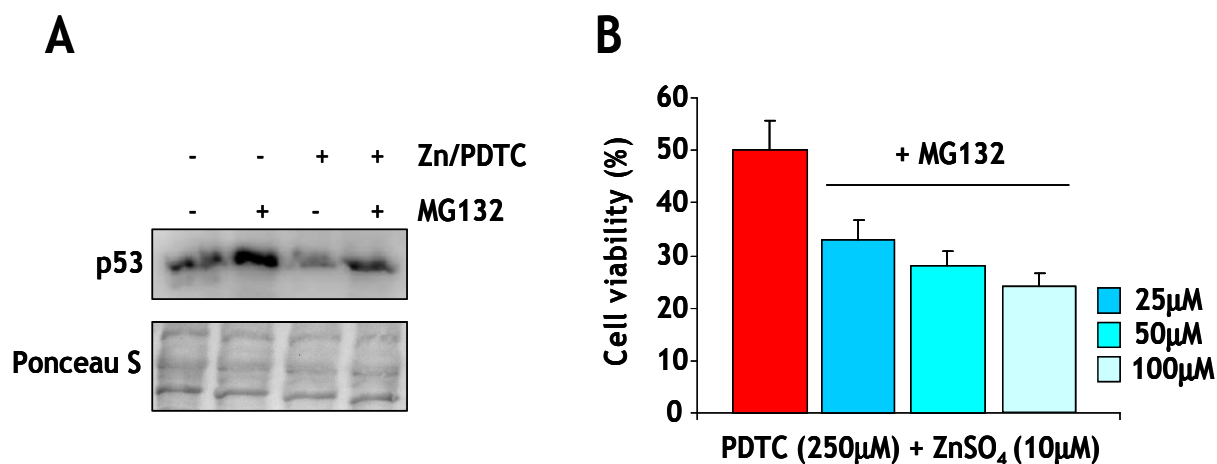


Figura 23. La degradazione di p53 dipendente dal proteasoma protegge parzialmente i fibroblasti dagli effetti citotossici di Zn/PDTC. A) I fibroblasti sono stati trattati per 6 ore con 250µM di PDTC e 10µM ZnSO₄ in assenza e in presenza di 100µM di MG132. L'analisi di Western blot è stata eseguita su un estratto proteico totale con anticorpi anti-p53. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo. B) I fibroblasti sono stati trattati per 24 ore con 250µM di PDTC e 10µM ZnSO₄ in assenza e in presenza di MG132 alle concentrazioni di 25, 50 e 100µM. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi). I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

Ciò è in linea con dati di letteratura riportanti che p53 agisce da fattore di trascrizione attivando geni apoptotici e che la traslocazione di p53 al mitocondrio determina una permeabilizzazione della membrana con successiva induzione di apoptosi [21].

5.2 Caratterizzazione degli effetti della riduzione di zinco intracellulare sulla crescita di linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico umano e di fibroblasti

5.2.A. Il TPEN inibisce la crescita di cellule di adenocarcinoma pancreatico in modo più efficace rispetto ai fibroblasti

Lo studio è poi proseguito analizzando gli effetti causati da una forte riduzione di zinco intracellulare su linee di adenocarcinoma pancreatico, ottenuta tramite l'uso del TPEN, un chelante dello zinco. Per valutare la capacità del TPEN di diminuire lo zinco intracellulare nelle cellule PaCa44 e nei fibroblasti primari, si è utilizzata la sonda FluoZin3. Il trattamento

con il TPEN determina una riduzione dello zinco intracellulare molto più forte nelle PaCa44 (24 unità arbitrarie) rispetto ai fibroblasti (3 unità arbitrarie) (figura 24).

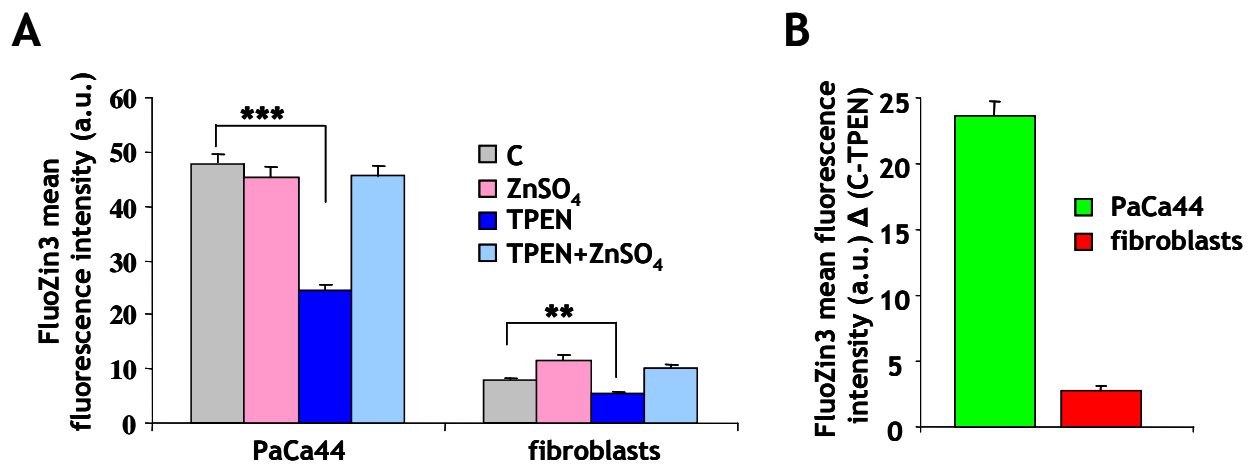


Figura 24. Il TPEN riduce la concentrazione di zinco intracellulare. A) Le PaCa44 e i fibroblasti sono stati trattati per 4 ore con 10 μ M di TPEN e/o 10 μ M ZnSO₄. L'intensità della fluorescenza del FlouZin3, corrispondente ai livelli di zinco intracellulare, è stata misurata tramite citofluorimetria ed espressa in unità arbitrarie (a.u.), come descritto nei Materiali e Metodi. I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$. B) il valore di Δ (C-TPEN) rappresenta la differenza del livello di zinco intracellulare prima e dopo il trattamento con TPEN nelle due linee messe a confronto.

E' stato poi valutato l'effetto citotossico del TPEN sulle cellule PaCa44 e sui fibroblasti. In figura 25 è presentata sia una curva dose-dipendente sia una curva tempo-dipendente dei trattamenti con il chelante su entrambe le linee cellulari. Si nota che i fibroblasti sono significativamente più resistenti delle PaCa44 al trattamento con il TPEN e, inoltre, mostrano caratteristiche di resistenza a partire dalla concentrazione di 10 μ M, dose sufficiente a inibire completamente la crescita delle PaCa44. Anche la cinetica di inibizione è molto più lenta nei fibroblasti rispetto alle PaCa44: la differenza tra i due tipi cellulari è maggiormente evidente dopo un trattamento di 8 ore, in cui la vitalità delle cellule normali è di circa l'85%, mentre quella delle tumorali del 20%.

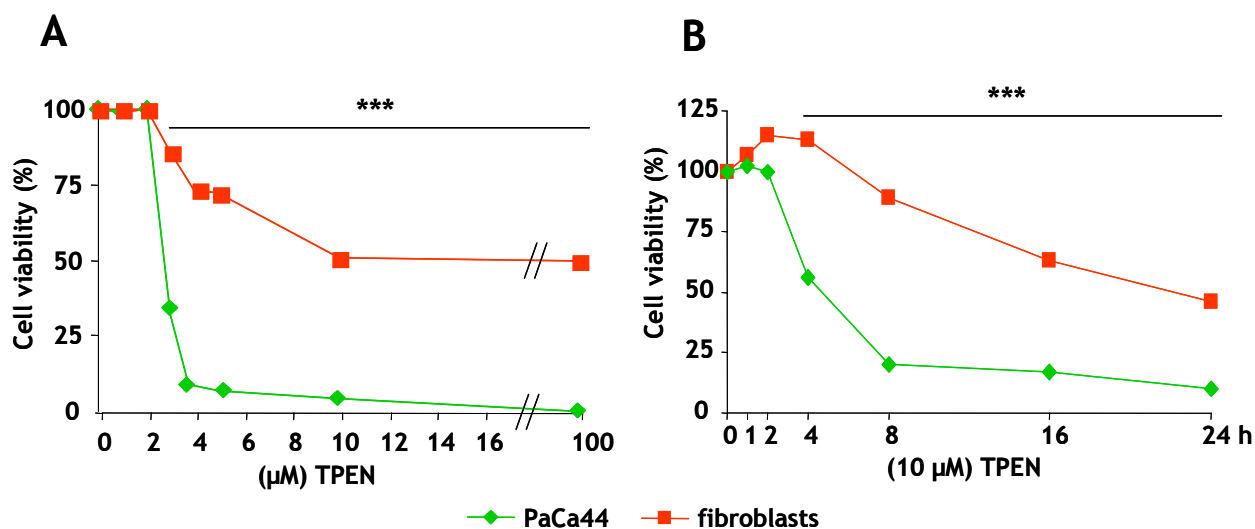


Figura 25. Il TPEN è più efficace nell'inibizione della crescita di cellule pancreatiche tumorali rispetto a fibroblasti normali. A) Le PaCa44 e i fibroblasti sono stati trattati per 24 ore con dosi crescenti di TPEN. B) Le PaCa44 e i fibroblasti sono stati trattati con una dose fissa di 10μM di TPEN per tempi crescenti. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi). I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti. *** $p < 0.001$.

Per verificare se l'effetto antiproliferativo dipendesse dall'attività chelante del TPEN, le cellule sono state trattate con il chelante in assenza o in presenza di ioni zinco aggiunti al mezzo di coltura. La figura 26 mostra che lo zinco esogeno è in grado di annullare l'effetto citotossico del TPEN sia nelle PaCa44 che nei fibroblasti, confermando l'assenza di effetti aspecifici.

