



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Biomedicina e Neuroscienze, indirizzo Oncobiologia Sperimentale
Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNec)
Settore Scientifico Disciplinare BIO/10

EFFETTI CITOTOSSICI SINERGICI INDOTTI DALLA COMBINAZIONE SAHA/PARTENOLIDE IN CELLULE DI CARCINOMA MAMMARIO UMANO MDA-MB231

IL DOTTORE

GIUSEPPINA BUTTITTA

IL COORDINATORE DELL'INDIRIZZO

Prof.ssa RENZA VENTO

IL TUTOR

Prof.ssa MARIANNA LAURICELLA

CICLO XXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015

INDICE

INTRODUZIONE	4
1. IL CARCINOMA MAMMARIO	5
2. IL CARCINOMA MAMMARIO TRIPLO NEGATIVO	10
3. STRATEGIE TERAPEUTICHE DEL CARCINOMA MAMMARIO	11
4. IL SAHA: UN INIBITORE DELLE DEACETILASI ISTONICHE	15
5. IL PARTENOLIDE	21
6. MECCANISMI DI MORTE CELLULARE PROGRAMMATA	29
6.1 L'apoptosi	29
6.2 La necroptosi	32
6.3 L' autofagia	33
7. CROSSTALK TRA AUTOFAGIA E APOPTOSI	36
7.1. Regolazione dell'apoptosi da parte di specifiche proteine autofagiche	37
7.2 Gli autofagosomi fungono da piattaforme per l'attivazione delle caspasi	37
7.3 Regolazione dell'autofagia da parte di specifiche proteine apoptotiche	38
MODELLO SPERIMENTALE	40
OBIETTIVI DELLA TESI	43
MATERIALI E METODI	46
1. COMPOSTI CHIMICI E REAGENTI IMPIEGATI	47
2. CONDIZIONI DI COLTURA DELLE CELLULE MDA-MB231	48
3. STUDIO DELLA VITALITA' CELLULARE MEDIANTE SAGGIO MTT	48
4. VALUTAZIONE DEL SINERGISMO MEDIANTE IL METODO DI CHOU-TALALAY	49
5. STUDIO DELL' APOPTOSI MEDIANTE SAGGIO DELL' ANNESSINA V/PI	49
6. DOSAGGIO DELLE SPECIE REATTIVE DELL' OSSIGENO	51

7. SAGGIO COLORIMETRICO PER LA VALUTAZIONE DEL GSH.....	51
8. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI LEGAME AL DNA DI NF-kB.....	52
9. VALUTAZIONE DEI VACUOLI AUTOFAGICI MEDIANTE COLORAZIONE CON MONODANSILCADAVERINA (MDC).....	53
10. PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI CELLULARI E SEPARAZIONE MEDIANTE SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	54
11. WESTERN BLOTTING.....	55
12. VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE.....	56
13. VALUTAZIONE DELLA LOCALIZZAZIONE CELLULARE DI Nrf2 MEDIANTE MICROSCOPIA A FLUORESCENZA	56
14. ANALISI STATISTICHE	57
RISULTATI	58
1. Il pre-trattamento con il SAHA incrementa l'effetto citotossico del PN nelle cellule MDA-MB231	59
2. Effetti del SAHA e del PN sulla produzione di ROS nelle cellule MDA-MB231	63
3. Il SAHA induce autofagia nelle cellule MDA-MB231	66
4. Il SAHA impiegato da solo e in associazione al PN induce apoptosi nelle cellule MDA- MB231	70
5. L'associazione SAHA/PN causa dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) e caduta del GSH.....	74
6. Crosstalk tra autofagia e apoptosi	76
7. Il pre-trattamento con il SAHA contrasta l'attivazione della via di Akt/mTOR indotta dal PN.....	78
8. Il pre-trattamento con il SAHA contrasta l'attivazione del fattore di trascrizione Nrf2 indotta dal PN.....	80
9. Effetti del SAHA e del PN sull'espressione di vari fattori coinvolti nella morte o nella sopravvivenza cellulare	83
DISCUSSIONE	86
BIBLIOGRAFIA	93

INTRODUZIONE

1. IL CARCINOMA MAMMARIO

Il carcinoma mammario è la neoplasia più diffusa nella popolazione femminile, sia nei paesi industrializzati sia in quelli in via di sviluppo e rappresenta la seconda causa di morte dopo il tumore del polmone. La sua incidenza è in aumento, come anche, fortunatamente, il tasso di sopravvivenza, soprattutto grazie al crescente numero di diagnosi precoci. Questo miglioramento di prospettiva, quindi, è dovuto all'individuazione più precoce del tumore che deriva dalla maggiore consapevolezza di un controllo regolare e da un migliore accesso alle tecniche mammografiche (Moulder e Hortobagyi, 2008). Tuttavia circa il 20-30% delle pazienti con linfonodi negativi ed il 50% di quelle con linfonodi positivi alla diagnosi sviluppa metastasi a distanza. Ad eccezione di casi sporadici (2-3%) in cui è stata osservata una sopravvivenza di lunga durata, il tumore mammario metastatico rimane, ad oggi, una malattia non guaribile, con una sopravvivenza media, nelle pazienti non precedentemente trattate, di 18-24 mesi, variabile in base all'aggressività biologica, alla sede e all'estensione della malattia (Cnossen et al., 2008; Mauri et al., 2008). Numerose ricerche hanno dimostrato che l'eziologia del carcinoma mammario è complessa e multifattoriale (Lakind et al., 2007). I fattori associati ad un aumentato rischio di cancro al seno comprendono:

- Caratteri demografici (Kelsey e Gammon, 1991).
- Fattori mestruali e riproduttivi: l'età precoce al menarca, la tarda età alla menopausa e l'età avanzata alla prima gravidanza (Lakind et al., 2007).
- Storia familiare di cancro al seno (Newman et al., 1997).
- Fattori genetici: mutazioni in due diversi geni di suscettibilità altamente penetranti quali BRCA1 e BRCA2 (Lakhani et al., 1998).
- Ormoni esogeni: come i contraccettivi orali o la terapia ormonale sostitutiva in post-menopausa (Lakind et al., 2007).
- Fattori nutrizionali (Lakind et al., 2007).
- Elevato consumo di bevande alcoliche e abitudini di vita voluttuarie (Lakind et al., 2007).
- Obesità (Lakind et al., 2007).

- Fattori ambientali, compresa l'esposizione a radiazioni ionizzanti e a composti xenobiotici. Dagli studi condotti è emerso che i tessuti del seno possono essere più vulnerabili ai potenziali effetti degli xenobiotici ambientali, anche se è importante ottenere informazioni sui tempi e sulla durata di tali esposizioni (Lakind et al., 2007).

Il carcinoma mammario è una malattia estremamente eterogenea che racchiude un ampio spettro di neoplasie che si differenziano dal punto di vista morfologico, prognostico e della risposta alla terapia. I vari tipi di carcinoma mammario possono assumere caratteristiche macroscopiche o microscopiche differenti in base al sito e al tipo di cellule da cui originano, a partire dai quali la neoplasia può progredire attraverso il tessuto stesso, attraverso il sistema linfatico o attraverso il sangue, verso linfonodi regionali, fino a metastatizzare raggiungendo organi distanti, quali polmoni, cervello, fegato e ossa; spesso la causa di morte non è il tumore primario, bensì la metastatizzazione, che inoltre complica la ricerca di una cura adeguata (Marino et al., 2013). Data la notevole eterogeneità, la classificazione clinica vede l'esistenza di molteplici categorie che distinguono le diverse tipologie di cancro al seno in virtù della morfologia, dell'organizzazione strutturale, dell'immunopatogenesi, dell'istotipo e dell'invasività, quest'ultima identificata in due forme: le forme *non invasive* e quelle *invasive* (Nicholas et al., 2011).

Le forme *non invasive* sono:

- Il carcinoma duttale in situ (o CDIS): è una forma iniziale di cancro al seno limitata alle cellule che formano la parete dei dotti. Se non viene curata può diventare invasiva.
- Il carcinoma lobulare in situ (o CLIS).

Le forme *invasive* sono:

- Il carcinoma duttale infiltrante non altrimenti specificato (o NAS IDC) che acquisisce questa denominazione quando supera la parete del dotto. Rappresenta il 70-80% di tutte le forme di cancro al seno.
- Il carcinoma lobulare infiltrante così denominato quando il tumore supera la parete del lobulo. Rappresenta il 10-15% di tutti i diversi tipi di cancro al seno.

Lo stadio è un ulteriore parametro di riferimento che indica convenzionalmente le dimensioni del tumore e l'invasività, ovvero la sua diffusione ai linfonodi adiacenti e ad altri organi (metastasi). La stadiazione è utile per stabilire qual'è il trattamento più idoneo per il singolo caso. Esistono vari metodi per definire lo stadio dei tumori, il più comune è il sistema numerico, che classifica i tumori della mammella secondo cinque stadi, partendo dallo Stadio 0, utilizzato per descrivere il cancro al seno non invasivo. In fase 0, non vi è alcuna evidenza di cellule tumorali o cellule anomale al di fuori della parte del seno dalla quale hanno avuto origine (National Cancer Institute). Lo Stadio I è diviso in fasi IA e IB:

- In fase IA, il tumore è di pochi centimetri, ma non è diffuso al di fuori del seno.
- In fase IB, piccoli gruppi di cellule cancerose si trovano nei linfonodi.

Lo Stadio II è diviso in fasi IIA e IIB:

- In fase IIA, il tumore è o di 2 cm o meno e si è diffuso ai linfonodi ascellari (linfonodi sotto il braccio); o il tumore è maggiore di 2 cm, ma non maggiore di 5 cm e non si è diffuso ai linfonodi ascellari. Nessun tumore si trova nel seno, ma è pienamente localizzato nei linfonodi ascellari.
- In stadio IIB, il tumore può essere più grande di 2 cm, ma non maggiore di 5 cm e si è diffuso ai linfonodi ascellari; o maggiore di 5 cm, ma non si è diffuso ai linfonodi ascellari.

Lo Stadio III è diviso in fasi IIIA, IIIB e IIIC:

- In fase IIIA, il cancro è presente nei linfonodi ascellari che sono attaccati gli uni agli altri o ad altre strutture ad esempio allo sterno. Il tumore può inoltre: diffondere ai linfonodi vicini, mantenendo però una dimensione di 2 cm o meno; assumere dimensioni maggior di 2 cm, ma non maggiore di 5 cm e diffondersi ai linfonodi ascellari che sono attaccati gli uni agli altri o ad altre strutture; diffondere ai linfonodi vicino allo sterno, e assumere dimensioni maggiori di 5 cm.
- In fase IIIB, il tumore può essere di qualsiasi dimensione. In questa fase è possibile che il cancro si sia diffuso alla parete toracica invadendo anche i linfonodi ascellari che possono essere collegati gli uni agli altri o ad altre strutture, o vicino lo sterno.

- In fase IIIC, il tumore può essere di qualsiasi dimensione e potrebbe aver invaso la parete toracica attraversando tutti i linfonodi.

Nello Stadio IV, il tumore si è diffuso ad altri organi del corpo.

Per quanto concerne l'istotipo, oggi si riconoscono varie forme tumorali, classificate come midollare, neuroendocrina, tubolare, apocrina, metaplastica, mucinosa, infiammatoria, adenoidea cistica, e micropapillare. È interessante notare che, dal tipo istologico dipende la prognosi (Nicholas et al., 2011). Sulla base delle analisi immunoistochimiche le diverse forme di carcinoma mammario si distinguono per la presenza o l'assenza di tre recettori: il recettore per gli estrogeni ER α (Estrogen Receptor α), il recettore per il progesterone PR (Progesteron Receptor), recentemente si è inoltre aggiunta la caratterizzazione dell'espressione del recettore HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), che ormai è divenuta parte integrante degli studi prognostici e predittivi. Più del 60% delle forme di carcinoma mammario risulta positivo a tali recettori. Una minore percentuale però, circa il 10-17%, non esprime nessuno di questi recettori e perciò è definita tripla negativa. Queste ultime forme di carcinoma mammario, sono scarsamente differenziate, altamente maligne e molto aggressive, con una cattiva prognosi e con un'elevata probabilità di sviluppare metastasi a distanza; presentano alterazioni nell'espressione di proteine, oncogeni e oncosoppressori coinvolti in diversi pathways che regolano la proliferazione, la crescita cellulare e

l'apoptosi. A causa della mancata espressione dei recettori ER, PR e HER2, le cellule di carcinoma mammario triple negative non sono sensibili alle terapie ormonali o a quelle dirette e specifiche contro tali recettori; la chemioterapia è così l'unica forma di trattamento per queste forme di carcinoma mammario che risultano perciò associate ad un elevato tasso di recidività locale e sistemica (Chen et al., 2009). 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 e Tutt, 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), molecole tipiche di un fenotipo ghiandolare basale/mioepiteliale (Anders e Carey, 2008).

2. IL CARCINOMA MAMMARIO TRIPLO NEGATIVO

I tumori del seno triplo negativi rappresentano un tipo particolarmente aggressivo di carcinoma mammario, tipicamente caratterizzato da una prognosi infausta. Queste neoplasie ammontano a circa il 16% dei casi di tumore al seno e si distinguono in quanto, a differenza delle forme più comuni, non esprimono il recettore degli estrogeni ER α (Estrogen Receptor α) e del progesterone PR (Progesteron Receptor) e non presentano amplificazione del gene codificante il recettore del fattore di crescita epidermico umano HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) (Bauer et al., 2007). La loro crescita è dunque guidata da meccanismi cellulari distinti e sono, per questo resistenti ai trattamenti standard. I tumori triplo negativi costituiscono un sottotipo particolarmente eterogeneo di carcinomi mammari, alcune forme sono infatti estremamente aggressive mentre altre presentano un grado di invasività pari alle forme più comuni. Questi tumori si distinguono inoltre per quanto riguarda l'incidenza delle recidive, la quale resta elevata entro 3-5 anni dalla forma primaria. I tumori triplo negativi sono caratterizzati infine da una estrema variabilità genotipica e presentano un carattere fortemente evolutivo, principalmente legato ad una forte instabilità del loro genoma. (Sohrab et al., 2012). Le forme di carcinoma mammario triplo negativo così come le forme basal-like o BLBC presentano alcune caratteristiche comuni: a) sono prevalenti nelle giovani donne Afro-Americane e in quelle obese; b) sono associate ai geni che regolano la suscettibilità all'insorgenza del carcinoma mammario, come per esempio BRCA-1 e BRCA-2; c) sono scarsamente differenziate, altamente maligne e molto aggressive, con una cattiva prognosi e con un'elevata probabilità di sviluppare metastasi a distanza (fegato, sistema nervoso centrale e polmone); d) presentano alterazioni nell'espressione di proteine, oncogeni e oncosoppressori coinvolti in diversi *pathways* che regolano la proliferazione, la crescita cellulare e l'apoptosi (Bosh et al., 2010; Reis Filho e Tutt, 2008; Chen et al., 2009; De Ruijeter et al., 2001; Dey et al., 2012). Le pazienti affette da carcinoma triplo-negativo e basal-like, 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 triplo 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 e Tutt, 2008).

3. STRATEGIE TERAPEUTICHE DEL CARCINOMA MAMMARIO

La disponibilità di nuovi farmaci per il trattamento del carcinoma mammario permette oggi di diversificare l'approccio terapeutico alla malattia e pone il problema di adottare una strategia terapeutica che consenta di utilizzare le diverse risorse rapportandole alle caratteristiche biomolecolari della patologia. Le nuove terapie biologiche consentono il trattamento del carcinoma mammario con efficacia e tollerabilità diverse rispetto alla chemioterapia e vanno analizzate e rapportate ai farmaci tradizionali.

Gli approcci terapeutici che vengono impiegati nel trattamento delle forme tumorali positive per ER sono molteplici: il blocco dell'interazione fra gli estrogeni (E2) e i propri recettori (ER) impiegando antiestrogeni, definiti SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators); l'inibizione dell'enzima aromatasi, responsabile della sintesi degli estrogeni; l'impiego di specifici antagonisti del recettore ER α , definiti SERDs (Selective Estrogen Receptor Down-Regulators). Inoltre, nelle forme di carcinoma mammario che overesprimono HER2, viene impiegato il Trastuzumab, noto anche con il nome commerciale di Herceptin, un anticorpo monoclonale che interagisce con HER2 inibendolo (Orlando et al, 2010). Il successo di questo farmaco ha favorito lo sviluppo di terapie analoghe basate su anticorpi come il Pertuzumab, che si lega a HER2 in un punto diverso rispetto al Trastuzumab, e che impedisce al recettore di interagire con altri membri della sua famiglia presenti sulla membrana cellulare come, per esempio, EGFR e HER3. Bloccare queste interazioni riduce il segnale che stimola la crescita lungo vie di comunicazione molecolare intracellulari a valle di questi recettori. Il Pertuzumab può addirittura interrompere certi tipi di attivazione di HER2 in cellule tumorali diventate resistenti al Trastuzumab. In più è stato dimostrato che l'abbinamento di Trastuzumab e Pertuzumab incrementa il tasso di morte cellulare in cellule di tumore mammario che presentano elevati livelli di HER2 (Sendur et al., 2012). Un'ulteriore strategia per incrementare l'efficacia di una terapia mirata su HER2 consiste nell'abbinare il Trastuzumab ad un inibitore del suo dominio intracellulare con attività tirosin-chinasica come il Lapatinib. Nelle linee cellulari di tumore al seno, questa combinazione produce una maggiore inibizione sinergica della crescita cellulare e tassi più elevati di morte per apoptosi (Baselga et al., 2012). Tra tutti i SERMs, il Tamoxifene è stato il primo ad essere individuato; si tratta di un agente non steroideo, contenente un gruppo trifeniletile che interagisce con il recettore ER e ne inibisce l'attività trascrizionale. Il Tamoxifene presenta comunque una parziale attività agonista a livello delle ossa e dell'endometrio, sui quali può indurre proliferazione cellulare e aumento del rischio di trasformazione tumorale in seguito a prolungata esposizione. Pertanto,

nel corso degli anni, sono stati sviluppati altri SERMs con minore attività agonista, come il Raloxifene e altri SERMs di seconda e terza generazione, come il Lasofoxifene e il Bazedoxifene, senza però ottenere buoni risultati a causa dell'insorgenza di meccanismi di resistenza nelle pazienti (Pickar et al., 2010). I SERDs, invece, agiscono come potenti antagonisti del recettore ER α e, a differenza dei SERMs, non mostrano alcuna attività agonista. Tra i SERDs maggiormente studiati troviamo il Fulvestrant, noto anche come ICI 182,780 o Faslodex, il quale possiede affinità di legame nei confronti del recettore ER α di circa l'89% rispetto all'estradiolo (Osborne et al., 2004). Esso agisce impedendo la dimerizzazione e la traslocazione al nucleo del recettore ER α ; inoltre, il complesso Fulvestrant-recettore viene ubiquitinato, avviato al proteasoma e quindi degradato, causando una riduzione dei livelli di ER α (Long et al., 2006). I risultati clinici ottenuti in seguito all'impiego del Fulvestrant sono stati però deludenti, per la sua scarsa biodisponibilità e per la difficoltà di raggiungere in circolo concentrazioni che risultano efficaci (McDonnel e Wardell, 2010). La classe degli inibitori dell'enzima aromatasi comprende composti steroidei, come l'Examestano e il Formastano, e non steroidei, come il Letrozolo e l'Anastrozolo. Il loro impiego è però limitato dall'insorgenza di effetti collaterali, come l'osteoporosi con conseguente rischio di fratture e dolore muscolo-scheletrico (Brueggemeier et al., 2005).

Le forme di carcinoma mammario triplo negativo, invece, a causa della mancata espressione dei recettori ER, PR e HER2 non sono sensibili alle terapie ormonali o a quelle dirette e specifiche contro tali recettori. La chemioterapia rappresenta pertanto l'unica forma di trattamento per queste forme, che risultano però associate ad un elevato tasso di recidiva locale e sistemica (Rouzier et al., 2005; Dent et al., 2007; Carey et al., 2007). Dagli anni '80 ad oggi è stata introdotta nella pratica quotidiana la chemioterapia "pre-operatoria" o "neoadiuvante" che sebbene presenti, almeno in una prima fase, efficacia nel trattamento di tali forme non è esente dalla induzione di meccanismi di resistenza (Reis-Filho e Tutt, 2008). Le terapie neoadiuvanti prevalentemente utilizzate nei trials clinici comprendono gli agenti anti-tubulina, come l'Ixabepilone (Hudis e Gianni, 2011) o agenti citotossici come i derivati del platino come ad esempio il cisplatino e il carboplatino (Tan e Swain, 2008). In particolare questi ultimi sono in grado di formare addotti covalenti con il DNA e di determinare il blocco della replicazione cellulare (Oakman et al. 2011). Delle terapie neoadiuvanti oltre agli agenti citotossici fanno parte le "terapie mirate" così definite perché hanno come target molecole che rappresentano una caratteristica specifica della cellula cancerosa come ad esempio un recettore overespresso che determina la selettività del trattamento verso le cellule maligne e la

mancata efficacia sulle cellule normali (Tan e Swain, 2008). Poiché il 45-70% delle forme di carcinoma mammario triplo negativo overesprime il recettore dell'EGF (EGFR), è possibile impiegare delle strategie terapeutiche rivolte contro tale recettore. EGFR stimola la replicazione cellulare in modo simile ad HER2. Se utilizzato come target terapeutico, l'effetto stimolatorio di EGFR potrebbe diminuire e determinare un arresto della crescita tumorale o una regressione del tumore. Esistono diverse molecole in grado di inibire o il dominio extracellulare dell'EGFR, come il Cetuximab (Erbix), o il suo dominio tirosina-chinasi, come il Gefitinib (Iressa) e l'Erlotinib (Tarceva); tali composti, associati alla radioterapia, mostrano potenziali effetti benefici per queste forme di carcinoma mammario (Rocha-Lima et al., 2007; Bayraktar e Glück, 2013). Anche gli inibitori dell'enzima PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase), che inducono tagli a livello del DNA con conseguente arresto della crescita cellulare in fase G2/M e apoptosi, trovano largo impiego in diversi trials clinici; tra questi inibitori, l'Olaparib (AZD2281) e il BSI-201, sembrano possedere una certa efficacia. Inoltre, sono in corso diversi studi per valutare l'efficacia di combinazioni dei composti neoadiuvanti, come l'associazione del Cisplatino con l'Olaparib e l'associazione del Carboplatino con il BSI-201 (Perez et al., 2010; Bayraktar e Glück, 2013).

L'angiogenesi è un meccanismo fondamentale nella crescita tumorale, pertanto, lo sviluppo di farmaci che colpiscono i meccanismi cellulari coinvolti nella neoangiogenesi è una priorità di ricerca. Il targeting e l'inibizione della formazione di vasi sanguigni hanno l'obiettivo di interrompere la creazione dell'ambiente che le cellule tumorali inducono per ricevere ossigeno e sostanze nutritive di cui hanno bisogno per sopravvivere ed interagire tra loro (Perez et al., 2010; Bayraktar e Glück, 2013). Tra i composti antiangiogenici si annovera il Bevacizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e il Sunitinib, un inibitore della tirosin-chinasi che ha per bersaglio il recettore per il VEGF, che ha dimostrato efficacia anche nel trattamento del carcinoma triplo negativo determinando tuttavia incremento di una popolazione di cellule staminali tumorali (CSCs) (Chinchar et al, 2014). Di notevole interesse terapeutico si è rivelato inoltre l'impiego dei micro-RNAs (miRNAs), una classe di piccoli RNA non codificanti che regolano l'espressione proteica a livello post-trascrizionale; essi, infatti, interagiscono con gli mRNA e ne determinano l'inibizione della traduzione o la degradazione. In particolare, è stato osservato che la regione non tradotta all'estremità 3' dell'mRNA codificante l'EGFR contiene tre putativi siti target del microRNA-7. Studi condotti da Webster et al. (2009) hanno dimostrato che l'impiego del microRNA-7 causa il decremento di

EGFR in linee cellulari di carcinoma del seno e del polmone, inducendo l'arresto del ciclo cellulare e la morte delle stesse cellule.

Alcune forme di carcinoma mammario triplo negativo mostrano un'iperattivazione della proteina mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), un target delle chinasi PI3K/PKB, che regola positivamente la progressione del ciclo cellulare. Pertanto, l'inibizione di mTOR mediante analoghi alla Rapamicina, come l'Everolimus e il Temsirolimus, è oggetto di studio in diversi trials clinici in combinazione con la chemioterapia. Inoltre, è stata dimostrata l'efficacia del

Dasatinib, un inibitore delle tirosina chinasi Src e c-Kit, in linee cellulari tumorali derivanti da forme di carcinoma mammario "basal-like" (BLBC) (Bosch et al., 2010). Alcuni dati sperimentali hanno anche dimostrato che gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) sono in grado di riesprimere il recettore ER α in linee cellulari tumorali negative per tale recettore. Ad esempio, la Tricostatina A (TSA) determina nella linea cellulare di carcinoma mammario triplo-negativa MDA-MB231, che non esprime il recettore α per gli estrogeni (ER α), la riespressione dell'mRNA codificante tale recettore e della proteina stessa. Tale effetto risulta più marcato quando il TSA è impiegato in associazione con l'agente demetilante 5-aza-2-deossicitidina (Stearns et al., 2007). Studi condotti presso i laboratori di Biochimica del Policlinico di Palermo dal gruppo di ricerca coordinato dal Prof. Giovanni Tesoriere, hanno evidenziato che un altro inibitore delle deacetilasi istoniche, l'Acido Idrossamico Suberoililide (SAHA), sensibilizza le cellule MDA-MB231 e le cellule ER+ MCF-7 all'azione del ligando TRAIL, mediante il decremento della proteina c-FLIP (Lauricella et al., 2012).

