



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNeC)
Dottorato di ricerca in Oncobiologia Sperimentale

Coordinatore Prof.ssa Renza Vento

**EFFETTI CITOTOSSICI DEL PARTENOLIDE IN CELLULE
DI CARCINOMA MAMMARIO UMANO MDA-MB231**

(SSD BIO/10-BIOCHIMICA)

Candidato

Dr.ssa Roberta Martinez

Tutor

Dr.ssa Antonella D'Anneo

Il Coordinatore del Dottorato

Prof.ssa Renza Vento

Triennio 2011-2013-Ciclo XXIV

INDICE

Introduzione	pag.3
Meccanismi di morte cellulare programmata	pag.4
L'apoptosi	pag.6
La necroptosi	pag.9
L'autofagia	pag.13
Stress ossidativo e cancro	pag.17
Il partenolide	pag.28
Principali meccanismi d'azione del partenolide	pag.30
Il carcinoma mammario.....	pag.37
Il carcinoma mammario triplo negativo	pag.37
Modello sperimentale utilizzato.....	pag.40
Obiettivo	pag.43
Obiettivi della ricerca condotta.....	pag.44
Materiali e Metodi	pag.45
Composti chimici e reagenti impiegati per i trattamenti cellulari.....	pag.46
Colture cellulari.....	pag.47
Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio MTT.....	pag.48
Colorazione con Ioduro di Propidio (PI).....	pag.48
Saggio dell'annessina V/PI.....	pag.49
Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare.....	pag.50
Dosaggio dell'anione superossido.....	pag.51
Dosaggio delle specie reattive dell'ossigeno.....	pag.51
Dosaggio del calcio citoplasmatico.....	pag.52
Saggi colorimetrici per la valutazione dei gruppi tiolici e del GSH.....	pag.53
Valutazione dell'attività di NF-kB.....	pag.55
Valutazione dei vacuoli autofagici.....	pag.56
Preparazione degli estratti cellulari e separazione mediante SDS-PAGE.....	pag.56
Analisi di Western Blotting	pag.57
Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale.....	pag.58
Analisi statistiche.....	pag.59

Risultati	pag.60
Effetti citotossici del partenolide su cellule MDA-MB231.....	pag.61
Il PN induce produzione di ROS e incrementa il livello dello ione calcio.....	pag.64
Effetti del PN sulle chinasi ERK 1/2, JNK e RIP-1.....	pag.68
Effetti del PN sulle componenti del riopotosoma e sui livelli delle caspasi.....	pag.70
Effetto del PN sui gruppi tiolici proteici liberi e proteici e sul GSH	pag.71
Effetti del PN su NF-kB.....	pag.72
Il PN causa dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale e necrosi delle cellule.....	pag.73
Il PN determina autofagia.....	pag.76
Discussione	pag.78
Bibliografia	pag.84

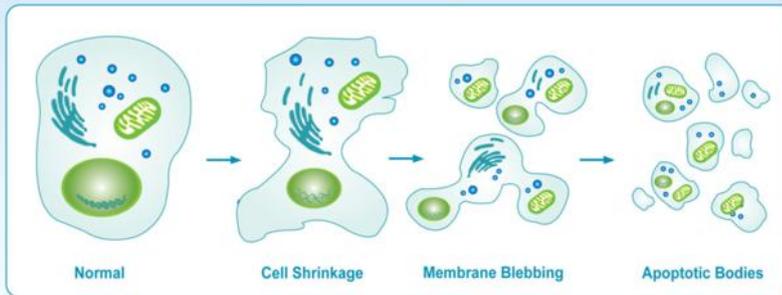
INTRODUZIONE

MECCANISMI DI MORTE CELLULARE PROGRAMMATA

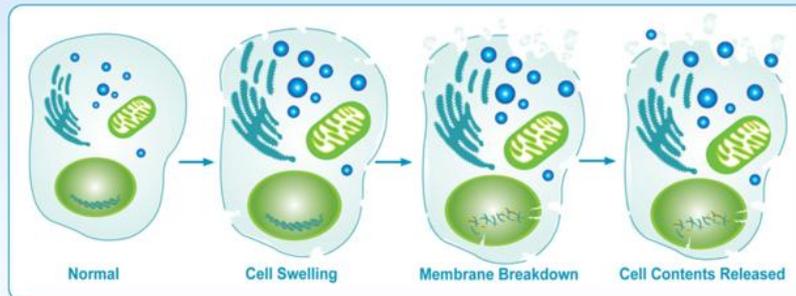
La morte cellulare programmata è uno degli eventi biologici alla base della regolazione dell'omeostasi tissutale, ma svolge anche un ruolo nell'eliminazione di cellule danneggiate, stressate o infette. Alterazioni di questi meccanismi sono responsabili dell'insorgenza di gravi patologie, quali tumori, malattie autoimmuni, malattie infettive, malattie neurodegenerative e ischemiche. La resistenza delle cellule tumorali ai meccanismi di morte cellulare programmata contribuisce alla progressione del tumore e alla resistenza alla terapia. Pertanto la conoscenza delle basi molecolari di tali eventi di morte assume una particolare importanza allo scopo di individuare valide strategie terapeutiche per sopprimere le cellule cancerose.

La morte cellulare programmata è una forma di morte regolata, che avviene secondo un programma molecolare ben preciso. La principale forma di morte cellulare programmata è l'apoptosi, che è caratterizzata dall'attivazione di specifiche proteasi, che prendono il nome di caspasi, le quali attivano una cascata proteolitica responsabile dell'innescamento e dell'esecuzione dell'evento di morte. Tradizionalmente l'apoptosi veniva contrapposta alla necrosi, una forma di morte indipendente dall'attivazione delle caspasi, che per lungo tempo è stata considerata un evento passivo e accidentale, oggi però sono note forme di necrosi programmata, quali la necroptosi. Un ulteriore meccanismo di morte cellulare programmata caspasi-indipendente è rappresentato dall'autofagia, che a differenza di apoptosi e necrosi può svolgere anche un ruolo di sopravvivenza (Ouyang et al., 2012; Liu et al., 2012).

Apoptosis Regulation



Necroptosis Regulation



Autophagy Regulation

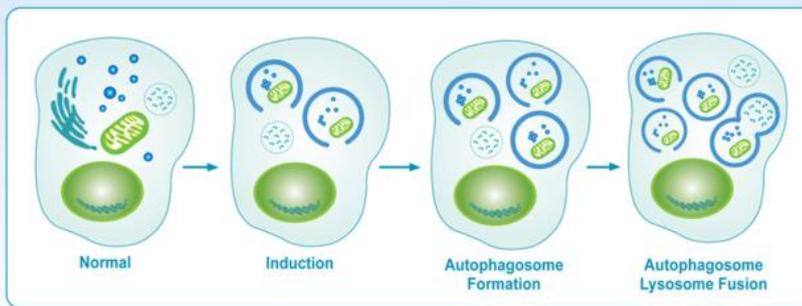


Figura 1 della tesi: Confronto tra diversi meccanismi di morte cellulare. Esistono diverse forme di morte cellulare che differiscono per le caratteristiche morfologiche e biochimiche: l'apoptosi, la necroptosi e l'autofagia. All'osservazione al microscopio la cellula apoptotica assume una forma tondeggiante, il volume cellulare si riduce (picnosi), la cromatina condensa, il nucleo viene frammentato (carioressi). Gli organelli citoplasmatici non presentano di norma modifiche ultrastrutturali. Modificazioni a carico del mitocondrio riguardano principalmente la caduta del potenziale di membrana mitocondriale e la fuoriuscita nel citoplasma di fattori pro-apoptotici come il citocromo c. La membrana plasmatica subisce, nello stadio finale, modifiche che portano alla formazione di evaginazioni dette corpi apoptotici (blebbing) che vengono fagocitati dal sistema immunitario. La necroptosi, è caratterizzata da una rapida perdita dell'integrità della membrana, rigonfiamento degli organelli citoplasmatici, moderata condensazione cromatinica, disfunzione mitocondriale. L'autofagia è caratterizzata dalla presenza nella cellula di autofagosomi, i quali sono costituiti da una doppia membrana contenente organelli o citoplasma in degenerazione. La fusione tra autofagosomi e lisosomi determina la formazione di autofagolisosomi, in questi avviene la degradazione della membrana interna dell'autofagosoma e del suo contenuto. La cellula autofagica è priva di condensazione cromatinica e contiene al proprio interno numerose vescicole autofagiche (Kroemer et al., 2009).

L'apoptosi

L'apoptosi è una forma di morte cellulare programmata, questo evento di morte di norma non si accompagna a processi infiammatori, poiché il materiale interno alla cellula non viene riversato all'esterno (Chowdhury et al., 2006). Le cellule che muoiono per apoptosi presentano specifiche caratteristiche morfologiche e biochimiche. All'osservazione al microscopio la cellula presenta una forma tondeggiante, il volume cellulare si riduce (picnosi), la cromatina condensa, il nucleo viene frammentato (carioressi). Gli organelli citoplasmatici non presentano di norma modifiche ultrastrutturali. Modificazioni a carico del mitocondrio riguardano principalmente la caduta del potenziale di membrana mitocondriale e la fuoriuscita nel citoplasma di fattori pro-apoptotici come il citocromo c. La membrana plasmatica subisce, nello stadio finale, modifiche che portano alla formazione di evaginazioni dette corpi apoptotici (blebbing) che vengono fagocitati dal sistema immunitario (Kroemer et al., 2009; Galluzzi et al., 2012). Una caratteristica molecolare tipica dell'apoptosi classica è l'attivazione delle caspasi (cisteina-aspartato proteasi), proteasi coinvolte sia nell'innescamento, sia nell'esecuzione di questo processo di morte. Le caspasi vengono prodotte sotto forma di pro-enzimi, ed attivate mediante taglio proteolitico. Esistono due sottofamiglie di caspasi: le caspasi iniziatrici (caspasi 9, 8, 2 e 10) e le esecutrici (caspasi 3, 7, 6); le prime, sono attivate in una fase precoce del processo e hanno il compito di attivare le esecutrici, le seconde agiscono su diversi substrati, contribuendo alla fase esecutiva dell'apoptosi (Fan et al., 2005). Il processo apoptotico può essere innescato da una via estrinseca o da una via intrinseca. La via estrinseca prevede l'attivazione di recettori di morte, tra i quali: Fas/CD95 o Apo-1, i recettori per il TNF (TNF-R), e i recettori TRAIL (TRAIL-R1 e TRAIL-R2). Questi recettori sono localizzati sulla membrana plasmatica e, una volta attivati dai loro specifici ligandi, sono in grado di reclutare molecole citoplasmatiche adattatrici (come TRADD e FADD) tramite i loro domini di morte (Death Domain o DD). Le proteine adattatrici, tramite il loro dominio DED (Death Effector Domain), richiamano le pro-caspasi 8 e 10, inducendone l'attivazione in un complesso che prende il nome di DISC (Death Inducing Signaling Complex). Le caspasi 8 e 10 attivano quindi le caspasi esecutrici (caspasi 3, 6 e 7) mediante un taglio proteolitico.

La via intrinseca prevede il coinvolgimento del mitocondrio, ed il rilascio nel citoplasma di fattori mitocondriali che attivano specifici sistemi di morte (Chowdhury et al., 2006). Un ruolo centrale nell'attivazione di questa via è svolto dalle proteine della famiglia Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2). Questa famiglia di proteine regola la permeabilità della membrana mitocondriale esterna (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP), e comprende sia fattori pro-apoptotici (Bak, BAD, Bok e altre), sia proteine anti-apoptotiche (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w). I membri della famiglia Bcl-2 possiedono dei domini omologhi, detti domini BH (Bcl-2 Homology Domain). Le proteine pro-apoptotiche presentano quattro domini BH: BH1, BH2, BH3, BH4; alcuni membri pro-apoptotici, come Bax (Bcl-2-Associated X protein) e Bak (Bcl-2 homologous Antagonist Killer) possiedono tutti i domini BH, eccetto il BH4. Infine gli altri membri pro-apoptotici come Bid, Bim e Bad possiedono esclusivamente il dominio BH3. Le proteine di questa famiglia contengono dei domini transmembrana che ne consentono l'inserimento nella membrana mitocondriale esterna. Si ipotizza che alcuni membri pro-apoptotici, come Bax e Bak, siano in grado di formare dei pori nella membrana esterna del mitocondrio, determinando il rilascio di fattori mitocondriali implicati nella via intrinseca. I fattori anti-apoptotici come Bcl-2 bloccano questo processo, altri membri come Bid favoriscono la formazione di questi pori (Chao et al.; 1998). In particolare, in seguito al taglio di Bid, operato dalla caspasi 8, si ottiene una proteina tronca, che migra nel mitocondrio e interagisce con altri membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2: Bax e Bak, i quali formano dei pori nella membrana mitocondriale esterna. Tramite questi pori fuoriescono alcune molecole, come il citocromo c, SMAC/Diablo, AIF (Apoptosis Inducing Factor), l'endonucleasi G. Il citocromo c è un importante fattore responsabile del trasporto degli elettroni dal complesso III al complesso IV della fosforilazione ossidativa. Quando è rilasciato dal mitocondrio va ad interagire con la proteina APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) e la pro-caspasi 9, generando un complesso multiproteico detto apoptosoma. Tale complesso determina quindi l'attivazione della pro-caspasi 9 in caspasi 9, innescando così una serie di eventi proteolitici che culminano nell'esecuzione dell'apoptosi (Chowdhury et al., 2006).

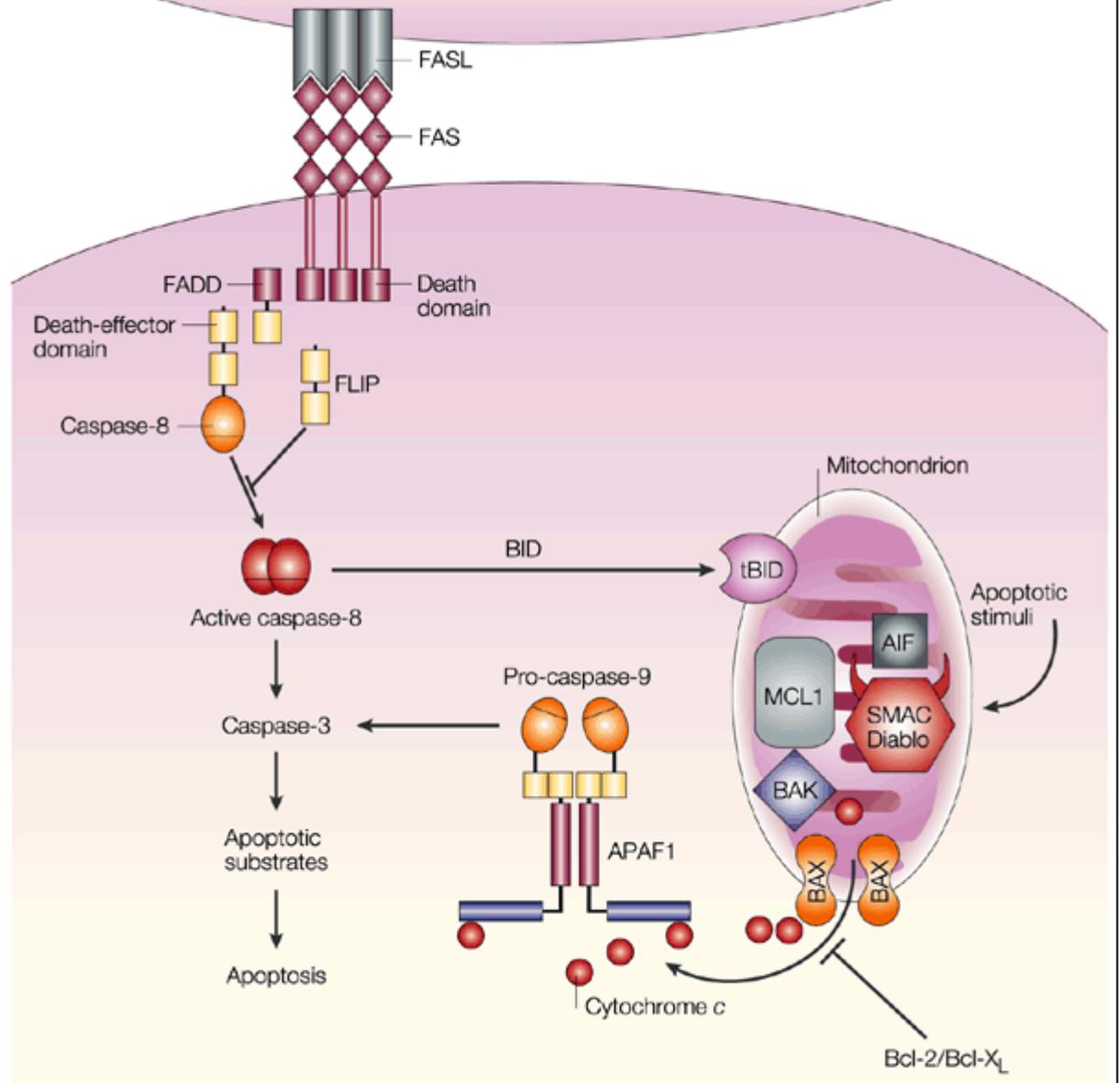


Figura 2 della tesi: Via estrinseca ed intrinseca dell'apoptosi. La via estrinseca dell'apoptosi prevede l'attivazione dei recettori di morte, i quali sono in grado di reclutare la pro-caspasi 8, inducendone l'attivazione. Tale caspasi a sua volta può attivare la caspasi 3, che va ad agire su diversi substrati consentendo l'esecuzione dell'evento apoptotico. La via intrinseca prevede la formazione di pori a livello della membrana mitocondriale, con il conseguente rilascio di fattori quali il citocromo c, il quale determina l'attivazione della caspasi 9, che a sua volta può attivare la caspasi 3. Esiste un collegamento tra le due vie, infatti la caspasi 8 può operare un taglio proteolitico su Bid, favorendo la formazione di pori nella membrana mitocondriale (Chowdhury et al., 2006).

La necroptosi

La necrosi è classicamente considerata un evento di morte cellulare non regolata, caratterizzata dalla presenza di precise modificazioni nella morfologia. Le cellule che subiscono questo processo di morte vanno incontro ad un incremento del volume e a lisi della membrana plasmatica, con conseguente rilascio del loro contenuto, danneggiando frequentemente le cellule vicine e innescando un processo infiammatorio.

Tuttavia oggi sono noti anche meccanismi di necrosi programmata, quali la necroptosi. Questo evento di morte è infatti innescato da meccanismi di trasduzione del segnale ed è regolato da specifiche proteine enzimatiche (Galluzzi et al., 2008; Hitomi e al., 2008).

La necroptosi può essere attivata dagli stessi recettori di morte coinvolti nel meccanismo apoptotico (Galluzzi et al., 2008), quali il recettore per il TNF, o i recettori TRAIL e Fas. È noto che questi recettori possono innescare l'apoptosi classica, ma quando le caspasi sono bloccate fisiologicamente o mediante l'impiego di specifici inibitori come lo zVAD.fmk o z-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone, gli stessi recettori possono attivare una via che determina la morte per necroptosi (Hitomi e al., 2008). Tale via prevede il coinvolgimento di RIP -1 (Receptor Interacting Protein 1), una proteina chiave del processo necroptotico. Da un punto di vista biochimico, infatti, la necroptosi è stata definita come un tipo di morte cellulare che può essere prevenuta mediante l'inibizione di RIP-1. Alcuni studi hanno dimostrato che la repressione trascrizionale o l'inibizione farmacologica di questa proteina può preservare le cellule dall'evento necroptotico (Kroemer et al., 2009). I principali inibitori farmacologici di RIP-1 sono le necrostatine, la più nota tra queste è la necrostatina-1, la quale interagisce con un dominio di morte presente su RIP-1 (Detgerev et al.; 2008). Questa proteina contiene infatti un dominio di morte che le consente di interagire con i recettori per il TNF (TNFR1), Fas, e i recettori del ligando TRAIL (TRAIL R1 e 2), e con le proteine adattatrici FADD e TRADD. Tramite tale dominio RIP-1 viene quindi reclutata nel complesso recettoriale ed attivata per fosforilazione. Inoltre questa proteina contiene anche un dominio che le consente di interagire con la chinasi RIP-3 (Sun et al., 2002), formando un complesso che è stato definito "necrosoma". RIP-3 sembra essere l'esecutore dell'evento necroptotico e la sua azione si correla ad un complesso meccanismo che culmina nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

L'attività di RIP-1 può essere regolata da eventi di ubiquitinazione: in particolare fattori antiapoptotici come le proteine IAP (Inhibitors of Apoptosis) sembrano promuovere l'ubiquitinazione di RIP-1 (Park et al., 2004). In tale stato RIP-1 acquisisce la funzione di fattore di sopravvivenza determinando indirettamente l'attivazione di NF- κ B. Nella forma de-ubiquitinata, invece, RIP-1 innesca eventi di morte caspasi-indipendenti, mediante l'attivazione di RIP-3 (Declercq et al., 2009). L'attività di RIP-1, ma anche di RIP-3 è regolata dall'azione delle caspasi, la caspasi 8 è in grado di degradare entrambe le chinasi contrastando l'evento necroptotico e favorendo la via apoptotica classica (Cho et al., 2009; Feng et al., 2007). Di recente, Feoktistova et al., hanno evidenziato che l'attività di RIP-1 è modulata a livello di un complesso detto "rioptosoma", questo complesso contiene, oltre a RIP-1, anche le due isoforme di c-FLIP (FLIP_L ed _S), FADD e la caspasi-8. Quando i livelli di FLIP_L sono elevati, si formano prevalentemente eterodimeri caspasi 8-FLIP_L, i quali possiedono attività catalitica ridotta rispetto alla forma attiva della caspasi. Pertanto tali eterodimeri possono agire selettivamente su substrati che si trovano nelle immediate vicinanze, quali la proteina RIP-1 presente nel complesso (Feoktistova et al., 2011). In seguito al taglio proteolitico di RIP-1, si ottiene un frammento C-terminale in grado di mediare l'apoptosi (Kim et al., 2000). Quando invece prevale la forma FLIP_S, si forma un eterodimero caspasi 8-FLIP_S, il quale non presenta attività catalitica, pertanto RIP-1 non viene degradata e attiva la necroptosi. Diversi studi evidenziano che l'assenza di FADD e della caspasi 8 è letale per le cellule, in quanto determina accumulo di RIP-1 e conseguente morte per necroptosi. Infatti in assenza di FADD, proteina adattatrice responsabile del reclutamento delle diverse componenti del ripoptosoma, il complesso non si forma e RIP-1 non può essere degradata (Feoktistova et al., 2011).

Come accennato RIP-1 può attivare la chinasi RIP-3 mediante fosforilazione, quando RIP-3 è attiva interagisce direttamente con enzimi implicati nel metabolismo ossidativo quali: la glicogeno fosforilasi (PYGL), la glutammina sintetasi, e la glutammato deidrogenasi (GLUD1). L'interazione di RIP-3 con questi enzimi ne incrementa l'attività, stimolando il metabolismo energetico con conseguente induzione di stress ossidativo (Declercq et al., 2009). Inoltre RIP-1 può attivare l'enzima NADPH ossidasi 1 a livello di un complesso che viene reclutato dal recettore del TNF- α (Kim et al., 2007). Infine RIP-1 può stimolare la degradazione autofagica della catalasi, favorendo l'accumulo dei ROS (Murakami et al., 2011). In alcuni modelli sperimentali i ROS

sembrano essere responsabili dell'esecuzione dell'evento necroptotico, determinando diversi effetti, quali una prolungata attivazione della chinasi JNK, seguita da morte cellulare (Christofferson et al., 2010). Un altro fenomeno che caratterizza la necroptosi è la presenza di alterazioni a carico del mitocondrio, quali permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna e produzione di ROS. In questo evento sembrano essere coinvolte le proteine ANT (Adenina Nucleotide Traslocasi) e Bmf (Bcl-2 Modifying Factor) (Christofferson et al., 2010; Kroemer et al., 2009). ANT è una proteina localizzata nella membrana mitocondriale interna, la quale media lo scambio ATP/ADP. L'ADP che penetra nel mitocondrio viene adoperato per la sintesi di ATP, il quale viene in seguito trasportato nel citosol (Temkin et al., 2006). In risposta a determinati stimoli ANT può formare dei pori nella membrana mitocondriale interna, determinando così una permeabilizzazione del mitocondrio (Kumarswamy et al., 2009). Bmf è una proteina della famiglia Bcl-2, in grado di inibire i membri anti-apoptotici di tale famiglia, favorendo così la formazione di pori nella membrana del mitocondrio (Hitomi et al., 2008).

Un altro evento spesso associato alla necroptosi è l'incremento del calcio citoplasmatico, il quale è in grado favorire la formazione di pori sulla membrana mitocondriale, ma anche di attivare le calpaine e le catepsine, proteasi coinvolte in eventi di morte caspasi-indipendenti (Kroemer et al., 2009).

Un altro noto mediatore della necrosi programmata è rappresentato dalla proteina AIF. AIF è una flavoproteina mitocondriale che in seguito ad un taglio proteolitico ad opera di proteasi quali le calpaine o le catepsine trasloca nel nucleo, dove forma un complesso con l'endonucleasi ciclofillina A e con l'istone H₂AX, determinando condensazione e frammentazione su larga scala della cromatina (Baritaud et al., 2012).

Lo studio del processo necroptotico è di grande interesse nell'ambito dell'oncologia molecolare, in quanto molecole in grado di indurre la necroptosi potrebbero essere utilizzate per determinare la morte di cellule tumorali resistenti all'apoptosi. L'inibizione del processo apoptotico è infatti una strategia frequentemente adoperata dalle cellule tumorali, per resistere al trattamento terapeutico (Viktorsson et al., 2005). È stato però ipotizzato che le cellule possano sviluppare anche meccanismi di resistenza alla necroptosi, quindi l'uso di combinazioni costituite da farmaci pro-apoptotici e composti che promuovono la necroptosi potrebbe rappresentare una valida strategia terapeutica (Hu et al., 2008).

(Song et al., *Bacteriol Virol*; 2013)

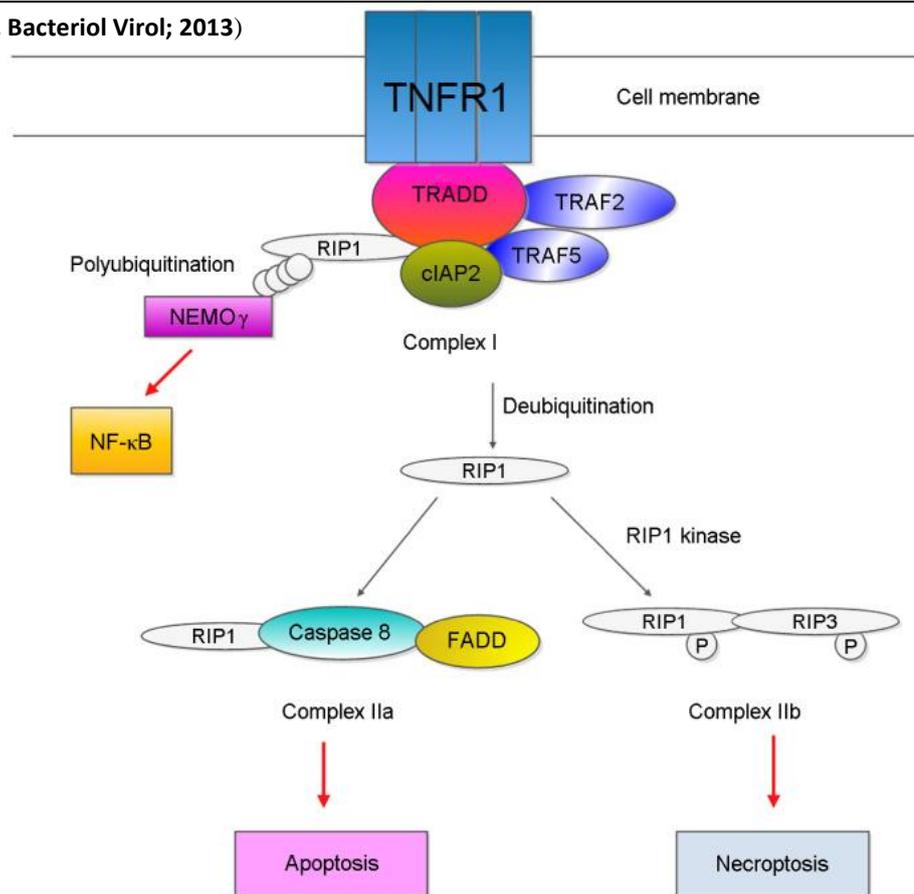
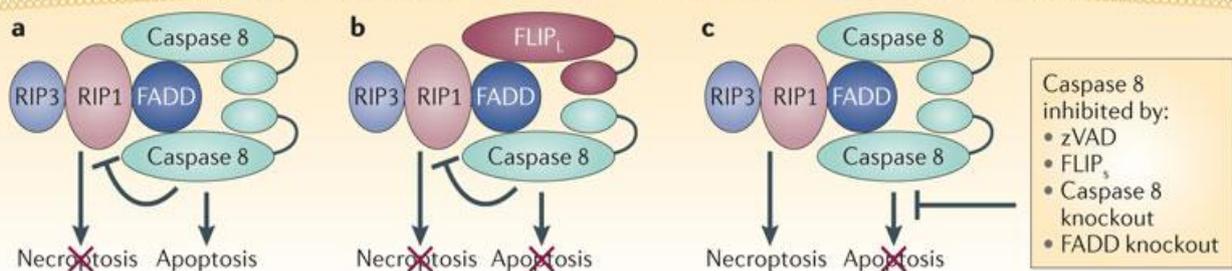


Figura 3 della tesi: Segnali di sopravvivenza e di morte attivati dai recettori. I recettori di morte, in risposta a specifici segnali possono reclutare presso la membrane alcune proteine quali TRADD, TRAF2, RIP-1 e cIAP1, formando il complesso I. Rip-1 può essere ubiquitinata da cIAP1 a livello di tale complesso, acquisendo la capacità di reclutare NEMO, una subunità del complesso IKK, determinando così l'attivazione della via di NF-κB. Quando RIP-1 è de-ubiquitinata forma il complesso IIa insieme a FADD, RIP-3 e la caspasi 8. La caspasi 8 attiva determina un taglio proteolitico su RIP-1 e RIP-3 attivando così l'apoptosi. Quando la caspasi 8 è assente o inibita le forme fosforilate di RIP-1 e RIP-3 formano il necrosoma, attivando così la necroptosi. La formazione del complesso IIb richiede l'attività chinasi di RIP-1, che viene inibita dalla Necrostatina-1 (Song et al., 2013; Yuan et al., 2010).

(Kreuzaler e Watson; *Nat Rev Cancer*; 2012)



Nature Reviews | Cancer

Figura 4 della tesi: Modulazione dell'attività di RIP-1 a livello del ripoptosoma. Il ripoptosoma è un complesso costituito dalla caspasi 8, RIP-1, FADD e cFLIP, il quale viene reclutato dai recettori di morte. La composizione del ripoptosoma è di fondamentale importanza nel determinare il destino cellulare. Quando si formano omodimeri della caspasi 8 viene attivata la cascata delle caspasi, stimolando la via apoptotica. Se si formano invece eterodimeri caspasi 8-FLIP_L, questa caspasi presenta attività ridotta e non è in grado di attivare l'apoptosi, può però determinare un taglio proteolitico su RIP-1, inibendo la necroptosi. Quando la caspasi 8 è inibita o assente o non si forma il ripoptosoma, RIP-1 si accumula e attiva la necroptosi (Feoktistova et al., 2011).

