



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE SPERIMENTALI

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE
INDIRIZZO: BIOLOGIA CELLULARE
XX CICLO**

**MODULAZIONE TERMICA DELL'ESPRESSIONE DELLA
SUBUNITA' CATALITICA DELLA TOSSINA DIFTERICA
E DELLE SUE VARIANTI CRM176 E CRM197 NELLA
TERAPIA GENICA DEL CARCINOMA DEL PANCREAS**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. TULLIO POZZAN

Supervisore: Ch.mo Prof. CESARE MONTECUCCO

Dottorando: Dott.ssa PAOLA FOGAR

31 gennaio 2008

La ricerca oggetto della tesi

- è stata condotta, in parte preponderante, presso la sezione di Biologia Molecolare del Servizio Medicina di Laboratorio dell’Azienda Ospedaliera di Padova diretto dal Prof. Mario Plebani;
- rientra negli obiettivi del Progetto “Miglioramento della stadiazione e controllo della crescita del carcinoma pancreatico in vitro ed in vivo” di cui è responsabile il Prof. Sergio Pedrazzoli.

Supervisor esterni: Prof. Mario Plebani

Prof. Sergio Pedrazzoli

INDICE

| | |
|---|-----------|
| RIASSUNTO | 5 |
| SUMMARY | 7 |
| 1. INTRODUZIONE | 9 |
| 1.1 Il carcinoma del pancreas..... | 9 |
| 1.2 Approcci di terapia genica sviluppati per il carcinoma pancreatico..... | 11 |
| 1.3 Tossina difterica | 26 |
| 1.4 Controllo dell'espressione genica nel carcinoma del pancreas | 28 |
| 1.5 Heat shock proteins..... | 29 |
| 2. SCOPI | 37 |
| 3. MATERIALI E METODI..... | 39 |
| 3.1 Linee cellulari | 39 |
| 3.2 Vettori plasmidici | 39 |
| 3.3 Vettore plasmidico con promotore costitutivo (pGFP) | 40 |
| 3.4 Vettori plasmidici sotto il controllo di promotore termoinducibile | 42 |
| 3.5 Trasfezione delle linee cellulari di carcinoma del pancreas..... | 45 |
| 3.6 Analisi dell'espressione di eGFP (FACS, Western Blot, Real time PCR) | 47 |
| 3.7 Esperimenti di shock termico..... | 53 |
| 3.8 Confronto dei livelli di espressione di eGFP tra i diversi vettori sottoposti a shock termico. | 54 |
| 3.9 Prove di citotossicità <i>in vitro</i> per le linee cellulari trasfettate con pHsp-DTA wt, pHsp-DTA176 e pHsp-DTA197 | 54 |
| 4. RISULTATI..... | 55 |
| 4.1 Espressione di Hsp70B' in linee cellulari di carcinoma pancreatico | 55 |
| 4.2 Individuazione della temperatura ottimale di shock termico | 55 |
| 4.3 Individuazione del tempo di esposizione ottimale allo shock termico | 57 |
| 4.4 Confronto tra i livelli di espressione dell'eGFP nelle linee neoplastiche pancreatiche trasfettate con i vettori termoregolabili V1, V2 e V3 | 58 |
| 4.5 Confronto tra i livelli di trascrizione del gene eGFP nelle linee neoplastiche pancreatiche trasfettate con i vettori termoregolabili V1, V2 e V3 | 60 |
| 4.6 Espressione di DTA e delle sue varianti CRM176 e CRM197 pilotata dal promotore termoregolabile pHsp-473+104..... | 61 |
| 5. DISCUSSIONE..... | 65 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 69 |

RIASSUNTO

L'impiego di composti altamente tossici per la cellula eucariote, come alcune tossine batteriche, potrebbe rappresentare un efficace approccio terapeutico per il carcinoma pancreatico.

Obiettivi della tesi sono stati: 1. realizzare dei vettori di espressione genica codificanti composti altamente tossici per la cellula eucariote, la cui trascrizione potesse essere indotta dalla esposizione a fonti esterne di calore; 2. verificare *in vitro* il loro possibile utilizzo nella terapia genica del carcinoma pancreatico.

Primo obiettivo

La subunità catalitica della tossina difterica (DTA) e le varianti CRM176 e CRM197 sono state utilizzate in questo studio come elementi di sicura tossicità cellulare. Tra le diverse tecniche sviluppate per confinare l'espressione genica di queste tossine al tessuto bersaglio, abbiamo identificato i promotori termoregolabili che permettono di controllare l'espressione del gene d'interesse in maniera sito specifica attraverso l'applicazione di una sorgente di calore esterna. La scelta è ricaduta sul promotore di HSPA6 (codificante la proteina Hsp70B') in quanto di provata efficienza, strettamente inducibile e con espressione basale praticamente assente in molti tessuti.

Abbiamo realizzato tre vettori di espressione che differivano nella sequenza della regione del promotore termoregolabile. La messa a punto delle condizioni operative è stata ottenuta mediante l'impiego dell'eGFP come gene reporter. Il promotore del vettore di espressione V1 era rappresentato da una sequenza di 473 paia di basi presente in commercio, omologa per il 91% a quella del promotore di Hsp70B'. Abbiamo realizzato un promotore sintetico di 104 bp (V2), costituito da 5 elementi HSE (Heat Shock Elements) e dalla sequenza del promotore minimo di HSPA6. Il promotore del terzo vettore di espressione, V3, era il risultato della fusione dei promotori di V1 e V2.

Al fine di identificare le condizioni ottimali di shock termico (temperatura e durata di esposizione) abbiamo utilizzato quattro linee cellulari neoplastiche transfettate stabilmente con il vettore V1. L'esposizione a 42,5°C per 1,5 ore è risultata la migliore combinazione temperatura/tempo in grado di indurre un aumento significativo dei livelli di trascrizione (Real Time PCR) e traduzione (analisi FACS) di eGFP in tutte le linee testate.

Questa combinazione temperatura/tempo è stata utilizzata per confrontare l'efficienza dei tre vettori studiati. L'analisi dei livelli di trascrizione e di traduzione documentava la presenza di un minimo livello di espressione anche in condizioni basali (37°C) nelle cellule transfettate con tutti i tre vettori.

Lo shock termico induceva un diverso aumento dei livelli di trascrizione, minimi e sovrapponibili dopo trasfezione con V1 o V2 (livelli di mRNA circa 8 volte superiori al basale), massimi dopo trasfezione con V3 (livelli di mRNA circa 30 volte superiori al basale).

V3 pertanto offriva la migliore combinazione fra efficienza di trascrizione controllabile mediante esposizione al calore e background di trascrizione basale ed è stato scelto per pilotare l'espressione di DTA e delle sue varianti meno tossiche.

Secondo obiettivo

A 37°C, la crescita di tutte le linee cellulari trasfettate con DTA o con la variante CRM176, venti volte meno attiva, risultava significativamente inibita a dimostrazione che anche minime quantità sintetizzate sono letali. Alla luce di questi risultati le due tossine non si possono considerare candidati idonei per protocolli di terapia genica utilizzando il promotore di V3.

Cellule neoplastiche pancreatiche trasfettate con la variante CRM197, descritta in letteratura come inattiva, presentavano lieve sofferenza se mantenute a 37°C, suggerendo che questa variante di DTA non è completamente inattiva. Questo assunto veniva confermato dopo l'induzione termica, che causava una ridotta proliferazione cellulare in tutte le linee studiate. Alla luce di questi risultati è possibile ipotizzare che l'azione tossica della variante CRM197, sicuramente inferiore a quella di DTA e della variante CRM176, sia dose-correlata.

In un protocollo di terapia genica l'utilizzo della variante CRM197 potrebbe avere il vantaggio di unire all'azione tossica diretta, limitata e controllabile, la capacità di indurre una risposta immunitaria antineoplastica.

Conclusioni

Il vettore di espressione per cellule eucariote comprendente il promotore termoregolabile di V3 (fusione del promotore commerciale di V1 con la sequenza sintetica da noi disegnata) e, a valle, la sequenza codificante la variante CRM197, può essere considerato un importante punto di partenza per future applicazioni di terapia genica per il carcinoma pancreatico *in vivo*.

SUMMARY

Despite surgery and/or chemotherapy more than 80% of patients affected by pancreatic cancer do not survive more than 5 years after diagnosis.

Gene therapy with bacterial toxins might be an effective approach for pancreatic cancer treatment.

The aims of the present study were: 1. to create expression vectors, encoding highly toxic compounds, which can be activated and modulated by heat; 2. to verify, *in vitro*, their possible application in pancreatic cancer gene therapy.

First objective

The catalytic domain of diphtheria toxin (DTA) and of its variants CRM176 and CRM197 have been employed in this study as potent inhibitors of protein synthesis.

To confine the expression of these cytotoxic agents to neoplastic tissue we focused our attention on heat inducible promoters, which allow a selective spatial and time control of gene induction by external heat.

We chose the promoter of HSPA6 (encoding Hsp70B' protein) because it is strictly inducible, its basal expression levels being barely detectable in most tissues.

We engineered three expression vectors with different heat-inducible HSPA6-derived promoter sequences driving the reporter gene eGFP: V1 containing a 473bp commercial sequence with a 91% homology to HSPA6; V2 with a 104bp sequence designed by us containing five Heat Shock Elements in tandem and the minimal promoter of HSPA6; V3 containing the 104bp sequence located downstream the 473bp promoter.

In order to define the optimal heat shock temperature and exposure time we used four pancreatic cancer cell lines stably transfected with V1: the highest levels of eGFP expression (measured by Q-RT-PCR and FACS analysis) were obtained with a heat shock of 42,5°C for 1,5 hours.

After setting the experimental conditions we compared the eGFP protein and mRNA levels in V1, V2 and V3 transfected pancreatic cancer cell lines.

At 37°C there were minimal eGFP expression levels in cells transfected with all three vectors. After heat shock, however, V1, V2 and V3 transfected cells behaved differently: V1 and V2 transfected lines showed low and similar levels of expression (fold increase in mRNA about 8) while V3 transfected cells were highly induced by heat reaching up to 30 times the basal levels.

V3, therefore, was shown to offer the best combination of high transcription efficiency and low background levels and was selected to drive the expression of DTA and its less toxic variants.

Second objective

The growth of all cell lines, transfected with DTA or its twenty fold less active variant CRM176, was significantly delayed even at 37°C. In other words the basal transcription levels of these toxins are sufficient to cause cell death; therefore DTA and CRM176 cannot be considered suitable candidates for gene therapy protocols using V3 promoter.

At 37°C the supposedly inactive toxin CRM197 caused mild distress in transfected cells. After heat shock this phenomenon was amplified: cell growth was reduced in all CRM197 transfected cell lines.

These findings indicate that the lethal effects of CRM197 are probably dose correlated.

A spatial and time controlled expression of this toxin variant might offer the opportunity of combining its cytotoxic effects with its immunogenic properties, which may help antitumor immune system reaction.

Conclusions

The expression vector with the V3 heat-inducible promoter driving the CRM197 variant can be considered a promising starting point for future *in vivo* applications of pancreatic cancer gene therapy.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il carcinoma del pancreas

Il carcinoma del pancreas è uno tra i più letali carcinomi che affliggono i paesi industrializzati. Negli Stati Uniti è causa di 32.000 ed in Italia di 7.000 morti l'anno. Negli ultimi cinque anni l'incidenza è rimasta invariata (Jemal A et al., 2007). Occupa il secondo posto tra le patologie gastrointestinali più ricorrenti ed è la quarta causa di morte per cancro dopo polmone, colon-retto e mammella. (Greenlee RT et al., 2000; Edwards BK et al., 2005). Il tasso di sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi si aggira intorno al 5%. La maggior parte dei pazienti, infatti, muore entro il primo anno dalla scoperta della malattia e quasi la totalità dei pazienti sviluppa metastasi.

Il tumore del pancreas viene ancora oggi diagnosticato quando la malattia è in fase avanzata. Accanto all'elevata capacità metastatizzante di tale carcinoma, le principali cause di diagnosi tardiva sono la difficoltà nella visualizzazione anatomica del pancreas ed una fase clinica silente che causa solamente sintomi aspecifici di solito attribuiti ad altre cause. Sintomi più caratteristici, dovuti ad invasione di altri organi e/o compressione dei dotti biliari, si presentano quando il tumore è in fase avanzata. Questi sintomi comprendono: calo ponderale, anoressia, dolore epigastrico irradiato al dorso, ittero, astenia, nausea e vomito.

Il perfezionamento degli strumenti diagnostici, che ha ridotto l'intervallo di tempo tra l'inizio dei sintomi e la diagnosi della malattia, non sembra averne migliorato la prognosi. L'individuazione dei fattori di rischio potrebbe perciò permettere una prevenzione primaria del carcinoma pancreatico. I principali fattori coinvolti sono l'età ed il fumo di sigaretta (Anderson KE et al., 1996). Nell'80% dei casi il carcinoma del pancreas insorge tra i 60-70 anni e attualmente colpisce in egual misura maschi e femmine (Gardis L et al., 1993; Rajiman I et al., 1993; Chappuis P et al., 2001;). Questo dato epidemiologico, in contrasto con il rapporto M/F stimato pari a circa 3/1 nei decenni passati, trova spiegazione, probabilmente, nell'aumentato consumo di sigarette da parte delle donne. Il fumo di sigaretta è responsabile del 25-29% dei casi di cancro al pancreas (Fryzek JP et al., 1997) ed è importante sottolineare che il rischio di sviluppare il carcinoma pancreatico diminuisce progressivamente negli ex-fumatori.

La tabella 1 riporta altri fattori associati al carcinoma del pancreas.

| FATTORI AMBIENTALI | FATTORI PATOLOGICI | FATTORI GENETICI |
|--|---------------------|------------------------------|
| Fumo | Diabete mellito | Pancreatite ereditaria |
| Dieta ricca di carne e povera di fibre | Pancreatite cronica | Cancro Pancreatico Familiare |
| Esposizione a sostanze cancerogene | | |

Tabella 1.1 *Fattori eziologici del tumore pancreatico*

Attualmente i soli approcci utilizzabili per il trattamento del carcinoma del pancreas sono quelli convenzionali: chirurgia, radioterapia, chemioterapia o la loro combinazione. La diagnosi precoce di questa neoplasia (tumore confinato al pancreas del diametro inferiore a 2 cm) consente di intervenire con una terapia chirurgica radicale che innalza il tasso di sopravvivenza al 20% dopo cinque anni dall'intervento (Ammori JB et al., 2003).

È noto che il carcinoma pancreatico è chemioresistente: tra il vasto numero di chemioterapici utilizzabili solo il 5-Fluorouracile (5-FU) e la gemcitabina (una deossicitidina analogo della citarabina) (El Kamar FG et al., 2003; Haller DG, 2003; Longley DB et al., 2003) hanno dato delle parziali risposte cliniche. In particolare questo ultimo farmaco viene attualmente utilizzato negli schemi chemioterapici per il carcinoma pancreatico. Infatti la somministrazione di gemcitabina ha innalzato la percentuale di sopravvivenza al 18% ad un anno, contro quella ottenuta dopo somministrazione di 5-FU che è solo del 2%. Ad ogni modo entrambi i farmaci non modificano nel complesso il tasso di sopravvivenza (Gilliam AD et al., 2002; El Kamar FG et al., 2003; Haller DG, 2003; Longley DB et al., 2003).

Di fronte ad un quadro non certo incoraggiante, nell'ultimo decennio i tentativi si sono rivolti alla ricerca di metodi alternativi di approccio terapeutico comprendenti le strategie geniche. I progressi nella conoscenza della genetica del carcinoma del pancreas, con l'identificazione di geni associati al tumore, caratteristici profili di espressione genica e mutazioni nelle cellule tumorali, hanno aperto nuove opportunità di applicazione della terapia genica anche in questa neoplasia.

1.2 Approcci di terapia genica sviluppati per il carcinoma pancreatico

La terapia genica ha come scopo la correzione di difetti genetici o l'espressione genica di prodotti di utilità terapeutica. Essa trasmette istruzioni, sotto forma di sequenze di DNA, alle cellule malate in modo tale che queste producano proteine capaci di contrastare la patologia. Il primo esperimento di terapia genica sull'uomo, che ricevette formale approvazione, ebbe inizio nel 1990 e mirava a curare la deficienza di adenosina-deaminasi. Venne introdotto il gene per l'adenosina deaminasi nei linfociti isolati da un paziente che presentavano un difetto a carico di tale enzima. Da allora questo tipo di approccio terapeutico ha consentito notevoli passi avanti specialmente nella lotta contro il cancro (Anderson WF, 1992 e 1994; Humphreys MJ et al., 1999; Rigg AS et al., 1999; Rubanyi GM, 2001; Tseng JF et al., 2002 Katz MH et al., 2003).

1.2.1 Terapia genica mirata alla correzione di difetti genetici

Nel caso specifico del carcinoma pancreatico, la terapia genica ha cercato, in primo luogo, di correggere alcuni dei numerosi difetti genetici che sono stati riscontrati a carico delle cellule neoplastiche pancreatiche (Figura 1.1).

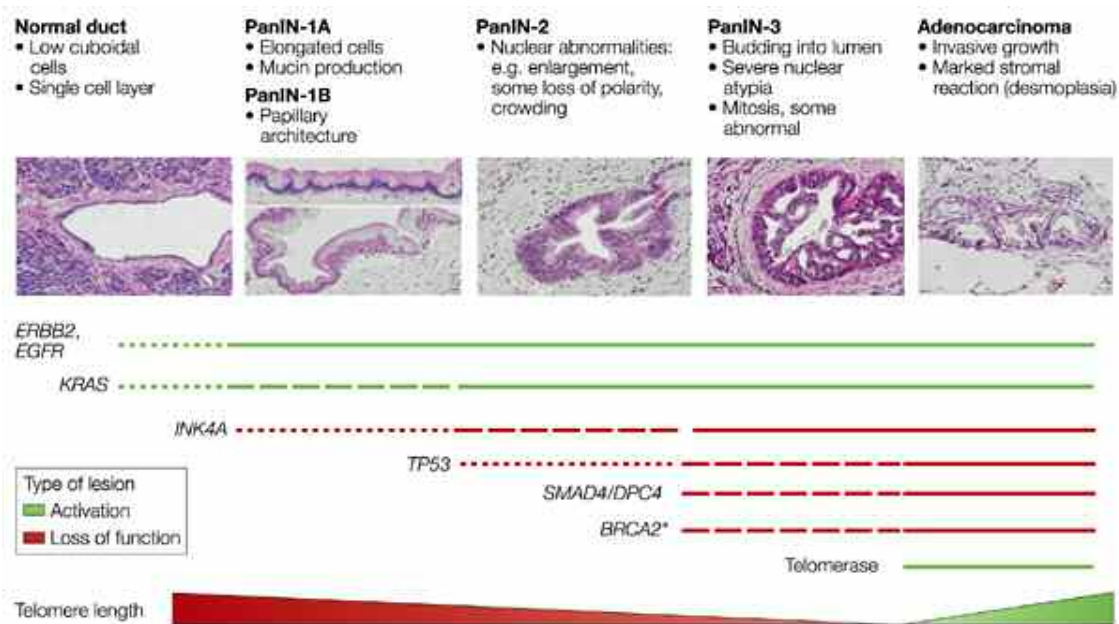


Figura 1.1: Modello genetico di progressione dell'adenocarcinoma pancreatico (Bardeesy N et al., 2002)

Sono stati utilizzati vettori codificanti geni la cui espressione e/o sequenza è alterata nel carcinoma pancreatico. *k-ras*, *p53*, *p16* e *DPC4* sono i geni più frequentemente mutati in questo tumore e vettori esprimenti i geni non mutati, da soli o in combinazione, sono stati testati "in vitro" e "in vivo".

k-ras

Tra i tumori solidi, il carcinoma del pancreas presenta la più alta frequenza di mutazione del gene *ras*. La famiglia Ras (*k-ras*, *h-ras*, *n-ras*) codifica per proteine G associate alla membrana la cui funzione, come regolatrici del segnale di trasduzione, è coinvolta nel controllo della proliferazione cellulare, nella sopravvivenza e nella migrazione della cellula. L'oncogene *k-ras* in particolare codifica una proteina (p21), localizzata sul lato interno della membrana plasmatica, che è attiva quando legata a GTP, inattiva se legata a GDP.

La mutazione puntiforme dell'oncogene *k-ras* è un evento precoce nella cancerogenesi pancreatica ed avviene normalmente nel codone 12 dell'esone 1, raramente nei codoni 13 dell'esone 1 o 61 dell'esone 2 (Schmid RM, 2002; Cowgill SM et al., 2003). La percentuale di casi che portano la mutazione *k-ras* aumenta progressivamente nelle lesioni precancerose PanIN1 (40%), PanIN2 (70%) e PanIN3 (88%) arrivando ad un 100% nella neoplasia pancreatica conclamata. (Bardeesy N et al., 2002). La mutazione al codone 12 determina uno stato costantemente attivato della proteina p21 ras che continua a trasmettere segnali di proliferazione cellulare. La mutazione *k-ras* non è specifica di malignità ed il rischio di progressione neoplastica è basso in assenza di altre mutazioni genetiche, in particolare le mutazioni dei geni oncosoppressori *p53*, *p16 INK4A* e *p21CIP1*. (Lemoine NR et al., 1992; Tada M et al., 1996; Berndt C et al., 1998; Luttgies J et al., 1999; Tateishi K et al., 1999).

Differenti strategie sono state utilizzate per sopprimere l'espressione di *k-ras* mutato: trasfezione della proteina mutata H-ras N116Y, tecnologie antisenso e utilizzo di sequenze interferenti (Kita K et al., 1999; Tsuchida T et al., 2000; Zhang YA et al., 2000; Su Z et al., 2001). La proteina H-ras mutata, N116Y, blocca la trasduzione del segnale proveniente dalle altre proteine ras, probabilmente interferendo nel legame di componenti posti a valle del segnale. I protocolli di terapia genica atti a ridurre o abolire l'espressione di *k-ras* mutato sono in grado di inibire la crescita cellulare sia "*in vitro*" che in "*in vivo*" (Tabella 1.2) (Aoki K et al., 1997; Giannini CD et al., 1999; Nakada Y et al., 2001; Kijima H et al., 2004; Bhattacharyya M et al., 2006). Tuttavia, l'inibizione della crescita cellulare con oligonucleotidi antisenso o con ribozyme è transiente e pertanto destinata ad una efficacia solo temporanea.

| Tipo di studio | Linea cellulare (mutazione <i>k-ras</i>) | Protocollo di terapia genica | Effetto della terapia genica | Autore |
|----------------|---|--------------------------------------|--|-----------------|
| "in vitro" | AsPC-1 (<i>k-ras</i> mut.) MIAPaCa2 (<i>k-ras</i> homo.) PANC-1 (<i>k-ras</i> het.) PSN-1 (<i>k-ras</i> mut.) BxPC-3 (<i>k-ras</i> wt) Hs 700T (<i>k-ras</i> wt) Hs 766T (<i>k-ras</i> wt) | Oligonucleotidi antisenso | 20-80% riduzione della crescita cellulare in presenza di <i>k-ras</i> mutato Nessun effetto in presenza di <i>k-ras</i> wt 60% riduzione della formazione di colonie in soft agar nelle MIAPaCa 2. | Aoki (1997) |
| "in vitro" | CFPAC-11 (<i>k-ras</i> het.) | Oligonucleotidi antisenso e ribozyme | 60% riduzione della crescita cellulare. 50% riduzione della formazione di colonie in soft agar. | Giannini (1999) |
| "in vitro" | HuP-T1 (<i>k-ras</i> het.) HuP-T3 (<i>k-ras</i> het.) PANC-1 (<i>k-ras</i> het.) BxPC-3 (<i>k-ras</i> wt) | Oligonucleotidi antisenso | 12-40% riduzione della crescita cellulare in presenza di <i>k-ras</i> mutato Nessun effetto sulle BxPC-3. | Kita (1999) |
| "in vitro" | CAPAN-1 (<i>k-ras</i> homo.) | Ribozyme | 80% riduzione della crescita cellulare. | Tsuchida (2000) |
| "in vitro" | MIA PaCa 2 (<i>k-ras</i> homo.) PANC-1 (<i>k-ras</i> het.) BxPC-3 (<i>k-ras</i> wt) | Oligonucleotidi antisenso | 22-33% riduzione della crescita cellulare in presenza di <i>k-ras</i> mutato Nessun effetto sulle BxPC-3. Riduzione (35-78%) dell'invasività. | Nakada (2001) |
| "in vitro" | AsPC-1 (<i>k-ras</i> mut.) BxPC-3 (<i>k-ras</i> wt) MIA PaCa 2 (<i>k-ras</i> homo.) PANC-1 (<i>k-ras</i> het.) | Oligonucleotidi antisenso | 10-30% riduzione della crescita cellulare in presenza di <i>k-ras</i> mutato Nessun effetto sulle BxPC3. | Su (2001) |
| "in vivo" | CAPAN-1 (<i>k-ras</i> homo.) | Ribozyme | Inibizione della crescita cellulare o regressione nel 68% dei topi . | Kijima (2004) |

Tabella 1.2 Studi di terapia genica con *k-ras* . *k-ras* het.=linee cellulari eterozigoti per *k-ras*; *kras* wt=linee cellulari omozigoti per *k-ras* non mutato; *k-ras* homo.= linee cellulari omozigoti per *k-ras* mutato; *k-ras* mut.= linee cellulari con almeno un allele mutato

p16^{INK4A}

Le mutazioni del locus $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$, si riscontrano nell' 80-95% dei casi di carcinoma pancreatico e compaiono già nelle forme pre-invasive (Figura 1.1) (Moore PS et al., 2001; Bardeesy N et al., 2002; Schmid RM, 2002; Aguirre AJ et al., 2003; Cowgill SM et al., 2003; Li J et al., 2004). Il locus $p16^{INK4A}/p14^{ARF}$ (cromosoma 9p21) codifica due geni oncosoppressori: *INK4A* e *ARF*. Il gene *INK4A* inibisce il complesso ciclinaD/CDK 4/6 chinasi, provocando così l'arresto del ciclo cellulare in fase G1, mentre *ARF* contribuisce all'inattivazione di p53

(Schneider G et al., 2003). Il trasferimento del gene *p16INK4A* non mutato, riduce la proliferazione delle cellule neoplastiche pancreatiche ma non è in grado di provocare la morte cellulare (Kobayashi S et al., 1999; Calbò J et al., 2001; Ghaneh P et al., 2001).