4. IL SAHA: UN INIBITORE DELLE DEACETILASI ISTONICHE

L'organizzazione strutturale del DNA all'interno delle cellule eucariotiche influenza l'attività trascrizionale dei geni. Infatti nelle cellule eucariotiche il DNA è compartimentalizzato nel nucleo sotto forma di cromatina, complesso altamente organizzato ed estremamente dinamico che è costituito da DNA, istoni e proteine non istoniche. L'unità fondamentale della cromatina è il nucleosoma, un ottamero istonico circondato da 146 bp di DNA costituito da due istoni H2A, due istoni H2B, due istoni H3 e due istoni H4. Gli istoni H3 e H4 formano due eterodimeri (H3-H4) che si associano dando origine ad un tetramero. H2A e H2B formano anch'essi eterodimeri che però non tetramerizzano (De Ruijter et al., 2003). La cromatina costituisce una piattaforma su cui convergono molteplici segnali biologici che, una volta integrati, determinano risposte molecolari essenziali per una corretta regolazione dell'espressione genica. In accordo con ciò, molteplici processi cellulari, come la proliferazione e il differenziamento, vengono influenzati da variazioni della struttura cromatinica. I cambiamenti nell'organizzazione della cromatina sono mediati da modifiche delle code N-terminali degli istoni attraverso diversi meccanismi come l'acetilazione, la metilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione (Hess-Stumpp, 2005). Uno tra gli effetti regolatori dell'espressione genica più studiato e sicuramente meglio caratterizzato è l'acetilazione delle proteine istoniche, processo intimamente accoppiato a varie funzioni cellulari, quali il riconoscimento del DNA da parte di proteine, le interazioni tra le stesse e la stabilità proteica. Due famiglie d'enzimi, le HAT (Histone Acetyl Trasferase) e le HDAC (Histone Deacetyl Trasferase), catalizzano le reazioni reversibili di acetilazione-deacetilazione a livello di residui lisinici di molecole istoniche e non istoniche. Le HAT trasferiscono gruppi acetilici dall'Acetil Co-enzima A ai residui di lisina delle code N-terminali degli istoni; in tal modo neutralizzano la carica positiva dei residui di lisina e promuovono uno stato rilassato o "aperto" della cromatina, rendendola accessibile ai fattori di trascrizione. Le HDAC, di contro, rimuovono i gruppi acetilici dai residui di lisina, promuovendo una struttura condensata o "chiusa" della cromatina, impedendo così l'accesso del complesso trascrizionale alle sequenze del DNA (Marks e Jiang, 2005; Emanuele et al., 2008). Nell'uomo sono state identificate 18 diverse HDAC che non presentano ridondanza nell'espletamento della loro funzione. Undici delle HDAC sono zinco dipendenti, classificate sulla base dell'omologia con le HDAC di lievito: la Classe I comprende le HDAC 1, 2, 3, e 8; la Classe IIA comprende HDAC 4, 5, 7 e 9; la Classe IIB, HDAC 6 e 10; la Classe IV, la HDAC11. La Classe III include le sirtuine 1-7, che hanno un requisito assoluto per NAD⁺,

non sono zinco dipendenti e generalmente non sono inibite da composti che inibiscono le deacetilasi zinco dipendenti (Marks e Xu, 2009).

In cellule normali esiste un equilibrio tra le attività di HAT ed HDAC e ciò risulta in specifici profili cellulari d'espressione genica; al contrario, un'alterazione di tale equilibrio può essere alla base di alcune trasformazioni neoplastiche. È infatti in aumento il numero di patologie umane, di tipo sia neoplastico che sindromico, la cui causa molecolare accertata risiede in mutazioni dei geni che codificano per proteine appartenenti, appunto, ai complessi di rimodellamento della cromatina (Kouraklis e Theocharis, 2006). Diverse forme tumorali, come il carcinoma gastrico, alla prostata e al colon sono caratterizzate da un'overespressione o da un aberrante reclutamento delle HDAC, con conseguente ipoacetilazione degli istoni e repressione genica. Alcune forme di cancro al colon presentano livelli elevati di HDAC2 e HDAC3, che sono associate alla comparsa di lesioni precancerose. Alti livelli di HDAC1 sono stati osservati nel carcinoma gastrico, mentre alcune forme di carcinoma mammario presentano elevati livelli di HDAC1 e HDAC3. Un esempio relativo, invece, ad alterato reclutamento delle HDAC è rappresentato dal fattore di trascrizione BCL-6 che risulta overespresso nel linfoma diffuso a grandi cellule B e che è in grado di reclutare HDAC2. Mutazioni strutturali delle HDAC sembrano invece essere piuttosto rare nel cancro; è stata riscontrata solo una mutazione tronca di HDAC2 nelle linee cellulari di carcinoma del colon e dell'endometrio (Dokmanovic et al., 2007; Marks e Jiang, 2005). Le HDAC rappresentano così un possibile bersaglio per la terapia antitumorale. A tale riguardo, è stato osservato che diversi composti sono in grado di inibire l'attività delle HDAC, favorendo uno stato acetilato e quindi decondensato della cromatina, che determina l'espressione di geni in grado di indurre l'arresto della crescita cellulare e la morte per apoptosi in cellule tumorali (Frew et al., 2009; Xu et al., 2007). In un primo momento, si riteneva che gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) modificassero l'espressione di un piccolo numero di geni (2-10%); recenti studi effettuati mediante l'impiego di microarrays, però, hanno indicato che gli HDACi modificano l'espressione di circa il 22% di geni. Diversi dati sperimentali hanno già dimostrato che gli HDACi risultano efficaci, sia da soli che in combinazione con altri agenti antitumorali, soltanto in cellule tumorali, senza mostrare particolari effetti avversi in quelle normali. Il potenziale antitumorale degli inibitori delle HDAC deriva infatti dalla loro capacità di interferire con diversi processi cellulari, generalmente non più controllati nelle cellule neoplastiche. Nella maggior parte dei casi l'attività antitumorale risiede nella capacità di attivare programmi di differenziamento, di inibire la progressione del ciclo cellulare e di

indurre apoptosi. Inoltre sembra essere molto importante anche la capacità di attivare la risposta immunitaria e l'inibizione dell'angiogenesi. Gli HDACi, quindi, favorendo una conformazione rilassata della cromatina, possono favorire l'accesso da parte di diversi agenti antitumorali direttamente al DNA. Ad esempio, nella leucemia promielocitica acuta, dove si osserva un aberrante reclutamento delle HDAC a livello della sequenza codificante la proteina di fusione PML-RAR α , è stata studiata l'associazione degli HDACi con l'acido trans-retinoico; tale associazione risulta efficace in modelli pre-clinici sia *in vitro* che *in vivo*. Gli HDACi sono anche in grado di esplicare notevoli effetti sinergici quando usati in combinazione con agenti chemioterapici tra cui le antracicline, il carboplatino e i taxani; inibitori delle topoisomerasi, quali l'Etoposide, la Doxorubicina e l'Ellipticina; analoghi dei nucleotidi che interferiscono con i meccanismi di replicazione del DNA, come la Gemcitabina e la Fludarabina; inibitori delle chinasi, come l'Imatinib; inibitori del proteasoma, come il Bortezomib; induttori di apoptosi, come il TRAIL; anticorpi monoclonali diretti contro l'EGFR-1, come il Trastuzumab, o contro il CD20, come il Rituximab; inibitori dell'EGFR, come l'Erlotinib; inibitori delle CDK, come il Flavopiridolo; inibitori della PI3K, come LY294002; inibitori delle MEK 1/2, come il PD184352; inibitori del fattore NF-kB, come il BAY-117082 (Emanuele et al., 2008; Codd et al., 2009; Siegel et al., 2009; Richon et al., 2009; Carlisi et al., 2009). Inoltre, sembra essere di notevole interesse lo studio del legame esistente tra la deacetilazione degli istoni e la metilazione del DNA in prossimità dei promotori dei geni. La metilazione del DNA, infatti, facilita il legame delle HDAC a livello del promotore, promuovendone così la deacetilazione. Pertanto, nei trials clinici vengono spesso impiegate combinazioni di HDACi e agenti demetilanti; un esempio è rappresentato dal trattamento con decitabina e vorinostat dei pazienti affetti da leucemie acute (Brodská et al., 2013).

Tutti gli HDACi, strutturalmente, hanno in comune tre caratteristiche: un dominio di legame allo ione Zinco (II), una regione "capping" all'estremità opposta ed una catena alchile, vinile o arile che connette le due regioni, la quale si inserisce nel tunnel idrofobico delle HDAC (Marks e Xu, 2009). Gli inibitori delle HDAC Zinco-dipendenti possono essere classificati in sei grandi gruppi: gli acidi grassi a catena corta, come il Sodio Butirrato (NaB) e l'Acido Valproico (VPA); gli acidi idrossammici, come la Tricostatina A (TSA), il SAHA, l'ITF2357, il Panobinostat, il PCI-24781; gli epossichetoni, come il Trapoxin e l'HC-toxin; i tetrapeptidi ciclici, come l'Apicidina e il Depsipeptide; gli epossidi, come il Depudecin e le benzamidi, come l'Entinostat (MS27-275) e l'MGCD0103 (Lane e Chabner, 2009; Tan et al., 2010).

Molti di questi HDACi sono impiegati in diversi trials clinici, da soli o in associazione con altri composti antitumorali. Tali HDACi, che agiscono sulle HDAC di classe I e II, non mostrano però alcun effetto sulle HDAC di classe III, per le quali sono stati sviluppati specifici inibitori come il Sirtinol (Sir2 inhibitor naphthol).

Gli acidi idrossammici rappresentano ad oggi la classe più efficace di HDACi, in quanto sono in grado di agire a basse concentrazioni, inducendo in cellule tumorali l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi e il differenziamento (Monneret, 2005; Oger et al. 2010). Il SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid), noto anche come Vorinostat o Zolinza, è un acido idrossammico sintetico la cui struttura è simile alla Tricostatina A, un composto prodotto naturalmente da ceppi selezionati di *Streptomyces platensis*, *Streptomyces hygroscopicus Y-50* o *Streptomyces siovaensis*. Studi di cristallografia a raggi X condotti mediante l'impiego della proteina di origine batterica HDLP (HDAC-like protein) o, più di recente, dell'HDAC8 di origine umana, hanno evidenziato che il SAHA mostra tre motivi strutturali: il gruppo idrossammico, il quale chela lo ione Zinco (II); la catena "linker" contenente sei atomi di carbonio, la quale si inserisce nella tasca dell'enzima; e il gruppo fenile, che riconosce la superficie del sito catalitico (Kouraklis e Theocharis, 2006). Il SAHA è in grado di inibire le HDAC di classe I, HDAC1, 2, 3 e 8, le HDAC di classe II, HDAC6 e 10, e HDAC 11; esso non agisce invece sulle HDAC4, 5, 7 e 9 a concentrazioni clinicamente rilevanti. La proprietà del SAHA di indurre differenziamento in cellule murine di eritroleucemia (MEL) è stata riportata per la prima volta nel 1996 (Codd et al., 2009); dieci anni dopo, nell'Ottobre del 2006, il SAHA fu il primo HDACi ad essere approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) per il trattamento di forme avanzate del linfoma cutaneo a cellule T (CTCL) (Mark et al., 2000; Batty et al., 2009). Dal punto di vista farmacologico, è stato osservato che il SAHA presenta un'emivita relativamente breve nel plasma, di circa 2 h; nonostante ciò, l'accumulo di istoni acetilati nelle cellule periferiche del sangue continua per oltre 10 h dopo somministrazione orale. La massima dose tollerata (MTD) della formulazione orale è 400 mg/d per somministrazione continua e gli effetti collaterali, quali anoressia, mielosoppressione, affaticamento, diarrea e nausea risultano immediatamente reversibili in seguito alla sospensione del farmaco (Karagiannis e El-Osta, 2007; Lane e Chabner, 2009). Risultati ottenuti in trials clinici di fase II hanno dimostrato l'efficacia del SAHA nel trattamento del cancro alla testa e al collo, del linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), del glioblastoma multiforme (GBM), del cancro alla prostata refrattario agli ormoni, del carcinoma del seno, del Linfoma Non-Hodgkin (NHL), del Linfoma Hodgkin, del cancro al

polmone non a piccole cellule (NSCLC), del carcinoma del colon-retto e del carcinoma ovarico (Siegel et al., 2009). Il SAHA agisce inducendo l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 o G2/M; esso determina infatti un incremento dell'espressione di geni come p21WAF1/CIP1. In particolare, causa specifiche modificazioni nel pattern di acetilazione delle lisine degli istoni H3 e H4 associati al promotore del gene p21. Queste evidenze suggeriscono che il SAHA ha un effetto specifico sulla trascrizione di quel gene (Kelly e Marks, 2005). Il SAHA è in grado di agire incrementando l'espressione di altri inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti come p27Kip1 (Richon et al., 2000); inoltre, è stato osservato che il SAHA favorisce uno stato ipofosforilato della pRb (Huang e Pardee, 2000). Il SAHA è anche in grado di attivare i pathways intrinseco ed estrinseco dell'apoptosi in cellule trasformate (Carlisi et al., 2009; Emanuele et al., 2007; Bali et al., 2005; Mitsiades et al., 2005). Recentemente è stato descritto il meccanismo apoptotico indotto dal SAHA in cellule di epatocarcinoma (Emanuele et al., 2007). In queste cellule, il SAHA è in grado di indurre la via estrinseca dell'apoptosi, incrementando l'espressione sia di FasR che di FasL e la produzione della caspasi-8 e di t-Bid e contemporaneamente la via intrinseca dell'apoptosi incrementando l'espressione dei membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2, come isoforme di Bim e Bcl-Xs, che è un' isoforma derivata dallo splicing alternativo del trascritto di Bcl-X. E' stato anche dimostrato che nelle cellule di epatocarcinoma il SAHA interagisce sinergicamente con il Bortezomib un inibitore del proteasoma con un complesso meccanismo pleiotropico. E' importante sottolineare che né il solo SAHA né la combinazione SAHA/Bortezomib ha dimostrato di esercitare alcun effetto avverso sugli epatociti primari umani (Emanuele et al., 2007). Il SAHA è anche in grado di agire sinergicamente con altri composti quali gli inibitori della topoisomerasi II in molte linee cellulari cancerose (Guerrant et al., 2012) e di sensibilizzare cellule di carcinoma mammario ER+ come le MCF-7 e triplo negative come le MDA-MB231 all'azione del ligando TRAIL (Lauricella et al., 2012).

Il SAHA può causare la morte cellulare determinando anche alterazioni nel pathway mitotico. Infatti, esso, favorendo uno stato acetilato degli istoni, provoca alterazioni nella struttura e nella funzione dei centromeri e dell'eterocromatina pericentrica. Inoltre, il SAHA induce la degradazione di due serina-treonina chinasi mitotiche, Aurora A e Aurora B, determinando così un transiente arresto delle cellule in prometafase, seguito dalla morte cellulare per apoptosi o per catastrofe mitotica (Zhang et al., 2008).

Il SAHA è anche in grado di bloccare sia l'angiogenesi, decrementando l'espressione di fattori pro-angiogenici, come HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1) e VEGF, che l'invasività,

riducendo i livelli delle metalloproteasi (MMPs) (Emanuele et al., 2008, Heider et al., 2006). In cellule di adenocarcinoma del colon, è stato osservato che il SAHA è in grado di esercitare la sua azione citotossica anche mediante induzione di stress ossidativo incrementando la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS); e tale evento è inibito dall'impiego della N-acetilcisteina (NAC) (Portanova et al., 2008). In cellule leucemiche Jurkat è stato dimostrato che il SAHA stimola la produzione di ROS poiché determina incrementata espressione della catepsina D, una proteasi presente a livello lisosomale e decremento dell'enzima tioredossina (TRX) che è substrato della catepsina D ed è uno scavenger endogeno dei ROS (Li et al, 2010). L'incremento dei ROS è inoltre favorito dalla capacità del SAHA di indurre l'espressione della proteina TBP-2 (Thioredoxin Binding Protein-2), la quale inibisce l'attività della TRX (Butler et al., 2002; Marks et al., 2005). Osservazioni sperimentali hanno dimostrato che il SAHA è in grado di acetilare, oltre alle proteine istoniche, anche alcune proteine non istoniche. Tra queste troviamo p53 (Carlisi et al., 2008), la quale induce il processo apoptotico, e HSP90 (Mühlenberg et al., 2009), la quale regola diverse proteine coinvolte nell'apoptosi e nel controllo del ciclo cellulare. Il SAHA è inoltre in grado di indurre pathways di morte alternativi, come l'autofagia, un particolare meccanismo di morte cellulare caratterizzato dall'accumulo di fagolisosomi (Hrzenjak et al., 2008; Yamamoto et al., 2008). Il SAHA in particolare induce autofagia sia in cellule di epatocarcinoma umano che in cellule di sarcoma stromale dell'endometrio inibendo il pathway di sopravvivenza Akt/mTOR, downregolando l'espressione sia di mTOR che della proteina ribosomale fosfo-S6 posta a valle di tale pathway (Liu YL et al., 2010; Hrzenjak et al., 2008). L'autofagia è un evento chiave che risulta spesso associato anche alla sopravvivenza cellulare, a tale proposito è stato osservato che il SAHA in fibroblasti embrionali e in cellule di glioblastoma induce un meccanismo autofagico che ostacola la morte cellulare mediante inibizione di mTOR il quale una volta inattivo determina lo stato defosforilato e quindi funzionale del complesso serina/treonina chinasi contenente ULK1/2, ATG13 e FIP200 (Gammoh et al., 2012). In cellule leucemiche Jurkat il SAHA induce autofagia in quanto inibisce il pathway Akt/mTOR poiché determina fosforilazione su S473 di Akt e su S2448 di mTOR, promuove la conversione della proteina LC3-I in LC3-II e l'attivazione di alcuni fattori protagonisti dell'evento autofagico fondamentali per la formazione dell'autofagosoma come la beclina-1, il complesso Atg12-Atg5 e Atg7 (Li et al., 2010).

5. IL PARTENOLIDE

I Sesquiterpeni lattoni (SLS) sono una sottofamiglia dei terpenoidi e costituiscono un gruppo ampio e diversificato di sostanze chimiche vegetali, biologicamente attive, estratte principalmente dalle *Asteraceae*. Si tratta di composti stabili, incolori, di sapore amaro e con caratteristiche lipofile (Ghantous et al., 2010). Questi composti sono noti per possedere un'ampia varietà di attività biologiche e farmacologiche correlate all'azione anti-microbica, citotossica, anti-infiammatoria, anti-virale, anti-batterica, anti-micotica e anti-cancro (Kreuger et al., 2012). E' ormai noto da tempo il loro impiego nelle pratiche medicinali tradizionali per il trattamento di stati febbrili, emicrania, disturbi gastrici, mal di denti, artrite reumatoide, irregolarità mestruali ed altri stati infiammatori (Mathema et al., 2012). I SLS sono composti a 15 atomi di carbonio, costituiti da tre unità isopreniche e un gruppo lattone (estere ciclico). Un'importante caratteristica dei SLS, che rappresenta la porzione attiva della molecole, è la presenza di un anello γ -lattone (chiuso verso o C-6 o C-8), contenente, in molti casi, un gruppo α -metilene. La presenza di questo raggruppamento funzionale è intrinsecamente connesso con la citotossicità (Ghantous et al., 2010). Tramite i gruppi α -metilene- γ -lattone, questi elementi strutturali reagiscono con i gruppi nucleofili, i più reattivi dei quali sono i gruppi tiolici, come i residui aminoacidici di cisteina presenti nelle proteine e il glutatione (GSH) intracellulare libero. Tali interazioni portano alla riduzione di attività enzimatiche ed interferiscono col metabolismo del GSH e l'equilibrio redox, essenziale per la sopravvivenza della cellula (Ghantous et al., 2013). Recentemente i SLS sono stati introdotti in trials clinici oncologici grazie alla loro proprietà di eliminare selettivamente le cellule tumorali e le cellule staminali cancerose (CSCs), risparmiando quelle normali. Il trattamento della malattia tumorale con questi composti si è dimostrato efficace, dal momento che la massa tumorale viene ridotta e la crescita delle cellule staminali cancerose viene inibita. Attualmente i SLS coinvolti negli studi clinici sono l'Artemisina, la Tapsigargina ed il Partenolide (Kreuger et al., 2012).

Notevole interesse suscita oggi il Partenolide (PN), un composto di origine naturale, estratto dall'erba medicinale *Tanacetum parthenium*, nota anche come "feverfew". Si tratta di un noto antinfiammatorio, impiegato da lungo tempo per alleviare sintomatologie dolorose, come le emicranie (Johnson 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). Numerosi studi hanno dimostrato che il PN possiede anche attività antimicrobica e antivirale ma soprattutto anticancerosa nei confronti di una vasta gamma di tumori quali la leucemia

mieloide acuta, il carcinoma del seno, del polmone e della prostata (Guzman et al., 2005; Nakshatri et al., 2004; Zhang et al., 2009; Sun et al., 2007).

Dal punto di vista molecolare 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). Target molecolare del PN è anche il fattore di trascrizione NF-kB che può svolgere un ruolo chiave nella tumorigenesi di alcune forme neoplastiche umane. Alcuni studi hanno, per esempio, messo in evidenza come la via di trasduzione del segnale di NF-kB sia costitutiva in alcune forme tumorali, quali carcinoma mammario, carcinoma al colon, linfoma di Hodgkin. Questi dati sono supportati da osservazioni sperimentali che mostrano come NF-kB possa regolare l'espressione di geni anti-apoptotici coinvolti nel cancro (Wu e Kral, 2005). Pertanto, l'inibizione di NF-kB è diventata una strategia di primario interesse nella ricerca oncologica. NF-kB è un fattore di trascrizione ubiquitariamente espresso, che regola svariate funzioni vitali per la cellula, quali il ciclo cellulare, il differenziamento, la proliferazione. Esso è anche in grado di operare un controllo della risposta immunitaria e dell'infiammazione (Pajak et al., 2008). NF-kB può essere costituito da omo- o eterodimeri dei membri appartenenti alla famiglia di Rel, tra cui: Rel A (p65), Rel B e c-Rel. NF-kB è mantenuto inattivo nel citoplasma grazie alle proteine I κ Bs che mascherano la sua sequenza di localizzazione nucleare. La fosforilazione di I κ B, da parte della chinasi IKK (etero dimero costituito da due sub unità catalitiche IKK α e IKK β e dalla sub unità regolatrice IKK γ) sul dominio citosolico e la sua successiva ubiquitinazione e degradazione nel proteosoma, determinano l'attivazione di NF-kB che trasloca nel nucleo e, in seguito al legame con il promotore di NF-kB, attiva la trascrizione dei geni da esso controllati (Sarkar e Li, 2008). NF-kB è attivato in seguito a diversi stimoli pro-apoptotici, quali TNF- α , farmaci citotossici, radiazioni ionizzanti e stress ossidativo. In risposta a tali segnali, NF-kB trasloca al nucleo e regola l'espressione di alcuni geni anti-apoptotici. Tali geni bersaglio includono quelli che esprimono il fattore 1 associato al recettore per TNF- α (TRAF1), TRAF2, le cIAP, la manganese superossido dismutasi (MnSOD), A20 e IEX-1L. Inoltre, controlla l'espressione di Bfl1/A1 e Bcl-xL, due proteine

anti-apoptotiche appartenenti alla famiglia di Bcl-2 (Wang et al., 2002). Tra i target trascrizionali di NF- κ B vi sono anche fattori coinvolti nella invasività cellulare come MMP-2 ed MMP-9, nell'angiogenesi come VEGF (Oka et al., 2007; Shibata et al., 2002) e 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).

Le modalità attraverso le quali il PN è in grado di inibire la via di segnalazione mediata da NF- κ B sono essenzialmente due: 1) in modo indiretto, tramite l'inibizione del complesso IKK (Hehner et al., 1998), 2) in modo diretto, tramite l'inibizione della sub unità Rel-A/p65. Nel primo caso, secondo alcuni studi, il PN interagirebbe 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). Nel secondo caso, altri studi hanno evidenziato un meccanismo di inibizione diretta di NF- κ B da parte del PN; dovuto ad una diretta interazione del PN con una cisteina presente nel sito di attivazione della subunità p65 (Kwok et al., 2001).