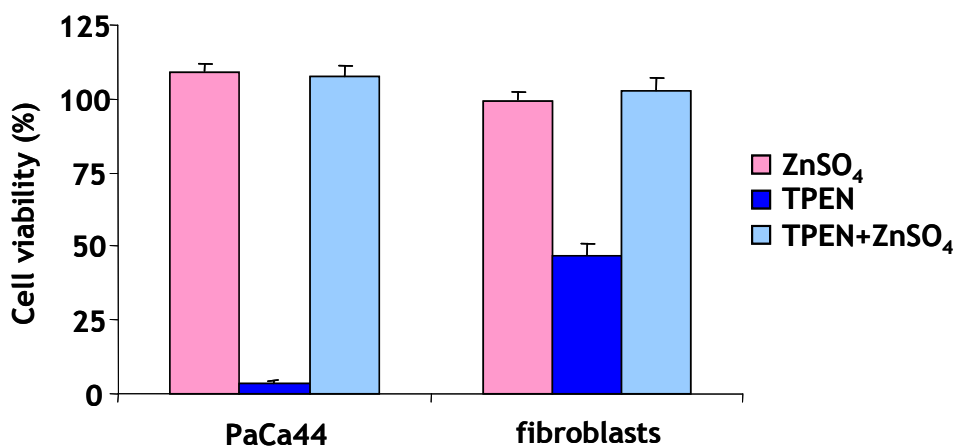


Figura 26. L'inibizione di crescita cellulare da parte del TPEN dipende dalla sua attività chelante. Le PaCa44 e i fibroblasti sono stati trattati per 24 ore con 10μM di TPEN e/o 10μM di ZnSO₄. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi). I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

L'insieme dei risultati sopradescritti indicano che la riduzione di zinco intracellulare, ottenuta con il TPEN, può determinare un effetto citotossico, in modo dipendente dalla quantità di zinco sottratto, molto maggiore nelle PaCa44 rispetto ai fibroblasti.

5.2.A1. Il TPEN inibisce la crescita di cellule di adenocarcinoma pancreatico più efficacemente di un pannello di sette composti antitumorali

Per studiare se l'elevato effetto antiproliferativo del TPEN sulla linea cellulare PaCa44 potesse essere esteso anche ad altre linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico, sono state eseguite, nelle stesse condizioni della figura 25, due curve dose e tempo-dipendente prendendo in esame altre cinque linee di adenocarcinoma pancreatico umano con differente origine e profilo genetico. La vitalità delle varie linee cellulari, mostrata in figura 27, è in linea con l'effetto ottenuto con il TPEN sulle PaCa44, linea cellulare presa come modello, suggerendo che le linee di adenocarcinoma pancreatico non mostrano i meccanismi di resistenza ipotizzati nei fibroblasti.

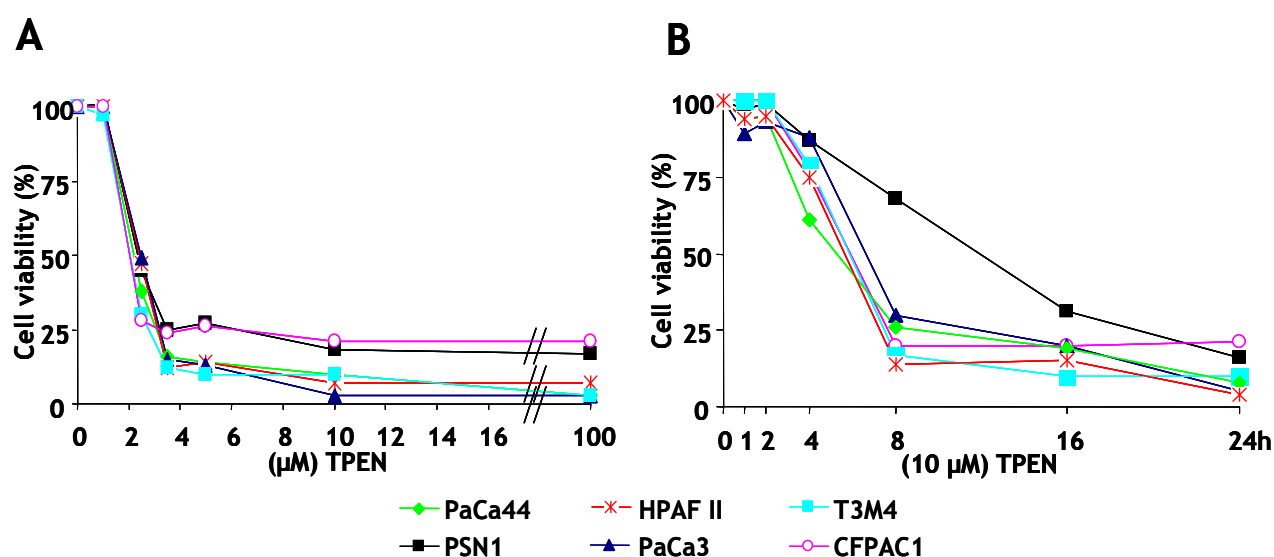


Figura 27. Il TPEN inibisce la crescita di tutte le sei linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico testate. A) Le cellule sono state trattate per 24 ore con dosi crescenti di TPEN. B) Le cellule sono state trattate con una dose fissa di 10μM di TPEN per tempi crescenti. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi). I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

L'effetto antiproliferativo del TPEN è stato poi confrontato con quello ottenuto con altri composti usati nella terapia contro il cancro (gemcitabina, 5-fluorouracile, irinotecan, cisplatino, edelfosina, trichostatina A, mitomicina C). Anche in questo caso, è stata fatta una curva dose e tempo-dipendente sulle PaCa44. Come si può osservare nella figura 28, il TPEN risulta essere il più efficiente tra tutti i composti saggati nell'inibire la crescita cellulare, sia se si considerano i bassi dosaggi (circa 4 μ M) sia se si considera la rapidità nella sua azione (8h).

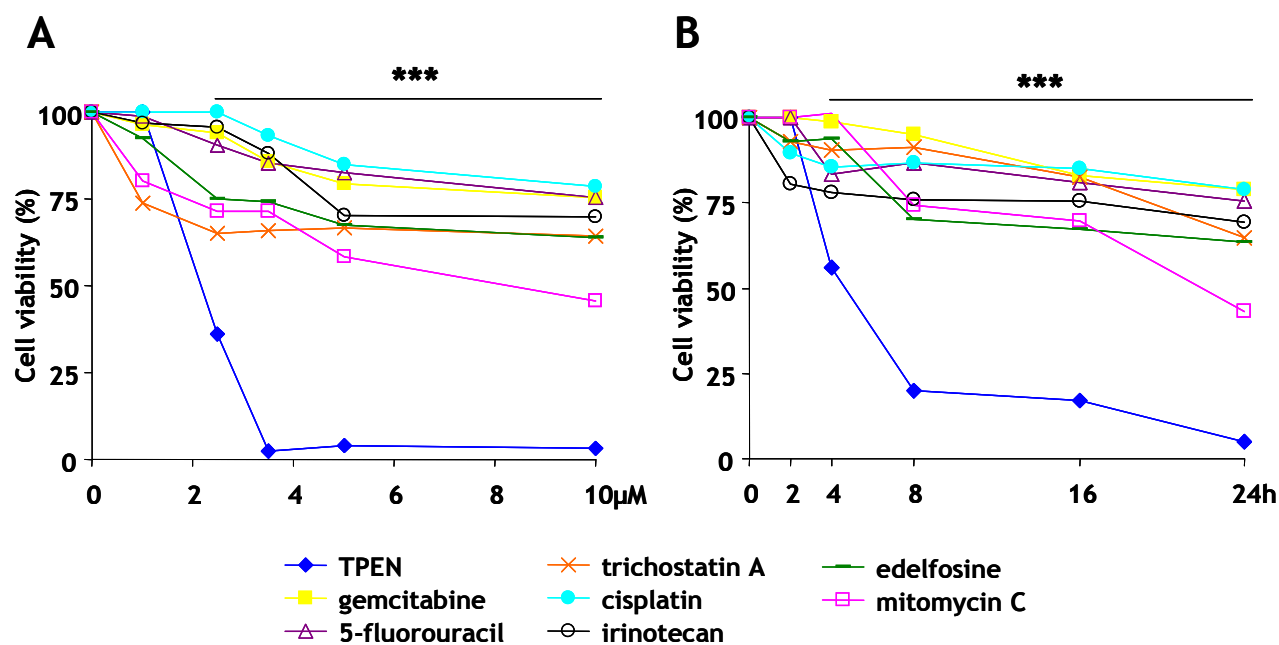


Figura 28. Il TPEN è molto più efficace nell'inibizione della crescita di cellule di adenocarcinoma ancreatico di altri 7 composti anti-tumorali. A) Le PaCa44 sono state trattate per 24 ore con dosi crescenti di ciascun composto indicato nella legenda. B) Le PaCa44 sono state trattate con una dose fissa di 10 μ M di ciascun composto per tempi crescenti. La proliferazione cellulare è stata valutata con il saggio di cristal-violetto (come descritto nei Materiali e Metodi). I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti. *** $p < 0.001$ (TPEN rispetto a ciascun altro composto).

5.2.A2. Il TPEN inibisce la progressione del ciclo cellulare

Per esaminare i meccanismi coinvolti nell'inibizione della vitalità cellulare delle PaCa44 in seguito a trattamento con TPEN, è stata analizzata la percentuale delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. La figura 29 mostra che la riduzione di zinco intracellulare aumenta la

percentuale di cellule in fase G1 dell'11% rispetto al non trattato; il blocco in G1 è annullato dall'aggiunta di ioni zinco.