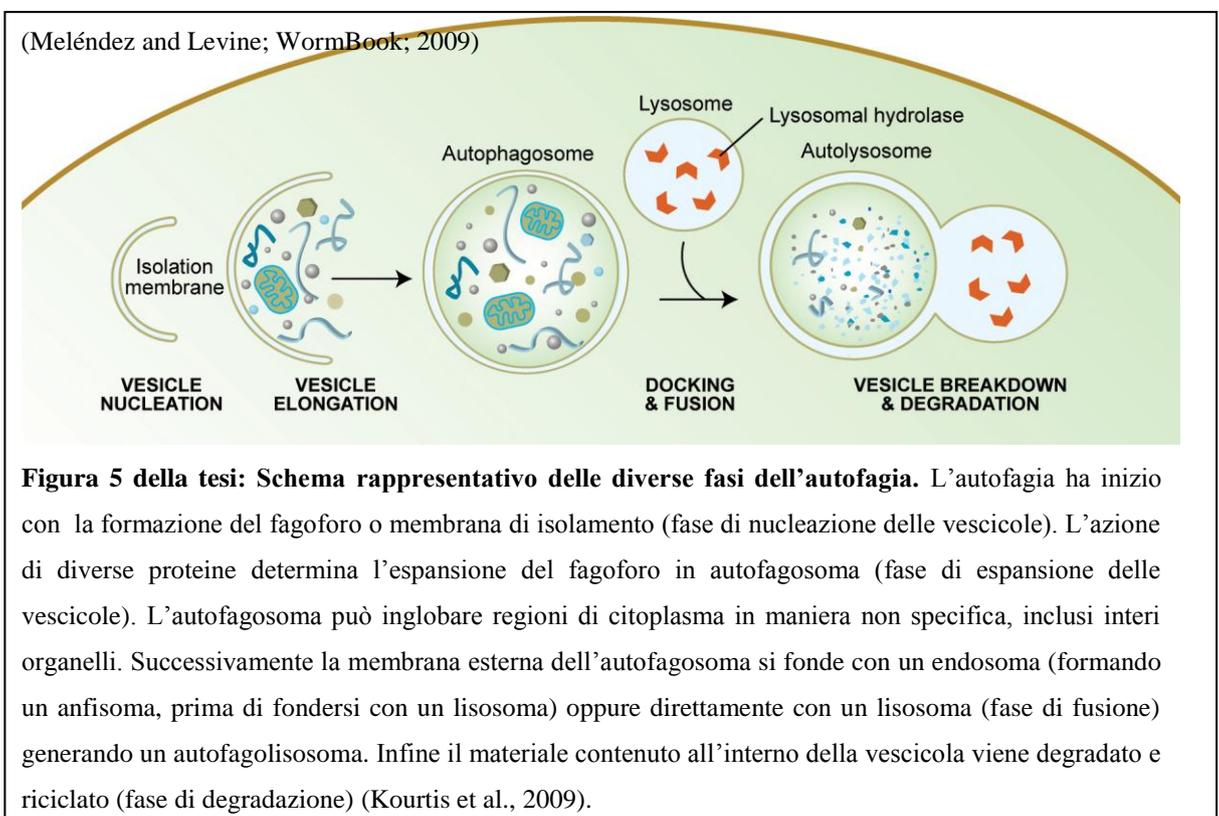
L'autofagia

Nel panorama dei meccanismi di morte attivabili nei sistemi cellulari, negli ultimi anni è emerso il meccanismo di morte autofagica. L'autofagia è un processo auto-digestivo della cellula che le consente di degradare e riciclare le componenti cellulari (Liu et al., 2012). Esistono tre forme di autofagia negli eucarioti: autofagia mediata dalle chaperone (CMA), microautofagia e macroautofagia, alla quale comunemente ci si riferisce impiegando il termine di autofagia. Questo processo è caratterizzato dalla presenza di autofagosomi: vescicole a doppia membrana che sequestrano il citoplasma o organuli cellulari e successivamente si fondono con i lisosomi, consentendo la digestione del materiale che contengono. L'autofagia può avere un ruolo di sopravvivenza, infatti quando la cellula si trova in condizioni di stress o di deprivazione di nutrienti, le componenti cellulari sequestrate e degradate vengono riciclate per la sintesi di macromolecole e di ATP. Inoltre la degradazione di organelli danneggiati o di costituenti citosoliche alterate, come per esempio aggregati proteici, preserva le cellule da ulteriori danni (Liu et al., 2012). L'autofagia può anche essere presente in tutte le cellule a livelli basali, per garantire il turnover del citoplasma e degli organelli (Levine et al., 2005). Tuttavia è noto che in una persistente condizione di stress l'autofagia può determinare eventi di morte, con caratteristiche differenti rispetto alla necrosi e all'apoptosi (Liu et al., 2012). Tra i principali regolatori dell'autofagia vi è la chinasi target della rapamicina (mTOR), la quale inibisce l'evento autofagico quando nella cellula vi è abbondanza di nutrienti (Levine et al., 2005). L'evento autofagico è stato scoperto nei mammiferi ed è stato a lungo studiato nei lieviti; questi studi hanno permesso di identificare diversi geni codificanti per proteine coinvolte nell'autofagia (ATG proteins). Questo processo è altamente conservato e molte proteine ATG presentano degli omologhi negli organismi superiori. Queste proteine intervengono nelle diverse fasi dell'evento autofagico: formazione (o nucleazione) delle vescicole, espansione di una membrana di isolamento chiamata fagoforo, maturazione degli autofagosomi, e recupero di proteine autofagiche da questi organelli (Kourtis et al., 2009). Le proteine ATG sono suddivise in quattro gruppi funzionali: 1) proteine che formano un complesso di serina/treonina chinasi, le quali sono attivate in risposta a diversi segnali, quali quello mediato da mTOR (ATG1, 13 e 17); 2) proteine coinvolte nella nucleazione delle vescicole autofagiche (ATG 6 e 14, Vps 15 e 34); 3) proteine

che mediano l'espansione delle vescicole (Atg 8, 3, 7 e 12); 4) proteine che consentono il recupero delle altre ATG dall'autofagosoma maturo (ATG 2, 9 e 18) (Levine et al., 2005). Durante la fase di formazione dell'autofagosoma interviene un complesso costituito dalla serina/treonina chinasi ATG 1, dalla proteina scaffold ATG 13 e dalle ATG 17, 29 e 31. Nei mammiferi esiste un complesso analogo costituito da ULK 1 (ATG 1), mATG 13 (ATG 13), FIP200 o Focal adhesion kinase family Interacting Protein (ATG 17) e ATG 101. L'attività di questo complesso è regolata da mTOR, il quale è sensibile allo stato nutrizionale della cellula (Pyo et al., 2012). In condizioni di abbondanza di nutrienti mTOR è attiva e, mediante un meccanismo ancora non chiarito, inibisce l'attività della chinasi ULK 1, impedendole di interagire con il fagoforo e di intervenire nella nucleazione dell'autofagosoma. In condizioni di deprivazione di nutrienti mTOR è inattiva, ciò consente l'autofosforilazione e conseguente attivazione di ULK 1, la quale va a fosforilare le proteine ATG13 e FIP200. ULK1, ATG 13 e FIP200 fosforilate formano un complesso che si va a localizzare in prossimità di specifiche regioni di membrana, reclutando proteine coinvolte nella formazione dell'autofagosoma. ULK è coinvolta anche nel reclutamento di un complesso coinvolto nella fase di nucleazione, tale complesso contiene la PI3K III o Phosphatidylinositol 3 kinase III (Vps 34), la beclina-1 (ATG 6), e p105 (Vps 15). L'interazione della beclina-1 con la PI3K III, ne promuove l'attività catalitica, consentendo la formazione di fosfatidil-inositolo 3 fosfato (PIP3), che reclutano diverse proteine nel sito di nucleazione. Recenti studi dimostrano che la beclina-1 è in grado di legare anche la proteina ATG 14 L (Barkor), consentendone il reclutamento presso la membrana dove lega i PIP3. In particolare sembra che ATG 14 L si leghi presso regioni curve di membrana dove sono stati incorporati questi fosfoinositoli, stabilizzando e mantenendo la curvatura e contribuendo così alla formazione dell'autofagosoma. A tale fase segue l'allungamento, il quale prevede eventi di coniugazione "ubiquitin-like", il primo evento coinvolge il complesso ATG 12-ATG 5-ATG 16; il secondo riguarda la conversione della proteina LC3 (ATG 8) dalla forma LC3I alla forma LC3II, evento chiave per la formazione dell'autofagosoma. LC3I subisce un taglio proteolitico da parte della cisteina proteasi ATG 4 e viene successivamente coniugato con la fosfatidiletanolamina (PE) da ATG 3 e ATG 7 (un enzima E2-like). Si ottiene così LC3II che si associa alla membrana dell'autofagosoma e vi rimane finché questo non viene fuso con i lisosomi.

La conversione di LC3I in LC3II è un noto step del processo autofagico (Pyo et al., 2012; Jung et al., 2010).

L'ultima fase dell'autofagia è rappresentata dalla fusione delle vescicole autofagiche contenenti il citoplasma con i lisosomi, formando gli autofagolisosomi o autolisosomi. Il contenuto degli autofagolisosomi e la loro membrana interna sono quindi degradati dalle idrolasi lisosomiali. Il meccanismo molecolare alla base della fusione tra autofagosomi e lisosomi ed il loro trasporto non è stato ancora del tutto chiarito. Di recente è stato evidenziato che sia nei mammiferi sia nei lieviti la maturazione degli autofagolisosomi richiede l'intervento di GTPasi monomeriche quali Rab22 e 24. Inoltre sono state individuate alcune proteine che regolano la maturazione e la degradazione degli autofagolisosomi, tra queste vi sono UVRAG, rubicon, presenilina 1, proteine contenenti valosina (VCP), e il complesso proteico syntaxin 5-SNARE. Infine è stato evidenziato un ruolo del complesso ESCRT (complesso richiesto per il trasporto degli endosomi) nella fusione tra autofagosomi e lisosomi. Anche il meccanismo mediante il quale i prodotti di degradazione delle componenti citoplasmatiche vengono esportati nel citosol per essere riutilizzati necessita di approfondimenti sperimentali che siano in grado di rendere più chiaro questo aspetto (Pyo et al., 2012).



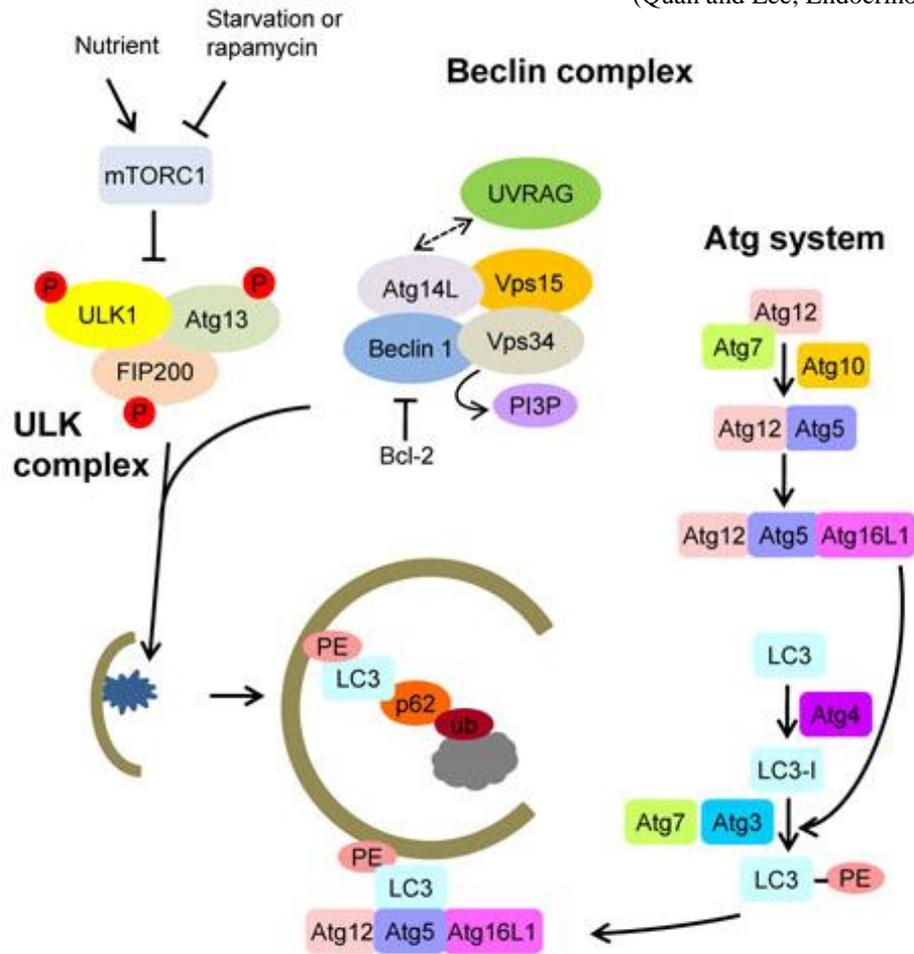


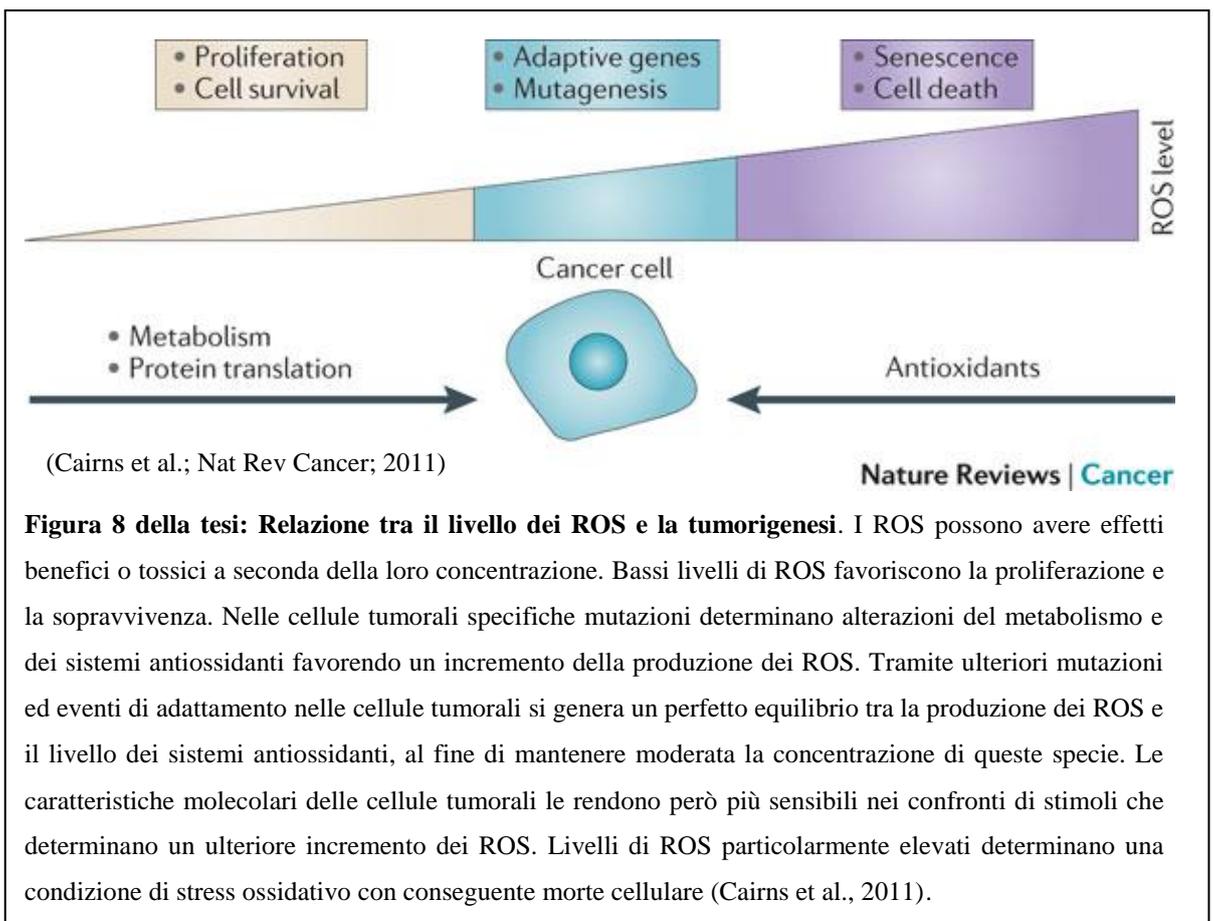
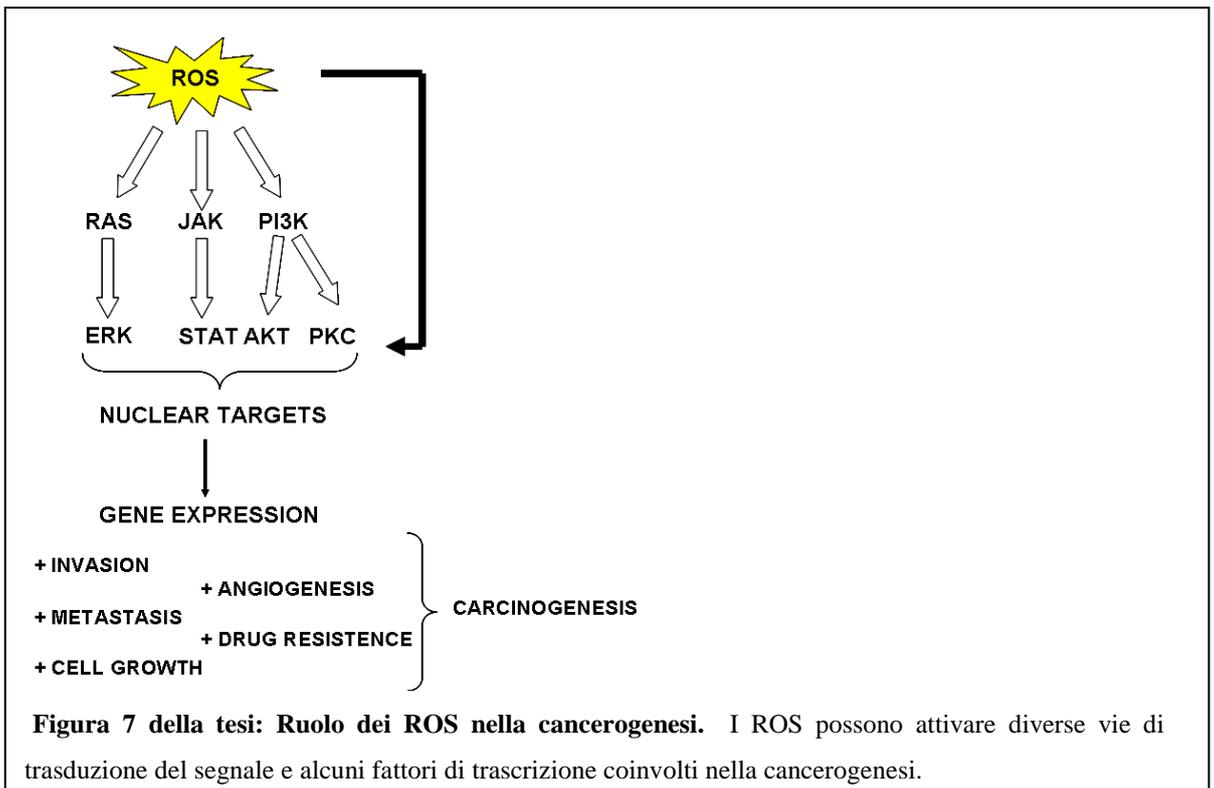
Figura 6 della tesi: Vie di regolazione dell'evento autofagico. L'autofagia è regolata dalla serina/treonina chinasi mTOR; in condizioni di abbondanza di nutrienti tale chinasi inibisce l'evento autofagico mediante regolazione negativa del complesso costituito dalla chinasi ULK1, da FIP200 e da Atg13. In condizioni di deprivazione di nutrienti mTOR è inibita, pertanto il complesso della chinasi ULK è attivo e recluta proteine coinvolte nella formazione dell'autofagosoma. Un altro fattore chiave dell'evento autofagico, coinvolto nella fase di maturazione dell'autofagosoma, è la PI3K III (Vsp34), la cui attività è promossa dall'interazione con la beclina-1. Il legame della beclina-1 con la proteina Bcl-2 inibisce l'autofagia. La fase di allungamento del pre-autofagosoma prevede due reazioni "ubiquitin-like". La prima prevede il coinvolgimento delle proteine Atg12, Atg5 e Atg16L1; la seconda riguarda la conversione della proteina LC3 dalla forma LC3I alla forma LC3II. Tale evento prevede un taglio proteolitico esercitato da Atg4 sulla proteina LC3I, il frammento così ottenuto viene quindi coniugato con la fosfatidiletanolamina (PE) dalle proteine Atg3 e Atg 7, generando LC3II (Pyo et al., 2012).

STRESS OSSIDATIVO E CANCRO

Diverse evidenze sperimentali supportano l'idea che l'attivazione di eventi ossidativi possa rappresentare un'utile strategia per uccidere selettivamente le cellule cancerose in alcuni sistemi tumorali.

Di fatto è stato anche documentato che le cellule tumorali presentano una maggiore quantità di specie reattive dell'ossigeno (ROS) rispetto alle cellule normali, ciò può dipendere da una loro maggiore produzione da parte del mitocondrio o da parte di enzimi quali la nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi (NOX), oppure da ridotti livelli di sistemi antiossidanti quali la MnSOD (Manganese Superossido Dismutasi) e la catalasi. Questi elevati livelli di ROS possono essere responsabili dell'acquisizione di un fenotipo oncogenico, infatti promuovono la proliferazione (per esempio tramite l'attivazione delle chinasi ERK 1/2), la resistenza all'apoptosi (mediante l'attivazione di fattori di sopravvivenza, quali il fattore di trascrizione NF-kB, e le chinasi AKT e scr), l'invasività e lo sviluppo di metastasi (stimolando la secrezione delle metalloproteinasi o MMPs) e l'angiogenesi (tramite secrezione di VEGF e angiopoietina) (Fig. 7). Inoltre i ROS possono determinare mutazioni a carico del DNA, favorendo la trasformazione oncogenica (Sosa et al., 2013).

Un ulteriore incremento del livello dei ROS nelle cellule tumorali determina invece dei danni a carico delle diverse macromolecole biologiche, risultando tossico. Tali cellule risultano pertanto particolarmente suscettibili all'azione di composti in grado di determinare una condizione di stress ossidativo (Sun et al., 2010) (Fig. 8).



Il termine “stress ossidativo” si riferisce alle condizioni in cui in un sistema biologico vi è un accumulo di ROS o di specie reattive dell’azoto (RNS). I ROS sono molecole elettronicamente instabili e quindi altamente reattive, che derivano dall’ossigeno molecolare, tra questi vi sono sia radicali liberi, sia specie non radicaliche. I radicali liberi sono molecole che contengono un elettrone spaiato nell’orbitale esterno e quindi sono altamente reattivi, in quanto tendono a catturare elettroni da altre molecole o a formare con esse legami covalenti, al fine di raggiungere una configurazione elettronica più stabile. I principali radicali dell’ossigeno sono: il radicale idrossilico ($\text{HO}\cdot$), l’anione superossido (O_2^-), il radicale idroperossido ($\text{HO}_2\cdot$), il monossido d’azoto ($\text{NO}\cdot$); i principali ROS non radicalici sono: il perossido d’idrogeno (H_2O_2), l’ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$), l’acido ipocloroso (HOCl), l’anione perossinitrito (ONOO^-) (Fig. 9).

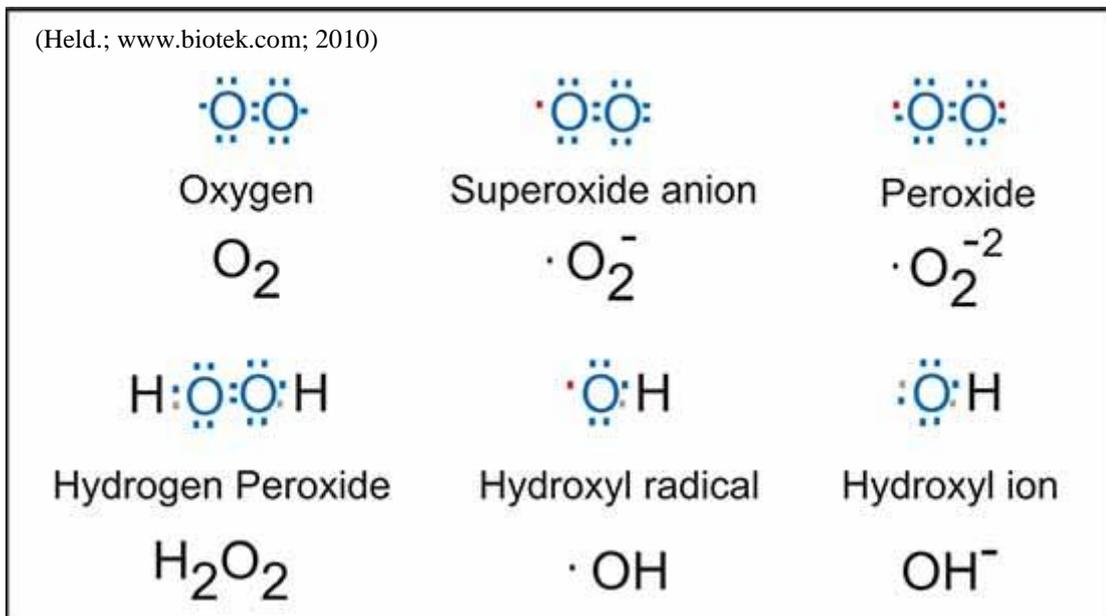
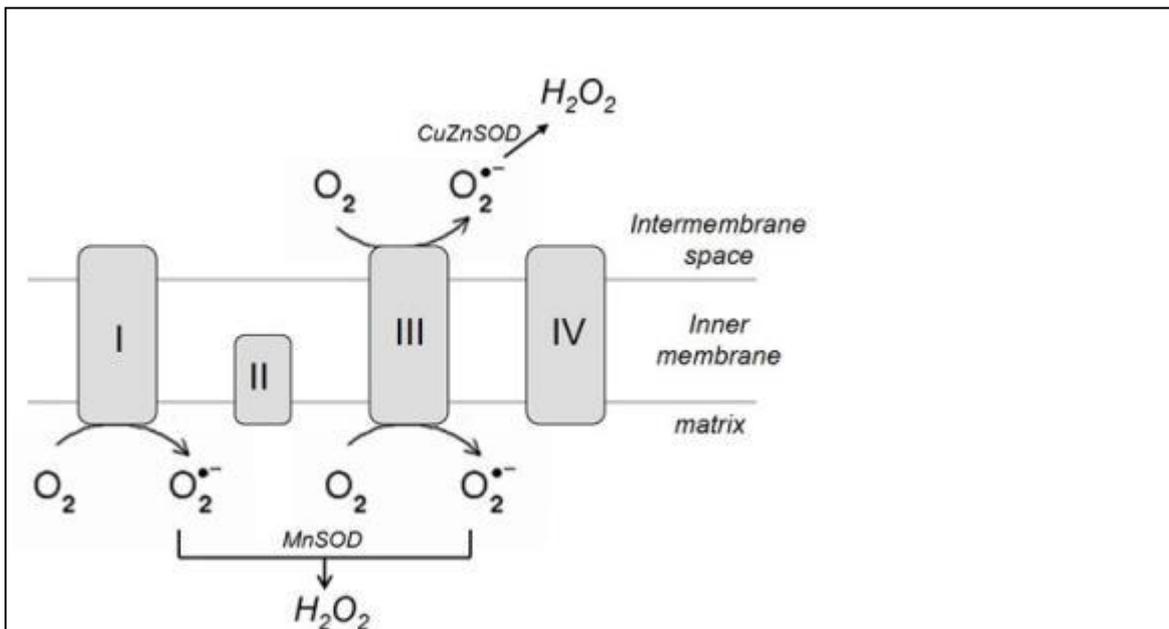


Figura 9 della tesi: Principali specie reattive dell’ossigeno prodotte nella cellula

I ROS sono prodotti da tutte le cellule degli organismi aerobi e regolano diversi processi fisiologici come la risposta agli stimoli mitogenici, la regolazione del ciclo cellulare (Paletta-Silva et al., 2013), ma anche il controllo dell’espressione genica, dell’apoptosi e della senescenza cellulare (Valko et al., 2006). Inoltre i ROS prodotti da cellule immunitarie quali i macrofagi e i neutrofili contribuiscono all’attivazione della risposta immunitaria nei confronti di agenti patogeni. Infine vie di segnalazione che prevedono il

coinvolgimento della chinasi JNK, delle MAPK e dei fattori di trascrizione AP-1 ed NF- κ B sono particolarmente sensibili ai ROS (Gutowski et al., 2013).

I ROS sono un prodotto del normale metabolismo cellulare e possono essere prodotti tramite diverse reazioni enzimatiche (Sies et al., 1997). La principale sede della produzione dei ROS è la catena respiratoria mitocondriale, la quale è costituita da quattro complessi redox disposti secondo potenziali di riduzione standard crescenti. Questi complessi contengono componenti quali flavoproteine, centri ferro-zolfo e ubisemiquinoni, queste componenti consentono il trasporto di elettroni da un complesso all'altro, fino a raggiungere l'accettore finale rappresentato dall'ossigeno molecolare, che viene ridotto ad acqua (Osellame et al., 2012) (Fig. 10). Singoli elettroni possono sfuggire alla catena respiratoria, determinando la riduzione monoelettronica dell'ossigeno, generando $O_2^{\cdot-}$. È ben noto che il complesso maggiormente coinvolto nella generazione dell'anione superossido è il complesso I, ma questa molecola radicalica può essere generata anche a livello dei complessi II e III. In particolare si ipotizza che la produzione di questa specie reattiva dipenda dall'auto-ossidazione dei centri ferro-zolfo e del semiquinone (Sun et al., 2003). In condizioni fisiologiche, a livello della catena respiratoria solo il 2% dell'ossigeno viene convertito in anione superossido, se avvengono alterazioni del trasporto elettronico mitocondriale questa percentuale può incrementare notevolmente. Altre fonti mitocondriali di superossido sono alcuni enzimi mitocondriali quali la citocromo b5 reduttasi, la monoammina ossidasi, la diidrotato deidrogenasi, la deidrogenasi dell' α -glicerofosfato, la succinato deidrogenasi, l'aconitasi e il complesso dell' α -chetoglutarato deidrogenasi (Andreyev et al., 2005; Turrens et al., 2003).



(<http://www.pharmainfo.net/pratibhanusha-chstanns/blog/reactive-oxygen-species-ros-%E2%80%93-very-hungry-little-enemies-our-body>).

Figura 10 della tesi: Produzione dei ROS da parte della catena respiratoria. La catena respiratoria è composta da quattro complessi redox deputati al trasporto di elettroni, i quali raggiungono l'accettore finale, rappresentato dall' O_2 , il quale viene ridotto ad H_2O . Singoli elettroni possono sfuggire alla catena respiratoria ed interagire direttamente con l' O_2 , formando $O_2^{\bullet-}$.

L'anione superossido può essere prodotto anche in sedi diverse dal mitocondrio, quali il reticolo endoplasmatico, la membrana cellulare e i perossisomi (Nordgren et al., 2013). In questi compartimenti cellulari, l' $O_2^{\bullet-}$ può essere prodotto direttamente nel corso di reazioni enzimatiche specifiche catalizzate da enzimi (Nordgren et al., 2013) come la NADPH ossidasi (NOX), che possiede diverse localizzazioni cellulari (Paletta-Silva et al., 2013), la xantina ossidasi, localizzata nei perossisomi (Kuppusami et al., 1989), la proteina Ero1 e membri della famiglia del citocromo p450, che si trovano nel Reticolo Endoplasmatico (ER) (Puntarulo et al., 1998), etc. Il principale enzima responsabile della sintesi dell'anione superossido è la NADPH ossidasi. La famiglia NOX comprende sei diverse isoforme enzimatiche: NOX 1-5 e DUOX 1 e 2 (dual oxidases). Le NOX sono state identificate nei fagociti, ma successivamente si è scoperto che sono espresse in tutti i tipi cellulari. Questi enzimi presentano sei domini transmembrana, due gruppi eme, un dominio flavinico e un dominio legante il NADPH. La NOX possiede diverse subunità proteiche, nella NOX 2 (la prima isoforma scoperta), troviamo due subunità di membrana: gp91phox (phox sta per phagocyte oxidase) e p22phox, tre subunità citosoliche: p40phox, p47phox e p67phox, ed infine una piccola proteina G:

Rac-2. Gp91phox è la subunità catalitica, detta anche NOX-2. In presenza di opportuni stimoli p47phox viene fosforilata ed è in grado di traslocare sulla membrana, dove si associa a p22phox. p67phox è associata con una regione ricca in prolina di p47, ma anche con la proteina Rac, mediante domini ricchi in tetratricopeptide. Anche p67 contiene residui di serina e treonina che possono essere fosforilati. La subunità p40 è associata con la p47 e presenta domini fosforilabili, ma la sua presenza non è necessaria per l'attività dell'enzima. Quando le componenti citosoliche vengono fosforilate, si associano con le componenti di membrana, determinando l'attivazione della NOX. Le NOX 1 e 3 presentano subunità analoghe alla 2, quali p22phox, NOXA1 o NOX activator 1 (omologo di p67), NOXO1 o NOX organizer 1 (omologo di p47) e Rac1. La NOX 4 invece richiede solo la subunità p22phox per esercitare la propria attività enzimatica. Di recente è stata anche scoperta l'esistenza della proteina Poldip2 (polymerase delta-interacting protein), la quale incrementa l'attività di questa isoforma della NOX. La NOX 5, localizzata nel reticolo endoplasmatico, è una particolare NOX sensibile al calcio, infatti possiede un dominio legante questo ione nella regione N-terminale. Anche le DUOX 1 e 2 presentano due domini leganti il calcio, il nome di questi enzimi deriva dal fatto che oltre al dominio NOX-like, presentano anche un dominio perossidasi-like, ma non è stato mai chiaramente dimostrato se possiedono un'attività perossidasi-like. La NADPH ossidasi produce l'anione superossido trasferendo un elettrone dal NADPH all'ossigeno, questa reazione è mediata dal FAD e dai due gruppi eme dell'enzima. È oggetto di discussione la possibilità che la NOX 4 e le DUOX possano produrre direttamente H₂O₂ invece di anione superossido (Paletta-Silva et al., 2013) (Fig. 11).