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), fattori di trascrizione che mediano diverse funzioni biologiche come la proliferazione cellulare, l'apoptosi, il differenziamento, l'infiammazione e la risposta immune (Meyer e Vinkemeier, 2007). Queste proteine, soprattutto l'isoforma STAT-3, sono costitutivamente attive, a causa della persistente fosforilazione delle loro tirosine in numerose forme tumorali, quali leucemia, mieloma multiplo (Ferrajoli et al., 2006), carcinoma della mammella (Sheen-Chen et al., 2007), carcinoma della prostata (Bromberg, 2002), tumore del colon retto (Ma et al., 2004) e carcinoma epatocellulare (Carlisi et al., 2011). 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 avere un effetto inibitorio su 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. 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-XL, survivina, Bcl-2), e fattori che promuovono l'angiogenesi (VEGF). Studi condotti in precedenza presso i laboratori di Biochimica del Policlinico di Palermo, dove ho sviluppato la mia tesi, hanno dimostrato 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 rendendole così sensibili alla morte per apoptosi indotta dal 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'insuccesso sia dell'evento apoptotico (Dhanasekaran e Reddy, 2008; Varfolomeev e Ashkenazi, 2004), sia dell'evento necrotico (Shen e Liu, 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-kB (Zhang et al., 2004a) 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 GSH, 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 e Jordan, 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 b). Inoltre studi condotti in precedenza presso i laboratori di Biochimica dove ho svolto questa tesi hanno dimostrato che in cellule di osteosarcoma umano MG63 e melanoma umano SK-MEL-28 il PN induce produzione di ROS a livello mitocondriale, evento che viene contrastato da inibitori della catena respiratoria quali il rotenone e l'FCCP (D'Anneo et al., 2013a).

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., 2013a,b). 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 di NF-kB, 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, presso gli stessi laboratori, 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 i laboratori dove ho sviluppato la mia tesi hanno evidenziato che in cellule di osteosarcoma umano MG63 e in cellule di melanoma umano SK-MEL-28 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., 2013a). 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).

Le proprietà antitumorali del PN sono state anche attribuite al suo ruolo di modulatore del codice epigenetico. I meccanismi epigenetici sono frequentemente alterati nelle cellule cancerose e alcuni tumori presentano modifiche aberranti degli istoni, esprimono elevati livelli di attività della deacetilasi istonica 1 (HDAC1) e sono molto più sensibili all'azione degli inibitori delle deacetilasi istoniche rispetto alle cellule normali (Ghantous et al., 2010). Il PN è in grado di ridurre l'espressione della proteina HDAC1 determinandone la degradazione da parte del proteasoma, senza inibire l'azione delle HDACs di classe I/II (Gopal et al., 2007). Il PN, ad esempio, attraverso questa inibizione, promuove la trascrizione del gene p21, un inibitore del complesso chinasi ciclino-dipendente, determinando l'arresto del ciclo cellulare (Ghantous et al., 2010). E' stato anche evidenziato che il ruolo del PN, come rimodellatore del codice epigenetico, si espleta anche sulla metilazione del DNA. Diversi tipi di tumore hanno elevati livelli di DNA metil trasferasi quali la DNMT1 e la DNMT3b. Questo determina ipermetilazione delle isole CpG dei promotori di alcuni geni che codificano per tumor suppressors determinando un loro silenziamento in alcune forme tumorali (Ghantous et al., 2010). Il PN induce ipometilazione del DNA *in vitro* ed *in vivo* inibendo in modo specifico l'attività di DNMT1 grazie al legame covalente tra il suo gruppo α -metilene- γ -lattone e la cys1226 del gruppo tiolico funzionale posto nel sito catalitico dell'enzima (Ghantous et al., 2010). Queste principali caratteristiche, fanno del PN l'agente anti-cancro ideale, è stato infatti dimostrato che tale composto è in grado di esplicare il suo potenziale antineoplastico in un ampio spettro di forme tumorali quali: osteosarcoma (D'Anneo et al., 2013a); melanoma (D'Anneo et al., 2013a); cancro renale (Oka et al., 2007); cancro al seno, cancro della cervice uterina (Wu et al., 2006); carcinoma pancreatico (Liu JW et al., 2010); cancro al colon-retto, epatocarcinoma, carcinoma intraepatico biliare (Carlisi et al., 2011); carcinoma prostatico (Sun et al., 2007) e carcinoma polmonare non a piccole cellule (Zhang et al., 2009).

Il PN è stato, inoltre, identificato nel 2005 come la prima molecola in grado di agire selettivamente sulle CSCs uccidendole, ciò è stato dimostrato impiegando cellule staminali di leucemia mieloide cronica (Guzman et al., 2005). Il PN agisce su tali cellule inibendo la loro

proliferazione, la formazione di sfere e la crescita del tumore trapiantato in modelli murini e canini. Il principale meccanismo mediante il quale esplicherebbe la sua azione riguarda l'inibizione di NF- κ B. In CSCs di carcinoma prostatico, inoltre, il PN oltre ad agire su NF- κ B, inibisce la MAPK, la via JAK/STAT e la PI3K (fosfatidilinositolo-3-chinasi) che rappresentano le principali vie di sopravvivenza e di autorinnovamento delle CSCs (Kawasaki et al., 2009). Un altro importante meccanismo mediante il quale il PN colpisce selettivamente le CSCs è l'alterazione dei sistemi redox, esso infatti è in grado di determinare la deplezione di due importanti molecole deputate all'omeostasi redox cellulare quali la tioredoxina e il GSH (Ghantous et al., 2010).

Nonostante il PN abbia dimostrato effetti promettenti *in vitro*, l'impiego di questo composto naturale come agente terapeutico è fortemente limitato dalla sua scarsa solubilità (Curry et al., 2004). A tale proposito, per ovviare a ciò, da Guzman ed i suoi collaboratori (Guzman et al., 2007) è stata generata una famiglia di analoghi del PN, progettati per migliorarne la solubilità e la biodisponibilità. Questi studi hanno identificato in particolare un analogo solubile conosciuto come dimetilammio-partenolide (DMAPT), ottenuto facendo reagire il PN con la dimetilammina, quindi il composto prodotto è stato convertito nel suo sale fumarato che ha dimostrato una solubilità in acqua 1000 volte superiore al PN, una maggiore biodisponibilità ed una minore tossicità. Il DMAPT è in grado di indurre rapidamente la morte delle cellule staminali leucemiche sia mieloidi che linfoidi ed è anche altamente citotossico per i diversi tipi di cellule leucemiche. Studi molecolari mostrano che il DMAPT, *in vitro*, induce stress ossidativo, inibizione di NF- κ B e attivazione di p53 e provoca la morte in cellule di cancro della prostata, del polmone e della vescica (Shanmugam et al, 2010; Shanmugam et al., 2011). La sua efficacia *in vivo* è stata dimostrata in xenograft di cellule di carcinoma prostatico e in modelli murini di cancro del polmone e della vescica in cui riduce la crescita tumorale e inibisce il processo metastatico (Shanmugam et al, 2010). Dati preclinici hanno dimostrato che questa molecola manifesta le sue proprietà antineoplastiche anche in trials clinici impiegati per il trattamento di alcune forme tumorali umane (Guzman et al., 2007). Il gruppo di ricerca di Hassane e Sen (2010; 2013) ha messo in evidenza che sebbene il PN e il DMAPT siano in grado di indurre un effetto citotossico in cellule leucemiche, tuttavia nei medesimi sistemi sperimentali esercitano un effetto citoprotettivo riconducibile alla sua capacità di attivare il pathway di PI3K/mTOR, che ne limita fortemente l'efficacia antitumorale. Inoltre l'attivazione della via di mTOR è responsabile dell'attivazione di Nrf2, un fattore trascrizionale che legandosi alle sequenze AREs (antioxidant-response elements) determina

incrementata espressione di geni che codificano per enzimi antiossidanti, impegnati in processi di detossificazione cellulare quali l'eme-ossigenasi 1, la superossido dismutasi, la catalasi, la glutatione perossidasi, la tioredossina (Kobayashi e Yamamoto, 2005). Sono stati individuati dei composti inibitori di tale via, quali la wortmannina, LY294002, rapamicina (sirolimus), ed il ciclopirox, un antifungino, che agendo in modo sinergico col PN sono in grado di incrementarne il potenziale antitumorale (Hassane et al., 2010; Sen et al., 2013).

Recentemente, presso i laboratori di Biochimica del Policlinico di Palermo, è stata dimostrata l'efficacia del PN su cellule di carcinoma mammario triplo negativo MDA-MB231. In quest'ultima linea cellulare il composto è in grado di innescare un meccanismo di morte caspasi-indipendente, correlato con l'induzione di autofagia e la produzione di ROS. E' stato inoltre accertato che l'impiego *in vivo* del suo analogo solubile DMAPT è in grado di ridurre il volume tumorale ed aumentare la sopravvivenza di modelli murini di carcinoma mammario (D'Anneo et al., 2013b). Gli studi condotti hanno quindi dimostrato che il PN e il DMAPT sono composti potenzialmente efficaci nel trattamento del carcinoma mammario triplo negativo.

6. MECCANISMI DI MORTE CELLULARE PROGRAMMATA

La morte cellulare è uno dei processi fisiologici più importanti che regola l'omeostasi tissutale in tutti gli organismi. La deregolazione di questo fenomeno è associata a molte patologie, come il cancro o la neurodegenerazione. Nella terapia antitumorale, la maggior parte dei chemioterapici utilizzati agisce proprio su molecole coinvolte nella regolazione dei diversi pathways di morte cellulare (Ricci e Zong, 2006). Nella cellula esistono dei meccanismi di morte altamente regolati che seguono un programma molecolare ben preciso e che pertanto vengono definiti “meccanismi di morte cellulare programmata” (PCD). La conoscenza dei meccanismi che presiedono al controllo della morte cellulare programmata rappresenta oggi un aspetto di particolare importanza nel panorama delle conoscenze biologiche che, nel futuro, potrebbe aprire la strada allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Tra i principali meccanismi di morte cellulare programmata, oggi, si annoverano:

- l'*apoptosi*, che è caratterizzata dall'attivazione di specifiche proteasi che prendono il nome di caspasi;
- la *necroptosi* che è una forma di necrosi programmata, ossia un evento di morte caspasi-indipendente innescato da meccanismi di trasduzione del segnale e regolato da specifiche proteine enzimatiche (Galluzzi e Kroemer, 2008; Hitomi e al., 2008);
- l'*autofagia*, un ulteriore meccanismo caspasi-indipendente che può svolgere anche un ruolo di sopravvivenza (Ouyang et al., 2012; Liu et al., 2012).

6.1 L'apoptosi

L'apoptosi, è un meccanismo di morte cellulare programmata, geneticamente controllato e altamente conservato nel corso dell'evoluzione (Metzstein et al., 1998) ed è il frutto di un fisiologico processo cellulare che concorre al mantenimento della normale omeostasi tissutale durante l'embriogenesi di diversi organismi ma anche in situazioni patologiche (Fulda e Debatin, 2004; Dunai et al., 2011). L'apoptosi è un evento di morte che di norma non si accompagna a processi infiammatori, poiché il materiale interno alla cellula non viene riversato all'esterno (Chowdhury et al., 2006). I cambiamenti cellulari iniziano con un arrotondamento della cellula, cui conseguono la perdita dei contatti con le cellule circostanti e la scomparsa di strutture proprie di membrana come i microvilli e le regioni specifiche di contatto con le altre cellule. Nel contempo, la perdita di acqua e di ioni determina una riduzione del volume cellulare con conseguente condensazione citoplasmatica (Kerr, 2002). A

livello nucleare, si verifica la perdita del nucleolo e la condensazione della cromatina in ammassi densi e circoscritti che si addossano alla membrana nucleare (nucleo picnotico). Successivamente, la matrice nucleare interna viene solubilizzata esponendo il DNA all'attacco enzimatico di nucleasi, che provocano la rottura dell'acido nucleico in frammenti ad alto peso molecolare. Al termine della condensazione cromatinica, il nucleo si presenta distrutto in frammenti che racchiudono anche organuli cellulari (mitocondri e porzioni del reticolo endoplasmico), circondati da membrana nucleare ed inglobati in protuberanze, che si formano alla superficie della cellula (*blebs*). La membrana plasmatica che delimita tali protuberanze si salda, dando origine ai "corpi apoptotici", rapidamente fagocitati e digeriti dai macrofagi. Tra i principali protagonisti di un processo così complesso e finemente regolato si annoverano le caspasi, cisteina/aspartato proteasi, che rappresentano i principali effettori coinvolti sia nell'innescio, sia nell'esecuzione di questo processo di morte. Le caspasi vengono sintetizzate in forma di zimogeni inattivi (procaspasi), ed attivate mediante taglio proteolitico (Fan et al., 2005). Dal punto di vista funzionale le caspasi sono distinte in due classi: iniziatrici, quali le caspasi-2, 8, 9 e 10, ed effettrici o esecutrici di morte quali le caspasi-3, 6, 7; queste ultime, a loro volta, agiscono su substrati specifici eterogenei, che si distinguono per attività, funzione e localizzazione subcellulare, tra cui citocheratine, PARP, proteine citoscheletriche e la proteina nucleare NuMA, responsabili dei cambiamenti biochimici e morfologici osservati nelle cellule apoptotiche (Elmore, 2007).

L'attivazione delle caspasi può verificarsi attraverso tre distinte modalità:

- meccanismo a cascata, che prevede un taglio proteolitico operato su una caspasi da parte di una o più caspasi che operano a monte nel percorso apoptotico; ciò è tipico delle caspasi esecutrici che vengono attivate dalle caspasi iniziatrici quali le caspasi-8 e 9;
- meccanismo per prossimità indotta, tipica della caspasi-8, la quale viene reclutata nella forma procaspasica, in un particolare microdominio dove è presente una proteina adattatrice; l'aumentata concentrazione che ne consegue stimola l'attività proteolitica dell'enzima portando ad una attivazione per proteolisi crociata;
- formazione di un complesso con altri fattori. A questo proposito ricordiamo la caspasi-9 che si attiva, in presenza di ATP, in seguito a coniugazione con il fattore Apaf-1 ed il citocromo C, (Kaufmann e Hengartner, 2001).

Esistono due vie principali di morte apoptotica, a seconda della natura dello stimolo induttore:

- *Via intrinseca*, anche detta via mitocondriale. Attivata da stimoli induttori interni alla cellula, quali, ad esempio, stress ossidativo, danno al DNA o da stimoli extracellulari quali la carenza di nutrienti o di fattori di crescita.
- *Via estrinseca*, mediata dall'attivazione di Recettori di Morte (DR) localizzati sulla membrana plasmatica. In entrambi i casi l'apoptosi è mediata dall'attivazione delle caspasi, che tagliano un gran numero di substrati citoplasmatici e nucleari per indurre gli eventi caratteristici della morte programmata.

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 e Korsmeyer; 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).

La *via estrinseca* prevede, invece, 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 domini 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.

6.2 La necroptosi

Con il termine necroptosi, oggi, si intende un evento di morte caspasi indipendente altamente regolato che trae origine da forme di morte necrotica che tradizionalmente viene contrapposta all'apoptosi e che per lungo tempo è stata considerata un evento passivo e accidentale (Ouyang et al., 2012; Liu et al., 2012). La necroptosi è un processo indotto da recettori che risulta morfologicamente simile alla necrosi ed è caratterizzato da una precoce perdita dell'integrità di membrana, aumento del volume cellulare e rigonfiamento degli organelli (Dunai et al., 2011). La necroptosi può essere attivata da diversi ligandi, tra cui FasL, TNF α e Trail; gli stessi ligandi che, attraverso specifici recettori di morte, possono attivare anche l'apoptosi. Il pathway più studiato che porta alla necroptosi è quello indotto dal legame del TNF α al suo recettore TNF-R1. Il TNF α generalmente induce segnali di sopravvivenza attraverso NF-kB ma è anche in grado di indurre apoptosi e morte cellulare simile a necrosi. A tale riguardo, il legame del TNF α al suo recettore induce dei rapidi cambiamenti conformazionali che permettono il reclutamento di RIP1 (Dunai et al., 2011, Christofferson e Yuan, 2010). La proteina RIP1 contiene un dominio di morte che le consente di interagire con i recettori per il TNF (TNFR1), ma anche con Fas, e i recettori del ligando TRAIL (TRAIL R1 e 2), mediante 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,

formando un complesso che è stato definito “necrosoma” (Sun et al., 2002). RIP-3 all’interno del complesso assume il ruolo di esecutore dell’evento necroptotico. 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. 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).

E’ stato visto che in condizioni in cui la caspasi 8 è compromessa o comunque in alcune linee cellulari tumorali, quali per esempio quelle di fibrosarcoma (L929) e fibroblasti embrionali di topo (MEFs), l’attivazione del pathway di TNF α induce necroptosi RIP dipendente, che può essere inibita dalla necrostatina, inibitore dell’attività di RIP1 (Dunai et al., 2011). Alcuni studi indicano inoltre che anche i ROS possono essere esecutori della morte cellulare per necroptosi, determinando diversi effetti, quali una prolungata attivazione della chinasi JNK, seguita da morte cellulare (Christofferson e Yuan, 2010). Anche le alterazioni a carico del mitocondrio rappresentano un altro fenomeno che caratterizza la necroptosi come la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna che può condurre alla produzione di ROS (Christofferson e Yuan, 2010).

6.3 L’ autofagia

Un altro meccanismo di morte cellulare programmata 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). Si tratta, infatti, di un processo adattativo che permette alla cellula di sopravvivere in momenti di stress metabolici come carenze nutrizionali, mediante degradazione di proteine e organelli intracellulari. L’autofagia è un processo caratterizzato dalla presenza di autofagosomi ossia vescicole a doppia membrana che sequestrano il citoplasma o organuli cellulari e successivamente si fondono con i lisosomi, consentendo la digestione del materiale sequestrato. Quando l’autofagia assume un ruolo di sopravvivenza, le componenti cellulari sequestrate e degradate vengono riciclate per la sintesi di macromolecole e di ATP. L’autofagia può inoltre degradare organelli danneggiati o costituenti citosoliche alterate, come per esempio aggregati proteici, preservando la cellula 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 e Yuan, 2005). Quando nella cellula vi è 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).

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 ossia le proteine ATG. Tali proteine, che intervengono in diverse fasi dell'evento autofagico, 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 e Yuan, 2005). L'autofagia ha inizio con la formazione del fagoforo o membrana di isolamento (fase di nucleazione delle vescicole). L'azione di diverse proteine determina l'espansione del fagoforo in autofagosoma (fase di espansione delle vescicole). L'autofagosoma può inglobare regioni di citoplasma in maniera non specifica, inclusi interi organelli. Successivamente la membrana esterna dell'autofagosoma si fonde con un endosoma (formando un anfisoma, prima di fondersi con un lisosoma) oppure direttamente con un lisosoma (fase di fusione) generando un autofagolisosoma. Infine il materiale contenuto all'interno della vescicola viene degradato e riciclato (fase di degradazione) (Kourtis e Tavernarakis, 2009).

Tra i principali regolatori dell'autofagia vi è la chinasi target della rapamicina (mTOR), una proteina sensibile allo stato nutrizionale della cellula (Pyo et al., 2012). In particolare mTOR interviene durante la fase di formazione dell'autofagosoma regolando l'attività di un complesso che nei mammiferi è costituito da: ULK1 (ATG1), mATG 13 (ATG13), FIP200 o Focal adhesion kinase family Interacting Protein (ATG17) e ATG 101. In condizioni di abbondanza di nutrienti mTOR è attiva e, mediante un meccanismo ancora non chiarito, causa la fosforilazione della chinasi ULK1 e ne inibisce l'attività, impedendole di interagire con il fagoforo e di intervenire nella formazione dell'autofagosoma. In condizioni di deprivazione di nutrienti mTOR è inattiva, ciò consente l'autofosforilazione e conseguente attivazione di ULK1, la quale va a fosforilare le proteine ATG13 e FIP200. ULK1, ATG13 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. ULK1 è

coinvolta anche nel reclutamento di un complesso che partecipa alla fase di nucleazione delle vescicole, tale complesso contiene la PI3KIII 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 fosfatidilinositolo-3 fosfato (PIP3), che recluta diverse proteine nel sito di nucleazione.

A tale fase segue la fase di espansione delle vescicole ossia la formazione dell'autofagosoma. Questa fase prevede diversi eventi tra cui la formazione del complesso ATG 12-ATG 5-ATG 16 e la conversione della proteina LC3 (ATG 8) dalla forma LC3I alla forma LC3II, evento chiave per la formazione dell'autofagosoma. In particolare 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 (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 (Pyo et al., 2012).

7. CROSSTALK TRA AUTOFAGIA E APOPTOSI

Sebbene l'autofagia e l'apoptosi costituiscano due processi cellulari distinti che conducono la cellula verso due diversi destini, i due pathway sono profondamente interconnessi tra di loro (Liang et al., 2012; Rubinstein e Kimchi, 2012). I meccanismi alla base di tale "crosstalk" non sono ancora del tutto chiariti ma l'ipotesi più accreditata prevede che la cellula vada incontro all'uno o all'altro destino in risposta a segnali di stress. L'apoptosi, come è ben noto, è un meccanismo di morte cellulare programmata rivolto all'eliminazione di cellule superflue durante il normale sviluppo di un organismo adulto (Metzstein et al., 1998). L'autofagia è un processo catabolico rivolto ad eliminare all'interno della cellula organelli danneggiati e patogeni, esso gioca un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, contribuisce alla sopravvivenza cellulare in condizioni di stress e fronteggia la privazione di nutrienti (Ouyang et al., 2012; Liu et al., 2012). Tuttavia in condizioni di stress eccessivo, l'autofagia cede il passo all'apoptosi. L'autofagia, va inoltre sottolineato, è un evento chiave nella malattia tumorale che risulta spesso associato anche alla resistenza intrinseca a trattamenti farmacologici. In considerazione del ruolo chiave di questo processo nella crescita e sopravvivenza cellulare tale meccanismo è stato recentemente identificato come target terapeutico in oncologia. Agenti chemioterapici che agiscono in combinazione tra loro possono inibire il processo autofagico sovvertendo la capacità della cellula di adattarsi allo stress e condurre la cellula verso l'arresto del ciclo cellulare o la morte cellulare programmata. Recenti studi hanno evidenziato che la soppressione dell'autofagia porta all'inibizione della proliferazione cellulare in cellule di carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) e le sensibilizza all'apoptosi indotta dal cisplatino attraverso la stimolazione della produzione di ROS (Kaminsky et al., 2012).

Sono state individuate, in particolare, tre diverse modalità mediante le quali l'autofagia e l'apoptosi possono dialogare tra loro: la prima prevede un'interazione fisica e funzionale tra i diversi fattori protagonisti dell'uno e dell'altro meccanismo; la seconda riguarda un controllo da parte dei due meccanismi dell'attività caspatica e autolisosomale; la terza prevede un controllo esclusivo da parte del meccanismo autofagico che sarebbe in grado di reclutare le caspasi e determinarne l'attivazione a livello della membrana autofagosomale (Rubinstein e Kimchi, 2012).

7.1. Regolazione dell'apoptosi da parte di specifiche proteine autofagiche

Tra le proteine protagoniste dell'evento autofagico ne sono state individuate alcune che rivestono un ruolo chiave anche nell'apoptosi. Un esempio è rappresentato dalla beclina-1 che insieme alla fosfatidilinositolo-3-chinasi di classe III (PI3KC3) forma un complesso regolatore del processo autofagico posto a valle del pathway di mTOR. La beclina-1, in particolare, stimola l'attività chinasi della PI3KC3 che è necessaria per il reclutamento delle proteine autofagiche ai siti di formazione dell'autofagosoma. La beclina-1 è anche in grado tramite il suo dominio BH3 di legarsi a Bcl2 e di inibire l'autofagia ma al contempo di sottrarre Bcl2 al suo ruolo di proteina antiapoptotica stimolando così la morte (Maiuri et al., 2007; Oberstein et al., 2007). E' stato anche osservato che la beclina-1 subisce il taglio proteolitico da parte delle caspasi quando nella cellula si innesca l'apoptosi. Il frammento C-terminale della beclina-1 frutto del taglio operato dalle caspasi migra al mitocondrio e determina il rilascio del citocromo c (Wirawan et al., 2010). E' stata avanzata l'ipotesi che tale taglio è in grado di inibire il processo autofagico inteso come meccanismo citoprotettivo in cellule indirizzate irreversibilmente verso la morte (Cho et al., 2009; Luo e Rubinsztein, 2010; Wirawan et al., 2010).

Durante l'autofagia, il processo di formazione dell'autofagosoma richiede l'assemblaggio di un complesso formato dalle proteine autofagiche Atg12 e Atg5 (Rubinstein et al., 2011). In condizioni di stress eccessivo il complesso costituito dalle due proteine non si forma ed in particolare Atg5 subisce un taglio da parte delle calpaine (cisteina-proteasi calcio dipendenti). Il frammento N-terminale risultante dal taglio trasloca al mitocondrio dove determina il rilascio del citocromo c e dove interagisce con BclXL, un membro antiapoptotico della famiglia Bcl2, determinandone l'inattivazione (Yousefi et al., 2006).