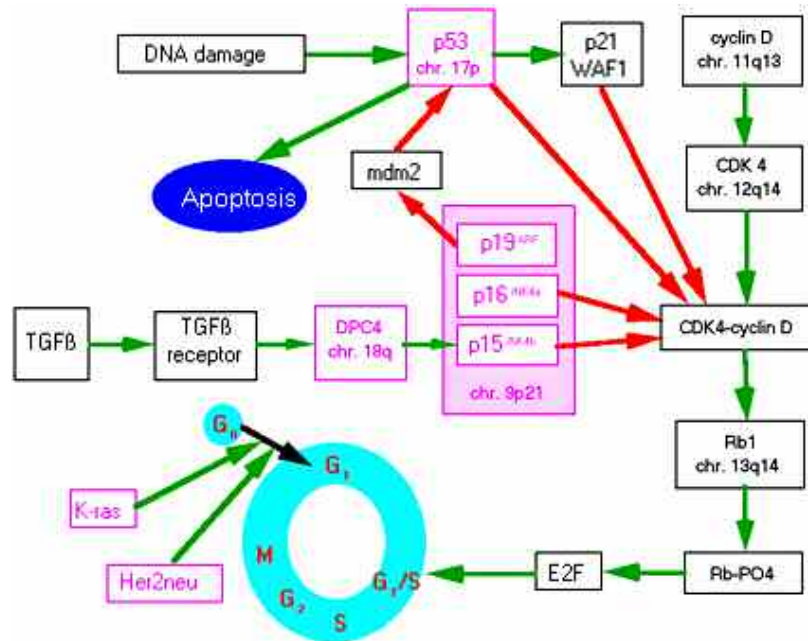


Figura 1.2: Rappresentazione schematica dei geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare. Gli oncogeni, come RAS, se alterati, inducono una continua duplicazione cellulare; i geni oncosoppressori (*p16*, *p53*, *DPC4*), se alterati, non esercitano più il loro controllo inibitorio sulla proliferazione cellulare.

p53

Il fattore di trascrizione *p53*, un gene oncosoppressore, è mutato in circa il 50% dei casi di carcinoma pancreatico (Moore PS et al., 2001; Bardeesy N et al., 2002; Schmid RM, 2002; Cowgill SM et al., 2003; Schneider G et al., 2003). È uno dei difetti genetici più comunemente rilevabili nei tumori e viene inattivato in seguito a delezione o a mutazioni puntiformi che interessino alcune regioni della sequenza codificante. *p53*, in presenza di un danno al DNA, blocca la divisione cellulare nella fase S, consentendo la riparazione del DNA. Se il danno è eccessivo, la riparazione fallisce e la cellula va incontro ad apoptosi. *p53* attivata blocca la progressione del ciclo cellulare inducendo l'espressione di *p21*, un inibitore del complesso ciclina D/CDK4. Se *p53* è mutata o inattivata, l'effetto inibitorio sul complesso ciclina D/CDK4 non è più presente e ne deriva quindi uno stato di iperproliferazione cellulare.

Il trasferimento del gene *p53* "wild type" in linee cellulari di carcinoma pancreatico portatrici di *p53* mutata, può inibire la crescita cellulare sia in "in vivo" che "in vitro", e indurre apoptosi (Barton CM et al., 1995; Bouvet M et al.,

1998; Hwang RF et al., 1998; Cascallo M et al., 1999; Ghaneh P et al., 2001; Rodicker F et al., 2003; Bhattacharyya M et al., 2006) (Tabella 1.3). Va tenuto presente che l'induzione dell'apoptosi da parte della proteina p53 non mutata non avviene sempre, in quanto alcuni tumori sono resistenti all'introduzione di p53 esogena. (Barton CM et al., 1995; Cascallo M et al., 1999; Rodicker F et al., 2003). Questa resistenza sembra dovuta alla fosforilazione della serina 46 che rende p53 incapace di transattivare i geni apoptotici bersaglio.

| Tipo di studio | Linee cellulari (mutazione p53) | Protocollo di terapia genica | Effetti della terapia genica | Autore |
|------------------------------|---|---|--|-----------------|
| "in vitro" | PANC-1 (mut) AsPC-1 (wt) Capan-2 (wt) PT45 (mut) 818.4 (wt) Colo-357 (wt) | Bersagli degli oligonucleotidi antisenso: p53 esone 10 p53 ATG codone di inizio | Nessun effetto sulla crescita cellulare. | Barton (1995) |
| "in vitro" e "in vivo" | AsPC-1 (wt) BxPC-3 (mut) Capan-1 (mut) CFPAC-1 (mut) MIA PaCa 2 (mut) PANC-1 | Trasferimento di p53 wild type tramite vettore adenovirale | <i>In vitro</i> : inibizione della crescita dose dipendente in tutte le linee cellulari. <i>In vivo</i> : soppressione della crescita. | Bouvet (1998) |
| "in vitro" e "in vivo" | BxPC-3 (mut) | Trasferimento di p53 wild type tramite vettore retrovirale | <i>In vitro</i> : riduzione (59-86 %) della crescita <i>In vivo</i> : inibizione della crescita. | Hwang (1998) |
| "in vitro" | NP-9 (mut) NP-18 (mut) NP-31 (mut) NP-29 (wt) | Trasferimento di p53 wild type tramite vettore adenovirale | Marcata diminuzione della proliferazione cellulare nelle linee p53 mutate. Nessun effetto nelle NP-29. | Cascallo (1999) |
| "in vitro" e "in vivo" | PANC-1 (mut) Capan-2 (wt) MIA PaCa 2 (mut) BxPC-3 (mut) CFPAC-1 (mut) | Trasferimento di p53 wild type tramite vettore adenovirale | <i>In vitro</i> : inibizione (75-95 %) della crescita cellulare <i>In vivo</i> : regressione del tumore e aumento della sopravvivenza (MIAPaCa2). | Ghaneh (2001) |
| "in vitro" | AsPC-1 (wt) Capan-1 (mut) Capan-2 (wt) MZA (mut) | Trasferimento di p53 wild type tramite vettore adenovirale | Nessuna risposta nelle AsPC-1. Inibizione della crescita 11-70 % nelle altre linee cellulari. | Rodicker (2003) |

Tabella 1.3 Studi di terapia genica con bersaglio p53. wt=linee cellulari omozigoti per p53 non mutata; mut=linee cellulari con almeno 1 allele mutato.

SMAD4/DPC4

Un'altra frequente alterazione nel carcinoma pancreatico è la perdita di SMAD4/DPC4, che codifica per proteine che regolano la trascrizione del segnale del transforming growth factor beta (TGFβ) (Liu F et al., 1997; Cook T et al., 2000; Moore PS et al., 2001; Bardeesy N et al., 2002; Schmid RM, 2002; Cowgill SM et al., 2003). Questo gene, nel cromosoma 18q21, è deletato in circa

il 30% dei carcinomi pancreatici. La perdita di *SMAD4*, che avviene negli ultimi stadi della carcinogenesi pancreatica, sembra essere coinvolta nella progressione tumorale ed è predittiva di minore sopravvivenza (Bardeesy N et al., 2002). E' ragionevole pensare che *SMAD4* contribuisca alla carcinogenesi pancreatica: la sua perdita, infatti, rende le cellule tumorali incapaci di rispondere al segnale inibitorio del TGF β . I peptidi della famiglia del TGF β inibiscono infatti la proliferazione cellulare bloccando la progressione G1-S del ciclo cellulare o promuovendo l'apoptosi. Il TGF β si lega al suo recettore di tipo II (TbRII) e recluta il recettore di tipo I (TbRI) per trasmettere all'interno del citoplasma il segnale attraverso una cascata che coinvolge più vie di trasmissione, incluse le proteine Smad. Sono stati identificati almeno 8 geni che codificano le proteine Smad. Queste possono appartenere a 3 principali gruppi: 1. Receptor regulated Smad (R-Smads), 2. co-Smads e 3. anti-Smads (Figura 1.3). Le R-Smads legano, a livello della membrana cellulare, specifici recettori posti in relazione con i recettori del TGF β , vengono fosforilate, si associano con una co-Smad e traslocano nel nucleo dove regolano l'espressione genica. Le anti-Smad interferiscono con la funzione delle R-Smad bloccandone la fosforilazione o legandole direttamente per prevenire la loro interazione con la co-Smad. Sono state descritte 5 R-Smads (1, 2, 3, 5 e 8), 2 anti-Smads (6 e 7) e 1 sola co-Smad (4). Le proteine Smad sono accomunate da una struttura generale che comprende 2 domini altamente conservati (MH1 e MH2, N-terminale e C-terminale, rispettivamente) separati da un dominio ricco di prolina. La capacità delle Smads di comportarsi da geni attivatori o repressori sembra dipendere dalla interazione del dominio MH2 con cofattori che agiscono sulla struttura della cromatina o interagiscono con l'apparato trascrizionale. Le proteine Smad possono essere inattivate dalle MAP chinasi indotte dall'EGF, tramite fosforilazione della regione ricca di prolina. In questo modo, l'EGF diventerebbe in grado di antagonizzare i segnali anti-proliferativi del TGF β .

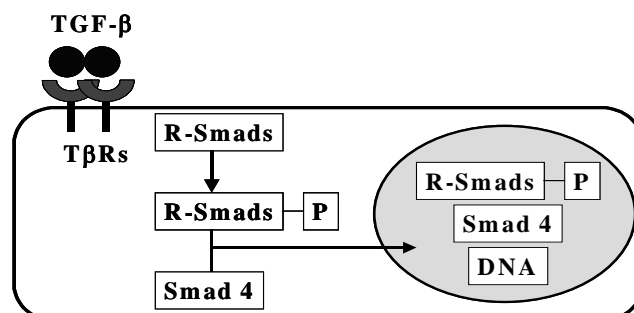


Figura 1.3: Rappresentazione schematica della via del segnale del TGF beta

Il ripristino attraverso la terapia genica di *SMAD4/DPC4* inibisce solo parzialmente la crescita di linee cellulari neoplastiche pancreatiche in cui questo gene è deletato (Moore PS et al., 2001 ; Chen WB et al., 2002; Peng B et al., 2002 ; Duda DG et al., 2003). *In vivo*, il ripristino di espressione e funzione, in linee cellulari con delezione omozigote del gene, inibisce significativamente la crescita. Questa discrepanza tra i risultati *in vitro* e *in vivo* può dipendere da altre azioni biologiche di *SMAD4/DPC4*, in particolare l'inibizione dell'angiogenesi, che potrebbe spiegare la ridotta crescita cellulare *in vivo* (Schwarte-Waldhoff I et al., 2000; Bhattacharyya M et al., 2006).

In sintesi, le mutazioni geniche che concorrono alla trasformazione delle cellule pancreatiche in cellule cancerose sono dunque molteplici e sono state riscontrate non solo nel cancro in fase avanzata ma anche nei suoi primi stadi di sviluppo. I principali geni nucleari mutati nelle cellule tumorali pancreatiche intervengono nel ciclo cellulare conferendo competenza replicativa (*K-ras*) e controllandone la progressiva crescita (oncosoppressori: *p53*, *p16* e *DPC4*) (Figura 1.2).

Per questo motivo il ripristino di un singolo oncogene o di un singolo oncosoppressore non è in grado di modificare la crescita delle cellule neoplastiche trasdotte.

Si è pensato, quindi, di introdurre nelle cellule neoplastiche pancreatiche dei geni capaci di:

1. antagonizzare la neovascolarizzazione tumorale;
2. produrre citochine per esaltare l'immunogenicità del tumore
3. incrementare la suscettibilità cellulare ai pro-farmaci.

1.2.2 Terapia genica anti-angiogenica

L'angiogenesi, o meglio la formazione di nuovi vasi, ha un ruolo critico per la crescita e l'invasione della neoplasia. Lo scopo della terapia genica anti-angiogenetica è trasferire geni codificanti proteine in grado di inibire la neoangiogenesi. È possibile inibire l'angiogenesi utilizzando adenovirus "replication-competent": le proteine E1A hanno un ruolo chiave nell'inibizione dell'angiogenesi legandosi a varie proteine cellulari (CREB e p300) che regolano l'espressione di numerosi geni, compreso il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

Il virus oncolitico AxE1AdB inibisce *in vitro* la produzione di VEGF in alcune linee cellulari neoplastiche pancreatiche (AsPc1, PANC1, PK1 e PK8) (Bhattacharyya M et al., 2006; Saito Y et al., 2006).

È stato inoltre sviluppato un vettore adenovirale che codifica la forma solubile del recettore flt-1 per il VEGF (Adsflt) in grado di inibire l'attività del VEGF in maniera dominante negativa (Hoshida T et al., 2002). Nei tumori pancreatici

trattati con Ad5fl1 è stata documentata una significativa riduzione della crescita tumorale *in vivo*, sebbene *in vitro* non vi fossero differenze rispetto alle linee non trasfettate.

Infine è stato realizzato un vettore adenovirale codificante una variante umana di Hepatocyte Growth Factor (HGF), l'NK4, che viene secreta e che agisce come antagonista competitivo dell'HFG stesso. e come inibitore dell'angiogenesi. In un modello di disseminazione peritoneale della linea neoplastica pancreatico AsPc1 nel topo nudo, l'iniezione settimanale intraperitoneale di questo adenovirus ricombinante ha soppresso la crescita dei noduli tumorali. L'analisi immunohistochimica dei noduli ha evidenziato l'espressione di NK4 con diminuzione della densità dei microvasi ed un aumento del numero di cellule apoptotiche (Saimura M et al., 2002; Bhattacharyya M et al., 2006).

1.2.3 Terapia genica con citochine

L'idea di indurre il sistema immunitario a riconoscere e distruggere la cellula tumorale risale a più di 100 anni fa e deriva dall'osservazione che la risposta immunitaria anti-neoplastica è in gran parte compromessa (Igney FH et al., 2002; Cross D et al., 2006). Le cellule tumorali, infatti, sono in grado di evadere il controllo da parte del sistema immunitario. Nel carcinoma del pancreas si riscontra una ridotta o mancata espressione delle molecole di istocompatibilità di classe I (MHC I). Queste molecole sono necessarie per attivare la risposta T cellulare indotta dalla presentazione dell'antigene tumorale da parte delle APC (Ryschich E et al., 2005; Panda H et al., 2007). Al contrario, le cellule neoplastiche del carcinoma del pancreas esprimono le molecole MHC di classe II coinvolte nella presentazione di peptidi esogeni.

La risposta immunologica alla cellula tumorale richiede l'attivazione e la maturazione delle cellule dendritiche, processi che risultano inibiti nei pazienti con carcinoma del pancreas (Bharadwaj U et al., 2007). In assenza di attivazione delle cellule dendritiche, infatti, viene meno la chemiotassi e l'attivazione dei linfociti nella sede tumorale, il che contribuisce all'evasione del sistema immunitario (Yanagimoto H et al., 2005).

Inoltre, nei pazienti con carcinoma del pancreas è stato dimostrato un aumento dei livelli circolanti ed infiltranti il tumore dei linfociti T regolatori (CD4+CD25+). La loro attività di inibizione dell'attivazione dei linfociti T può contribuire a rendere il sistema immunitario meno attivo nei confronti della neoplasia (Liyanaage UK et al., 2002 e 2006; Viehl CT et al., 2006; Nummer D et al., 2007). L'attivazione delle cellule dendritiche e delle cellule T è mediata da numerose citochine tra le quali TNF- α , IFN- γ e IL-12 svolgono un ruolo principale (Bancherou J et al 1998).

I risultati preliminari sulla combinazione delle tecniche di terapia genica con quelle di immunoterapia, basati sulla induzione della espressione di citochine immunomodulatorie, sono incoraggianti (Dranoff G, 2004).

La crescita tumorale di linee di carcinoma pancreatico trasfettate con IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-15, TNF- α o GM-CSF viene significativamente inibita (Kimura M et al., 1998 e 1999; Yoshida Y et al., 2000; Tada H et al., 2001; Kishida T et al., 2003; Ugai S-I et al., 2003). In modelli sperimentali nel topo nudo è stata dimostrata una inibizione della crescita e della progressione tumorale e protezione contro la reinoculazione delle linee cellulari parentali grazie alla produzione di IL-2 e IL-4 (Kimura M et al., 1998 e 1999). L'IL-2, in particolare, è un fattore di crescita per i linfociti T che aumenta sia la risposta immune non specifica (attivazione dei macrofagi, cellule NK, cellule killer attivate dalle linfochine) sia la risposta citotossica MHC mediata (Dranoff G, 2004).

L'utilizzo di un vettore di espressione per il TNF- α sotto il controllo di un promotore inducibile, in combinazione con la radioterapia, rappresenta un modo di trarre vantaggio dalla attività antitumorale del TNF- α evitando la tossicità sistemica (Rasmussen H et al., 2002).

La terapia genica con INF- α in un modello animale (hamster) di carcinoma del pancreas si è dimostrata efficace nell'indurre morte cellulare e immunità antitumorale attraverso la stimolazione dei linfociti NK (Hara H et al., 2007).

In 7 pazienti, affetti da carcinoma del pancreas, inoltre, è stato testato un protocollo di fase I che utilizzava un vettore adenovirale capace di esprimere IL-12, che, in modelli animali di tumori metastatici dell'apparato digerente, era stato in grado di generare un effetto sistemico antitumorale. Nell'uomo, la somministrazione di IL-12 è stata ben tollerata ma ha prodotto solo un parziale effetto antitumorale (Sangro B et al., 2004).

1.2.4 Terapia genica con geni suicidi

Fino a poco tempo fa l'utilizzo di geni suicidi rappresentava una terapia molto promettente in campo oncologico. Questo approccio si basa sul trasferimento, all'interno delle cellule tumorali, di geni di origine batterica o fungina, non presenti nel genoma umano, che codificano per un enzima in grado di trasformare un profarmaco, di per sé non tossico, nel corrispondente prodotto attivo e tossico per la cellula (Humphreys MJ et al., 1999; Rigg AS et al. 1999; Katz MH et al., 2003) (Figura 1.4).

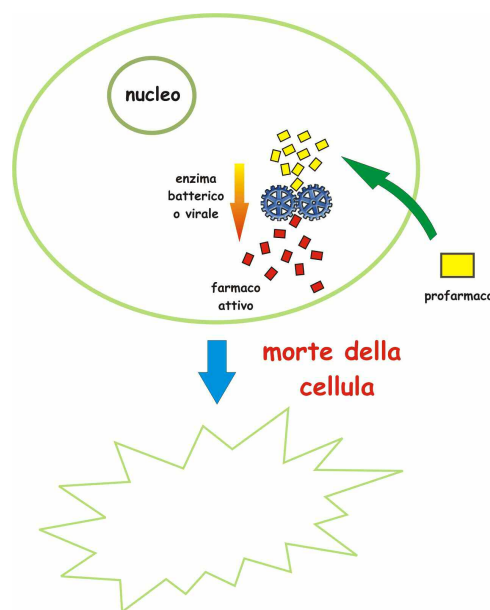


Figura 1.4: Meccanismo d'azione dei geni suicidi.

I geni suicidi più comunemente utilizzati nel carcinoma del pancreas sono: timidina chinasi e citosina deaminasi.

Il sistema Herpes Virus-Timidina Chinasi / Ganciclovir (HSV-TK)

Il gene della timidina chinasi deriva dall' Herpes Simplex Virus tipo I (HSV-TK). Il prodotto genico catalizza la trasformazione del farmaco ganciclovir (GCV), di per sé non tossico, nel suo metabolita trifosfato tossico per la cellula. Il GCV è un analogo ciclico del nucleoside 2'-deossiguanosina con attività antivirale (Elion FB, 1983; Evoy D et al., 1997). Il meccanismo di azione coinvolge l'inibizione altamente selettiva della replicazione del DNA virale.

L'attivazione del GCV consiste in una prima fosforilazione catalizzata dalla timidina chinasi (TK) virale. Successivamente il composto subisce altre due fosforilazioni da parte delle chinasi cellulari. Il derivato trifosfato è in grado di intercalarsi tra le basi del DNA di nuova sintesi, al posto della guanosina trifosfato e, inibendo la DNA polimerasi, di bloccare l'ulteriore allungamento della catena (Humphreys MJ et al., 1999; Rigg AS et al 1999; Katz MH et al.,2003). Gli effetti del GCV sono limitati alla replicazione del DNA, perciò solo le cellule in divisione e trasdotte con il gene TK virale vengono colpite in modo selettivo. Studi clinici hanno dimostrato una tossicità minima in soggetti trattati con questo farmaco (Yang L et al., 1996; Carriò M et al., 1999).

Il sistema HSV-TK è efficiente e risultati incoraggianti sono stati ottenuti in diversi tumori, compreso il carcinoma del pancreas. Tuttavia, i risultati "in vitro", usando linee cellulari neoplastiche pancreatiche differenti, non sono uniformi: alcune linee cellulari sono più sensibili al GCV dopo la trasduzione del gene HSV-TK, altre lo sono meno o non lo sono affatto (Aoki K et al., 1997; Rosenfeld ME et al., 1997; Yiang L et al., 1998; Makinen K., 2000; Greco E et al., 2002; Hajri A et al., 2004; Wang J et al., 2004).

Si possono formulare alcune ipotesi per giustificare tale fenomeno: a) delezione o inattivazione del gene HSV-TK mediante metilazione; b) presenza di fosfatasi nucleotidiche più attive in grado di defosforilare ed inattivare il GCV fosforilato (Faulds D et al.,1990); c) esistenza di meccanismi di farmaco resistenza come ad esempio: esocitosi, compartimentalizzazione, eliminazione rapida dei farmaci (Yang L et al.,1996; Yiang L, Chiang Y et al.,1998); d) incapacità delle differenti linee cellulari di dare inizio al processo apoptotico.

L'apoptosi indotta dal GCV nelle cellule trasdotte con HSV-TK avviene attraverso una via di segnale che può essere inibita da Bcl-2 (Carriò M et al., 2001). La diversa espressione di *bcl-2* o di altri geni responsabili dell'inibizione dell'apoptosi, può influenzare l'efficacia del trattamento con GCV.

Un altro importante fattore in grado di influenzare il successo della terapia genica con HSV-TK è l'“effetto bystander” (Elshami AA et al., 1996; Kumar NM et al., 1996; Yang L et al., 1996; Ishii-Morita, 1997; Mesnil M et al., 2000; Carriò et al., 2001) che permette al GCV fosforilato di passare dalle cellule trasdotte con HSV-TK a quelle contigue, non trasdotte, attraverso le giunzioni serrate (*gap junctions*). Senza di queste il GCV-trifosfato sarebbe incapace di attraversare la membrana plasmatica (Freeman SM et al., 1993; Fick J et al., 1995; Dilber MS et al., 1997). È stato, infatti, dimostrato che cellule neoplastiche pancreatiche, trasdotte con HSV-TK, che presentavano un'elevata resistenza al GCV (MIAPaCa2) avevano un basso effetto bystander, mentre quelle sensibili al GCV (CAPAN1) presentavano un marcato effetto bystander (Greco E et al., 2002). In altre parole, più è marcato tale effetto più alta è la probabilità di successo della terapia genica con HSV-TK nel cancro del pancreas. Tale comportamento sembra dipendere dalla diversa espressione delle giunzioni serrate esistenti tra le cellule e dalla diversa densità delle proteine che le compongono (connessine) (Carriò M et al., 2001).

In letteratura sono presenti alcuni lavori sperimentali che hanno valutato l'efficacia del sistema HSV-TK “*in vivo*” nel carcinoma del pancreas (Tabella 6). Nonostante la difficoltà a confrontare studi diversi (condizioni sperimentali, animali da esperimento utilizzati, linee cellulari, modalità e durata del trattamento con GCV) i risultati sono non conclusivi e talvolta scoraggianti. Un unico autore (Aoki K et al., 1997), riporta la completa remissione del tumore del pancreas nel 57% dei casi, utilizzando, peraltro, un'unica linea cellulare.

| Autori | Linee cellulari utilizzate | Modelli sperimentali (num. animali impiegati) | Tempo GCV | Risultati |
|-------------------|----------------------------|---|-----------|---|
| Aoki K 1997 | PSN-1 | Inoculazione intraperitoneale di cellule pancreatiche neoplastiche in topi nudi. (n=42) | 8gg | Assenza di tumore e metastasi peritoneali nel 57% dei casi |
| Block A 1997 | PANC02 | Inoculazione di cellule pancreatiche neoplastiche nel fegato di topi C57BL6 (n=26) | 6gg | Riduzione del volume tumorale |
| Carriò M 1999 | NP-18 | Inoculazione sottocutanea in topi nudi Balb/C (n=22) | 14gg | Riduzione della massa tumorale |
| Fogar P 2003 | CAPAN-1, MIAPaCa2, PANC-1 | Inoculazione intraperitoneale di cellule pancreatiche neoplastiche in topi SCID. (n=78) | 14gg | Nessun effetto |
| Rosenfeld ME 1997 | BxPC3 | Inoculazione intraperitoneale di cellule pancreatiche neoplastiche in topi nudi Balb/C (n=50) | 14gg | Riduzione del volume tumorale |
| Yang L 1998 | BxPC3 | Inoculazione di cellule pancreatiche neoplastiche in pancreas di topi nudi (n=19) | 16gg | Nessuna differenza nel tumore primario. Riduzione di metastasi peritoneali. |

Tabella 1.4 Dati sperimentali ottenuti “*in vivo*” con il sistema HSV-TK.

Il sistema citosina deaminasi / 5-Fluorocitosina

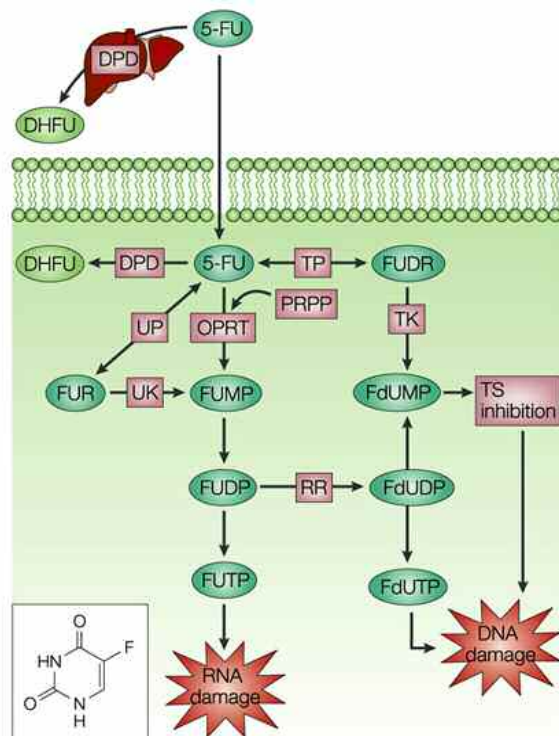
Il gene della citosina deaminasi (CD) può essere di derivazione batterica (*Escherichia coli*) o fungina (*Saccaromices cerevisiae*). Il prodotto genico è un enzima che catalizza la conversione della 5-fluorocitosina (5-FC), di per sé non tossica, in 5-fluorouracile (5-FU) che esercita la sua tossicità per le cellule umane inibendo la sintesi sia dell'DNA che dell'RNA (Humphreys MJ et al., 1999; Rigg AS et al., 1999; Vermes A et al., 2000; Longley DB et al., 2003). Il farmaco 5-FC è un composto sintetico antimicotico sintetizzato per la prima volta nel 1957 come potenziale agente antitumorale (Huber BE et al., 1994; Ohwada A et al., 1996; Evoy D et al., 1997; Cao G et al., 1999; Erbs P et al., 2000; Vermes A et al., 2000).

La 5-FC penetra all'interno della cellula attraverso delle permeasi. Una volta all'interno della cellula la 5-FC viene rapidamente deaminata in 5-FU dalla citosina deaminasi.

Il farmaco attivo 5-fluorouracile è un analogo strutturale dell'uracile e della timina. Presenta un atomo di fluoro legato al C₅ che simula un idrogeno. Può penetrare nella cellula sfruttando gli stessi meccanismi di trasporto attivo dell'uracile (Wohlhueter RM et al., 1980) e una volta all'interno viene convertito in tre principali metaboliti (FdUMP, FdUTP, FUTP) secondo due fondamentali meccanismi di attivazione (Figura 1.5).

Il 1° meccanismo è la fosforilazione del 5-FU in 5-fluorouridina monofosfato (FUMP), difosfato (FUDP) e trifosfato (FUTP). Il FUTP viene incorporato nell'RNA al posto dell'acido uridilico e questo altera l'aminoacilazione del tRNA con conseguente inibizione della sintesi proteica.

Il 2° meccanismo consiste nella formazione di 5-fluorodeossiridina monofosfato (FdUMP) ad opera delle uridine monofosfato fosforilasi. Il composto ottenuto è un potente inibitore della timidilato sintetasi, enzima chiave nella sintesi del DNA. Conseguentemente la sintesi del DNA risulta inibita (Vermes A et al., 2000; Longley DB et al., 2003).