(Bedard and Krause; Pysiol Rev; 2011)

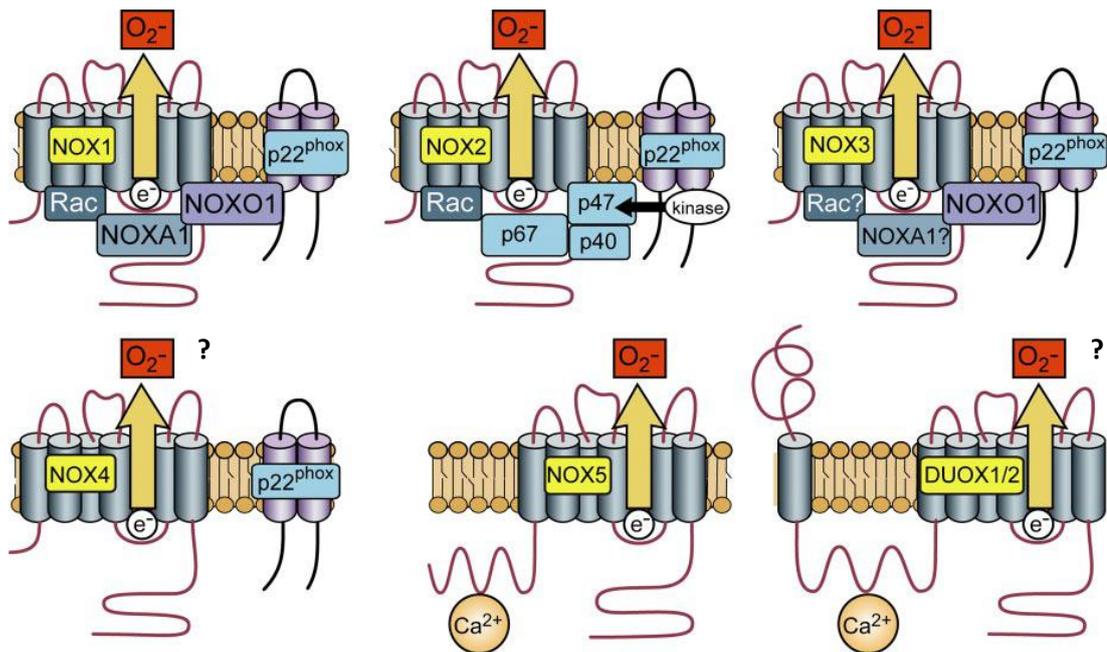


Figura 11 della tesi: Struttura e regolazione delle diverse isoforme della NADPH ossidasi. Tutte le NOX sono proteine di membrana deputate alla produzione di O_2^- , è oggetto di discussione se la NOX 4 e le DUOX possono generare direttamente H_2O_2 . Le NOX 1, 2, 3 e 4 possiedono la subunità $p22^{phox}$, ma soltanto le NOX 1 e 2 sono regolate dalla piccola GTPasi RAC. Le NOX 1 e 3 richiedono per la loro attivazione l'intervento delle subunità NOXA 1 e NOXO 1. Invece l'attivazione della NOX 2 necessita della presenza delle subunità p47 e p67, la subunità p40 può ulteriormente supportare l'attività dell'enzima. L'attivazione della NOX 5 e delle DUOX è dipendente dal calcio (Paletta-Silva, 2013).

L'anione superossido è la principale specie reattiva dell'ossigeno prodotta nella cellula, questa molecola ha un'emivita molto breve a causa della sua elevata reattività, pertanto deve essere prodotta in prossimità del suo bersaglio (Paletta-Silva et al., 2013). L'anione superossido può reagire con l'ossido nitrico, formando il perossinitrito, un forte agente ossidante e nitrosilante (Paletta-Silva et al., 2013). Inoltre, secondo la reazione di Haber-Weiss l' O_2^- può interagire con l' H_2O_2 , generando $HO\cdot$, il più reattivo degli intermedi dell'ossigeno. Tuttavia è stato dimostrato che alle basse concentrazioni di O_2^- e di H_2O_2 presenti nella cellula, questa reazione si verifica difficilmente (Koppenol et al., 2001). In presenza di Fe^{+2} o di Cu^{2+} comunque l' $OH\cdot$ può essere generato dall' H_2O_2 mediante la reazione di Fenton (Singh et al., 2013) (Fig. 12).

Reazione di Fenton

(Savelli et al.; Medico e Bambino; 2011)



Reazione di Haber-Weiss

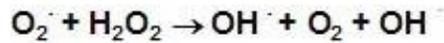


Figura 12 della tesi: Reazione di Fenton e reazione di Haber-Weiss. L'OH[·] si può generare a partire dalla reazione tra O₂^{·-} e H₂O₂ mediante la reazione di Haber-Weiss, oppure in presenza di ioni Fe²⁺, può essere generato a partire dall'H₂O₂, mediante la reazione di Fenton (Kalyanaraman et al., 2013).

I ROS prodotti nella cellula vengono rimossi da sistemi antiossidanti enzimatici (SOD, catalasi, glutatione perossidasi) e non enzimatici (vitamine C ed E, GSH, etc), che assicurano il mantenimento di concentrazioni non tossiche di queste molecole; quando aumenta la produzione dei ROS e/o si ha un malfunzionamento dei sistemi antiossidanti o di attività enzimatiche deputate alla loro rimozione si instaura una condizione di stress ossidativo (Paletta-Silva et al., 2013; Gutowski et al., 2013) (Fig. 13).

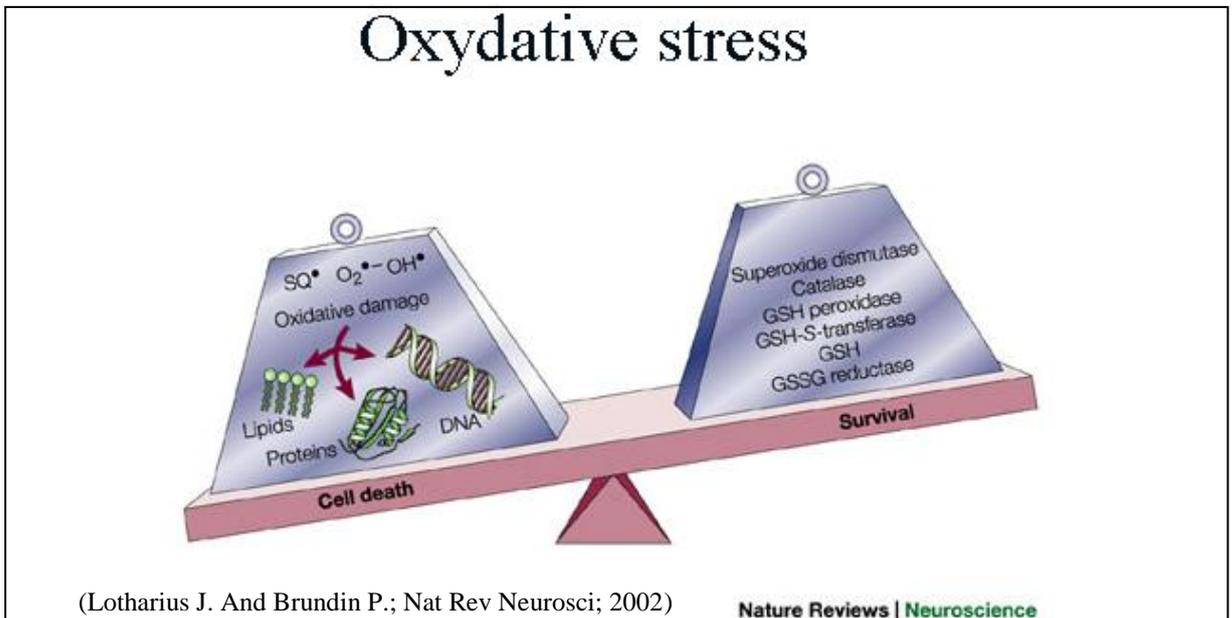
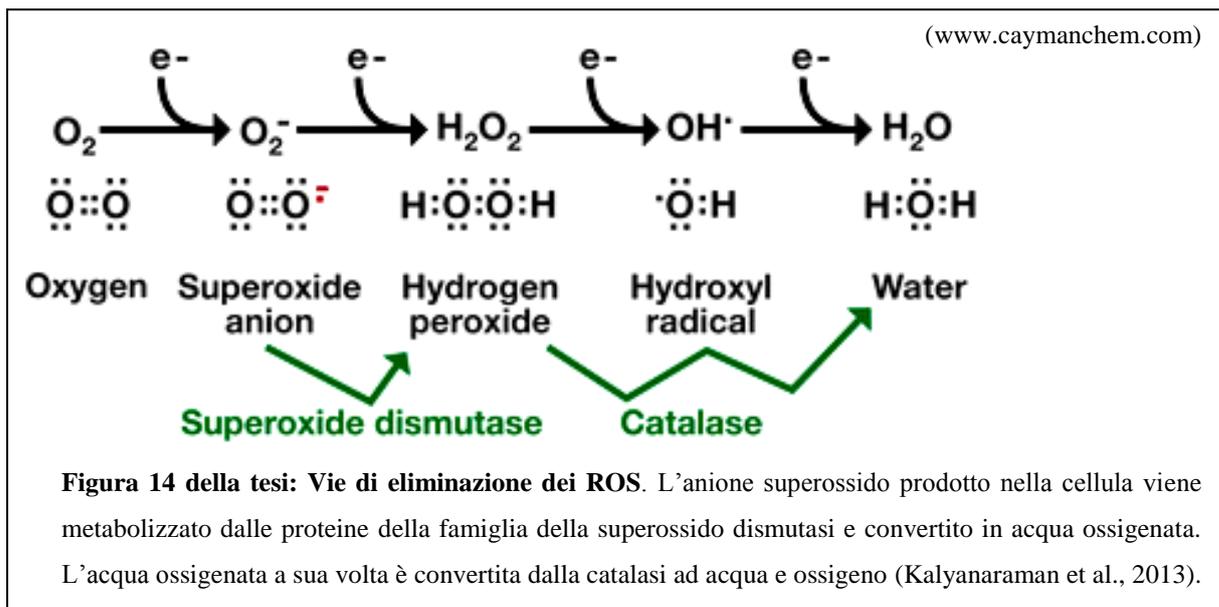


Figura 13 della tesi: Lo stress ossidativo risulta dallo squilibrio tra la produzione dei ROS e i livelli dei sistemi antiossidanti. Normalmente le cellule sono in grado di mantenere un equilibrio tra produzione e rimozione dei ROS. Quando l'equilibrio si sposta verso la produzione dei ROS o si riducono i livelli dei sistemi antiossidanti si instaura una condizione di stress ossidativo, che risulta tossica per la cellula (Scandalios J.G., 2005).

L'anione superossido prodotto tramite le reazioni precedentemente descritte non è in grado di attraversare le membrane cellulari, a causa della propria carica negativa, ma può essere dismutato in perossido d'idrogeno (capace di attraversarle) spontaneamente o enzimaticamente, mediante l'intervento della superossido dismutasi (SOD). La SOD è un'ossido-reduttasi, che contiene uno ione metallo: rame, ferro o manganese e rappresenta uno dei più importanti sistemi scavenger. La Cu,ZnSOD si trova nel citoplasma e nello spazio intermembrana del mitocondrio, la MnSOD, ha invece localizzazione prevalentemente mitocondriale. La SOD effettua una reazione di dismutazione che consiste nel trasferimento di un elettrone da un anione superossido ad un altro. La molecola a cui è stato sottratto l'elettrone diverrà ossigeno, l'altra legherà due ioni H^+ , trasformandosi in acqua ossigenata (Kalyanaraman et al., 2013). L'acqua ossigenata è più stabile del perossido d'idrogeno ed è in grado di attraversare le membrane, i suoi livelli vengono regolati dalla catalasi e dalla glutatione perossidasi. La catalasi è un'ossidoreduttasi contenente quattro gruppi ferrosi, che converte il perossido d'idrogeno in acqua e ossigeno. Anche la glutatione perossidasi è un'ossidoreduttasi, la quale ossida due molecole di glutatione per convertire il perossido d'idrogeno in acqua. Esistono anche sistemi antiossidanti non enzimatici, costituiti da molecole a basso peso molecolare quali l'ascorbato, la vitamina E, il glutatione ridotto (GSH), i carotenoidi e la metallotioneina (MT) (Kalyanaraman et al., 2013).

Il GSH è un tripeptide, costituito dagli amminoacidi cisteina e glicina legati mediante un normale legame peptidico, e acido glutammico che è legato alla cisteina tramite un legame atipico (legame γ -peptidico). Il GSH agisce mediante il gruppo tiolico della cisteina, che dona equivalenti riducenti a molecole instabili quali i ROS, si origina così una forma altamente reattiva che reagisce però rapidamente con un'altra molecola di glutatione ossidato formando il glutatione disolfuro (GSSG). Il glutatione ossidato può essere nuovamente ridotto dalla glutatione reduttasi, la quale impiega come donatore di elettroni il NADPH. Elevati livelli di glutatione nelle cellule tumorali sono correlati ad eventi di resistenza alle terapie. La più nota molecola in grado di ridurre i livelli del GSH è la butionina sulfossimina (BSO), che viene frequentemente associata ai chemioterapici tradizionali. Un limite nel suo impiego è rappresentato dalla sua breve emivita, e la sua scarsa selettività per le cellule tumorali, per questo motivo sono in corso studi per individuare altri composti da impiegare in alternativa (Traverso et al., 2013).



Come già accennato i ROS sono un normale prodotto del metabolismo cellulare e possono svolgere sia ruoli benefici, sia ruoli tossici per la cellula. Gli effetti benefici, come la risposta fisiologica agli stimoli mitogenici, la difesa da agenti patogeni, la regolazione del ciclo cellulare si manifestano a basse concentrazioni (Paletta-Silva et al., 2013; Bartosz et al., 2009). Elevati livelli di ROS possono ossidare lipidi, proteine e DNA, alterando la loro funzione fisiologica. L'anione superossido, reagisce prevalentemente con ioni metallici, gruppi ferro-zolfo e residui cisteinici di proteine. Anche il perossido d'idrogeno reagisce con i gruppi tiolici di proteine (in maniera reversibile) determinando la regolazione della loro attività. Per esempio l'acqua ossigenata può regolare alcune chinasi sensibili allo stress ossidativo come la protein chinasi B, la protein chinasi C, le proteine attivate dai mitogeni (MAPK), e JNK, inoltre può avere effetti diretti su canali ionici e recettori (Paletta-Silvia et al., 2013). Il perossido d'idrogeno può reagire anche con ioni metallici, determinando la sintesi dei radicali idrossilici, i quali reagiscono rapidamente e indiscriminatamente con molecole biologiche di diverso tipo, come acidi nucleici, nucleotidi liberi, proteine, lipidi e carboidrati (Sthos et al., 1995).

L'ossidazione dei lipidi genera gli idrossidi lipidici, molecole molto instabili che vengono facilmente convertite in aldeidi altamente reattive quali 4-idrossi-2,3-nonenale e la malondialdeide (MDA) (Birben et al., 2012). La perossidazione lipidica ad opera dei ROS può determinare la perdita di acidi grassi polinsaturi, riducendo la fluidità delle

membrane e alterando la loro permeabilità, favorendo la lisi delle cellule. Inoltre i ROS possono alterare l'interazione tra lipidi di membrana e proteine, modificando l'attività di alcuni enzimi e il trasporto ionico (Kowaltowski et al., 1999; Sthos et al., 1995).

Infine i ROS possono interagire con il DNA sia a livello delle basi puriniche e pirimidiniche modificandole, sia con lo scheletro zucchero-fosfato determinando la scissione della doppia elica. L'ossidazione delle basi presenta un'azione mutagenica, ma di recente è stato osservato che alcune basi ossidate come l' 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) possono modificare l'espressione genica (Zarakowska et al., 2013).

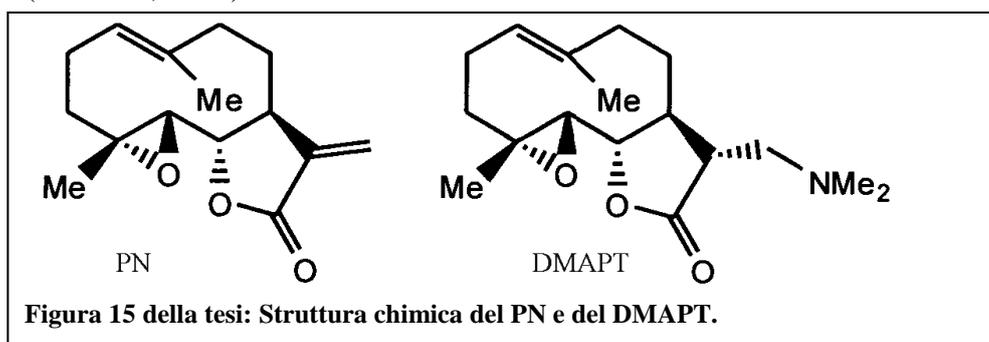
IL PARTENOLIDE

Il partenolide (PN) è un composto di origine naturale, che viene estratto dall'erba medicinale *Tanacetum parthenium*, nota anche come "feverfew". Questo composto appartiene alla famiglia dei sesquiterpeni lattoni, ed è un noto antinfiammatorio, impiegato da lungo tempo per alleviare sintomatologie dolorose, emicranie (Jhonson et al., 1985; Pareek et al., 2011), ma anche disturbi gastrici, irregolarità mestruali, febbre e artrite reumatoide (Pareek et al., 2011; Mathema et al., 2012).

L'azione antinfiammatoria del PN è stata correlata all'inibizione della fosfolipasi A2 (Makheja et al., 1982), a cui consegue la riduzione della produzione di prostaglandine a partire dall'acido arachidonico (Collier et al., 1980). Inoltre è stato dimostrato che il PN è in grado di inibire la 5-lipossigenasi (Sumner et al., 1992), le forme inducibili della ciclossigenasi (Hwang et al., 1996) e dell'ossido nitrico sintetasi, (Fukuda et al., 2000), contribuendo ulteriormente all'effetto antiflogistico. È stato osservato che il PN esplica la propria attività antinfiammatoria anche inibendo la secrezione dei mediatori pro-infiammatori indotti dal lipopolisaccaride: TNF- α e IL-6 (Sobota et al., 2000).

Studi moderni rivelano che il PN è dotato anche di attività antimicrobica (Tiuman et al., 2005) ed antivirale (Onozato et al., 2009). Inoltre numerosi esperimenti condotti in vitro ed in vivo evidenziano una spiccata azione antitumorale del PN nei confronti di carcinoma del seno, del polmone, della prostata e della leucemia mieloide acuta (Nakshatri et al., 2004; Zhang et al., 2009; Sun et al., 2007; Guzman et al., 2005). Questo composto è anche in grado di sensibilizzare diverse linee di cellule tumorali nei confronti dell'azione del ligando TRAIL (Carlisi et al., 2011; Suvannasankha et al., 2008; Nakshatri et al., 2004) e di terapie tradizionali quali la chemioterapia (Sohma et al., 2011), la radioterapia (Sun et al., 2010; Sun et al., 2007) e l'ipertermia (Hayashi et al., 2011). Un limite nell'impiego del PN in terapia è rappresentato dalla sua scarsa biodisponibilità, che ne riduce l'efficacia in vivo (Curry EA 3rd et al., 2004). Questo problema è stato superato mediante la sintesi di un analogo del PN: il dimetilammino-partenolide (DMAPT), il quale, quando convertito in sale di fumarato, presenta una solubilità in acqua 1.000 volte maggiore di quella del PN. È stato documentato che il DMAPT presenta una biodisponibilità del 70% dopo somministrazione per via orale e mostra scarsa tossicità in modelli animali (Guzman et al., 2007; Shanmugam et al., 2010). Attualmente sono in corso TRIAL clinici di fase I (Shanmugam et al., 2011).

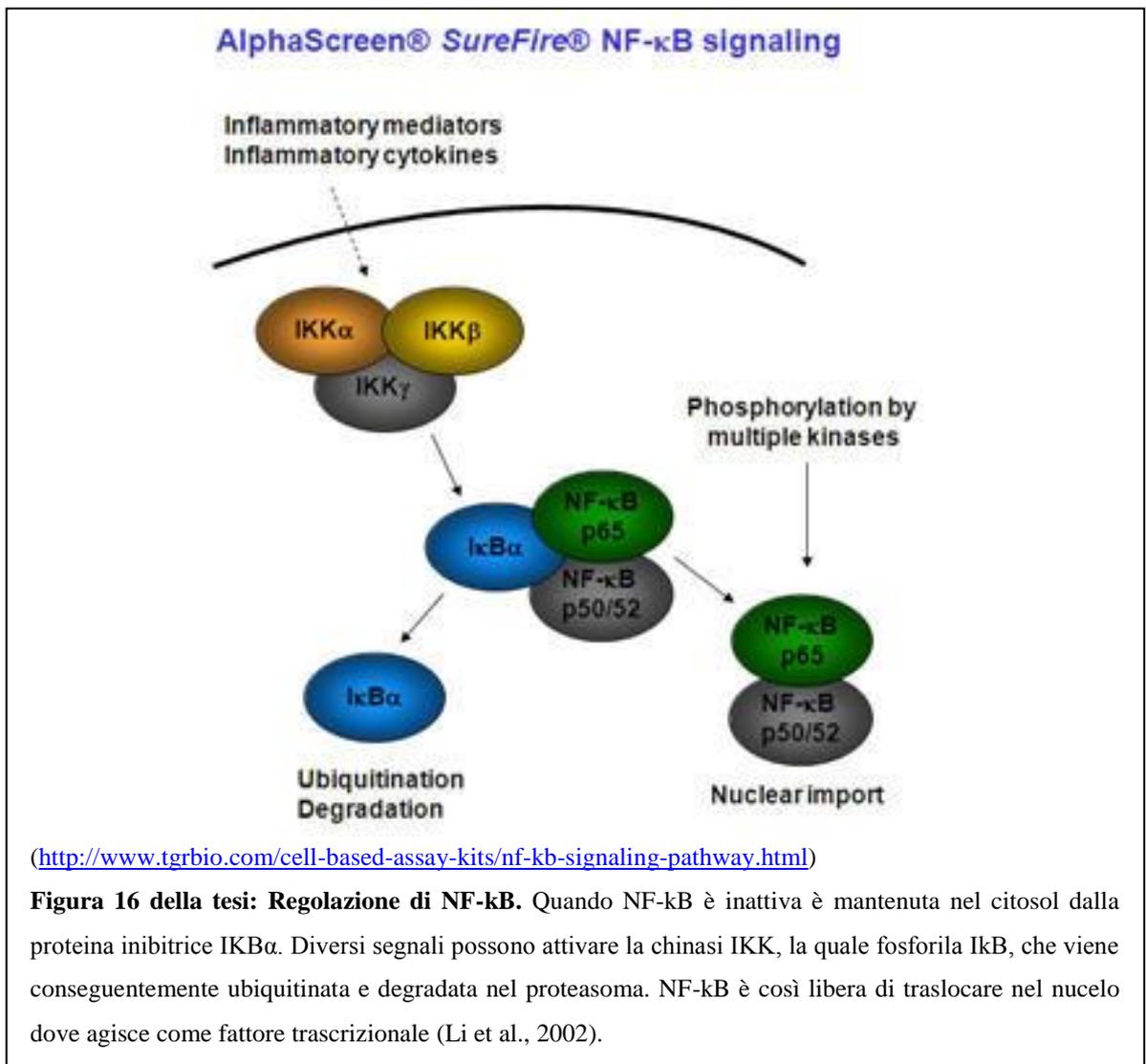
Diversi studi hanno evidenziato che il DMAPT possiede le stesse proprietà biologiche del PN (Shanmugam et al., 2010; Shanmugam et al., 2011). Le proprietà di questo composto sono state attribuite al suo gruppo α -metilene- γ -lattone ed al suo anello epossido (Fig. 15), i quali sono in grado di interagire rapidamente con gruppi nucleofili di molecole biologiche, quali i gruppi SH (Bork et al., 1997). Il gruppo α -metilene- γ -lattone e l'anello epossido del PN alchilano i gruppi nucleofili mediante una reazione di addizione di Michael, che consiste nell'addizione nucleofila di anioni enolato al carbonio β di composti carbonilici α - β insaturi, definiti accettori di Michael (Tokoroyama et al., 2010). Le interazioni tra il PN e i gruppi tiolici o il GSH portano alla riduzione di attività enzimatiche e interferiscono col metabolismo del GSH e l'equilibrio redox, essenziale per la sopravvivenza della cellula (Zhang et al., 2004 a). Infatti è noto che i gruppi tiolici svolgono un ruolo importante nel regolare lo stato redox della cellula, ma anche nel mediare le vie di trasduzione del segnale. Diverse proteine regolatrici, quali chinasi, fosfatasi e fattori di trascrizione presentano gruppi tiolici cisteinici nel sito attivo; l'ossidazione e la riduzione di questi tioli regola l'attività di queste proteine (Winterbourn et al., 2008). Tramite la sua azione sui gruppi nucleofili il PN può determinare molteplici effetti, tra i meccanismi d'azione più studiati vi sono l'inibizione di fattori di trascrizione quali NF- κ B (Kwok et al., 2001; Garcia-Piñeres et al., 2001) e le proteine STATs (Carlisi et al., 2011), l'induzione di stress ossidativo (Wang et al., 2006) e l'attivazione della chinasi JNK (Nakshatri et al., 2004) (Fig. 19). Inoltre è stato recentemente dimostrato che il PN può ridurre i livelli della deacetilasi istonica 1 (HDAC1) (Gopal et al., 2007), può inibire l'attività della tubulina carbossipeptidasi (Fonrose et al., 2007) e promuovere l'ubiquitinazione e conseguente degradazione di MDM2 (Murine Double Minute 2) (Gopal et al., 2009), favorendo quindi l'attivazione di p53. Altri studi dimostrano che il PN promuove l'ipometilazione del DNA mediante l'inibizione e la riduzione dei livelli della DNA metiltransferasi 1 (Liu et al., 2009).



PRINCIPALI MECCANISMI D'AZIONE DEL PARTENOLIDE

Tra i più noti target del PN si annoverano i fattori di trascrizione della famiglia NF- κ B (Pareek et al., 2011; Mathema et al., 2012). Tali fattori possono esplicare diversi ruoli, quali modulare la risposta infiammatoria, la proliferazione, il differenziamento, la sopravvivenza e l'apoptosi (Baldwin et al., 2001). Tra le subunità che possono costituire questo fattore vi sono: c-Rel, Rel A o p65, Rel B, p50 e p52. L'eterodimero p65-p50 è la forma di NF- κ B maggiormente rappresentata nella cellula. Quando NF- κ B è inattivo, viene mantenuto nel citoplasma dalle proteine I κ Bs: I κ B α , β , γ , p105 e p100. Per consentire il rilascio di NF- κ B, I κ B deve essere fosforilata dalla chinasi IKK. Il complesso chinasi IKK è un eterodimero costituito da due subunità catalitiche, IKK α e IKK β e la subunità regolatrice IKK γ (Li et al., 2002). Questo complesso è implicato nella fosforilazione delle proteine I κ Bs a livello di specifici residui di serina (posti nella regione N-terminale), tale evento consente quindi la poliubiquitinazione di queste proteine e la loro conseguente degradazione dipendente dal proteasoma. Come conseguenza NF- κ B, può traslocare nel nucleo, attivando la trascrizione di specifici geni (Fig. 16). Il PN è in grado di inibire NF- κ B in modo indiretto tramite l'inibizione del complesso IKK (Hehner et al., 1998). Secondo alcuni studi il PN interagisce direttamente con IKK β , legando la cisteina 179 presente nel sito di attivazione, questa attività è attribuita alla porzione α -metilene- γ -lattone del PN (Kwok et al., 2001). Mediante tale inibizione il PN previene quindi la proteolisi di I κ B α e β da parte del proteasoma 26S, mantenendo NF- κ B nel citoplasma (Hehner et al., 1998). È stato inoltre ipotizzato che un altro target del PN possa essere rappresentato anche dalla subunità regolatrice IKK γ (Hehner et al., 1999). Altri studi evidenziano invece un meccanismo di inibizione diretta di NF- κ B da parte del PN. Tali studi hanno dimostrato un'interazione del PN con una cisteina presente nel sito di attivazione della subunità p65 (Kwok et al., 2001). Com'è noto il fattore NF- κ B è implicato nei meccanismi di sopravvivenza cellulare (Li et al., 2002), pertanto la sua inibizione rende le cellule suscettibili nei confronti dell'apoptosi o le sensibilizza all'azione di farmaci antitumorali (Nakshatri et al., 2004; Patel et al., 2000). Tra i target trascrizionali di NF- κ B vi sono alcuni fattori anti-apoptotici, come Bcl-x_L e survivina. Bcl-x_L è un importante fattore di sopravvivenza appartenente alla famiglia Bcl-2; la survivina è una proteina appartenente alla famiglia delle IAPs (Inhibitors of Apoptosis), che svolge un

ruolo fondamentale nell'inibire la morte cellulare programmata. L'overespressione di queste proteine è correlata alla resistenza delle cellule tumorali nei confronti di agenti citotossici (Naugler et al., 2008). Quindi il PN, inibendo NF- κ B, determina una riduzione dei livelli di queste proteine, favorendo così l'apoptosi. Tra i target trascrizionali di NF- κ B vi è anche la proteina antiapoptotica c-FLIP (FLICE-inhibitory protein), che inibisce la pro-caspasi 8, una caspasi iniziatrice, impedendone l'attivazione. È stato osservato che il PN determina una riduzione di entrambe le isoforme di c-FLIP (short e long) (Kwok et al., 2001) (Fig. 17).



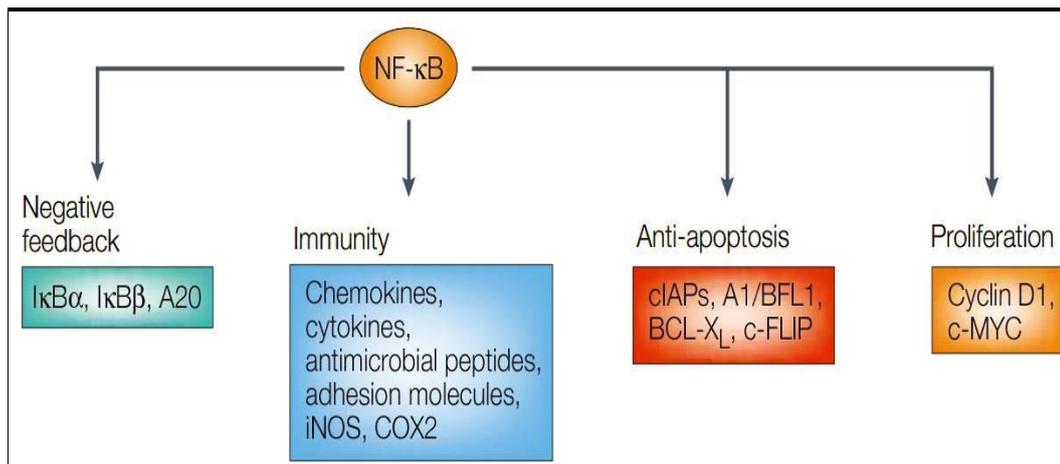
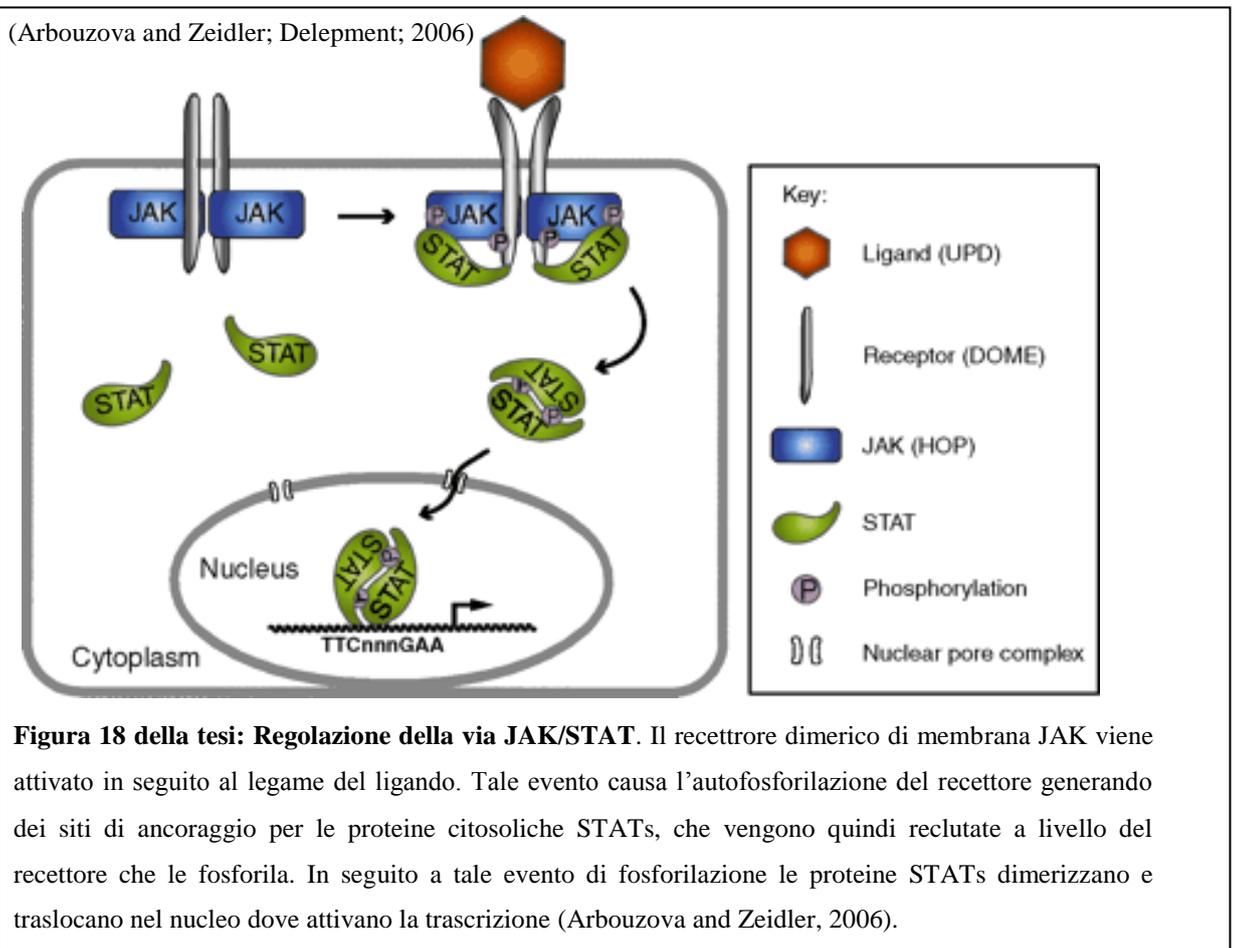


Figura 17 della tesi: Principali target trascrizionali di NF-κB.