7.2 Gli autofagosomi fungono da piattaforme per l'attivazione delle caspasi

Secondo le osservazioni di molti autori l'autofagia può direttamente contribuire all'induzione dell'apoptosi. Secondo tale ipotesi le caspasi sono reclutate direttamente sugli autofagosomi che fungono da piattaforme intracellulari per la loro attivazione. Tale meccanismo è stato evidenziato per quanto riguarda la caspasi 8 che può essere attivata dal complesso DISC che si assembla sulla membrana degli autofagosomi. L'attivazione della caspasi 8, in questo caso, non prevede il coinvolgimento del pathway estrinseco dell'apoptosi (Laussmann et al., 2011; Young et al., 2012). Sono state descritte due diverse modalità mediante le quali la caspasi 8 può essere reclutata a livello dell'autofagosoma: la prima prevede che la caspasi 8

ubiquitinata si leghi a p62, una proteina autofagica con funzione recettoriale, che ne determina l'oligomerizzazione e in seguito l'attivazione; la seconda prevede un'interazione tra la caspasi 8, la proteina adattatrice FADD e Atg5. (Jin et al., 2009; Young et al., 2012; Pyo et al., 2005; Young et al., 2012).

7.3 Regolazione dell'autofagia da parte di specifiche proteine apoptotiche

Alcuni fattori facenti parte del macchinario apoptotico possono direttamente interagire con proteine autofagiche. Un esempio già menzionato è rappresentato da Bcl2 che formando un complesso con la beclina-1 ne impedisce l'attivazione. In condizioni di benessere cellulare Bcl2 è costitutivamente legato alla beclina-1 e ciò inibisce l'autofagia, in condizioni di stress cellulare Bcl2 si dissocia dalla beclina-1 e si ha induzione del processo autofagico. Altre proteine che possiedono il dominio BH3 possono competere con Bcl2 nel legame con la beclina-1 tra cui: BclX_L che in condizioni di mancanza di nutrienti si dissocia dalla beclina-1 e si lega alla proteina antiapoptotica BAD (Maiuri et al., 2007); Noxa che regola anch'essa il legame tra Bcl2 e la beclina-1 (Elgendy et al., 2011); Bim che non influenza il legame tra Bcl2 e la beclina-1 ma funziona come inibitore dell'autofagia ancorando la beclina-1 ai microtubuli. Un altro noto meccanismo di regolazione dell'autofagia riguarda la fosforilazione tanto di Bcl2 che della beclina-1. Dati recenti, in particolare, hanno infatti documentato che JNK svolge un ruolo attivo nell'evento autofagico, in quanto fosforila Bcl2 e promuove il rilascio della beclina-1 soprattutto in condizioni di carenza di nutrienti (Wei et al., 2008) ed in seguito a trattamento con ceramide (Patingre et al., 2009). Quest'ultima a sua volta può essere fosforilata dalla death-associated protein kinase (DAPK) che ne promuove la dissociazione da BclX_L inducendo l'autofagia (Zalckvar et al., 2009). La compartimentalizzazione di alcuni fattori protagonisti dei due processi rappresenta un ulteriore modalità di regolazione del crosstalk tra autofagia e apoptosi. Un esempio è rappresentato dai due diversi compartimenti in cui risiede Bcl2 ossia il reticolo endoplasmatico (ER) e il mitocondrio che rispettivamente regolano l'autofagia e l'apoptosi (Patingre et al., 2005). In particolare nel ER l'autofagia è regolata dal legame tra Bcl2 e la beclina-1 che viene favorito dall'intervento del fattore endoplasmatico NAF1 e inibito dalla proteina BIK (Chang et al., 2010). Inoltre è stato osservato che in condizione di carenza di nutrienti JNK1 specificamente fosforila Bcl2 che risiede a livello endoplasmatico inducendo autofagia (Wei et al., 2008); in maniera opposta a livello mitocondriale l'interazione tra Bcl2 e le proteine Bax, Bak e AMBRA1, un regolatore positivo della beclina-1 è responsabile

dell'attivazione dell'apoptosi e dell'inibizione dell'autofagia (Adams e Cory, 2007; Martinou e Youle, 2011; Strappazon et al., 2011). Un importante ruolo viene svolto anche dalla proteina anti-apoptotica FLIP, in particolare è stato evidenziato che l'isoforma FLIPs può inibire l'autofagia poiché impedisce il legame di LC3 ad Atg3 in sede di formazione dell'autofagosoma (Lee et al., 2009).

Infine è stato osservato che numerose proteine autofagiche quali la beclina-1, VPS34, Atg3, Atg4d e AMBRA1 subiscono il taglio da parte delle caspasi che ne determina l'inattivazione, in tal senso l'inibizione dell'autofagia che spesso precede l'apoptosi, serve a prevenire la simultanea attivazione di due processi opposti nella cellula, l'uno che mira alla sopravvivenza l'altro che mira alla morte (Betin e Lane, 2009; Cho et al., 2009; Luo e Rubinsztein, 2010; Norman et al., 2010; Oral et al., 2012; Pagliarini et al., 2012).

MODELLO SPERIMENTALE

Le ricerche descritte in questa tesi sono state condotte impiegando come modello sperimentale le cellule MDA-MB231, una linea di adenocarcinoma mammario umano altamente aggressiva, isolata da metastasi pleuriche. In particolare questa linea cellulare è stata ricavata da un singolo campione di effusione pleurale ottenuto nel 1973 da una donna di 51 anni alla quale era stata praticata nel 1969 una mastectomia radicale destra a causa di un tumore scarsamente differenziato tendente verso la configurazione papillare ed alla formazione tubulare e complicata da effusione pericardiale ed effusione pleurale. La terapia praticata consistente nel trattamento sistemico, dapprima con 5-Fluorouracile e in seguito con ciclofosfamide, adriamicina e amfoterina non ebbe successo (Cailleau et al., 1974). 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 (PR) 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). Numerosi studi concordano nel dimostrare che tale recettore è coinvolto nella proliferazione, nella sopravvivenza, nel differenziamento, nella migrazione e nell'invasività delle cellule. Hirsch et al. (2006), in particolare, hanno dimostrato che l'elevato livello dell'EGFR in questa linea cellulare non è conseguenza di un meccanismo di amplificazione genica, bensì di una decrementata degradazione di questo recettore. Inoltre Zhou et al. (2009) hanno dimostrato che gli elevati livelli di EGFR sono correlati con l'assenza del recettore degli estrogeni ER α , che quando presente è in grado di interagire 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. Un'altra mutazione che contribuisce ad incrementare il tasso di proliferazione e di sopravvivenza delle cellule MDA-MB231 riguarda la proteina p53. Tale mutazione, localizzata nell'esone 8, codone 280, determina la sostituzione di un residuo di arginina con una lisina (R280K). Questa mutazione altera la capacità della p53 di legare il DNA (Houvinen et al., 2011). In particolare la p53 si può legare solo a promotori associati ad istoni fortemente acetilati (Vrba et al., 2008). Un'altra mutazione 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 (Kozma et al., 1987). Un'altra caratteristica delle cellule MDA-MB231 è l'overespressione delle subunità integriniche β 1, β 4, α 2, α 3, α 5, α V, α 6. I recettori

integrinici sono responsabili di segnali di proliferazione che favoriscono la crescita e l'invasività (Morini et al., 2000; Lichtner et al., 1998). 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). Le cellule MDA-MB231 hanno un fenotipo *mesenchymal-like o stromal-like* (Lacroix e Lequercq, 2004); presentano, infatti, molte caratteristiche comuni alle cellule mesenchimali in quanto sono dotate di un'elevata capacità di invadere e attraversare membrane basali. Non essendo, queste linee cellulari, sensibili alle terapie ormonali, oggi la ricerca scientifica è rivolta all'individuazione di composti che risultino efficaci per il trattamento di queste forme tumorali particolarmente aggressive e altamente invasive.

OBIETTIVI DELLA TESI

Presso i laboratori di Biochimica del Policlinico di Palermo, il gruppo di ricercatori insieme ai quali ho sviluppato la mia tesi studia, da tempo, l'effetto di differenti composti nell'induzione di morte in cellule tumorali umane in coltura. Gli studi riportati in questa tesi sono stati condotti in cellule MDA-MB231, una linea di adenocarcinoma mammario umano triplo negativo così definita perché priva dei recettori degli estrogeni, del progesterone e di HER-2. Le forme di carcinoma mammario prive del recettore per gli estrogeni, sono insensibili alla terapia ormonale. Pertanto, oggi la ricerca è rivolta all'individuazione di composti che risultino efficaci per il trattamento di queste forme tumorali. Il gruppo di ricerca del quale ho fatto parte durante lo svolgimento del mio progetto ha approfondito negli ultimi anni uno studio riguardo le proprietà antitumorali del Partenolide (PN), un sesquiterpene lattone estratto dall'erba medicinale *Tanacetum parthenium*. Tale composto è noto essere in grado di indurre un'azione citotossica su cellule tumorali in coltura, mostrando invece modesta efficacia sulle cellule normali (Sun et al., 2010). La spiccata attività antineoplastica del PN è stata evidenziata in diversi sistemi tumorali quali il carcinoma pancreatico, il carcinoma della vescica, il colangiocarcinoma, la leucemia mieloide acuta, l'osteosarcoma e il melanoma (Liu et al., 2010; Cheng e Xie, 2011; Kim et al., 2005; Guzman et al., 2005; D'Anneo et al., 2013a). Recentemente studi condotti negli stessi laboratori hanno dimostrato che il PN esercita un potente effetto citotossico in cellule MDA-MB231 (D'Anneo et al., 2013b). I risultati ottenuti, in particolare, hanno dimostrato che il PN ad alte concentrazioni (superiori al 15 μ M) induce morte delle cellule, e che tale evento risulta indipendente dall'attivazione delle caspasi, ma correlato con la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). La produzione di ROS, risultante dall'attivazione della NADPH ossidasi, esercita un ruolo cruciale nel meccanismo di morte indotto dal PN, in quanto in una prima fase di trattamento (1-8h) i ROS sembrano essere responsabili della stimolazione del processo autofagico, mentre in una seconda fase (8-20h) sembrano favorire la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale e la comparsa di eventi necrotici. Ulteriori studi hanno permesso di dimostrare che il PN mediante produzione di ROS promuove la fosforilazione del recettore per EGF nelle cellule MDA-MB231, che a sua volta favorisce l'attivazione della NADPH ossidasi con ulteriore produzione di ROS (D'Anneo et al., 2013c). L'effetto del PN in cellule di carcinoma mammario è stato anche valutato *in vivo* impiegando il diamminopartenolide (DMAPT), un analogo solubile del PN. La somministrazione di DMAPT a topi nudi portatori di xenotrapianti di cellule MDA-MB231 determina una significativa inibizione della crescita dei tumori, un incremento della sopravvivenza degli animali, una marcata riduzione delle

metastasi polmonari e una riduzione dei livelli di fattori angiogenetici, quali il VEGF, e invasivi, quali le metalloproteasi (D'Anneo et al., 2013b). Gli studi condotti hanno tuttavia dimostrato che il PN induce consistenti effetti tossici nelle cellule MDA-MB231 quando impiegato ad alte dosi (15-25 μ M), mentre quando è a basse dosi (2-5 μ M) anche dopo lunghi periodi di trattamento (70-100h), è scarsamente efficace. Questi risultati, in linea con osservazioni di altri autori, suggeriscono che il PN possa essere in grado di innescare un meccanismo citoprotettivo che si evidenzia a basse dosi, quando quest'effetto prevale sull'azione citotossica. Per ovviare a tale problema lo studio è stato rivolto all'individuazione di un composto che associato al PN e impiegato anch'esso a basse dosi potesse annullare l'effetto citoprotettivo, esplicando un potente effetto sinergico. L'individuazione di composti in grado di potenziare l'azione del PN rappresenta un obiettivo importante in quanto consentirebbe di abbassare le dosi dei composti impiegati riducendone la tossicità. L'attenzione, in particolare, è stata rivolta al SAHA, un inibitore delle deacetilasi istoniche, di cui i ricercatori del laboratorio di Biochimica del Policlinico di Palermo avevano già dimostrato l'efficacia nelle cellule MDA-MB231. Il SAHA è infatti in grado di sensibilizzare queste cellule alla via di TRAIL (Lauricella et al., 2012). Studi preliminari hanno dimostrato che il SAHA è in grado di sensibilizzare in modo sinergico le cellule MDA-MB231 all'azione citotossica del PN impiegato a basse dosi. In rapporto a tali osservazioni le ricerche condotte in questa tesi si sono proposte di valutare gli effetti della combinazione SAHA/PN nelle cellule MDA-MB231 e di chiarire il meccanismo molecolare alla base dell'interazione sinergica tra i due composti.

MATERIALI E METODI

1. COMPOSTI CHIMICI E REAGENTI IMPIEGATI

Per la realizzazione degli esperimenti riportati in questa tesi sono stati impiegati i seguenti composti:

- Il Partenolide, solubilizzato in dimetilsolfossido (DMSO), alla concentrazione 40 mM. Per gli esperimenti tale soluzione è stata diluita in terreno di coltura alla concentrazione 2.5 μ M, 5 μ M, 8 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M.
- Il SAHA, solubilizzato in DMSO, alla concentrazione 20 mM. Per gli esperimenti tale soluzione è stata diluita in terreno di coltura alla concentrazione 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M.
- Il benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoromethylketone (z-VAD-fmk), un inibitore generale delle caspasi, è stato acquistato in soluzione alla concentrazione 10 mM. Per il trattamento delle cellule l'inibitore è stato impiegato alla concentrazione 100 μ M.
- La necrostatina, un inibitore della chinasi RIP-1, solubilizzata in DMSO alla concentrazione 38 mM. Per gli esperimenti tale soluzione è stata diluita in terreno di coltura alla concentrazione 50 μ M.
- La Bafilomicina A1, un inibitore del flusso autofagico, solubilizzata in DMSO alla concentrazione 0.16 mM. Per gli esperimenti tale soluzione è stata diluita in terreno di coltura alla concentrazione 20 nM.
- L'apocinina, un inibitore della NADPH ossidasi, solubilizzata in DMSO realizzando una concentrazione 1 M. Per gli esperimenti tale soluzione è stata diluita in terreno di coltura alla concentrazione 100 μ M.
- Il diphenyleneiodonium (DPI), un inibitore della NADPH ossidasi, solubilizzato in DMSO alla concentrazione 15.8 mM. Per gli esperimenti tale soluzione è stata diluita in terreno di coltura alla concentrazione 10 μ M.

Tutti i composti sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich (Milano, Italia), eccetto il SAHA che è stato acquistato presso la ditta Italfarmaco S.p.a (Milano, Italia) e lo z-VAD che è stato acquistato presso la ditta Promega (Milano, Italia).

La concentrazione finale di DMSO impiegata non ha superato mai lo 0,04% e non ha determinato effetti tossici sulle cellule.

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.

2. CONDIZIONI DI COLTURA DELLE CELLULE MDA-MB231

Le cellule di carcinoma mammario MDA-MB231 sono state acquistate presso l'Istituto Scientifico Tumori (Genova, Italia) e sono state coltivate in fiasche con superficie di 75 cm², sulle quali crescono in monostrato, adese al substrato in polistirene. 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 antibiotico anti-micotico (miscela di penicillina-streptomicina 0,5%) aggiunto in un volume pari a 5 ml per 500 ml di terreno, glutammina 2mM e 1% di aminoacidi non essenziali (NEA). Le cellule sono poste in incubatore a 37°C, in atmosfera costituita per il 95% da aria e per il 5% da anidride carbonica. Per studiare gli effetti dei composti, le cellule sono state staccate dal substrato al quale crescono adese mediante una soluzione di tripsina-EDTA 1X (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 (2 x 10⁵ cellule/2 ml di terreno di coltura) o da 96 pozzetti (8 x 10³ cellule/200 µl di terreno di coltura per pozzetto). 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.

3. STUDIO DELLA VITALITÀ CELLULARE MEDIANTE SAGGIO MTT

La vitalità cellulare è stata valutata 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 in formazano, un cristallo insolubile di colore blu-violetto. L'intensità della colorazione è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali e può essere misurata spettrofotometricamente.

Per la realizzazione di questo saggio le cellule (8x10³ cellule per pozzetto in 200 µl di terreno di coltura) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti. Dopo 24 h sono stati effettuati i trattamenti, al termine dell'incubazione con i composti, sono stati aggiunti 20 µl 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 µl di terreno. Successivamente sono stati aggiunti 100 µl 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 (test) e 630 nm (lunghezza d'onda di riferimento). L'azzeramento viene effettuato impiegando il solo buffer di lisi.

4. VALUTAZIONE DEL SINERGISMO MEDIANTE IL METODO DI CHOU-TALALAY

La natura dell'interazione tra due composti viene valutata mediante il metodo di Chou-Talalay (Chou e Talalay, 1984). Si tratta di un modello matematico che consente il calcolo del "Combination Index" (CI) secondo cui è possibile dare una definizione quantitativa dell'interazione tra due composti. Valori di CI < 1 indicano "sinergismo", valori di CI = 1 indicano "effetto additivo", valori di CI > 1 indicano "antagonismo". I requisiti essenziali per calcolare il CI secondo tale metodo e dimostrare sinergismo tra due composti è la conoscenza dell'andamento della loro curva dose-effetto. Studi condotti da Zhao e collaboratori (Zhao et al., 2004) hanno permesso di elaborare l'equazione che descrive il principio alla base del metodo di Chou-Talalay:

$$CI = (D)_1/(D_x)_1 + (D)_2/(D_x)_2$$

dove $(D_x)_1$ e $(D_x)_2$ sono le dosi dei composti 1 e 2 che da soli producono $x\%$ di effetto e $(D)_1$ e $(D)_2$ sono le dosi dei composti 1 e 2 che insieme producono il medesimo effetto.

5. STUDIO DELL'APOPTOSI MEDIANTE SAGGIO DELL'ANNESSINA V/PI

Nel meccanismo di morte per apoptosi, uno degli eventi più precoci che si osserva è l'esternalizzazione della fosfatidilserina (PS), un fosfolipide di membrana localizzato sul versante interno della membrana plasmatica. La fosfatidilserina lega con un'elevata affinità l'Annessina V, la quale coniugata con fluorocromi come l'isotiocianato di fluoresceina (FITC), risulta essere un marcatore sensibile per l'analisi citofluorimetrica delle cellule in apoptosi. Il risultato ottenuto mediante l'analisi al citofluorimetro viene riportato in un grafico come mostrato in Fig. 1 in cui l'asse delle ascisse (FL1) indica l'intensità di fluorescenza FITC, invece l'asse delle ordinate (FL3) indica l'intensità di fluorescenza ROD (Rodamina).

Entrambi gli assi sono riportati in scala logaritmica. Osservando la positività o meno delle cellule all'Annessina V-FITC e allo Ioduro di Propidio (PI) si possono distinguere: in C1, la percentuale di cellule necrotiche (positive al PI e negative all'Annessina V); in C2 la popolazione di cellule necrotiche o in apoptosi tardiva (positive sia all'Annessina V che al PI); in C3, le cellule vitali (negative all'Annessina V e al PI); in C4, la popolazione di cellule apoptotiche (positive all'Annessina V e negative al PI).

Fig. 1

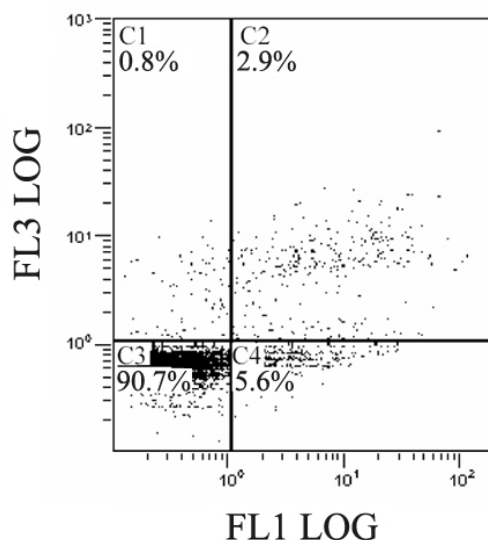


Fig. 1: Esempio di grafico ottenuto mediante analisi al citofluorimetro.

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 ($2 \times 10^5/2$ ml di terreno per pozzetto) sono state seminate in piastre da 6 pozzetti e quindi sottoposte ai trattamenti con i composti. 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) sono state risospese in binding buffer 1X preparato da una soluzione 10X fornita dal kit (Hepes/NaOH 10 mM, pH 7.4, NaCl₂ 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM). Quindi 100 µl della soluzione (1×10^5 cellule) sono stati trasferiti in un tubo e incubati con 5 µl di Annessina V-FITC 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 è stata eseguita l'analisi dei campioni mediante un citofluorimetro Beckman Coulter Epics FACscan XL (Brea, CA, USA) entro un'ora dall'incubazione con Annessina V-FITC e PI. I risultati sono stati analizzati

mediante il software Expo32. E' stato inserito anche un controllo negativo ossia cellule incubate in presenza del solo Binding Buffer 1 X.

6. DOSAGGIO DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO

La produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte delle cellule dopo trattamento con diversi composti è stata misurata impiegando la 5-(e 6-) 2',7' carbossidiclorodididrofluoresceina diacetato (H₂DCFDA, Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR), una sonda non fluorescente che presenta due gruppi acetile che conferendo caratteristiche lipofile gli consentono di attraversare la membrana plasmatica. Una volta penetrata all'interno della cellula, le esterasi rimuovono i gruppi acetile e la molecola ottenuta (DCFH) viene così ossidata dai ROS eventualmente prodotti e convertita in un prodotto verde fluorescente (DCF, diclorofluoresceina). Per dosare i ROS le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (8 x 10³ cellule/200µl di terreno per pozzetto) ed incubate con i composti per diversi tempi. Al termine dell'incubazione il terreno di coltura è stato allontanato e sostituito con 100 µl di una soluzione 50 µM di H₂DCFDA diluita in buffer HBSS (Hank's Salt Balanced Solution)/Ca/Mg (NaCl 0.137M, KCl 5.4 mM, Na₂HPO₄ 0.34 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, CaCl₂ 1.3 mM, MgSO₄ 0.41 mM, MgCl₂ 0.49 mM, NaHCO₃ 4.2 mM, D-Glucosio 5.56 mM, pH 7.3). Dopo 30 minuti di incubazione al buio a 37°C, è stata verificata l'incorporazione del fluorocromo mediante microscopio a fluorescenza, successivamente la soluzione è stata rimossa e sostituita con 100 µl di 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.

7. SAGGIO COLORIMETRICO PER LA VALUTAZIONE DEL GSH

Il livello del GSH intracellulare 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/in 2 ml di terreno) sono state seminate in una piastra da sei e dopo il trattamento sono state staccate con tripsina e centrifugate a 120 g per 8 minuti. Il pellet cellulare è stato risospeso in PBS e si è proceduto alla conta mediante la camera di Thoma. Le cellule (3×10^5) sono state risospese in 50 μ l di acido metafosforico (5 g/100 ml di acqua distillata), omogenate con pasteur di vetro ed in seguito congelate a -80°C per 5 minuti. Tale 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. A tale diluizione sono stati aggiunti in successione 10 μ l di ciascun reagente (R1 ed R2, entrambi forniti dal kit) e la piastra è stata incubata al buio per 10 minuti. Al termine dell'incubazione, 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 intracellulare 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.

8. VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI LEGAME AL DNA 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, USA), basato su un sistema colorimetrico. Il kit è costituito da rack di 8 pozzetti, inseriti in una piastra da 96 pozzetti, sul fondo dei quali vi sono le sequenze oligonucleotidiche corrispondenti alla sequenza consensus riconosciuta dalla sub unità p65 di NF-kB. Dopo aver posto il campione nel pozzetto, si aggiunge l'anticorpo primario diretto contro p65. 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-kB attive.

Per effettuare tale valutazione le cellule (2×10^5 / in 2 ml di terreno sono state seminate in piastre da 6 pozzetti; 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, MgCl₂ 1.5mM, KCl 10mM, EGTA 1mM, EDTA 1mM, pH 7.5) a cui è stato aggiunto un cocktail di inibitori delle proteasi (aprotinina 25 µg/ml, PMSF o fluoruro di fenilmetansulfonile 1 mM, leupeptina 25 µg/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 nel buffer di lisi fornito dal kit 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). Si è proceduto al dosaggio dei campioni e successivamente gli estratti nucleari (20 µg) sono stati posti nei pozzetti dei rack inseriti nella 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 µl della soluzione contenente l'anticorpo primario specifico per p65. Dopo un'ora di incubazione a 37 °C sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione contenente un anticorpo secondario anti-IgG coniugato con la perossidasi di rafano. Dopo un'ora di incubazione a 37°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 (Dyner Technologies; Chantilly, VA).

9. VALUTAZIONE DEI VACUOLI AUTOFAGICI MEDIANTE COLORAZIONE CON MONODANSILCADAVERINA (MDC)

La presenza di vacuoli autofagici è stata evidenziata impiegando la monodansilcadaverina (MDC), una molecola fluorescente verde che consente di identificare i vacuoli autofagici come strutture “dot-like” distinte, conferendo una colorazione verde intensa e rilevabile mediante microscopia a fluorescenza. La MDC si accumula nei compartimenti acidi, come gli autofagosomi e lega in modo specifico i lipidi presenti sulla membrana di questi organelli (Munafò et al., 2001). Al fine di valutare la presenza di vacuoli autofagici le cellule (8×10^3 /

in 200 µl di terreno di coltura) sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti. Al termine del trattamento è stato aggiunto il fluorocromo alla concentrazione 50 µM, la piastra è stata incubata quindi per 10 minuti a 37°C (Biederbick et al., 1995). 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.