La conversione del 5-FU a 5-FUMP può essere direttamente catalizzata dall'enzima orotato-fosforibosiltransferasi (OPRT) utilizzando il 5-fosforibosil-1-pirofosfato (5PRPP) come co-substrato o indirettamente tramite una sequenza di reazioni in cui il 5-FU è inizialmente convertito a 5-fluorouridina (FUR) dalla pirimidina-nucleosidefosforilasi, utilizzando il ribosio-1-fosfato come cosubstrato, e quindi fosforilato a 5-FUMP dalla uridina-chinasi (UK).

Il 5-FU può anche essere convertito in 2-desossi-5-fluorouridina da una pirimidina-nucleoside-fosforilasi, con l'intervento di desossi-ribosio-1-fosfato come substrato, e quindi trasformato in 5-FUMP da una timidina chinasi. Il fattore limitante nel catabolismo del 5-FU è rappresentato dalla sua conversione in diidrofluorouracile (DHFU) ad opera della diidropirimidina deidrogenasi (DPD).

Tale processo avviene per più dell'80% nel fegato (Diasio RB et al., 1989).

Figura 1.5: Metabolismo del 5-FU

Il meccanismo di citotossicità del 5-FU è legato all'incorporazione, nel DNA e nell'RNA, dei suoi fluorometaboliti attivi capaci di sconvolgerne la sintesi e all'inibizione della timidilato sintetasi (TS). Quest'ultima è un enzima che catalizza la metilazione della dUMP in dTMP mediante l'intervento della 5,10-metilentetraidrofolato (CH_2THF) che funge da donatore di metili. Questa reazione costituisce la sola fonte *de novo* di timidilato necessario alla replicazione e alla riparazione del DNA.

Esistono però delle cellule neoplastiche che risultano relativamente resistenti al 5-FU qualora la conversione del profarmaco nei relativi metaboliti tossici risulti difettosa. Alcuni batteri o enzimi micotici (uracile-fosforibosiltransferasi:5-PRT) possono superare efficacemente tale limite convertendo il 5-FU in 5-FUMP (Erbs P et al., 2000).

Fino all'introduzione in terapia della gemcitabina, il 5-FU ha rappresentato la pietra miliare della chemioterapia contro il cancro del pancreas anche se la sua efficacia clinica è limitata (Gilliam AD et al., 2000; Reni M et al., 2001; Rothenberg ML et al., 2002; Shi X et al., 2002 Longley DB et al., 2003). La possibile spiegazione di questo fenomeno è legata a due fattori: a) l'elevata tossicità del 5-FU ne implica l'utilizzo a dosaggi che possono non essere abbastanza aggressivi per le cellule neoplastiche b) la possibilità che la conversione del 5-FU nelle cellule malate risulti difettosa.

Un protocollo di terapia genica che utilizza l'enzima citosina deaminasi (CD) permette di raggiungere alte concentrazioni di 5-FU solo nelle cellule trasdotte,

limitando in questo modo la tossicità sistemica. Quindi, transfettando le cellule tumorali con CD e 5-PRT, è possibile evitare che sfuggano all'effetto tossico del 5-FU dovuto a difettosa o lenta conversione nel metabolita intermedio 5-FUMP (Erbs P et al., 2000). Inoltre, il sistema CD/5-FU non necessita del contatto tra le cellule perché il farmaco attivo, 5-FU, diffonde passivamente e penetra all'interno delle cellule vicine non trasdotte. Questa diffusione passiva offre il vantaggio di consentire un effetto bystander anche in cellule prive di giunzioni serrate (Lawrence TS et al., 1998; Kuriyama S et al., 1999).

I risultati ottenuti utilizzando il gene suicida citosina deaminasi in studi *in vitro* e *in vivo* nel carcinoma del pancreas indicano che questo approccio è utile in alcune linee neoplastiche pancreatiche, PANC1 e BxPC3 in particolare, ma non è in grado di eradicare completamente il tumore (Evoy D et al., 1997; Erbs P et al., 2000; Kanyama H et al., 2001; Wang X-P et al., 2004; Fogar P et al., 2007).

In sintesi: la terapia con geni suicidi, purtroppo, non ha raggiunto le aspettative: la regressione del carcinoma pancreatico è risultata solo parziale sia *in vitro* che in modelli animali *in vivo* (Greco E et al., 2002; Fogar P et al., 2003, 2005, 2007). Una possibile spiegazione di questi risultati va ricercata nelle alterazioni metaboliche delle cellule neoplastiche pancreatiche che, aumentando l'espressione di segnali anti-apoptotici e inibendo le vie pro-apoptotiche, diventano resistenti all'apoptosi. Da tutte queste considerazioni emerge che il protocollo di terapia genica per il carcinoma del pancreas deve utilizzare un vettore in grado di colpire più vie di sopravvivenza e di controbilanciare i meccanismi anti-apoptotici sviluppati dalle cellule neoplastiche. Alcune tossine batteriche possiedono questi requisiti.

1.2.5 Terapia genica con tossine batteriche

Nella terapia genica con tossine batteriche si utilizzano sequenze di DNA derivate da batteri e/o altri microrganismi che codificano sostanze tossiche per le cellule dei mammiferi. Le tossine batteriche possono alternativamente essere impiegate nella terapia antineoplastica come immunotossine, composti chimerici formati dalla tossina, da un linker e da un ligando che riconosce specifici recettori cellulari iperespressi dalle cellule neoplastiche.

La scelta delle tossine da utilizzare nella terapia antineoplastica prevede che vengano soddisfatti precisi criteri: 1. la tossina deve possedere un'elevata tossicità intrinseca; in altri termini deve agire quando presente nel medium a concentrazioni molto basse (poche nanomoli/Litro). Questo poiché l'espressione del recettore bersaglio è solitamente inferiore a 10^5 molecole per cellula. La tossina difterica rispetta perfettamente questo requisito in quanto una sola molecola è sufficiente per uccidere una cellula; 2. il composto tossico destinato ad applicazioni in terapia genica, che solitamente comprende il

ligando per la cellula bersaglio, la tossina e un linker, deve possedere le principali caratteristiche della tossina; 3. molte tossine esercitano la loro azione letale nel citoplasma. Per tale motivo le caratteristiche del composto tossico devono essere tali da consentirne l'internalizzazione previo riconoscimento da parte di recettori della membrana plasmatica della cellula tumorale; 4. la tossina deve essere in grado di sopravvivere ai processi di degradazione intracellulare (Johannes L et al., 2005).

Si possono identificare tre classi di immunotossine: Classe I. Le tossine appartenenti a questa classe, utilizzate principalmente nelle malattie ematologiche, sono enzimi intracellulari che bloccano la sintesi proteica modificando il fattore 2 di allungamento (tossina difterica, esotossina di *Pseudomonas aeruginosa*), oppure l' RNA ribosomiale (ricina, saporina), o degradando l' RNA totale (angiogenina, ribonucleasi). Questa classe di tossine agisce a livello citoplasmatico e necessita, quindi, di internalizzazione mediata da un dominio recettoriale. Classe II. Le tossine appartenenti a questa classe sono solitamente prodotti di fusione fra molecole che riconoscono specifici recettori della membrana cellulare e molecole in grado di attivare vie intracellulari del segnale che inducono morte cellulare. Un esempio è il prodotto di fusione tra il frammento Fab dell'anticorpo anti CD25 e la fosfolipasi C del *Clostridium perfringens* utilizzato per legare specificamente ed inibire la sintesi proteica nei linfociti T esprimenti il recettore dell'IL-2. Classe III. Le tossine appartenenti a questa classe sono peptidi che inducono la formazione di discontinuità (pori) nella membrana plasmatica. Questi includono la mellitina, il peptide tionina della pianta *Pyrularia*, la citotossina cationica di 63 aa del veleno di cobra. (Johannes L et al., 2005).

La produzione per trasferimento genico di tossine batteriche letali per la cellula neoplastica rappresenta un'importante applicazione in oncologia sperimentale (Chandler LA et al., 1998; Duesbery NS et al., 2001; Hung CF et al., 2001; Liu S et al., 2001; Frankel AE et al., 2002; Hotz HG et al., 2002; Koo H-M et al., 2002; Li Y et al., 2002; Peng W et al., 2002; Liu S et al., 2003; Mishra G et al., 2003; Kreitman RJ, 2003).

Varie tossine sono state utilizzate ma le due molecole più frequentemente impiegate nella terapia genica del cancro appartengono alla classe I e sono la tossina difterica e l'esotossina di *Pseudomonas aeruginosa*. In questo studio è stata utilizzata la tossina difterica per la sua elevata azione biologica e la possibilità di limitare, *in vivo*, eventuali effetti sistemici grazie alla immunizzazione obbligatoria.

1.3 Tossina difterica

La tossina difterica (DT) è una proteina di 535 aminoacidi, composta da due frammenti denominati DTA e DTB. Il residuo N-terminale di 193 aminoacidi (DTA) comprende il dominio catalitico (C) mentre i restanti 342 aminoacidi (DTB) comprendono il dominio recettoriale (R) ed il dominio di traslocazione (T) (Pappenheimer AM, 1977; Ratti G et al., 1983) (Figura 1.6).

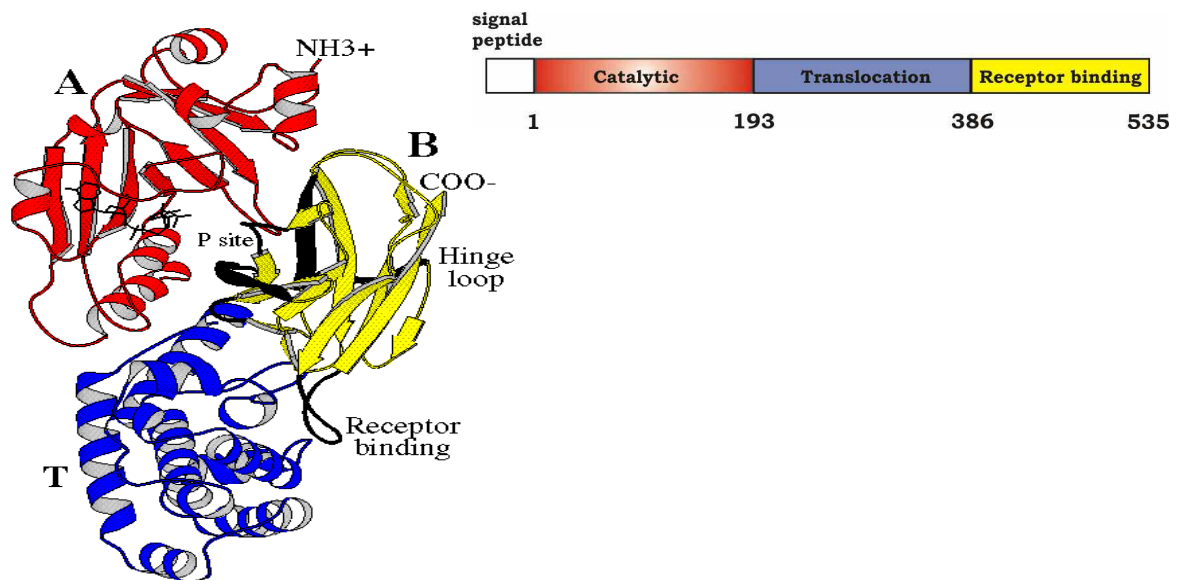
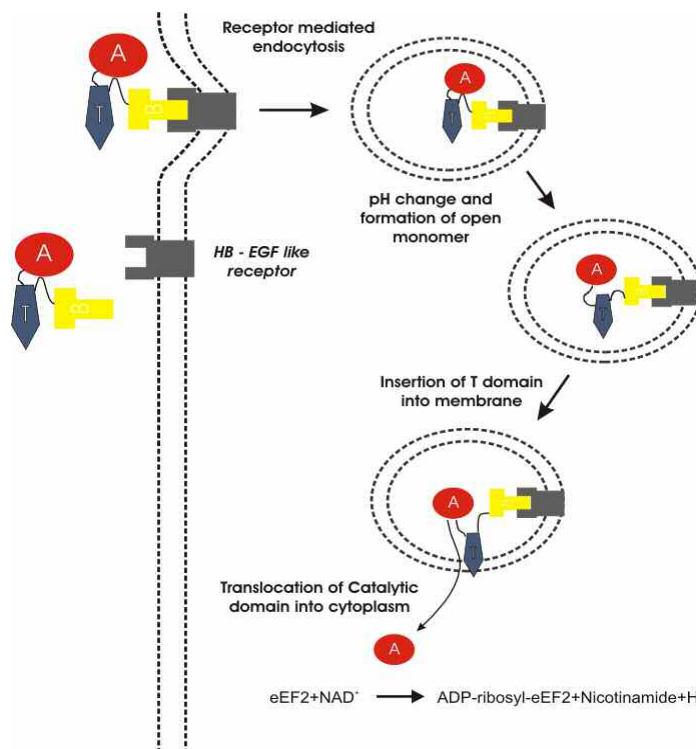


Figura 1.6: Rappresentazione dei domini della tossina difterica

Il dominio recettoriale si lega al recettore del Heparin-binding EGF like growth factor ed entra nella cellula con un processo di endocitosi. Il pH acido dell'endosoma permette al dominio di traslocazione di inserirsi nella membrana



e di creare un canale ionico che facilita il passaggio di DTA nel citoplasma dove agisce catalizzando la reazione di ADP-ribosilazione del fattore 2 di allungamento, indispensabile per la sintesi proteica, che viene inattivata in maniera irreversibile. L'inibizione della sintesi proteica nelle cellule causa infine la morte cellulare (Pappenheimer AM, 1977) (Figura 1.7).

Figura 1.7: Meccanismo d'azione della tossina difterica

In protocolli di terapia genica, la porzione del gene DT che codifica per la subunità A (DTA) è stata ingegnerizzata per l'utilizzo nelle cellule di mammifero e la sua efficacia terapeutica è stata testata *in vitro* nei tumori della prostata e nei gliomi (Pang S, 2000; Zheng JY et al., 2003; Peng W et al., 2005; Wang CY et al., 2006). La sua espressione è stata dimostrata uccidere la cellula neoplastica con elevata efficienza.

La mancanza della subunità che lega i recettori di membrana e che fisiologicamente media l'internalizzazione della tossina impediva, in questi modelli sperimentali, che la lisi conseguente all'attività tossica, portasse nel mezzo di coltura tossine in grado di danneggiare le cellule circostanti.

La subunità A (DTA) è stata inoltre coniugata con vari ligandi (EGF, interleuchine e VEGF) al fine di colpire in maniera specifica cellule tumorali diverse (Shaw JP et al., 1991).

Il controllo dell'espressione di DTA utilizzando promotori tumore specifici è stato ottenuto, almeno in parte, nel carcinoma della prostata utilizzando il promotore del PSA (Peng W et al., 2005) e nei gliomi con opportuni vettori (baculovirus ricombinanti) che infettano prevalentemente questo tipo di cellule tumorali (Wang CY et al., 2006).

L'elevata tossicità di DTA rende questa tossina estremamente interessante nella terapia genica di una neoplasia resistente alla chemioterapia convenzionale come è il carcinoma del pancreas. Tuttavia, deve essere messo in atto uno stretto controllo dell'espressione di DTA nella sola cellula neoplastica per non danneggiare il tessuto sano adiacente.

1.3.1 Varianti di DT

Le relazioni tra struttura e funzioni della tossina difterica sono state identificate attraverso l'analisi di mutanti prodotti utilizzando la mutagenesi con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. In questo modo sono state generate tossine la cui funzionalità era alterata ma che presentavano cross-reattività con gli anticorpi policlonali anti-DT (Uchida T et al., 1973; Johnson VG et al., 1994). Questi "cross-reacting materials" (CRM) possono essere suddivisi in due gruppi:

1. CRM con alterazioni della funzione di legame al recettore e/o della funzione di traslocazione (CRM 30, 45, 228, 107, 102, 103, 9 e 1001) dovute a mutazioni o alla formazione di catene tronche nel frammento B della tossina difterica
2. CRM con alterazione della attività enzimatica (CRM 197, 228 e 176) dovute a sostituzioni aminoacidiche nel frammento A della tossina difterica.

CRM176 presenta la sostituzione della glicina 128 con un acido aspartico. Questa mutazione comporta una riduzione dell'attività enzimatica (1/10 rispetto al wilde type) (Uchida T et al., 1973; Comanducci et al., 1987).

CRM197 presenta la sostituzione della glicina 52 con un acido glutammico che rende incapace la tossina di legare il suo cofattore NAD⁺ con perdita quasi completa dell'attività catalitica (Uchida T et al., 1973; Giannini G et al., 1984). Questa variante è immunologicamente indistinguibile dalla tossina difterica e, come la molecola nativa, mantiene la capacità di legarsi al Heparin-binding EGF, recettore spesso iperespresso dai tessuti tumorali. In un recente studio clinico eseguito su 25 pazienti con neoplasie avanzate refrattarie agli altri trattamenti, CRM197, iniettata sottocute, ha mostrato di svolgere attività antitumorale non solo per la sua diretta tossicità ma anche perché capace di indurre una risposta immunitaria (Buzzi S et al., 2004; Kageyama T et al., 2007).

1.4 Controllo dell'espressione genica nel carcinoma del pancreas

Pilotare l'espressione di agenti citotossici all'interno delle cellule tumorali è particolarmente problematico. Maggiore è la tossicità del composto utilizzato in terapia genica, più elevato è il rischio di danno per le cellule non neoplastiche che ricevono il gene se il promotore non è perfettamente tumore specifico. Ad oggi, non esistono, promotori tumore pancreatico specifici (Rigg AS et al., 1999), anche se elementi regolatori della trascrizione di alcuni geni parzialmente pancreas-specifici sono stati proposti (tabella 1.5).

| GENE | SPECIFICITA' TUMORALE E TISSUTALE |
|----------|---|
| ERBB2 | Carcinoma del pancreas, gastrico e della mammella |
| ERBB3 | Carcinoma gastrointestinale e della mammella |
| ERBB4 | Carcinoma gastrointestinale e della mammella |
| MUC1 | Carcinoma duttale pancreatico e della mammella |
| CEA | Carcinoma pancreatico, coloretale e gastrico |
| PSA | Carcinoma della prostata |
| Amilasi | Cellule acinari pancreatiche |
| Insulina | Cellule beta pancreatiche |

Tabella 1.5 Elementi regolatori trascrizionali.

Vi sono numerose tecniche sviluppate per confinare l'espressione genica al tessuto target: 1. Promotori endogeni che conferiscono specificità per un determinato tessuto ma non riescono a procurare livelli di espressione sufficienti a raggiungere una soglia terapeutica di espressione locale del gene (Mawatari F et al., 1998; Tanaka S et al., 2000; Yu D et al., 2001); 2. Promotori regolabili

farmacologicamente che controllano l'espressione del gene attraverso la somministrazione di un induttore (di solito si tratta di piccole molecole effettrici come le tetracicline o la rapamicina) ma non permettono una terapia localmente ristretta e non proteggono dalle conseguenze di una possibile disseminazione del vettore durante il trasporto (Gossen M et al., 1992 e 1995; Clackson T, 2000) ; 3. Promotori termoregolabili che sembrano promettenti in quanto permettono di controllare l'espressione del gene d'interesse in maniera sito specifica attraverso l'applicazione di una sorgente di calore esterna (Huang Q et al., 2000; Smith RC et al., 2002; Rome C et al., 2005; Stauffer PR, 2005).

1.5 Heat shock proteins

I geni che iniziano a trascrivere una proteina in seguito ad uno stress termico, vengono denominati "heat shock genes" ossia geni dello shock termico. Sono stati identificati nel 1962 da Ritossa in *Drosophila*. Egli osservò che la risposta allo shock termico era caratterizzata dalla comparsa, nei cromosomi delle ghiandole salivari, di caratteristici "puffs" dovuti all'aumentata trascrizione e traduzione di proteine definite 'heat shock proteins' (HSPs). Le HSPs sono proteine citoprotettive altamente conservate, presenti in tutte le specie, dai batteri all'uomo, che svolgono funzioni essenziali per la cellula: sono infatti coinvolte nel processo di apoptosi, nella sintesi proteica, nella traslocazione delle proteine, nel ripiegamento delle proteine, nella degradazione delle proteine e nella trasmissione del segnale. (Wheeler DS et al., 2007). La regolazione della sintesi delle HSPs, in risposta ad uno stress cellulare, è indotta da fattori di trascrizione noti come heat shock factors (HSFs 1-4). Nelle cellule dei mammiferi gli HSFs vengono attivati in seguito a stimoli ambientali o fisiologici. Gli HSFs 1 e 3 funzionano come attivatori della risposta allo stress. HSF2 viene attivato durante lo sviluppo e la differenziazione embrionale. HSF4 sembra essere preferenzialmente espresso nel cuore, cervello, muscolo scheletrico e pancreas umani. A differenza degli altri HSFs lega costitutivamente il DNA e, per questo motivo, sembra esercitare una funzione di controllo negativo della risposta allo shock termico. Normalmente HSF1 è presente, come monomero, nel citoplasma delle cellule legato ad Hsp70 o ad altre proteine "chaperone". In seguito a stress, le proteine "chaperone" legate ad HSF1 vengono sequestrate dalle proteine cellulari danneggiate. HSF1 monomero, libero dal legame, trimerizza ed in tale conformazione viene traslocato nel nucleo dove, legandosi a specifiche sequenze di 5 paia di basi (nGAAn, chiamate heat shock elements, HSEs) presenti, in tandem, nella regione del promotore dei geni termoregolabili, promuove la trascrizione (Santoro MG, 2000) (Figura 1.8).

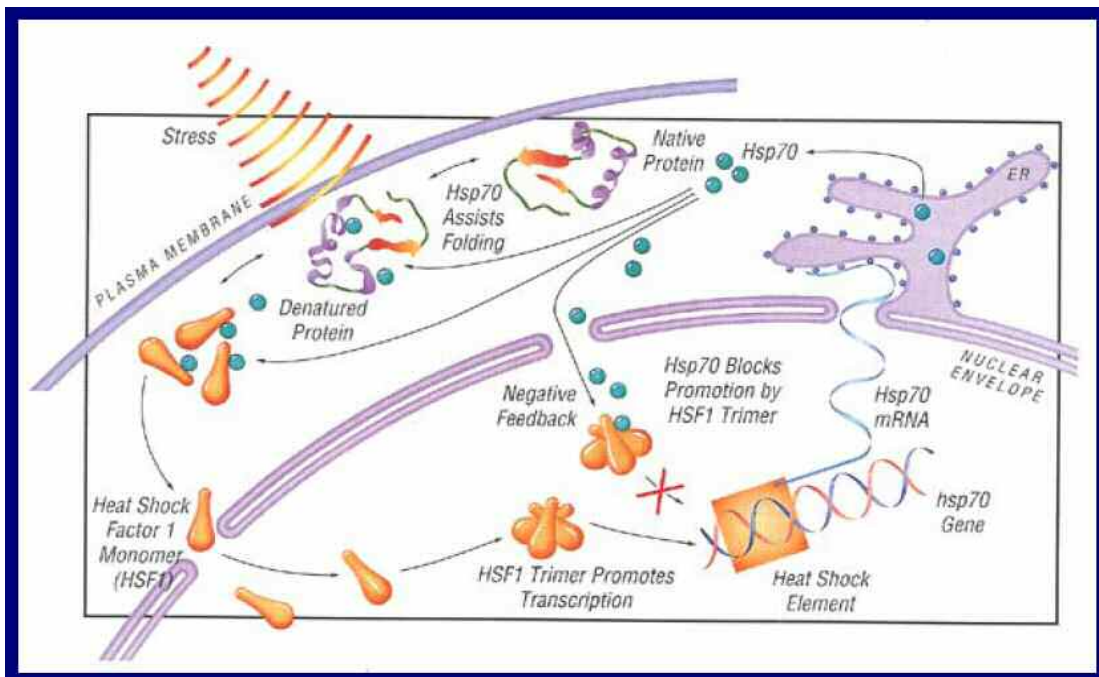


Figura 1.8: Regolazione della sintesi delle HSPs.

Le HSPs vengono suddivise sulla base del peso molecolare in 6 grandi famiglie (Tabella 1.6)

| Famiglia | Componenti | Localizzazione cellulare | Funzione |
|------------|--|--|--|
| Small HSPs | Ubiquitin Hsp10 α-crystallin Hsp27 Hsp32 | Citosol/nucleo Mitocondri Citosol Citosol/nucleo Citosol | Degradazione proteica non lisosomiale "Co-chaperone" di Hsp60 Stabilizza gli elementi del citoscheletro Stabilizza i microfilamenti, regola actina Eme ossigenasi 1, proprietà antiossidanti |
| HSP40 | Hsp40 | Citosol/nucleo | "Co-chaperone" di Hsp70 |
| HSP60 | Hsp60 | Mitocondri | Lega i polipeptidi non completamente ripiegati. Si ritrova nei granuli di zimogeno |
| HSP70 | Hsp72 Hsp73 GRP75 GRP78 | Citosol/nucleo Citosol/nucleo Mitocondri RE | Indotta dallo stress Costitutivamente espressa Coinvolta nel processo di traslocazione attraverso le membrane mitocondriali Ha un ruolo nell'assemblamento delle proteine secretorie |
| HSP90 | Hsp90 α Hsp90 β GRP94 | Citosol Citosol RE | 1-2% del totale delle proteine citoplasmatiche solubili con un ruolo di recettore per gli ormoni steroidei "Chaperone" legante il calcio |
| HSP100 | Hsp100 | Citosol/nucleo | Coinvolta nel dissolvere gli aggregati e nella termotolleranza |

Tabella 1.6 Classificazione delle HSPs in base al peso molecolare (Rakonczay Z et al., 2003)

Sebbene l'espressione delle proteine dello stress sia stata inizialmente descritta in cellule che avevano subito uno stress acuto, molti componenti di queste famiglie di proteine sono costitutivamente espressi e giocano un importante

ruolo nell'omeostasi cellulare. Fra gli stimoli in grado di indurre l'espressione di queste famiglie di proteine si riconoscono, oltre allo shock termico, una varietà di stress fisici e chimici: raggi ultravioletti, radiazioni gamma, infezioni virali e batteriche, ipossia, assenza di glucosio, agenti chimici e farmaci.

1.5.1 La famiglia delle Hsp70

Hsp70 è, di gran lunga, la proteina più conservata nel corso dell'evoluzione. Si ritrova in tutti gli organismi, dagli Archaeobacteria, alle piante, all'uomo. La proteina Hsp70 dei procarioti, DnaK, ha un'omologia di circa il 50% con le proteine Hsp70 degli eucarioti. Anche le proprietà funzionali sono altamente conservate nelle diverse specie. È interessante notare che tutti gli eucarioti possiedono più di un gene che codifica le proteine Hsp70.

La famiglia delle Hsp 70 umane comprende almeno 8 geni distinti posti su cromosomi diversi che codificano un gruppo di proteine altamente correlate: differiscono tra loro per la sequenza aminoacidica, il livello di espressione e la localizzazione subcellulare (tabella 1.7) (Tavaria et al., 1996, Daugaard M et al., 2007).