Un altro meccanismo tramite il quale il PN esercita la sua azione antinfiammatoria ed antitumorale è l'inibizione delle proteine STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription). In numerose forme tumorali, quali leucemia, mieloma multiplo (Ferrajoli et al., 2006), carcinoma della mammella (Sheen-Chen et al., 2007), carcinoma della prostata (Bromberg et al., 2002), tumore del colon retto (Ma et al., 2004) e carcinoma epatocellulare (Carlisi et al., 2011) le proteine STATs, e soprattutto l'isoforma STAT-3, sono costitutivamente attive, a causa della persistente fosforilazione delle loro tirosine. Ciò può essere dovuto a diversi meccanismi: la deregolazione dell'attività delle chinasi che fosforilano questi fattori di trascrizione (JAKs, TYK), o l'inibizione dei regolatori negativi delle STATs: fosfatasi, soppressori del segnale delle citochine (SOCS), PIAS (Protein Inhibitors of Activated STATs) (Ma et al., 2004). È stato ipotizzato che il PN possa inibire JAK, coniugandosi con i suoi gruppi SH (Sobota et al., 2000), l'inibizione di questa chinasi impedisce la fosforilazione di STAT-3 a livello della tirosina 705, prevenendo la dimerizzazione di questo fattore, la sua traslocazione nel nucleo e l'attivazione della trascrizione dei suoi geni target (Fig. 18). In particolare STAT-3 regola la trascrizione dei geni coinvolti nella proliferazione cellulare (c-Myc, Ciclina D1, D2, Ciclina E, p21-waf1), geni codificanti per proteine anti-apoptotiche (Mcl-1, XIAP, Bcl-X_L, survivina, Bcl-2), e fattori che promuovono l'angiogenesi (VEGF). Studi condotti in precedenza presso il laboratorio dove ho svolto il mio progetto, hanno dimostrato chiaramente che il PN è in grado di determinare un notevole decremento delle forme fosforilate di STAT-3 e STAT-1 in cellule di epatocarcinoma umano HepG2, Hep3B ed SK-Hep1. Il decremento di STAT-

3 favorirebbe un incremento dell'espressione dei recettori di morte per TRAIL DR4 e DR5 e quindi una sensibilizzazione delle cellule nei confronti dell'azione del ligando TRAIL (Carlisi et al., 2011).



Un altro noto target del PN è rappresentato dalla c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Nakshatri et al., 2004; Mathema et al., 2012; Pareek et al., 2011). Questa chinasi, attivata in risposta allo stress cellulare, è implicata nell'innescare sia dell'evento apoptotico (Dhanasekaran et al., 2008; Varfolomeev et al., 2004), sia dell'evento necrotico (Shen et al.; 2006; Ventura et al.; 2004). L'attivazione di JNK da parte del PN può essere diretta, per interazione molecolare con il PN, oppure può dipendere dall'inibizione di NF-κB (Zhang et al., 2004 b) o dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Shanmugam et al.; 2010). È ben noto infatti, che il PN determina in molte linee cellulari un notevole incremento dei ROS, con conseguente induzione di stress ossidativo e morte cellulare. Questo evento si esplica sia mediante l'attivazione di sistemi deputati alla produzione dei ROS, sia mediante la deplezione dei sistemi antiossidanti.

Infatti il PN è in grado di interagire con la tioredoxina, la glutammato cisteina-ligasi, la glutatione perossidasi e il glutatione, riducendo i loro livelli. Questo evento dipenderebbe da un'interazione diretta del gruppo esometilene e dell'anello epossido del PN, con i gruppi SH (Pei et al., 2012).

Altri dati in letteratura hanno invece documentato che l' incremento dei ROS indotto dal PN è mediato in diverse linee di cellule tumorali, quali cellule di carcinoma prostatico (Sun et al., 2010) e mieloma multiplo (Wang et al., 2006), dall'attivazione dell'enzima NADPH ossidasi.

Nelle cellule di carcinoma prostatico è stato dimostrato anche che il PN può determinare la fosforilazione del fattore di trascrizione FOXO3a con conseguente caduta dei livelli di alcuni suoi target, ed in particolare di proteine antiossidanti quali la catalasi e la MnSOD (Sun et al., 2010).

Infine nella produzione dei ROS indotta dal PN può avere un ruolo di rilievo anche il mitocondrio. È stato evidenziato infatti che il PN determina effetti a livello mitocondriale, che si accompagnano spesso a dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ed al rilascio nel citoplasma di proteine pro-apoptotiche, come il citocromo c e Smac/DIABLO (Zhang et al., 2004 c). Inoltre studi condotti in precedenza presso il laboratorio dove ho svolto questa tesi hanno dimostrato che in cellule di osteosarcoma e melanoma umano il PN può determinare produzione di ROS a livello mitocondriale, evento che viene contrastato da inibitori della catena respiratoria (D'Anneo et al., 2013).

Tramite i meccanismi precedentemente descritti il PN può determinare morte delle cellule tumorali, sia mediante eventi caspasi dipendenti quali l'apoptosi, sia caspasi indipendenti quali la necrosi (Pozawroski et al., 2003; D'Anneo et al., 2013).

Il PN è in grado di attivare sia la via estrinseca, sia la via intrinseca dell'apoptosi (Suvannasankha et al., 2008). Per esempio, in seguito all'inibizione del fattore di trascrizione NF- κ B, il PN può determinare una caduta dei livelli della proteina c-FLIP, noto inibitore della caspasi 8, favorendo l'attivazione della via estrinseca (Suvannasankha et al., 2008). Inoltre, come precedentemente descritto, presso il laboratorio di Biochimica del dipartimento BioNeC (ora STEBICEF), dove ho svolto la mia tesi, è stato dimostrato che il PN può incrementare i livelli dei recettori di morte DR4 e DR5, tramite l'inibizione del fattore di trascrizione STAT-3 (Carlisi et al., 2011). Il PN può anche attivare la via intrinseca tramite la produzione dei ROS (Wen et al.,

2002), l'inibizione di NF-kB (Zhang et al., 2009) e delle proteine STATs (Mathema et al., 2012). L'inibizione di questi fattori di trascrizione determina una riduzione dei livelli di proteine anti-apoptotiche quali Bcl-x_L e Bcl-2, spostando l'equilibrio tra fattori anti-apoptotici e pro-apoptotici della famiglia Bcl-2 a favore dei membri pro-apoptotici. Queste proteine formano dei pori nella membrana mitocondriale, determinando la liberazione nel citoplasma di fattori pro-apoptotici, come il citocromo c. La liberazione del citocromo c consente la formazione dell'apoptosoma, e quindi l'attivazione della caspasi 9, con conseguente innesco dell'apoptosi (Suvannasankha et al., 2008).

Inoltre il PN induce il taglio proteolitico delle proteine Bid e XIAP (Suvannasankha et al., 2008). La proteina pro-apoptotica Bid tronca favorisce la formazione di pori nella membrana mitocondriale. La proteina XIAP invece è un inibitore delle caspasi, che in seguito al taglio proteolitico viene inattivato, consentendo l'attivazione di queste proteasi. È stato riportato pertanto, che in alcuni sistemi tumorali l'effetto del PN è caspasi-dipendente, in particolare il PN è in grado di incrementare l'attività delle caspasi 8, 3 e, in misura minore della 9 (Suvannasankha et al., 2008).

In alcune linee cellulari il PN può determinare invece eventi di tipo necrotico, studi condotti presso il laboratorio dove ho sviluppato la mia tesi hanno evidenziato che in cellule di osteosarcoma e melanoma umano il PN determina un evento di morte caspasi-indipendente, nel quale un ruolo chiave viene svolto dallo stress ossidativo e dalla proteina AIF (D'Anneo et al., 2013). Inoltre alcuni studi dimostrano che il PN è in grado di indurre sia l'apoptosi, sia la necrosi nelle cellule Jurkat (linfociti T immortalizzati) e in cellule leucemiche (Pozawroski et al., 2003). Infatti, in seguito al trattamento, una parte delle cellule va incontro ad un evento apoptotico classico, negli altri elementi cellulari si osserva invece una rapida perdita d'integrità della membrana, assenza di frammentazione del DNA e mancata attivazione delle caspasi (Pozawroski et al., 2003).

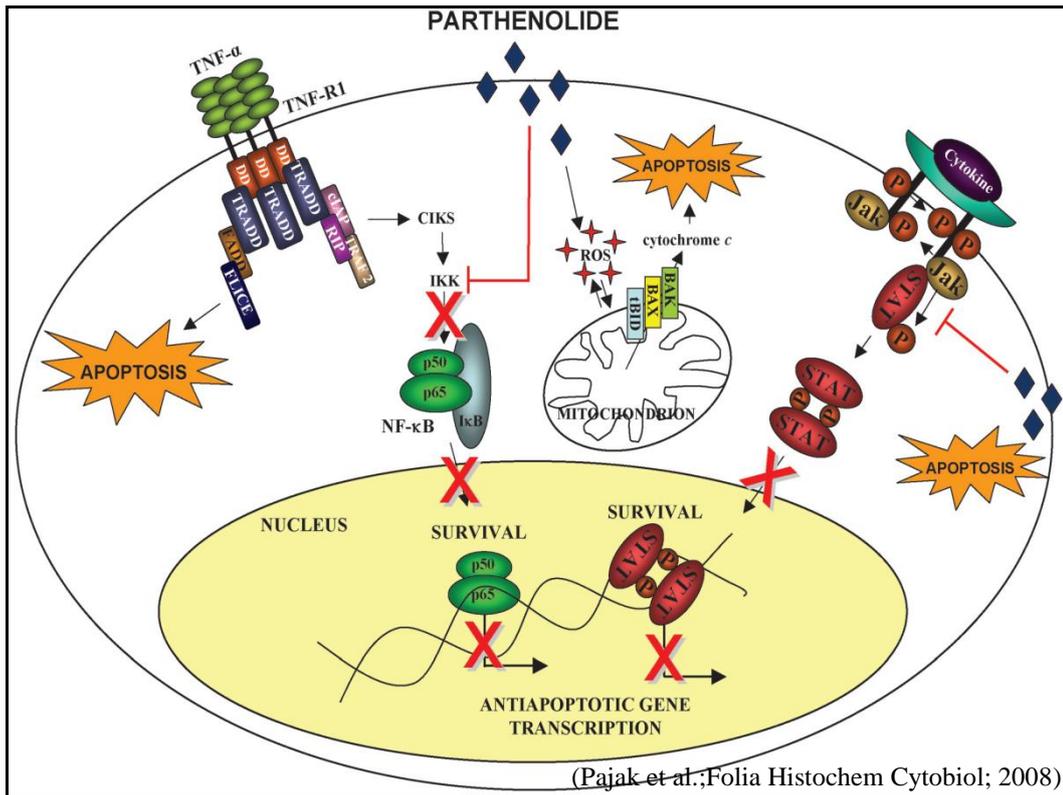


Figura 19 della tesi: Principali meccanismi d'azione del PN. Tra i meccanismi d'azione più studiati del PN si annoverano l'inibizione del fattore di trascrizione NF-κB e l'inibizione della via di JAK/STAT, che notoriamente hanno un ruolo antiapoptotico. Inoltre il PN induce produzione di ROS, con conseguente compromissione del mitocondrio (Ghantous et al., 2013).

IL CARCINOMA MAMMARIO

Il carcinoma mammario è una forma tumorale molto eterogenea, che comprende diverse forme che differiscono per le caratteristiche biologiche e cliniche. Per decenni la classificazione del carcinoma mammario invasivo è stata effettuata in riferimento al tipo istologico, grado ed espressione dei recettori ormonali. Più recentemente si è aggiunta la caratterizzazione dell'espressione del recettore HER 2, che ormai è divenuta parte integrante degli studi prognostici e predittivi. Sulla base delle analisi immunohistochimiche le diverse forme di carcinoma mammario si possono suddividere in tre gruppi principali: 1) quelle positive per i recettori ormonali, che vengono curate impiegando una terapia target per i recettori per gli estrogeni, che può essere associata o meno alla chemioterapia; 2) quelle positive per il recettore HER 2, che in aggiunta ricevono terapia diretta verso tale recettore (trastuzumab o in alcuni casi Lapatinib), e 3) quelle negative per tutti e tre i recettori (tripli negativi), per le quali l'unica terapia disponibile è rappresentata dalla chemioterapia. Negli ultimi anni è stata effettuata un'ulteriore classificazione delle forme di carcinoma mammario basata su studi di espressione genica, condotti mediante analisi di microarray. I primi studi genetici sono stati effettuati dal gruppo dell'Università di Stanford, ed hanno evidenziato che l'elevata eterogeneità osservata a livello morfologico si riflette in un'elevata eterogeneità a livello del trascrittoma. Come già accennato questi studi hanno portato ad una nuova classificazione in cinque gruppi: luminal A (ER+, PR+, HER2-), luminal B (ER+, PR+, HER2 +), normal breast-like, ERBB2 o HER2 (ER-, PR-, alti livelli di HER2) e basal-like o BLBC (ER-, PR-, HER2 -) (Reis-Filho et al., 2008; Chen et al., 2009). Il basal-like è caratterizzato da bassa espressione dei recettori per gli estrogeni, per il progesterone, ed HER2, ed alta espressione di citocheratine quali CK5 e CK14, caveolina-1, CAIX, p63, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR, HER2), molecole tipiche di un fenotipo ghiandolare basale/mioepiteliale (Anders et al., 2008).

IL CARCINOMA MAMMARIO TRIPLO NEGATIVO

Circa il 10-17% dei tumori mammari sono tripli negativi, cioè sono privi dei recettori per gli estrogeni, per il progesterone e HER 2. Numerosi dati presenti in letteratura mostrano diversi aspetti comuni tra il carcinoma mammario triplo negativo e il basal-

like, sebbene queste due forme non siano identiche. Infatti tra i carcinomi tripli negativi vi sono anche alcune forme rare quali forme metaplastiche e adenomatose-cistiche. Gli aspetti comuni tra le due forme comprendono l'insorgenza in giovane età (meno di 50 anni), la prevalenza in donne Afro-Americane e in quelle obese, e la maggiore aggressività rispetto agli altri sottogruppi molecolari. Questa elevata aggressività è caratterizzata da un' elevata frequenza di recidive tra il primo e il terzo anno dopo la terapia ed un' elevata mortalità nei primi cinque anni dopo la terapia. Inoltre le pazienti affette da queste due forme tumorali, rispetto alle pazienti degli altri sottogruppi, hanno una sopravvivenza ridotta dopo il primo evento metastatico. In queste donne sono frequenti le metastasi viscerali, incluse quelle cerebrali. Inoltre entrambi i sottotipi presentano prevalentemente un elevato grado istologico. La maggior parte dei carcinomi tripli negativi sono carcinomi duttali di alto grado, invasivi, ma possono essere rappresentati anche altri fenotipi quali il metaplastico, midollare tipico o atipico e cistico adenoide (Reis-Filho et al., 2008). Nonostante i numerosi aspetti comuni tra il carcinoma triplo negativo e il basal-like non bisogna commettere l'errore di pensare che le due forme tumorali coincidano. Infatti le analisi dei micro-array hanno messo in luce che anche il gruppo dei tumori tripli negativi è eterogeneo, infatti non comprende solo il sottogruppo basal-like, ma anche un altro sottogruppo chiamato normal breast-like, il quale non risponde alla terapia neoadiuvante, a differenza del basal-like. Alcuni studi hanno evidenziato inoltre che la maggior parte delle forme tumorali caratterizzate da una mutazione di BRCA1 nella linea germinale, ed in particolare quelle diagnosticate al di sotto dei 50 anni di età, presenta fenotipo basal-like e triplo negativo. Esistono anche delle forme sporadiche nelle quali BRCA1 è silenziato a causa di modifiche epigenetiche, queste forme non possiedono i recettori per estrogeni e progesterone e hanno fenotipo basal-like. Il carcinoma triplo negativo è una delle forme più difficili da trattare, infatti a causa della mancata espressione dei recettori ER, PR ed HER2, non risulta sensibile alle terapie ormonali o alle terapie dirette nei confronti di tali recettori. L'unica terapia attualmente disponibile è rappresentata dalla chemioterapia. Sebbene sia i tumori tripli negativi, sia i basal-like mostrano un'alta sensibilità alla terapia neoadiuvante con antracicline e taxani, presentano una prognosi peggiore rispetto agli altri sottogruppi molecolari, a causa dell'elevata frequenza di recidive nelle pazienti in cui il tumore non viene totalmente eradicato (Reis-Filho et al., 2008; Anders et al., 2008). Altre terapie tradizionalmente impiegate sono rappresentate da derivati del

platino ed agenti anti-tubulina come l'ixabepilone (Hudis et al., 2011). In particolare i derivati del platino, che agiscono formando addotti covalenti con il DNA e bloccando la replicazione, si sono rivelati particolarmente efficaci (Perez et al., 2010). Sono in corso studi per valutare l'efficacia di terapie dirette nei confronti dell'EGFR, infatti circa il 66% dei tumori basal-like e tripli negativi esprimono tale recettore. In più del 25% dei casi di carcinoma mammario metaplastico, il quale mostra un fenotipo basal-like e triplo negativo, è presente un'amplificazione genica dell'EGFR. Raramente sono presenti mutazioni attivanti il gene (Reis-Filho et al., 2008). Tra i farmaci in grado di agire su tale recettore vi sono molecole che ne inibiscono il dominio extracellulare (Cetuximab o Erbitux) ed altre che hanno come bersaglio il dominio tirosina-chinasi (Gefitinib o Iressa ed Erlotinib o Tarceva). Tali composti, associati alla radioterapia, sembrano mostrare potenziali effetti benefici nel contrastare il carcinoma triplo negativo (Rocha-Lima et al., 2007). Di particolare interesse si è rivelato anche l'impiego dei micro-RNAs (miRNAs), una classe di piccoli RNA non codificanti, che regolano l'espressione proteica a livello post-trascrizionale, interagendo con gli mRNA ed impedendone la traduzione o determinandone la degradazione. In particolare è stato dimostrato che il miRNA-7 determina un decremento dei livelli dell'EGFR nel carcinoma mammario e del polmone, determinando l'arresto del ciclo cellulare ed eventi di morte (Webster et al., 2009).

Altre terapie proposte di recente prevedono l'impiego di molecole che hanno come target la Poly-ADP-Riboso Polimerasi (PARP) e i recettori per gli androgeni (Hudis et al., 2011). Gli inibitori della PARP inducono tagli a livello del DNA con conseguente arresto della proliferazione, blocco del ciclo cellulare in fase G2/M e apoptosi. Tra questi l'Olaparib (AZD2281) e il BSI-201 sembrano possedere una certa efficacia sia quando impiegati da soli, sia in combinazione con composti neoadiuvanti quali il Cisplatino e il Carboplatino (Perez et al., 2010). Un'altra terapia neoadiuvante che viene frequentemente impiegata nei trials clinici è rappresentata da composti antiangiogenetici diretti contro il VEGF, come il Bevacizumab (Perez et al., 2010). Inoltre alcuni studi hanno dimostrato che gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi), quali la Tricostatina A sono in grado di riesprimere il recettore Er_{α} in linee cellulari triple negative, quali le cellule MDA-MB231 (Stearns et al., 2007). Studi condotti presso il laboratorio di Biochimica del dipartimento BioNeC (ora STEBICEF), hanno evidenziato che un altro inibitore delle deacetilasi: il SAHA, sensibilizza le cellule di

carcinoma mammario triple negative MDA-MB231 e le cellule ER⁺ MCF-7 all'azione del ligando TRAIL, mediante il decremento della proteina c-FLIP (Lauricella et al., 2012). Diversi trials clinici in corso prevedono l'impiego di macrolidi analoghi della Rapamicina come l'everolimus e il temsirolimus in combinazione con la chemioterapia. Questi composti hanno come target la proteina mTOR, una proteina target delle chinasi PI3K/PKB, la quale regola positivamente la progressione del ciclo cellulare, tale proteina risulta iperattiva in diverse forme di carcinoma mammario triplo negativo (Bosch et al., 2010).

MODELLO SPERIMENTALE UTILIZZATO

I risultati riportati in questa tesi sono stati condotti impiegando come modello sperimentale le cellule MDA-MB231, una linea di adenocarcinoma mammario umano altamente aggressiva, isolata da metastasi pleuriche. Le cellule MDA-MB231 rappresentano un modello di carcinoma mammario triplo negativo, in quanto sono caratterizzate dalla mancata espressione del recettore per gli estrogeni ER_α, del recettore per il progesterone e del recettore HER2 (Subik et al., 2010). Queste cellule sono inoltre caratterizzate da un' overespressione del recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) (Hirsch et al., 2006, Subik et al., 2010). Tale recettore è coinvolto nella proliferazione, nella sopravvivenza, nel differenziamento, nella migrazione e nell'invasività delle cellule. Hirsch et al. hanno dimostrato che l'elevato livello dell'EGFR in questa linea cellulare non è conseguenza di un meccanismo di amplificazione genica, ma è correlato ad una decrementata degradazione di questo recettore (Hirsch et al., 2006). Inoltre Zou et al. hanno dimostrato che il recettore Er_α interagisce con una sequenza di regolazione negativa localizzata nel primo introne del gene che codifica per l'EGFR, bloccando la trascrizione del mRNA di questa proteina. Quindi l'assenza del recettore per gli estrogeni, nelle cellule MDA-MB231, contribuirebbe ad aumentare il livello dell'EGFR (Zhou et al., 2009). Le MDA-MB231 sono caratterizzate anche da una mutazione in p53. Tale mutazione è localizzata in una delle regioni conservate di questa proteina, l'esone 8, codone 280 e determina la sostituzione di un residuo di arginina con una lisina (R280K). Questa mutazione altera la capacità della proteina p53 di interagire con le proteine Bcl-2 e Bcl-XL, e di legare il DNA (Houvinen et al., 2011). Vrba et al, hanno dimostrato che tale mutante riesce in

realità a legare il DNA, ma si lega in maniera aspecifica, in quanto è in grado di legare solo promotori associati ad istoni fortemente acetilati (Vrba et al.2008). Anche tale mutazione contribuisce ad incrementare il tasso di proliferazione e di sopravvivenza delle cellule MDA-MB231. Un'altra mutazione che è stata individuata in questa linea cellulare riguarda l'oncogene Ki-Ras, questa mutazione è caratterizzata da una transizione da guanosina ad adenosina a livello del codone 13, con conseguente sostituzione di una glicina con un acido aspartico (Gurtner et al., 2010, Kozma et al., 1987).

Inoltre in queste cellule è stata osservata un'overespressione di alcune subunità integriniche: $\beta 1$, $\beta 4$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αV , $\alpha 6$. I recettori integrinici sono responsabili di segnali di proliferazione che favoriscono la crescita e l'invasività, la loro overespressione quindi contribuisce alla particolare aggressività di questa linea tumorale (Morini et al., 2000; Lichtner et al., 1998; Gilcrease et al., 2004).

È stato osservato che questa linea cellulare forma prevalentemente metastasi ossee, ma occasionalmente può causare l'insorgenza di metastasi anche a livello cerebrale, ovarico e nelle ghiandole surrenali (Yoneda et al., 2001).

Come precedentemente accennato le forme di carcinoma mammario prive del recettore per gli estrogeni, oltre ad essere insensibili alla terapia ormonale, risultano particolarmente aggressive. Pertanto, oggi la ricerca scientifica ha come obiettivo l'individuazione di composti che risultino efficaci per il trattamento di queste forme tumorali altamente invasive.

	MDA-MB231
Invasività	Altamente invasiva
Origine e istologia	Carcinoma duttale, effusione pleurica
Sottotipo	Basal B mesenchimal stem-like
ER	-
PR	-
HER2	-
EGFR	↑
p53	R280K
T Attività STAT3	↑
E-caderina	-
KRAS	G13D
BRAF	G464V

Tabella 1: Caratteristiche molecolari delle cellule di carcinoma mammario triplo negativo MDA-MB231

OBIETTIVO

OBIETTIVI DELLA RICERCA CONDOTTA

Presso il laboratorio di Biochimica del dipartimento BioNeC (Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche) di Palermo (ora dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche, STEBICEF), dove ho sviluppato il progetto discusso in questa tesi, si studiano ormai da diversi anni i meccanismi di morte cellulare attivabili da composti in cellule tumorali umane in coltura. Negli ultimi anni l'attenzione è stata rivolta allo studio degli effetti di un composto antitumorale di origine naturale: il partenolide. Questo composto presenta una spiccata attività antineoplastica in diversi sistemi tumorali quali il carcinoma pancreatico, il carcinoma della vescica, il colangiocarcinoma e la leucemia mieloide acuta (Liu et al., 2010; Cheng et al., 2011; Kim et al., 2005; Guzman et al., 2005). Gli studi sinora condotti hanno dimostrato che il partenolide è in grado di indurre una chiara azione citotossica sulle cellule tumorali in coltura, mostrando invece un'efficacia modesta sulle cellule normali (Sun et al., 2010). Queste osservazioni sperimentali e l'azione mirata sui sistemi tumorali hanno indicato il PN come un farmaco antineoplastico molto promettente. Ulteriori studi sono comunque necessari per chiarire le modalità d'azione di questo composto e la sua selettività nei sistemi cancerosi. In rapporto a tali osservazioni le ricerche condotte in questa tesi si sono proposte di valutare gli effetti di questo composto in cellule di carcinoma mammario umano triplo negativo MDA-MB231. In particolare lo studio si è proposto di chiarire se il PN è in grado di esercitare su queste cellule un'azione citotossica, valutando la tipologia di morte cellulare, nonché il meccanismo biochimico della sua azione.

MATERIALI E METODI

COMPOSTI CHIMICI E REAGENTI IMPIEGATI PER I TRATTAMENTI CELLULARI

Il partenolide è stato ottenuto dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia) ed è stato solubilizzato in dimetil solfossido (DMSO), ottenendo la concentrazione 40 mM.

Il benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethylketone (z-VAD-fmk), un inibitore generale delle caspasi, è stato acquistato dalla Promega (Milano, Italia) ed è stato solubilizzato in DMSO alla concentrazione 10 mM. Per il trattamento delle cellule l'inibitore è stato diluito in terreno alla concentrazione 100 μ M. L'N-acetilcisteina (NAC), una molecola antiossidante, è stata solubilizzata in terreno di coltura ottenendo una soluzione 0,2 M. Il NAC è stato impiegato alla concentrazione finale 2 mM.

La 3-metil adenina (3-MA), un inibitore specifico della PI3K III, è stata preparata in terreno di coltura in presenza di etanolo al 10%, al fine di evitare la precipitazione del composto, realizzando una concentrazione finale pari a 50 mM. Il composto è stato successivamente diluito in terreno per trattare le cellule, realizzando una concentrazione 5mM.

La necrostatina, un inibitore della chinasi RIP-1, è stata solubilizzata in DMSO per ottenere una concentrazione 38 mM. La concentrazione impiegata per effettuare i trattamenti è la 50 μ M.

Il BAPTA-AM o [1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)], un chelante del calcio è stato impiegato ad una concentrazione 10 μ M, realizzata in terreno a partire da una madre 32,7 mM (preparata in DMSO).

L'apocinina, inibitore della NADPH ossidasi è stata solubilizzata in DMSO realizzando una concentrazione 1 M e successivamente diluita in terreno per ottenere una dose 100 μ M.

Il Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), un diaccoppiante della fosforilazione ossidativa, è stato solubilizzato in etanolo realizzando una soluzione 98,3 mM, per gli esperimenti tale soluzione è stata diluita in terreno al fine di ottenere una concentrazione 1 μ M.

Il rotenone, un composto che inibisce il complesso I della catena respiratoria mitocondriale, è stato diluito in DMSO, ottenendo una soluzione madre 1,26 mM che è stata successivamente diluita in terreno per realizzare una soluzione 1 μ M.

L'U0126, un inibitore delle chinasi ERK1/2 è stato solubilizzato in DMSO al fine di ottenere una soluzione madre 20 mM, per effettuare gli esperimenti è stata impiegata una dose 20 μ M, ottenuta diluendo la madre in terreno di coltura.

L'inibitore di JNK: SP600125 è stato solubilizzato in DMSO per preparare una soluzione 20 mM, che è stata poi diluita in terreno alla concentrazione 50 μ M per effettuare i trattamenti.

La wortmannina, un inibitore generale delle PI3K, è stata solubilizzata in DMSO, realizzando una concentrazione 4,64 mM ed è stata poi diluita in terreno per realizzare una dose 2 μ M.

Tutti i composti, eccetto lo z-VAD, sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich (Milano, Italia). La concentrazione finale di DMSO impiegata non ha superato mai lo 0,04% e non ha determinato effetti tossici sulle cellule.

Tutti i composti sono stati diluiti poi alla concentrazione finale nel terreno di coltura. Per ogni esperimento viene riportata una prova controllo, che si riferisce a cellule MDA-MB231 trattate con il solo veicolo con cui è stato solubilizzato il composto preso in esame.

COLTURE CELLULARI

Le cellule di carcinoma mammario MDA-MB231 sono state ottenute dall'”Istituto Scientifico Tumori” (Genova). Le cellule sono state coltivate in fiasche con superficie di 75 cm², sulle quali crescono in monostrato, adese al substrato in polistirene. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C, in atmosfera costituita per il 95% da aria e per il 5% da anidride carbonica. Come terreno di coltura è stato impiegato il Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) arricchito con il 10% di Siero Bovino Fetale (FBS) inattivato al calore (56° C per 30 minuti) e contenente lo 0,5% di antibiotico anti-micotico (penicillina-streptomina), glutammina 2mM e 1% di amminoacidi non essenziali (NEA). Per studiare gli effetti dei composti, le cellule sono state staccate con TRIPSINA-EDTA (2,5 mg/ml di tripsina; 1 mg/ml di EDTA) diluita in PBS (Phosphate buffered saline: NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4) alla concentrazione 0,25 X, e seminate su piastre da 6 o da 96 pozzetti. Le cellule sono state quindi lasciate aderire al substrato per 24 h in incubatore a 37°C e successivamente trattate con i composti per i tempi stabiliti.

VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE MEDIANTE SAGGIO MTT

La vitalità cellulare è stata studiata mediante saggio colorimetrico impiegando l'MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), un sale tetrazolico di colore giallo, che nelle cellule vitali viene ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali a Formazan, un composto di colore violetto. L'intensità della colorazione è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali e può essere misurata mediante uno spettrofotometro.

Per valutare la vitalità le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (8×10^3 cellule per pozzetto in 200 μ l di terreno di coltura). Dopo 24 h sono stati effettuati i trattamenti, al termine dell'incubazione con i composti, sono stati aggiunti 20 μ l di MTT (11 mg/ml di PBS) a ciascun pozzetto. Dopo 2 h di incubazione a 37°C, la piastra è stata centrifugata a 120 g per 5 minuti e sono stati allontanati 190 μ l di terreno. Successivamente sono stati aggiunti 100 μ l di buffer di lisi (20% sodio dodecil solfato in 50% N,N-dimetilformammide, pH 4,7). La piastra è stata posta ad agitare per 10 minuti a 37°C ed è stata eseguita una lettura spettrofotometrica mediante lettore ELISA per piastre da 96 pozzetti (Opsys MR; Dynex technologies, Chantilly, VA), valutando l'assorbanza a 540 nm e 630 nm (lunghezza d'onda di riferimento), come prova di riferimento è stato impiegato il solo buffer di lisi.

COLORAZIONE CON IODURO DI PROPIDIO (PI)

Lo ioduro di propidio è un colorante fluorescente che penetra esclusivamente nelle cellule che presentano un danno di membrana, come cellule necrotiche o cellule in apoptosi tardiva; viene invece escluso dalle cellule vitali. Quando penetra nella cellula, questo colorante lega il DNA emettendo fluorescenza rossa.

8×10^3 cellule sono state piastrate nei pozzetti di una piastra da 96. In seguito al trattamento è stato aggiunto il PI (2 μ g/ml di terreno) e le cellule sono state incubate per circa 15 minuti al buio. Infine si è proceduto all'osservazione delle cellule mediante microscopio a fluorescenza Leica DMR, dotato di telecamera DC300F (Wetzlar, Germany), utilizzando un filtro per la rodamina (eccitazione: 596 nm – emissione: 620 nm). Le immagini sono state visualizzate ed acquisite mediante il software Leica Q

Fluoro. Sono state contate le cellule presenti in cinque campi per condizione ed è stata valutata la percentuale di cellule rosse rispetto alle cellule totali.

SAGGIO DELL'ANNESSINA V/PI

Uno degli eventi precoci del processo apoptotico è l'esternalizzazione della fosfatidilserina (PS), un fosfolipide di membrana localizzato nel foglietto interno della membrana plasmatica. Per valutare l'esternalizzazione della PS si impiega l'annessina V coniugata con un fluorocromo (FITC o isotiocianato di fluoresceina), in quanto l'annessina lega con alta affinità la PS. Alla marcatura con annessina V viene associata la colorazione con ioduro di propidio, in questo modo si possono individuare 1) cellule vitali, negative per entrambi i marcatori, 2) cellule in apoptosi precoce, positive all'annessina V, ma non al PI, 3) cellule necrotiche, positive al PI, ma non all'annessina, 4) cellule in apoptosi tardiva o in necrosi, positive per entrambi i fluorocromi.