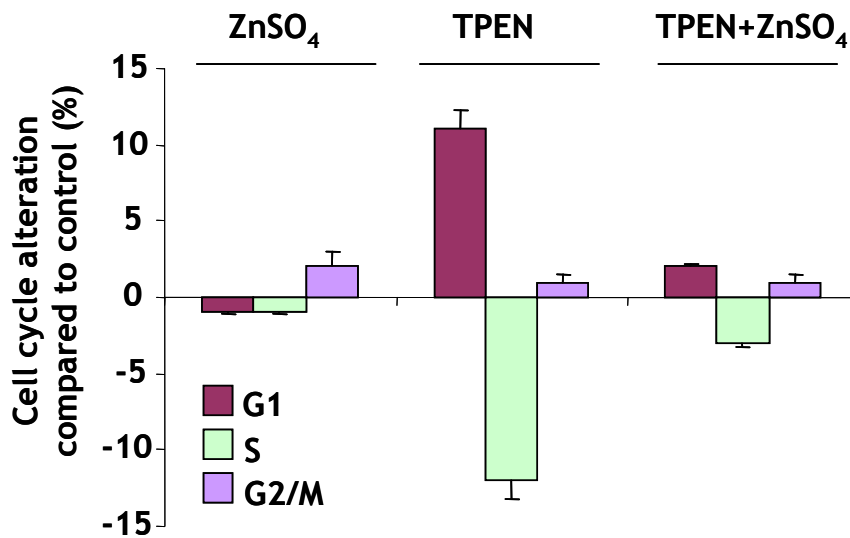


Figura 29. Il TPEN determina un arresto del ciclo cellulare in fase G1. Le PaCa44 sono state trattate con 10 μ M di TPEN e/o 10 μ M di ZnSO₄ per 24 ore. I valori mostrati sono riferiti a cellule non trattate e sono la media di tre esperimenti indipendenti. Le indicazioni sull'analisi della distribuzione del ciclo cellulare sono riportate nei Materiali e Metodi.

Negli esperimenti successivi, è stata misurata l'espressione di vari geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare tramite RT-PCR. La riduzione di zinco intracellulare da parte del TPEN determina un'induzione dei geni *P57* e *P19*, soppressori tumorali, e una repressione dei geni *CICLINA A* e *CICLINA B* (figura 30A), mentre non altera l'espressione di altri geni come *P21* e *P27* (dati non mostrati). In figura 30B è mostrato che il rapporto tra il livello di espressione dei geni inibitori dei complessi ciclina-cdk (*P57* e *P19*) e quello dei geni codificanti cicline aumenta fortemente a seguito del trattamento con TPEN. La riduzione di zinco intracellulare, quindi, è in grado di regolare sia i geni coinvolti nella progressione sia nell'inibizione del ciclo cellulare, determinandone un effetto globale di rallentamento del ciclo in fase G1.

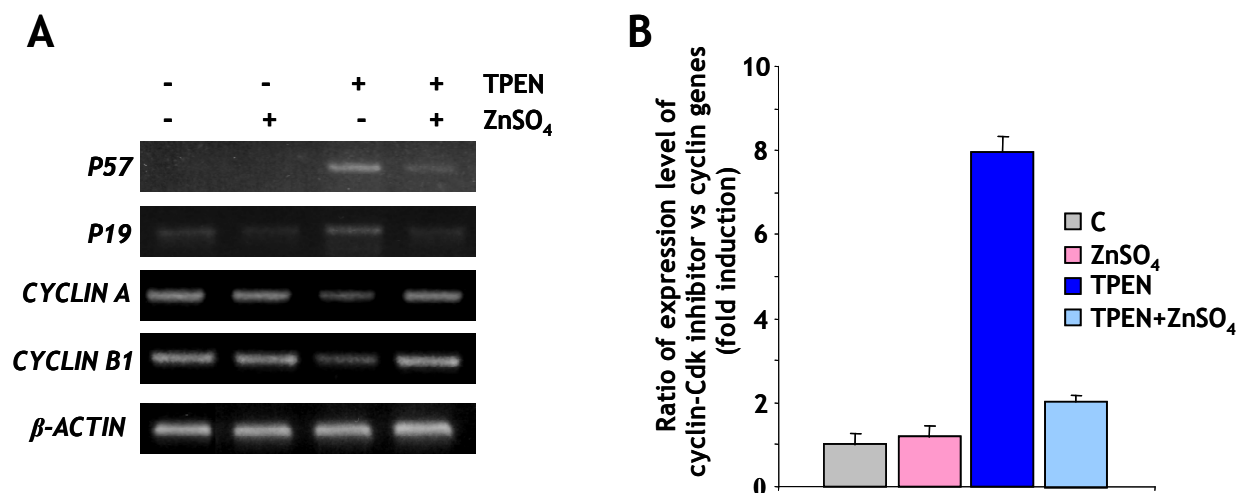


Figura 30. Il TPEN regola l'espressione di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare. A) L'analisi di RT-PCR sui geni *P57*, *P19*, *CICLINA A* e *CICLINA B1* è stata eseguita sull'RNA totale estratto dalle PaCa44 trattate per 8 ore con 10 μ M di TPEN e/o 10 μ M di ZnSO₄. Le sequenze dei "primers" e le condizioni di PCR sono descritte nei Materiali e Metodi. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo. B) Analisi densitometrica delle bande di *P57*, *P19*, *CICLINA A* e *CICLINA B1* normalizzate su β -actina. I valori espressi sono calcolati come volte di induzione dei livelli di espressione del rapporto $P57 + P19 / CICLINA A + CICLINA B1$. E' presentata la media di tre esperimenti indipendenti.

5.2.A3. Il TPEN induce morte apoptotica

Per spiegare se nel forte effetto citotossico ci fosse coinvolto, oltre ad un blocco di ciclo, anche un meccanismo apoptotico, le Paca44 sono state analizzate tramite citofluorimetria con annexina V-FITC e ioduro di propidio. La figura 31 mostra che il TPEN, già a 16 ore dall'inizio del trattamento, causa una forte apoptosi aumentando la percentuale di cellule sia in fase precoce (annexina V⁺) sia tardiva (annexina V⁺/propidio ioduro⁺) del processo apoptotico. Questo effetto è completamente annullato dall'aggiunta di zinco nel mezzo di coltura.

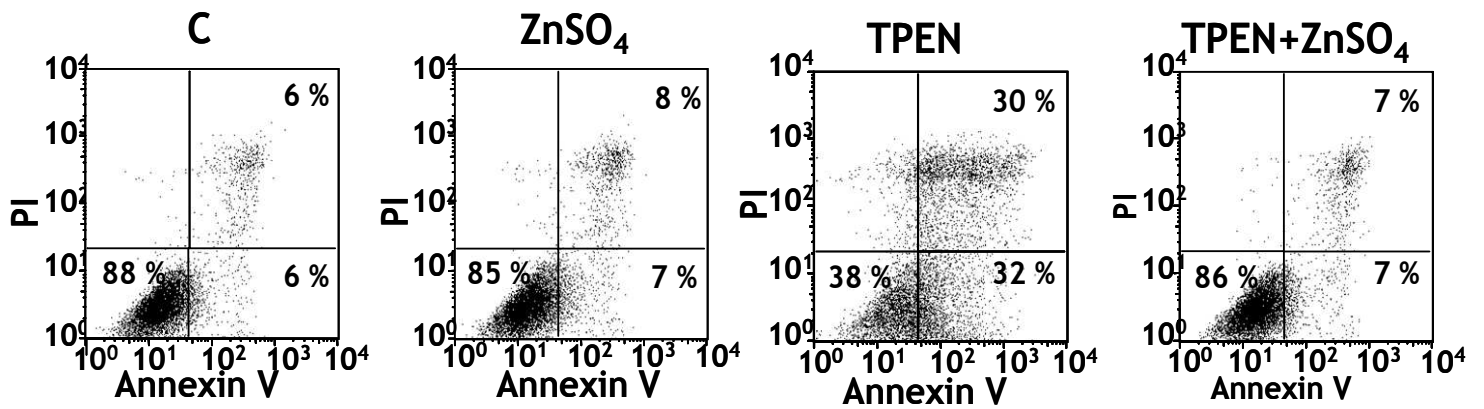


Figura 31. Il TPEN induce una forte apoptosi. Le PaCa44 sono state trattate con 10 μ M TPEN e/o 10 μ M ZnSO₄ per 16 ore. 2 x 10⁵ cellule sono state analizzate tramite citofluorimetria per determinare la percentuale di cellule mostranti annexina V⁺/propidio ioduro⁻ (apoptosi precoce) o annexina V⁺/ propidio ioduro⁺ (apoptosi tardiva). Qui è mostrato un esperimento rappresentativo.

Successivamente è stata compiuta un'analisi dell'espressione di geni coinvolti nel processo apoptotico mediato dal mitocondrio. La tecnica dell'RT-PCR ha rivelato che il TPEN è in grado di indurre l'espressione del gene apoptotico *BCL-X_S*, probabilmente regolando lo splicing alternativo del gene *BCL-X*, e di inibire l'espressione dei geni anti-apoptotici *BCL-2*, *BCL-W* e *BCL-X_L* (figura 32A). Nonostante il TPEN non induca altri geni apoptotici come *BIM*, *BAK*, *BAX*, *PUMA* e *NOXA* (dati non mostrati), è importante notare che c'è un forte aumento (circa 9 volte) del rapporto tra i livelli di espressione dei geni apoptotici e quelli dei geni anti-apoptotici (figura 32B).