Questa famiglia include sia isoforme costitutivamente espresse sia isoforme inducibili, alcune delle quali agiscono da proteine "chaperone". Tutte queste isoforme hanno un peso molecolare compreso tra 66 e 78 kDa. La localizzazione di Hsp70-5 e Hsp70-9 è confinata al lume del reticolo endoplasmatico e alla matrice mitocondriale, rispettivamente, mentre le rimanenti sei proteine si trovano sia nel citosol che nel nucleo.

| Proteina | Altre nomenclature | Omologia Hsp70-1a | Locus | Posizione | Localizzazione cellulare | Espressione inducibile |
|----------|-------------------------------|-------------------|--------|-------------|-------------------------------|------------------------|
| Hsp70-1a | Hsp70, HSP72, Hsp70-1 | 100 % | HSPA1A | 6p21.3 | Citosol Nucleo Lisosomi | SI |
| Hsp70-1b | Hsp70, HSP72, Hsp70-1 | 99 % | HSPA1B | 6p21.3 | Citosol Nucleo Lisosomi | SI |
| Hsp70-1t | Hsp70-hom | 91 % | HSPA1L | 6p21.3 | Citosol Nucleo | NO |
| Hsp70-2 | Hsp70-3 HspA2 | 84 % | HSPA2 | 14q24.1 | Citosol Nucleo | NO |
| Hsp70-5 | Bip, Grp78 | 64 % | HSPA5 | 9q33-q34.1 | RE | NO |
| Hsp70-6 | Hsp70B' | 85 % | HSPA6 | 1cen-qter | Citosol Nucleo | SI |
| Hsc70 | Hsp70-8 Hsp73 | 86 % | HSPA8 | 11q23.3-q25 | Citosol Nucleo | NO |
| Hsp70-9 | Grp75, mtHsp75 mortalin | 52 % | HSPA9 | 5q31.1 | Mitocondri | NO |

Tabella 1.7 La famiglia delle Hsp70 umane

Tutti i componenti della famiglia possiedono i seguenti domini altamente conservati: 1. dominio ATPasico in posizione N-terminale; 2. regione intermedia che comprende siti sensibili alle proteasi; 3. dominio legante il peptide; 4. all'estremità C-terminale un dominio ricco di glicina/prolina all'interno del quale è presente la sequenza EEVD (Glu-Glu-Val-Asp) che consente il legame con le proteine "co-chaperone" e altre Hsp (Nollen EA et al., 2002; Daugaard M et al., 2007).

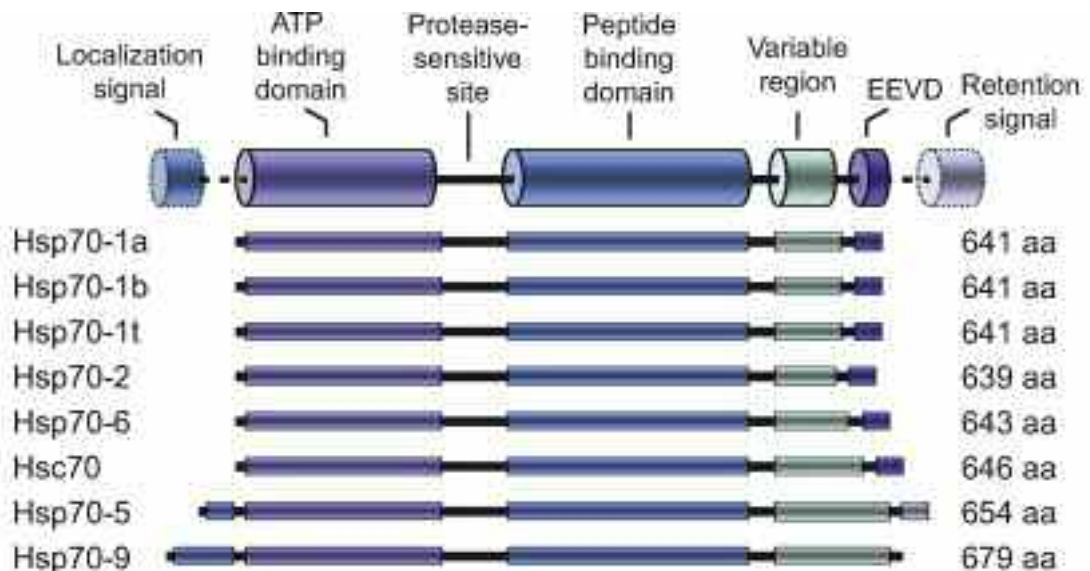


Figura 1.9: Rappresentazione schematica dei domini e dei siti di legame delle proteine Hsp70 (Daugaard M et al., 2007)

Hsp70-1a e Hsp70-1b: queste due proteine, chiamate collettivamente Hsp70-1, sono le forme inducibili più rappresentate. I geni codificanti, HSP70A1A e HSP70A1B, sono fra loro in stretto linkage e privi di introni, localizzati nel cluster del complesso maggiore di istocompatibilità di classe III, tra i loci del complemento e del TNF, sul braccio corto del cromosoma 6. In risposta a varie condizioni di stress, la trascrizione di entrambi i geni viene indotta dal fattore trascrizionale HSF1, che riconosce e lega gli elementi HSE posti, in molteplici copie, nella regione del promotore. In assenza di alterazioni patologiche, l'espressione delle proteine Hsp70-1 è tipo e fase cellulare dipendente, accumulandosi soprattutto nelle fasi G1 ed S. Accanto agli elementi HSE, nei promotori delle Hsp70 si riconoscono alcune sequenze che vengono riconosciute da fattori di trascrizione basale, come TATA, CCAAT-box-binding transcription factor e SP1. Il livello di espressione basale di HSPA1A e HSPA1B (mRNA) varia da tessuto a tessuto e, in generale, l'espressione di HSPA1A è in qualche modo superiore rispetto ad HSPA1B. Le proteine Hsp70-1, indotte dallo stress, agiscono come proteine "chaperone" permettendo alla cellula di far fronte alle aggregazioni dannose delle proteine denaturate che si accumulano durante e immediatamente dopo l'evento stressante. La loro espressione

ectopica sia in linee cellulari che in topi transgenici, conferisce protezione dagli stress che inducono danno proteico (calore, ischemia, stress ossidativi).

Hsp70-1t : Il gene che codifica Hsp70-1t (HSPA1L) è privo di introni e localizzato nella stessa regione del complesso maggiore di istocompatibilità, come HSPA1A e HSPA1B. La proteina presenta un'omologia del 91% con Hsp-1a e le maggiori differenze sono contenute nel dominio C-terminale. Il gene HSPA1L non contiene sequenze HSE nella regione del promotore e viene costitutivamente espresso a livelli elevati nel testicolo mentre è presente a livelli molto bassi negli altri tessuti. La funzione e la regolazione trascrizionale di questa proteina al momento non sono note.

Hsp70-2: Questa proteina, prodotto del gene HSPA2 posto sul cromosoma 14, viene costitutivamente espressa a bassi livelli in molti tessuti, mentre raggiunge livelli elevati nel testicolo e nel cervello. La sua espressione è frequentemente ridotta in caso di sterilità maschile.

Hsp70-5: Il gene HSPA5 è localizzato sul cromosoma 9 e codifica una proteina, compartimento specifica, costitutivamente espressa: Hsp70-5. Questa hsp, conosciuta anche come Bip o Grp78, è localizzata nel reticolo endoplasmatico dove facilita il trasporto di proteine di nuova sintesi nel lume del reticolo ed il loro ripiegamento. Hsp70-5 contiene in posizione N-terminale un segnale guida per la localizzazione nel reticolo endoplasmatico mentre in posizione C-terminale contiene un segnale "KDEL" di ritenzione a livello del reticolo endoplasmatico. Hsp70-5 si trova in tutti i tipi cellulari ma viene soprattutto espressa nelle cellule secernenti quali quelle della tiroide e delle insule pancreatiche in quanto sembra giocare un ruolo nella maturazione delle proteine secretorie.

Hsp70-6: Questo componente della famiglia, chiamato anche Hsp70B', è una proteina strettamente inducibile codificata dal gene HSPA6 posto sul cromosoma 1. Hsp70B' presenta un'omologia dell'85% con Hsp70-1a e la sua produzione viene indotta solo a seguito di uno stress severo. Nonostante questa differenza del 15% con le altre due proteine inducibili, anche Hsp70-6 contribuisce, nello stesso modo, alla risposta allo stress. Viene espressa a moderati livelli nel sangue, in particolare nelle cellule dendritiche, nei monociti e nelle cellule natural killer, mentre è praticamente assente nelle altre cellule del sangue e negli altri tessuti. Nel cromosoma 1 è contenuto anche uno pseudogene, HSPA7, che viene trascritto in risposta allo stress. La trascrizione di questo gene non dà origine ad una proteina funzionante in quanto la

presenza di un'inserzione nucleotidica al codone 340 crea un frame-shift e un conseguente codone di stop in posizione 368.

Tra le proteine inducibili della famiglia Hsp70, la Hsp70B' ha delle caratteristiche uniche in quanto viene indotta rapidamente a seguito di shock termico e presenta una breve emivita. Anche Hsp70-1 viene indotta rapidamente ma rimane stabile dopo shock termico e livelli elevati di questa proteina sono rilevabili per diversi giorni. Questa diversa emivita suggerisce che Hsp70B' è necessaria per la risposta immediata ad uno stress cellulare ed è dipendente dal numero di proteine mal ripiegate prodotte dallo stress. L'assenza di espressione basale di Hsp70B' è stata messa in relazione a variazioni nella sequenza del promotore, coinvolgenti ad esempio i TATA box o i CAAT box (Noonan EJ et al., 2007).

Hsp70-8 La forma costitutiva di Hsp70 più rappresentata è l'Hsc70, prodotto del gene HSPA8. Questa proteina è costitutivamente espressa in molti tessuti ed è coinvolta in una moltitudine di funzioni quali il ripiegamento delle proteine, la traslocazione delle proteine attraverso le membrane, l'autofagia mediata dalle proteine "chaperone", la prevenzione dell'aggregazione proteica a seguito di condizioni di stress.

In sintesi: Il promotore del gene Hsp70B' possiede delle caratteristiche biologiche che lo rendono particolarmente interessante per una applicazione in terapia genica: 1. è molto efficiente, infatti è in grado di pilotare l'espressione del gene reporter a livelli comparabili a quelli raggiunti utilizzando il promotore del citomegalovirus; 2. viene attivato e modulato dal calore. L'espressione del gene reporter, praticamente assente in condizioni basali, viene indotta dall'esposizione allo stress termico; 3 è passibile di espressione controllata: attraverso l'utilizzo di ultrasuoni focalizzati (focused ultrasound) è possibile aumentare la temperatura in un'area ben definita e permettere in questo modo l'espressione del gene solo nell'area riscaldata (Rome C et al., 2005).

1.5.2 Heat shock protein e pancreas

I componenti più importanti della famiglia delle Hsp sono costitutivamente espressi o possono essere indotti nel pancreas. In letteratura sono presenti diversi lavori che dimostrano questa ipotesi. L'applicazione preventiva di uno stress termico, di uno stimolo adrenergico o di uno stress chimico con arsenito di sodio è in grado di proteggere gli animali dalla pancreatite acuta indotta da ceruleina. Questo effetto protettivo sembra mediato dall'Hsp70 che previene la prematura attivazione del tripsinogeno all'interno degli acini pancreatici. (Frossard J-L et al., 2002; Rakonczay Z Jr et al., 2003; Bhagat L et al., 2007).

I meccanismi utilizzati dalle HSPs per proteggere il pancreas dalla pancreatite acuta non sono del tutto noti ma sembrano coinvolgere le proprietà “chaperone” di questa famiglia di proteine. È stato dimostrato che le HSPs possono aumentare la resistenza all'apoptosi o alla necrosi (Wagner AC et al., 1996; Weber H et al., 2000; Frossard J-L et al., 2001; Rakonczay Z Jr et al., 2003), diminuire i livelli di citochine proinfiammatorie (Frossard J-L et al., 2001; Rakonczay Z Jr et al., 2003) e/o esercitare effetti antiossidanti.

Vi sono alcune osservazioni a sostegno dell'importante ruolo dell'Hsp70: 1. l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso verso Hsp70 è in grado di ripristinare la capacità della ceruleina di causare, all'interno delle cellule, l'attivazione del tripsinogeno e di abolire l'effetto protettivo del pretrattamento con ipertermia (Bhagat L et al., 2000); 2. la dimostrazione che in topi knock-out per Hsp70 (Hsp70.1^{-/-}) la stimolazione con ceruleina causa una più marcata attivazione del tripsinogeno rispetto ai topi Hsp70.1^{+/+}, conferma ulteriormente il ruolo di questa proteina nella prevenzione della autoattivazione del tripsinogeno nella pancreatite acuta (Hwang J-H et al., 2005).

Gress TM et al. (1994) ed Ogata M et al. (2000) hanno descritto una diversa espressione delle Hsps nelle malattie croniche del pancreas rispetto al pancreas normale. In particolare hanno dimostrato una selettiva iperespressione di Hsp90 α nel carcinoma del pancreas e che le cellule tumorali presentavano un maggior contenuto di RNA messaggero di questa proteina. Al contrario l'Hsp90 β era costitutivamente espressa ad alti livelli in tutti e tre i gruppi (controlli, adenocarcinomi e pancreatiti croniche) e l'RNA messaggero di questa proteina si riscontrava in tutte le cellule di origine parenchimale o stromale. L'RNA messaggero di Hsp70 era invece espresso nel carcinoma pancreatico (tessuto tumorale e stroma) e nella pancreatite cronica (tessuto connettivo e residui di cellule acinari).

Infine in un recente lavoro di Aghdassi A et al. (2007) è stato dimostrato il ruolo di Hsp70 nella regolazione dell'apoptosi nelle cellule di carcinoma pancreatico. I livelli d'espressione di Hsp70 erano significativamente più elevati nelle cellule di carcinoma pancreatico rispetto alle colture cellulari di dotti pancreatici normali. Questa iperespressione è stata confermata su tessuto di pazienti sottoposti ad intervento chirurgico per neoplasia pancreatico: i tessuti neoplastici presentavano livelli di mRNA di Hsp70 significativamente aumentati rispetto ai tessuti sani vicini. L'inibizione di Hsp70 con quercetina o tramite utilizzo di specifici Hsp72 siRNA era in grado di indurre apoptosi nelle cellule di carcinoma pancreatico. Ad ulteriore conferma, è stato dimostrato da Phillips PA et al. (2007) che l'utilizzo di triptolide, piccola molecola derivante dalla pianta cinese *Tripterygium wilfordii* che agisce come inibitore della trascrizione dei geni HS,

induce morte delle cellule di carcinoma pancreatico sia *in vitro* che nell'animale da esperimento. Il meccanismo alla base di questo risultato è l'apoptosi mediata dall'inibizione dell'Hsp70. Questa molecola potrebbe quindi venir utilizzata per prevenire la progressione e la metastatizzazione del carcinoma del pancreas.

Il riscontro di questa aumentata espressione di Hsp70 nel carcinoma del pancreas è di particolare interesse in quanto suggerisce che nelle cellule tumorali la risposta allo stress è già attivata.

Questa condizione potrebbe, pertanto, favorire l'espressione di un gene, controllato da promotore termoregolabile, soprattutto nelle cellule tumorali.

2. SCOPI

Gli obiettivi di questa tesi sono stati:

1. realizzare dei vettori di espressione genica codificanti composti altamente tossici per la cellula eucariote, la cui trascrizione possa essere indotta dalla esposizione a fonti esterne di calore.

Sono state individuate la subunità catalitica della tossina difterica (DTA) e le varianti CRM176 e CRM197 come elementi di sicura tossicità cellulare. Per il controllo della trascrizione sono state individuate le sequenze regolatorie HSE dei geni termoregolabili appartenenti alla famiglia delle Hsp70.

2. verificare *in vitro* il loro possibile utilizzo nella terapia genica del carcinoma pancreatico.

A tal fine la citotossicità dei vettori realizzati con il primo obiettivo, è stata valutata in quattro diverse linee cellulari neoplastiche pancreatiche specchio, *in vitro*, della variabilità biologica di questa neoplasia *in vivo*.

In particolare pRc/RSV consente l'espressione, in cellule eucariote, del gene d'interesse sotto il controllo di un promotore costitutivo (CMV), mentre pEGFP-1 consente di valutare la capacità di promotori diversi di indurre l'espressione di un gene reporter.

Entrambi i vettori plasmidici contengono un "marker" di selezione (neomicina fosfotransferasi, NEO) sotto il controllo del promotore SV40, necessario per isolare le cellule capaci di esprimere il gene d'interesse in modo stabile.

3.3 Vettore plasmidico con promotore costitutivo (pGFP)

3.3.1 pGFP

Nel vettore di espressione per cellule eucariote sotto il controllo di un promotore costitutivo pRc/RSV è stato subclonato un gene (EGFP) capace di produrre una proteina dotata di proprietà fluorescenti (eccitazione alla lunghezza d'onda di 488 nm ed emissione a 507 nm). Il gene EGFP è stato staccato come frammento Hind III/Not I dal plasmide pEGFP-1 e ricombinato in pRc/RSV.

3.3.2 Tecnica di clonaggio di pGFP

Digestione con enzimi di restrizione

Le endonucleasi di restrizione sono enzimi di origine batterica che riconoscono specifiche sequenze di DNA e le tagliano. Ognuno di questi enzimi ha un'attività ottimale a determinati valori di temperatura, di concentrazioni saline e di pH.

La digestione dei due vettori pRC/RSV e pEGFP-1 è stata effettuata, separatamente, utilizzando 4 µg di DNA di ciascun vettore, 20 U di Hind III (New England Biolabs) ed il tampone consigliato dalla ditta fornitrice in un volume finale di 50 µL. Questa prima digestione è stata condotta a 37°C per 6 ore. L'enzima è stato inattivato a 65°C per 20 minuti prima di aggiungere 20 U di Not I (New England Biolabs) e un adeguato tampone di incubazione per un volume finale di 100 µL. La seconda digestione si è protratta per 6 h a 37°C a cui sono seguiti 20 minuti a 65°C.

Purificazione dei frammenti di digestione

I frammenti di digestione sono stati caricati su gel di agarosio al 1.2 %. Le bande contenenti EGFP e pRC/RSV digeriti sono state quindi tagliate e purificate mediante colonnine di affinità. E' stato utilizzato il QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) che permette di isolare frammenti di DNA a doppio filamento di dimensioni comprese tra 100 bp e le 10 kb, mediante l'uso di colonnine in gel di silice.

La quantità e la qualità del materiale ottenuto è stata quindi rivalutata dopo elettroforesi su gel di agarosio rispetto ad un marcatore di peso molecolare.

Ligazione dei frammenti di DNA

Le ligazioni sono state eseguite con l'enzima T4 ligasi (Invitrogen) in grado di catalizzare la formazione di legami fosfodiesterasici tra un'estremità 3' e una 5'. I frammenti (rapporto EGFP/pRC RSV di 3:1) sono stati ricombinati mediante 1U di T4 ligasi in un volume finale di 20 µL per 18 h a 4°C in presenza di un adeguato buffer di incubazione fornito dal produttore.

Trasformazione batterica

La trasformazione batterica è un processo che permette l'introduzione di DNA plasmidico in batteri, purchè questi possiedano la competenza necessaria.

In questa tesi sono stati utilizzati batteri (*E. Coli*, ceppo DH5α, Invitrogen) resi chimicamente competenti mediante l'uso di CaCl₂.

In particolare 2 µL di reazione di ligasi sono stati miscelati con 50 µL di sospensione batterica per 30 minuti a 0°C (ghiaccio fondente) e quindi sottoposti a shock termico per 40 secondi a 42°C a cui sono seguiti 2 minuti in ghiaccio.

La sospensione è stata diluita in 1 mL di terreno liquido LB (Invitrogen) ed incubata per 1 h a 37°C, in agitazione.

150 µL di sospensione batterica sono stati infine piastrati in terreno solido LB contenente l'antibiotico per la selezione dei batteri trasformati (ampicillina 100 µg/mL) e fatti crescere a 37°C per una notte.

Screening delle colonie ricombinanti e purificazione di DNA plasmidico da batteri

Da alcune delle colonie cresciute ed ulteriormente propagate in terreno liquido contenente ampicillina è stato estratto il DNA plasmidico mediante colonnine di affinità (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen). I plasmidi sono stati quindi digeriti con Hind III e Not I, stessi enzimi di restrizione utilizzati per il subclonaggio, per verificare, dopo elettroforesi su gel di agarosio, la presenza dell'inserto (eGFP).

Con il DNA plasmidico di una delle miniprep si sono trasformate cellule competenti di *E. coli* seguendo il protocollo prima descritto. Le cellule trasformate sono state propagate in terreno solido e una colonia è stata utilizzata per inoculare 500 mL di terreno liquido (maxiprep). Il plasmide è stato infine estratto con colonne di affinità di adeguata dimensione (QIAfilter Plasmid Maxi Kit, Qiagen) e quantificato spettrofotometricamente. Seguendo questo protocollo è possibile ottenere 500-800 µg di plasmide.

3.4 Vettori plasmidici sotto il controllo di promotore termoinducibile

3.4.1 pHsp-473 (V1)

Il vettore V1 è stato ottenuto inserendo in Xho I/Hind III di pEGFP-1 (Becton Dickinson Biosciences) una sequenza di 473 bp veicolata da pHsp-luc, gentilmente fornito da Eugene W. Gerner (Department of Cell Biology and Anatomy, University of Arizona, USA). Questa sequenza, che presenta un'omologia del 91% con il promotore del gene HSPA6, era stata originariamente descritta e commercializzata dalla StressGen (Canada) nel plasmide p173OR.

La procedura utilizzata è del tutto sovrapponibile a quella prima descritta per pGFP (paragrafo 3.3.2), ad eccezione degli enzimi utilizzati e dell'antibiotico usato per la selezione (Kanamicina 50 µg/mL).

3.4.2 pHsp-104 (V2) e pHsp-473+104 (V3)

La figura 3.2 illustra la sequenza di DNA da noi disegnata. Si tratta di una sequenza di 104 bp comprendente 5 siti HSE allineati testa coda e il promotore minimo del gene HSPA6 (72 bp, sequenza sottolineata). A monte e a valle della sequenza di 104 paia di basi vi sono i siti di restrizione Hind III e EcoR I.

In dettaglio: i due filamenti di DNA che compongono la sequenza descritta sono stati ottenuti per sintesi chimica (Sigma).

L'annealing *in vitro* è stato ottenuto miscelando 160 pmoli di ciascun filamento con Tris-HCl 100 mM pH=7, NaCl 1 M e EDTA 10 mM in un volume finale di 20 µL, portando la soluzione a 85°C per 10 minuti e raffreddando lentamente (1-2 h) fino a temperatura ambiente.

La sequenza di DNA a doppio filamento che ne risulta porta delle estremità "adesive" corrispondenti ai siti di taglio per Hind III ed EcoR e quindi compatibili per essere ricombinate in plasmidi tagliati con i medesimi enzimi.

Il subclonaggio nei vettori di espressione pEGFP-1 per ottenere V2 e in V1 per ottenere V3 è stato ottenuto seguendo una procedura del tutto sovrapponibile a quella prima descritta per pGFP (paragrafo 3.3.2), ad eccezione degli enzimi utilizzati e dell'antibiotico usato per la selezione (Kanamicina 50 µg/mL).

Il vettore V3 così ottenuto contiene la sequenza di 104 bp inserita al 3' della sequenza da 473 bp.

La miscela di reazione è stata sottoposta ai seguenti passaggi:

- denaturazione iniziale a 95°C per 1 minuto;
- 20 ripetizioni per pGFP e 30 ripetizioni per CRM176 e CRM197 del seguente ciclo: 94°C per 1 minuto, 60°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuto;
- estensione finale a 72°C per 10 minuti.

I prodotti di PCR sono stati precipitati con aggiunta di 5 µL (10 % del volume di amplificazione) di sodio acetato 3M pH=5.2, glicogeno (10 µg) e 2.5 volumi di etanolo assoluto freddo (-20°C).

Dopo 30 minuti a -20°C e dopo centrifugazione per 20 minuti a 14.000 g si ottiene un piccolo "pellet" di DNA che è stato lavato con etanolo al 70%.

Infine il DNA è stato risospeso e sottoposto a digestione enzimatica con 40 U di BamH I (New England Biolabs) e di Not I (New England Biolabs) in un volume finale di 100 µL con il tampone suggerito dal produttore per BamH I.

La digestione è stata protratta per 18 h avendo cura di aggiungere ulteriori 20 U di Not I dopo 12 ore.

Infine gli enzimi sono stati inattivati per 20 minuti a 65°C. Il prodotto di digestione è stato purificato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1.2 %.

I vettori pHsp-DTA wt, pHsp-DTA176 e pHsp-DTA197 sono stati ottenuti rimuovendo il frammento BamH I/Not I contenente EGFP da V3 ed inserendo il corrispondente prodotto di PCR (DTAwt, DTA176 e DTA197).

La procedura utilizzata è del tutto sovrapponibile a quella prima descritta per pGFP (paragrafo 3.3.2), ad eccezione degli enzimi utilizzati e dell'antibiotico usato per la selezione (Kanamicina 50 µg/mL) .

La figura 3.3 illustra schematicamente la procedura con cui sono stati ottenuti i vettori termoinducibili.

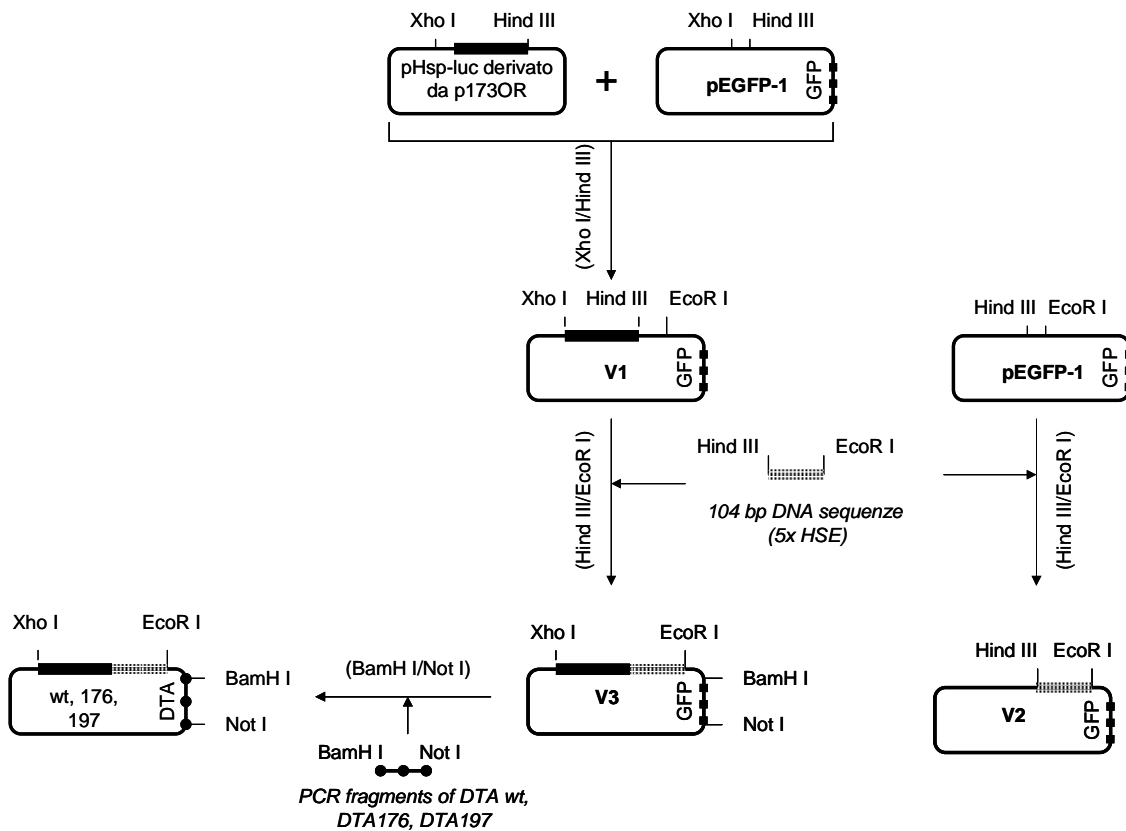


Figura 3.3: Rappresentazione schematica dei vettori termoinducibili. Sono riportati il plasmide utilizzato, le sequenze di DNA introdotte e gli enzimi di restrizione utilizzati.