Per effettuare il saggio dell'annessina V/PI è stato impiegato il kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Le cellule (2×10^5 /pozzetto in 2 ml di terreno) sono state seminate in piastre da 6 pozzetti. Al termine del trattamento le cellule sono state prelevate con tripsina, centrifugate a 120 g per 8 minuti, risospese in PBS e contate. Le cellule (1×10^6 cellule/ml di buffer) sono state risospese in binding buffer 1X fornito dal kit (Hepes/NaOH 10 mM pH 7,4, NaCl₂ 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM). 100 µl (contenenti 10^5 cellule) sono stati trasferiti in un tubo e incubati con 3 µl di Annexina V e 5 µl di PI per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 400 µl di Binding Buffer 1 X a ciascun tubo ed i campioni sono stati analizzati mediante un citofluorimetro Beckman Coulter Epics FACscan XL (Brea, CA, USA). I risultati sono stati analizzati mediante il software Expo32. Come controllo negativo sono state impiegate cellule (10^5) incubate in presenza del solo Binding Buffer 1 X (500 µl).

ANALISI CITOFLUORIMETRICA DEL CICLO CELLULARE

L'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare consente, oltre alla evidenziazione delle diverse fasi del ciclo, di valutare la frammentazione del DNA. Questo acido nucleico viene marcato con il fluorocromo ioduro di propidio (PI), il quale si intercala nel DNA.

Questa molecola assorbe radiazioni luminose alla lunghezza d'onda di 488 nm ed emette a 575 nm. Per consentire allo ioduro di propidio di penetrare nel nucleo, le cellule vengono trattate con una soluzione ipotonica, questo trattamento mantiene intatta la membrana nucleare. In una popolazione cellulare eterogenea si ritrovano cellule in diverse fasi del ciclo cellulare e che quindi differiscono per il contenuto di DNA. Le cellule in fase G_0/G_1 possiedono un corredo cromosomico diploide ($2N$). Alla fase G_1 segue la fase S, durante la quale avviene la duplicazione del DNA, quindi le cellule entrano in fase G_2/M . Queste cellule, prima della citodieresi, presentano un quantitativo doppio di DNA (fase tetraploide $4N$). L'intensità della fluorescenza emessa e rilevata al citofluorimetro è proporzionale alla quantità di ioduro di propidio che si intercala nel DNA, la quale a sua volta è correlata alla quantità di acido nucleico presente nelle cellule. Le cellule in fase G_2/M pertanto emettono maggiore fluorescenza rispetto a quelle in fase G_0/G_1 . Le cellule contenenti DNA frammentato e cromatina condensata, le quali probabilmente sono andate incontro ad un processo apoptotico, incorporano una minore quantità di ioduro di propidio, e quindi emettono meno fluorescenza. Questa frazione di cellule prende il nome di sub- G_0/G_1 . Per effettuare l'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare le cellule sono state seminate su piastre da sei pozzetti (10^5 /pozzetto in 2 ml di terreno di coltura), sono state trattate con i composti, prelevate con tripsina, centrifugate, risospese in una soluzione ipotonica di fluorocromo (2 $\mu\text{g/ml}$ di ioduro di propidio, 0,1% di citrato di sodio, 0,1% di Nonidet P-40, e 100 $\mu\text{g/ml}$ di RNasi) e incubate al buio, alla temperatura di 4°C per circa due ore. L'analisi citofluorimetrica è stata condotta mediante un citofluorimetro FACSscan (Beckman Coulter Epics XL; Brea, CA, USA), e i dati sono stati elaborati usando il software Expo32. La fluorescenza emessa dalle cellule è stata analizzata come frequenza di istogrammi di parametri singoli.

DOSAGGIO DELL'ANIONE SUPEROSSIDO

L'anione superossido è stato dosato impiegando il diidroetidio (DHE), un fluorocromo che viene ossidato da questo anione e convertito in etidio (EH), che va ad intercalarsi nel DNA emettendo fluorescenza rossa (605 nm). Il DHE è stato solubilizzato in DMSO per realizzare una soluzione madre 10 mM e successivamente diluito 1:100 in PBS. Per dosare l' O_2^- , 8×10^3 cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (in

200 µl di terreno di coltura DMEM), in seguito al trattamento le piastre sono state centrifugate a 120 g per 5 minuti. Al termine il terreno è stato sostituito con 100 µl di PBS, a cui è stato aggiunto il diluito 1:100 del DHE, al fine di realizzare una soluzione 20 µM. Dopo circa 10 minuti la piastra è stata centrifugata a 120 g per 5 minuti e la soluzione contenente il fluorocromo è stata sostituita con PBS. Quindi le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza Leica DMR (Wetzlar, Germany) dotato di telecamera DC300F, utilizzando un filtro per la rodamina (eccitazione: 596 nm - emissione: 620 nm). Le immagini sono state acquisite mediante il software Leica Q Fluoro.

L'anione superossido è stato dosato anche mediante analisi citofluorimetrica. 2×10^5 cellule/pozzetto sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (in 2 ml di terreno di coltura), e dopo il trattamento sono state prelevate con tripsina e centrifugate. I pellet sono stati risospesi in PBS e incubati con DHE 20 µM per 15 minuti al buio. Successivamente le cellule sono state centrifugate a 120 g per 5 minuti e i pellet sono stati risospesi in 500 µl di PBS. Al termine la fluorescenza è stata valutata mediante un citofluorimetro FACScan (Beckman Coulter Epics XL, Brea, CA, USA), e i dati sono stati elaborati usando il software Expo32.

DOSAGGIO DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO

La produzione dei ROS è stata valutata impiegando la 5-(e 6-) 2',7' carbossidiclorodidrossifluoresceina diacetato (H_2DCFDA , Molecular Probes; Eugene, OR). Questo composto presenta due gruppi acetile che lo rendono lipofilo e gli consentono di attraversare la membrana plasmatica; all'interno della cellula, le esterasi rimuovono i gruppi acetile e la molecola ottenuta (DCFH) viene così ossidata dai ROS eventualmente presenti, e convertita in un prodotto verde fluorescente (DCF, diclorofluoresceina).

Per dosare i ROS le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti (8×10^3 cellule per pozzetto) ed incubate con i composti per diversi tempi. Al termine dell'incubazione la piastra è stata centrifugata a 120 g per 5 minuti, il terreno di coltura è stato allontanato e sostituito con 100 µl di una soluzione 100 µM di H_2DCFDA (preparata a partire da una soluzione madre 11,7 mM in buffer HBSS/Ca/Mg: NaCl 0,137M, KCl 5,4 mM, Na_2HPO_4 0,34 mM, KH_2PO_4 0,44 mM, $CaCl_2$ 1,3 mM, $MgSO_4$ 0,41 mM,

MgCl₂ 0,49 mM, NaHCO₃ 4,2 mM, D-Glucosio 5,56 mM, pH 7,3). Dopo 30 minuti è stata verificata l'incorporazione del fluorocromo mediante microscopio a fluorescenza, successivamente la soluzione è stata rimossa e sostituita con HBSS. Dopo circa 20 minuti le cellule sono state osservate mediante un microscopio a fluorescenza Leica DMR con telecamera DC300F (Wetzlar, Germany), mediante un filtro FITC (isotiocianato di fluoresceina) con lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e di emissione di 530 nm. Le immagini sono state acquisite utilizzando il software Leica Q Fluoro. Le cellule sono state contate (in 5 campi per condizione) ed è stata valutata la percentuale di cellule verdi rispetto alle cellule totali.

I ROS sono stati dosati anche mediante analisi citofluorimetrica, per effettuare questa valutazione le cellule (2×10^5 /pozzetto in 2 ml di terreno) sono state seminate su piastre da 6 pozzetti, al termine del trattamento con i composti sono state staccate con tripsina e centrifugate a 120 g per 8 minuti. I pellet sono stati lavati con PBS e incubati con una soluzione 50 μ M di H₂DCFDA (diluito in HBSS) per circa 30 minuti al buio a 37°C. Al termine le cellule sono state centrifugate a 120 g per 5 minuti, i pellet sono stati risospesi in 500 μ l di HBSS e la fluorescenza è stata valutata mediante citofluorimetro FACScan (Beckman Coulter Epics XL; Brea, CA, USA), i dati sono stati elaborati usando il software Expo32.

DOSAGGIO DEL CALCIO CITOPLASMATICO

Il livello del calcio citoplasmatico è stato valutato mediante l'impiego del fluorocromo FLUO-3AM (estere tetrakis(acetossimetil) acido 4-(6-Acetossimetossi-2,7-dicloro-3-osso-9-xantenil)-4'-metil-2,2'-(etilene-diossi)dianilineN,N,N',N'-tetraacetico). Questa molecola presenta un gruppo acetossimetil estere (AM) che la rende lipofila e le consente di attraversare la membrana plasmatica e penetrare nella cellula. Una volta penetrato questi gruppi vengono rimossi dalle esterasi cellulari, generando FLUO-3, il quale interagisce con il calcio e viene convertito in un prodotto fluorescente verde (eccitazione: 506 nm - emissione: 526 nm). Per valutare il livello del calcio circa 2×10^5 cellule sono state piastrate in ciascun pozzetto di una piastra da 6 pozzetti. In seguito al trattamento le cellule sono state staccate con tripsina e prelevate. Dopo centrifugazione a 120 g per 8 minuti sono stati eseguiti due lavaggi in PBS privo di calcio e magnesio, in quanto questi sali interferiscono con la reazione. Le cellule sono state

successivamente risospese in questo tampone salino e incubate con una soluzione 5 μ M di FLUO-3AM (preparata in terreno a partire da una madre 8,8 mM, solubilizzata in DMSO) per circa 60 minuti a 37°C al buio. Al termine la fluorescenza è stata valutata al citofluorimetro (Beckman Coulter Epics XL, Brea, CA) e i risultati sono stati visualizzati al monitor di un PC mediante il software Expo32. La percentuale di cellule fluorescenti è stata calcolata in rapporto ad un controllo negativo non incubato con il fluorocromo.

SAGGI COLORIMETRICI PER LA VALUTAZIONE DEI GRUPPI TIOLICI E DEL GSH

I gruppi tiolici liberi e proteici sono stati valutati utilizzando il reagente di Ellman (acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, DNTB). I gruppi tiolici sono in grado di determinare la rottura del ponte disolfuro del DNTB, determinando la produzione del 2-nitro-5tiobenzoato (NTB-), il quale in ambiente acquoso neutro o alcalino si converte in una forma dianionica di colore giallo (NTB²⁻).

Per valutare i tioli le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti e incubate con i composti per diversi tempi (5×10^5 cellule/condizione). Al termine, le cellule sono state staccate con tripsina, lavate in PBS, contate, quindi 3×10^5 cellule sono state risospese in 50 μ l di un apposito buffer di diluizione (Tris HCl 30mM, EDTA 3mM, pH 8,2). Per valutare i tioli proteici, ai campioni sono stati aggiunti 25 μ l di DNTB (29,7 mg in 25 ml di metanolo) e 400 μ l di metanolo. I campioni sono stati quindi centrifugati a 3.000 g per 5 minuti, 250 μ l di ciascun supernatante sono stati trasferiti nei pozzetti di una piastra da 96 pozzetti e letti in un lettore per piastre ELISA Opsys MR (Dynex Technologies; Chantilly, VA) a 400 nm. Il contenuto di gruppi tiolici proteici è stato valutato in rapporto ad una curva standard di NAC contenente concentrazioni variabili da 5 a 20 nanomoli ed espresso come nanomoli di gruppi SH per 10^5 cellule. Per valutare i gruppi tiolici liberi le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico (TCA), 25 μ l di TCA al 10% sono stati aggiunti ai campioni risospesi nel buffer di diluizione ed è stata effettuata una centrifugazione a 200 g x 15 minuti. 50 μ l di ciascun supernatante sono stati trasferiti nei pozzetti di una piastra da 96 e successivamente sono stati aggiunti 200 μ l di Tris HCl 0,2 M, pH 8,9 e 20 μ l di DNTB. Infine è stata effettuata una lettura a 400 nm utilizzando un lettore per piastre ELISA Opsys MR

(Dynex Technologies; Chantilly, VA). Il contenuto di gruppi tiolici liberi è stato valutato in rapporto ad una curva standard di NAC contenente concentrazioni variabili da 0,5 a 10 nanomoli ed espresso come nanomoli di gruppi SH per 10^5 cellule.

Il livello del GSH è stato valutato mediante un kit (BIOXYTECH GSH-400) acquistato presso la OXIS Research (Portland, OR). Tra le componenti del kit vi sono il reagente R1 (4-cloro-1-metil-7-trifluorometil-quinolinium metilsolfato), il quale è in grado di reagire con tutti i mercaptani (R-SH) presenti nel campione, generando tioeteri; il reagente R2 (30% NaOH), che invece interagisce con i tioeteri derivanti dalla prima reazione convertendoli in tioni cromofori. Al fine di valutare i livelli del GSH, 2×10^5 cellule sono state seminate in ciascun pozzetto di una piastra da sei e dopo il trattamento sono state staccate con tripsina e centrifugate a 120 g per 8 minuti. Le cellule sono state risospese in PBS e contaminate; 3×10^5 cellule sono state quindi risospese in 50 μ l di acido metafosforico (5g/100 ml di acqua distillata) e congelate a -80°C per 5 minuti e omogenate con la pipetta pasteur, questo procedimento è stato ripetuto per tre volte. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati a 3.000 g per 10 minuti. Infine 25 μ l di ciascun supernatante sono stati trasferiti nei pozzetti di una piastra da 96, e diluiti in 155 μ l di buffer fornito dal kit, sono stati aggiunti in successione 10 μ l di ciascun reagente (R1 ed R2), e la piastra è stata incubata al buio per 10 minuti. Al termine l'assorbanza è stata valutata mediante un lettore per piastre ELISA Opsys MR (Dynex Technologies; Chantilly, VA), leggendo alla lunghezza d'onda di 400 nm. Lo strumento è stato tarato mediante una prova bianca, contenente esclusivamente 180 μ l di buffer e i due reagenti. Il contenuto di GSH è stato valutato in riferimento ad una curva standard contenente concentrazioni variabili da 2 a 20 nmoli ed è stato espresso come nanomoli di GSH per 10^5 cellule.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI NF-KB

L'attività di legame al DNA del fattore di trascrizione NF-KB è stata valutata mediante uno specifico kit (Trans-AM NF-kB; Active Motif, Carlsbad, CA), basato su un sistema colorimetrico. Il kit è costituito da piastre da 96 pozzetti, che al fondo di ciascun pozzetto contengono sequenze oligonucleotidiche corrispondenti alla sequenza consensus riconosciuta da NF-kB. Se nel campione è presente la forma attiva di NF-kB, questa si lega alla sequenza consensus. Dopo aver posto il campione nel pozzetto, si

aggiunge un anticorpo primario che riconosce in maniera specifica epitopi presenti nella forma attiva (legata al DNA) di una delle subunità di NF- κ B (p65, p50, p52, c-Rel o RelB). Infine si aggiunge un anticorpo secondario che lega in maniera specifica l'anticorpo primario. L'anticorpo secondario è coniugato con un enzima che media una reazione colorimetrica, aggiungendo il substrato di questo enzima si otterrà un prodotto colorato in quantità direttamente proporzionale al numero di molecole di NF- κ B attive. Impiegando questo kit si può così quantificare l'attività di NF- κ B ed individuare quali componenti di questo fattore legano il DNA.

Per effettuare tale valutazione, 3×10^5 cellule per condizione sono state piastrate in capsule petri e al termine del trattamento sono state staccate con tripsina e centrifugate a circa 120 g per 8 minuti. I pellet sono stati lavati in PBS e risospesi in un buffer di lisi (Hepes 20mM, saccarosio 250 mM, $MgCl_2$ 1,5mM, KCl 10mM, EGTA 1mM, EDTA 1mM, pH 7,5) a cui è stato aggiunto un cocktail di inibitori delle proteasi (aprotinina 25 μ g/ml, PMSF o fluoruro di fenilmetansulfonile 1 mM, leupeptina 25 μ g/ml e pirofosfato di sodio 0,2 mM). Le cellule sono state quindi omogenate con una pipetta pasteur di vetro e centrifugate a 1.000 g per 10 minuti a 4 °C. I pellet ottenuti sono stati omogenati nuovamente nello stesso buffer e centrifugati a 800 g x per 10 minuti. Il pellet, corrispondente alla frazione nucleare è stato risospeso in RIPA buffer (Tris-HCl pH 7,4 50 mM, NP-40 1%, EDTA 1 mM) a cui è stato aggiunto un cocktail di inibitori delle proteasi ed è stato nuovamente sottoposto ai procedimenti di estrazione e centrifugazione precedentemente descritti. Infine i pellet sono stati lisati in RIPA buffer e sottoposti a lisi fisica mediante sonicazione (3 cicli di 10 secondi, con intervalli di 5 secondi), adoperando un'intensità di 10 REV (Soniprep 150; MSE (UK) Limited, London, UK). Gli estratti nucleari (20 μ l) sono stati posti nei pozzetti della piastra da 96 fornita dal kit e incubati per un'ora a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi in un apposito buffer fornito dal kit, sono stati aggiunti 100 μ l della soluzione contenente l'anticorpo primario specifico per p65. Dopo un'ora di incubazione a 25 °C sono stati aggiunti 100 μ l di una soluzione contenente un anticorpo secondario anti-IgG coniugato con la perossidasi di rafano. Dopo un'ora di incubazione a 25°C è stato aggiunto il substrato dell'enzima (tetrametilbenzene) ed è stata valutata l'assorbanza a 450 nm mediante un lettore per piastre ELISA Opsys MR (Dynex Technologies; Chantilly, VA).

VALUTAZIONE DEI VACUOLI AUTOFAGICI

La presenza di vacuoli autofagici è stata evidenziata impiegando la monodansilcadaverina (MDC), una molecola fluorescente verde. La MDC si accumula nei compartimenti acidi, come gli autofagosomi e lega in modo specifico lipidi presenti sulla membrana di questi organelli. Osservando la cellula al microscopio a fluorescenza, in presenza di autofagosomi, si evidenziano una serie di spot di colore verde brillante (Munafò et al., 2001). Al fine di valutare la presenza di vacuoli autofagici le cellule sono state piastrate in una piastra da 96 pozzetti (8×10^3 cellule per pozzetto in 200 μ l di terreno di coltura). In seguito al trattamento con i composti le cellule sono state incubate con una soluzione 50 μ M di MDC a 37°C al buio, per circa 10 minuti. Successivamente le cellule sono state lavate con PBS e osservate al microscopio a fluorescenza Leica DMR con telecamera DC300F, utilizzando un filtro DAPI (eccitazione: 372 nm – emissione: 456 nm). Le immagini sono state acquisite mediante il software Leica Q Fluoro. Le cellule sono state contate (in 5 campi per condizione) ed è stata valutata la percentuale di cellule positive alla MDC rispetto alle cellule totali.

PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI CELLULARI E SEPARAZIONE MEDIANTE SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Le cellule (2×10^5 per pozzetto in 2 ml di terreno di coltura) sono state seminate su piastre da 6 pozzetti, al termine del trattamento sono state lavate in PBS e staccate dalla piastra adoperando una soluzione di tripsina-EDTA (2,5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA), prelevate e centrifugate a 120 g per 10 minuti. Successivamente sono state lisate in RIPA buffer, un tampone dissociante costituito da NP-40 all'1%, sodio deossicolato 0,5%, SDS 0,1 %. Prima di impiegare il RIPA, a questo buffer è stata aggiunta una miscela di inibitori delle proteasi, per preservare le proteine (aprotinina 25 μ g/ml, PMSF o fluoruro di fenilmetansulfonile 1 mM, leupeptina 25 μ g/ml e pirofosfato di sodio 0,2 mM). La completa lisi cellulare è stata ottenuta mediante sonicazione (3 cicli di 10 secondi, con intervalli di 5 secondi), adoperando un'intensità di 10 REV (Soniprep 150; MSE (UK) Limited, London, UK). Successivamente è stato dosato il contenuto proteico mediante il metodo di Lowry (Lowry et al., 1951), e sono stati preparati campioni contenenti 50 μ g di proteine, da sottoporre ad elettroforesi SDS-

page. Ai campioni è stato quindi aggiunto il sample buffer 2 x (Tris-HCl 50 mM, β -mercaptoetanol 100 mM, SDS al 2%, blu di bromo fenolo 0,1%, glicerolo al 10 %, pH 6,8) secondo un rapporto di 1:1, per un totale di 20 μ l. Le proteine sono state denaturate per 5 minuti a 90°C, e i campioni sono stati caricati nei pozzetti di un gel di poliacrilamide (al 7.5%, 10% o 12% in relazione al peso molecolare della proteina da valutare), accanto ad uno standard costituito da proteine di peso molecolare noto. Infine è stata effettuata una corsa elettroforetica verticale a 150 V per circa 2 h in presenza del tampone di scorrimento.

ANALISI DI WESTERN BLOTTING

Al termine dello scorrimento elettroforetico, le proteine sono state trasferite su un filtro di nitrocellulosa (Pharmacia Biotech) mediante “elettroblotting” (20 V “overnight”), in presenza di transfer buffer (glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS 0,037%, metanolo 20%). Per controllare l’avvenuto trasferimento e l’uniformità della quantità di proteine caricate nei pozzetti, il filtro è stato colorato con rosso Ponceau 1X, un colorante che lega reversibilmente le proteine. Il Rosso Ponceau 1X è stato preparato diluendo in acqua distillata il 10X (acido tricloroacetico o TCA 60 ml, Acido solfosalicilico 30 g e H₂O q.b. per un volume finale di 100 ml). Dopo aver effettuato una serie di lavaggi con TBST (Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,005%, pH 7,5) per rimuovere il colorante, al filtro è stata aggiunta una soluzione di “blocking” (latte o albumina a percentuali variabili a seconda dell’anticorpo impiegato, solubilizzati in TBST) per circa 1 h, in modo da schermare il filtro e ridurre i legami aspecifici tra le proteine presenti nel filtro e l’anticorpo da impiegare nella successiva fase di “detection”. È stata quindi aggiunta una soluzione contenente l’anticorpo primario specifico (1 μ g/ml di TBST) ed il filtro è stato mantenuto ad incubare per tempi variabili in base all’anticorpo impiegato. L’anticorpo per RIP-1 è stato acquistato presso la Abcam (San Francisco, CA), gli anticorpi anti-beclina-1 e anti caspasi 3, 8 e 9 sono stati ottenuti dalla Cell Signaling Technology (Beverly, MA), gli anticorpi anti-LC3 dalla Novus Biologicals (Cambridge, UK). Tutti gli altri anticorpi sono stati acquistati presso la Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Dopo l’incubazione il filtro è stato sottoposto a tre lavaggi in TBST, di 10 minuti ciascuno, ed è stato incubato per 30 min in TBST contenente l’anticorpo secondario (1

$\mu\text{g}/3$ ml di TBST) coniugato con la fosfatasi alcalina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Le bande sono state evidenziate mediante l'aggiunta dei substrati della fosfatasi alcalina: BCIP o 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato (16,5 μl) ed NTB o nitroblue di tetrazolio (33 μl) in 5 ml di AP buffer (Tris HCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, pH 8,9). La fosfatasi agisce sui substrati causando la formazione di un precipitato di colore blue-viola in corrispondenza della banda in cui è localizzata la proteina bersaglio. L'omogeneità del contenuto proteico delle singole prove è stata accertata mediante immunoblotting dell'actina. L'intensità delle bande è stata quantificata mediante il software SMX Image.

VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE

Il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi\text{m}$) è stato studiato mediante il fluorocromo metacromatico JC1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina ioduro), acquistato presso la Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). Tale molecola è un catione lipofilo in grado di attraversare le membrane cellulari. Quando i mitocondri presentano un potenziale di membrana integro, JC1 viene attratto dalle cariche negative presenti nella matrice, dove polimerizza formando delle strutture dette J-aggregati, i quali presentano un'intensa colorazione rossa fluorescente (eccitazione: 490 nm - emissione: 590 nm). Quando il mitocondrio si depolarizza JC1 si accumula prevalentemente nel citosol, dove si trova nella forma monomeric, che presenta un colore verde fluorescente (eccitazione: 490 nm - emissione: 527 nm). Per valutare il $\Delta\psi\text{m}$ 8×10^3 cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti. In seguito al trattamento sono stati aggiunti 10 μl di JC1 per 15 minuti. La piastra è stata centrifugata a 120 g per 5 minuti, il terreno contenente il fluorocromo è stato allontanato e sostituito con terreno fresco. Infine le cellule sono state visualizzate al microscopio a fluorescenza Leica DMR equipaggiato con una telecamera DC300F (Wetzlar, Germany), utilizzando un filtro FITC (eccitazione: 485 nm - emissione: 530 nm) per visualizzare i monomeri di JC1 presenti nelle cellule con $\Delta\psi\text{m}$ alterato, ed un filtro per la rodamina (eccitazione: 596 nm - emissione: 620 nm) per visualizzare gli aggregati presenti nelle cellule con potenziale di membrana integro. Le immagini sono state acquisite mediante il software Leica Q Fluoro.

ANALISI STATISTICHE

Le analisi statistiche sono state effettuate mediante il test del t Student. I risultati riportati sono la media di tre differenti esperimenti \pm l'errore standard (S.E.).

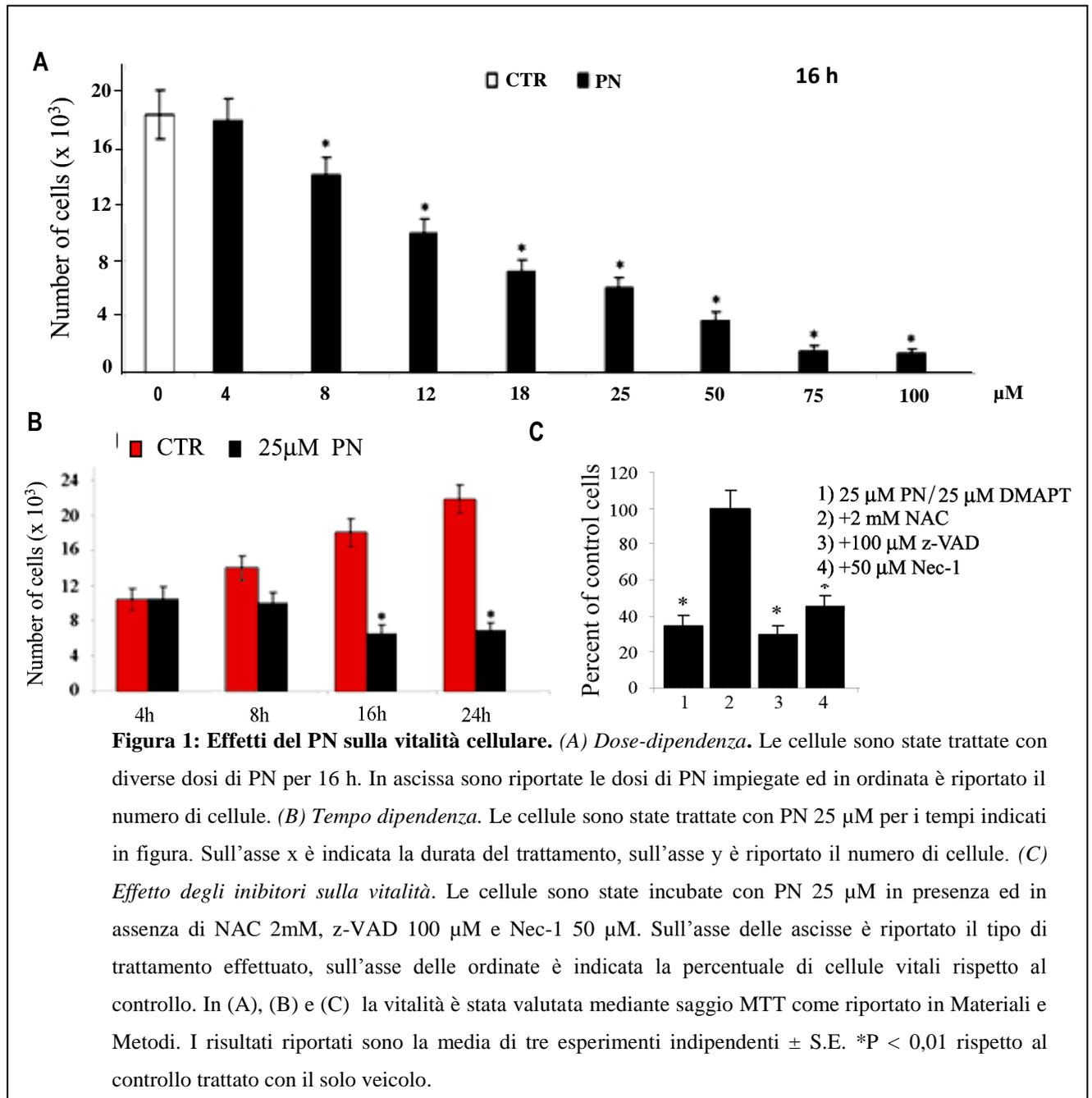
RISULTATI

EFFETTI CITOTOSSICI DEL PARTENOLIDE SU CELLULE MDA-MB231

Per valutare l'efficacia del partenolide (PN) sulle cellule di carcinoma mammario MDA-MB231, sono stati inizialmente condotti degli studi di vitalità cellulare, trattando le cellule con dosi crescenti di composto (variabili dalla 4 alla 100 μM). Dopo 16 h di trattamento, gli effetti del composto sono stati analizzati mediante saggio MTT. Come è possibile osservare dai dati riportati in Fig. 1, il PN riduce la vitalità delle cellule MDA-MB231 in modo dose dipendente, infatti incubando le cellule con la dose 4 μM si osservano effetti modesti (10%), che incrementano progressivamente aumentando la concentrazione del composto impiegata. L'effetto citotossico risulta particolarmente evidente con la dose 100 μM che riduce la vitalità di circa il 90% a 16 h di trattamento. Dalla figura emerge anche che risultati particolarmente interessanti sono stati ottenuti impiegando la dose 25 μM , la quale riduce la vitalità del 64% rispetto al controllo incubato con il solo veicolo (Fig. 1 A). Valutando l'effetto di tale concentrazione nel tempo si è osservato che durante le prime 8 h di trattamento l'effetto del PN sulla vitalità è modesto (-30% dopo 8 h), prolungando invece il trattamento fino a 16 e 24 h la vitalità si riduce consistentemente, raggiungendo valori pari a circa il 34% del controllo dopo 16 h (Fig. 1 B). È interessante osservare che gli effetti citotossici del PN vengono annullati dalla molecola antiossidante N-acetilcisteina, suggerendo un ruolo centrale dei ROS nel meccanismo d'azione del composto. I risultati riportati in Fig. 1 mostrano anche che l'aggiunta di Necrostatina-1, un inibitore della chinasi RIP-1, determina un parziale effetto protettivo nei confronti del PN, lasciando ipotizzare il coinvolgimento di questa proteina nell'evento di morte. Invece gli effetti esercitati dal PN sulla vitalità non vengono modificati dall'inibitore generale delle caspasi z-VAD, indicando l'esistenza di un meccanismo di morte caspasi-indipendente (Fig. 1 C).

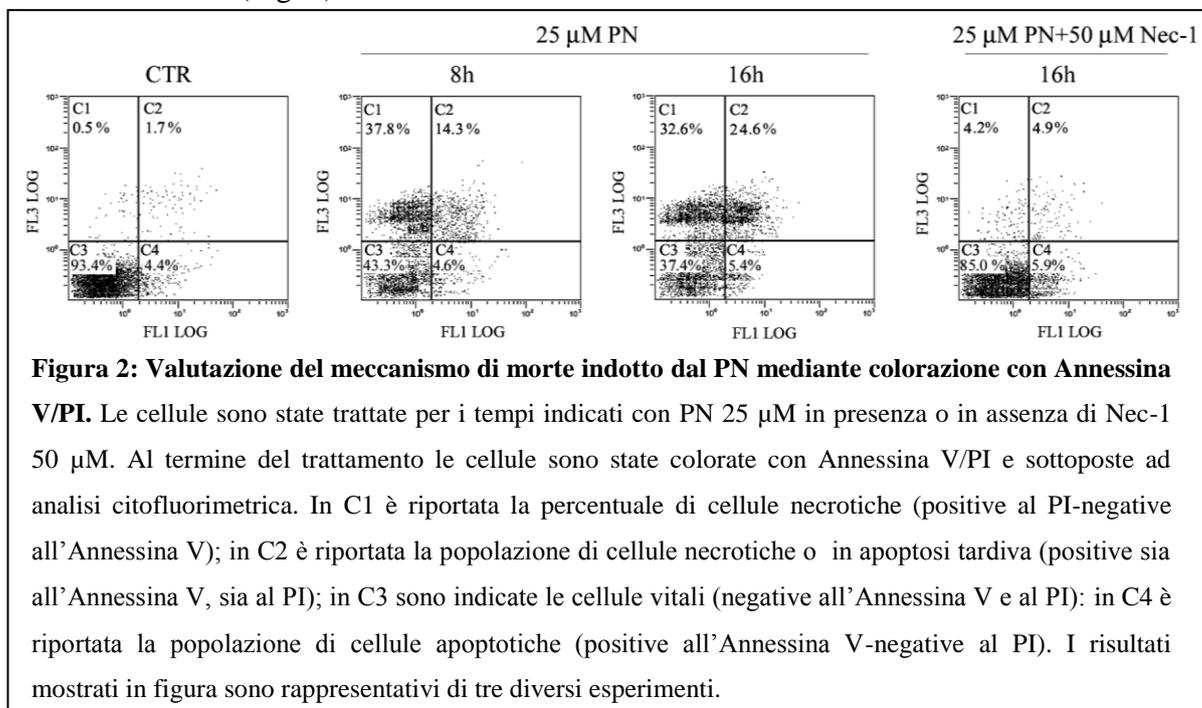
Al fine di individuare le cause del potente effetto citotossico esercitato dal PN sulla vitalità e per chiarire le modalità d'azione del composto, è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica dopo colorazione delle cellule con annessina V e ioduro di propidio (PI), due fluorocromi che, come riportato nei metodi, colorando differentemente le cellule, consentono di discriminare tra meccanismi di morte per necrosi o per apoptosi. Come si può osservare in Fig. 2 dopo circa 8 h di trattamento con PN 25 μM il 37,8% delle cellule risulta positiva al solo PI, indice della presenza di eventi necrotici. Dopo 16 h di trattamento, oltre a questa frazione, compare anche una frazione di cellule (24,6%)

positive tanto al PI, che all'Annexina V (cellule necrotiche o in apoptosi tardiva). In tutte le condizioni di trattamento studiate non si osserva la comparsa di cellule positive alla sola Annexina V (cellule in apoptosi precoce), suggerendo che la frazione di cellule doppiamente positive osservata a 16 h corrisponda a cellule necrotiche. Nella stessa figura si osserva che gli effetti del PN vengono annullati dall'aggiunta di necrostatina-1, lasciando ipotizzare un ruolo centrale della chinasi RIP-1 nell'evento necrotico indotto dal PN (Fig. 2).