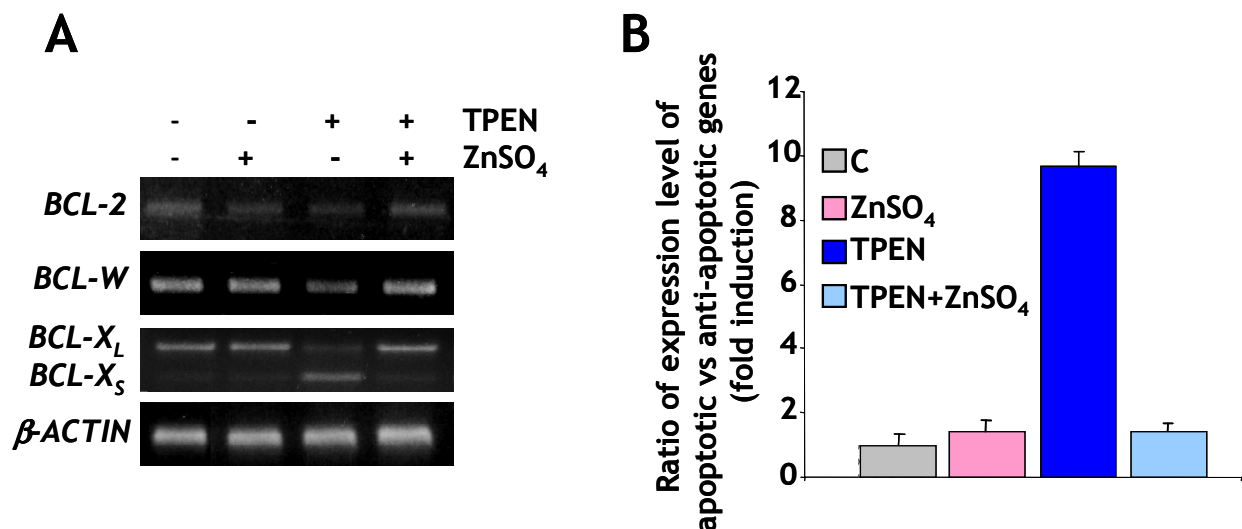


Figura 32. Il TPEN regola l'espressione di geni coinvolti nell'apoptosi mediata dal mitocondrio. A) L'analisi di RT-PCR dei geni *BCL-2*, *BCL-W*, *BCL-X_L* e *BCL-X_S* è stata eseguita sull'RNA totale estratto dalle PaCa44 trattate per 8 ore con 10 μ M di TPEN e/o 10 μ M di ZnSO₄. Le sequenze dei "primers" e le condizioni di PCR sono descritte nei Materiali e Metodi. Qui è mostrato un esperimento rappresentativo. B) Analisi densitometrica delle bande di *BCL-2*, *BCL-W*, *BCL-X_L* e *BCL-X_S* normalizzate su β -actina. I valori espressi sono calcolati come volte di induzione dei livelli di espressione del rapporto $BCL-X_S / BCL-2 + BCL-W + BCL-X_L$. E' presentata la media di tre esperimenti indipendenti.

Per determinare l'effetto della riduzione di zinco intracellulare sul mitocondrio, è stata valutata, tramite citofluorimetria, la percentuale di cellule che presentavano $\Delta\Psi_m$ ridotto. Il TPEN, già dopo 16 ore di trattamento, è in grado di aumentare a 45% la percentuale di cellule con un $\Delta\Psi_m$ ridotto rispetto al controllo e l'aggiunta di ioni zinco esogeni previene completamente il danno mitocondriale (figura 33), in accordo con quanto osservato per l'apoptosi (figura 31) e per la regolazione di geni apoptotici (figura 32).

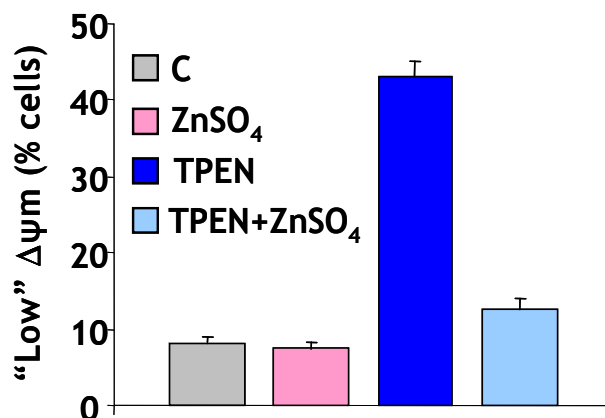


Figura 33. Il TPEN danneggia la membrana mitocondriale. Le PaCa44 sono state trattate con 10 μ M TPEN e/o 10 μ M ZnSO₄ per 16 ore. La percentuale di cellule che mostrano un ridotto $\Delta\Psi_m$ è stata determinata tramite citofluorimetria usando la sonda 3,3-dihexyloxacarbocyanine come descritto nei Materiali e Metodi. I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

Per capire se nell'apoptosi causata da una diminuzione di zinco intracellulare fossero coinvolte le caspasi, sono stati eseguiti dei saggi di attività sulle caspasi 3 e 8. Questi esperimenti hanno mostrato che il TPEN attiva sia la caspasi 3 sia la caspasi 8 di 11 e 2,5 volte, rispettivamente, indicando che esse rivestono un ruolo importante nell'induzione apoptotica indotta da TPEN (figura 34).

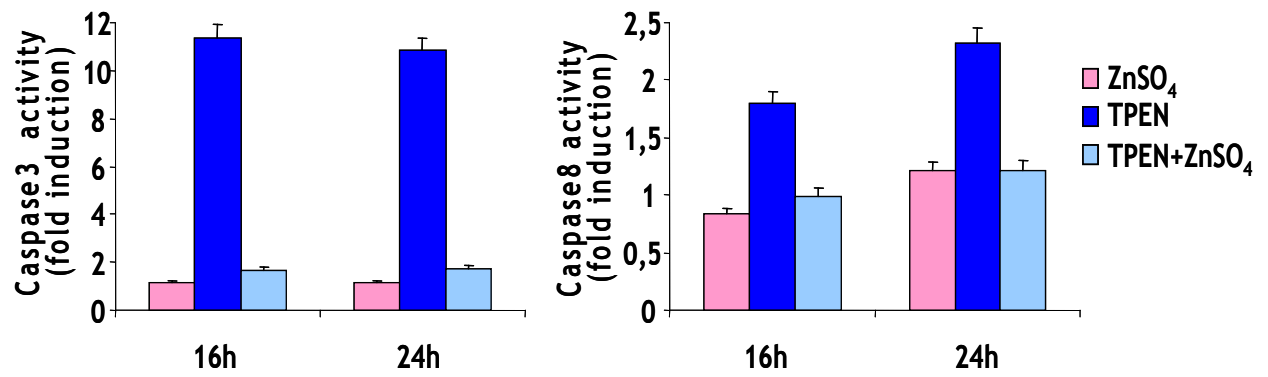


Figura 34. Il TPEN attiva le caspasi 3 e 8. Le PaCa44 sono state esposte a 10 μ M TPEN e/o 10 μ M ZnSO₄ per il tempo indicato. Le attività delle caspasi 3 e 8 sono state saggiate come descritto nei Materiali e Metodi. I valori presentati sono la media di tre esperimenti indipendenti.

6. DISCUSSIONE

In questo studio, sono stati valutati gli effetti delle variazioni dei livelli intracellulari dello ione zinco in linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico. È stato dimostrato che questa strategia permette di ottenere una riduzione della vitalità cellulare molto più marcata nelle cellule tumorali pancreatiche che nei fibroblasti normali. L'alterazione della concentrazione intracellulare di zinco determina lo scatenarsi di meccanismi molecolari diversi in relazione all'intensità dell'aumento o della diminuzione intracellulare di questo ione. L'aumento dei livelli di zinco è stato ottenuto trattando le cellule con un composto ad attività ionofora, il PDTC, con il quale è possibile modulare l'aumento della quantità di zinco intracellulare: bassa se il PDTC veicola tracce di zinco presenti nel mezzo di coltura oppure alta se si aggiunge zinco esogeno al terreno. Per quanto riguarda la riduzione di zinco intracellulare è stato utilizzato il TPEN, un chelante specifico per lo ione zinco altamente permeabile alla membrana cellulare.

6.1 Effetti e meccanismi molecolari coinvolti nell'aumento di zinco intracellulare

Nella prima parte di questo studio è stato dimostrato che il PDTC ha un effetto inibitorio sulla crescita di cellule di adenocarcinoma pancreatico, tramite un arresto in fase S del ciclo cellulare, mentre non ha effetto su fibroblasti primari. L'azione citotossica del PDTC è dovuta ad un aumento dei livelli di ROS e ad una fosforilazione ROS-dipendente di ERK1/2. Questa induzione è responsabile dell'aumentata stabilità dell'mRNA di *P21*, il quale ha un ruolo centrale nell'arresto della crescita cellulare come dimostrato tramite silenziamento genico con specifici oligonucleotidi antisenso. Al contrario, nei fibroblasti il PDTC fosforila ed attiva p53 inducendo, così, *SESN2*, gene target di p53 con funzione antiossidante, il quale è presumibilmente responsabile della resistenza di queste cellule all'azione antiproliferativa

del PDTC. Nella figura 35, è mostrato, per maggiore chiarezza, un modello di azione del PDTC sulle linee cellulari tumorali e sui fibroblasti.