Al fine di controllare le sequenze clonate nei vettori di espressione di DTAwt, DTA176 e DTA197, i costrutti plasmidici sono stati sequenziati con la strumentazione ABI Prism 310 DNA Analyzer.

3.5 Trasfezione delle linee cellulari di carcinoma del pancreas

La trasfezione consiste nel trasferimento di DNA esogeno in cellule animali o vegetali mediante tecniche fisiche o chimiche. Questo DNA può essere trattenuto nella cellula per un determinato periodo di tempo, variabile dalle 24 alle 72 ore, o può integrarsi in modo stabile nel genoma ed essere trasmesso alle cellule figlie.

Per la trasfezione abbiamo utilizzato un sistema chimico basato sull'utilizzo di Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Abbiamo testato tutte le linee cellulari neoplastiche pancreatiche precedentemente citate con un oligonucleotide fluorescente (Invitrogen), che permette di valutare l'efficienza di trasfezione, e con il vettore pGFP che permette di valutare l'efficienza di trascrizione e traduzione sulla base dell'intensità di fluorescenza rilevabile nel citoplasma delle cellule trasfettate.

In particolare, 200.000 cellule sono state seminate in pozzetti da 35 mm di diametro in 2 mL di terreno di Dulbecco Modificato contenente FCS 10% ma non antibiotici.

A distanza di 24 ore le cellule sono state trasfettate per 6 ore con 150 pmol di BLOCK-it™ Fluorescent Oligo o con 4 µg di DNA (pGFP).

Al termine il medium di trasfezione è stato sostituito con terreno di coltura completo. Dopo 24 ore le cellule sono state raccolte e la loro fluorescenza citoplasmatica è stata valutata mediante analisi FACS.

La tabella 3.2 riporta le percentuali di cellule positive all'oligonucleotide fluorescente e al gene reporter EGFP.

| Cellule Positive | BxPC3 | MIAPaCa2 | PANC1 | PSN1 |
|------------------------------|---------|----------|--------|--------|
| Oligonucleotide fluorescente | 77% | 97% | 85% | 89% |
| Gene reporter EGFP | 46-66 % | 68-95% | 80-96% | 62-86% |

Tabella 3.2: Efficienza di trasfezione nelle quattro linee cellulari neoplastiche pancreatiche

Seguendo la medesima metodica abbiamo trasfettato le linee cellulari neoplastiche pancreatiche con tutti i vettori utilizzati nello studio.

3.5.1 Trasfezione transiente

Le linee cellulari trasfettate sono state mantenute a 37°C per 24 ore e poi utilizzate negli esperimenti di shock termico o nelle prove di tossicità *in vitro*.

3.5.2 Trasfezione stabile

Le linee cellulari trasfettate con i vettori contenenti EGFP sono state selezionate sostituendo, 48 ore dopo la trasfezione, il medium di coltura con terreno contenente 1 mg/mL di G418 (Invitrogen). La G418, un analogo della neomicina, consente di selezionare le cellule stabilmente trasfettate, capaci di sopravvivere in presenza dell'antibiotico grazie alla resistenza portata dal vettore (NEO). Dopo 15 giorni, durante i quali il terreno veniva sostituito ogni 3 giorni, le cellule sopravvissute sono state stabilizzate come nuove linee cellulari (linee stabilmente trasfettate).

3.6 Analisi dell'espressione di eGFP (FACS, Western Blot, Real time PCR)

3.6.1 Analisi FACS

Il gene reporter da noi utilizzato codifica una proteina eGFP isolata dall'*Aequoria victoria*, che non viene sintetizzata dalle cellule dei mammiferi, in grado di emettere fluorescenza verde (507nm) se eccitata alla lunghezza d'onda di 488 nm. Pertanto la presenza di segnale fluorescente all'interno delle cellule è indice di trascrizione e traduzione della proteina da parte del vettore inserito e l'intensità di fluorescenza è indice della magnitudo di questo processo. La fluorescenza dell'eGFP è stata misurata citofluorimetricamente (EPICS XL, Beckman Coulter) nel citoplasma delle cellule trasfettate.

Inizialmente è stato creato un "gate" attorno alla popolazione di cellule integre: in questo modo vengono eliminati i frammenti e le piccole particelle. La soglia M1 (range 0-1) è stata definita valutando la fluorescenza delle cellule di controllo (non trasfettate). L'analisi della popolazione compresa nel "gate" ha dimostrato che tutte le linee di controllo emettono la maggior parte della loro fluorescenza nel range di M1. La fluorescenza delle cellule trasfettate è rilevabile nel range M2 (>1 scala logaritmica).

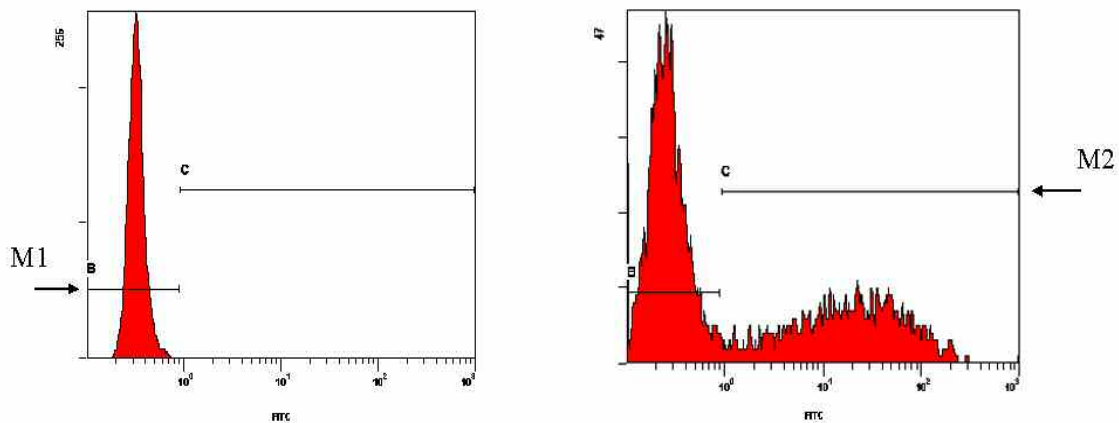


Figura 3.4: Analisi citofluorimetrica dell'espressione di eGFP. M1= range che comprende la fluorescenza delle cellule di controllo, M2= range che rileva la fluorescenza delle cellule trasfettate.

3.6.2 Analisi Western blot

Questa tecnica permette di rilevare, grazie all'impiego di un anticorpo specifico, la presenza della proteina d'interesse all'interno di una miscela proteica eterogenea.

Per l'analisi western blot le cellule sono state raccolte a distanza di 12 ore dallo shock termico, lisate in 100 μ L per 1.0×10^6 cellule in tampone di lisi (20mM TRIS-HCl pH7.5, NaCl 150mM, EDTA_{Na} 2, TRITON X-100 1%, DTT 1mM)

addizionato con una miscela di inibitori delle proteasi al 10% (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) e congelate a -80°C.

Come controlli positivi sono stati utilizzati un lisato cellulare di linea stabilmente trasfettata con EGFP e un lisato di *E. Coli* esprimente la proteina umana ricombinante HSP70B' (20µL, Stressgen).

Le proteine contenute nei campioni d'interesse sono state dapprima separate in base al loro peso molecolare in SDS-PAGE e poi trasferite su membrana PVDF 0.2 µm. In particolare, 120 µg di estratto cellulare (quantificato mediante saggio proteico secondo il metodo Bradford, Bio-Rad) sono stati denaturati in condizioni riducenti con sodio dodecilsolfato e beta mercaptoetanololo, separati con un gel di poliaccrilamide al 10% e trasferiti, a 50 mA (amperaggio costante), su membrana PVDF.

Prima del trasferimento, la membrana PVDF è stata attivata tramite trattamento con etanolo per 1 minuto e successivamente equilibrata nel tampone blotting (TRIS-glicina 10% e metanolo 10%).

La membrana è stata quindi saturata con una soluzione di BSA al 3% per due ore in agitazione continua a temperatura ambiente.

La membrana è stata poi incubata con l'anticorpo primario, specifico per le proteine da individuare, diluito opportunamente, in una soluzione di BSA al 1.5%, alle concentrazioni riportate in tabella 3.3. Questa incubazione è stata eseguita in agitazione continua per due ore a temperatura ambiente.

Gli anticorpi utilizzati, per l'analisi dell'espressione di eGFP e per l'analisi di espressione di Hsp70B', sono i seguenti:

| Anticorpo | Sorgente | Tipo di anticorpo | Concentrazione |
|----------------------------------|----------|--------------------------|----------------|
| Anti-GFP(Invitrogen) | Coniglio | Policlonale, isotipo IgG | 1:2000 |
| Anti-HSP70B'(SPA-756, Stressgen) | Coniglio | Policlonale | 1:2500 |

Tabella 3.3 Specifiche degli anticorpi utilizzati per l'analisi western blot

L'eccesso di anticorpo è stato rimosso con 3 lavaggi, di 15 minuti ciascuno, in PBS Tween20 0.1%. L'incubazione con anticorpo secondario coniugato a perossidasi di cavallo (HRP) è stata effettuata per 30 minuti in una soluzione di BSA al 1.5%. La membrana è stata quindi lavata come descritto in precedenza per rimuovere l'eccesso di anticorpo e incubata per 1 minuto con ECL (Amersham ECL detection reagent) in assenza di luce.

L'enzima HRP è in grado, in presenza di perossido di idrogeno, di ossidare il luminolo, emettendo una luce che impressiona una lastra fotografica (Amersham) nel punto in cui è presente la proteina d'interesse.

3.6.3 Real time PCR

Le analisi FACS e western blot evidenziano la quantità complessiva di proteina sintetizzata risultante dai processi di trascrizione genica e traduzione. Al fine di studiare il processo di trascrizione abbiamo messo a punto un protocollo di quantificazione dell'RNA messaggero di eGFP mediante Real Time PCR basata sull'uso di sonde fluorogeniche di tipo TaqMan.

Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto a partire da linee cellulari stabilmente trasfettate 2, 4, 6, 8 e 24 ore dopo shock termico (42.5°C per 1.5 ore) e dalle stesse linee cellulari stabilmente trasfettate non sottoposte a shock termico (cellule di controllo).

Le cellule sono state risospese in 200 µL di PBS, lisate in 400 µL di una soluzione contenente guanidina-HCl 4.5 M che ha il compito di rompere le membrane cellulari e inattivare le RNasi presenti. Il materiale lisato veniva conservato a -20°C per un massimo di 7 giorni prima del completamento dell'estrazione dell' RNA totale.

Il lisato delle cellule veniva quindi purificato mediante colonnine di affinità contenenti un filtro costituito da fibre di vetro (High Pure RNA Isolation Kit, Roche). Dopo centrifugazione a 8000 g per 15 secondi, all' RNA che rimaneva adeso alle fibre di vetro venivano aggiunti 100 µL di una soluzione contenente 200 U di DNasi I al fine di digerire il DNA contaminante. Dopo lavaggio con tamponi contenenti guanidina-HCl 5 M, TrisHCl 20 mM, pH 6.6 e NaCl 20 mM, TrisHCl 2 mM, pH 7.5, rispettivamente, l'RNA veniva eluito in 50 µL di acqua sterile trattata con dietilpirocarbonato (DEPC).

Determinazione della concentrazione dell' RNA.

La quantità di RNA ottenuta da ogni estrazione è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260 nm, tenendo conto che una soluzione di RNA di 40 µg/mL ha una densità ottica pari a 1. Allo stesso modo, con lettura a 280 nm, era valutata la presenza di proteine residue al processo di purificazione. Il rapporto DO 260/DO 280 fornisce una stima della purezza dell'RNA: sono stati considerati accettabili e processabili campioni con rapporto superiore a 1.65.

Retrotrascrizione dell' RNA.

L'RNA totale di ciascun campione e' stato retrotrascritto a cDNA utilizzando la SuperScriptTM II RnasiH⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen), enzima purificato dal virus Moloney della leucemia murina. Come innesco per l'attività enzimatica, è stata utilizzata una miscela di esameri oligonucleotidici (Random Primers,

Invitrogen), capaci di trovare numerosi siti di appaiamento in ciascuna molecola di RNA. Tali esameri rendono possibile la retrotrascrizione contemporanea di ogni diverso RNA presente nel campione.

Protocollo di retrotrascrizione:

I seguenti reattivi vengono incubati ad una temperatura di 70°C per 10 minuti e successivamente a 25°C per 10 minuti:

- 750 ng di "Random primers"
- 3 µg di RNA
- H₂O-DEPC q.b. a 35 µL

Vengono aggiunti quindi:

- 12µL di tampone di reazione 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3 a 25 °C, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- 6 µL di Ditiotreitolo (DTT) 0.1 M
- 0.5 mM di ciascun dNTP

La miscela di reazione è stata coperta con olio minerale (Sigma) e sottoposta ai seguenti passaggi:

- incubazione a 42°C per 90 minuti dopo aver aggiunto 200 U di enzima SuperScript™ II RNasiH- Reverse Transcriptase (Invitrogen).
- inattivazione dell'enzima a 70°C per 15 minuti.

In ogni seduta di retrotrascrizione dell'RNA veniva processato un controllo negativo contenente acqua sterile al posto del campione.

I cDNA venivano conservati a -20°C fino alle successive analisi.

Amplificazione del trascritto della β2 microglobulina.

È stata ricercata, in ogni aliquota retrotrascritta di ciascun campione, la presenza del cDNA del gene della β2 microglobulina. Questo gene è espresso costitutivamente in tutte le cellule dell'organismo.

Il successo nel verificare la sua presenza/amplificabilità garantisce circa l'integrità dell'RNA estratto e la buona riuscita della reazione di retrotrascrizione. Solamente i campioni con riscontro positivo per la β2 microglobulina sono stati successivamente analizzati per la presenza/quantità di eGFP mRNA.

Ciascuna PCR è stata eseguita in un volume finale di 25 µl nelle seguenti condizioni, utilizzando i “primers” riportati nella tabella 3.4:

- 2 µL di cDNA;
- 12,5 pmol di primer “forward”;
- 12,5 pmol di primer “reverse”;
- 0,2 mM di ciascun dNTP;
- 2,5 µL di tampone di reazione 10X (500 mM KCl; 100 mM Tris/HCl pH=9 a 25 °C; 1% Triton-100);
- 1,5 mM MgCl₂;
- 1 unità di Taq polimerasi (Promega);
- Acqua bidistillata sterile q.b. a 25 µL.

La miscela di reazione è stata coperta con olio minerale (Sigma) e sottoposta ai seguenti passaggi:

- denaturazione iniziale a 95°C per 5 minuti;
- 40 ripetizioni del seguente ciclo: 94°C per 30 secondi, 55°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuto;
- estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Per verificare l'assenza di contaminazioni tra campioni o della miscela di reazione ogni seduta prevedeva la presenza di un controllo negativo in cui acqua bidistillata sostituiva il campione. Parallelamente veniva processato anche il controllo negativo di retrotrascrizione al fine di individuare eventuali contaminazioni precedenti l'amplificazione della β2 microglobulina .

| Sequenza del primer | T melting(°C) | Dimensione amplificato (pb) |
|---------------------------------------|---------------|-----------------------------|
| Forward: 5' AGCAGAGAATGGAAAGTCAA 3' | 57 | 534 |
| Reverse: 5' TGTTGATGTTGGATAAGAGAAT 3' | 56 | |

Tabella 3.4 Sequenze dei “primers” utilizzati per la determinazione del trascritto della β2 microglobulina.

Dieci µL del prodotto di amplificazione sono stati caricati in un gel d'agarosio al 2% addizionato di bromuro d'etidio alla concentrazione finale di 0,5 µg/mL e separati applicando un campo elettrico con differenza di potenziale di 90 V per 60 minuti

Quantificazione relativa dell'eGFP mRNA.

L'RNA messaggero dell' eGFP è stato quantificato in maniera relativa utilizzando un protocollo di RealTime PCR con curva standard. La quantità di trascritto in ciascun campione, determinata per interpolazione con la curva standard, è stata rapportata alla quantità del trascritto nel campione calibratore (cellule di controllo). Pertanto le quantità di RNA messaggero dell' eGFP sono espresse come variazioni relative rispetto al calibratore (campione 1x). Le possibili variazioni nella quantità di cDNA aggiunte alle diverse reazioni di PCR

sono state normalizzate mediante la quantificazione contemporanea, per ogni PCR, di un trascritto di riferimento utilizzato come controllo endogeno (RNA messaggero dell'enzima ipoxantina ribosil transferasi, HPRT1).

Real Time PCR

Il cDNA di eGFP e di HPRT1 sono stati amplificati contestualmente in pozzetti separati a partire da 20 ng di RNA totale retrotrascritto mediante RealTime PCR utilizzando la chimica delle sonde ad idrolisi TaqMan e la strumentazione ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (AB Applied Biosystems).

I primer specifici per l'eGFP cDNA così come la sonda interna alla sequenza bersaglio sono stati disegnati grazie al software Primer Express (AB Applied Biosystems):

| | |
|------------------|------------------------------|
| primer senso | 5'AGTCCGCCCTGAGCAAAGA3' |
| primer antisenso | 5'TCCAGCAGGACCATGTGATC3' |
| sonda TaqMan | 5'6-FAM-CCCAACGAGAAGCG-MGB3' |

La curva standard per l'eGFP mRNA è stata ottenuta mediante diluizione seriale 1:10 (da 4.2×10^4 a 0.42 fg) del vettore V1.

La quantificazione dell'HPRT1 mRNA ha previsto l'uso di una curva standard costituita da diluizioni seriali 1:5 (da 2×10^5 a 3.2×10^2 pg) di cDNA retrotrascritto a partire da RNA totale estratto dalla linea cellulare umana HepG2.

Tali diluizioni venivano preparate nuove ad ogni saggio successivo di PCR quantitativa e utilizzate per la produzione degli standard.

Ciascun punto della curva standard così come ciascun campione è stato analizzato in triplicato.

La miscela di reazione per l'eGFP era così composta: 300 nM del primer Mix (Applied Biosystems) in un volume finale di 30 μ L.

La miscela di reazione per l'HPRT1 era così composta: 1x Universal Master Mix, 1x Gene Expression Assay Mix (PDARs part number 4326321E, Applied Biosystems) in un volume finale di 30 μ L.

La reazione di PCR prevedeva il seguente seguente profilo di amplificazione: 50°C 2 minuti, 95°C 10 minuti seguiti da 45 cicli così strutturati: 95°C 15 secondi e 60°C 1 minuto.

3.7 Esperimenti di shock termico

È noto che i promotori termoinducibili vengono attivati a temperature elevate (ottimali 40°C - 42°C) per un tempo variabile tra 1 e 3 ore. Al fine di individuare, nelle linee cellulari di carcinoma pancreatico, la migliore combinazione di temperatura e tempo di esposizione per ottenere la massima espressione genica, abbiamo utilizzato, come riferimento, le linee trasfettate con il vettore pHsp-473 (V1), che presenta un'omologia del 91% con il promotore del gene HSPA6, in quanto già descritto in letteratura.

Le cellule stabilmente trasfettate con V1 sono state raccolte, contate e risospese in terreno completo addizionato di G418 (1mg/mL) alla concentrazione di 100.000 cellule/mL. Due mL di tale sospensione (200.000 cellule) sono stati seminati in pozzetti da 35 mm di diametro il giorno precedente gli esperimenti di shock termico.

Lo shock termico veniva eseguito immergendo le piastre in bagno termostato a temperatura controllata.

Sono state eseguite due serie di esperimenti:

Analisi del range di temperature: le linee cellulari stabilmente trasfettate con il vettore pHsp-473 (V1) sono state mantenute a 37°C o sono state sottoposte a shock termico della durata di 2 ore alle seguenti temperature: 38°C, 39 °C, 40°C, 41°C, 42°C, 42.5°C, 43°C e 44°C, e riportate a 37°C per le successive 24 ore. Le cellule sono state infine raccolte, risospese in tampone PBS e l'espressione di eGFP è stata misurata mediante analisi FACS.

Analisi del tempo di esposizione: le linee cellulari stabilmente trasfettate con il vettore pHsp-473 (V1) sono state mantenute a 37°C o sono state sottoposte a shock termico alla temperatura di 42.5°C per 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 e 3 ore e riportate a 37°C per le successive 24 ore. Le cellule sono state infine raccolte, risospese in tampone PBS e l'espressione di eGFP è stata misurata mediante analisi FACS.

3.8 Confronto dei livelli di espressione di eGFP tra i diversi vettori sottoposti a shock termico.

Dopo aver definito con il vettore V1 la temperatura ed il tempo di esposizione ottimali, tutte le linee cellulari trasfettate in maniera transiente con i vettori V1, V2 e V3 sono state mantenute a 37°C o sottoposte a shock termico a 42.5°C per 1.5 ore, e riportate a 37°C per le successive 24 ore. Le cellule sono state infine raccolte, risospese in tampone PBS e l'espressione di eGFP è stata misurata mediante analisi FACS.

In una seconda serie di esperimenti, tutte le linee cellulari trasfettate con i vettori V1, V2 e V3 sono state selezionate per 15 giorni con G418. Le linee stabilizzate sono state seminate in fiasche da 25 cm² (1.5 x 10⁶/fiasca), mantenute a 37°C o sottoposte a shock termico a 42.5°C per 1.5 ore.

Per l'analisi western blot le cellule sono state riportate a 37°C, raccolte a distanza di 12 ore dallo shock termico, lisate in 100 µL per 1.0x10⁶ cellule in tampone di lisi (20mM TRIS-HCl pH7.5, NaCl 150mM, EDTANa₂, TRITON X-100 1%, DTT 1mM) addizionato con una miscela di inibitori delle proteasi al 10% (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) e congelate a -80°C.

Per la quantificazione del RNA messaggero, le cellule sono state riportate a 37°C, raccolte dopo 0, 2, 4, 6, 8 e 24 ore dallo shock termico, lisate e utilizzate per l'estrazione del RNA messaggero (vedi paragrafo 3.6.3)

3.9 Prove di citotossicità *in vitro* per le linee cellulari trasfettate con pHsp-DTA wt, pHsp-DTA176 e pHsp-DTA197

Le cellule di tutte le linee cellulari trasfettate, in maniera transiente, con i vettori pHsp-DTA wt, pHsp-DTA176 e pHsp-DTA197 sono state raccolte 24 ore dopo la trasfezione, contate e risospese in medium completo in modo da ottenere una concentrazione finale di 30x10³ cell/mL. 100 µL di ogni sospensione (3000 cell) sono stati seminati in quadruplo in due micropiastre da 96 pozzetti per coltura cellulare. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore per consentire alle cellule di aderire nei pozzetti. Il giorno successivo una piastra è stata mantenuta a 37°C mentre l'altra è stata sottoposta a shock termico a 42.5°C per 1.5 ore.

La vitalità/mortalità delle cellule trasfettate, mantenute a 37°C o sottoposte a shock termico, è stata quantificata mediante saggio con XTT (Roche) dopo 24, 48, 72, 96 e 144 ore dalla trasfezione.

Questo saggio è basato sulla capacità delle cellule vive di trasformare l'XTT in Sali di formazano che assorbono a $\lambda = 450_{nm}$. L'assorbimento valutato spettrofotometricamente a 450 nm riflette la densità delle cellule vive.

4. RISULTATI

4.1 Espressione di Hsp70B' in linee cellulari di carcinoma pancreatico

In letteratura non sono presenti dati riguardanti l'espressione di Hsp70B' nel carcinoma del pancreas. Abbiamo pertanto analizzato, mediante analisi western blot, l'espressione di Hsp70B' a 37°C e dopo esposizione a shock termico (42.5°C per 1.5 ore) in quattro linee cellulari neoplastiche pancreatiche.

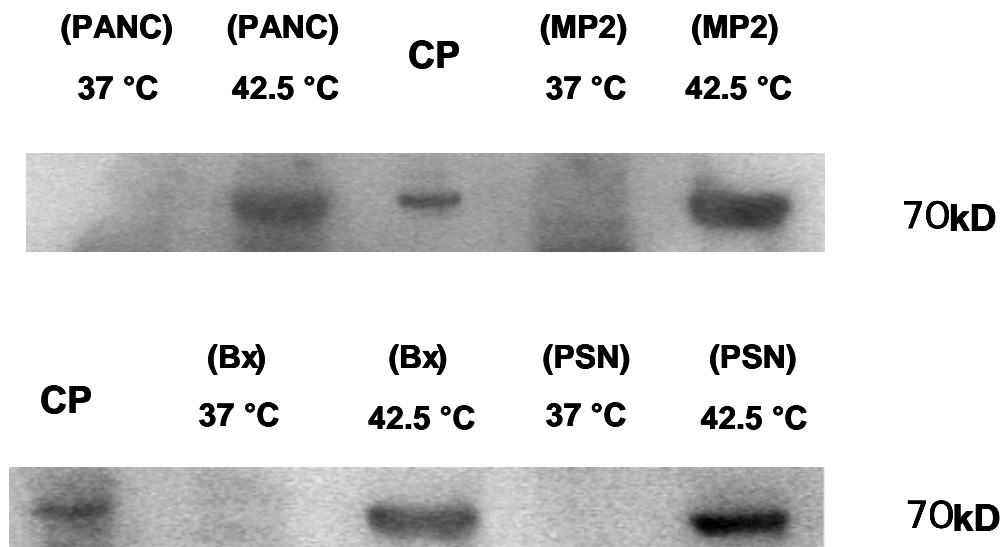


Figura 4.1: *Analisi western blot della proteina Hsp70B' in quattro linee cellulari neoplastiche pancreatiche mantenute a 37°C o sottoposte a shock termico (42.5°C per 1.5 ore). CP=Controllo positivo.*

La figura 4.1 evidenzia che la proteina Hsp70B', di 70 kDa, non viene espressa da nessuna linea neoplastica pancreatico se mantenuta in coltura alla temperatura di a 37°C, mentre viene indotta dopo esposizione al calore (42.5°C per 1.5 ore).

4.2 Individuazione della temperatura ottimale di shock termico

Al fine di individuare la temperatura ottimale in grado di indurre la massima espressione genica dopo trasfezione cellulare con il vettore pHsp-473 (V1), i livelli intracellulari della proteina eGFP sono stati determinati mediante analisi citofluorimetrica. La figura 4.2 riporta l'intensità di fluorescenza dell'eGFP misurata nelle linee cellulari stabilmente trasfettate con il vettore pHsp-473 (V1), mantenute a 37°C o esposte per 2 ore alle seguenti temperature: 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C e 44°C. I livelli di espressione di eGFP, analizzati dopo 24 ore dallo shock termico, erano significativamente aumentati dopo

esposizione a temperature superiori a 40°C, con un picco massimo di espressione tra i 42°C e i 43°C.

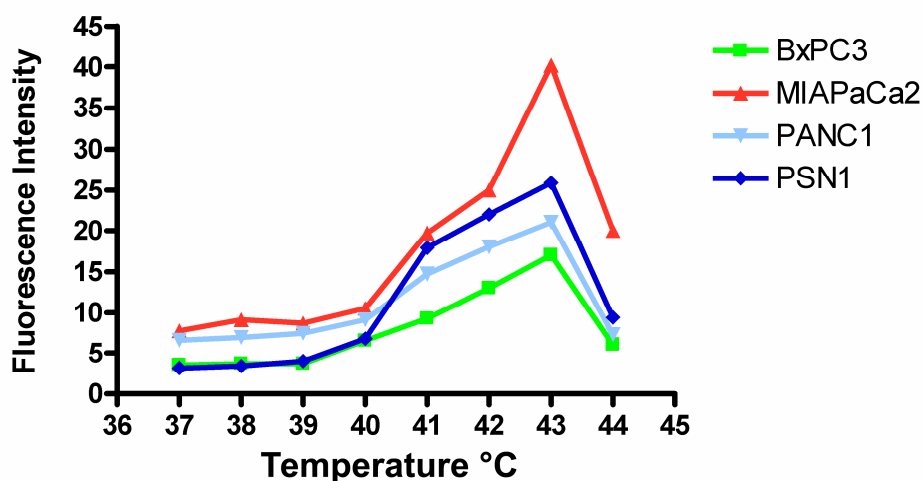


Figura 4.2: Analisi dell'intensità di fluorescenza di eGFP nelle quattro linee neoplastiche pancreatiche trasfettate con il vettore pHsp-473 (V1) e sottoposte, per 2 ore, a shock termico nel range di temperatura 37°C - 44°C.