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

Per preparare gli estratti cellulari le cellule (2×10^5 / in 2 ml di terreno di coltura) sono state seminate su piastre da 6 pozzetti. Al termine del trattamento con i composti, le cellule 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, preparato in PBS contenente NP-40 all'1%, sodio deossicolato 0.5%, SDS 0.1 % e gli inibitori delle proteasi (aprotinina 25 µg/ml, PMSF o fluoruro di fenilmetansulfonile 1 mM, leupeptina 25 µg/ml e pirofosfato di sodio 0.2 mM). La lisi cellulare è stata completata con la 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 il contenuto proteico è stato dosato mediante il metodo di Lowry (Lowry et al., 1951) e sono stati preparati campioni contenenti 50 µg di proteine, da sottoporre ad elettroforesi SDS - page. Ai campioni è stato quindi aggiunto il sample buffer (Tris-HCl 50 mM, β-mercaptoetanolo 100 mM, SDS al 2%, blu di bromofenolo 0,1%, glicerolo al 10 %, pH 6,8) secondo un rapporto di 1:1, per un totale di 20 µl. Le proteine sono quindi 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 (Tris glicina 1X preparato a partire da una soluzione 5X contenente Tris, Glicina, SDS e H₂O distillata).

11. WESTERN BLOTTING

Terminato lo 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. Per rimuovere il colorante sono stati effettuati una serie di lavaggi con TBST (Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.005%, pH 7.5) ed in seguito 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 µg/ml di TBST) ed il filtro è stato mantenuto ad incubare per tempi variabili in base all’anticorpo impiegato.

L’anticorpo anti-LC3 è stato acquistato presso la Novus Biologicals (Littleton, CO), gli anticorpi per phospho-mTOR, beclina-1, phospho-p70S6K, p21, p27, citocromo c e caspasi 3 sono stati acquistati presso la Cell Signaling Technology (Beverly, MA), gli anticorpi per valutare ULK1/2, DNMT1 e β-actina presso la Sigma-Aldrich (Milano, Italia). 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 µg/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, MgCl₂ 5 mM, pH 8.9). La reazione consiste nella defosforilazione di BCIP da parte della fosfatasi alcalina in indolo, il quale reagisce con l’NBT (ossidante), per formare un precipitato di colore blu-viola a livello della banda in cui è presente la proteina di interesse. L’omogeneità del contenuto proteico delle singole prove è stata accertata mediante immunoblotting dell’actina.

12. VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE

La perdita del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) è uno degli eventi intracellulari che avvengono dopo l'induzione dell'apoptosi e coincide con l'aumento della permeabilità mitocondriale, portando infine al rilascio del citocromo c. Per valutare la depolarizzazione della membrana mitocondriale sono state condotte delle analisi mediante microscopio a fluorescenza impiegando il fluorocromo metacromatico JC1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolilcarbocianina 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 mitocondriale, dove polimerizza formando delle strutture dette J-aggregati, i quali emettono fluorescenza rossa (eccitazione: 490 nm, emissione: 590 nm). Quando il mitocondrio si depolarizza JC1 si accumula prevalentemente nel citosol, dove si trova nella forma monomerica, emettendo fluorescenza verde (eccitazione: 490 nm, emissione: 525 nm). Per valutare il $\Delta\psi_m$ le cellule ($8 \times 10^3/200 \mu\text{l}$ di terreno per pozzetto) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti. In seguito al trattamento sono stati aggiunti $20 \mu\text{l}$ di JC1 (diluito 1:100 in PBS) per 15 minuti a 37°C . Al termine dell'incubazione la piastra è stata centrifugata a 120 g per 5 minuti, è stato allontanato il terreno contenente il fluoro cromo e sono stati effettuati due lavaggi in PBS. Infine le cellule, a cui è stato aggiunto PBS, 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, ed un filtro per la rodamina (eccitazione: 596 nm, emissione: 620 nm) per visualizzare gli aggregati. Le immagini sono state acquisite mediante il software Leica Q Fluoro e sono state successivamente sovrapposte per valutare la fluorescenza prevalente.

13. VALUTAZIONE DELLA LOCALIZZAZIONE CELLULARE DI Nrf2 MEDIANTE MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

Per valutare la localizzazione intracellulare del fattore di trascrizione Nrf2, le cellule (8×10^3 /in $200 \mu\text{l}$ di terreno) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e sono state sottoposte ad analisi di immunofluorescenza indiretta. Prima del trattamento con i composti, le cellule sono state sottoposte a colorazione con Hoechst 33342 ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) per 30 minuti. L'Hoechst 33342 è un colorante fluorescente che lega il DNA in corrispondenza delle coppie di basi A-

T. Tale molecola viene eccitata da luce ultravioletta (350 nm) ed emette luce blu con lunghezza d'onda di circa 461 nm. L'Hoechst 33342 contiene un gruppo etile, che lo rende lipofilo, consentendogli di penetrare nelle cellule vitali. In questo caso la fluorescenza emessa è evidenziata da una colorazione a spot blu diffusa e piuttosto tenue.

Dopo il trattamento con i composti, le cellule sono state fissate per 5 min con paraformaldeide al 3% e permeabilizzate con Triton X-100 0.1% per 5 min a temperatura ambiente. Le cellule fissate sono state incubate overnight a 4°C con un anticorpo primario policlonale di rabbit diretto contro Nrf2 umano (Santa Cruz, CA) diluito 1:100 in PBS contenente BSA all'1% e NaAzide. Le cellule sono state poi sottoposte a tre lavaggi in PBS e NaAzide e incubate per 2 ore con un anticorpo secondario (1 µg/100 µl di PBS) coniugato con FITC (Santa Cruz, CA). Infine, le analisi sono state condotte mediante un microscopio a fluorescenza Leica DMR dotato di una fotocamera DC300F (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania). La colorazione con Hoechst 33342 è stata acquisita mediante filtro DAPI (lunghezza d'onda di eccitazione 372 nm e la lunghezza d'onda di emissione 456 nm), mentre la colorazione di Nrf2 è stato visualizzata mediante filtro FITC (lunghezza d'onda di eccitazione 485 nm e la lunghezza d'onda di emissione 530 nm). Le immagini acquisite mediante il software Leica Q Fluoro (Leica Microsystems) sono state successivamente sovrapposte per visualizzare la localizzazione intracellulare della proteina Nrf2.

14. 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

1. Il pre-trattamento con il SAHA incrementa l'effetto citotossico del PN nelle cellule MDA-MB231

Studi precedenti condotti presso i laboratori di Biochimica del Policlinico di Palermo dove ho sviluppato la tesi, hanno dimostrato che il PN (concentrazioni comprese tra 15-25 μM), induce marcati effetti citotossici in cellule MDA-MB231 mediante un meccanismo indipendente dall'attivazione delle caspasi, ma correlato con la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'induzione di autofagia e di morte per necrosi (D'Anneo et al., 2013b). Nell'ambito di questi studi è emerso, tuttavia, che il PN quando impiegato a più basse concentrazioni è scarsamente efficace anche dopo lunghi periodi di trattamento. Gli effetti del composto sulla vitalità cellulare sono stati analizzati mediante saggio MTT impiegando concentrazioni variabili dalla 2.5 alla 20 μM per tempi differenti di trattamento (0-72h). I dati riportati in Fig. 1A mostrano che quando le cellule sono incubate con basse dosi di PN (2.5, 5, 8 e 10 μM) il composto induce modesti effetti sulla vitalità cellulare. In particolare le concentrazioni 2.5 e 5 μM non determinano alcun effetto anche per tempi lunghi di trattamento (72h). Questi risultati suggeriscono che il PN induce nelle MDA-MB231 effetti citoprotettivi che si evidenziano a basse dosi. In una prima fase, lo studio è stato pertanto rivolto all'individuazione di un composto da utilizzare in associazione col PN che, impiegato anch'esso a basse dosi, potesse potenziarne l'effetto citotossico. L'attenzione, in particolare, è stata rivolta al SAHA, un inibitore della deacetilasi istoniche, già noto per la sua efficacia antitumorale ai ricercatori del laboratorio di Biochimica, in quanto studi precedenti condotti avevano dimostrato la capacità del composto di sensibilizzare le cellule MDA-MB231 alla via di TRAIL (Lauricella et al., 2012). Al fine di valutare se il SAHA fosse in grado di potenziare l'azione citotossica del PN le cellule sono state sottoposte ad un trattamento con i due composti. Studi preliminari sono stati condotti per valutare le migliori condizioni di trattamento combinato. In particolare sono stati comparati gli effetti ottenuti in cellule co-trattate con i composti a quelli ottenuti pretrattando le cellule con il SAHA e poi aggiungendo il PN. L'analisi, eseguita mediante saggio MTT, ha messo in evidenza che il co-trattamento riduce la proliferazione delle cellule MDA-MB231 con un effetto additivo (dati non mostrati). Quando invece le cellule vengono prima sottoposte ad un pre-trattamento di 20h con il SAHA cui segue un trattamento combinato SAHA/PN di 40h si osserva un potente effetto sinergico di decremento della vitalità cellulare. Tale effetto è molto evidente utilizzando il SAHA alla concentrazione 2 μM in combinazione al PN alla concentrazione 10 μM . Queste concentrazioni sono state, quindi, scelte per condurre lo studio riportato nella mia tesi. Come

si osserva in Fig. 1B, il pre-trattamento delle cellule con il SAHA 2 μ M per 20h determina un decremento della vitalità cellulare del 15% rispetto alle cellule controllo, quando a tale pre-trattamento segue il trattamento combinato SAHA 2 μ M/PN 10 μ M si ha un effetto sinergico di decremento della vitalità cellulare che aumenta progressivamente prolungando il tempo, raggiungendo un valore residuo di vitalità cellulare pari al 3-4% rispetto al controllo dopo 60h di trattamento combinato. Sulla base dei risultati ottenuti, per confermare l'esistenza di un'azione sinergica determinata dall'associazione dei due composti sono state condotte delle analisi sulla vitalità cellulare mediante saggio MTT pre-trattando per 20h le cellule con varie dosi del SAHA (0.5-5 μ M) a cui è stato fatto seguire un co-trattamento SAHA/PN di 40h con varie dosi di PN (2.5-25 μ M) mantenendo le concentrazioni dei due composti in un rapporto fisso (1:5). Gli effetti determinati dalla combinazione SAHA/PN sono stati comparati a quelli determinati dai composti impiegati singolarmente (Fig.1C). I risultati così ottenuti sono stati utilizzati per calcolare, secondo il modello matematico di Chou e Talalay (Chou e Talalay, 1984), "l'indice di combinazione" (CI) in rapporto alla Fa, ossia la "Fraction affected" (% di riduzione di vitalità cellulare). Come mostrato in Fig.1D, poiché i valori di CI calcolati per diversi valori di Fa sono sempre inferiori ad 1 si può concludere l'esistenza di un'interazione sinergica tra il SAHA e il PN. E' interessante osservare che l'effetto citotossico indotto dalla combinazione SAHA/PN è in gran parte prevenuto dall'inibitore generale delle caspasi z-VAD, suggerendo un ruolo centrale delle caspasi nel meccanismo di morte indotto dai composti (Fig.1E). I risultati riportati in Fig.1E mostrano che l'aggiunta di Necrostatina-1, un inibitore della chinasi RIP-1 coinvolta nell'induzione di necrosi, non modifica invece l'effetto esercitato dall'associazione SAHA/PN, suggerendo un mancato coinvolgimento di questa proteina nell'evento di morte. Infine, l'aggiunta della bafilomicina A1 (BafA1), un potente inibitore del flusso autofagico, determina un marcato incremento dell'effetto citotossico del SAHA e della combinazione SAHA/PN. In particolare il SAHA riduce del 25% la vitalità cellulare quando impiegato da solo e del 70% in presenza di BafA1. Ciò suggerisce che il SAHA possa indurre autofagia e che tale meccanismo abbia un ruolo di sopravvivenza. Le successive analisi condotte avranno lo scopo di chiarire i meccanismi molecolari alla base dell'interazione sinergica tra il SAHA e il PN.

Fig. 1

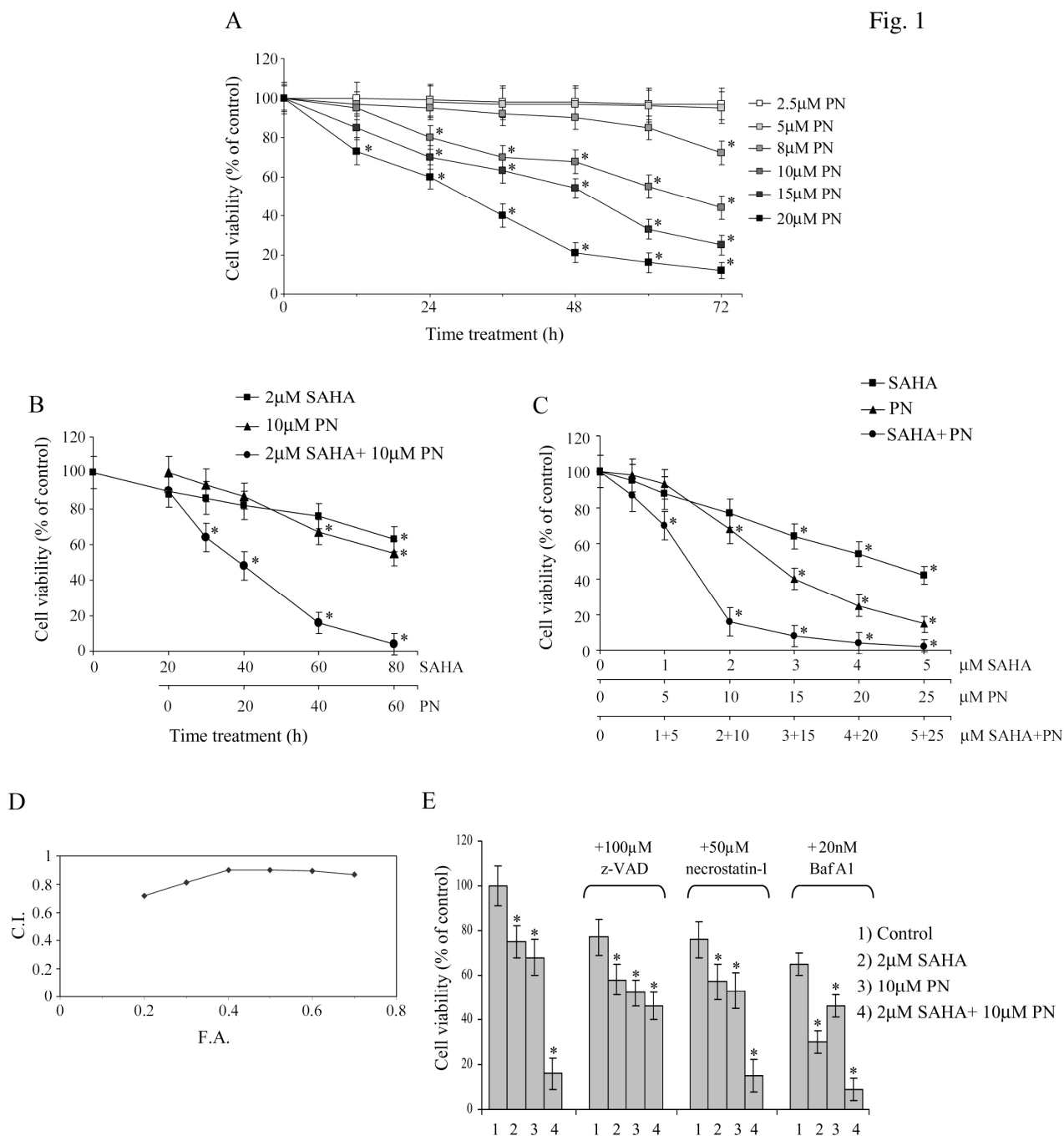


Fig. 1: L'associazione SAHA/PN induce un potente effetto citotossico sinergico nelle cellule MDA-MB231.

(A) Effetti di dose e tempo dipendenza del PN sulla vitalità cellulare. Le cellule MDA-MB231 (8×10^3 /pozzetto) sono state trattate con diverse dosi di PN e per diversi tempi. In ascissa è indicata la durata del trattamento e in ordinata la % di vitalità cellulare rispetto alla condizione controllo, ossia cellule trattate con il solo veicolo. (B) Il pre-trattamento con il SAHA incrementa l'effetto citotossico del PN sulla vitalità cellulare. Le cellule MDA-MB231 sono state pre-trattate per 20h con SAHA 2 μM, al termine di tale pre-incubazione è stato aggiunto il PN 10 μM e l'incubazione è stata protratta per altre 20, 40 e 60h. In ascissa è riportata la durata del trattamento e in ordinata la % di vitalità cellulare rispetto alla condizione controllo, ossia cellule trattate con il solo veicolo (C)

Effetti di inibizione della vitalità cellulare esercitati da diverse dosi di SAHA e PN impiegati singolarmente e in associazione. Le cellule sono state trattate con diverse dosi di SAHA (0.5-5 μ M) per 60h o con diverse dosi di PN (2.5-25 μ M) per 40h dopo 20h con il solo veicolo. Per il trattamento combinato i due composti sono stati impiegati in un rapporto fisso (1:5, SAHA:PN). Dopo pre-trattamento con il SAHA per 20h, le cellule sono state trattate per altre 40h con SAHA e PN. In ascissa è indicata la concentrazione del composto impiegata e in ordinata la % di vitalità cellulare rispetto alla condizione controllo, ossia cellule trattate con il solo veicolo (*D*)

Effetto sinergico tra SAHA e PN sulla vitalità cellulare. I risultati mostrati in Fig. 1C sono stati impiegati per calcolare, in base alle diverse percentuali di “Fa” (frazione affetta), i corrispondenti valori dell’indice di combinazione (CI), in accordo con il modello matematico di Chou e Talalay (Chou and Talalay, 1984). In ascissa è indicato il valore di Fa (intervallo di valori compreso tra 0 e 0.8) e in ordinata il valore di CI (intervallo di valori compreso tra 0 e 1). (*E*) *Effetti degli inibitori z-VAD, necrostatina-1 e BafA1 sull’effetto indotto dall’associazione SAHA/PN sulla vitalità cellulare.* Sull’asse delle ascisse è riportato il tipo di trattamento effettuato: (1) cellule trattate per 60h con il solo veicolo; (2) cellule trattate per 60h con SAHA 2 μ M; (3) cellule trattate per 20h con il veicolo e successivamente con PN 10 μ M per 40h; (4) cellule trattate per 20h con SAHA 2 μ M e per ulteriori 40h con l’associazione SAHA/PN. Gli inibitori (z-VAD 100 μ M, necrostatina-1 50 μ M e BafA1 20 nM) sono stati aggiunti all’inizio del trattamento. Sull’asse delle ordinate è indicata la percentuale di cellule vitali rispetto al controllo. In (A), (B), (C) ed (E) la vitalità è stata valutata mediante saggio MTT come riportato in Materiali e Metodi. I risultati riportati sono la media di tre esperimenti indipendenti \pm S.E. *P < 0.01 rispetto al controllo, ossia cellule trattate con il solo veicolo.

2. Effetti del SAHA e del PN sulla produzione di ROS nelle cellule MDA-MB231

Precedenti studi condotti in cellule MDA-MB231 hanno dimostrato che il PN impiegato alle dosi 15-25 μM induce, già dalle prime ore di trattamento (1-3h), una consistente produzione di ROS. L'incremento dei ROS è responsabile della deplezione di gruppi tiolici e glutazione, attivazione di c-Jun N-terminal kinase (JNK), down-regulation del fattore nucleare kB (NF-kB) e, a tempi più lunghi di trattamento (5-20h), dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale e comparsa di eventi necrotici (D'Anneo et al., 2013b). Dati presenti in letteratura riportano, inoltre, che in alcuni sistemi tumorali, quali cellule di adenocarcinoma del colon HT-29 o cellule leucemiche Jurkat, il SAHA è in grado di esercitare la sua azione citotossica anche mediante induzione di stress ossidativo incrementando la produzione di ROS (Portanova et al., 2008; Li et al., 2010). Alla luce di tali osservazioni, è stato ritenuto opportuno valutare se il PN a più bassa concentrazione fosse in grado di determinare produzione di ROS e se il SAHA nel modello sperimentale impiegato fosse in grado di esercitare il medesimo effetto. A tale scopo sono state condotte delle analisi di microscopia a fluorescenza impiegando il fluorocromo H_2DCFDA , che viene ossidato dai ROS generando un prodotto fluorescente verde. La produzione di ROS è stata valutata dopo trattamento con SAHA 2 μM o PN 10 μM impiegati da soli o in combinazione, in quest'ultimo caso facendo precedere un pre-trattamento di 20h con il solo SAHA. I dati riportati in Fig.2A e 2B mostrano che il trattamento con SAHA 2 μM dopo 30h determina una notevole produzione di ROS in quanto circa l'80% degli elementi cellulari emette fluorescenza verde. Il trattamento con PN 10 μM dopo 10h determina un modesto incremento della produzione di ROS. Quando i due composti agiscono in associazione è possibile osservare una percentuale di cellule fluorescenti di circa il 50% dopo 30h, inferiore pertanto a quella osservata con il solo SAHA. I medesimi effetti sono stati evidenziati per tutte le condizioni prese in esame prolungando ulteriormente di 10-30h il trattamento (dati non mostrati). Al fine di individuare il meccanismo mediante il quale il SAHA è in grado di indurre produzione di ROS sono stati impiegati l'Apocinina e il DPI, due inibitori della NADPH ossidasi. E'interessante notare che la produzione di ROS indotta dal SAHA sia da solo che in combinazione con il PN viene parzialmente prevenuta dai due inibitori per tutta la durata del trattamento (Fig.2A e 2B). Complessivamente questi risultati lasciano ipotizzare che la produzione dei ROS indotta dal SAHA sia dipendente da due meccanismi: uno dipendente dalla attività della NADPHossidasi, l'altro invece potrebbe avere origine mitocondriale, in accordo con quanto osservato in cellule leucemiche da Li e collaboratori (Li et al., 2010).

Fig. 2

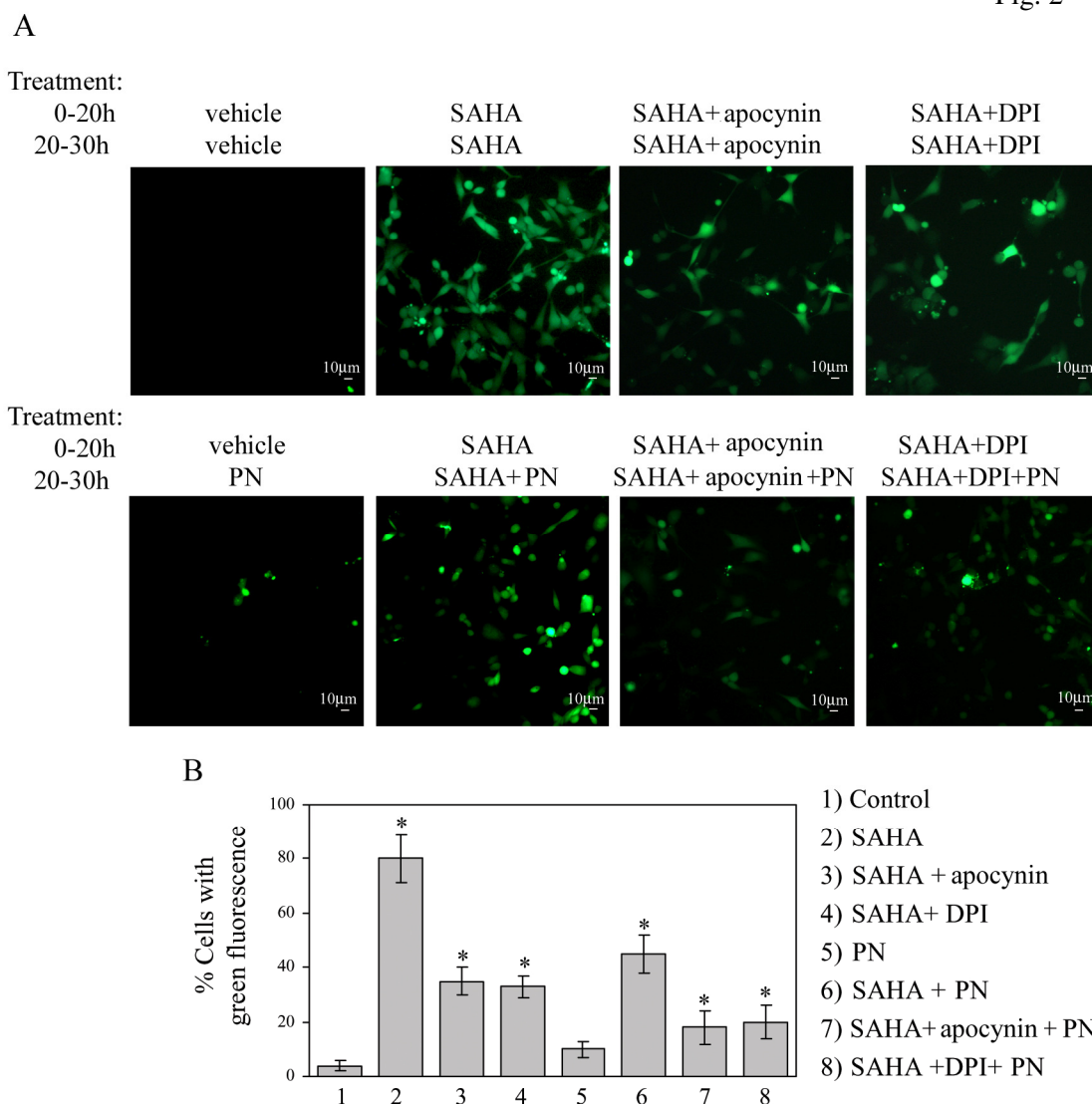


Fig. 2: Il SAHA induce produzione di ROS nelle cellule MDA-MB231. (A) Valutazione della produzione di ROS mediante microscopia a fluorescenza. Le cellule (8×10^3 /pozzetto) sono state trattate per i tempi indicati con SAHA $2\mu\text{M}$ e con PN $10\mu\text{M}$ impiegati singolarmente o in associazione dopo pre-trattamento con SAHA. L'effetto dei due composti è stato inoltre valutato in presenza di Apocinina $100\mu\text{M}$ e di DPI $10\mu\text{M}$, due inibitori della NADPH ossidasi. Al termine del trattamento il terreno è stato rimosso e sostituito con $100\mu\text{l}$ di H_2DCFDA $50\mu\text{M}$ e i campioni sono stati incubati per altri 30min a 37°C . Al termine il fluorocromo è stato sostituito con $100\mu\text{l}$ di HBSS e dopo 20min è stata condotta l'analisi. 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. Le immagini sono state acquisite con ingrandimento $200\times$ (scale bar $10\mu\text{m}$) e sono rappresentative di tre diversi esperimenti. In (B) è riportata la percentuale di cellule verdi calcolata dopo aver contato le cellule in 5 campi per condizione. In ascissa è indicata la condizione di

trattamento ed in ordinata la % di cellule verdi. I dati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti differenti \pm S.E. *P < 0.01 rispetto al controllo trattato con il solo veicolo.