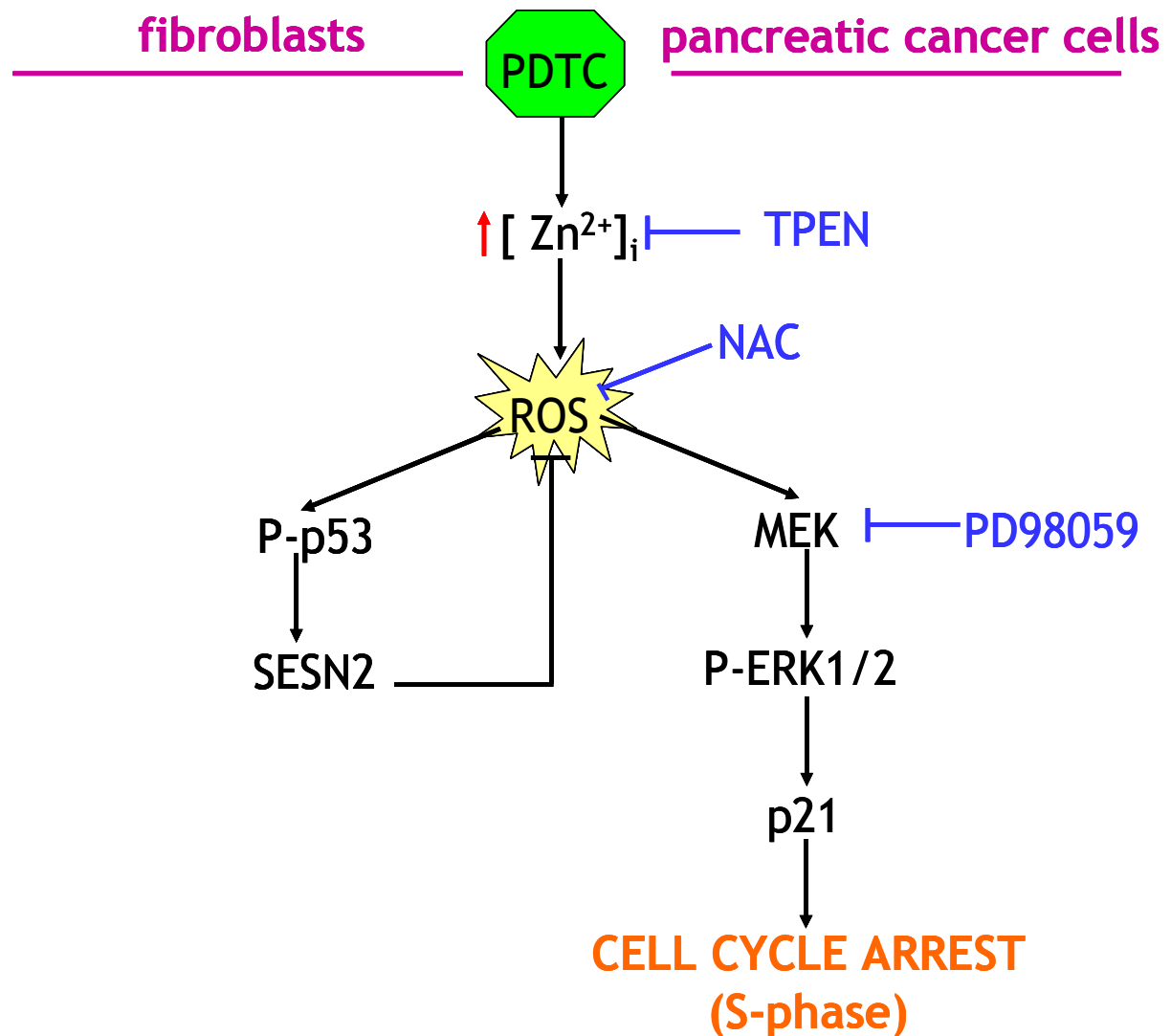


Figura 35. Modello dei meccanismi di azione del PDTC su linee cellulari tumorali e normali

Nella seconda parte dei risultati, è stato dimostrato che l'ulteriore aumento dei livelli di zinco intracellulare, ottenuto trattando le cellule con PDTC in associazione a dosi di per sé non tossiche di zinco, determina un'inibizione della crescita di cellule di adenocarcinoma pancreatico tramite l'induzione di una forte apoptosi. Il processo apoptotico è totalmente annullato dall'uso del TPEN o del NAC, dimostrando che l'incremento dei livelli di ROS, zinco-dipendenti, sono l'evento chiave dell'inibizione della crescita cellulare indotta da

Zn/PDTC. Inoltre, l'aumento di ROS genera una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale ed una traslocazione di AIF al nucleo, senza regolare l'espressione di geni apoptotici ed anti-apoptotici o l'attività delle caspasi 3 e 8. Rispetto alle cellule tumorali, i fibroblasti sono meno sensibili all'azione citotossica della combinazione Zn/PDTC. In queste cellule, inoltre, l'induzione di stress ossidativo riduce fortemente i livelli di espressione della proteina p53, promuovendone la degradazione proteasomale. La figura 36 illustra i meccanismi molecolari determinati da Zn/PDTC su linee cellulari tumorali e normali. Va notato che, rispetto al trattamento con il solo PDTC, il trattamento Zn/PDTC determina un aumento significativamente più consistente dei livelli intracellulari di zinco e di ROS inducendo così differenti meccanismi molecolari antiproliferativi.

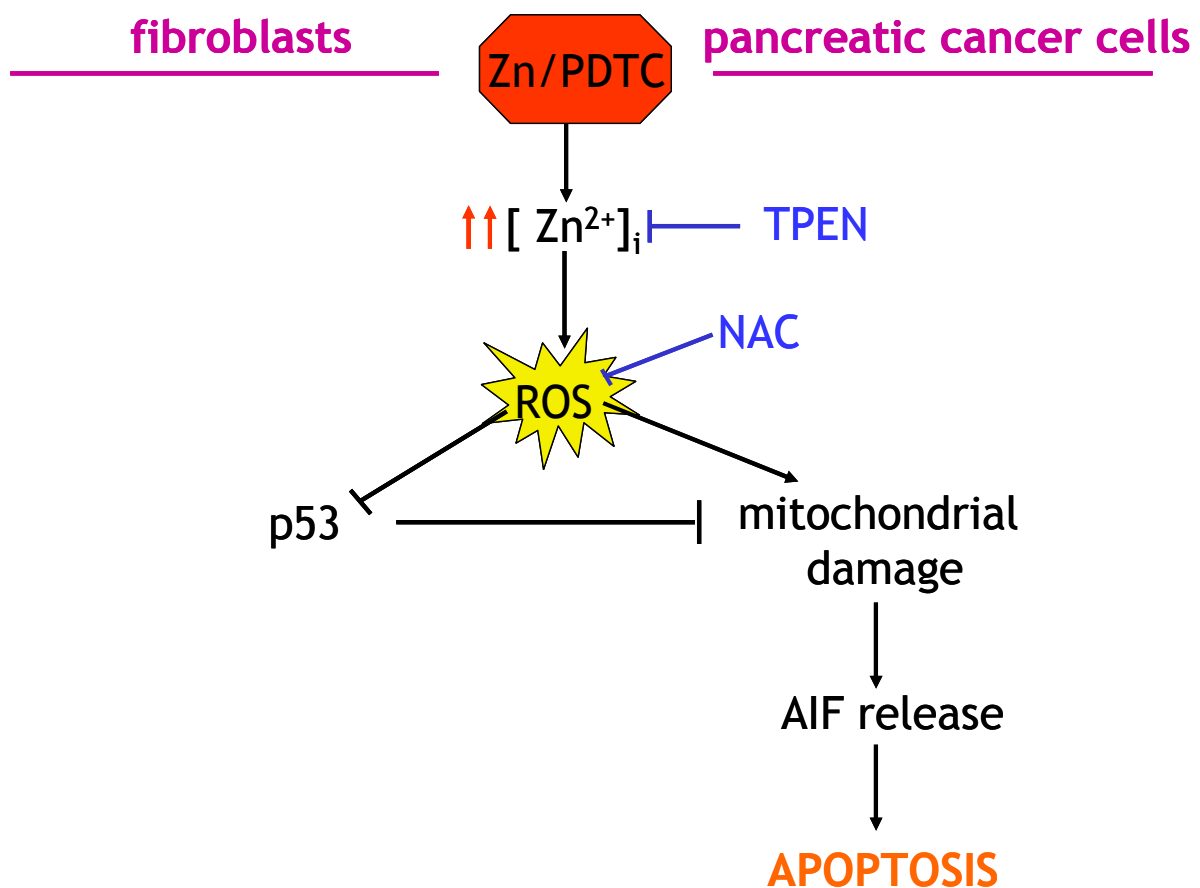


Figura 36. Modello dei meccanismi di azione del Zn/PDTC su linee cellulari tumorali e normali

Lo stress ossidativo causato dall'incremento di zinco intracellulare ha un ruolo chiave nell'induzione della morte apoptotica. In letteratura, sono presenti numerosi articoli che confermano una diretta relazione tra aumento intracellulare di zinco e stress ossidativo, anche se le ipotesi meccanicistiche sono varie. Le più significative sono le seguenti: a) lo zinco determina un rallentamento del trasporto degli elettroni a livello della catena respiratoria inibendo il complesso III [57] o il complesso IV [58]; b) lo zinco inibisce enzimi con attività antiossidante come la LADH, lipoamide deidrogenasi, [59] o GR, glutatione reduttasi, [60]; c) lo zinco produce radicali idrossilici tramite reazioni non enzimatiche [61].

L'aumento della concentrazione di zinco a livello intracellulare è, quindi, strettamente legato all'incremento dello stress ossidativo, il quale a sua volta determina lo scatenarsi di fenomeni diversi volti a proteggere la cellula dai danni causati dalle ROS o, se questi ultimi fossero troppo elevati, a promuoverne il "suicidio" cellulare per apoptosi [37]. Infatti, nel presente studio, bassi livelli di ROS inducono il potenziamento dei sistemi antiossidanti (aumento di *SESN2*); livelli intermedi promuovono sistemi di limitazione del danneggiamento cellulare (diminuzione di p53 e induzione di p21); livelli elevati inducono apoptosi. Questo concetto è rappresentato schematicamente in figura 37.