L'esposizione a temperature superiori a 41°C per lunghi periodi di tempo può, di per sé, avere effetti collaterali tossici sui tessuti esposti e anche minime variazioni in aumento della temperatura possono avere ripercussioni significative. In questo contesto, è stata effettuata una seconda serie di esperimenti atti ad individuare la temperatura ottimale per la massima espressione genica considerando il range 42°C - 43°C e realizzando variazioni di 0.5°C.

Le 4 linee cellulari neoplastiche pancreatiche sono state sottoposte a shock termico della durata di 2 ore alle seguenti temperature: 42°C, 42.5°C e 43°C.

I risultati, riportati nella figura 4.3, indicano che la temperatura ottimale per raggiungere i massimi livelli di fluorescenza è pari a 42.5°C.

Questa temperatura è stata quindi utilizzata nei successivi esperimenti atti a definire il tempo di esposizione ottimale.

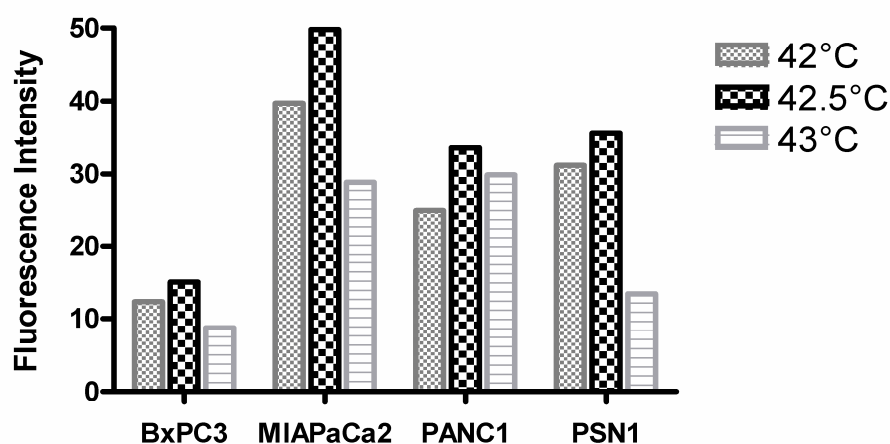


Figura 4.3: Analisi dell'intensità di fluorescenza di eGFP nelle quattro linee neoplastiche pancreatiche trasfettate con il vettore pHsp-473 (V1) e sottoposte, per 2 ore, a shock termico alle temperature di 42°C, 42.5°C e 43°C

4.3 Individuazione del tempo di esposizione ottimale allo shock termico

Le linee cellulari stabilmente trasfettate con il vettore pHsp-473 (V1) sono state sottoposte a shock termico alla temperatura di 42.5°C per 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 e 3 ore. I risultati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica dell'eGFP sono riportati nella figura 4.4. Il picco di fluorescenza di eGFP veniva raggiunto quando lo shock termico veniva protratto per almeno 1.5 ore, rimanendo invariato per esposizioni prolungate fino ad un massimo di 2.5 ore. Esposizioni più prolungate (3.0 ore) erano associate ad una minore espressione. Abbiamo pertanto deciso di utilizzare per tutti i successivi esperimenti di shock termico una esposizione alla temperatura di 42.5°C per 1.5 ore, tempo sufficientemente lungo da garantire il massimo livello di trascrizione di eGFP sotto il controllo del promotore termoregolabile e nello stesso tempo sufficientemente breve da limitare gli effetti collaterali dovuti all'esposizione ad elevate temperature delle cellule non trasfettate.

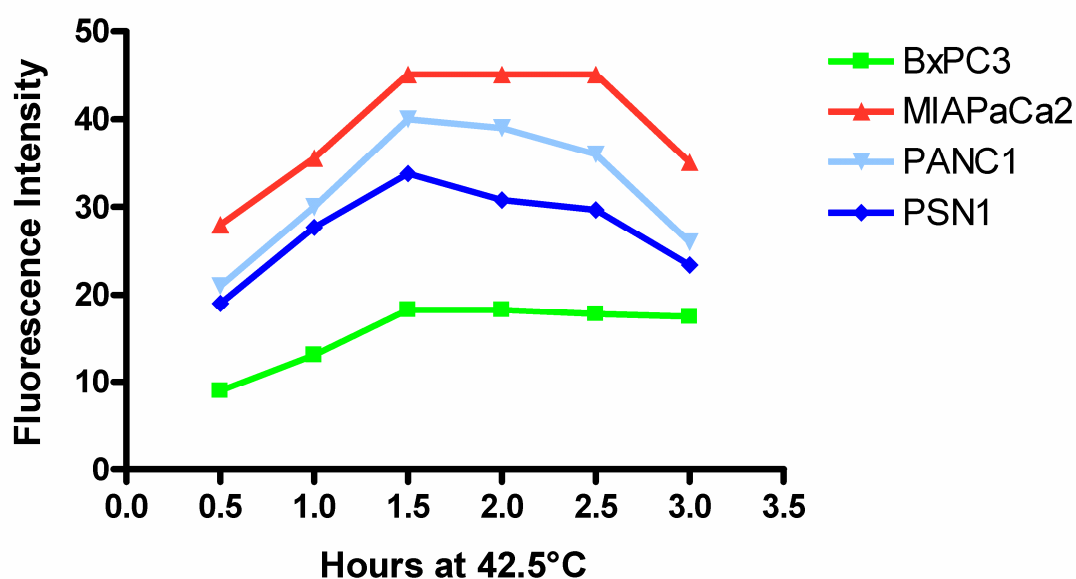


Figura 4.4: *Analisi dell'intensità di fluorescenza di eGFP nelle quattro linee neoplastiche pancreatiche trasfettate con il vettore pHsp-473 (V1) e sottoposte a shock termico alla temperatura di 42.5°C nel range di tempo 0.5- 3.0 ore.*

L'effetto dello shock termico dopo trasfezione con pHsp-473 (V1) sulla espressione di eGFP, è stata analizzata anche mediante analisi western blot.

Dalle linee stabilmente trasfettate mantenute a 37°C o sottoposte a shock termico (42.5°C) per 1.5 ore, sono state ottenute le proteine totali dopo 12 ore.

Dopo separazione elettroforetica su gel di poliaccrilamide, le proteine sono state trasferite su membrana PVDF. L'espressione di eGFP è stata quindi analizzata mediante l'utilizzo di anticorpi policlonali. La figura 4.5 riporta i risultati ottenuti con la linea MIAPaCa2 e dimostra chiaramente che l'espressione della

proteina eGFP pilotata da promotore termoregolabile era identificabile solo dopo esposizione al calore (pozzetto 2 vs pozzetto 4). Risultati identici sono stati ottenuti con le altre tre linee cellulari studiate.

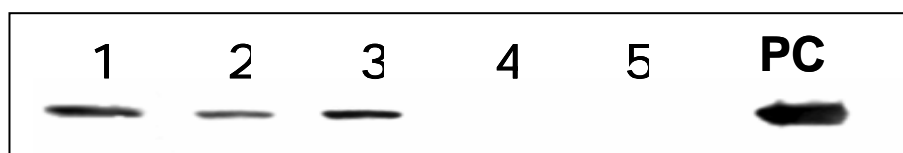


Figura 4.5: Analisi western blot dell' espressione di eGFP nella linea cellulare MIA PaCa2. 1. pGFP, T=42.5°C x 1.5 h; 2. V1, T=42.5°C x 1.5 h; 3. pGFP, T=37°C; 4. V1, T=37°C; 5. cellule non transfettate; PC= controllo positivo.

4.4 Confronto tra i livelli di espressione dell'eGFP nelle linee neoplastiche pancreatiche trasfettate con i vettori termoregolabili V1, V2 e V3

L'espressione di eGFP ottenuta a 37°C e dopo esposizione al calore (42.5 °C per 1.5 ore) nelle quattro linee cellulari trasfettate in maniera transiente con i vettori V1, V2 e V3, comprendenti i tre diversi promotori termoinducibili, è stata quantificata mediante analisi citofluorimetrica, effettuata a distanza di 24 ore dallo shock termico. Nella tabella 4.1 vengono riportate le medie, gli errori standard e l'analisi statistica (test *t* di Student per dati appaiati) dei risultati ottenuti. L'intensità di fluorescenza di eGFP misurata dopo shock a 37°C, utilizzando i risultati di almeno 3 diversi esperimenti.

| Linee cellulari | Vettori | 37°C (Media±SEM) | 42.5°C (Media±SEM) | <i>t</i> di Student |
|-----------------|---------|------------------|--------------------|--------------------------|
| BxPC3 | V1 | 7.04 ± 0.9 | 52.27 ± 1.6 | <i>t</i> =27.0, p<0.01 |
| | V2 | 7.05 ± 0.5 | 51.75 ± 4.4 | <i>t</i> =9.04, p=0.07 |
| | V3 | 7.75 ± 0.7 | 99.8 ± 2.2 | <i>t</i> =31.96, p<0.05 |
| MIA PaCa2 | V1 | 3.8 ± 0.8 | 19.23 ± 3.2 | <i>t</i> =5.9, p<0.01 |
| | V2 | 3.96 ± 1 | 31.93 ± 0.7 | <i>t</i> =19.19, p<0.01 |
| | V3 | 3.1 ± 0.5 | 46.88 ± 1.5 | <i>t</i> =28.4, p<0.001 |
| PANC1 | V1 | 18.33 ± 1.9 | 49.1 ± 4.6 | <i>t</i> =7.57, p<0.001 |
| | V2 | 19.06 ± 1.85 | 85.37 ± 10.9 | <i>t</i> =5.9, p<0.05 |
| | V3 | 22 ± 3.6 | 102.47 ± 4.9 | <i>t</i> =11.68, p<0.001 |
| PSN1 | V1 | 3.33 ± 0.4 | 38.23 ± 6.5 | <i>t</i> =5.73, p<0.05 |
| | V2 | 7.08 ± 1.2 | 63.65 ± 5.3 | <i>t</i> =14.1, p<0.05 |
| | V3 | 5.33 ± 0.78 | 97.05 ± 2.9 | <i>t</i> =25.23, p<0.05 |

Tabella 4.1. Media ± errore standard e significatività dei valori di intensità di fluorescenza di eGFP misurati a 37°C e dopo esposizione a 42.5°C nelle quattro linee cellulari neoplastiche pancreatiche trasfettate con i vettori V1, V2 e V3.

La figura 4.6 riporta graficamente il confronto tra i tre vettori nelle quattro linee neoplastiche pancreatiche.

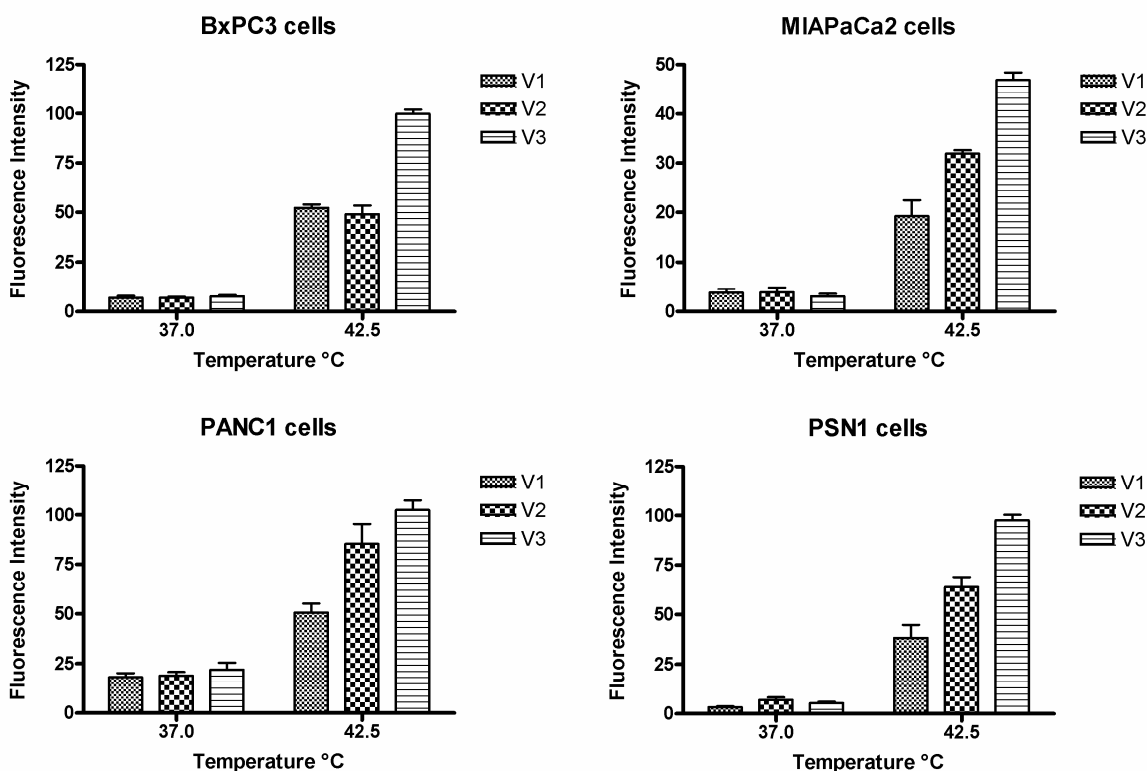


Figura 4.6: Confronto delle intensità di fluorescenza di eGFP misurate a 37°C e dopo esposizione a 42.5°C per 1.5 ore nelle quattro linee cellulari neoplastiche pancreatiche trasfettate con i vettori V1, V2 e V3.

Nonostante il promotore del vettore V2 sia costituito solo da 5 HSE disposti in tandem e dal promotore minimo del gene HSPA6, questo ha permesso di ottenere livelli di espressione di eGFP sovrapponibili (linea BxPC3) o superiori (linee MIAPaCa2, PANC1 e PSN1) rispetto a quelli ottenibili con il promotore commerciale di V1. Rispetto a quest'ultimo, il promotore di V2 ha il vantaggio di essere più corto (104 bp vs 473 bp) e quindi più facilmente maneggiabile.

Il promotore di V3 (104 bp più 473 bp) è risultato essere il più efficiente, consentendo di raggiungere livelli di fluorescenza di eGFP 2-3 volte superiori rispetto a quelli ottenibili trasfettando le linee cellulari con il vettore V1.

Il promotore di V3, pertanto, è risultato quello in grado di pilotare l'espressione genica ai massimi livelli dopo esposizione al calore; in altri termini, fra i tre promotori studiati, quello di V3 è il più efficiente e pertanto il più adatto per il raggiungimento dei nostri obiettivi.

4.5 Confronto tra i livelli di trascrizione del gene eGFP nelle linee neoplastiche pancreatiche trasfettate con i vettori termo-regolabili V1, V2 e V3

Al fine di verificare se l'aumento dei livelli di espressione della proteina eGFP misurati citofluorimetricamente correlavano con la trascrizione genica, abbiamo quantificato i livelli dell'RNA messaggero di eGFP mediante Real Time PCR. Questa misurazione è stata effettuata nelle linee cellulari stabilmente trasfettate 2, 4, 6, 8 e 24 ore dallo shock termico (42.5°C per 1.5 ore) con riferimento alle stesse linee cellulari non sottoposte a shock termico. Un aumento progressivo dei livelli di trascrizione di eGFP è stato rilevato in tutte le linee trasfettate con i tre vettori nelle prime otto ore dopo esposizione delle stesse allo shock termico (figura 4.7); i livelli di mRNA si riducevano dopo 24 ore, raggiungendo in tutte le condizioni da noi testate livelli di espressione non superiori a 6 volte rispetto al basale. L'incremento della trascrizione presentava differenze significative a seconda del vettore utilizzato: la massima espressione era ottenuta dopo trasfezione con V3 (incremento a 8 ore pari a 24-34 volte rispetto al basale), rispetto a V1 (incremento a 8 ore pari a 7-15 volte rispetto al basale) o V2 (incremento a 8 ore pari a 6-20 volte rispetto al basale). Questi risultati, in linea con i dati citofluorimetrici, confermano la maggiore efficienza di V3 rispetto a V1 e V2; confermano inoltre che la nostra sequenza di 104 bp (V2) è egualmente efficiente nell'indurre la trascrizione genica dopo shock termico rispetto a V1. Un minimo livello di espressione, variabile a seconda della linea cellulare, era peraltro rilevabile anche a 37°C.

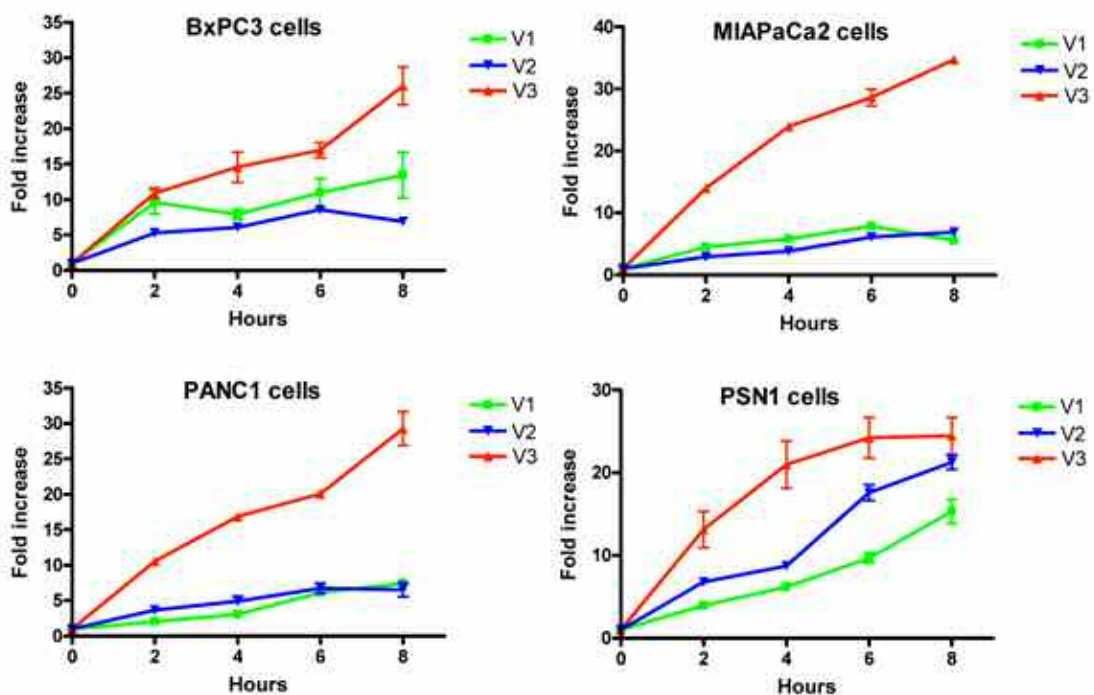


Figura 4.7: Incremento dei livelli di mRNA di eGFP dopo esposizione a 42.5°C per 1.5 ore nelle quattro linee cellulari neoplastiche pancreatiche trasfettate con i vettori V1, V2 e V3 rispetto alle stesse linee non sottoposte a shock termico.

Abbiamo pertanto scelto il vettore V3 per pilotare l'espressione della subunità catalitica della tossina difterica (DTA) e di due sue varianti: CRM176 e CRM197.

4.6 Espressione di DTA e delle sue varianti CRM176 e CRM197 pilotata dal promotore termoregolabile pHsp-473+104.

Poiché tutti i promotori termoregolabili da noi analizzati risultavano in grado di indurre una minima trascrizione genica a 37°C, abbiamo valutato, a questa temperatura, la citotossicità dei vettori con promotore termoregolabile esprimenti DTA e le sue varianti CRM197 e CRM176.

La figura 4.8 riporta le curve di crescita a 37°C delle quattro linee cellulari studiate dopo trasfezione transiente con DTA, CRM197 (DTA197) o CRM176 (DTA176) sotto controllo del promotore pHsp-473+104. La crescita delle cellule MIAPaCa2 e PANC1 trasfettate con DTA197 risultava sovrapponibile a quella del corrispondente controllo (cellule non trasfettate). Lo stesso vettore causava una lieve inibizione della crescita delle PSN1 e delle BxPC3 rispetto al controllo. In tre linee cellulari (MIAPaCa 2 e PSN1 e PANC1) la crescita risultava inibita in maniera significativa dopo trasfezione sia con DTA che con la sua variante DTA176, indicando che il minimo livello di trascrizione genica della subunità catalitica della tossina difterica, ma anche della sua variante 20 volte meno attiva, era tossico per queste cellule. Viceversa la linea BxPC3 risultava più resistente ai livelli minimi di trascrizione di DTA o di DTA176.

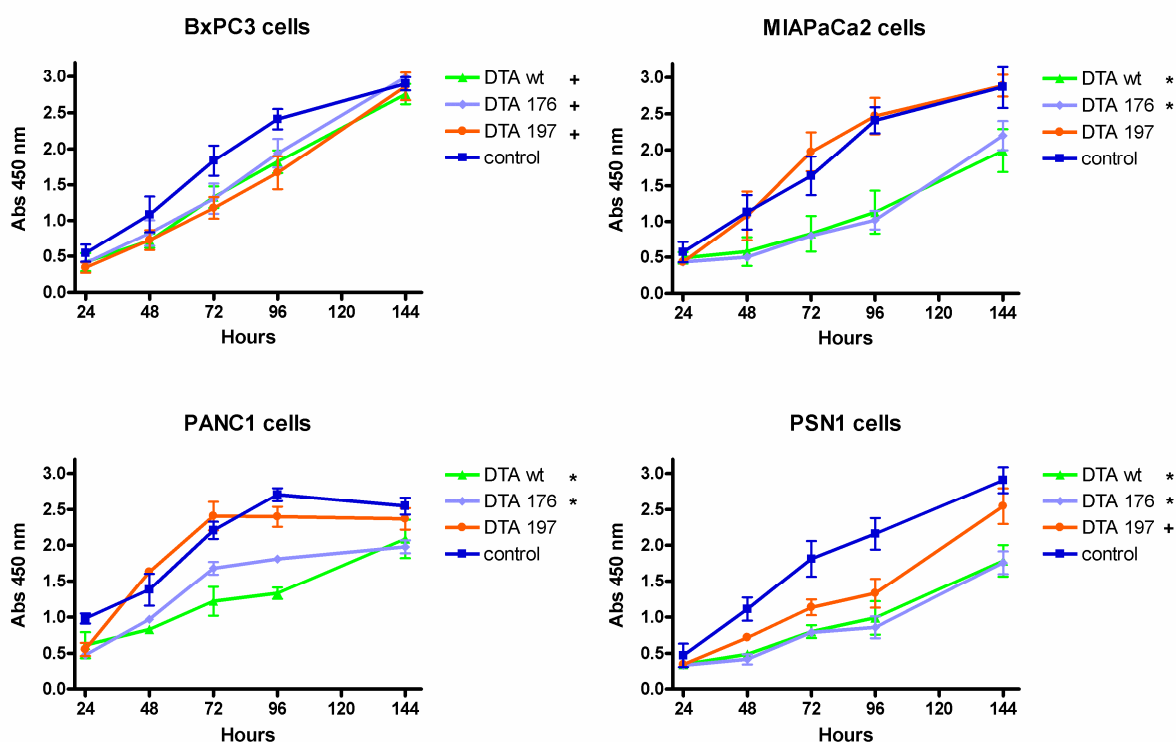


Figura 4.8: Curve di crescita delle quattro linee neoplastiche pancreatiche di controllo e trasfettate con i vettori esprimenti DTA, DTA176 e DTA197 sotto controllo del promotore termoregolabile pHsp-473+104. Analisi della varianza per misurazioni ripetute: + = $p < 0.01$ rispetto al controllo; * = $p < 0.0001$ rispetto al controllo e a DTA197

Abbiamo quindi valutato l'effetto dell'aumento della temperatura nelle quattro linee neoplastiche pancreatiche di controllo. Nella figura 4.9 sono rappresentate le curve di crescita delle linee cellulari mantenute a 37°C o sottoposte a shock termico (42.5°C per 1.5 ore). Due linee cellulari (BxPC3 e PANC1) sulle quattro testate, presentavano una pressochè nulla sensibilità al calore. Lo shock termico provocava solo una lieve riduzione della proliferazione delle MIAPaCa2 (F=6.42, p<0.05) e delle PSN1 (F=12.94, p<0.01).

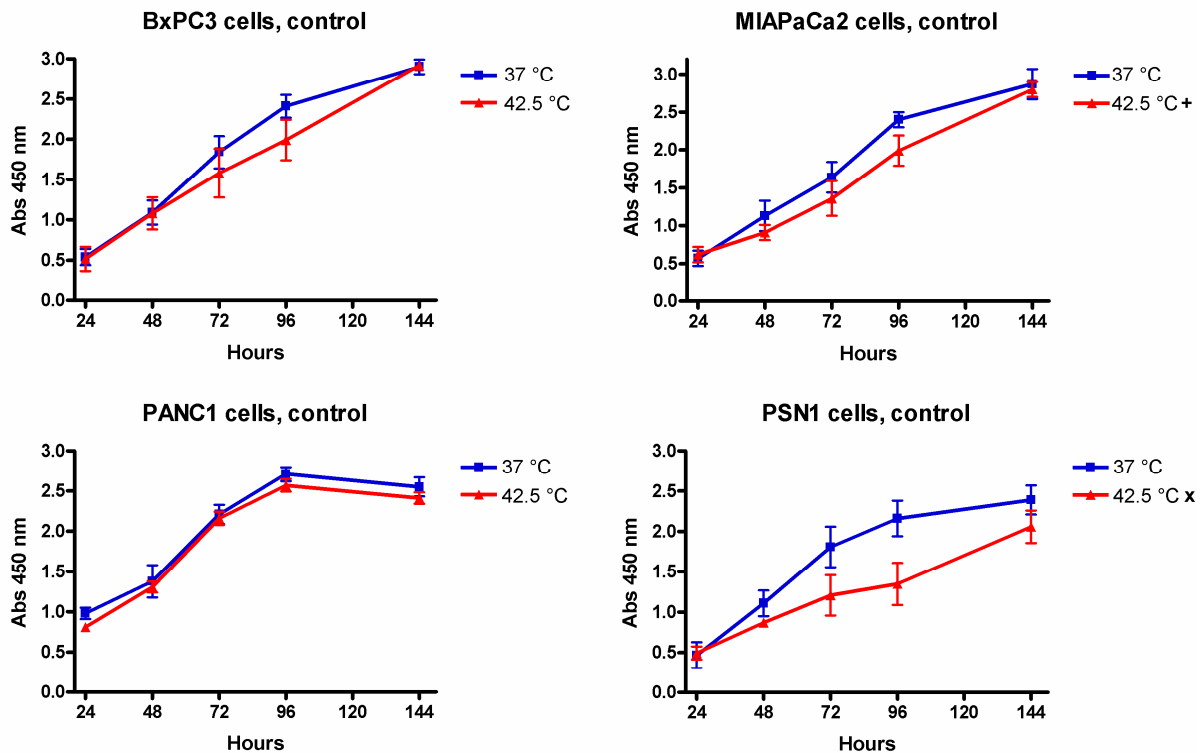


Figura 4.9 Curve di crescita delle quattro linee neoplastiche pancreatiche di controllo mantenute a 37°C o sottoposte a shock termico. Analisi della varianza per misurazioni ripetute: += p<0.05 rispetto a 37°C; x= p<0.01 rispetto a 37°C.