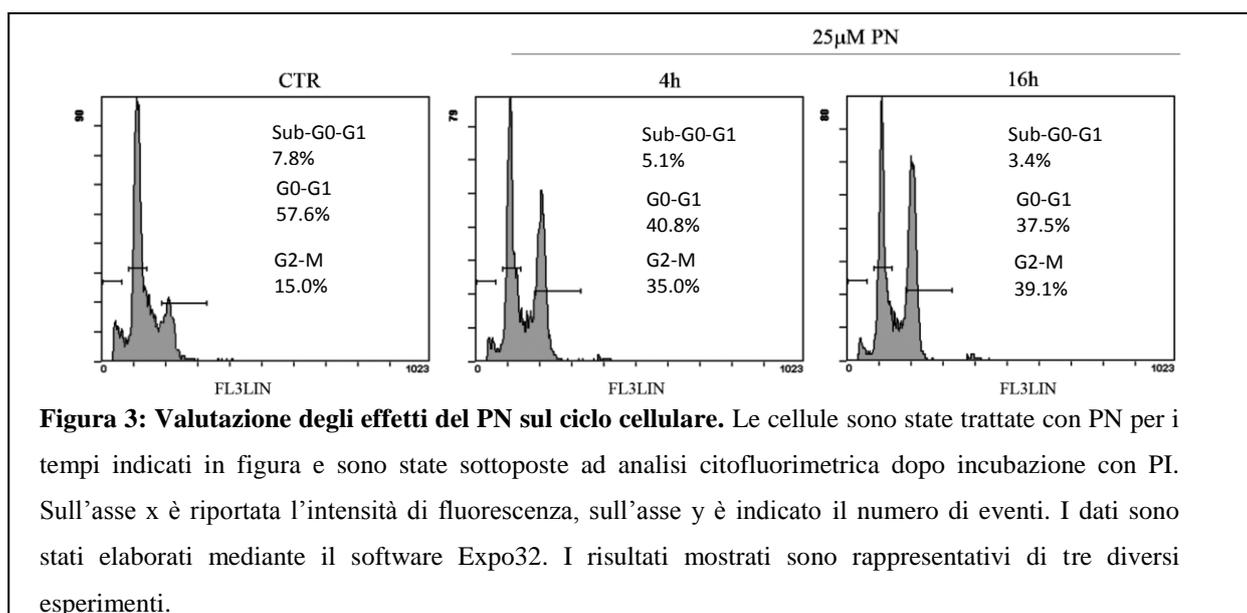


Le analisi citofluorimetriche condotte si sono anche proposte di valutare la distribuzione delle cellule lungo le diverse fasi del ciclo cellulare. Dopo colorazione con PI, gli studi

hanno mostrato che il trattamento per 4 h con PN 25 μ M, incrementa del 20% la frazione di cellule in G2/M. Tale effetto si continua ad osservare anche prolungando l'incubazione con PN fino a 16 h. Tale evento non si accompagna a frammentazione della cromatina (Fig. 3).



È interessante osservare che il trattamento con il PN determina profonde alterazioni nella morfologia delle cellule MDA-MB231. Le analisi condotte al microscopio ottico hanno dimostrato che già dopo 1 h di incubazione le cellule tendono ad assumere una morfologia tondeggiante; a 4 h risultano già tutte tonde e inizia il distacco dal substrato, un effetto che è annullato dall'aggiunta dell'antiossidante NAC (Fig. 4).



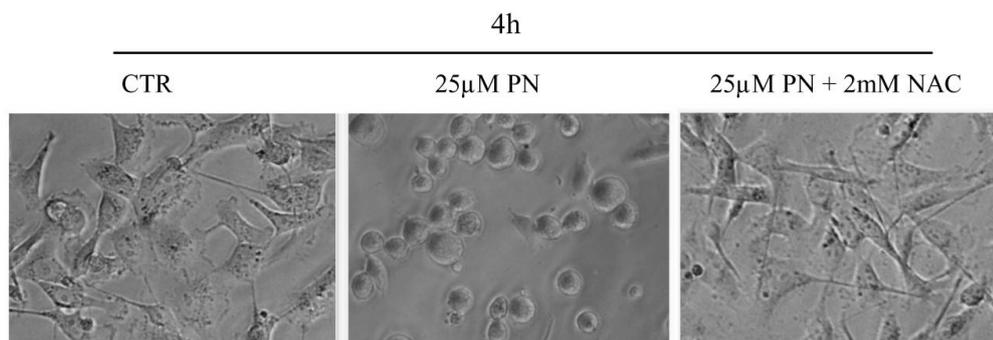
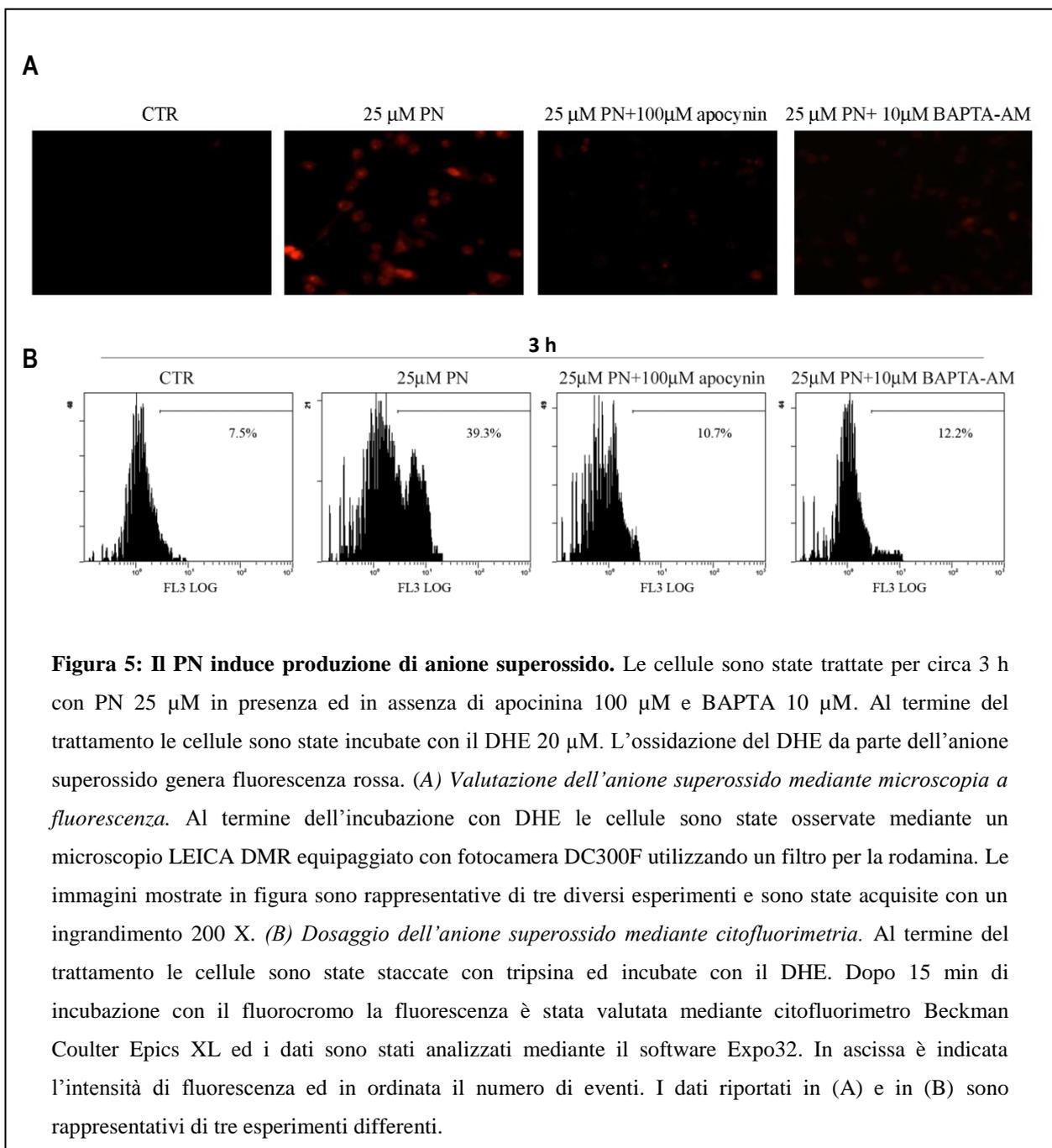


Figura 4: Effetti del PN sulla morfologia cellulare. Le cellule sono state trattate con PN 25 μ M per 4 h in presenza ed in assenza di NAC 2 mM. Al termine le cellule sono state osservate al microscopio ottico utilizzando un ingrandimento 200X. Le immagini mostrate sono rappresentative di tre diversi esperimenti.

IL PN INDUCE PRODUZIONE DI ROS E INCREMENTA IL LIVELLO DELLO IONE CALCIO

Poiché i dati di vitalità cellulare e le analisi morfologiche hanno mostrato che gli effetti del PN sono annullati dall'antiossidante NAC (che previene gli effetti esercitati dal PN sulla vitalità e sulla morfologia), sono stati condotti degli esperimenti per accertare se il PN potesse espletare un'azione citotossica mediante l'induzione di stress ossidativo. A tale scopo è stata valutata la produzione di anione superossido impiegando il DHE, un fluorocromo che viene ossidato dall' $O_2^{\cdot-}$ e dopo conversione in etidio si intercala nel DNA emettendo fluorescenza rossa. Come si evince dalle immagini in fluorescenza riportate in Fig. 5, dopo circa 2-6 h di trattamento con PN 25 μ M, si osserva la comparsa di un'intensa colorazione di colore rosso. Questi risultati sono stati confermati anche da analisi citofluorimetriche che dimostrano che già dopo appena 3 h di incubazione in presenza di PN, il 39,3% delle cellule presenta positività al fluorocromo rispetto alle cellule controllo non esposte ad alcun trattamento. Dai dati ottenuti è interessante osservare che la produzione dell'anione superossido è annullata dall'apocinina, un inibitore dell'enzima NADPH ossidasi (NOX), suggerendo il coinvolgimento di questo enzima nella produzione di questa specie radicalica. Le ricerche condotte hanno anche dimostrato che il chelante del calcio BAPTA-AM

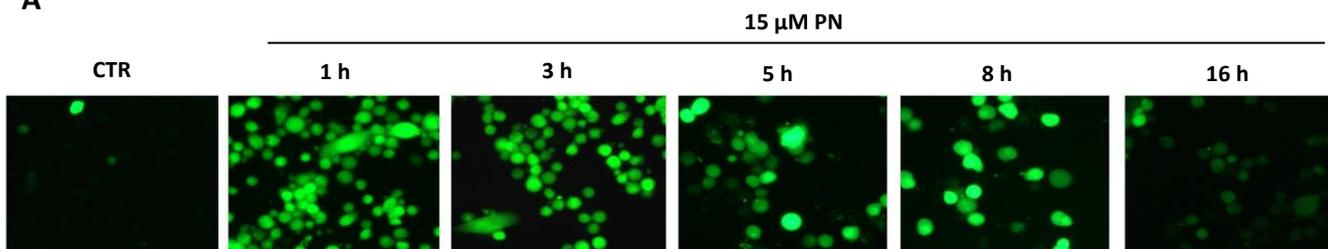
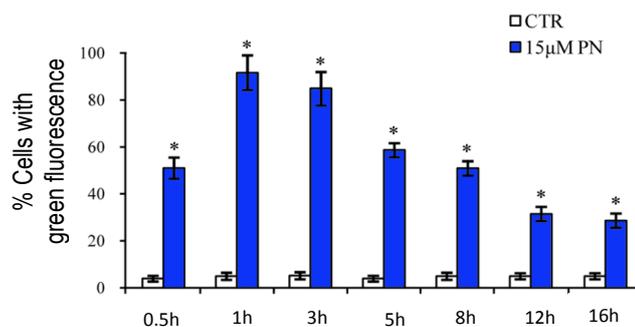
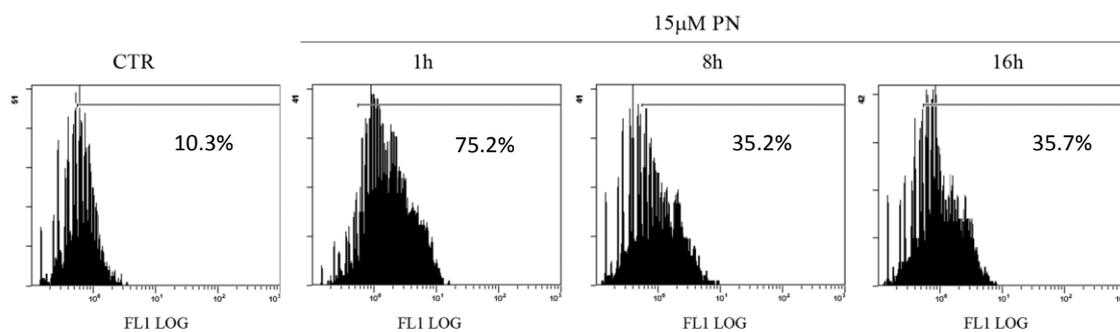
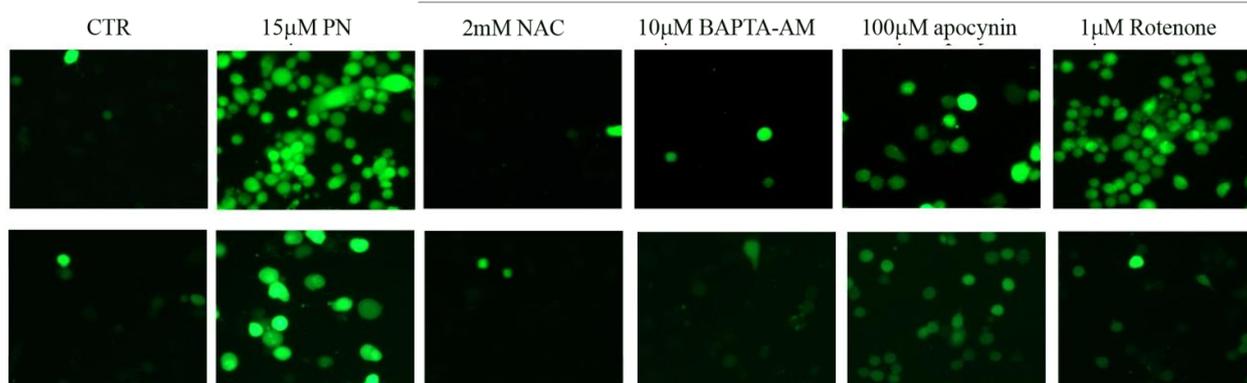
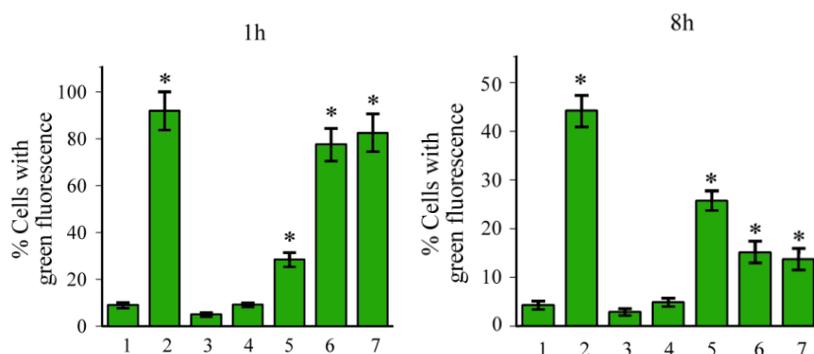
previene la produzione dell'anione superossido, lasciando ipotizzare che questo ione possa svolgere un ruolo nell'attivazione della NOX (Fig. 5 A e B).



Successivamente è stata effettuata una valutazione generale dei ROS impiegando il fluorocromo H₂DCFDA, il quale viene ossidato da queste molecole generando un prodotto fluorescente verde. La produzione dei ROS è stata valutata dopo diversi intervalli di tempo in presenza di PN 15 μ M. I dati riportati in Fig. 6, ottenuti mediante analisi di microscopia a fluorescenza, mostrano che già dopo soltanto 1 h di trattamento

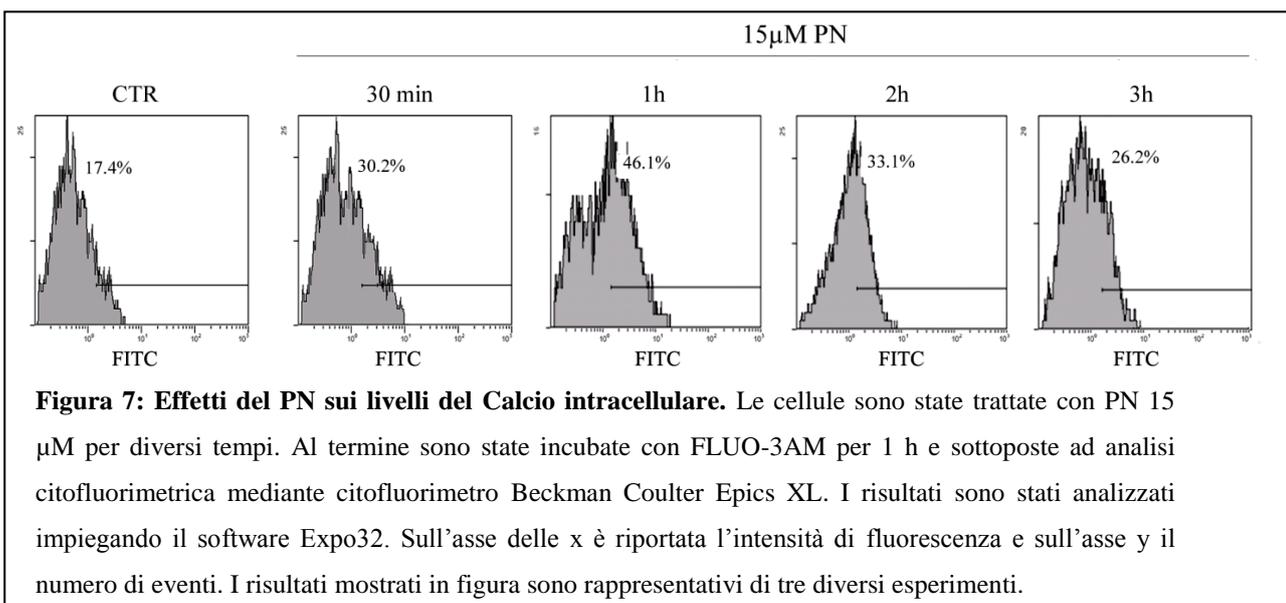
con il composto quasi la totalità delle cellule (90%) presenta fluorescenza verde brillante. Questa percentuale si mantiene elevata nelle prime 3 h di incubazione con PN, per poi decrementare progressivamente, fino a raggiungere un valore pari al 30% dopo 16 h di trattamento (Fig. 6 A-C). La produzione dei ROS viene annullata dal NAC e dal BAPTA-AM. È interessante notare che mentre la produzione dei ROS viene prevenuta dall'apocinina dopo 1 h di trattamento, questo inibitore risulta meno efficace quando l'incubazione con PN viene effettuata per 8 h. Invece il rotenone, un inibitore del complesso I della catena respiratoria, e l'FCCP, un disaccoppiante della fosforilazione ossidativa, esercitano un modesto effetto inibitorio ad 1 h di trattamento, mentre inibiscono consistentemente l'incremento dei ROS ad 8 h (Fig. 6 D ed E). Complessivamente questi risultati lasciano ipotizzare che alla base della produzione dei ROS esistono diversi meccanismi: uno dipendente dalla NADPH ossidasi (1-8 h), l'altro invece avrebbe origine prevalentemente dalla fosforilazione ossidativa.

I risultati ottenuti impiegando il BAPTA-AM, il quale annulla sia la produzione dell'anione superossido, sia la produzione dei ROS, suggeriscono che il calcio possa svolgere un ruolo nell'induzione dello stress ossidativo. Per valutare il coinvolgimento di questo ione nel meccanismo d'azione del PN sono state condotte analisi di citometria di flusso dopo incubazione delle cellule con FLUO-3AM, un fluorocromo che emette fluorescenza verde in seguito al legame con il calcio. Come è possibile osservare dalla Fig. 7, l'incremento del calcio citoplasmatico è un evento particolarmente precoce nelle cellule incubate con PN, infatti già dopo soltanto 30 min di trattamento i livelli di questo ione raggiungono un valore pari al 30,2%. Il suo livello incrementa ulteriormente dopo 1 h (46,1%) e successivamente i livelli cominciano a decrementare (Fig. 7).

A**B****C****D****E**

- 1) CTR
- 2) 15 μ M PN
- 3) 15 μ M PN + 2mM NAC
- 4) 15 μ M PN + 10 μ M BAPTA-AM
- 5) 15 μ M PN + 100 μ M apocynin
- 6) 15 μ M PN + 1 μ M Rotenone
- 7) 15 μ M PN + 1 μ M FCCP

Figura 6: Il PN determina produzione di ROS. (A), (B), (D) ed (E) Valutazione della produzione dei ROS mediante microscopia a fluorescenza. Le cellule sono state trattate per i tempi indicati in figura con PN 15 μM in presenza ed in assenza di NAC 2 mM, BAPTA-AM 10 μM , apocinina 100 μM , FCCP 1 μM e rotenone 1 μM . Al termine il terreno è stato rimosso e sostituito con 100 μl di H_2DCFDA 50 μM . L'ossidazione dell' H_2DCFDA da parte dei ROS genera fluorescenza verde che è stata evidenziata mediante microscopio Leica DMR dotato di fotocamera DC300F, impiegando un filtro FITC. In (A) e in (D) le immagini sono state acquisite con ingrandimento 200X e sono rappresentative di tre diversi esperimenti. In (B) e (E) è riportata la percentuale di cellule verdi calcolata dopo aver contato le cellule in 5 campi per condizione. In (B) in ascissa è riportata la durata del trattamento e in ordinata è indicata la percentuale di cellule verdi rispetto alle cellule totali. In (E) in ascissa è indicata la condizione di trattamento ed in ordinata la % di cellule verdi (C) Valutazione della produzione dei ROS mediante citofluorimetria. Dopo diversi intervalli di trattamento con il PN 15 μM le cellule sono state incubate con H_2DCFDA per 30 min. La fluorescenza verde è stata valutata utilizzando un citofluorimetro Beckman Coulter Epics XL. I risultati sono stati analizzati mediante il software Expo 32, sull'asse delle x è riportata l'intensità di fluorescenza, sull'asse y è indicato il numero di eventi. I dati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti differenti.



EFFETTI DEL PN SULLE CHINASI ERK 1/2, JNK E RIP-1

In rapporto ai dati ottenuti sono stati valutati fattori che possono svolgere un ruolo nell'induzione di stress ossidativo. I risultati ottenuti mediante analisi di western blotting e riportati in Fig. 8 hanno evidenziato che il PN incrementa in modo dose dipendente i livelli della forma fosforilata e quindi attiva delle chinasi ERK e JNK ed i livelli della chinasi RIP-1. Questi effetti sono già evidenti dopo soltanto 2 h di

trattamento con la dose 15 μM e incrementano ulteriormente impiegando dosi maggiori di composto (25 e 50 μM). Valutando l'effetto della dose 25 μM nel tempo si osserva che i livelli di p-ERK1/2, p-JNK e RIP-1 subiscono un incremento già dopo 1 h di trattamento, raggiungendo un picco dopo 2-4 h. È interessante osservare che l'incremento di p-ERK 1/2 indotto dal PN viene contrastato dall'U0126, un inibitore di MEK 1/2 (mitogen-activated protein kinase kinase 1/2) (Favata et al, 1998), una chinasi che agisce a monte di ERK 1/2 nella cascata delle MAPK (Kurdi et al., 2007). Tale effetto invece non viene contrastato dall'aggiunta di apocinina, di NAC o di SP600125, un inibitore di JNK (Bennet et al., 2001), lasciando ipotizzare che l'attivazione di ERK 1/2 sia un evento precoce che preceda la produzione dei ROS e l'attivazione di JNK. Questi dati sono in accordo con quanto dimostrato da Moon et al., i quali hanno evidenziato che la chinasi ERK può incrementare la trascrizione della NOX, favorendo la produzione di ROS (Moon et al., 2010). Inoltre è stato dimostrato che ERK può fosforilare la subunità p47 della NADPH ossidasi, determinandone la migrazione verso la membrana, dove si assembla con le altre subunità che costituiscono l'enzima, consentendone l'attivazione (Dewas et al., 2000). L'incremento di p-JNK indotto dal PN viene invece prevenuto dal NAC, dall'apocinina e dall'U0126, si può ipotizzare quindi che l'attivazione di questa chinasi possa dipendere dallo stress ossidativo indotto in seguito all'azione di ERK 1/2 sulla NADPH ossidasi. Infine nessuno degli inibitori impiegati (NAC, apocinina, SP600125 e U0126) è in grado di contrastare l'effetto del PN su RIP-1, suggerendo che questo evento sia indipendente dall'incremento dei ROS e dall'attivazione di JNK ed ERK (Fig. 8).

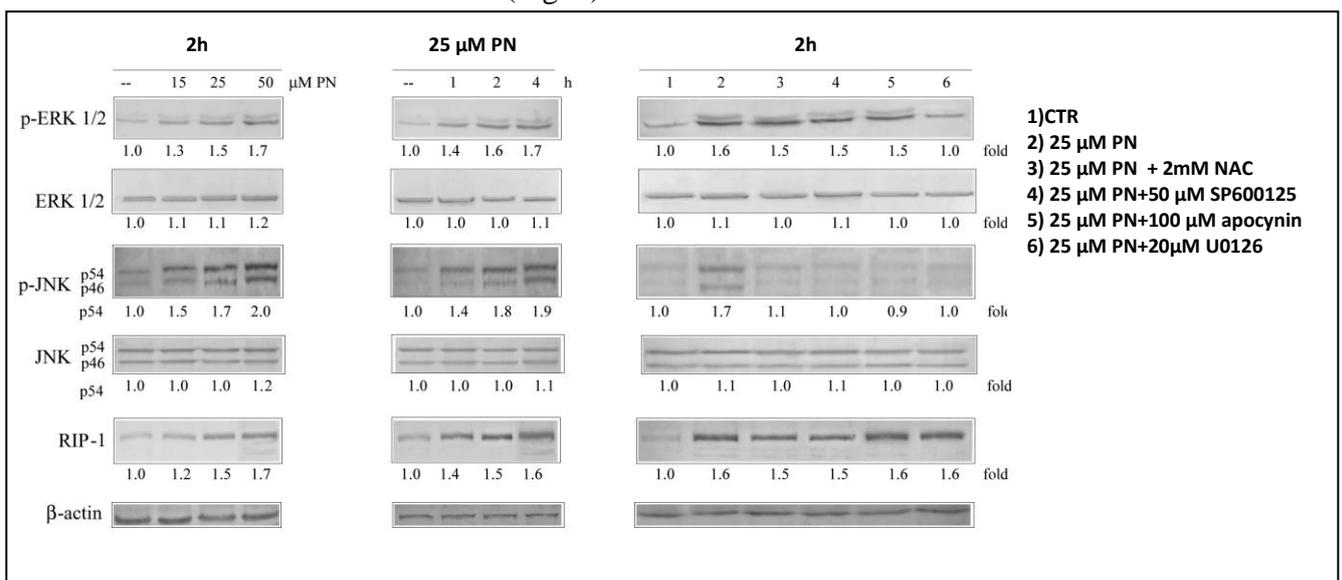
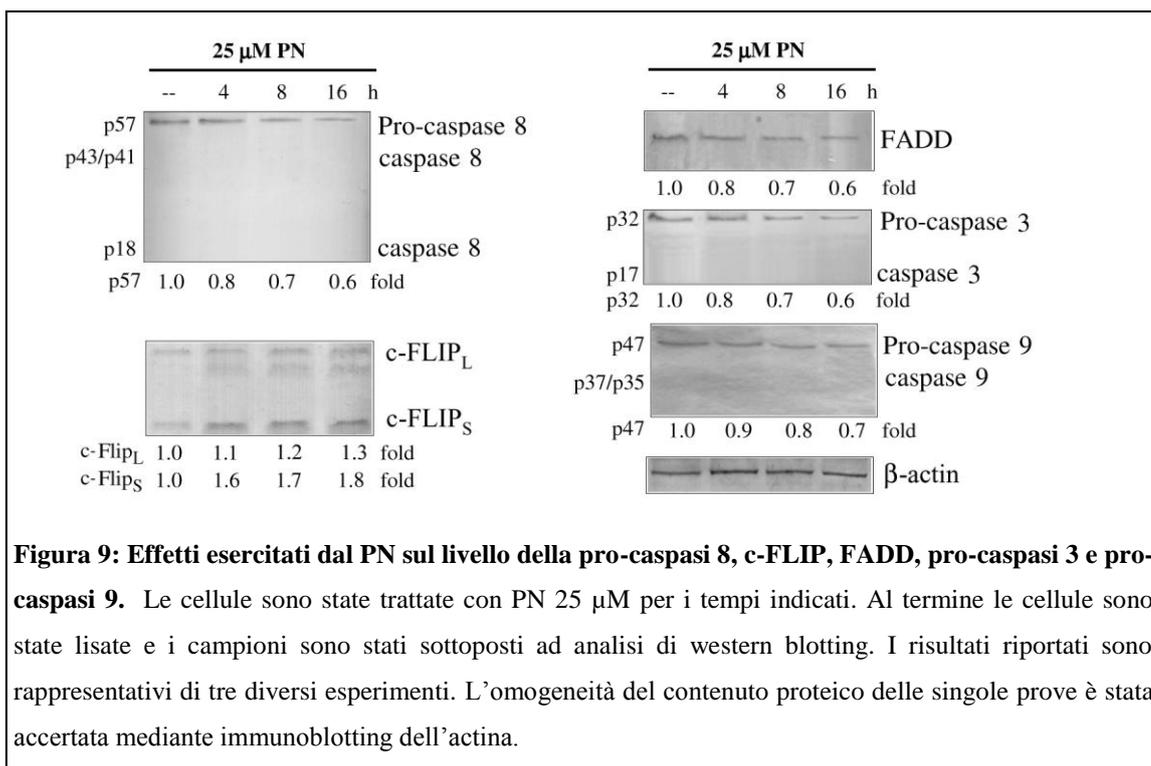


Figura 8: Effetti del PN sui livelli delle chinasi ERK1/2, JNK e RIP-1. Le cellule sono state trattate per i tempi indicati in figura con diverse dosi di PN in assenza o in presenza di NAC 2 mM, SP600125 50 μ M, apocinina 100 μ M, U0126 20 μ M. Al termine sono stati preparati gli estratti cellulari che sono stati sottoposti ad analisi di western blotting. I risultati mostrati sono rappresentativi di tre diversi esperimenti. L'omogeneità del contenuto proteico delle singole prove è stata accertata mediante immunoblotting dell'actina.

EFFETTI DEL PN SULLE COMPONENTI DEL RIPOPTOSOMA E SUI LIVELLI DELLE CASPASI

È noto che l'attività della chinasi RIP-1 viene modulata all'interno di un complesso che prende il nome di "rioptosoma". Questo complesso contiene, oltre a RIP-1, la molecola adattatrice FADD, la pro-caspasi 8 e le due isoforme di c-FLIP (FLIP_L ed _S). All'interno di questo complesso la pro-caspasi 8 può formare un eterodimero con FLIP_L, il quale determina un taglio proteolitico della chinasi RIP-1, si ottiene così un frammento C-terminale, coinvolto nell'evento apoptotico. Quando la pro-caspasi 8 è assente o inibita (per esempio da FLIP_S), RIP-1 si accumula e attiva la necroptosi, una forma di necrosi programmata (Feoktistova et al., 2011). Sono state quindi condotte analisi di western blotting per indagare se nelle nostre condizioni l'attivazione di RIP-1 potesse dipendere da variazioni nei livelli di proteine del "rioptosoma". I risultati ottenuti evidenziano una riduzione del livello di FADD e della pro-caspasi 8, che non si accompagna alla comparsa del corrispondente frammento attivo. Inoltre si osserva un incremento del livello di c-FLIP ed in maniera più spiccata dell' isoforma FLIP_S. Questi effetti si osservano già dopo 4 h di trattamento e incrementano ulteriormente nel tempo, divenendo particolarmente evidenti a 16 h di trattamento (Fig. 9). Le analisi di western blotting, valutando i livelli delle pro-caspasi 3 e 9 hanno altresì confermato che il PN agisce attraverso un meccanismo caspasi-indipendente. Analogamente a quanto osservato per la pro-caspasi 8, anche i livelli di queste due proteasi si riducono già dopo 4 h e decrementano ulteriormente a 16 h di trattamento. Tale evento non si accompagna a comparsa dei frammenti attivi (Fig. 9).