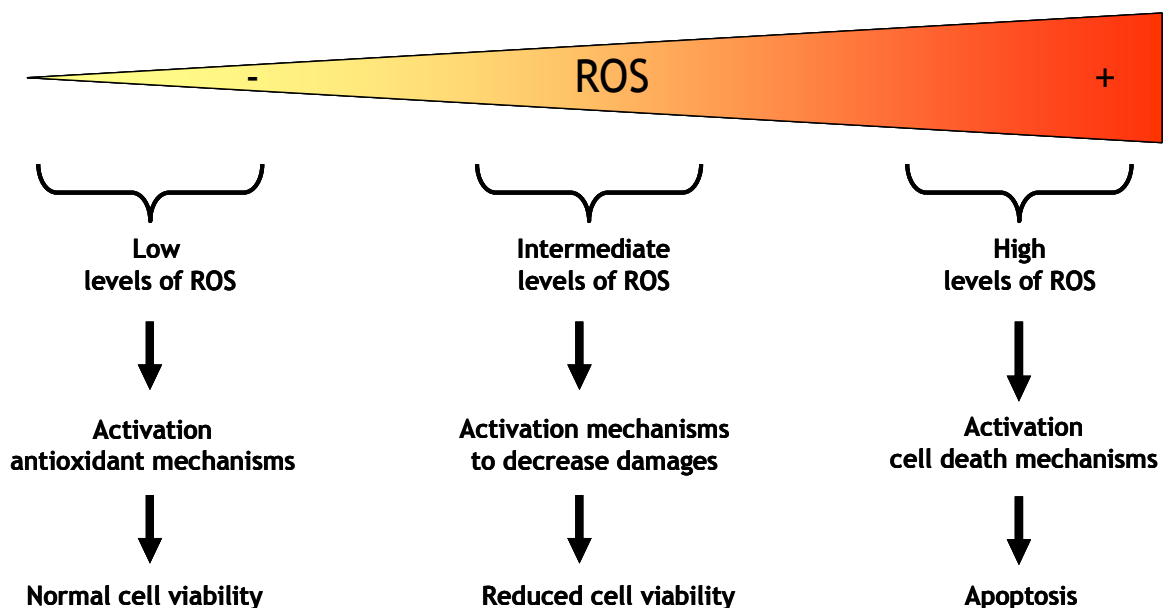


Figura 37. Effetti e meccanismi molecolari indotti dallo stress ossidativo

Uno degli effetti più significativi dei metalli e delle ROS sulle “pathways” di trasduzione del segnale è stato osservato nella famiglia delle MAP chinasi, importanti nei processi di carcinogenesi e nel controllo della proliferazione cellulare, del differenziamento e dell’apoptosi [62]. L’attivazione delle tre “pathways” di MAP chinasi (ERK, JNK, e p38) varia in funzione del tipo di ROS prodotta, della provenienza dello stimolo, della durata dell’esposizione e del tipo cellulare. E’ stato dimostrato che la produzione di ROS determina un rallentamento nel ciclo cellulare con incremento di p21 che è accompagnato da una fosforilazione di ERK1/2 e p38 [63]. Nel nostro modello cellulare e sotto lo stimolo del PDTC è possibile attribuire totalmente ad ERK1/2 la capacità di aumentare la stabilità dell’mRNA di *P21* e il conseguente blocco del ciclo cellulare in fase S. p21 è uno dei più importanti regolatori del ciclo cellulare ed è raramente mutato nei vari tipi di cancro, compreso quello pancreatico [64]. L’aumento di questa proteina causa generalmente un arresto in fase G1 e G2/M [52, 65] anche se sono stati pubblicati dei lavori [66, 67], in accordo con questo studio, in cui l’induzione di p21 in cellule di cancro del seno e delle ovaie determina un blocco in fase S.

E’ stato riportato che elevati livelli di ROS causano un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale e rilascio nel citosol di varie molecole che possono portare a morte programmata, in alcuni casi senza coinvolgimento delle caspasi [55]. Dati, che non sono mostrati in questa tesi, rivelano che l’apoptosi mediata da Zn/PDTC produce frammenti di DNA ad elevato peso molecolare e non è associata a rilascio nel citosol di citocromo c. Tutti questi dati, assieme a quelli di letteratura [56, 68] che confermano che l’apoptosi AIF-dipendente è associata alla degradazione del DNA in larghi frammenti e non è necessariamente accoppiata all’attivazione delle caspasi, suggeriscono fortemente che AIF

sia il maggior effettore dell'apoptosi ROS-dipendente indotta da Zn/PDTC in cellule pancreatiche tumorali.

Rispetto alle cellule tumorali, i fibroblasti sono più resistenti all'aumento di stress ossidativo, grazie all'attivazione dei sistemi di protezione che coinvolgono la regolazione di p53.

È stato riportato che in condizione di limitato stress ossidativo, bassi livelli di p53 sono sufficienti ad indurre geni codificanti proteine con funzione antiossidante che determinano, quindi, una diminuzione delle ROS intracellulari [54]. Nel presente studio, bassi livelli di ROS determinano fosforilazione di p53 con induzione di *SESN2*, suggerendo fortemente che il suo effetto antiossidante può annullare la produzione di ROS da parte del PDTC rendendo i fibroblasti resistenti all'azione citotossica di questo composto. Quando, invece, i fibroblasti sono sottoposti a livelli di ROS più elevati, la fosforilazione di p53 e i livelli dei geni target apoptotici o antiossidanti non variano, mentre c'è una forte riduzione della proteina p53 stessa. È noto che essa, oltre ad avere un ruolo come regolatore della trascrizione genica, ha anche un effetto pro-apoptotico diretto sul mitocondrio partecipando a interazioni proteiche con membri pro- e anti-apoptotici della famiglia di Bcl-2 [21]. p53 necessita di essere fosforilato quando funge da fattore trascrizionale [69], mentre le sue modificazioni post-traduzionali (fosforilazione o acetilazione) sono ininfluenti quando promuove l'apoptosi mitocondriale tramite l'interazione molecolare proteina-proteina [70]. Considerando tutti questi aspetti, la parziale resistenza dei fibroblasti ai trattamenti con PDTC e Zn/PDTC può dipendere da due fattori: 1) il minor aumento della concentrazione di zinco intracellulare e dello stress ossidativo rispetto alle cellule tumorali pancreatiche; 2) la funzione di p53 che, se attivata a bassi livelli dal solo PDTC, protegge tramite l'induzione di geni antiossidanti e, se degradata via proteasoma da un forte stress ossidativo, diminuisce il contributo diretto all'apoptosi mitocondriale.

In tipi tumorali esprimenti la proteina p53 non funzionante, la ricerca di nuove strategie volte a ridurre gli effetti collaterali sui tessuti normali, causati da una eccessiva morte cellulare da

chemio- e radioterapia, è orientata all'utilizzo di piccole molecole capaci di inibire p53 [71]. Un composto con queste caratteristiche potrebbe essere il PDTC, che, singolarmente o in associazione a zinco, agisce su p53 annullando o riducendo la citotossicità sulle cellule normali. Il PDTC, inoltre, è risultato essere molto più efficace del chemioterapico standard gemcitabina nell'inibizione della crescita di linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico. L'insieme delle proprietà descritte suggeriscono che l'incremento di zinco intracellulare possa essere una nuova e selettiva strategia per il trattamento del cancro del pancreas. In linea con questa ipotesi sono i risultati ottenuti *in vivo*, i quali dimostrano che il PDTC, senza determinare tossicità apparente, riduce fortemente, fino al 60%, il volume della massa di cellule di adenocarcinoma pancreatico cresciuta sottocute in topi nudi. Esperimenti *in vivo* eseguiti associando al PDTC dosi di zinco, non hanno mostrato un'ulteriore effetto antitumorale (dati non mostrati): ciò può essere spiegato considerando che la concentrazione di zinco nel plasma è circa 15-20 μ M [72], quantità sufficiente a generare una massimale azione antitumorale del PDTC.

6.2 Effetti e meccanismi molecolari coinvolti nella riduzione di zinco intracellulare

Lo studio sugli effetti della chelazione dello zinco intracellulare ha messo in luce che il TPEN è in grado di determinare, nelle cellule pancreatiche tumorali, arresto del ciclo cellulare ed apoptosi attraverso la regolazione di geni coinvolti nei due processi. Lo schema riassuntivo dei meccanismi di azione del TPEN è mostrato in figura 38.

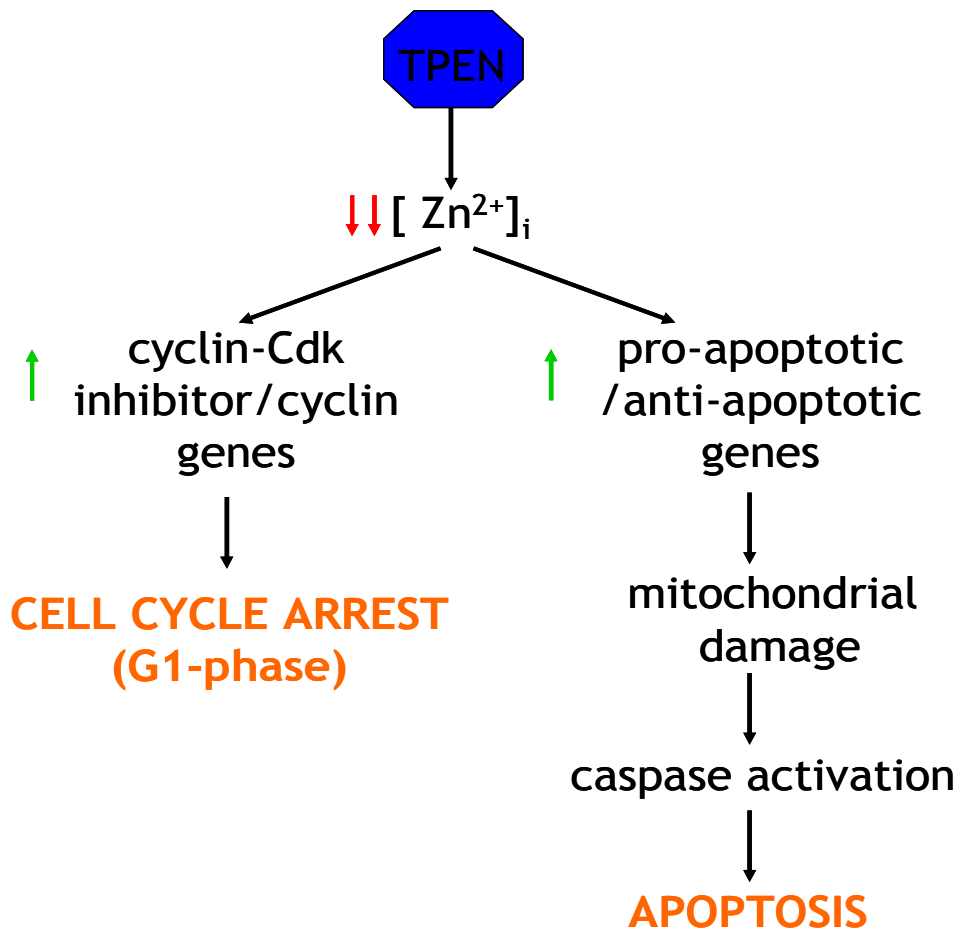


Figura 38. Modello dei meccanismi di azione del TPEN su linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico

Due sono gli effetti più interessanti del TPEN: 1) è molto più efficace nell'inibire la vitalità di linee cellulari tumorali pancreatiche rispetto ad altri sette composti anti-tumorali; 2) la sua attività citotossica è molto minore nei fibroblasti rispetto a cellule tumorali.