3. Il SAHA induce autofagia nelle cellule MDA-MB231

La tecnica di colorazione che impiega la MDC è stata da me utilizzata per accertare l'effetto del SAHA nell'induzione dell'autofagia in cellule MDA-MB231. La MDC è un colorante fluorescente verde che si accumula all'interno dei vacuoli autofagici. L'osservazione delle cellule al microscopio a fluorescenza dopo trattamento con SAHA 2 μM dimostra che dopo 10 h vi è un'elevata percentuale di cellule che risulta positiva alla MDC; come mostrato in Fig. 3A questa percentuale si mantiene elevata e si incrementa progressivamente fino alle 30 h di trattamento. Studi precedenti hanno dimostrato che nelle medesime cellule il PN impiegato a più elevate concentrazioni (15-25 μM) sin dalle prime ore di trattamento è in grado di esplicare la sua azione citotossica mediante induzione di autofagia. La Fig. 3A mostra, che il PN 10 μM , invece, non è in grado di indurre autofagia ed inoltre contrasta l'induzione del meccanismo operato dal SAHA; è infatti possibile osservare un decremento della percentuale di cellule positive alla MDC in seguito al trattamento che prevede l'associazione dei due composti. È interessante sottolineare che tutti i segni di autofagia osservati nelle cellule incubate con SAHA vengono prevenuti dalla apocinina e dal DPI, due inibitori dell'enzima NADPH ossidasi, suggerendo un ruolo centrale svolto dai ROS nell'induzione del processo autofagico (Fig. 3A). Tali risultati sono in accordo con quanto osservato da Li e collaboratori (2010), i quali hanno dimostrato che il SAHA, in cellule leucemiche Jurkat, è in grado di indurre l'autofagia tramite la produzione di ROS in quanto il fenomeno viene totalmente abolito dall'N-acetilcisteina (NAC). Il coinvolgimento dell'autofagia nel meccanismo indotto dal SAHA è stato confermato da analisi di western blotting, condotte per valutare i livelli di LC3, un noto marker autofagico. 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 (Pyo et al., 2012). Come è possibile osservare in Fig. 3B, il SAHA 2 μM dopo 30 h di trattamento determina l'incremento di LC3II, tale effetto è ancora più evidente con le dosi più elevate (5 e 10 μM). Il PN 10 μM , dopo 10 h di trattamento, non determina alcun effetto sulla conversione di LC3I in LC3II; l'incremento è evidente, invece, quando il composto viene impiegato a più alta concentrazione (25 μM). Quando il SAHA e PN, impiegati rispettivamente alle dosi 2 e 10 μM agiscono in associazione, si osserva un incremento di LC3II pari a quello determinato dal solo SAHA 2 μM . È interessante osservare che l'incremento della forma LC3II determinata dal SAHA sia quando impiegato da solo che

in associazione al PN è ancora più evidente quando si aggiunge BafA1, supportando ulteriormente l'ipotesi che il SAHA sia in grado di indurre il flusso autofagico nel nostro modello sperimentale.

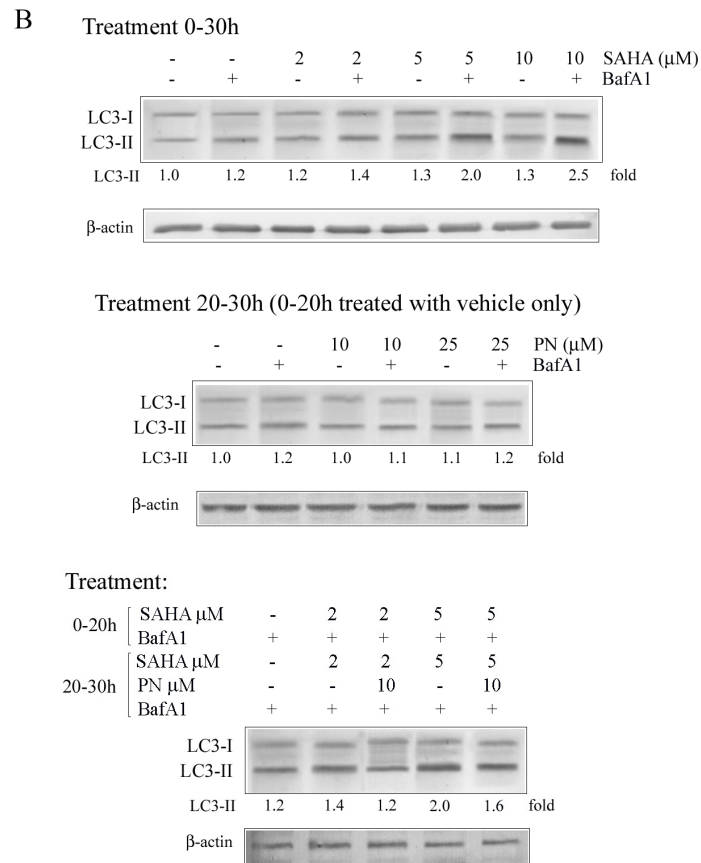
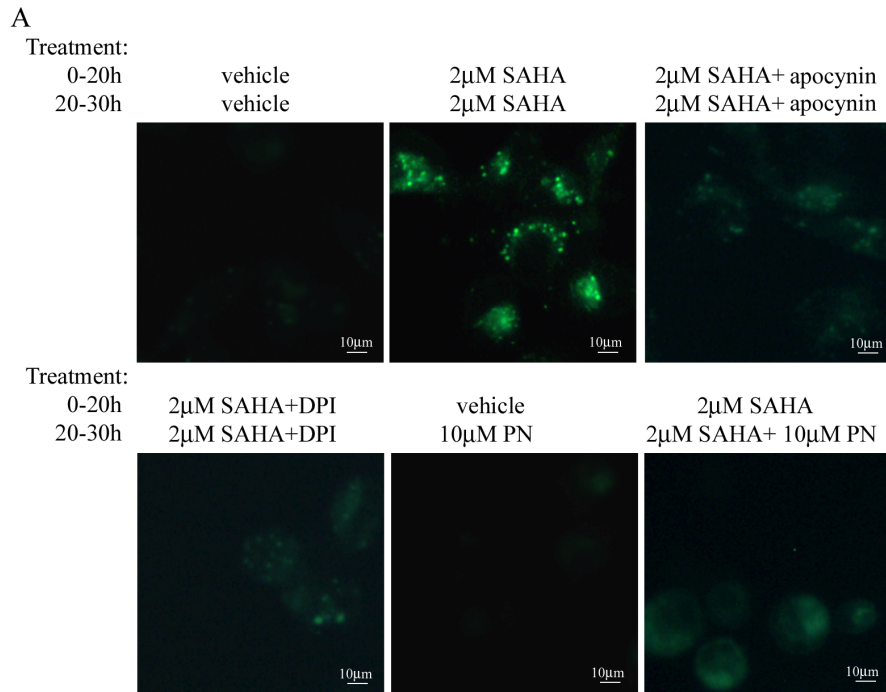


Fig. 3: Il SAHA determina autofagia nelle cellule MDA-MB231. (A) Valutazione della comparsa di vacuoli autofagici. Le cellule (8×10^3 /pozzetto) sono state trattate per i tempi indicati con SAHA 2 μM e con PN 10 μM impiegati singolarmente o in associazione dopo pre-trattamento con SAHA. L'effetto dei due composti è stato

inoltre valutato in presenza di Apocinina 100 μ M e di DPI 10 μ M. Al termine le cellule sono state incubate con MDC 50 μ M e i campioni sono stati incubati per 10 min. La fluorescenza è stata evidenziata mediante un microscopio a fluorescenza Leica DMR dotato di fotocamera DC300F impiegando un filtro DAPI. Sono state acquisite le immagini in 5 campi per condizione con un ingrandimento 400 X (scale bar 10 μ m). I vacuoli autofagici appaiono come strutture dot-like distribuite nel citoplasma. *(B) Effetti del SAHA e del PN sul livello di LC3.* Le cellule sono state trattate con diverse dosi di SAHA o di PN impiegati singolarmente o in associazione dopo pre-incubazione con il SAHA. L'effetto dei due composti è stato inoltre valutato in presenza di BafA1 20 nM. Al termine del trattamento le cellule sono state lisate e sottoposte ad analisi di western blotting come descritto in Materiali e Metodi. La valutazione dell'actina è inclusa per dimostrare l'omogeneità delle prove. In *(A)* e in *(B)* i risultati sono rappresentativi di tre diversi esperimenti.

4. Il SAHA impiegato da solo e in associazione al PN induce apoptosi nelle cellule MDA-MB231

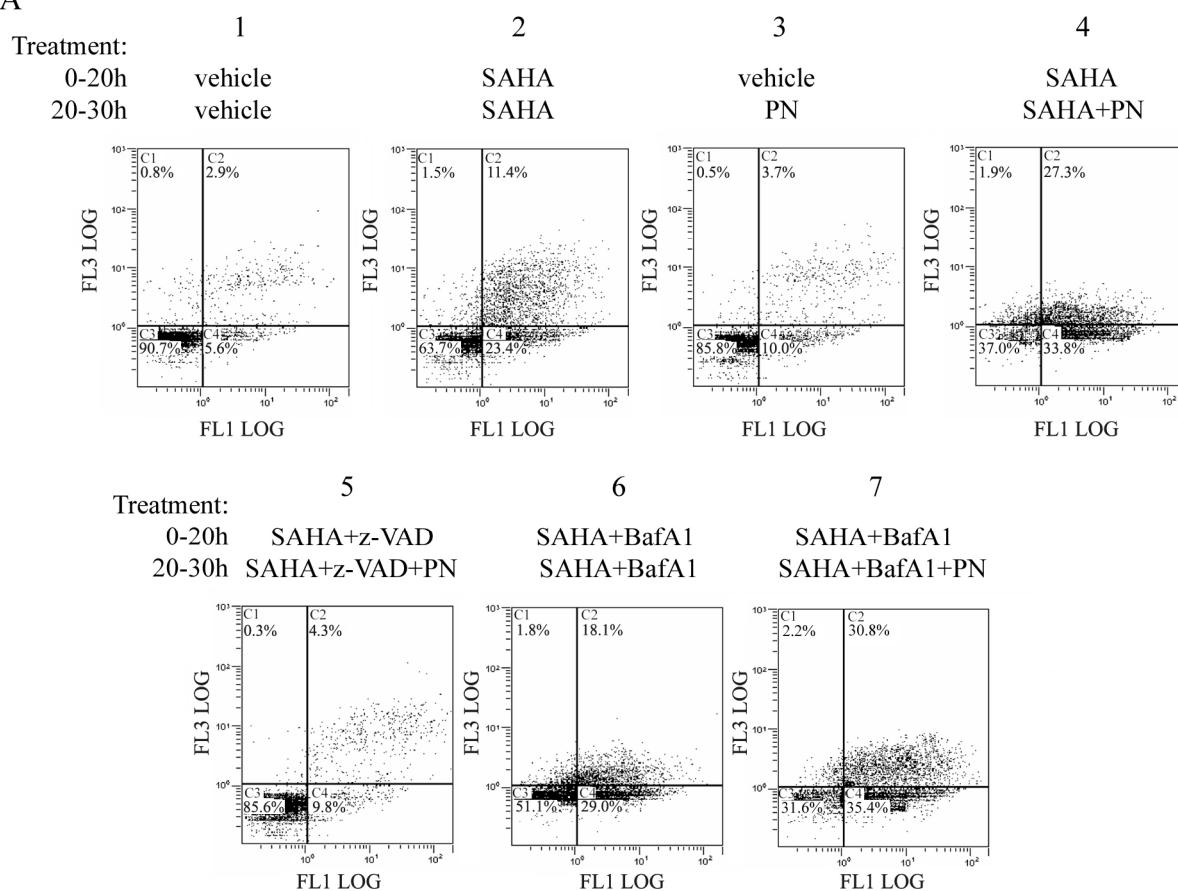
I risultati ottenuti dimostrano che il SAHA è in grado di attivare nelle cellule MDA-MB231 il processo autofagico in seguito ad induzione di stress ossidativo. Dati riportati in letteratura sono concordi nel ritenere che segnali di stress persistenti non consentono all'autofagia di assicurare la sopravvivenza della cellula ma bensì di volgere il destino di quest'ultima verso la morte per apoptosi (Rubistein e Kimchi, 2012). Al fine di individuare le cause del potente effetto citotossico esercitato dall'associazione SAHA/PN sulla vitalità cellulare e per chiarire le modalità d'azione dei composti, 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. 4A, già dopo circa 30 h di trattamento con SAHA 2 μ M il 23.4% delle cellule risulta positiva alla sola Annessina V, percentuale indicativa di cellule in apoptosi precoce; oltre a questa frazione, compare anche una frazione di cellule (11.4%) positive tanto al PI, che all'Annessina V (cellule necrotiche o in apoptosi tardiva). Il trattamento per 10 h con PN 10 μ M non determina rilevanti effetti sulla distribuzione della popolazione cellulare nei diversi quadranti. Si osservano, infatti, basse percentuali di cellule positive alla sola Annessina V e positive a quest'ultima e al PI, rispettivamente del 10 e 3.7%. Il pre-trattamento per 20h con il SAHA e la successiva incubazione per 10h con il PN determina l'incremento tanto della percentuale di cellule positive alla sola Annessina V (33.8%) che della frazione positiva all'Annessina V e al PI (27.3%). I risultati suggeriscono, quindi, che il trattamento con il solo SAHA determina l'induzione di morte cellulare per apoptosi e che tale meccanismo viene marcatamente incrementato quando il composto agisce in associazione col PN. Nella stessa figura si osserva che gli effetti dell'associazione SAHA/PN vengono annullati dall'aggiunta dello z-VAD, lasciando ipotizzare un ruolo centrale delle caspasi nell'evento di morte indotto dai composti (Fig. 4A).

All'interno della cellula condizioni di eccessivo stress ossidativo possono determinare l'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi che prevede danno mitocondriale, il coinvolgimento dei membri della famiglia Bcl-2, la fuoriuscita del citocromo c e l'attivazione delle caspasi (Chowdhury et al., 2006). Sono state pertanto condotte delle analisi di Western blotting rivolte a valutare il rilascio del citocromo c dal mitocondrio e l'attivazione di uno dei principali effettori del programma di morte: la caspasi 3, una nota caspasi esecutrice. I

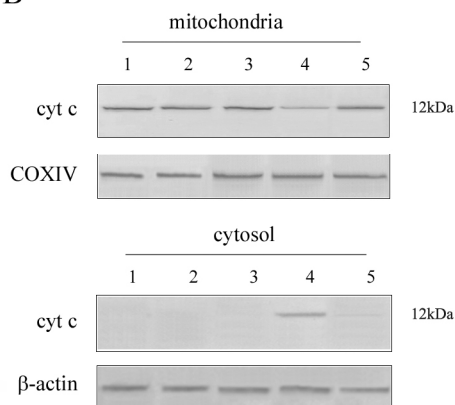
risultati mostrati in Fig. 4B dimostrano che il trattamento per 30h con SAHA 2 μ M non è in grado di determinare la fuoriuscita del citocromo c e l'attivazione della caspasi 3. Quando le cellule vengono pre-trattate per 20h con il SAHA e successivamente incubate per 10h con il SAHA e il PN si osserva sia il rilascio del citocromo c dal mitocondrio e l'attivazione della caspasi 3. La Fig. 4B mostra il decremento del citocromo c a livello mitocondriale e il suo incremento a livello citosolico (lane 4). Per quanto riguarda l'attivazione della caspasi 3, la Fig. 4C mostra il decremento della forma pro-caspasica (32 kDa) e la comparsa dei frammenti attivi a più basso peso molecolare (17 e 12 kDa) (lane 4). Prolungando il tempo di trattamento si è inoltre osservato la scomparsa della forma pro-caspasica e il decremento dei frammenti attivi (dati non mostrati). E' interessante notare che il rilascio del citocromo c e l'attivazione della caspasi 3 vengono prevenuti dall'aggiunta dello z-VAD (Fig. 4B e C, lane 5). Le analisi condotte dimostrano che il SAHA determina l'induzione di una fase precoce dell'apoptosi consistente nell'esternalizzazione cellulare della fosfatidilserina; l'aggiunta del PN potenzia l'effetto di morte con rilascio del citocromo c, taglio della pro-caspasi 3 e produzione della sua forma attiva.

Fig. 4

A



B



C

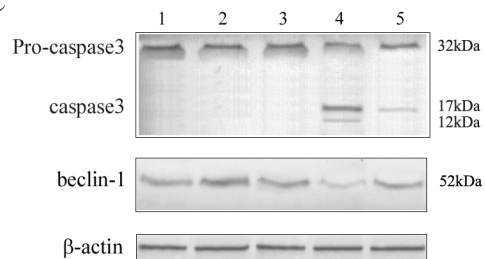


Fig. 4: Il SAHA impiegato da solo e in associazione al PN induce apoptosi nelle cellule MDA-MB231. (A) *Valutazione del meccanismo di morte indotto dai composti mediante colorazione con Annessina V/PI.* Le cellule sono state trattate per i tempi indicati con SAHA 2 μ M e con PN 10 μ M impiegati singolarmente o in associazione dopo pre-trattamento con SAHA. L'effetto dei due composti è stato inoltre valutato in presenza di z-VAD 100 μ M e BafA1 20 nM. Al termine del trattamento le cellule sono state colorate con Annessina V/PI e sottoposte ad analisi citofluorimetrica. In C1 è riportata la percentuale di cellule necrotiche (positive al PI e negative all'Annessina V); in C2 è riportata la popolazione di cellule necrotiche o in apoptosi tardiva (positive all'Annessina V e al PI); in C3 sono indicate le cellule vitali (negative all'Annessina V e al PI); in C4 è riportata la popolazione di cellule apoptotiche (positive all'Annessina V e negative al PI). (B e C) *Effetti di SAHA e PN, da soli e in associazione, sui livelli del citocromo c (B), pro-caspasi 3, caspasi 3 e beclina-1 (C).* (B) Il livello del citocromo c è stato valutato nella frazione citosolica e mitocondriale come riportato in Materiali e Metodi. Le valutazioni di COXIV e dell'actina sono incluse per dimostrare che non vi sono contaminazioni delle due frazioni, mitocondriale e citosolica. (C) L'effetto di SAHA e PN, da soli e in associazione, sui livelli di pro-caspasi 3, caspasi 3 e beclina-1 è stato inoltre valutato in presenza di z-VAD 100 μ M. Al termine del trattamento le cellule sono state lisate e sottoposte ad analisi di western blotting come descritto in Materiali e Metodi. La valutazione dell'actina è inclusa per dimostrare l'omogeneità delle prove. In (A), in (B) e in (C) i risultati sono rappresentativi di tre diversi esperimenti.

5. L'associazione SAHA/PN causa dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) e caduta del GSH

La fuoriuscita del citocromo c è un evento che consegue alla perdita della permeabilità mitocondriale. In conseguenza degli stimoli apoptotici, il citocromo c viene liberato nel citoplasma dove si lega ad APAF-1 favorendone la funzione di attivatore delle pro-caspasi esecutrici e quindi innescando la fase effettrice del processo apoptotico (Chowdhury et al., 2006). Per comprendere se l'effetto apoptotico indotto dal trattamento combinato SAHA/PN si accompagna a depolarizzazione della membrana mitocondriale, sono state condotte analisi di microscopia a fluorescenza mediante impiego del fluorocromo 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 la membrana mitocondriale si depolarizza, JC1 rimane prevalentemente nel citosol dove si trova in forma monomeric ed emette fluorescenza verde. Come si osserva in Fig. 5, il trattamento con SAHA 2 μ M o PN 10 μ M impiegati singolarmente determina il prevalere della colorazione rossa, indice di un $\Delta\psi_m$ integro. Invece, quando le cellule vengono pre-incubate con SAHA per 20h e successivamente sottoposte al trattamento combinato SAHA/PN per 10h si osserva un notevole incremento della percentuale di cellule con fluorescenza verde, indice di caduta del $\Delta\psi_m$ (Fig. 5).

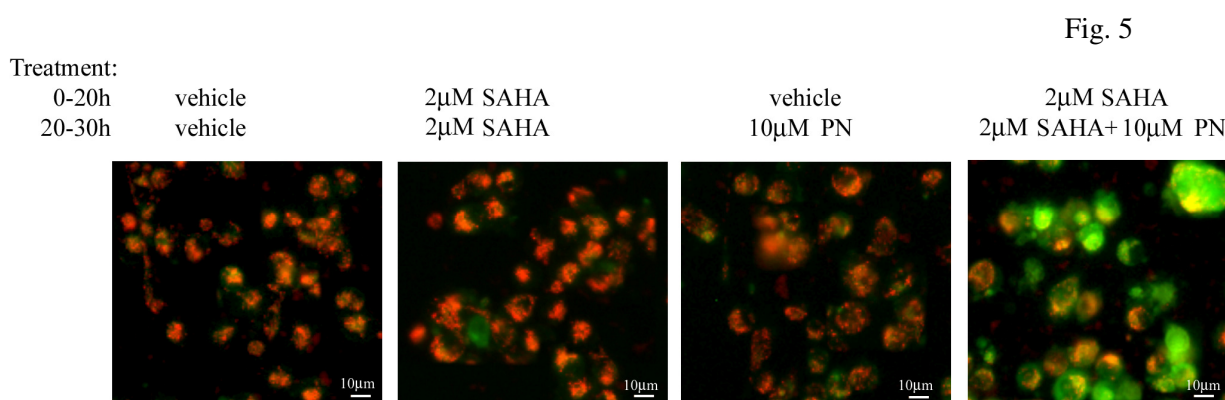


Fig. 5: L'associazione SAHA/PN determina caduta del $\Delta\psi_m$. Le cellule (8×10^3 /pozzetto) sono state trattate per i tempi indicati in figura con SAHA 2 μ M e con PN 10 μ M impiegati singolarmente o in associazione dopo pre-trattamento con SAHA. Al termine del trattamento sono state incubate con 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 monometrica di JC-1 (indice di depolarizzazione del mitocondrio). Le immagini sono state acquisite

mediante il software Leica Q Fluoro ad un ingrandimento 200 X (scale bar 10 μm). Le immagini mostrate risultano dalla sovrapposizione (merge) delle immagini ottenute con il filtro per il FITC e quelle ottenute con il filtro per la rodamina e sono rappresentative di tre diversi esperimenti.

Una delle cause di caduta del $\Delta\psi\text{m}$ è l'accumulo intracellulare di GSH ossidato, evento che determina la formazione di pori sulla membrana del mitocondrio e conseguentemente la sua depolarizzazione (Zhang et al., 2004c). E' stato pertanto valutato se il trattamento con i composti fosse in grado di determinare caduta dei livelli intracellulari di GSH ridotto. Il dosaggio effettuato con uno specifico kit, come descritto in Materiali e Metodi, ha messo in evidenza che quando le cellule vengono sottoposte al trattamento con solo SAHA 2 μM per 30h o con solo PN 10 μM per 10h si ha un modesto decremento dei livelli intracellulari di GSH. Quando invece le cellule vengono pre-trattate per 20h con SAHA 2 μM e poi sottoposte per altre 10h al trattamento combinato SAHA/PN la concentrazione di GSH decrementa del 56% rispetto alla condizione controllo (Fig. 6).