EFFETTO DEL PN SUI GRUPPI TIOLICI LIBERI E PROTEICI E SUL GSH

L'osservazione che il PN induce un rapido e consistente incremento dei ROS ha indotto a valutare quale fosse l'effetto del composto sul contenuto di gruppi tiolici liberi e proteici e del GSH. In condizioni di stress ossidativo solitamente si assiste ad una riduzione nel livello di queste molecole. Il dosaggio dei gruppi SH è stato effettuato mediante saggio colorimetrico, dopo colorazione con il reagente di Ellman; per effettuare tali studi le cellule sono state trattate per diversi intervalli di tempo con PN 25 μM. Come è possibile osservare in Fig. 10 il trattamento causa un rapido decremento dei gruppi tiolici proteici già dopo 2-4 h, raggiungendo valori pari al 30% del controllo dopo 16 h di trattamento. Un decremento ancora più consistente si osserva per i gruppi tiolici liberi che dopo 16 h raggiungono un valore pari al 10-15% del controllo. Il GSH è stato misurato utilizzando uno specifico kit, in seguito al trattamento la concentrazione di questa molecola si riduce in maniera analoga a quanto avviene per i gruppi tiolici liberi, raggiungendo un valore pari al 10-15 % del controllo dopo 16 h (Fig. 10).

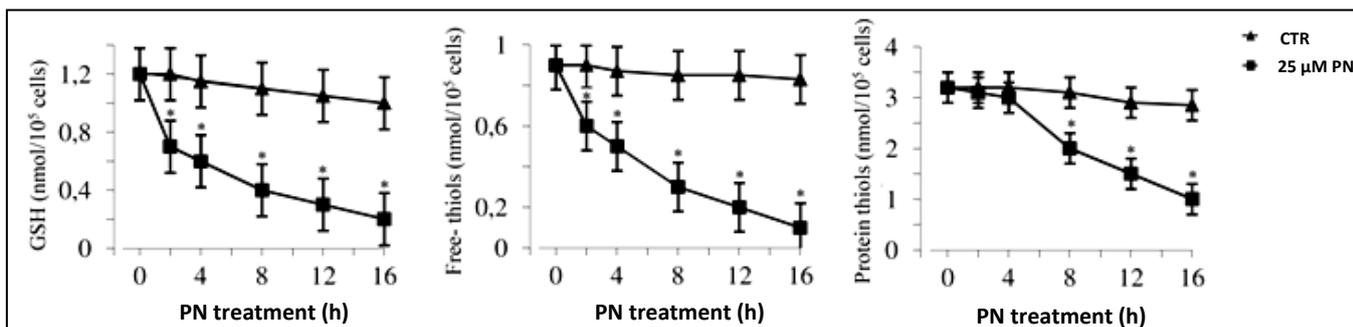


Figura 10: Il PN induce un decremento dei gruppi tiolici e del GSH. Le cellule sono state trattate per diversi tempi con PN 25 μM . Al termine i gruppi tiolici liberi e proteici ed il GSH sono stati dosati mediante un saggio colorimetrico, come descritto in Materiali e Metodi. In ascissa è riportata la durata del trattamento, in ordinata la concentrazione dei gruppi tiolici e del GSH espressa come $\text{nmol}/10^5$ cellule. I risultati sono la media di tre esperimenti \pm S.E. * $P < 0,01$ rispetto al controllo incubato con il solo veicolo.

EFFETTI DEL PN SU NF- κ B

È noto che il PN esercita un effetto inibitorio sul fattore di trascrizione NF- κ B, il quale svolge un importante ruolo nella sopravvivenza, nell'angiogenesi e nello sviluppo di metastasi. Nelle cellule di carcinoma mammario triplo negativo, quali le MDA-MB231, questo fattore di trascrizione risulta particolarmente attivo, pertanto l'impiego di composti in grado inibirlo rappresenta una strategia efficace contro questa forma tumorale (Nakshatri et al., 1997). Per studiare l'effetto esercitato dal PN su NF- κ B nelle cellule MDA-MB231 è stato impiegato uno specifico kit che consente di valutare l'attività di legame al DNA di p65, una delle principali subunità che compongono questo fattore di trascrizione. È stato quindi valutato l'effetto di diverse dosi di composto per 16 h; impiegando la dose 4 μM già si cominciano ad osservare degli effetti, in quanto l'attività di p65 si riduce di circa il 30% rispetto al controllo, l'effetto inibitorio risulta particolarmente evidente con la dose 50 μM , che riduce l'attività di p65 del 75% (Fig. 11 A). Inoltre analisi di western blotting hanno evidenziato che il PN 25 μM dopo 16 h di trattamento riduce consistentemente il livello di p65 (Fig. 11 B). È stato documentato che l'attività di NF- κ B può essere modulata dai ROS, infatti tali molecole possono ossidare una cisteina presente sulla subunità p65 di questo fattore di trascrizione, impedendone il legame al DNA (Morgan et al., 2011). Pertanto per valutare se l'inibizione di NF- κ B potesse essere correlata all'incremento dei ROS

indotto dal PN, sono stati condotti alcuni esperimenti impiegando il NAC, che come è possibile vedere nella figura, è in grado di prevenire sia l'inibizione dell'attività di legame al DNA di NF-kB, che il decremento di p65 indotto dal PN (Fig. 11 A e B).

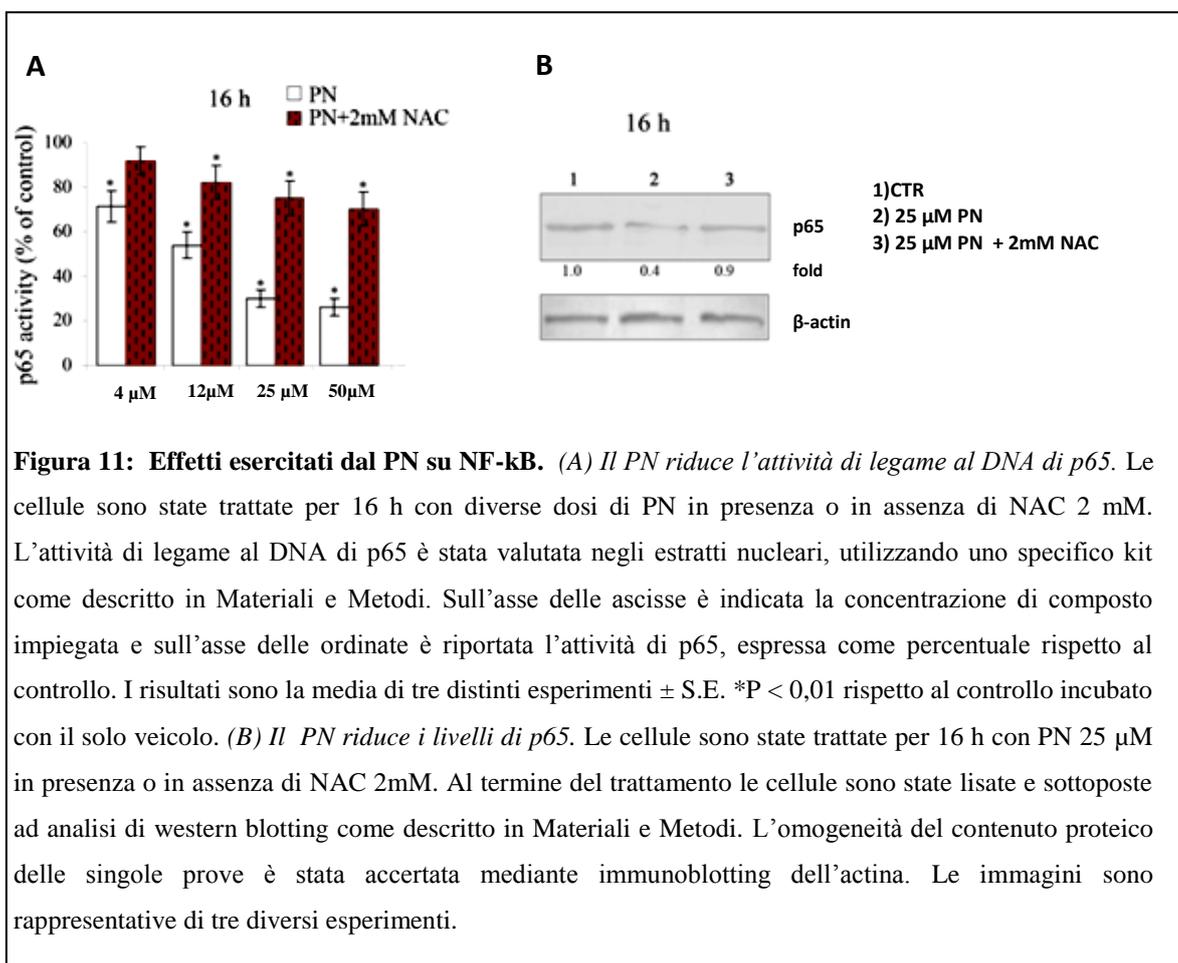


Figura 11: Effetti esercitati dal PN su NF-kB. (A) Il PN riduce l'attività di legame al DNA di p65. Le cellule sono state trattate per 16 h con diverse dosi di PN in presenza o in assenza di NAC 2 mM. L'attività di legame al DNA di p65 è stata valutata negli estratti nucleari, utilizzando uno specifico kit come descritto in Materiali e Metodi. Sull'asse delle ascisse è indicata la concentrazione di composto impiegata e sull'asse delle ordinate è riportata l'attività di p65, espressa come percentuale rispetto al controllo. I risultati sono la media di tre distinti esperimenti \pm S.E. *P < 0,01 rispetto al controllo incubato con il solo veicolo. (B) Il PN riduce i livelli di p65. Le cellule sono state trattate per 16 h con PN 25 μ M in presenza o in assenza di NAC 2mM. Al termine del trattamento le cellule sono state lisate e sottoposte ad analisi di western blotting come descritto in Materiali e Metodi. L'omogeneità del contenuto proteico delle singole prove è stata accertata mediante immunoblotting dell'actina. Le immagini sono rappresentative di tre diversi esperimenti.

IL PARTENOLIDE CAUSA DISSIPAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE E NECROSI DELLE CELLULE

È noto che i ROS possono ossidare i gruppi tiolici di alcune proteine localizzate nella membrana mitocondriale, favorendo la formazione di pori e determinando quindi una depolarizzazione del mitocondrio (Petronilli et al., 1994), inoltre è stato dimostrato che l'accumulo di GSH ossidato favorisce la formazione di tali pori (Halestrap et al., 2009). Pertanto, poiché i risultati ottenuti hanno dimostrato che il PN induce la produzione di ROS con conseguente caduta dei livelli del GSH, è stato valutato se questo composto potesse determinare una caduta del potenziale di membrana mitocondriale. Il $\Delta\Psi_m$ è stato valutato impiegando il JC1, un catione lipofilo che viene attratto dalle cariche negative presenti nella matrice dei mitocondri con potenziale di membrana integro,

all'interno di questo spazio ristretto questa molecola polimerizza emettendo fluorescenza rossa (J-aggregati). Quando il mitocondrio va incontro ad eventi di depolarizzazione JC1 si accumula prevalentemente nel citosol dove si trova in forma monomeric ed emette fluorescenza verde. Per valutare il $\Delta\Psi_m$ le cellule sono state trattate con PN 25 μM per diversi tempi, dopo circa 4 h di incubazione con il composto prevale la colorazione rossa, indice di un potenziale di membrana integro, prolungando il trattamento la colorazione verde incrementa fino a raggiungere un picco a 16 h, quando la maggior parte delle cellule presenta una dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale. Anche questo effetto viene prevenuto dal NAC, indicando il coinvolgimento dei ROS nella depolarizzazione del mitocondrio (Fig. 12).

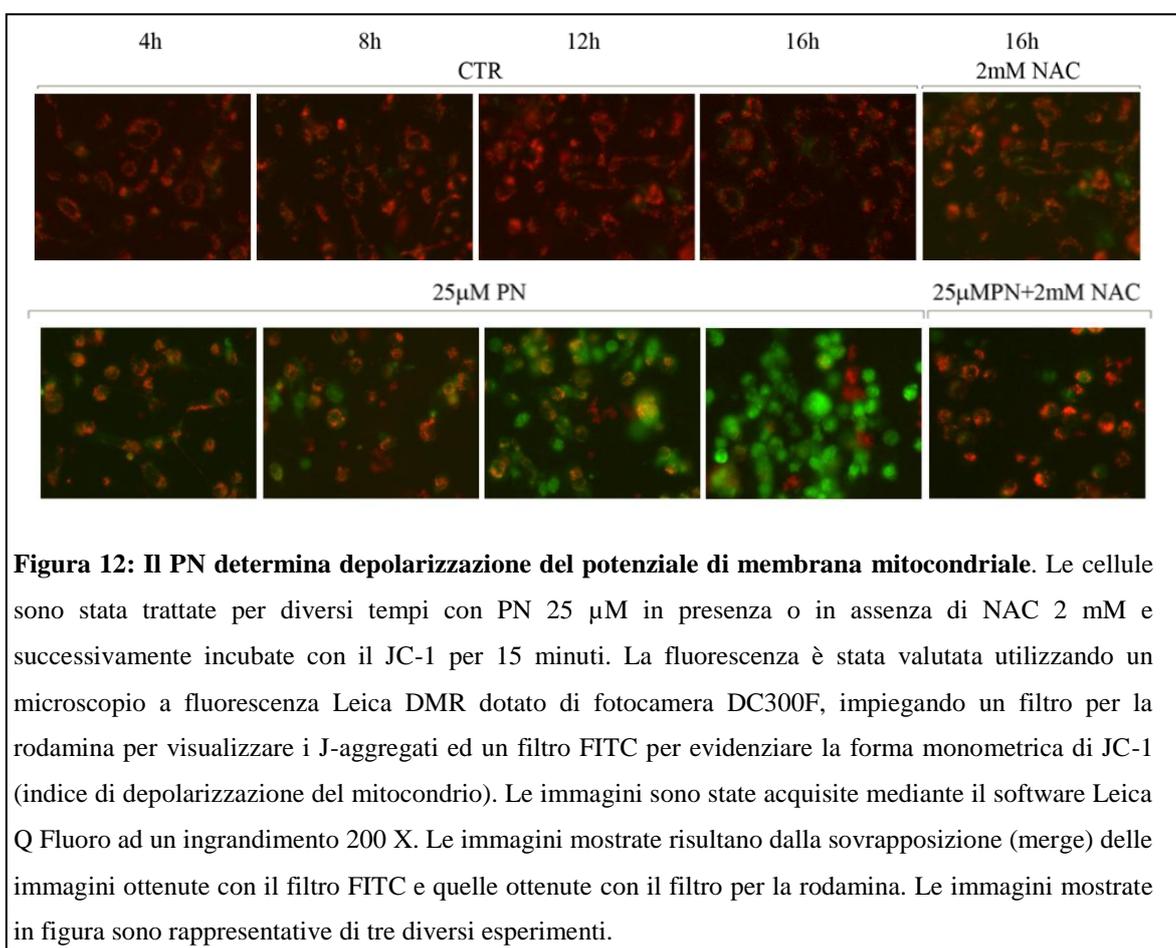
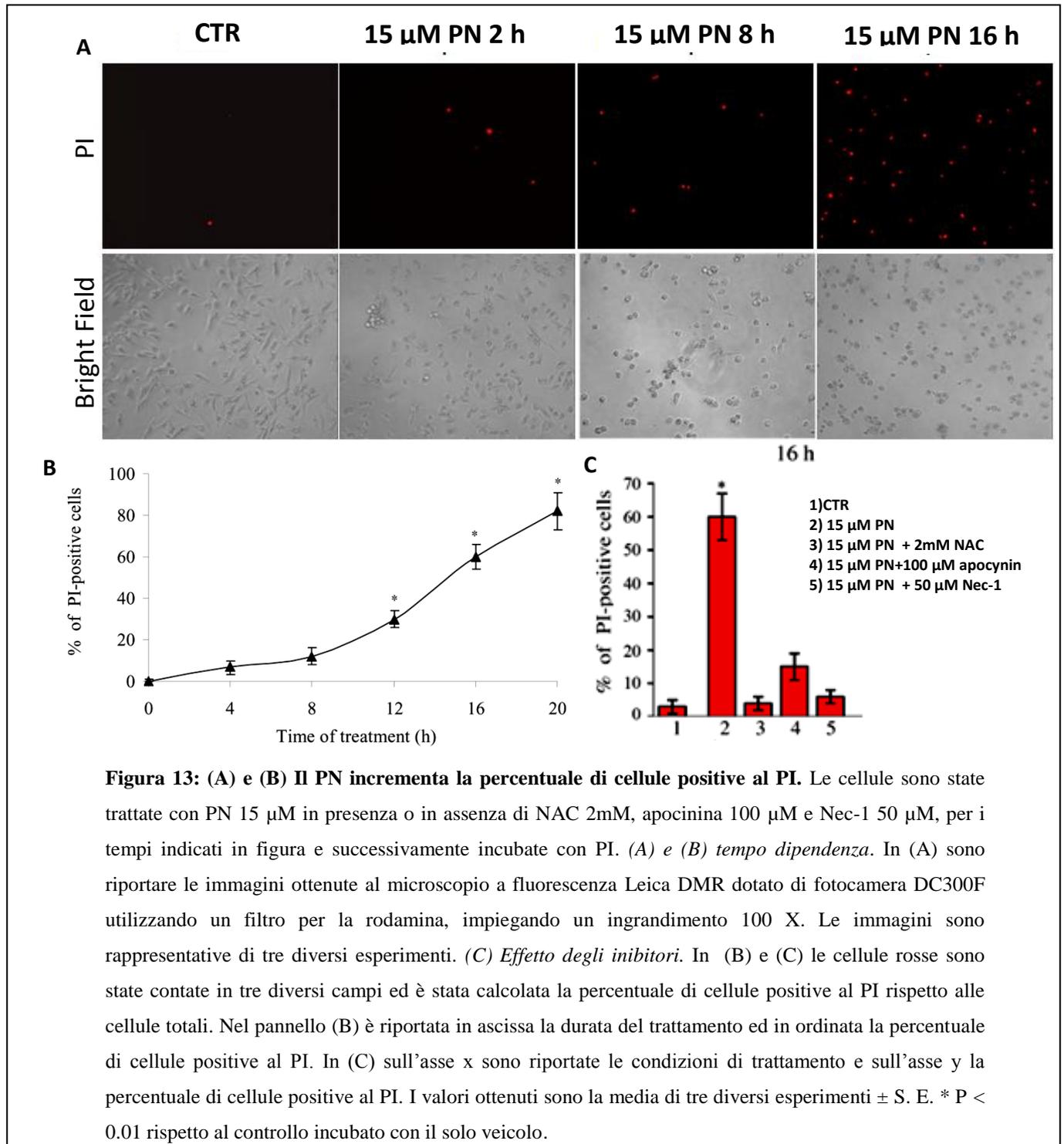


Figura 12: Il PN determina depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale. Le cellule sono stata trattate per diversi tempi con PN 25 μM in presenza o in assenza di NAC 2 mM e successivamente incubate con il JC-1 per 15 minuti. La fluorescenza è stata valutata utilizzando un microscopio a fluorescenza Leica DMR dotato di fotocamera DC300F, impiegando un filtro per la rodamina per visualizzare i J-aggregati ed un filtro FITC per evidenziare la forma monomeric di JC-1 (indice di depolarizzazione del mitocondrio). Le immagini sono state acquisite mediante il software Leica Q Fluoro ad un ingrandimento 200 X. Le immagini mostrate risultano dalla sovrapposizione (merge) delle immagini ottenute con il filtro FITC e quelle ottenute con il filtro per la rodamina. Le immagini mostrate in figura sono rappresentative di tre diversi esperimenti.

Al fine di verificare se il PN fosse in grado di determinare eventi necrotici nelle cellule MDA-MB231, dopo il trattamento con questo composto, le cellule sono state colorate con PI, un colorante che penetra esclusivamente all'interno di cellule con membrana danneggiata, che sono considerate necrotiche o in apoptosi tardiva, colorando il nucleo in rosso. Valutando l'effetto del PN 15 μM nel tempo si osserva nelle prime 8 h una

debole positività al PI, mentre in una fase successiva la percentuale di cellule rosse aumenta progressivamente, raggiungendo un picco dopo 20 h di trattamento (80%) (Fig. 13 A e B). Questo effetto viene annullato dal NAC e dalla Nec-1, confermando il ruolo centrale dei ROS e di RIP-1 nell'evento necrotico indotto dal PN (Fig. 13 C).



IL PN DETERMINA AUTOFAGIA

Al fine di precisare il meccanismo d'azione del PN nelle cellule MDA-MB231 è stata valutata la presenza di segni di autofagia mediante colorazione con monodansilcadaverina (MDC). La MDC è un colorante fluorescente verde che si accumula all'interno dei vacuoli autofagici determinando la presenza di una serie di spot verdi all'interno della cellula. Osservando le cellule al microscopio a fluorescenza dopo trattamento con PN 15 μM per diversi intervalli di tempo si osserva che, già dopo 1 h, un'elevata percentuale di cellule (65%) risulta positiva alla MDC; questa percentuale si mantiene elevata durante le prime 8 h di incubazione (80%), e decrementa prolungando il trattamento fino a 16 h (40%) (Fig. 13 A e B). Il coinvolgimento dell'autofagia nel meccanismo indotto dal PN è stato confermato da analisi di western blotting, condotte per valutare i livelli di due noti marker autofagici: LC3 e beclina-1. La proteina LC3 può essere presente in due forme: LC3I ed LC3II. Durante l'evento autofagico la proteina LC3I subisce un taglio proteolitico da parte della proteasi Atg4 e viene successivamente coniugata con la fosfatidiletanolamina dagli enzimi Atg3 e Atg7, si ottiene così la forma LC3II che si associa alla membrana dell'autofagosoma. La beclina-1 invece forma un complesso con la PI3K III, tale complesso interviene nella maturazione dell'autofagosoma (Pyo et al., 2012). Come è possibile osservare in Fig. 13 D, il PN incrementa il livello di LC3II in modo dose dipendente, infatti gli effetti si osservano già con la dose 15 μM e incrementano ulteriormente con le dosi più elevate (25 e 50 μM). Inoltre gli studi condotti impiegando la dose 25 μM per diversi tempi mostrano un effetto particolarmente evidente dopo 2 h di trattamento. Anche il livello della beclina-1 incrementa in modo dose-dipendente, raggiungendo un picco dopo 2 h di trattamento (Fig. 13 D). È interessante sottolineare che tutti i segni di autofagia osservati nelle cellule incubate con PN vengono prevenuti dalla 3-metiladenina e dalla wortmannina. La prima è un inibitore della PI3KIII, una chinasi notoriamente coinvolta nell'evento autofagico. La wortmannina invece è un inibitore generale di tutte le isoforme della PI3K. Inoltre l'autofagia indotta dal PN viene contrastata dall'SP600125 e dalla Nec-1, suggerendo il coinvolgimento di JNK e di RIP-1 nell'evento autofagico (Fig. 13 C e D).

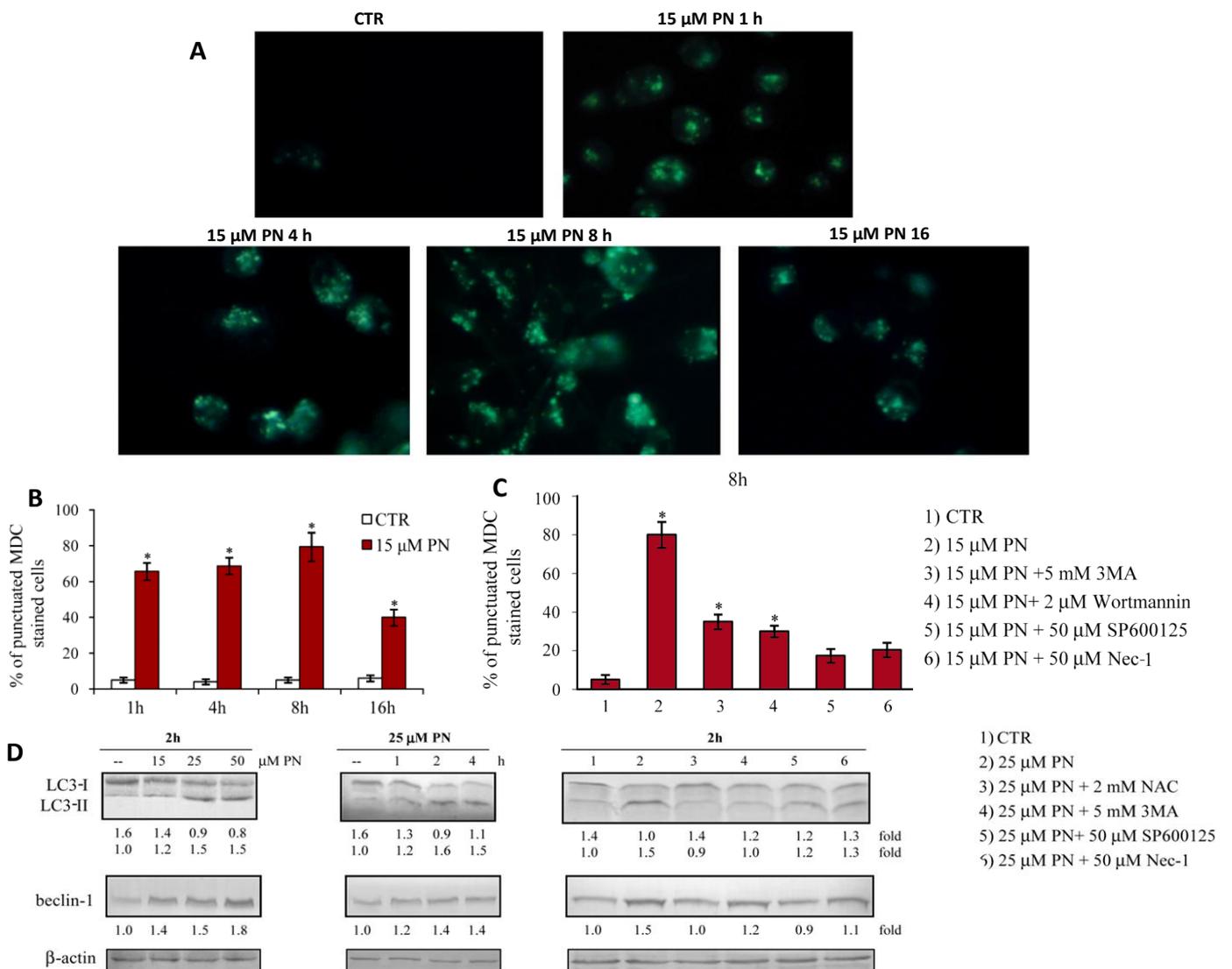


Figura 13: Il PN determina autofagia nelle cellule MDA-MB231. (A-C) Valutazione della comparsa di vacuoli autofagici. Le cellule sono state trattate con PN 15 μM per diversi tempi in presenza ed in assenza di 3MA 5 mM, wortmannina 2 μM, SP600125 50 μM, Nec-1 50 μM. Al termine sono state incubate con MDC 50 μM per 10 min. La fluorescenza è stata evidenziata mediante un microscopio a fluorescenza Leica DMR dotato di fotocamera DC300F impiegando un filtro FITC. Sono state acquisite le immagini in 5 campi per condizione con un ingrandimento 400 X. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti diversi. (B) Quantificazione delle cellule positive alla MDC. Le cellule sono state contate ed è stata valutata la percentuale di cellule positive alla MDC rispetto alle cellule totali. Sull'asse delle ascisse è riportata la durata del trattamento, sull'asse delle ordinate è indicata la percentuale di cellule positive alla MDC. (C) Effetto degli inibitori sulla percentuale di cellule positive alla MDC. In ascissa sono indicati i composti impiegati ed in ordinata la percentuale di cellule positive alla MDC. In (B) e in (C) i valori sono la media di tre diversi esperimenti ± S. E. * P < 0.01 rispetto al controllo incubato con il solo veicolo. (D) Effetti del PN sul livello di LC3 e beclina-1. Le cellule sono state trattate con diverse dosi di PN per diversi tempi in presenza o in assenza degli inibitori indicati in figura. Al termine del trattamento le cellule sono state lisate e sottoposte ad analisi di western blotting come descritto in Materiali e Metodi. L'omogeneità del contenuto proteico delle singole prove è stata accertata mediante immunoblotting dell'actina. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti differenti.

DISCUSSIONE

I dati riportati in questa tesi si inseriscono in una più ampia linea di ricerca, condotta presso il laboratorio di Biochimica del Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNeC, ora STEBICEF) dell'Università degli Studi di Palermo. Da lungo tempo presso questo laboratorio vengono studiati gli effetti del PN su diverse linee di cellule tumorali umane al fine di delucidarne la modalità d'azione. Il PN è un composto di origine naturale appartenente alla famiglia dei sesquiterpeni lattoni, che negli ultimi anni ha attratto l'attenzione della comunità scientifica in virtù della sua particolare azione citotossica sulle cellule tumorali, mentre presenta scarsa tossicità nei confronti delle cellule normali. Tali osservazioni sperimentali hanno indicato il PN come un composto antitumorale molto promettente (Ghantous et al., 2013).

Lo studio presentato in questa tesi si è proposto di valutare gli effetti citotossici e chiarire il meccanismo d'azione del PN in cellule di carcinoma mammario umano MDA-MB231.

Le cellule MDA-MB231 rappresentano un modello di carcinoma del seno triplo negativo, una forma particolarmente aggressiva e metastatica, resistente alle terapie tradizionalmente impiegate per la cura del carcinoma mammario (Reis Filho et al., 2008). Pertanto è di fondamentale importanza la messa a punto di strategie terapeutiche efficaci nei confronti di tale forma tumorale.

Le cellule MDA-MB231 si sono rivelate particolarmente sensibili all'azione del PN, il quale è in grado di determinare chiari effetti sulla vitalità cellulare in modo dose e tempo dipendente. I risultati degli esperimenti condotti suggeriscono una particolare efficacia del PN 25 μM , dose che è stata impiegata per effettuare gli esperimenti riportati nella tesi. Per alcuni esperimenti, quali il dosaggio dello ione calcio, la determinazione dei ROS, la valutazione dell'autofagia tramite l'impiego della MDC e della morte per necrosi mediante colorazione con PI, i risultati riportati sono stati ottenuti con la concentrazione 15 μM , in quanto impiegando questa dose si riescono ad apprezzare meglio le differenze tra le diverse condizioni di trattamento.

Osservando le cellule al microscopio ottico si osserva che il PN determina profonde alterazioni della morfologia cellulare, infatti già dopo soltanto 4 h di incubazione un'elevata percentuale di cellule assume una morfologia tondeggianti e comincia a staccarsi dal substrato.

I risultati ottenuti evidenziano inoltre che alla base del meccanismo d'azione del PN nelle cellule MDA-MB231 vi è l'induzione di stress ossidativo. Già dopo poche ore di trattamento questo composto induce infatti una consistente produzione di ROS, tra cui l'anione superossido. Alla luce di questi risultati sono state condotte ulteriori indagini per individuare l'origine dei ROS, a tale proposito sono stati impiegati alcuni inibitori quali l'apocinina (inibitore della NADPH ossidasi), il rotenone (inibitore del complesso I della fosforilazione ossidativa), lo FCCP (una molecola disaccoppiante) e il BAPTA-AM (un chelante del calcio). I risultati ottenuti hanno chiaramente mostrato che dopo poche ore di trattamento la produzione dei ROS e dell'anione superossido è contrastata dall'apocinina, suggerendo, in accordo con quanto documentato da Sun et al. e da Wang et al. (Sun et al., 2010; Wang et al., 2006), che in questa fase il PN attiva la NOX. In una seconda fase di trattamento (8-16 h) i ROS vengono invece prodotti prevalentemente a livello della catena respiratoria mitocondriale, infatti la loro produzione viene inibita dall'aggiunta di FCCP e rotenone.

I dati sperimentali suggeriscono che l'attivazione della NADPH ossidasi indotta dal PN possa dipendere dall'intervento della chinasi ERK. È noto infatti che l'espressione di questa attività può essere stimolata in seguito all'attivazione della via di ERK (Moon et al., 2010). Inoltre è stato dimostrato che pERK può fosforilare la subunità p47 della NOX, consentendo l'attivazione di questo complesso multienzimatico (Dewas et al., 2000). Il coinvolgimento di pERK nel meccanismo d'azione del PN è stato confermato da analisi di western blotting che mostrano un incremento della forma fosforilata e quindi attiva di questa chinasi. Anche lo ione calcio ha un ruolo nell'attivazione della NOX indotta dal PN, infatti sia la produzione dei ROS, sia la produzione dell'anione superossido vengono inibite dal BAPTA-AM. Il calcio potrebbe determinare questo effetto mediante attivazione della PKC, dati presenti in letteratura infatti dimostrano che tale chinasi può favorire l'attivazione della NOX mediante fosforilazione della subunità p47. Inoltre mediante eventi di fosforilazione la pkC può contribuire all'attivazione della subunità RAC-1 della NOX (Brechard et al., 2008). Infine è nota l'esistenza di un'isoforma della NOX sensibile al calcio: la NOX5 (Paletta-Silva et al., 2013). Il coinvolgimento dello ione calcio nel meccanismo d'azione del PN ha trovato conferma nei dati sperimentali che ne hanno evidenziato un consistente incremento già dopo 30 min-1h di trattamento.

Questi risultati sono in linea con quanto documentato da Riganti et al., i quali hanno dimostrato che il PN può incrementare i livelli del calcio esercitando un effetto inibitorio sui canali SERCA, che gestiscono il trasporto del calcio nel reticolo endoplasmatico (Riganti et al., 2009).