La crescita cellulare delle linee trasfettate con DTA o con le sue varianti CRM197 e CRM176 sotto il controllo del promotore pHsp-473+104 è stata quindi valutata dopo shock termico e confrontata con la crescita ottenibile a 37°C.

Le figure 4.10, 4.11, e 4.12 illustrano i risultati ottenuti nelle varie condizioni.

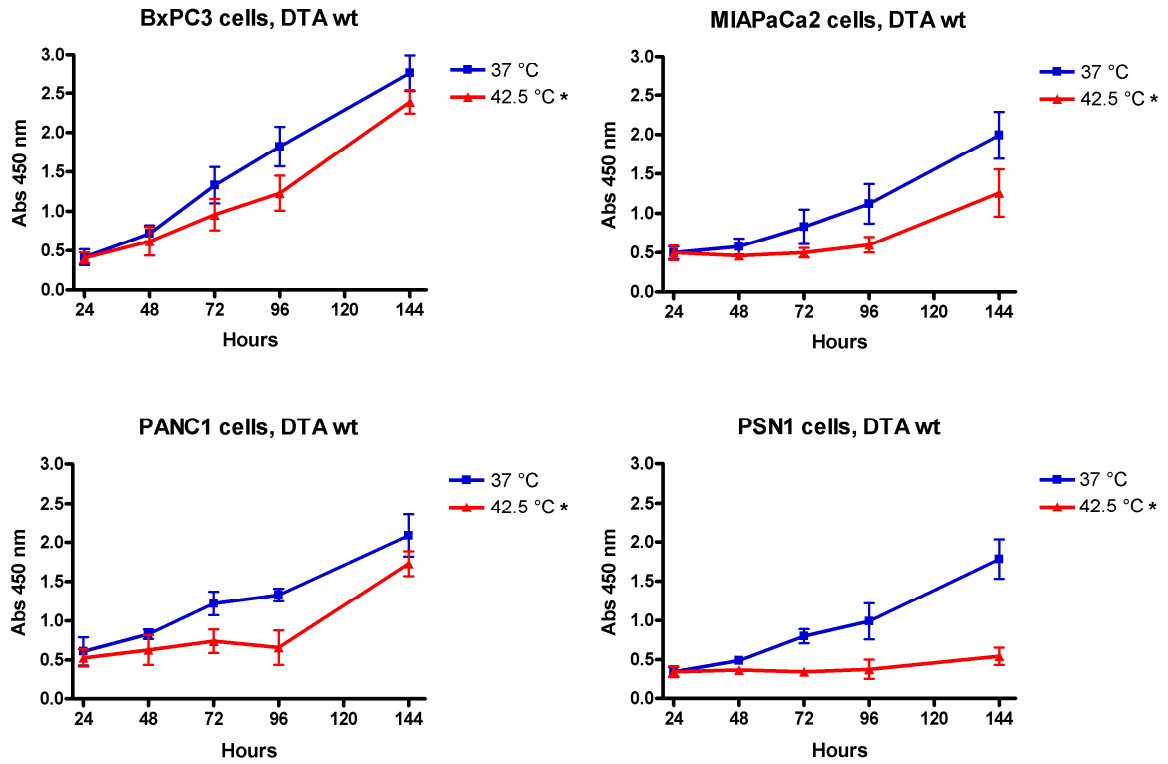


Figura 4.10: Curve di crescita delle quattro linee neoplastiche pancreatiche trasfettate con DTA sotto il controllo del promotore termoregolabile pHsp-473+104 mantenute a 37°C o sottoposte a shock termico. Analisi della varianza per misurazioni ripetute: * = $p < 0.001$ rispetto a 37°C.

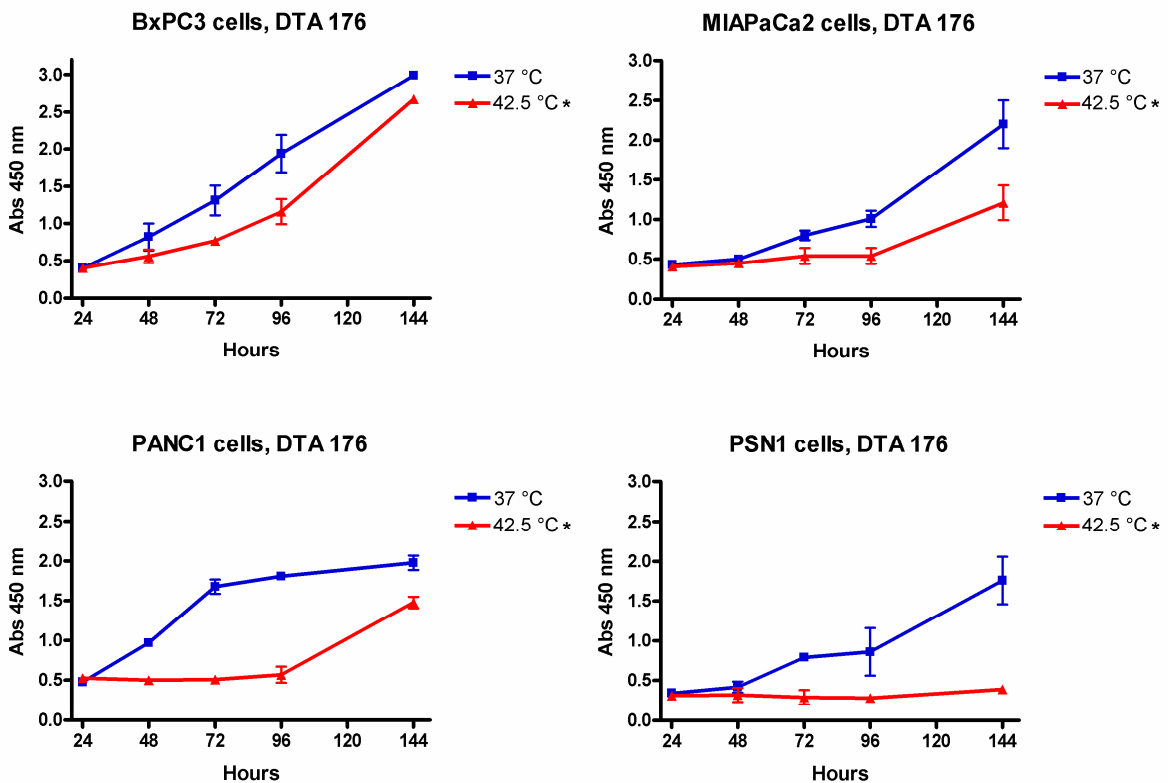


Figura 4.11: Curve di crescita delle quattro linee neoplastiche pancreatiche trasfettate con DTA176 sotto il controllo del promotore termoregolabile pHsp-473+104 mantenute a 37°C o sottoposte a shock termico. Analisi della varianza per misurazioni ripetute: * = $p < 0.001$ rispetto a 37°C.

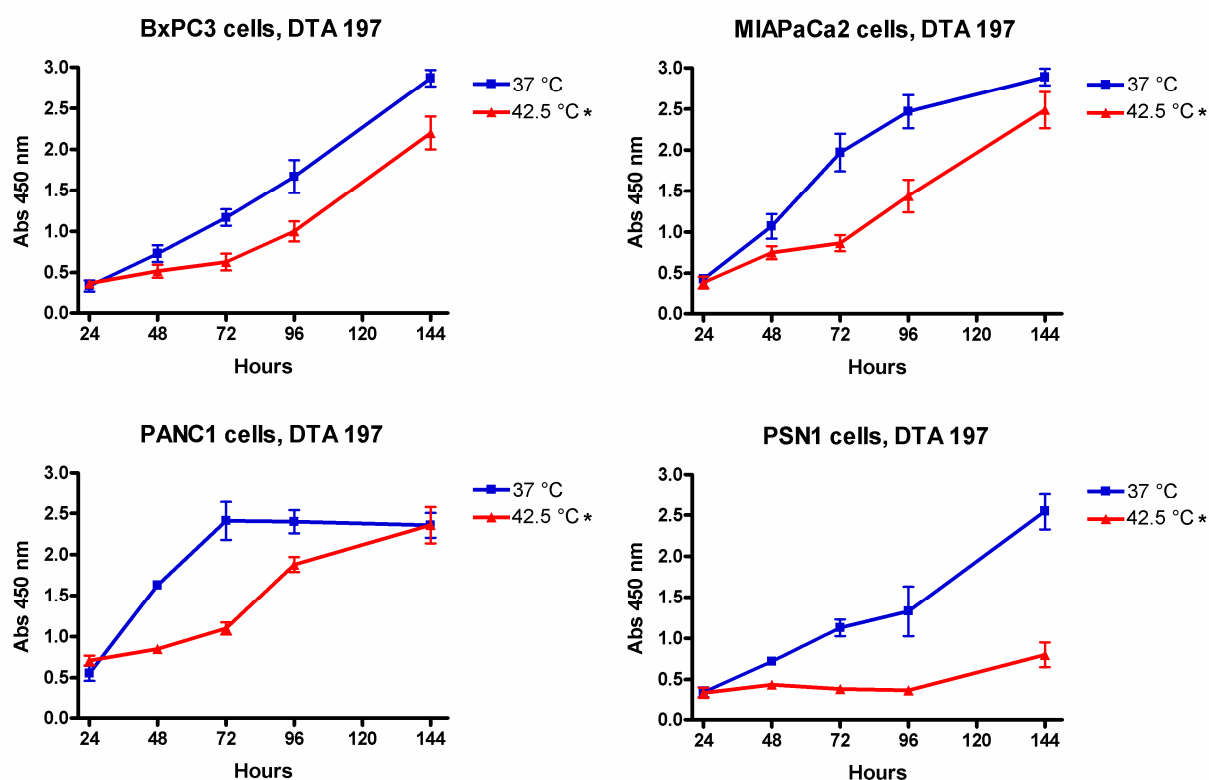


Figura 4.12: Curve di crescita delle quattro linee neoplastiche pancreatiche trasfettate con DTA197 sotto il controllo del promotore termoregolabile pHsp-473+104 mantenute a 37°C o sottoposte a shock termico. Analisi della varianza per misurazioni ripetute: * = $p < 0.001$ rispetto a 37°C.

Dopo esposizione al calore l'espressione di DTA o della sua variante CRM176 causava una riduzione significativa della crescita in tutte le linee studiate; l'effetto maggiore era rilevabile nelle linee MiaPaCa2, PANC1 e PSN1 dove provocava, nelle prime 96 ore, un arresto quasi completo della proliferazione cellulare.

Più resistente all'azione di DTA risultava la linea BxPC3, forse per il minore successo della trasfezione (circa 30% di cellule trasfettate con successo vs circa 80% rilevato nelle altre linee cellulari).

L'induzione termica della espressione della variante CRM197 causava in tutte le linee trasfettate una ridotta proliferazione rispetto alle cellule mantenute a 37°C. Questo risultato suggerisce che DTA197 non è completamente inattiva e che il suo effetto tossico è probabilmente correlato al livello di espressione.

5. DISCUSSIONE

Le precedenti esperienze di terapia genica sia *in vivo* che *in vitro* per il trattamento del carcinoma pancreatico sono nel complesso poco incoraggianti (Bhattacharyya M et al., 2006; Fogar P et al., 2005). I pochi risultati positivi riportati *in vitro*, spesso non sono stati riconfermati *in vivo* in modelli animali.

Lo scarso successo degli approcci di terapia genica finora sperimentati nel carcinoma pancreatico è probabilmente dovuto all'utilizzo di geni terapeutici la cui espressione nelle cellule neoplastiche non è sufficiente a controbilanciare le numerose alterazioni genetiche che favoriscono sia la crescita che la capacità metastatizzante di queste cellule.

Alla luce di tali riscontri si potrebbe trarre la conclusione che questo approccio non è valido per il trattamento di questa neoplasia. In alternativa la terapia genica potrebbe essere un sistema vincente qualora consentisse il trasferimento di geni di sicura tossicità, a patto che la loro espressione fosse circoscritta alle cellule neoplastiche. Per questo abbiamo scelto di studiare i promotori termoregolabili delle "heat shock proteins" come elementi di regolazione della espressione genica e la subunità catalitica della tossina difterica (DTA) e le sue varianti CRM176 e CRM197 come elementi di sicura tossicità cellulare. Fra le numerose alterazioni molecolari descritte nel carcinoma del pancreas, di notevole interesse è quella che coinvolge le "heat shock proteins", poiché iperespresse nel tessuto tumorale pancreatico (Gress TM et al., 1994; Ogata M et al., 2000; Aghdassi A et al., 2007).

Con questa premessa, l'utilizzo in terapia genica di un promotore sensibile alla regolazione termica potrebbe favorire l'espressione del gene d'interesse prevalentemente in cellule neoplastiche, dove sono verosimilmente già attive le vie di segnale che esitano nella trascrizione di geni inducibili dal calore. Un promotore sensibile alla regolazione termica potrebbe consentire anche il controllo dell'espressione genica dall'esterno mediante l'utilizzo di ultrasuoni focalizzati (Rome C et al., 2005; Stauffer PR et al., 2005).

Abbiamo individuato le proteine della famiglia Hsp70 come potenzialmente rilevanti per i seguenti motivi: 1. sono strettamente inducibili dopo esposizione al calore; 2. nei tumori pancreatici sono stati descritti livelli aumentati di queste proteine; 3. sequenze di DNA analoghe a quella del promotore di queste proteine sono state utilizzate con successo nella terapia genica sperimentale. (Smith RC et al., 2002; Daugaard M et al., 2007).

Nell'ambito di questa famiglia di proteine abbiamo scelto di studiare l'Hsp70B' perché non ha una espressione costitutiva e il suo promotore è molto efficiente. La mancata espressione costitutiva e l'inducibilità dopo esposizione al calore è

stata verificata nella presente tesi in quattro linee cellulari neoplastiche pancreatiche (figura 4.1).

La realizzazione di un vettore di espressione genica sotto il controllo del promotore di questo gene è stata il primo obiettivo della presente tesi, e per realizzarlo abbiamo utilizzato il promotore di Hsp70B' disponibile in commercio. Il vettore di espressione è stato realizzato utilizzando il plasmide pEGFP-1, la sequenza di 473 bp (Hsp-473) come promotore termoregolabile e il gene reporter eGFP (V1). Le quattro linee cellulari neoplastiche sono state trasfettate con il vettore V1 e l'espressione della proteina eGFP è stata valutata sia mediante analisi western blot che mediante analisi citofluorimetrica.

Nella prima parte della presente tesi sono state messe a punto le condizioni ottimali di heat shock. L'esposizione a 42°C per 2 ore è quanto viene riportato in letteratura per indurre l'attivazione di geni termoinducibili (Smith RC et al., 2002; O'Connell-Rodwell CE et al., 2004).

La verifica che temperature inferiori non sono in grado di indurre la trascrizione del gene d'interesse con promotori utilizzati per la terapia genica appare fondamentale quando l'obiettivo è, come il nostro, quello di sottoporre a stretto controllo il gene terapeutico pilotato da un promotore termoinducibile. Per questo abbiamo dapprima realizzato una serie di esperimenti con il vettore V1 esponendo le cellule trasfettate per 2 ore a temperature progressivamente crescenti a partire da quella fisiologica (37°C) e utilizzando l'analisi citofluorimetrica per misurare il livello di espressione proteica di eGFP. A 37°C si rilevava una minima espressione basale di eGFP, che aumentava progressivamente con l'aumento della temperatura, raggiungendo i livelli massimi nel range 42°C - 43°C.

L'espressione basale di eGFP non veniva confermata mediante analisi western blot, verosimilmente perchè quest'ultima metodica è meno sensibile dell'analisi FACS. L'analisi più dettagliata dell'effetto della temperatura considerando intervalli più stretti all'interno del range ottimale, documentava la massima efficienza di trascrizione alla temperatura di 42.5°C per tutte le linee cellulari studiate. Questa temperatura è stata utilizzata per definire il tempo ottimale minimo di esposizione, che è risultato pari a 1,5 ore.

La possibilità di ridurre anche di mezz'ora il tempo di esposizione a temperature elevate, a parità di efficacia di trascrizione, presenta l'indubbio vantaggio di limitare al minimo gli effetti dannosi sulle cellule dovuti alla sola esposizione al calore. Questa osservazione ha particolare rilevanza quando si progetta l'applicazione di questo approccio terapeutico *in vivo*, dove la sofferenza aspecifica di cellule sane adiacenti la neoplasia potrebbe essere un effetto collaterale di non trascurabile importanza.

V1 consentiva pertanto di ottenere un significativo aumento della trascrizione di eGFP dopo esposizione delle cellule trasfettate a 42.5°C per 1.5 ore, anche se un minimo livello di espressione era rilevabile in condizioni basali (37°C).

Al fine di ridurre al minimo la trascrizione basale, abbiamo realizzato un promotore sintetico costituito da 5 elementi HSE disposti in tandem e dalla sequenza del promotore minimo di HSPA6. L'insieme, costituito da 104 paia di basi, è stato utilizzato per la realizzazione di un secondo vettore di espressione (V2) che differiva da V1 solo per la sequenza del promotore.

I livelli di trascrizione genica e di traduzione di eGFP pilotata da questo promotore risultavano sovrapponibili a quelli ottenibili dopo trasfezione con V1 in tutte le linee studiate. V2 pertanto, a parità di efficienza, offre rispetto a V1 il vantaggio di essere più facilmente maneggiabile perchè di dimensioni più contenute; questo vettore peraltro non consentiva di abolire la trascrizione minima basale delle cellule trasfettate. Il massimo incremento della trascrizione dopo shock termico, nelle cellule trasfettate con V1 o V2 non superava le 8 volte rispetto al basale.

Con l'obiettivo di ottimizzare l'efficienza di trascrizione, abbiamo ingegnerizzato un nuovo vettore V3, il cui promotore era il risultato dell'assemblamento dei promotori di V1 e V2. La trascrizione basale minima di questo nuovo vettore non risultava superiore a quella di V1 o V2, mentre il livello di trascrizione dopo esposizione al calore raggiungeva picchi pari a 30 volte il basale. V3 pertanto offriva la migliore combinazione fra efficienza di trascrizione controllabile mediante esposizione al calore e background di trascrizione basale.

Con queste premesse il promotore di V3 è stato scelto per pilotare l'espressione di DTA e delle sue varianti CRM176 e CRM197, entrambe derivanti da una sostituzione aminoacidica all'interno della molecola di DTA che causa una riduzione (CRM176) (Comanducci et al., 1987) o l'abolizione quasi completa (CRM197) (Giannini G et al., 1984) dell'azione tossica.

La scelta di analizzare non solo DTA, ma anche le sue varianti meno tossiche è derivata dalla osservazione che, anche un promotore teoricamente strettamente controllabile con il calore, come V3, in realtà è in grado di pilotare a livelli minimi la trascrizione genica anche a temperatura fisiologica. Questo rappresenta un limite se il gene pilotato codifica una molecola altamente tossica, come DTA, perchè la terapia genica intrapresa con un tale sistema potrebbe evadere il controllo e causare pericolosi effetti collaterali nei tessuti adiacenti la neoplasia. A conferma di questo assunto la crescita di tutte le linee cellulari trasfettate con DTA e mantenute a 37°C risultava significativamente inibita. A questa stessa temperatura la crescita cellulare risultava egualmente inibita dopo trasfezione con la variante CRM176. Quest'ultima, pertanto, seppur 20 volte meno tossica

della tossina nativa, è sufficientemente letale anche se sintetizzata in minime quantità.

Alla luce delle nostre premesse, la variante CRM176 non può essere considerata una valida alternativa a DTA nei protocolli di terapia genica utilizzando il promotore di V3. A differenza di DTA e della sua variante CRM176, la variante CRM197 ha dimostrato solo minimi effetti tossici a 37°C, anche se era preventivabile l'assenza di qualsiasi effetto tossico. Infatti teoricamente quest'ultima molecola è inattiva perchè incapace di legare il suo cofattore NAD+.

A conferma della potenziale azione tossica della CRM197, sono i risultati ottenuti dopo shock termico, che induceva una significativa inibizione della crescita di tutte le linee trasfettate con questa variante. La minima azione inibente riscontrata a 37°C associata ad una significativa inibizione dopo shock termico ci fanno ipotizzare che l'azione tossica della variante CRM197 sia dose-correlata e a sostegno di tale ipotesi vi sono alcuni recenti studi della letteratura che hanno documentato una azione antineoplastica della CRM197 dopo iniezione sottocutanea sia per una sua azione tossica diretta che per la sua capacità di indurre una risposta immunitaria anti-neoplastica (Buzzi S et al., 2004; Kageyama T et al., 2007)

Questi risultati sono particolarmente promettenti per l'applicazione *in vivo* di questo approccio, che consentirebbe di raggiungere più obiettivi contemporaneamente: 1. minimo livello di tossicità basale; 2. azione letale dopo induzione termica controllata; 3. attivazione della risposta immunologica anti-neoplastica dopo induzione termica.

6. BIBLIOGRAFIA

Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, Lerch MM, Saluja A. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2007; 67:616-25.

Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS, DePinho RA. Activated K-ras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2003; 17: 3112-3126.

Ammori JB, Colletti LM, Zalupski MM, Eckhauser FE, Greenson JK, Dimick J, Lawrence TS, McGinn CJ. Surgical resection following radiation therapy with concurrent gemcitabine in patients with previously unresectable adenocarcinoma of the pancreas. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 766-772.

Anderson KE, Potter JD, Mack TM. Pancreatic cancer. In: Schottenfeld D, Fraumene JF Jr, eds *Cancer epidemiology and prevention*, Oxford: Oxford University Press, 1996: 725-771.

Anderson WF. Human gene therapy. *Science.* 1992; 256:808-13.

Anderson WF. Gene therapy for cancer. *Hum Gene Ther.* 1994; 5:1-2.

Aoki K, Yoshida T, Matsumoto N, Ide H, Sugimura T, Terada M. Suppression of ki-ras p21 levels leading to growth inhibition of pancreatic cancer cell lines with ki-ras mutation but not those without ki-ras mutation. *Mol Carcinogen* 1997; 20: 251-8.

Aoki K, Yoshida T, Matsumoto N, Ide H, Hosokawa K, Sugimura T, Terada M. Gene therapy for peritoneal dissemination of pancreatic cancer by liposome-mediated transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1105-1113.

Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 897-909.

Barton CM, Lemoine NR. Antisense oligonucleotides directed against p53 have antiproliferative effects unrelated to effects on p53 expression. *Br J Cancer* 1995; 71: 429-437.

Berndt C, Haubold K, Wenger F, Brux B, Muller J, Bendzko P, Hillebrand T, Kottgen E, Zanow J. K-ras mutations in stools and tissue samples from patients with malignant and nonmalignant pancreatic diseases. *Clin Chem* 1998; 44: 2103-2107.

.Bhagat L, Singh VP, Song AM, van Acker GJ, Agrawal S, Steer ML, Saluja AK. Thermal stress-induced HSP70 mediates protection against intrapancreatic trypsinogen activation and acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology.* 2002;122:156-65.

Bhagat L, Singh VP, Dawra RK, Saluja AK. Sodium arsenite induces heat shock protein 70 expression and protects against secretagogue-induced trypsinogen and NF-kappaB activation. *J Cell Physiol.* 2007

Bharadwaj U, Li M, Zhang R, Chen C, Yao Q. Elevated interleukin-6 and G-CSF in human pancreatic cancer cell conditioned medium suppress dendritic cell differentiation and activation. *Cancer Res* 2007; 67: 5479-88.

Bhattacharyya M, Lemoine NR. Gene therapy developments for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20(2):285-98.

Block A, Chen S-H, Kosai K-I, Finegold M, Woo SLC. Adenoviral-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer: regression of hepatic metastasis of pancreatic tumors. *Pancreas* 1997; 15: 25-34

Bouvet M, Bold RJ, Lee J, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ, McConkey DJ, Chandra J, Chada S, Fang B, Roth JA. Adenovirus-mediated wild-type p53 tumor suppressor gene therapy induces apoptosis and suppresses growth of human pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 1998; 5: 667-669.

Buzzi S, Rubboli D, Buzzi G, Buzzi AM, Morisi C, Pironi F. CRM197 (nontoxic diphtheria toxin): effects on advanced cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 1041-8.

Calbò J, Marotta M, Cascallo M, Roig JM, Gelpi JL, Fueyo J, Mazo A. Adenovirus-mediated wt-p16 reintroduction induces cell cycle arrest or apoptosis in pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 740-750.

Cao G, Kuriyama S, Gao J, Kikukawa M, Cui L, Nakatani T, Zhang X, Tsujinoue H, Pan X, Fukui H, Qi Z. Effective and safe gene therapy for colorectal carcinoma using the cytosine deaminase gene directed by the carcinoembryonic antigen promoter. *Gene Ther.* 1999 Jan;6(1):83-90.

Carriò M, Romagosa A, Mercadè E, Mazo A, Nadal M, Gomez-Foix A-M, Fillat C. Enhanced pancreatic tumor regression by a combination of adenovirus and retrovirus-mediated delivery of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Gene Ther* 1999; 6: 547-553.

Carriò M, Mazo A, Lòpez-Iglesias C, Estivill X, Fillat C. Retrovirus-mediated transfer of the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase and connexin26 genes in pancreatic cells. Results in variable efficiency on the bystander killing: implications for gene therapy. *Int J Cancer* 2001; 94: 81-88.

Cascallo M, Mercade E, Capella G, Lluís F, Fillat C, Gomez-Foix AM, Mazo A. Genetic background determines the response to adenovirus-mediated wild-type p53 expression in pancreatic tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 1999; 6: 428-436.

Chandler LA, Sosnowski BA, McDonald JR, Price JE, Aukerman SL, Baird A, Pierce GF, Houston LL. Targeting tumor cells via EGF receptors: selective toxicity of an HBEGF-toxin fusion protein. *Int J Cancer* 1998; 78: 106-111.

Chappuis PO, Ghadirian P, Foulkes WD. The role of genetic factors in the etiology of pancreatic adenocarcinoma: an update. *Cancer Invest.* 2001; 19:65-75.

Chen WB, Lenschow W, Tiede K, Fischer JW, Kalthoff H, Ungefroren H. Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 36118-36128.

Clackson T. Regulated gene expression systems. *Gene Ther.* 2000;7(2):120-5.

Comanducci M, Ricci S, Rappuoli R, Ratti G. The nucleotide sequence of the gene coding for diphtheria toxoid CRM176. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(14):5897.

Cook T, Urrutia R. TIEG proteins join the Smads as TGF-beta-regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G513-G521.

Cowgill SM, Muscarella P. The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg* 2003; 186: 279-286.

Cross D, Burmester JK. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res* 2006; 4: 218-27.

Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007; 581(19):3702-10.

Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* 1989; 16(4):215-37.

Dilber MS, Abedi MR, Christensson B, Björkstrand B, Kidder GM, Naus CC, Gahrton G, Smith CI. Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase *in vivo*. *Cancer Res.* 1997;57(8):1523-8.

Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Rev* 2004; 4: 11-22.

Duda DG, Sunamura M, Lefter LP, Furukawa T, Yokoyama T, Yatsuoka T, Abe T, Inoue H, Motoi F, Egawa S, Matsuno S, Horii A. Restoration of SMAD4 by gene therapy reverses the invasive phenotype in pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* 2003; 22: 6857-6864.

Duesbery NS, Resau J, Webb CP, Koochekpour S, Koo HM, Leppla SH, Vande Woude GF. Suppression of ras-mediated transformation and inhibition of tumor growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of multiple MEK pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(7):4089-94.

Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LA, Schrag D, Jamison PM, Jemal A, Wu XC, Friedman C, Harlan L, Warren J, Anderson RN, Pickle LW. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:1407-27.

El Kamar FG, Grossbard ML, Kozuch PS. Metastatic pancreatic cancer: emerging strategies in chemotherapy and palliative care. *The Oncologist* 2003; 8:18-34.

Elion FB. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *Antimicrob Chemother* 1983; 12 (suppl.B): 9-17.

Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuk JC, Spray DC, Fishman GI, Amin KM, Kaiser LR, Albelda SM. Gap junction play a role in the 'bystander effect' of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system *in vitro*. *Gene Ther* 1996; 3: 85-92.

Erbs P, Regulier E, Kintz J, Leroy P, Poitevin Y, Exinger F, Jund R, Mehtali M. *In vivo* cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res* 2000; 60: 3813-3822.

Evoy D, Hirschowitz EA, Naama HA, Kui X, Crystal RG, Daly JM, Lieberman MD. *In vivo* adenoviral-mediated gene transfer in the treatment of pancreatic cancer. *J Surg Res* 1997; 69: 226-231

Faulds D, Rennie CH. Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infection. *Drugs* 1990; 39: 567-638.

Fick J, Barker FG 2nd, Dazin P, Westphale EM, Beyer EC, Israel MA. The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(24):11071-5.

Fogar P, Greco E, Basso D, Habeler W, Navaglia F, Zambon C-F, Tormen D, Gallo N, Cecchetto A, Plebani M, Pedrazzoli S. Suicide gene therapy with HSV-TK in pancreatic cancer has no effect *in vivo* in a mouse model. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 721-730.

Fogar P, Greco E, Basso D, Navaglia F, Plebani M, Pedrazzoli S. Killer genes in pancreatic cancer therapy. *Cell Mol Biol* 2005; 51(1):61-76.

Fogar P, Navaglia F, Basso D, Greco E, Zambon CF, Fadi E, Falda A, Stranges A, Vannozzi F, Danesi R, Pedrazzoli S, Plebani M. Suicide gene therapy with the yeast fusion gene cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase is not enough for pancreatic cancer. *Pancreas* 2007;35(3):224-31.

Frankel AE, Powell BL, Lilly MB. Diphtheria toxin conjugate therapy of cancer. In: Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers, Annual 20. Giaccone G, Schilsky R, Sondel P (Eds). Elsevier Science BV 2002. pp 301-313.

Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993;53(21):5274-83.

Frossard JL, Pastor CM, Hadengue A. Effect of hyperthermia on NF-kappaB binding activity in cerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280: G1157-62.

Frossard JL, Bhagat L, Lee HS, Hietaranta AJ, Singh VP, Song AM, Steer ML, Saluja AK. Both thermal and non-thermal stress protect against caerulein induced pancreatitis and prevent trypsinogen activation in the pancreas. *Gut*. 2002; 50:78-83.

Fryzek JP, Garabrant DH, Greenson JK, Schottenfeld D. A review of the epidemiology and pathology of pancreas cancer. *Gastrointest Cancer* 1997; 2:99-110.

Gardis L, Gold BL. Epidemiology and etiology of pancreatic cancer. In: The pancreas: biology, pathobiology and disease. 2nd ed. Go VL et al. Raven Press Ltd, New York 1993: 837-855.

Ghaneh P, Greenhalf W, Humphreys M, Wilson D, Zumstein L, Lemoine NR, Neoptolemos JP. Adenovirus-mediated transfer of p53 and p16^(INK4a) results in pancreatic cancer regression *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 2001; 8: 199-208

Giannini CD, Roth WK, Piiper A, Zeuzem S. Enzymatic and antisense effects of a specific anti ki-ras ribozyme *in vitro* and in cell culture. *Nucleic Acids Res* 1999; 13: 2737-2744.

Giannini G, Rappuoli R, Ratti G. The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197. *Nucleic Acids Res*. 1984; 12(10):4063-9.

Gilliam AD, Watson SA. Emerging biological therapies for pancreatic carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2002; 28:370-8.

Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:5547-51.

Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 1995; 268(5218):1766-9.

Greco E, Fogar P, Basso D, Stefani AL, Navaglia F, Zambon CF, Mazza S, Gallo N, Piva MG, Scarpa A, Pedrazzoli S, Plebani M. Retrovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer in pancreatic cancer cell lines: an incomplete antitumor effect. *Pancreas*. 2002;25(2):e21-9.

Greenlee RT, Murray T, Golden S, Wingo PA. Cancer Statistics, 2000. *Cancer J Clin* 2000; 50: 7-33.

Gress TM, Muller-Pillasch F, Weber C, Lerch MM, Friess H, Buchler M, Beger HG, Adler G. Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 1994;54:547-51.

Haller DG. New perspectives in the management of pancreas cancer. *Sem Oncol* 2003; 30 (Suppl 11): 3-10.

Hara H, Kobayashi A, Yoshida K, Ohashi M, Ohnami S, Uchida E, Higashihara E, Yoshida T, Aoki K. Local interferon-alpha gene therapy elicits systemic immunity in a syngeneic pancreatic cancer model in hamster. *Cancer Sci* 2007; 98: 455-63.

Hoshida T, Sunamura M, Duda DG, Egawa S, Miyazaki S, Shineha R, Hamada H, Ohtani H, Satomi S, Matsuno S. Gene therapy for pancreatic cancer using an adenovirus vector encoding soluble flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Pancreas*. 2002; 25:111-21.

Hotz HG, Gill PS, Masood R, Hotz B, Buhr HJ, Foitzik T, Hines OJ, Reber HA. Specific targeting of tumor vasculature by diphtheria toxin-vascular endothelial growth factor fusion protein reduces angiogenesis and growth of pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2002; 6:159-166.

Huang Q, Hu JK, Lohr F, Zhang L, Braun R, Lanzen J, Little JB, Dewhirst MW, Li CY. Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy. *Cancer Res*. 2000; 60(13):3435-9.

Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(17):8302-6.

Humphreys MJ, Greenhalf W, Neoptolemos JP, Ghaneh P. The potential for gene therapy in pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 1999; 26: 5-21.

Hung C-F, Cheng W-F, Hsu K-F, Chai C-Y, He L, Ling M, Wu T-C. Cancer immunotherapy using a DNA vaccine encoding the translocation domain of a bacterial toxin linked to a tumor antigen. *Cancer Res* 2001; 61: 3698-3703.

Hwang JH, Ryu JK, Yoon YB, Lee KH, Park YS, Kim JW, Kim N, Lee DH, Jeong JB, Seo JS, Kim YT. Spontaneous activation of pancreas trypsinogen in heat shock protein 70.1 knock-out mice. *Pancreas*. 2005; 31:332-6.

Hwang RF, Gordon EM, Anderson WF, Parekh D. Gene therapy for primary and metastatic pancreatic cancer with intraperitoneal retroviral vector bearing the wild-type p53 gene. *Surgery* 1998; 124: 143-150.

Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 907-20.

Ishii-Morita H. Mechanism of 'bystander effect' killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Ther* 1997; 4: 244-251.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*. 2007;57:43-66.

Johannes L, Decaudin D. Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. *Gene Ther*. 2005; 12(18):1360-8.

Johnson VG, Nicholls PJ. Identification of a single amino acid substitution in the diphtheria toxin A chain of CRM 228 responsible for the loss of enzymatic activity. *J Bacteriol*. 1994;176(15):4766-9.

Kageyama T, Ohishi M, Miyamoto S, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E. Diphtheria toxin mutant CRM197 possesses weak EF2-ADP-ribosyl activity that potentiates its anti-tumorigenic activity. *J Biochem* 2007; 142: 95-104.

Kanyama H, Tomita N, Yamano T, Aihara T, Miyoshi Y, Ohue M, Sekimoto M, Salita I, Tamaki Y, Kaneda Y, Senter PD, Monden M. Usefulness of repeated direct intratumoral gene transfer using hemagglutinating virus of Japan-liposome method for cytosine deaminase suicide gene therapy. *Cancer Res*. 2001; 61: 14-18.

Katz MH, Bouvet M. Novel gene therapy approaches to pancreatic cancer. *Int J Gastrointestinal. Cancer* 2003; 33: 89-97.

Kijima H, Yamazaki H, Nakamura M, Scanlon KJ, Osamura RY, Ueyama Y. Ribozyme against mutant k-ras mRNA suppresses tumor growth of pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2004; 24: 559-564.

Kimura M, Tagawa M, Takenaga K, Kondo F, Yamaguchi T, Saisho H, Nakagawara A, Sakiyama S. Loss of tumorigenicity of human pancreatic carcinoma cells engineered to produce interleukin-2 or interleukin-4 in nude mice: a potentiality for cancer gene therapy. *Cancer Lett* 1998; 128: 47-53.

Kimura M, Yoshida Y, Narita M, Takenaga K, Takenouchi T, Yamaguchi T, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Acquired immunity in nude mice induced by expression of the IL-2 or IL-4 gene in human pancreatic carcinoma cells and anti-tumor effect generated by *in vivo* gene transfer using retrovirus. *Int J Cancer* 1999; 82: 549-555.

Kishida T, Asada H, Itokawa Y, Cui F-D, Shin-Ya M, Gojo S, Yasutomi K, Ueda Y, Yamagishi H, Imanishi J, Mazda O. Interleukin (IL)-21 and IL-15 genetic transfer synergistically augments therapeutic antitumor immunity and promotes regression of metastatic lymphoma. *Mol Ther* 2003; 8: 552-558.

Kita K, Saito S, Morioka, CY, Watanabe A. Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes. *Int J Cancer* 1999; 80:553-8.

Kobayashi S, Shirasawa H, Sashiyama H, Kawahira H, Kaneko K, Asano T, Ochiai, T. pP16^{INK4a} expression adenovirus vector to suppress pancreas cancer cell proliferation. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 4182-4185.

Koo HM, VanBrocklin M, McWilliams MJ, Leppla SH, Duesbery NS, Woude GF. Apoptosis and melanogenesis in human melanoma cells induced by anthrax lethal factor inactivation of mitogen-activated protein kinase kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(5):3052-7

Kreitman RJ. Recombinant toxins for the treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5: 44-51.

Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996; 84: 381-388.

Kuriyama S, Kikukawa M, Masui K, Okuda H, Nakatani T, Sakamoto T, Yoshiji H, Fukui H, Ikenaka K, Mullen CA, Tsujii T. Cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy can induce efficient anti-tumor effects and protective immunity in immunocompetent mice but not in athymic nude mice. *Int J. Cancer* 1999; 81: 592-597.

Lawrence TS, Rehemtulla A, Ng EY, Wilson M, Trosko JE, Stetson PL. Preferential cytotoxicity of cells transduced with cytosine deaminase compared to bystander cells after treatment with 5-fluorocytosine. *Cancer Res* 1998;58(12):2588-93.

Lemoine NR, Jain S, Hughes CM, Staddon SL, Maillet B, Hall PA, Kloppel G. Ki-ras oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer. *Gastroenterology* 1992; 102: 230-236.

Li J, Weghorst CM, Tsutsumi M, Poi MJ, Knobloch TJ, Casto BC, Melvin WS, Tsai MD, Muscarella P. Frequent p16^{INK4A/CDKN2A} alterations in chemically induced Syrian golden hamster pancreatic tumors. *Carcinogenesis* 2004; 25: 263-268.

Li Y, McCadden J, Ferrer F, Kruszewski M, Carducci M, Simons J, Rodriguez R. Prostate-specific expression of the diphtheria toxin A chain (DT-A): studies of inducibility and specificity of expression of prostate-specific antigen promoter-driven DT-A adenoviral-mediated gene transfer. *Cancer Res* 2002; 62: 2576-2582

Liu F, Pouponnot C, Massaguè J. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* 1997; 11: 3157-3167.

Liu S, Bugge TH, Leppla SH. Targeting of tumor cells by cell surface urokinase plasminogen activator-dependent antral toxin. *J Biol Chem* 2001; **276**: 17976-17984.

Liu S, Aaronson H, Mitola DJ, Leppla SH, Bugge TH. Potent antitumor activity of a urokinase-activated engineered anthrax toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 657-662.

Liu TF, Cohen KA, Ramage JG, Willingham MC, Thorburn AM, Frankel AE. A diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein is cytotoxic to human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1834-1837.

Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169: 2756-61.

Liyanage UK, Goedegebuure PS, Moore TT, Viehl CT, Moo-Young TA, Larson JW, Frey DM, Ehlers JP, Eberlein TJ, Linehan DC. Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma. *J Immunother* 2006; 29: 416-24.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 330-338.

Luttges J, Schlehe B, Menke MA, Vogel I, Henne-Bruns D, Kloppel G. The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium. *Cancer* 1999; 85: 1703-1710.

Makinen K, Loimas S, Wahlfors J, Alhava E, Janne J. Evaluation of herpes simplex thymidine kinase mediated gene therapy in experimental pancreatic cancer. *J Gene Med* 2000; 2: 361-367.

Mawatari F, Tsuruta S, Ido A, Ueki T, Nakao K, Kato Y, Tamaoki T, Ishii N, Nakata K. Retrovirus-mediated gene therapy for hepatocellular carcinoma: selective and enhanced suicide gene expression regulated by human alpha-fetoprotein enhancer directly linked to its promoter. *Cancer Gene Ther.* 1998; 5(5):301-6.

Mesnil M, Yamasaki H. Bystander effects in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res* 2000; 60: 3989-3999.

Mishra G, Liu TF, Frankel AE. Recombinant toxin DAB(389)EGF is cytotoxic to human pancreatic cancer cells. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3:1173-1180

Mizuno M, Yoshida J, Colosi P, Kurtzman G. Adeno-associated virus vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene causes complete regression of intracerebrally implanted human gliomas in mice, in conjunction with ganciclovir administration. *Jpn J Cancer Res.* 1998;89(1):76-80.

Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, Gress T, Bassi C, Kloppel G, Kalthoff H, Ungefroren H, Lohr M, Scarpa A. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virch Arch* 2001; 439: 798-802.

Nakada Y, Saito S, Ohzawa K, Morioka CY, Kita K, Minemura M, Takahara T, Watanabe A. Antisense oligonucleotides specific to mutated k-ras genes inhibit invasiveness of human pancreatic cancer cell lines. *Pancreatol* 2001;1:314-9.

Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci* 2002; 15: 2809-16.

Noonan EJ, Place RF, Giardina C, Hightower LE. Hsp70B' regulation and function. *Cell Stress Chaperones.* 2007;12(3):219-29.

Noonan EJ, Place RF, Rasoulpour RJ, Giardina C, Hightower LE. Cell number-dependent regulation of Hsp70B' expression: evidence of an extracellular regulator. *J Cell Physiol.* 2007;210(1):201-11.

Nummer D, Suri-Payer E, Schmitz-Winnenthal H, Bonertz A, Galindo L, Antolovich D, Koch M, Buchler M, Weitz J, Schirmacher V, Beckhove P. Role of tumor endothelium in CD4+ CD25+ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1188-99.

O'Connell-Rodwell CE, Shriver D, Simanovskii DM, McClure C, Cao YA, Zhang W, Bachmann MH, Beckham JT, Jansen ED, Palanker D, Schwettman HA, Contag CH. A genetic reporter of thermal stress defines physiologic zones over a defined temperature range. *FASEB J* 2004; 18(2):264-71.

Ogata M, Naito Z, Tanaka S, Moriyama Y, Asano G. Overexpression and localization of heat shock proteins mRNA in pancreatic carcinoma. *J Nippon Med Sch.* 2000; 67:177-85.

Ohwada A, Hirschowitz EA, Crystal RG. Regional delivery of an adenovirus vector containing the Escherichia coli cytosine deaminase gene to provide local activation of 5-fluorocytosine to suppress the growth of colon carcinoma metastatic to liver. *Hum Gene Ther* 1996;7(13):1567-76.

Pandha H, Rigg A, John J, Lemoine N. Loss of expression of antigen-presenting molecules in human pancreatic cancer and pancreatic cancer cell lines. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 127-35.

Pang S. Targeting and eradicating cancer cells by a prostate-specific vector carrying the diphtheria toxin A gene. *Cancer Gene Ther.* 2000;7(7):991-6.

Pappenheimer AM Jr. Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem.* 1977;46:69-94.

Peng B, Fleming JB, Breslin T, Grau AM, Fojioka S, Abbruzzese JL, Evans DB, Ayers D, Wathen K, Wu T, Robertson KD, Chiao PJ. Suppression of tumorigenesis and induction of p15^(ink4b) by Smad4/DPC4 in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3628-3638.

Peng W, Vverbitsky A, Bao Y, Sawicki JA. Regulated expression of diphtheria toxin in prostate cancer cells. *Mol Ther* 2002; 6: 527-545.

Peng W, Chen J, Huang YH, Sawicki JA. Tightly-regulated suicide gene expression kills PSA-expressing prostate tumor cells. *Gene Ther* 2005; 12: 1573-80.

Phillips PA, Dudeja V, McCarroll JA, Borja-Cacho D, Dawra RK, Grizzle WE, Vickers SM, Saluja AK. Triptolide induces pancreatic cancer cell death via inhibition of heat shock protein 70. *Cancer Res.* 2007;67:9407-16.

Raijman I, Levin B. Exocrine tumors of the pancreas In: *The pancreas: biology, pathobiology and disease.* 2nd ed. Go VL et al. Raven Press Ltd, New York 1993: 899-912.

Rakonczay Z Jr, Takacs T, Boros I, Lonovics J. Heat shock proteins and the pancreas. *J Cell Physiol.* 2003;195:383-91.

Rasmussen H, Rasmussen C, Lempicki M, Durham R, Brough D, King CR, Weichselbaum R. TNFerade Biologic: preclinical toxicology of a novel adenovector with a radiation-inducible promoter, carrying the human tumor necrosis factor alpha gene. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 951-7.

Ratti G, Rappuoli R, Giannini G. The complete nucleotide sequence of the gene coding for diphtheria toxin in the corynebacterium phage omega (tox+) genome. *Nucleic Acids Res.* 1983; 11(19):6589-95.

Reni M, Passani P, Panucci MG, Nicoletti R, Galli L, Balzano G, Zerbi A, Di Carlo V, Villa E. Definitive results of phase II trial of cisplatin, epirubicin, continuous-infusion fluorouracil, and gemcitabine in stage IV pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2679-2686.

Rigg AS, Lemoine NR. Genetic prodrug activation therapy for pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci USA* 1999; 880: 319-325.

Ritossa FA. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18:571-573.

Rodicker F, Putzer BM. pP73 is effective in p53-null pancreatic cancer cells resistant to wild-type TP53 gene replacement. *Cancer Res* 2003; 63: 2737-2741.

Rome C, Couillaud F, Moonen CT. Spatial and temporal control of expression of therapeutic genes using heat shock protein promoters. *Methods*. 2005; 35(2):188-98.

Rosenfeld ME, Vickers SM, Raben D, Wang M, Sampson L, Feng M, Jaffee E, Curiel, DT. Pancreatic carcinoma cell killing via adenoviral mediated delivery of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Ann. Surg.* 1997; 5: 609-620.

Rubanyi GM. The future of human gene therapy. *Mol Aspects Med* 2001; 22: 113-142.

Ryschich E, Notzel T, Hinz U, Autschbach F, Ferguson J, Simon I, Weitz J, Frohlich B, Klar E, Buchler MW, Schmidt J. Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 498-504.

Saimura M, Nagai E, Mizumoto K, Maehara N, Minamishima YA, Katano M, Matsumoto K, Nakamura T, Tanaka M. Tumor suppression through angiogenesis inhibition by SUIT-2 pancreatic cancer cells genetically engineered to secrete NK4. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:3243-9.

Saimura M, Nagai E, Mizumoto K, Maehara N, Okino H, Katano M, Matsumoto K, Nakamura T, Narumi K, Nukiwa T, Tanaka M. Intraperitoneal injection of adenovirus-mediated NK4 gene suppresses peritoneal dissemination of pancreatic cancer cell line AsPC-1 in nude mice. *Cancer Gene Ther*. 2002; 9:799-806.

Saito Y, Sunamura M, Motoi F, Abe H, Egawa S, Duda DG, Hoshida T, Fukuyama S, Hamada H, Matsuno S. Oncolytic replication-competent adenovirus suppresses tumor angiogenesis through preserved E1A region. *Cancer Gene Ther*. 2006;13:242-52.

Sangro B, Mazzolini G, Ruiz J, Herraiz M, Quiroga J, Herrero I, Benito A, Larrache J, Pueyo J, Subtil JC, Olague C, Sola J, Sadaba B, Lacasa C, Melero I, Qian C, Prieto J. Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1389-97.

Santoro MG. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol*. 2000;59(1):55-63

Schmid RM. Genetic basis of pancreatic cancer. *Best Pract & Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 421-433.

Schneider G, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2003; 2:15.

Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Luttgies J, Kloppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegel W. Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9624-9629.

Shaw JP, Akiyoshi DE, Arrigo DA, Rhoad AE, Sullivan B, Thomas J, Genbauffe FS, Bacha P, Nichols JC. Cytotoxic properties of DAB486EGF and DAB389EGF, epidermal growth factor (EGF)receptor-targeted fusion toxins J Biol Chem. 1991;266(31):21118-24.

Shi X, Liu S, Kleeff J, Friess H, Buchler MW. Acquired resistance of pancreatic cancer towards 5-fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. Oncology 2002; 62: 354-362.

Smith RC, Machluf M, Bromley P, Atala A, Walsh K. Spatial and temporal control of transgene expression through ultrasound-mediated induction of the heat shock protein 70B promoter *in vivo*. Hum Gene Ther. 2002;13(6):697-706.

Stauffer PR. Evolving technology for thermal therapy of cancer. Int J Hyperthermia. 2005;21(8):731-44.

Su Z, Lebedeva IV, Gopalkrishnan RV, Goldstein NI, Stein CA, Reed JC, Dent P, Fisher PB. A combinatorial approach for selectively inducing programmed cell death in human pancreatic cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:10332-7.

Tada H, Maron DJ, Choi EA, Barsoum J, Lei H, Xie Q, Liu W, Ellis L, Moscioni AD, Tazelaar J, Fawell S, Qin X, Prokert KJ, Davis A, Fraker DL, Wilson JM, Spitz FR. Systemic IFN- γ gene therapy results in long-term survival in mice with established colorectal liver metastases. J Clin Invest 2001; 108: 83-95.

Tada M, Ohashi M, Shiratori Y, Okudaira T, Komatsu Y, Kawabe T, Yoshida H, Machinami R, Kishi K, Omata M. Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. Gastroenterology 1996; 110: 227-231.

Tanaka S, Iwai M, Harada Y, Morikawa T, Muramatsu A, Mori T, Okanoue T, Kashima K, Maruyama-Tabata H, Hirai H, Satoh E, Imanishi J, Mazda O. Targeted killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cholangiocarcinoma cells by polyamidoamine dendrimer-mediated transfer of an Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vector carrying the CEA promoter. Cancer Gene Ther. 2000; 7(9):1241-50.

Tateishi K, Tada M, Yamagata M, Isayama H, Komatsu Y, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. High proportion of mutant K-ras gene in pancreatic juice of patients with pancreatic cystic lesions. Gut 1999; 45: 737-740.

Tavaria M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. Cell Stress Chaperones. 1996; 1:23-8.

Tseng JF, Mulligan RC. Gene therapy for pancreatic cancer. Surg Oncol Clin N Am 2002; 11: 537-569.

Tsuchida T, Kijima H, Hori S, Oshika Y, Tokunaga T, Kawai K, Yamazaki H, Ueyama Y, Scanlon KJ, Tamaoki N, Nakamura M. Adenovirus-mediated anti-K-ras ribozyme induces apoptosis and growth suppression of human pancreatic carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2000; 7:373-383.

Uchida T, Pappenheimer AM Jr, Greany R. Diphtheria toxin and related proteins. I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin. *J Biol Chem*. 1973; 248: 3838-44.

Ugai S-I, Shimozato O, Yu L, Wang Y-Q, Kawamura K, Yamamoto H, Yamaguchi T, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Transduction of the IL-21 and IL-23 genes in human pancreatic carcinoma cells produces natural killer cell-dependent and independent antitumor effects. *Cancer Gene Ther* 2003; 10:771-778.

Vermes A, Guchelaar H-J, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *JAC* 2000; 46:171-179.

Viehl CT, Moore TT, Liyanage UK, Frey DM, Ehlers JP, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumor-specific immune response in pancreas cancer-bearing mice. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1252-8.

Wagner AC, Weber H, Jonas L, Nizze H, Strowski M, Fiedler F, Printz H, Steffen H, Göke B. Hyperthermia induces heat shock protein expression and protection against cerulein-induced pancreatitis in rats. *Gastroenterology*. 1996; 111:1333-42.

Wang CY, Li F, Yang Y, Guo HY, Wu CX, Wang S. Recombinant baculovirus containing the diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy. *Cancer Res* 2006; 66: 5798-806.

Wang J, Xiao-Xuan L, Dao-Zhen C, Shu-Feng L, Li-Shan Z. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 400-403.

Wang X-P, Yazawa K, Yang J, Kohn D, Fisher WE, Brunicardi C. Specific gene expression and therapy for pancreatic cancer using the cytosine deaminase gene directed by the rat insulin promoter. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 98-108.

Weber H, Wagner AC, Jonas L, Merkord J, Höfken T, Nizze H, Leitzmann P, Göke B, Schuff-Werner P. Heat shock response is associated with protection against acute interstitial pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci*. 2000; 45:2252-64.

Wheeler DS, Wong HR. Heat shock response and acute lung injury. *Free Radic Biol Med*. 2007;42:1-14

Wohlhueter RM, McIvor RS, Plagemann PG. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J Cell Physiol* 1980; 104(3):309-19.

Yanagimoto H, Takai S, Satoi S, Toyokawa H, Takahashi K, Terakawa N, Kwon AH, Kamiyama Y. Impaired function of circulating dendritic cells in patients with pancreatic cancer. *Clin Immunol* 2005; 114: 52-60.

Yang L, Chiang Y, Lenz H-J, Danenberg KD, Spears CP, Gordon EM, Anderson WF, Parekh D. Intercellular communication mediates the bystander effect during herpes simplex thymidine kinase/ ganciclovir-based gene therapy of human gastrointestinal tumor cells. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 719-728.

Yang L, Hwang R, Pandit L, Gordon EM, Anderson WF, Parekh D. Gene therapy of metastatic pancreas cancer with intraperitoneal injections of concentrated retroviral herpes simplex thymidine kinase vector supernatant and ganciclovir. *Ann Surg* 1996; 224: 405-417.

Yang L, Hwang R, Chiang Y, Gordon EM, Anderson WF, Parekh D. Mechanisms for ganciclovir resistance in gastrointestinal tumor cells transduced with a retroviral vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene *Clin Cancer Res* 1998; 4: 731-741.

Yoshida Y, Tasaki K, Miyauchi M, Narita M, Takenaga K, Yamamoto H, Yamaguchi T, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Impaired tumorigenicity of human pancreatic cancer cells retrovirally transduced with interleukin-12 or interleukin-15 gene. *Cancer Gene Ther* 2000; 7: 324-331.

Yu D, Chen D, Chiu C, Razmazma B, Chow YH, Pang S. Prostate-specific targeting using PSA promoter-based lentiviral vectors. *Cancer Gene Ther*. 2001;8(9):628-35.

Zhang YA, Nemunaitis J, Scanlon KJ, Tong AW. Anti-tumorigenic effect of a K-ras ribozyme against human lung cancer cell line heterotransplants in nude mice. *Gene Ther* 2000; 7: 2041-2050.

Zheng JY, Chen D, Chan J, Yu D, Ko E, Pang S. Regression of prostate cancer xenografts by a lentiviral vector specifically expressing diphtheria toxin A. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 764-70.