I chemioterapici in uso per il cancro del pancreas sono il 5-fluorouracile e la gemcitabina. Quest'ultima è considerata migliore sebbene presenti un tasso di risposta inferiore al 20% [73, 74]. Sarebbe quindi importante trovare dei nuovi composti che risultino più efficaci della gemcitabina nella cura del cancro del pancreas. In quest'ottica, i dati mostrati in questo lavoro diventano degni di attenzione. Esperimenti di proliferazione cellulare dose-dipendente e tempo-dipendente dimostrano che il TPEN è molto più efficace nell'inibire la crescita di cellule tumorali pancreatiche della gemcitabina (un nucleoside analogo della citidina) e del 5-

fluoruracile (una base analoga all'uracile) e di altri cinque composti anti-tumorali come l'irinotecan (un inibitore della DNA topoisomerasi I), il cisplatino (un intercalante del DNA), l'edelfosina (un alchilo-lisofosfolipide), la tricostatina A (un inibitore delle deacetilasi istoniche) e la mitomicina C (un inibitore della sintesi del DNA). Inoltre i risultati mostrano che, l'aggiunta di zinco al mezzo di coltura previene l'inibizione cellulare data dal TPEN, confermando che l'effetto citotossico dipende dalla sua attività chelante e non da effetti aspecifici.

Lo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nell'arresto del ciclo in fase G1 ha mostrato che il TPEN è in grado di aumentare il rapporto tra i livelli di espressione dei geni inibitori dei complessi ciclina-cdk (*P57* e *P19*) e i geni delle cicline (*CICLINA A* e *CICLINA B1*). È stato dimostrato in precedenza che l'induzione di p19 e p57 arresta la progressione del ciclo cellulare in fase G1 [75], mentre l'inibizione delle cicline A e B1 blocca il ciclo cellulare in fase S e G2/M e in fase G2/M, rispettivamente [76, 77]. Il TPEN modula l'espressione di geni del ciclo cellulare in modo da arrestare potenzialmente tutte le fasi del ciclo, quindi, oltre al blocco rilevato in fase G1, probabilmente dovuto al contributo prevalente dell'induzione di p19 e p57, si può ipotizzare che ci sia un rallentamento globale nella progressione del ciclo cellulare, non apprezzabile sperimentalmente dal calcolo dei valori percentuali. Inoltre, poiché il TPEN non è in grado di regolare altri geni coinvolti nel ciclo cellulare, come *P21* e *P27*, si può supporre che la riduzione di zinco agisca specificamente sull'attività di determinati attivatori o repressori trascrizionali di geni che controllano il ciclo cellulare. Una regolazione specifica dei geni del ciclo cellulare diventa importante soprattutto se si considera che il cancro del pancreas presenta una elevata frequenza di mutazione in *P16* e *P15* [78].

L'analisi apoptotica mostra che il TPEN è capace di indurre anche una forte morte cellulare apoptotica nelle cellule pancreatiche tumorali, che è completamente annullata dall'aggiunta di

ioni zinco. Le caratteristiche apoptotiche sono state confermate dalla presenza di nucleosomi nella frazione citoplasmatica di cellule tumorali trattate con TPEN (dati non mostrati). La riduzione di zinco intracellulare è in grado di incrementare il rapporto tra i livelli di espressione dei geni mitocondriali apoptotici e quelli anti-apoptotici, appartenenti alla famiglia di Bcl-2, di aumentare la percentuale delle cellule con un basso potenziale di membrana e di attivare le caspasi 3 e 8. Poiché i membri pro- e anti-apoptotici della famiglia di Bcl-2 sono noti per la loro funzione di regolare il macchinario apoptotico e i loro livelli di espressione relativi sono critici per il destino della cellula, l'incremento del rapporto dell'espressione dei geni apoptotici rispetto agli antiapoptotici può essere cruciale nell'induzione del processo apoptotico determinato da TPEN. Inoltre, poiché è stato dimostrato che lo zinco inibisce l'attivazione della caspasi 3 [33] la sua deplezione può favorire il processamento proteolitico della caspasi 3, inducendo apoptosi nelle cellule tumorali pancreatiche. Per quanto riguarda la caspasi 8, i dati presenti nella letteratura suggeriscono che la sua attivazione potrebbe non dipendere da un contributo diretto della diminuzione di zinco intracellulare, ma da una mera conseguenza dell'attivazione della caspasi 3 [79].

E' stato precedentemente dimostrato che il TPEN determina l'inibizione della crescita cellulare tramite l'induzione di stress ossidativo e di P53 [80, 81]. Per valutare se anche in questo caso, oltre a quello di un aumento dello zinco intracellulare dato dal PDTC, p53 avesse un ruolo nella parziale resistenza dei fibroblasti al TPEN, i fibroblasti sono stati trattati con il chelante per valutare i livelli di p53 e p53 fosforilato. Inoltre, è stata valutata la vitalità dei fibroblasti trattati con TPEN in assenza o presenza di NAC. L'esperimento di Western blot e la curva di crescita (non inseriti in questa tesi) hanno mostrato che il TPEN non è in grado né di regolare p53 né di indurre ROS, come rivela l'incapacità del NAC di annullare l'effetto antiproliferativo del TPEN. Quindi, la minor sensibilità al TPEN dei fibroblasti rispetto alle cellule tumorali, non è data dalla regolazione di p53, ma

probabilmente dalla differente riduzione del livello di zinco intracellulare dopo l'uso del chelante (circa 8 volte in meno nei fibroblasti).

In conclusione, in questa tesi è stato mostrato che agendo sull'omeostasi dello zinco, sia aumentando che diminuendo la sua concentrazione cellulare, è possibile inibire fortemente la crescita di cellule tumorali pancreatiche attraverso l'arresto nella progressione del ciclo cellulare e/o l'apoptosi, preservando almeno parzialmente la vitalità dei fibroblasti normali. L'insieme dei dati presentati può fornire la base per uno studio indirizzato allo sviluppo di una terapia contro il cancro del pancreas basata sull'omeostasi intracellulare dello zinco.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Donadelli, M., Dalla Pozza, E., Costanzo, C., Scupoli, M. T., *et al.*, Increased stability of P21(WAF1/CIP1) mRNA is required for ROS/ERK-dependent pancreatic adenocarcinoma cell growth inhibition by pyrrolidine dithiocarbamate. *Biochim Biophys Acta* 2006, **1763**:, 917-926.
- [2] Donadelli, M., Dalla Pozza, E., Costanzo, C., Scupoli, M. T., *et al.*, Zinc depletion efficiently inhibits pancreatic cancer cell growth by increasing the ratio of antiproliferative/proliferative genes. *J Cell Biochem* 2007,
- [3] Cardenes, H. R., Chiorean, E. G., Dewitt, J., Schmidt, M. and Loehrer, P., Locally advanced pancreatic cancer: current therapeutic approach. *Oncologist* 2006, **11**, 612-623.
- [4] Rosenberg, L., Pancreatic cancer: a review of emerging therapies. *Drugs* 2000, **59**, 1071-1089.
- [5] Raraty, M. G., Magee, C. J., Ghaneh, P. and Neoptolemos, J. P., New techniques and agents in the adjuvant therapy of pancreatic cancer. *Acta Oncol* 2002, **41**, 582-595.
- [6] Berlin, J. D., Catalano, P., Thomas, J. P., Kugler, J. W., *et al.*, Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol* 2002, **20**, 3270-3275.
- [7] Burris, H. A., 3rd, Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., *et al.*, Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997, **15**, 2403-2413.
- [8] Shi, X., Liu, S., Kleeff, J., Friess, H. and Buchler, M. W., Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. *Oncology* 2002, **62**, 354-362.
- [9] Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y. Z., Heinemann, V., *et al.*, Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol* 1995, **22**, 3-10.
- [10] Clarke, M. L., Mackey, J. R., Baldwin, S. A., Young, J. D. and Cass, C. E., The role of membrane transporters in cellular resistance to anticancer nucleoside drugs. *Cancer Treat Res* 2002, **112**, 27-47.
- [11] Achiwa, H., Oguri, T., Sato, S., Maeda, H., *et al.*, Determinants of sensitivity and resistance to gemcitabine: the roles of human equilibrative nucleoside transporter 1 and deoxycytidine kinase in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2004, **95**, 753-757.
- [12] Cascallo, M., Calbo, J., Gelpi, J. L. and Mazo, A., Modulation of drug cytotoxicity by reintroduction of wild-type p53 gene (Ad5CMV-p53) in human pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther* 2000, **7**, 545-556.
- [13] Galmarini, C. M., Clarke, M. L., Falette, N., Puisieux, A., *et al.*, Expression of a non-functional p53 affects the sensitivity of cancer cells to gemcitabine. *Int J Cancer* 2002, **97**, 439-445.
- [14] Klimstra, D. S. and Longnecker, D. S., K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *Am J Pathol* 1994, **145**, 1547-1550.
- [15] Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S. A., *et al.*, Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997, **57**, 1731-1734.
- [16] Ramirez, P. J. and Vickers, S. M., Current status of gene therapy for pancreatic cancer. *Curr Surg* 2004, **61**, 84-92.
- [17] Hustinx, S. R., Leoni, L. M., Yeo, C. J., Brown, P. N., *et al.*, Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod Pathol* 2005, **18**, 959-963.