I ROS prodotti in seguito al trattamento con il PN svolgono un ruolo centrale nel meccanismo d'azione del composto, infatti gran parte degli effetti indotti dal PN vengono annullati dalla molecola antiossidante NAC. Tra le conseguenze dello stress ossidativo vi sono: 1) la riduzione della vitalità; 2) le alterazioni morfologiche; 3) il decremento dei gruppi tiolici liberi e proteici e del GSH, evento che contribuisce a ridurre le difese antiossidanti della cellula; 4) l'attivazione della chinasi JNK, una chinasi notoriamente attivata dallo stress, coinvolta in eventi di morte cellulare programmata (Seki et al., 2012); 5) l'inibizione dell'attività di legame al DNA di NF- κ B, un fattore di trascrizione che media eventi di sopravvivenza cellulare (Baldwin et al., 2001).

Dopo lunghi intervalli di trattamento con il PN (16 h) il persistente stress ossidativo e la conseguente deplezione del GSH determinano l'apertura di pori nella membrana mitocondriale, alterandone la permeabilità e determinando una dissipazione del $\Delta\Psi_m$. È stato ampiamente dimostrato infatti che nella membrana mitocondriale sono presenti delle proteine che in risposta a specifici stimoli formano il poro di transizione per la permeabilità mitocondriale (PTP, Permeability Transition Pore). Queste proteine contengono dei gruppi tiolici che possono essere ossidati dai ROS, determinando l'apertura del PTP. Inoltre l'accumulo della forma ossidata del GSH favorisce l'apertura di tale poro (Halestrap et al., 1998; Chernyak et al., 1997).

Un'altra conseguenza dello stress ossidativo è la comparsa di segni di autofagia, questo dato è particolarmente interessante in quanto fino ad ora non è mai stato documentato un rapporto tra PN ed eventi autofagici. Anche l'autofagia è un evento molto precoce, già dopo poche ore di trattamento si osserva infatti la comparsa di vacuoli autofagici, evidenziati mediante la colorazione con MDC. Una conferma di tale dato è stata ottenuta valutando la conversione della proteina LC3 dalla forma LC3I alla forma LC3II e l'incremento della beclina-1, noti marker autofagici (Yang et al., 2009). I dati ottenuti hanno anche evidenziato che l'incremento di LC3II e beclina-1 vengono contrastati dal NAC, suggerendo il coinvolgimento dei ROS nella comparsa di segni di autofagia indotta dal PN. Questi dati sono in accordo con quanto dimostrato da Scherz-Shouval et

al., i quali hanno evidenziato un coinvolgimento dei ROS nell'induzione dell'evento autofagico (Scherz-Shouval et al., 2007). La comparsa di segni autofagici osservata in seguito al trattamento con il PN potrebbe anche essere correlata all'intervento delle chinasi JNK e RIP-1. Dati recenti hanno infatti documentato che JNK svolge un ruolo attivo nell'evento autofagico, promuovendo il rilascio e la trascrizione della beclina-1 (Wei et al., 2008; Park et al., 2009), ma anche incrementando i livelli di LC3 (Sun et al., 2011) e di p62, una proteina strutturale dell'autofagosoma (Puissant et al., 2010).

Non è stato ancora del tutto chiarito invece come RIP-1 determina autofagia, alcuni studi recenti suggeriscono che tale evento sia correlato alla capacità di questa proteina di indurre una condizione di stress ossidativo, con conseguenti danni a livello del DNA. Si attiverebbero così meccanismi di riparazione di questo acido nucleico che prevedono il coinvolgimento della PARP. L'attivazione della PARP comporta un consumo di ATP e NADPH, con conseguente deficit energetico in seguito al quale si attiva l'evento autofagico, nel tentativo di ricavare energia dalla digestione del contenuto cellulare (Zhang et al., 2011).

I dati riportati in questa tesi dimostrano anche che i segni di autofagia sono particolarmente evidenti in una prima fase di incubazione delle cellule MDA-MB231 con il PN (1-8 h), e decrementano prolungando il trattamento fino a 16 h. Dopo 16 h invece si manifestano prevalentemente segni di necroptosi, una forma di necrosi programmata. La presenza di un meccanismo di tipo necrotico è stata evidenziata mediante il saggio dell'annessina V/PI e successivamente confermato mediante osservazione al microscopio a fluorescenza dopo colorazione con PI. Questi esperimenti evidenziano un incremento della frazione di cellule positive al PI, indice di un evento necrotico. Un'ulteriore conferma di questo dato è stata ottenuta impiegando la necrostatina-1 (Nec-1), noto inibitore della chinasi RIP-1, una proteina chiave della necroptosi (Kroemer et al., 2009). I dati ottenuti evidenziano infatti che la Nec-1 previene gli effetti citotossici del PN ed inibisce la morte per necrosi osservata dopo incubazione con il composto.

Il coinvolgimento di RIP-1 nell'evento di morte indotto dal PN è confermato da analisi di western blotting. Il livello di questo fattore infatti incrementa dopo trattamento con PN, un evento che potrebbe essere correlato alla mancata degradazione di tale proteina da parte della caspasi-8 a livello del ripotosoma. Infatti i risultati mostrano che il PN induce un decremento del livello della pro-caspasi 8 che non si associa alla comparsa

dei frammenti attivi. Inoltre si osserva un incremento dei livelli di FLIPs, che potrebbe essere responsabile dell'inibizione della caspasi 8 attiva. Come è noto, quando la caspasi 8 è assente o inibita (per esempio da FLIP_S), RIP-1 si accumula e attiva la necroptosi (Feoktistova et al., 2011). È interessante osservare che il trattamento con PN causa anche un decremento di FADD, una molecola adattatrice che consente di reclutare le componenti del riopotosoma. Il decremento di FADD nelle condizioni sperimentali osservate potrebbe impedire l'assemblaggio del riopotosoma e l'eventuale degradazione di RIP-1 a livello di questo complesso.

L'attivazione di un meccanismo di morte caspasi-indipendente da parte del PN è confermata anche dall'osservazione che gli effetti citotossici indotti da questo composto non sono contrastati dall'inibitore generale delle caspasi zVAD. Gli studi condotti hanno inoltre evidenziato che il decremento dei livelli delle pro-caspasi 3, 9 e 8, non si accompagna alla comparsa dei corrispondenti frammenti attivi.

In conclusione il PN determina effetti citotossici sulle cellule MDA-MB231 mediante un meccanismo caspasi-indipendente che può essere suddiviso in due fasi. La prima fase (1-8 h) prevede un rapido e consistente incremento dei ROS, che sono responsabili di diversi effetti indotti dal PN, quali la comparsa di segni di autofagia. In una seconda fase (dopo 16 h) il persistente stress ossidativo e la deplezione del GSH compromettono la funzionalità mitocondriale con conseguente comparsa di segni di necrosi, che si accompagnano all'attivazione di RIP-1. Complessivamente i risultati ottenuti suggeriscono che il PN potrebbe essere un buon candidato per il trattamento del carcinoma mammario triplo negativo.

BIBLIOGRAFIA

- Anders C, Carey LA. **Understanding and treating triple-negative breast cancer.** *Oncology*. 2008; 22:1233-1239.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. **Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species.** *Biochemistry (Mosc)*. 2005; 70:200-214.
- Arbouzova NI, Zeidler MP. **JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions.** *Development*. 2006; 133:2605-2616.
- Baldwin AS. **Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB.** *J Clin Invest*. 2001; 107:241-246.
- Baritaud M, Cabon L, Delavallée L, Galán-Malo P, Gilles ME, Brunelle-Navas MN, Susin SA. **AIF-mediated caspase-independent necroptosis requires ATM and DNA-PK-induced histone H2AX Ser139 phosphorylation.** *Cell Death Dis*. 2012; 3:e390.
- Bartosz G. **Reactive oxygen species: destroyers or messengers?** *Biochem Pharmacol*. 2009; 77:1303-1315.
- Bedard K, Krause KH. **The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.** *Physiol Rev*. 2007; 87:245-313.
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. **SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:13681-1366.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. **Oxidative stress and antioxidant defense.** *World Allergy Organ J*. 2012; 5:9-19

Bork PM, Schmitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. **Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB.** *FEBS Lett.* 1997; 402:85-90.

Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Viña JR, Lluch A. **Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research.** *Cancer Treat Rev.* 2010; 36:206-215.

Brécharard S, Tschirhart EJ. **Regulation of superoxide production in neutrophils: role of calcium influx.** *J Leukoc Biol.* 2008; 84:1223-1237.

Bromberg J. **Stat proteins and oncogenesis.** *J Clin Invest.* 2002; 109:1139-1142.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. **Regulation of cancer cell metabolism.** *Nat Rev Cancer.* 2011; 11:85-95.

Carlisi D, D'Anneo A, Angileri L, Lauricella M, Emanuele S, Santulli A, Vento R, Tesoriere G. **Parthenolide sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by inducing the expression of death receptors through inhibition of STAT3 activation.** *J Cell Physiol.* 2011; 226:1632-1641.

Chao DT, Korsmeyer SJ. **BCL-2 family: regulators of cell death.** *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:395-419.

Cherniak B V. **Redox Regulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore.** *Bioscience Reports.* 1997; 17:293-302.

Chen JQ, Russo J. **ERalpha-negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches.** *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1796:162-175.

Cheng G, Xie L. **Parthenolide induces apoptosis and cell cycle arrest of human 5637 bladder cancer cells in vitro.** *Molecules.* 2011; 16:6758-6768.

Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. **Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation.** *Cell*. 2009; 137:1112-1123.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. **Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited.** *Cell Mol Biol Lett*. 2006; 11:506-525.

Christofferson DE, Yuan J. **Necroptosis as an alternative form of programmed cell death.** *Curr Opin Cell Biol*. 2010; 22:263-268.

Collier HO, Butt NM, McDonald-Gibson WJ, Saeed SA. **Extract of feverfew inhibits prostaglandin biosynthesis.** *Lancet*. 1980; 2:922-923.

Curry EA 3rd, Murry DJ, Yoder C, Fife K, Armstrong V, Nakshatri H, O'Connell M, Sweeney CJ. **Phase I dose escalation trial of feverfew with standardized doses of parthenolide in patients with cancer.** *Invest New Drugs*. 2004; 22:299-305.

D'Anneo A, Carlisi D, Lauricella M, Emanuele S, Di Fiore R, Vento R, Tesoriere G. **Parthenolide induces caspase-independent and AIF-mediated cell death in human osteosarcoma and melanoma cells.** *J Cell Physiol*. 2013; 228:952-967.

Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. **RIP kinases at the crossroads of cell death and survival.** *Cell*. 2009; 138:229-232.

Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. **Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins.** *Nat Chem Biol*. 2008; 4:313-321.

Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J. **The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils.** *J Immunol*. 2000; 165:5238-5244.

Dhanasekaran DN, Reddy EP. **JNK signaling in apoptosis.** *Oncogene*. 2008; 27:6245-6251.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. **Caspase family proteases and apoptosis.** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2005; 37:719-727.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. **Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase.** *J Biol Chem*. 1998; 273:18623-18632.

Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu DE, Hoti N, Castanares M, Wu M. **Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain.** *Cell Signal*. 2007; 19:2056-2067.

Feoktistova M, Geserick P, Kellert B, Dimitrova DP, Langlais C, Hupe M, Cain K, MacFarlane M, Häcker G, Leverkus M. **cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms.** *Mol Cell*. 2011; 43:449-463.

Ferrajoli A, Faderl S, Ravandi F, Estrov Z. **The JAK-STAT pathway: a therapeutic target in hematological malignancies.** *Curr Cancer Drug Targets*. 2006; 6:671-679.

Fonrose X, Ausseil F, Soleilhac E, Masson V, David B, Pouny I, Cintrat JC, Rousseau B, Barette C, Massiot G, Lafanechère L. **Parthenolide inhibits tubulin carboxypeptidase activity.** *Cancer Res*. 2007; 67:3371-3378.

Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, Ohno Y, Yamashita K, Akao S, Fujiwara H. **Inhibition by parthenolide of phorbol ester-induced transcriptional activation of inducible nitric oxide synthase gene in a human monocyte cell line THP-1.** *Biochem Pharmacol*. 2000; 60:595-600.

Galluzzi L, Kroemer G. **Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis.** *Cell*. 2008; 135:1161-1163.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. **Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012.** *Cell Death Differ*. 2012; 19:107-120.

García-Piñeres AJ, Castro V, Mora G, Schmidt TJ, Strunck E, Pahl HL, Merfort I. **Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones.** *J Biol Chem*. 2001; 276:39713-39720.

Ghantous A, Sinjab A, Herceg Z, Darwiche N. **Parthenolide: from plant shoots to cancer roots.** *Drug Discov Today*. 2013; 18:894-905.

Gilcrease MZ, Zhou X, Welch K. **Adhesion-independent alpha6beta4 integrin clustering is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase.** *Cancer Res*. 2004; 64:7395-7398.

Gopal YN, Arora TS, Van Dyke MW. **Parthenolide specifically depletes histone deacetylase 1 protein and induces cell death through ataxia telangiectasia mutated.** *Chem Biol*. 2007; 14:813-823.

Gopal YN, Chanchorn E, Van Dyke MW. **Parthenolide promotes the ubiquitination of MDM2 and activates p53 cellular functions.** *Mol Cancer Ther*. 2009; 8:552-562.

Gurtner A, Starace G, Norelli G, Piaggio G, Sacchi A, Bossi G. **Mutant p53-induced up-regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 3 contributes to gain of function.** *J Biol Chem*. 2010; 285:14160-14169.

Gutowski M., Kowalczyk S. **A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance.** *Acta Biochim Pol.* 2013; 60:1-16.

Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L, Li X, Peterson DR, Howard DS, Jordan CT. **The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells.** *Blood.* 2005; 105:4163-4169.

Guzman ML, Rossi RM, Neelakantan S, Li X, Corbett CA, Hassane DC, Becker MW, Bennett JM, Sullivan E, Lachowicz JL, Vaughan A, Sweeney CJ, Matthews W, Carroll M, Liesveld JL, Crooks PA, Jordan CT. **An orally bioavailable parthenolide analog selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells.** *Blood.* 2007; 110:4427-4435.

Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. **Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart.** *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics.* 1998; 1366:79–94.

Halestrap AP. **What is the mitochondrial permeability transition pore?** *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 46:821-831.

Hayashi S, Koshiha K, Hatashita M, Sato T, Jujo Y, Suzuki R, Tanaka Y, Shioura H. **Thermosensitization and induction of apoptosis or cell-cycle arrest via the MAPK cascade by parthenolide, an NF- κ B inhibitor, in human prostate cancer androgen-independent cell lines.** *Int J Mol Med.* 2011; 28:1033-1042.

Hehner SP, Heinrich M, Bork PM, Vogt M, Ratter F, Lehmann V, Schulze-Osthoff K, Dröge W, Schmitz ML. **Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta.** *J Biol Chem.* 1998; 273:1288-1297.

Hehner SP, Hofmann TG, Dröge W, Schmitz ML. **The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex.** *J Immunol.* 1999; 163:5617-5623.

Hirsch DS, Shen Y, Wu WJ. **Growth and motility inhibition of breast cancer cells by epidermal growth factor receptor degradation is correlated with inactivation of Cdc42.** *Cancer Res.* 2006; 66:3523-3530.

Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J. **Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway.** *Cell.* 2008; 135:1311-1323.

Hu X, Xuan Y. **Bypassing cancer drug resistance by activating multiple death pathways-a proposal from the study of circumventing cancer drug resistance by induction of necroptosis.** *Cancer Lett.* 2008; 259:127-137.

Hudis CA, Gianni L. **Triple-negative breast cancer: an unmet medical need.** *Oncologist.* 2011; 1:1-11.

Huovinen M, Loikkanen J, Myllynen P, Vähäkangas KH. **Characterization of human breast cancer cell lines for the studies on p53 in chemical carcinogenesis.** *Toxicol In Vitro.* 2011; 25:1007-1017.

Hwang D, Fischer NH, Jang BC, Tak H, Kim JK, Lee W. **Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages correlates with the inhibition of MAP kinases.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 226:810-818.

Johnson ES, Kadam NP, Hylands DM, Hylands PJ. **Efficacy of feverfew as prophylactic treatment of migraine.** *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985; 291:569-573.

Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. **mTOR regulation of autophagy.** *FEBS Lett.* 2010; 584:1287-1295.

Kalyanaraman B. **Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students:Oxidants, antioxidants and disease mechanisms.** *Redox Biol.* 2013; 1:244-257.

Kim JW, Choi EJ, Joe CO. **Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP.** *Oncogene.* 2000; 19:4491-4499.

Kim JH, Liu L, Lee SO, Kim YT, You KR, Kim DG. **Susceptibility of cholangiocarcinoma cells to parthenolide-induced apoptosis.** *Cancer Res.* 2005; 65:6312-6320.

Kim YS, Morgan MJ, Choksi S, Liu ZG. **TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death.** *Mol Cell.* 2007; 26: 6756-6787.

Koppenol WH. **The Haber-Weiss cycle--70 years later.** *Redox Rep.* 2001; 6:229-234.

Kozma SC, Bogaard ME, Buser K, Saurer SM, Bos JL, Groner B, Hynes NE. **The human c-Kirsten ras gene is activated by a novel mutation in codon 13 in the breast carcinoma cell line MDA-MB231.** *Nucleic Acids Res.* 1987; 15:5963-5971.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. **Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** *Cell Death Differ.* 2009; 16:3-11.

Kourtis N, Tavernarakis N. **Autophagy and cell death in model organisms.** *Cell Death Differ.* 2009; 16:21-30.

Kowaltowski AJ, Vercesi AE. **Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress.** *Free Radic Biol Med.* 1999; 26:463-471.

Kreuzaler P, Watson CJ. **Killing a cancer: what are the alternatives?** *Nat Rev Cancer*. 2012; 12:411-424.

Kumarswamy R, Chandna S. **Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them?** *Mitochondrion*. 2009; 9:1-8.

Kuppusamy P, Zweier JL. **Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation.** *J Biol Chem*. 1989; 264:9880-9884.

Kurdi M, Booz GW. **Evidence that IL-6-type cytokine signaling in cardiomyocytes is inhibited by oxidative stress: parthenolide targets JAK1 activation by generating ROS.** *J Cell Physiol*. 2007; 212:424-431.

Kwok BH, Koh B, Ndubuisi MI, Elofsson M, Crews CM. **The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase.** *Chem Biol*. 2001; 8:759-766.

Lauricella M, Ciralo A, Carlisi D, Vento R, Tesoriere G. **SAHA/TRAIL combination induces detachment and anoikis of MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells.** *Biochimie*. 2012; 94:287-299.

Li X, Stark GR. **NF κ B-dependent signaling pathways.** *Exp Hematol*. 2002; 30:285-296.

Lichtner RB, Howlett AR, Lerch M, Xuan JA, Brink J, Langton-Webster B, Schneider MR. **Negative Cooperativity between $\alpha_3\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ Integrins in Human Mammary Carcinoma MDA MB 231 Cells.** *Exp Cell Res*. 1998; 240:368-376.

Liu Z, Liu S, Xie Z, Pavlovicz RE, Wu J, Chen P, Aimiwu J, Pang J, Bhasin D, Neviani P, Fuchs JR, Plass C, Li PK, Li C, Huang TH, Wu LC, Rush L, Wang H, Perrotti D, Marcucci G, Chan KK. **Modulation of DNA methylation by a sesquiterpene lactone parthenolide.** *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 329:505-514.

Liu JW, Cai MX, Xin Y, Wu QS, Ma J, Yang P, Xie HY, Huang DS. **Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells in vitro.** *J Exp Clin Cancer Res.* 2010; 29:108.

Liu Z, Ouyang L, Peng H, Zhang WZ. **Oridonin: targeting programmed cell death pathways as an anti-tumour agent.** *Cell Prolif.* 2012; 45:499-507.

Levine B, Yuan J. **Autophagy in cell death: an innocent convict?** *J Clin Invest.* 2005; 115:2679-2688.

Lotharius J, Brundin P. **Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein.** *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3:932-942.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.

Ma XT, Wang S, Ye YJ, Du RY, Cui ZR, Somsouk M. **Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma.** *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 1569-1573.

Makheja AN, Bailey JM. **A platelet phospholipase inhibitor from the medicinal herb feverfew (*Tanacetum parthenium*).** *Prostaglandins Leukot Med.* 1982; 8:653-660.

Mathema VB, Koh YS, Thakuri BC, Sillanpää M. **Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities.** *Inflammation.* 2012; 35:560-565.

Meléndez A, Levine B. **Autophagy in *C. elegans*.** *WormBook.* 2009; 1-26.

Moon EJ, Sonveaux P, Porporato PE, Danhier P, Gallez B, Batinic-Haberle I, Nien YC, Schroeder T, Dewhirst MW. **NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species**

production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:20477-20482.

Morgan MJ, Liu ZG. **Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling.** *Cell Res.* 2011; 21: 103-115.

Morini M, Mottolese M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, Noonan DM, Natali PG, Albini A. **The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity.** *Int J Cancer.* 2000; 87:336-342.

Munafó DB, Colombo MI. **A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation.** *J Cell Sci.* 2001; 114:3619-3629.

Murakami Y, Miller JW, Vavvas DG. **RIP kinase-mediated necrosis as an alternative mechanisms of photoreceptor death.** *Oncotarget.* 2011; 2:497-509.

Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ Jr, Sledge GW Jr. **Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth.** *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3629–3639.

Nakshatri H, Rice SE, Bhat-Nakshatri P. **Antitumor agent parthenolide reverses resistance of breast cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-Jun N-terminal kinase.** *Oncogene.* 2004; 23:7330-7344.

Naugler WE, Karin M. **NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms.** *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 18:19-26.

Nordgren M, Fransen M. **Peroxisomal metabolism and oxidative stress.** *Biochimie.* 2013 pii: S0300-9084(13)00249-6.

Onozato T, Nakamura CV, Cortez DA, Dias Filho BP, Ueda-Nakamura T. **Tanacetum vulgare: antiherpes virus activity of crude extract and the purified compound parthenolide.** *Phytother Res.* 2009; 23:791-796.

Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. **Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012; 26:711-723.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. **Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis.** *Cell Prolif.* 2012; 45:487-498.

Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A. **Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells.** *Folia Histochem Cytobiol.* 2008; 46:129-135.

Paletta-Silva R, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes JR. **NADPH oxidase biology and the regulation of tyrosine kinase receptorsignaling and cancer drug cytotoxicity.** *Int J Mol Sci.* 2013; 14:3683-3704.

Pareek A, Suthar M, Rathore GS, Bansal V. **Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review.** *Pharmacogn Rev.* 2011; 5:103-110.

Park SM, Yoon JB, Lee TH. **Receptor interacting protein is ubiquitinated by cellular inhibitor of apoptosisproteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro.** *FEBS Lett.* 2004; 566:151-156.

Park KJ, Lee SH, Lee CH, Jang JY, Chung J, Kwon MH, Kim YS. **Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 382:726-729.

Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Bhat-Nakshatri P, Newton TR, Rice S, Gelfanov V, Boswell SH, Goulet RJ Jr, Sledge GW Jr, Nakshatri H. **Paclitaxel sensitivity of**

breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. *Oncogene*. 2000; 19:4159-4169.

Pei S, Jordan CT. **How close are we to targeting the leukemia stem cell?** *Best Pract Res Clin Haematol*. 2012; 25:415-418.

Perez EA, Moreno-Aspitia A, Aubrey Thompson E, Andorfer CA. **Adjuvant therapy of triple negative breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 120:285-291.

Petronilli V, Costantini P, Scorrano L, Colonna R, Passamonti S, Bernardi P. **The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents.** *J Biol Chem*. 1994; 269:16638-16642.

Pope RM. **Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis.** *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:527-535.

Pozarowski P, Halicka DH, Darzynkiewicz Z. **NF-kappaB inhibitor sesquiterpene parthenolide induces concurrently atypical apoptosis and cell necrosis: difficulties in identification of dead cells in such cultures.** *Cytometry A*. 2003; 54:118-124.

Puissant A, Robert G, Fenouille N, Luciano F, Cassuto JP, Raynaud S, Auberger P. **Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation.** *Cancer Res*. 2010; 70:1042-1052.

Puntarulo S and Cederbaum AI. **Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes.** *Free Radic Biol Med*. 1998; 24:1324-1330.

Pyo JO, Nah J, Jung YK. **Molecules and their functions in autophagy.** *Exp Mol Med.* 2012; 44:73-80.

Quan W, Lee MS. **Role of Autophagy in the Control of Body Metabolism.** *Endocrinol Metab.* 2013; 28:6-11.

Reis-Filho JS, Tutt AN. **Triple negative tumours: a critical review.** *Histopathology.* 2008; 52:108-118.

Riganti C, Doublier S, Viarisio D, Miraglia E, Pescarmona G, Ghigo D, Bosia A. **Artemisinin induces doxorubicin resistance in human colon cancer cells via calcium-dependent activation of HIF-1 α and P-glycoprotein overexpression.** *Br J Pharmacol.* 2009; 156:1054–1066.

Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. **EGFR targeting of solid tumors.** *Cancer Control.* 2007; 14:295-304.

Savelli A, Pecorari L, Marsella M, Borgogna-Pignatti C. **Gli antiossidanti nello stress ossidativo della talassemia e dell'anemia falciforme. A che punto siamo?** *Medico e Bambino.* 2008; Volume XI.

Scandalios JG. **Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses.** *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38:995-1014.

Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. **Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4.** *EMBO J.* 2007; 26:1749–1760.

Seki E, Brenner DA, Karin M. **A Liver Full of JNK: Signaling in Regulation of Cell Function and Disease Pathogenesis, and Clinical Approaches.** *Gastroenterology.* 2012; 143:307–320.

Shanmugam R, Kusumanchi P, Cheng L, Crooks P, Neelakantan S, Matthews W, Nakshatri H, Sweeney CJ. **A water-soluble parthenolide analogue suppresses in vivo prostate cancer growth by targeting NFκB and generating reactive oxygen species.** *Prostate*. 2010; 70:1074-1086.

Shanmugam R, Kusumanchi P, Appaiah H, Cheng L, Crooks P, Neelakantan S, Peat T, Klaunig J, Matthews W, Nakshatri H, Sweeney CJ. **A water soluble parthenolide analog suppresses in vivo tumor growth of two tobacco-associated cancers, lung and bladder cancer, by targeting NF-κB and generating reactive oxygen species.** *Int J Cancer*. 2011; 128:2481-2494.

Sheen-Chen SM, Huang CC, Tang RP, Yang CH, Chou FF, Eng HL. **Signal transducer and activator of transcription 1 in breast cancer: analysis with tissue microarray.** *Anticancer Res*. 2007; 27:2481-2486.

Shen HM, Liu ZG. **JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species.** *Free Radic Biol Med*. 2006; 40:928-939.

Sohma I, Fujiwara Y, Sugita Y, Yoshioka A, Shirakawa M, Moon JH, Takiguchi S, Miyata H, Yamasaki M, Mori M, Doki Y. **Parthenolide, an NF-κB inhibitor, suppresses tumor growth and enhances response to chemotherapy in gastric cancer.** *Cancer Genomics Proteomics*. 2011; 8:39-47.

Sies, H. **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants.** *Experimental Physiology* 1997; 82:291-295.

Singh SK, Tang WZ. **Statistical analysis of optimum Fenton oxidation conditions for landfill leachate treatment.** *Waste Manag*. 2013; 33:81-88.

Sobota R, Szwed M, Kasza A, Bugno M, Kordula T. **Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family.** *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 267:329-333.

Song C.H. **Cell Death and Bacterial Infection.** *Bacteriol Virol.* 2013; 43:85-91.

Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. **Oxidative stress and cancer: an overview.** *Ageing Res Rev.* 2013; 12:376-390.

Stearns V, Zhou Q, Davidson NE. **Epigenetic regulation as a new target for breast cancer therapy.** *Cancer Invest.* 2007; 25:659-655.

Stohs SJ. **The role of free radicals in toxicity and disease.** *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1995; 6:205-228.

Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung MC, Bonfiglio T, Hicks DG, Tang P. **The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines.** *Breast Cancer (Auckl).* 2010; 4:35-41.

Sumner H, Salan U, Knight DW, Hoult JR. **Inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase in leukocytes by feverfew. Involvement of sesquiterpene lactones and other components.** *Biochem Pharmacol.* 1992; 43:2313-2320.

Sun X, Yin J, Starovasnik MA, Fairbrother WJ, Dixit VM. **Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3.** *J Biol Chem.* 2002; 277:9505-9511.

Sun J, Trumpower BL. **Superoxide anion generation by the cytochrome bcl complex.** *Arch Biochem Biophys.* 2003; 419:198-206.

Sun Y, St Clair DK, Fang F, Warren GW, Rangnekar VM, Crooks PA, St Clair WH. **The radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells is mediated by nuclear factor-kappaB inhibition and enhanced by the presence of PTEN.** *Mol Cancer Ther.* 2007; 6:2477-2486.

Sun Y, St Clair DK, Xu Y, Crooks PA, St Clair WH. **A NADPH oxidase-dependent redox signaling pathway mediates the selective radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells.** *Cancer Res.* 2010; 70:2880-2890.

Sun T, Li D, Wang L, Xia L, Ma J, Guan Z, Feng G, Zhu X. **c-Jun NH₂-terminal kinase activation is essential for up-regulation of LC3 during ceramide-induced autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells.** *J Transl Med.* 2011; 9:161.

Suvannasankha A, Crean CD, Shanmugam R, Farag SS, Abonour R, Boswell HS, Nakshatri H. **Antimyeloma effects of a sesquiterpene lactone parthenolide.** *Clin Cancer Res.* 2008; 14:1814-1822.

Temkin V, Huang Q, Liu H, Osada H, Pope RM. **Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor-interacting protein-mediated necrosis.** *Mol Cell Biol.* 2006; 26:2215-2225.

Tiuman TS, Ueda-Nakamura T, Garcia Cortez DA, Dias Filho BP, Morgado-Díaz JA, De Souza W, Nakamura CV. **Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:176-182.

Tokoroyama T. **Discovery of the Michael Reaction.** *European Journal of Organic Chemistry.* 2010; 10:2009–2016.

Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. **Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance.** *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013:972913.

Turrens JF. **Mitochondrial formation of reactive oxygen species.** *J Physiol.* 2003; 552:335-344.

Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovica M., Mazur M. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** *Chem Biol Interact.* 2006; 160:1-40.

Varfolomeev EE, Ashkenazi A. **Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?** *Cell*. 2004; 116:491-497.

Ventura JJ, Cogswell P, Flavell RA, Baldwin AS Jr, Davis RJ. **JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species.** *Genes Dev*. 2004; 18:2905-2915.

Viktorsson K, Lewensohn R, Zhivotovsky B. **Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies.** *Adv Cancer Res*. 2005; 94:143-196.

Vrba L, Junk DJ, Novak P, Futscher BW. **p53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters.** *BMC Genomics*. 2008; 9:486.

Wang W, Adachi M, Kawamura R, Sakamoto H, Hayashi T, Ishida T, Imai K, Shinomura Y. **Parthenolide -induced apoptosis in multiple myeloma cells involves reactive oxygen species generation and cell sensitivity depends on catalase activity.** *Apoptosis*. 2006; 11:2225-2235.

Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ. **Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7.** *J Biol Chem*. 2009; 284:5731-5741.

Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. **JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy.** *Mol Cell*. 2008; 30:678-688.

Wen J, You KR, Lee SY, Song CH, Kim DG. **Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide.** *J Biol Chem*. 2002; 277:38954-38964.

Winterbourn CC, Hampton MB. **Thiol chemistry and specificity in redox signaling.** *Free Radic Biol Med*. 2008; 45:549-561.

Yang Z, Klionsky DJ. **An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009; 335:1–32.

Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, Niewolna M, Nishimura R. **A Bone-Seeking Clone Exhibits Different Biological Properties from the MDA-MB-231 Parental Human Breast Cancer Cells and a Brain-Seeking Clone In Vivo and In Vitro.** *J Bone Miner Res.* 2001; 16:1486-1495.

Yuan J, Kroemer G. **Alternative cell death mechanisms in development and beyond.** *Genes Dev.* 2010; 24:2592-2602.

Zarakowska E, Gackowski D, Foksinski M, Olinski R. **Are 8-oxoguanine (8-oxoGua) and 5-hydroxymethyluracil (5-hmUra) oxidatively damaged DNA bases or transcription (epigenetic) marks?** *Mutat Res.* 2013. pii: S1383-5718(13)00261-1.

Zhang S, Ong CN, Shen HM. **Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells.** *Cancer Lett.* 2004; 208: 143-153. a

Zhang S, Lin ZN, Yang CF, Shi X, Ong CN, Shen HM. **Suppressed NF-kappaB and sustained JNK activation contribute to the sensitization effect of parthenolide to TNF-alpha-induced apoptosis in human cancer cells.** *Carcinogenesis.* 2004; 25:2191-2199. b

Zhang S, Ong CN, Shen HM. **Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis.** *Cancer Lett.* 2004; 211:175-188. c

Zhang D, Qiu L, Jin X, Guo Z, Guo C. **Nuclear factor-kappaB inhibition by parthenolide potentiates the efficacy of Taxol in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo.** *Mol Cancer Res.* 2009; 7:1139-1149.

Zhang N, Chen Y, Jiang R, Li E, Chen X, Xi Z, Guo Y, Liu X, Zhou Y, Che Y and Jiang X. **PARP and RIP-1 are required for autophagy induced by 11'-deoxyverticillin A, which precedes caspase-dependent apoptosis.** *Autophagy* 2011; 7:598-612.

Zhou Q, Shaw PG, Davidson NE. **Inhibition of histone deacetylase suppresses EGF signaling pathways by destabilizing EGFR mRNA in ER-negative human breast cancer cells.** *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 117:443-451.