Fig. 6

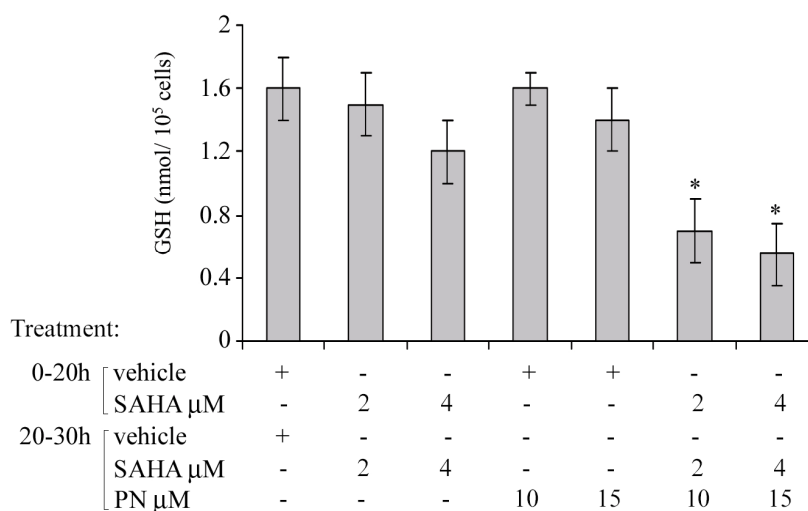


Fig. 6: L'associazione SAHA/PN determina caduta dei livelli intracellulari di GSH. Le cellule (2×10^5 /pozzetto) sono state trattate per i tempi indicati con diverse dosi di SAHA o di PN impiegati singolarmente o in associazione dopo pre-incubazione con il SAHA. Al termine del trattamento il GSH è stato dosato mediante un saggio colorimetrico, come descritto in Materiali e Metodi. In ascissa è riportata la durata del trattamento e la concentrazione del composto impiegata, in ordinata la concentrazione del GSH espressa come nmol/10⁵ cellule. I risultati sono la media di tre esperimenti \pm S.E. *P < 0.01 rispetto al controllo incubato con il solo veicolo.

6. Crosstalk tra autofagia e apoptosi

L'autofagia e l'apoptosi sono due processi che, sebbene conducano la cellula verso due diversi destini, possono stabilire un "dialogo" tra loro (Rubinstein e Kimchi, 2012). In condizioni di stress eccessivo, quali l'ipossia, la carenza di nutrienti o consistente aumento di ROS, il processo autofagico inizialmente attivato con significato citoprotettivo non è in grado di fronteggiare la condizione di stress e pertanto avvia la cellula verso la morte per apoptosi (Rubinstein e Kimchi, 2012). Poiché i risultati ottenuti, in accordo con quanto dimostrato da altri autori in altri sistemi tumorali, dimostrano che il SAHA nelle cellule MDA-MB231 è in grado di indurre tanto il processo autofagico che l'apoptosi, è stato condotto uno studio per valutare l'esistenza di un rapporto tra i due processi. Inizialmente, in studi di vitalità cellulare eseguiti mediante saggio MTT, è stato esaminato l'effetto di Baf A1, un noto inibitore del flusso autofagico, sull'azione esercitata dal SAHA e dal PN, tanto impiegati singolarmente che in associazione. Come è possibile osservare in Fig. 1E, l'aggiunta di Baf A1 al SAHA o alla combinazione SAHA/PN determina un ulteriore decremento della vitalità cellulare, suggerendo che l'autofagia indotta dal SAHA abbia un ruolo di sopravvivenza cellulare. Mediante saggio dell'Annessina V/PI è stato, inoltre, dimostrato che dopo trattamento con il SAHA o con l'associazione SAHA/PN la percentuale di cellule positive alla sola Annessina V (C4) e all'Annessina V/PI (C2) si incrementa marcatamente in seguito all'aggiunta di Baf A1, suggerendo che l'inibizione dell'autofagia possa indurre l'incremento della morte cellulare per apoptosi (Fig. 4A). Uno degli eventi alla base del "crosstalk" tra autofagia e apoptosi è il taglio proteolitico che subisce la beclina-1, un noto marker autofagico, da parte delle caspasi nelle cellule indirizzate all'apoptosi. Tale taglio è in grado di inibire il processo autofagico inteso come meccanismo citoprotettivo in cellule indirizzate irreversibilmente verso la morte (Cho et al., 2009; Luo e Rubinsztein, 2010; Wirawan et al., 2010). Il frammento C-terminale della beclina-1 frutto del taglio operato dalle caspasi migra al mitocondrio e può favorire il rilascio del citocromo c (Wirawan et al., 2010). I risultati ottenuti mediante analisi di western blotting e riportati in Fig. 4C hanno evidenziato che il livello della beclina-1 non subisce variazioni in seguito al trattamento con SAHA o PN impiegati singolarmente, quando invece le cellule vengono pre-incubate con SAHA 2 μ M e successivamente sottoposte al trattamento combinato SAHA/PN si osserva un decremento del suo livello. Tale decremento viene prevenuto dallo z-VAD suggerendo che il processo apoptotico indotto dall'associazione SAHA/PN porti all'attivazione delle caspasi, al taglio della beclina-1 e conseguentemente all'inibizione dell'autofagia. I risultati ottenuti complessivamente indicano che nelle

condizioni sperimentali prese in esame l'autofagia e l'apoptosi sono due processi strettamente interconnessi tra loro.

7. Il pre-trattamento con il SAHA contrasta l'attivazione della via di Akt/mTOR indotta dal PN

Recentemente alcuni autori hanno osservato che in cellule leucemiche il PN è in grado di indurre effetti citoprotettivi correlati all'attivazione del *pathway* di sopravvivenza Akt/mTOR e che questo effetto limita l'azione citotossica del composto (Sen et al., 2013; Hassane et al., 2010). Akt è una serina/treonina chinasi che determina la fosforilazione di mTOR, una serina/treonina chinasi che a sua volta costituisce la componente catalitica di due distinti complessi, mTORC1 ed mTORC2 (Lo Piccolo et al., 2008; Loewith et al., 2002). In seguito a stimoli differenti, quali la mancanza di nutrienti, si attiva il complesso mTORC1 che è in grado di indurre la fosforilazione delle proteine p70S6K e 4EBP. Gli studi condotti sulla vitalità cellulare hanno evidenziato che il PN nelle cellule MDA-MB231 non induce alcuna significativa riduzione della vitalità quando impiegato a basse dosi, inferiori a 10 μ M (Fig 1A), anche dopo lunghi periodi di trattamento (70-100h). Ciò suggerisce che il composto possa innescare un meccanismo citoprotettivo che si evidenzia a basse dosi quando l'effetto citotossico è poco marcato. E' stato condotto uno studio per valutare se anche nelle cellule MDA-MB231 il PN sia in grado di attivare la via di sopravvivenza Akt/mTOR. Come mostrato in Fig. 7 l'analisi di western blotting ha evidenziato che il PN 10 μ M determina incremento dei livelli delle proteine Akt e mTOR fosforilate e pertanto attive. Tale effetto si accompagna anche all'incremento delle forme fosforilate di p70S6K e del suo substrato, la proteina ribosomiale S6. E' noto che il complesso mTORC1 è in grado, inoltre, di inibire il processo autofagico inducendo la fosforilazione e l'inattivazione della proteina ULK1/2 (Shang e Wang, 2011). A tale riguardo è stato messo in evidenza, mediante western blotting, nelle cellule trattate con PN la comparsa di una banda fosforilata a più lento scorrimento elettroforetico (Fig. 7).

In accordo con quanto osservato da altri autori in cellule leucemiche, i risultati ottenuti dunque dimostrano che il PN anche nelle cellule MDA-MB231 è in grado di attivare il complesso mTORC1. E' interessante osservare che le analisi di western blotting hanno accertato che il trattamento con SAHA 2 μ M determina un decremento nei livelli delle forme fosforilate di Akt, mTOR, p70S6K, S6 e ULK1/2. Inoltre, il pretrattamento con il SAHA è in grado di inibire l'effetto su tali proteine determinato dal PN. I risultati quindi indicano la capacità del SAHA di contrastare l'attivazione del *pathway* Akt/mTOR indotta dal PN.

Fig. 7

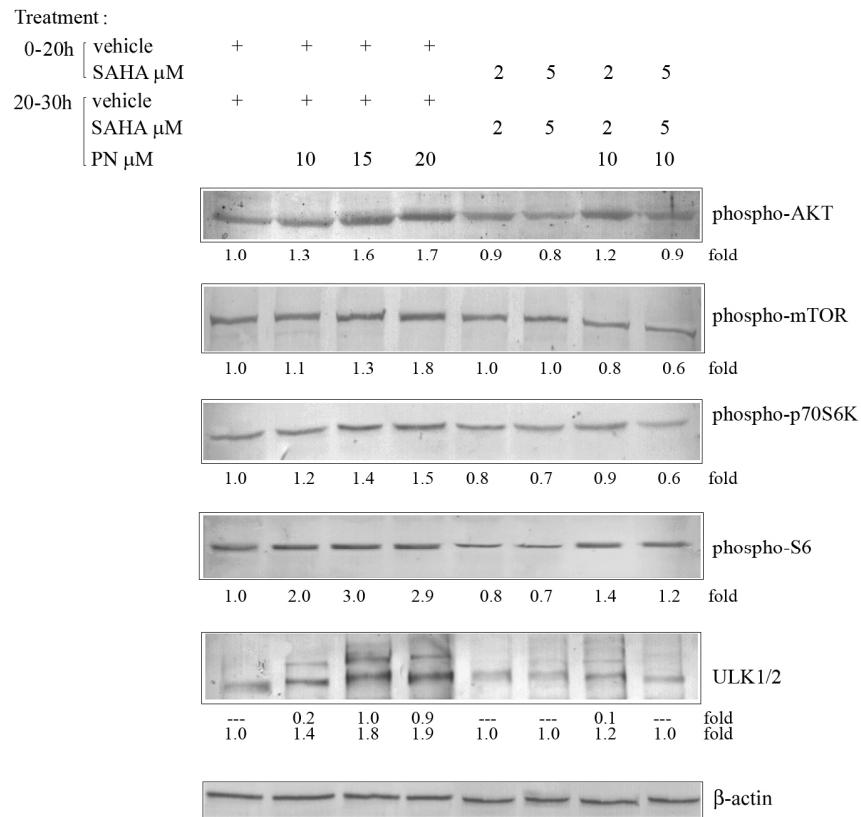


Fig. 7: Il pre-trattamento con il SAHA contrasta l'attivazione del *pathway* di Akt/mTOR indotta dal PN. Le cellule (2×10^5 /pozzetto) sono state trattate per i tempi indicati con diverse dosi di SAHA o di PN impiegati singolarmente o in associazione dopo pre-incubazione con il SAHA. Al termine le cellule sono state lisate, come descritto in materiali e metodi, e i campioni sono stati sottoposti ad analisi di western blotting impiegando anticorpi specifici per fosfo-Akt (S475), fosfo-mTOR (S2448), fosfo-p70S6K (T389), fosfo-S6, ULK1/2. I valori densitometrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La valutazione dell'actina è inclusa per dimostrare l'omogeneità delle prove.

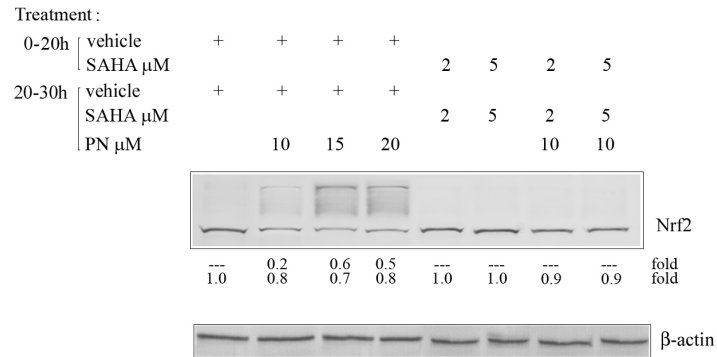
8. Il pre-trattamento con il SAHA contrasta l'attivazione del fattore di trascrizione Nrf2 indotta dal PN

Nrf2 è un fattore di trascrizione che induce l'espressione di geni che codificano per enzimi antiossidanti. In condizioni di benessere metabolico cellulare Nrf2 forma a livello citoplasmatico un complesso con la proteina Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein1) che ne determina la degradazione proteosoma dipendente (Kansanen et al., 2013). In condizioni di stress, di contro, Nrf2 subisce la fosforilazione e pertanto la stabilizzazione da parte di chinasi citosoliche. Il fattore, così, è libero di traslocare a livello del nucleo e trascrivere per una batteria di geni implicati nelle difese antiossidanti. Tutti i geni bersaglio di Nrf2 possiedono nella loro regione promoter delle sequenze di nucleotidi che formano il cosiddetto Elemento di Risposta Antiossidante (Antioxidant Response Element; ARE), specifico per legare questo fattore (Nguyen et al., 2003). Alcuni autori hanno dimostrato che l'attivazione di mTOR indotta dal PN può essere responsabile della fosforilazione e conseguente traslocazione al nucleo di Nrf2 (Sen et al., 2013; Hassane et al., 2013). Sono state quindi condotte analisi di western blotting per indagare se anche nelle nostre condizioni l'effetto citoprotettivo osservato in presenza di basse dosi di PN e mediato dal *pathway* Akt/mTOR potesse dipendere anche dall'attivazione del fattore Nrf2. Come mostrato in Fig. 8A, i risultati ottenuti, mediante analisi di western blotting, evidenziano che il trattamento con il PN determina la comparsa di una banda a più lenta mobilità elettroforetica che corrisponde alla forma fosforilata di Nrf2. Questa banda scompare tanto quando le cellule sono sottoposte al trattamento con il solo SAHA che quando sottoposte al trattamento con il SAHA e il PN in associazione. Per confermare tale dato è stata condotta un'analisi di immunofluorescenza impiegando un anticorpo specifico per Nrf2 che viene legato da un anticorpo secondario coniugato con FITC che emette fluorescenza verde, mentre i nuclei vengono identificati mediante colorazione del DNA con Hoechst 33342, che emette fluorescenza blu. Come mostrato in Fig. 8B, nelle cellule MDA-MB231 trattate con il solo SAHA 2 μ M, Nrf2 è localizzato prevalentemente a livello citoplasmatico come dimostrato dalla distinzione netta della colorazione blu del nucleo e la fluorescenza verde dell'anticorpo confinata nel citosol, il trattamento con il PN determina, invece, la traslocazione di Nrf2 a livello nucleare in quanto la fluorescenza verde si sovrappone al blu del nucleo. E' interessante osservare che quando le cellule vengono pre-trattate con il SAHA e successivamente sottoposte al trattamento combinato SAHA/PN il segnale di immunofluorescenza si osserva principalmente a livello citoplasmatico. I risultati ottenuti quindi indicano che il PN è in grado di esplicare l'azione

citoprotettiva mediante l'attivazione del fattore Nrf2 e che tale effetto viene contrastato dal SAHA.

Fig. 8

(A)



(B)

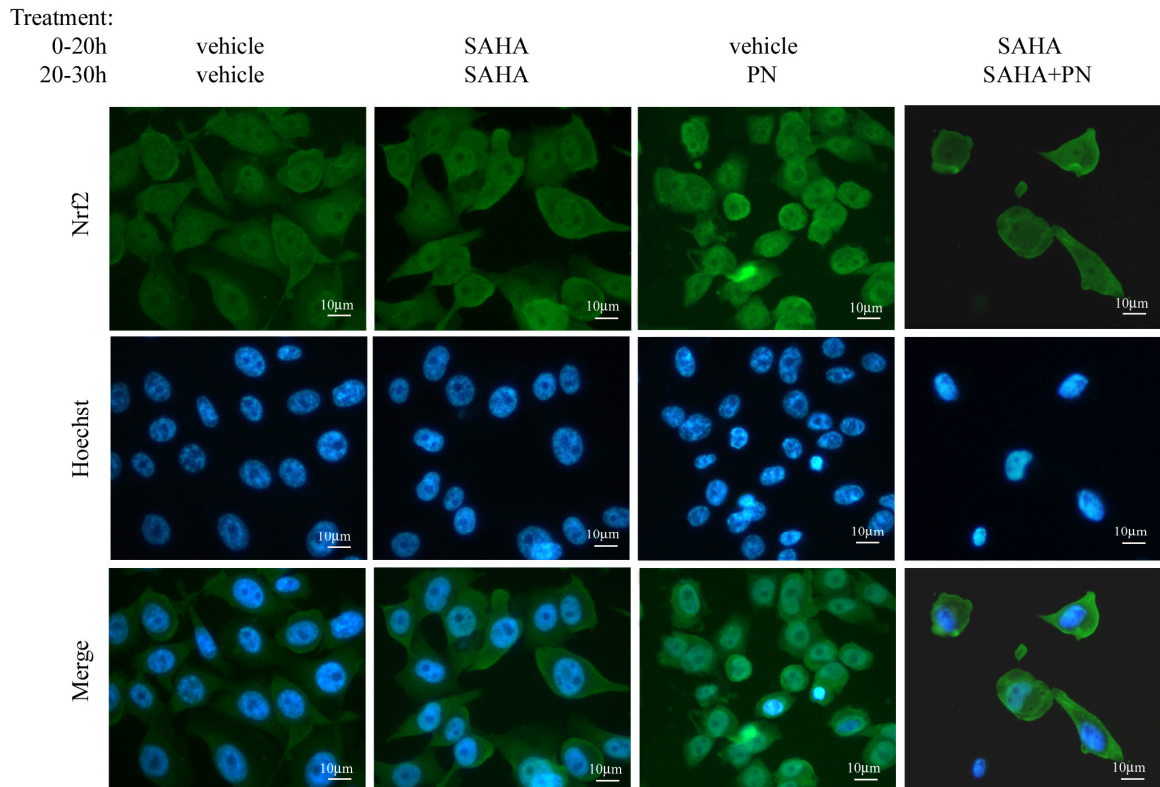


Fig. 8: Il pre-trattamento con il SAHA contrasta l'attivazione del fattore di trascrizione Nrf2 indotta dal PN. (A) Effetti di SAHA e PN, da soli e in associazione, sui livelli di Nrf2. Le cellule (2×10^5 /pozzetto) sono state trattate per i tempi indicati con diverse dosi di SAHA o di PN impiegati singolarmente o in associazione dopo pre-incubazione con il SAHA. Al termine le cellule sono state lisate, come descritto in Materiali e Metodi, e i campioni sono stati sottoposti ad analisi di western blotting impiegando un anticorpo specifico per Nrf2. I valori densitometrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La valutazione dell'actina è inclusa per

dimostrare l'omogeneità delle prove. (B) *Effetti di SAHA e PN, da soli e in associazione, sulla localizzazione intracellulare di Nrf2.* Le cellule (8×10^3 /pozzetto) sono state trattate per i tempi indicati con diverse dosi di SAHA o di PN impiegati singolarmente o in associazione dopo pre-incubazione con il SAHA. Al termine del trattamento le cellule sono state sottoposte ad analisi di immunofluorescenza impiegando un anticorpo primario diretto contro Nrf2 e un anticorpo secondario coniugato con FITC. I nuclei delle cellule sono stati sottoposti a colorazione con Hoechst 33342. La colorazione con Hoechst 33342 è stata visualizzata mediante filtro DAPI, mentre la colorazione di Nrf2 è stato visualizzata mediante filtro FITC. Le immagini sono state acquisite mediante il software Leica Q Fluoro ad un ingrandimento 400 X (scale bar 10 μ m). Le immagini mostrate in figura sono rappresentative di tre diversi esperimenti.

9. Effetti del SAHA e del PN sull'espressione di vari fattori coinvolti nella morte o nella sopravvivenza cellulare

E' noto che tanto il SAHA che il PN sono in grado di indurre modifiche epigenetiche. Il SAHA, in quanto HDACi, esplica il suo potenziale antitumorale favorendo una conformazione rilassata della cromatina, mediante la quale determina l'accesso dei fattori di trascrizione direttamente al DNA, riattivando così l'espressione di geni oncosoppressori (Marks e Xu, 2009; Slingerland et al., 2014). Le modifiche epigenetiche che il DNA può subire possono anche consistere nella metilazione, un processo che riguarda le citosine che si trovano nelle sequenze dinucleotidiche CpG (Robertson, 2005). I pattern anomali di metilazione del DNA sono stati associati ad un gran numero di neoplasie umane e si trovano in due forme distinte: ipermetilazione e ipometilazione. L'ipermetilazione caratteristica di alcuni tumori solidi e neoplasie del sangue, si verifica in genere nelle isole CpG nella regione del promotore di un gene oncosoppressore ed è associata con l'inattivazione genica. L'ipometilazione è anch'essa coinvolta nello sviluppo e nella progressione del cancro attraverso meccanismi diversi. Tra gli enzimi responsabili della metilazione vi è la DNA metil-trasferasi 1 (DNMT1) che è spesso coinvolta in meccanismi aberranti di metilazione (Yoo e Jones, 2006). Il PN è in grado di agire sul livello di metilazione del DNA in quanto reprime l'espressione della DNMT1 e inibisce la sua attività catalitica (Liu et al., 2009). E' stato pertanto intrapreso uno studio al fine di valutare se anche nelle cellule MDA-MB231 il SAHA e il PN sono in grado di determinare modifiche epigenetiche. I risultati ottenuti e riportati in Fig. 9 hanno evidenziato che il trattamento con il SAHA 2 μ M determina un consistente incremento delle forme acetilate degli istoni H3 ed H4. Il PN 10 μ M determina già dopo 10h di trattamento un marcato decremento dei livelli della DNMT1. Entrambi gli effetti causati dai composti impiegati singolarmente si osservano anche quando essi agiscono in associazione. L'azione a livello epigenetico può essere correlata alla capacità di modulare l'espressione di alcuni fattori coinvolti nella morte e nella sopravvivenza cellulare. Come mostrato in Fig. 9, l'analisi di western blotting ha dimostrato che il SAHA è in grado di incrementare i livelli di p21 e di p27, due prodotti di geni oncosoppressori e di ridurre il livello di Bcl-2, una proteina anti-apoptotica. Il PN è in grado di determinare un consistente decremento sia di Bcl-2 che di p65, una delle subunità di NF-kB, e della sua forma clivata. Questa affermazione è supportata anche dai risultati ottenuti mediante un saggio ELISA, che dimostra che il PN riduce il binding al DNA di p65. Tutti gli effetti sopra descritti si

osservano anche quando le cellule vengono trattate con i composti in associazione (Fig. 9 e 10).

I risultati nel complesso indicano che l'associazione SAHA/PN mantiene lo stato iperacetilato degli istoni H3 ed H4 determinato dal SAHA e i bassi livelli della DNMT1 indotti dal PN, eventi presumibilmente responsabili dell'incrementata espressione di p21 e p27 e del decremento di Bcl-2 e p65.

Fig. 9

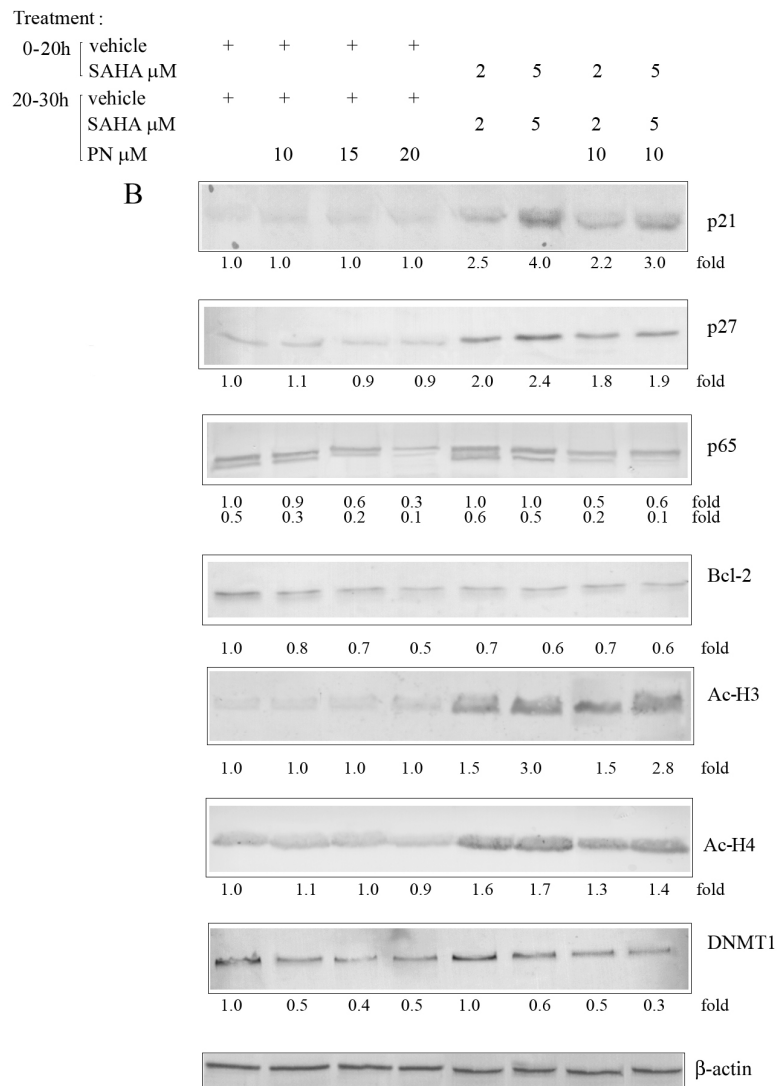


Fig. 9: Effetti del SAHA e del PN sull'espressione di vari fattori coinvolti nella morte o nella sopravvivenza cellulare. Le cellule (2×10^5 /pozzetto) sono state trattate per i tempi indicati con diverse dosi di SAHA o di PN, impiegati singolarmente o in associazione dopo pre-incubazione con il SAHA. Al termine le

cellule sono state lisate, come descritto in materiali e metodi, e i campioni sono stati sottoposti ad analisi di western blotting impiegando anticorpi specifici per p21, p27, p65, Bcl-2, Ac-H3, Ac-H4 e DNMT1. I valori densitometrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La valutazione dell'actina è inclusa per dimostrare l'omogeneità delle prove.