- [18] Zhang, Y., Xiong, Y. and Yarbrough, W. G., ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998, 92, 725-734.
- [19] Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N. and Depinho, R. A., Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2006, 20, 1218-1249.
- [20] Lane, D. P., Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 358, 15-16.
- [21] Moll, U. M., Marchenko, N. and Zhang, X. K., p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* 2006, 25, 4725-4743.
- [22] Kobrin, M. S., Funatomi, H., Friess, H., Buchler, M. W., *et al.*, Induction and expression of heparin-binding EGF-like growth factor in human pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 202, 1705-1709.
- [23] Korc, M., Chandrasekar, B., Yamanaka, Y., Friess, H., *et al.*, Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest* 1992, 90, 1352-1360.
- [24] Friess, H., Kleeff, J., Korc, M. and Buchler, M. W., Molecular aspects of pancreatic cancer and future perspectives. *Dig Surg* 1999, 16, 281-290.
- [25] Beyersmann, D. and Haase, H., Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* 2001, 14, 331-341.
- [26] McCall, K. A., Huang, C. and Fierke, C. A., Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 2000, 130, 1437S-1446S.
- [27] Vallee, B. L. and Falchuk, K. H., The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 1993, 73, 79-118.
- [28] Outten, C. E. and O'Halloran, T. V., Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 2001, 292, 2488-2492.
- [29] Gaither, L. A. and Eide, D. J., Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals* 2001, 14, 251-270.
- [30] Cousins, R. J., Liuzzi, J. P. and Lichten, L. A., Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem* 2006, 281, 24085-24089.
- [31] Truong-Tran, A. Q., Ho, L. H., Chai, F. and Zalewski, P. D., Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J Nutr* 2000, 130, 1459S-1466S.
- [32] Chai, F., Truong-Tran, A. Q., Ho, L. H. and Zalewski, P. D., Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: A review. *Immunol Cell Biol* 1999, 77, 272-278.
- [33] Takahashi, A., Alnemri, E. S., Lazebnik, Y. A., Fernandes-Alnemri, T., *et al.*, Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93, 8395-8400.
- [34] Jiang, D., Sullivan, P. G., Sensi, S. L., Steward, O. and Weiss, J. H., Zn(2+) induces permeability transition pore opening and release of pro-apoptotic peptides from neuronal mitochondria. *J Biol Chem* 2001, 276, 47524-47529.
- [35] Schrantz, N., Auffredou, M. T., Bourgeade, M. F., Besnault, L., *et al.*, Zinc-mediated regulation of caspases activity: dose-dependent inhibition or activation of caspase-3 in the human Burkitt lymphoma B cells (Ramos). *Cell Death Differ* 2001, 8, 152-161.
- [36] Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., *et al.*, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39, 44-84.
- [37] Boonstra, J. and Post, J. A., Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004, 337, 1-13.

- [38] Halliwell, B., Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007, 401, 1-11.
- [39] Laurent, A., Nicco, C., Chereau, C., Goulvestre, C., *et al.*, Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 2005, 65, 948-956.
- [40] Pelicano, H., Carney, D. and Huang, P., ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004, 7, 97-110.
- [41] Fitsanakis, V. A., Amarnath, V., Moore, J. T., Montine, K. S., *et al.*, Catalysis of catechol oxidation by metal-dithiocarbamate complexes in pesticides. *Free Radic Biol Med* 2002, 33, 1714-1723.
- [42] Liesivuori, J. and Savolainen, K., Dithiocarbamates. *Toxicology* 1994, 91, 37-42.
- [43] Shinobu, L. A., Jones, S. G. and Jones, M. M., Mobilization of aged cadmium deposits by dithiocarbamates. *Arch Toxicol* 1983, 54, 235-242.
- [44] Lang, J. M., Touraine, J. L., Trepo, C., Choutet, P., *et al.*, Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of ditiocarb sodium ('Imuthiol') in human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 1988, 2, 702-706.
- [45] Chinery, R., Brockman, J. A., Peeler, M. O., Shyr, Y., *et al.*, Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBPbeta. *Nat Med* 1997, 3, 1233-1241.
- [46] Herrmann, J. L., Beham, A. W., Sarkiss, M., Chiao, P. J., *et al.*, Bcl-2 suppresses apoptosis resulting from disruption of the NF-kappa B survival pathway. *Exp Cell Res* 1997, 237, 101-109.
- [47] Malaguarnera, L., Pilastro, M. R., DiMarco, R., Scifo, C., *et al.*, Cell death in human acute myelogenous leukemic cells induced by pyrrolidinedithiocarbamate. *Apoptosis* 2003, 8, 539-545.
- [48] Di Nicuolo, F., Serini, S., Boninsegna, A., Palozza, P. and Calviello, G., Redox regulation of cell proliferation by pyrrolidine dithiocarbamate in murine thymoma cells transplanted in vivo. *Free Radic Biol Med* 2001, 31, 1424-1431.
- [49] Shmist, Y. A., Kamburg, R., Ophir, G., Kozak, A., *et al.*, N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine improves myocardial protection against ischemia by modulation of intracellular Ca²⁺ homeostasis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 313, 1046-1057.
- [50] Adler, M., Dinterman, R. E. and Wannemacher, R. W., Protection by the heavy metal chelator N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) against the lethal action of botulinum neurotoxin A and B. *Toxicon* 1997, 35, 1089-1100.
- [51] Moore, P. S., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., *et al.*, Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* 2001, 439, 798-802.
- [52] Moon, S. K., Jung, S. Y., Choi, Y. H., Lee, Y. C., *et al.*, PDTC, metal chelating compound, induces G1 phase cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells through inducing p21Cip1 expression: involvement of p38 mitogen activated protein kinase. *J Cell Physiol* 2004, 198, 310-323.
- [53] Moon, S. K., Jung, S. Y. and Kim, C. H., Transcription factor Sp1 mediates p38MAPK-dependent activation of the p21WAF1 gene promoter in vascular smooth muscle cells by pyrrolidine dithiocarbamate. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 316, 605-611.
- [54] Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., *et al.*, The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 2005, 11, 1306-1313.
- [55] Fleury, C., Mignotte, B. and Vayssiere, J. L., Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 2002, 84, 131-141.
- [56] Zhang, X., Chen, J., Graham, S. H., Du, L., *et al.*, Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J Neurochem* 2002, 82, 181-191.

- [57] Berry, E. A., Zhang, Z., Bellamy, H. D. and Huang, L., Crystallographic location of two Zn(2+)-binding sites in the avian cytochrome bc(1) complex. *Biochim Biophys Acta* 2000, *1459*, 440-448.
- [58] Francia, F., Giachini, L., Boscherini, F., Venturoli, G., *et al.*, The inhibitory binding site(s) of Zn²⁺ in cytochrome c oxidase. *FEBS Lett* 2007, *581*, 611-616.
- [59] Gazaryan, I. G., Krasnikov, B. F., Ashby, G. A., Thorneley, R. N., *et al.*, Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase. *J Biol Chem* 2002, *277*, 10064-10072.
- [60] Bishop, G. M., Dringen, R. and Robinson, S. R., Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radic Biol Med* 2007, *42*, 1222-1230.
- [61] Lee, J., Kim, M. S., So, H. S., Park, C., *et al.*, Protective effects of Debo on zinc-induced apoptosis of C6 glial cells via modulation of intracellular antioxidant, reduced glutathione. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001, *23*, 383-396.
- [62] Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006, *160*, 1-40.
- [63] Zhang, Z., Leonard, S. S., Huang, C., Vallyathan, V., *et al.*, Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G(2)/M phase arrest. *Free Radic Biol Med* 2003, *34*, 1333-1342.
- [64] DiGiuseppe, J. A., Redston, M. S., Yeo, C. J., Kern, S. E. and Hruban, R. H., p53-independent expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 1995, *147*, 884-888.
- [65] Wendt, J., Radetzki, S., von Haefen, C., Hemmati, P. G., *et al.*, Induction of p21(CIP/WAF-1) and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene* 2005,
- [66] Somasundaram, K., Zhang, H., Zeng, Y. X., Houvras, Y., *et al.*, Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CiP1. *Nature* 1997, *389*, 187-190.
- [67] Zhang, Y., Rishi, A. K., Dawson, M. I., Tschang, R., *et al.*, S-phase arrest and apoptosis induced in normal mammary epithelial cells by a novel retinoid. *Cancer Res* 2000, *60*, 2025-2032.
- [68] Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., *et al.*, Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001, *410*, 549-554.
- [69] Steegenga, W. T., van der Eb, A. J. and Jochemsen, A. G., How phosphorylation regulates the activity of p53. *J Mol Biol* 1996, *263*, 103-113.
- [70] Nemajerova, A., Erster, S. and Moll, U. M., The post-translational phosphorylation and acetylation modification profile is not the determining factor in targeting endogenous stress-induced p53 to mitochondria. *Cell Death Differ* 2005, *12*, 197-200.
- [71] Gudkov, A. V. and Komarova, E. A., Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, *331*, 726-736.
- [72] Whitehouse, R. C., Prasad, A. S., Rabbani, P. I. and Cossack, Z. T., Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. *Clin Chem* 1982, *28*, 475-480.
- [73] Haller, D. G., New perspectives in the management of pancreas cancer. *Semin Oncol* 2003, *30*, 3-10.
- [74] Li, D., Xie, K., Wolff, R. and Abbruzzese, J. L., Pancreatic cancer. *Lancet* 2004, *363*, 1049-1057.
- [75] Schwarze, S. R., Shi, Y., Fu, V. X., Watson, P. A. and Jarrard, D. F., Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* 2001, *20*, 8184-8192.

- [76] Desdouets, C., Sobczak-Thépot, J., Murphy, M. and Brechot, C., Cyclin A: function and expression during cell proliferation. *Prog Cell Cycle Res* 1995, *1*, 115-123.
- [77] Porter, L. A. and Donoghue, D. J., Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res* 2003, *5*, 335-347.
- [78] Naumann, M., Savitskaia, N., Eilert, C., Schramm, A., *et al.*, Frequent codeletion of p16/MTS1 and p15/MTS2 and genetic alterations in p16/MTS1 in pancreatic tumors. *Gastroenterology* 1996, *110*, 1215-1224.
- [79] Chimienti, F., Seve, M., Richard, S., Mathieu, J. and Favier, A., Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochem Pharmacol* 2001, *62*, 51-62.
- [80] Ho, E., Courtemanche, C. and Ames, B. N., Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts. *J Nutr* 2003, *133*, 2543-2548.
- [81] Ho, E. and Ames, B. N., Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, *99*, 16770-16775.