Fig. 10

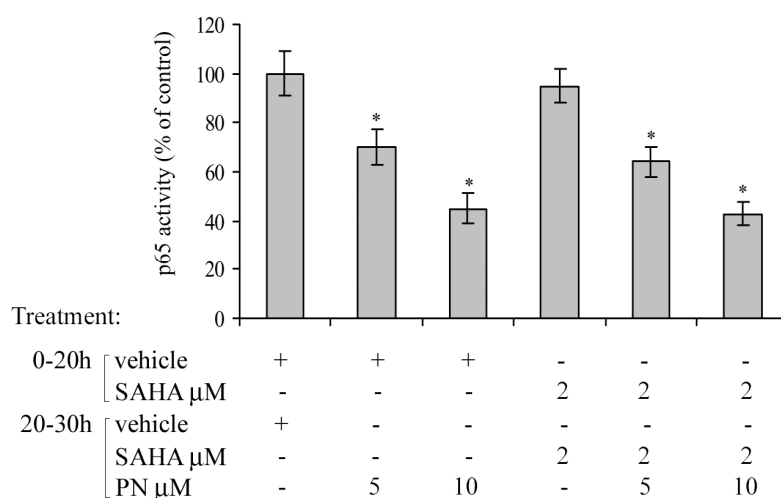


Fig. 10: Il PN, da solo e in associazione al SAHA, riduce l'attività di legame al DNA di p65. Le cellule (2×10^5 /pozzetto) sono state trattate per i tempi indicati con due diverse dosi di SAHA o di PN impiegate singolarmente o in associazione dopo pre-incubazione con il SAHA. L'attività di legame al DNA di p65 è stata valutata negli estratti nucleari, utilizzando uno specifico kit come descritto in Materiali e Metodi. Sull'asse delle ascisse è indicato il tempo di trattamento e 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.

DISCUSSIONE

Presso i laboratori di Biochimica del Policlinico di Palermo si conducono da alcuni anni studi volti alla individuazione del meccanismo d'azione del Partenolide (PN) in cellule tumorali. Questi studi hanno dimostrato che il composto è in grado di esercitare marcati effetti citotossici in cellule di epatocarcinoma, di osteosarcoma umano e di melanoma in coltura (Carlisi et al., 2011; D'Anneo et al., 2013a). Recentemente l'attenzione si è rivolta alla valutazione degli effetti del PN in cellule MDA-MB231, una linea di carcinoma mammario "triplo negativo". Tali cellule rappresentano il modello sperimentale più utilizzato di carcinoma del seno "triplo negativo", così definito perché privo dei recettori degli estrogeni, del progesterone e di HER-2 neu. Si tratta di neoplasie altamente maligne, caratterizzate da un'elevata mortalità e da resistenza alle terapie tradizionalmente impiegate per la cura (Reis Filho et al., 2008). Pertanto è di fondamentale importanza l'individuazione di nuove strategie terapeutiche per tale forma tumorale.

I ricercatori del laboratorio di Biochimica hanno dimostrato che il PN impiegato ad alte dosi (15-25 μM) esercita un potente effetto citotossico nelle cellule MDA-MB231, inducendo una consistente produzione di ROS e morte per necrosi (D'Anneo et al., 2013b). Tuttavia studi di vitalità cellulare hanno anche evidenziato che il PN quando impiegato a basse dosi (0.5-10 μM) determina effetti citotossici molto limitati, anche dopo lunghi periodi di trattamento (70-100h). Questi risultati suggeriscono che il PN nelle cellule MDA-MB231 possa indurre effetti citoprotettivi che si evidenziano quando impiegato a basse dosi. Questa osservazione è in accordo con quanto dimostrato da altri autori (Sen et al., 2013; Hassane et al., 2003), i quali hanno evidenziato che in cellule leucemiche il PN è in grado di indurre effetti citoprotettivi correlati con l'attivazione del *pathway* di sopravvivenza Akt/mTOR. L'aggiunta di composti quali wortmannina, rapamicina e temsirolimus, in grado di inibire il *pathway* di mTOR, potenzia l'effetto citotossico del PN (Sen et al., 2013; Hassane et al., 2003). Sulla base di tali considerazioni il mio studio è stato rivolto alla individuazione di composti in grado di potenziare l'effetto di basse dosi di PN in cellule MDA-MB231. L'attenzione è stata rivolta al SAHA, un inibitore delle HDAC. La scelta è stata giustificata dalla osservazione che il SAHA esercita effetti tossici sulle cellule MDA-MB231, come precedentemente dimostrato dai ricercatori dei laboratori di Biochimica (Lauricella et al., 2012), ed è inoltre, in grado di inibire il *pathway* Akt/mTOR in alcuni modelli sperimentali (Liu YL et al., 2010; Hrzjenjak et al., 2008; Li et al., 2010).

Lo studio presentato in questa tesi si è proposto di valutare gli effetti della combinazione SAHA/PN nelle cellule MDA-MB231 e di chiarirne il meccanismo molecolare d'azione.

Studi della vitalità cellulare, condotti mediante saggio MTT, hanno dimostrato che il pre-trattamento delle cellule con il SAHA 2 μM per 20h e una successiva incubazione per 40h con l'associazione SAHA 2 μM e PN 10 μM decrementa marcatamente la vitalità cellulare e che SAHA e PN manifestano effetto sinergico. Per confermare l'esistenza di tale azione sinergica, determinata dai composti in associazione, è stata valutata la riduzione della vitalità cellulare dopo trattamento con differenti dosi di SAHA (0.5-5 μM) e di PN (2.5-25 μM) mantenendo tra i due composti il rapporto fisso di 1:5 (SAHA:PN). I risultati ottenuti sono stati quindi impiegati per calcolare, secondo il modello matematico di Chou e Talalay, l'Indice di combinazione (Chou e Talalay, 1984). L'osservazione che tale valore risulta essere sempre inferiore ad 1, qualunque sia la percentuale di "frazione cellulare affetta", ha confermato l'esistenza di una interazione sinergica tra SAHA e PN. E' interessante osservare che l'effetto citotossico è in gran parte prevenuto dallo z-VAD-fmk, un inibitore generale delle caspasi, suggerendo un ruolo centrale delle caspasi nel meccanismo di morte indotto dai composti. L'aggiunta di BafA1, invece, un potente inibitore del flusso autofagico, incrementa l'effetto citotossico sia del SAHA che della combinazione SAHA/PN, dimostrando che il SAHA è in grado di indurre autofagia e che tale meccanismo assume un ruolo di sopravvivenza.

L'analisi degli eventi molecolari indotti dai composti ha evidenziato che il SAHA è in grado di indurre stress ossidativo mediante una consistente produzione di ROS e di stimolare il processo autofagico. Alla luce di questi risultati sono state condotte ulteriori analisi per individuare l'origine dei ROS e dell'autofagia, mediante l'impiego di apocinina e DPI, due inibitori della NADPH ossidasi. I risultati ottenuti hanno chiaramente dimostrato che la produzione dei ROS e l'induzione di autofagia sono contrastati da entrambi gli inibitori. Questi risultati dimostrano, pertanto, che il SAHA, attivando la NADPH ossidasi, è in grado di indurre produzione di ROS, che a loro volta sono responsabili dell'attivazione dell'autofagia.

E' interessante osservare che il PN a bassa concentrazione (10 μM) non è in grado di indurre né produzione di ROS né autofagia, effetti evidenziabili invece quando impiegato ad alte concentrazioni (15-25 μM) (D'Anneo et al., 2013b). Inoltre il PN 10 μM quando impiegato in associazione con il SAHA riduce parzialmente gli effetti determinati da quest'ultimo sulla produzione di ROS e sull'induzione di autofagia.

L'induzione dell'autofagia da parte del SAHA è stata confermata accertando la conversione della proteina LC3 dalla forma LC3I alla forma LC3II, noto marker autofagico. L'analisi ha messo in evidenza che il SAHA determina accumulo di LC3-II, reso ancora più evidente

dall'aggiunta di Baf A1. Tale effetto decrementa quando le cellule sono sottoposte al trattamento combinato indicando che il PN è in grado di contrastare l'autofagia indotta dal SAHA.

Analisi condotte mediante saggio dell'Annexina V e ioduro di propidio (PI) indicano che in seguito al trattamento con il solo SAHA una frazione di cellule va incontro ad apoptosi precoce e una quota inferiore ad apoptosi tardiva. Tali quote si incrementano in seguito al trattamento con l'associazione SAHA/PN e subiscono un decremento dopo aggiunta di z-VAD. Quest'ultimo dato conferma il coinvolgimento delle caspasi nell'induzione di morte per apoptosi. Inoltre l'osservazione che l'aggiunta di BafA1 inibendo l'autofagia potenzia l'effetto di morte causato dal SAHA e dall'associazione SAHA/PN conferma ulteriormente che l'autofagia indotta dal SAHA svolge un ruolo di sopravvivenza cellulare.

Analisi di western blotting hanno messo in evidenza che il trattamento con l'associazione SAHA/PN induce incremento del citocromo c nella frazione citosolica ed attiva la caspasi 3. Tutto ciò indica attivazione del processo apoptotico. In conclusione il SAHA stimola l'esternalizzazione cellulare della fosfatidilserina, evento precoce dell'apoptosi, mentre l'aggiunta del PN potenzia l'effetto apoptotico con rilascio del citocromo c e attivazione della caspasi 3.

Per approfondire il meccanismo molecolare mediante il quale il PN potenzia l'effetto di morte indotto dal SAHA è stato valutato l'effetto dei composti sul potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$). I risultati ottenuti indicano che le cellule sottoposte al trattamento con i singoli composti presentano un potenziale di membrana integro, mentre nelle cellule trattate con l'associazione si osserva compromissione mitocondriale, evento che si accompagna a caduta dei livelli intracellulari di GSH. Zhang e collaboratori (2004) indicano che il GSH gioca un ruolo importante nella stabilità del $\Delta\psi_m$ mitocondriale. In particolare la caduta dei suoi livelli, determinando l'apertura dei pori nella membrana mitocondriale, altera la permeabilità di quest'ultima causando la dissipazione del $\Delta\psi_m$. Il meccanismo mediante il quale l'associazione SAHA/PN è in grado di determinare deplezione del GSH attualmente è poco chiaro e pertanto necessita di ulteriori approfondimenti, tuttavia a tale proposito è possibile avanzare due ipotesi: l'una riguarderebbe il decremento della forma ridotta del GSH, l'altra l'azione diretta del PN sul GSH. Nelle nostre condizioni sperimentali, l'ossidazione del GSH potrebbe essere determinata dalla produzione di ROS indotta dal SAHA, mentre il PN tramite il suo gruppo α -metilene- γ -lattone potrebbe reagire direttamente con il GSH. È possibile che entrambi i meccanismi siano responsabili della caduta del GSH e della

conseguente compromissione mitocondriale, rilascio del citocromo c e attivazione della caspasi 3. Studi riportati in letteratura hanno dimostrato l'esistenza di un cross-talk tra autofagia e apoptosi. E' noto infatti che l'apoptosi subentra al meccanismo autofagico quando quest'ultimo in condizioni di stress eccessivo non è più in grado di assicurare la sopravvivenza della cellula (Liang et al., 2012). Poiché i risultati ottenuti indicano che lo spegnimento dell'autofagia indotta dal SAHA favorisce l'evento apoptotico si è ritenuto opportuno approfondire dal punto di vista molecolare la relazione tra apoptosi e autofagia nelle condizioni sperimentali esaminate. Analisi di western blotting hanno dimostrato che l'associazione SAHA/PN induce un decremento del livello della beclina-1, una proteina coinvolta nella formazione dell'autofagosoma. E' noto che la beclina-1, in cellule indirizzate irreversibilmente verso la morte, subisce il taglio proteolitico da parte delle caspasi. Il frammento N-terminale della beclina-1 frutto del taglio può inibire l'autofagia mentre il frammento C-terminale migra al mitocondrio e può favorire il rilascio del citocromo c (Wirawan et al., 2010). Pertanto è possibile ipotizzare che l'attivazione della caspasi 3 indotta dall'associazione SAHA/PN possa essere responsabile della degradazione della beclina-1 e che questo evento favorisce l'inibizione del processo autofagico attivato dal SAHA nonché il rilascio del citocromo c.

Lo studio riportato in questa tesi è volto a chiarire il meccanismo alla base dell'effetto citoprotettivo esercitato dal PN e la capacità del SAHA di contrastare tale effetto. In accordo con le osservazioni di altri autori (Sen et al., 2013; Hassane et al., 2003), i risultati hanno dimostrato che il PN è in grado di attivare anche nelle cellule MDA-MB231 la via di sopravvivenza Akt/mTOR. Analisi di western blotting, infatti, hanno messo in evidenza che il PN determina la fosforilazione e quindi l'attivazione dei principali protagonisti di questa via quali Akt, mTOR, la proteina p70S6K ed il substrato di quest'ultima, la proteina ribosomale S6. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il PN tramite mTOR è in grado di inibire il processo autofagico in quanto determina la fosforilazione e pertanto l'inattivazione di ULK1/2. E' interessante osservare che l'aggiunta del SAHA contrasta gli effetti esercitati dal PN sul *pathway* di mTOR in accordo con quanto in precedenza dimostrato da Shang e Wang (2011).

Si noti anche che il PN, tramite mTOR, può determinare fosforilazione e conseguente traslocazione nel nucleo di Nrf2, un fattore di trascrizione che regola l'espressione di geni che codificano per enzimi antiossidanti (Sen et al., 2013; Hassane et al., 2003, Nguyen et al., 2003). I risultati mostrano che, anche nelle cellule MDA-MB231, il PN determina la

fosforilazione di Nrf2 e la sua traslocazione al nucleo; tuttavia quando le cellule vengono sottoposte al trattamento con l'associazione, il SAHA è in grado di prevenire l'effetto esercitato dal PN su Nrf2.

E' ben noto che tanto il PN che il SAHA sono in grado di agire a livello epigenetico. I dati ottenuti dimostrano che il PN decrementa i livelli della DNMT1 e di due proteine quali p65, una subunità di NFκB e la proteina anti-apoptotica Bcl-2. In particolare l'effetto sulla DNMT1 potrebbe essere conseguenza tanto dell'alchilazione della cisteina 1226 del suo sito catalitico che di una ridotta espressione della proteina in accordo con quanto dimostrato da Liu e collaboratori (2009).

Gli studi condotti hanno inoltre dimostrato che il SAHA induce acetilazione degli istoni H3 e H4. Questo risultato è in accordo con quanto osservato da altri autori (Mitsiades et al., 2004; Chen et al., 2013), i quali hanno accertato che gli inibitori delle HDAC determinano acetilazione dei residui di lisina nelle code NH₂-terminali degli istoni H3 e H4. Tali modifiche conferiscono una conformazione rilassata della cromatina che favorisce l'accesso dei fattori di trascrizione al DNA. Nel nostro modello sperimentale il SAHA determina, inoltre, incremento dei livelli di due prodotti di geni oncosoppressori, p21 e p27, e decremento di Bcl-2. Di notevole interesse si è rivelata l'osservazione che quando i due composti agiscono in associazione si mantiene l'iperacetilazione degli istoni e il decremento dei livelli della DNMT1. Uno stato della cromatina iperacetilato e ipometilato, che si associa ad uno stato aperto e pertanto trascrizionalmente attivo della cromatina, potrebbe essere responsabile degli incrementati livelli di p21 e p27 e decremento di p65 e Bcl-2 osservati in cellule trattate con SAHA e PN in combinazione. E' possibile, inoltre, osservare che il PN è in grado di inibire il binding al DNA di p65, effetto che si evidenzia anche quando i composti agiscono in associazione.

In conclusione i risultati ottenuti complessivamente suggeriscono che nelle cellule MDA-MB231 il pre-trattamento con il SAHA incrementa in modo sinergico l'effetto citotossico indotto da basse dosi di PN. In particolare, i due composti sono in grado di annullare i rispettivi effetti citoprotettivi: il SAHA contrasta l'attivazione del pathway Akt/mTOR indotta dal PN e quest'ultimo inibisce la produzione di ROS e il meccanismo autofagico stimolato dal SAHA. I due composti inducono, inoltre, modifiche epigenetiche che potrebbero essere responsabili degli incrementati livelli di p21 e p27 e della caduta di Bcl-2 e p65. A questi eventi si accompagna la deplezione del GSH che compromette la funzionalità mitocondriale

con conseguente fuoriuscita del citocromo c, attivazione della caspasi 3 e morte per apoptosi degli elementi cellulari.

BIBLIOGRAFIA

- Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; **19**: 488-496.
- Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology.* 2008; **22**:1233-1239.
- Bali P, Pranpat M, Swaby R, Fiskus W, Yamaguchi H, Balasis M, Rocha K, Wang HG, Richon V, Bhalla K. Activity of suberoylanilide hydroxamic Acid against human breast cancer cells with amplification of her-2. *Clinical Cancer Research* 2005; **11**: 6382-6389.
- Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C, Gómez H, Dinh P, Fauria K, Van Dooren V, Aktan G, Goldhirsch A, Chang TW, Horváth Z, Coccia-Portugal M, Domont J, Tseng LM, Kunz G, Sohn JH, Semiglazov V, Lerzo G, Palacova M, Probachai V, Puztai L, Untch M, Gelber RD, Piccart-Gebhart M; NeoALTTO Study Team. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet.* 2012; **379**:633-40.
- Batty N, Malouf GG, Issa JPJ. Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents. *Cancer Letters.* 2009; **280**: 192-200.
- Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer* 2007; **109**: 1721-1728.
- Bayraktar S, Glück S. Molecularly targeted therapies for metastatic triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2013; **138**: 21-35.
- Betin VM, Lane JD. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J. Cell Sci.* 2009; **122**: 2554-2566.
- Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol.* 1995; **66**: 3-14.
- Bosch A, Eroles P, Zaragosa R, Vina JR, Lluch A, Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treatment Reviews.* 2010; **36**: 206-215.

Brodská B, Holoubek A, Otevřelová P, Kuželová K. Combined treatment with low concentrations of decitabine and SAHA causes cell death in leukemic cell lines but not in normal peripheral blood lymphocytes. *Biomed Res Int.* 2013; **2013**: 659254.

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

Brueggemeier RW, Hackett JC, Diaz-Cruz ES. Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer. *Endocrine Reviews.* 2005; **26**: 331-345.

Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *PNAS* 2002; 99: 11700-11705.

Cailleau R, Young R, Olivè M, Reeves W J. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute.* 1974; 53: 661-666.

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham M L, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical Cancer Research.* 2007; 13: 2329-2334.

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.

Carlisi D, Lauricella M, D'Anneo A, Emanuele S, Angileri L, Di Fazio P, Santulli A, Vento R, Tesoriere G. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid sensitises human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-DISC activation. *European Journal of Cancer.* 2009; **45**: 2425-2438.

Carlisi D, Vassallo B, Lauricella M, Emanuele S, D'Anneo A, Di Leonardo E, Di Fazio P, Vento R, Tesoriere G. Histone deacetylase inhibitors induce in human hepatoma HepG2 cells acetylation of p53 and histones in correlation with apoptotic effects. *International Journal of Oncology* 2008; **32**: 177-184.

Chang NC, Nguyen M, Germain M, Shore GC. Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *EMBO J.* 2010; **29**: 606-618.

- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol.* 1998; **16**: 395-419.
- Chen JQ, Russo J. ERalpha-negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta.* 2009; **1796**: 162-175.
- Chen S, Zhao Y, Gou WF, Zhao S, Takano Y, Zheng HC. The anti-tumor effects and molecular mechanisms of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on the aggressive phenotypes of ovarian carcinoma cells. *PLoS One.* 2013; **8**: e79781.
- Cheng G, Xie L. Parthenolide induces apoptosis and cell cycle arrest of human 5637 bladder cancer cells in vitro. *Molecules.* 2011; **16**:6758-6768.
- Chinchar E, Makey KL, Gibson J, Chen F, Cole SA, Megason GC, Vijayakumar S, Miele L, Gu JW. Sunitinib significantly suppresses the proliferation, migration, apoptosis resistance, tumor angiogenesis and growth of triple-negative breast cancers but increases breast cancer stem cells. *Vasc Cell.* 2014; 6:12.
- 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.
- Cho DH, Jo YK, Hwang JJ, Lee YM, Roh SA, Kim JC. Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Lett.* 2009; **274**: 95-100.
- Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984; **22**: 27-55.
- 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**: 263-326.
- Cnossen JA, Heinemann V, Laessig D, Stemmler HJ. Long-term survival with metastatic breast cancer (MBC): Results of a retrospective, single-centre analysis from 2000–2005. *Journal of clinical oncology* 2008. 26:1128

- Codd R, Braich N, Liu J, Soe CZ, Pakchung AAH. Zn (II)-dependent histone deacetylase inhibitors: Suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009; **41**: 736-739.
- 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, Emanuele S, Buttitta G, Di Fiore R, Vento R, Tesoriere G, Lauricella M. Parthenolide induces superoxide anion production by stimulating EGF receptor in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2013;**43**:1895-900. c
- 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. a
- D'Anneo A, Carlisi D, Lauricella M, Puleio R, Martinez R, Di Bella S, Di Marco P, Emanuele S, Di Fiore R, Guercio A, Vento R and Tesoriere G. Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer. *Cell Death and Disease*. 2013; **4**, e891. b
- Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell*. 2009; **138**: 229-232.
- De Ruijter JA, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. 2003; **370**: 737-749.
- De Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, van Engeland M, Tjan-Heijnen V C. Characteristics of triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2001; **137**:183-192.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2007; **13**: 4429-4434.

Dey N, Smith B R, Leyland-Jones B. Targeting basal-like breast cancers. *Current Drug Targets* 2012; **13**:1510-1524.

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

Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives. *Molecular Cancer Research*. 2007; **5**: 981-989.

Dunai Z, Bauer PI, Mihalik R. Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects. *Phatol. Oncol. Res.* 2011; **17**: 791-800.

Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol. Cell*. 2011; **42**: 23-35.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; **35**: 495-516.

Emanuele S, Lauricella M, Carlisi D, Vassallo B, D'Anneo A, Di Fazio P, Vento R and Tesoriere G. SAHA induces apoptosis in hepatoma cells and synergistically interacts with the proteasome inhibitor Bortezomib. *Apoptosis*. 2007; **12**: 1327-1338.

Emanuele S, Lauricella M, Tesoriere G, Histone deacetylase inhibitors: Apoptotic effects and clinical implications. *International Journal of Oncology*. 2008; **33**: 637-646.

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

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.

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.

Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE, Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Letters*. 2009; **280**: 125-133.

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.

Fulda S, Debatin KM. Apoptosis signaling in tumor therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004; **1028**: 150-156.

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

Gammoh N, Lam D, Puente C, Ganley I, Marks PA, Jiang X. Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; **109**: 6561-5.

Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov Today.* 2010; **15**: 668-78.

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

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.

Guerrant W, Patil V, Canzoneri JC, Oyelere AK. Dual targeting of histone deacetylase and topoisomerase II with novel bifunctional inhibitors. *J Med Chem.* 2012; **55**:1465-77.

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.

Hassane DC, Sen S, Minhajuddin M, Rossi RM, Corbett CA, Balys M, Wei L, Crooks PA, Guzman ML, Jordan CT. Chemical genomic screening reveals synergism between parthenolide

and inhibitors of the PI-3 kinase and mTOR pathways. *Blood*. 2010; **116**: 5983-90.

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.

Heider U, Kaiser M, Sterz J, Zavrski I, Jakob C, Fleissner C, Eucker J, Possinger K, Sezer O. Histone deacetylase inhibitors reduce VEGF production and induce growth suppression and apoptosis in human mantle cell lymphoma. *European Journal Haematology*. 2006; **76**: 42-50.

Hess-Stumpp H. Histone deacetylase inhibitors and cancer: from cell biology to the clinic. *European Journal of Cell Biology*. 2005; **84**: 109-121.

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.

Hrzenjak A, Kremser ML, Strohmeier B, Moinfar F, Zatloukal K, Denk H. SAHA induces caspase-independent, autophagic cell death of endometrial stromal sarcoma cells by influencing the mTOR pathway. *J Pathol*. 2008; **216**:495-504.

Huang L, Pardee AB, Suberoylanilide Hydroxamic Acid as a Potential Therapeutic Agent for Human Breast Cancer Treatment. *Molecular Medicine*. 2000; **6**: 849-866.

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.

Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell.* 2009; **137**: 721-735.

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.

Kaminsky VO, Piskunova T, Zborovskaya IB, Tchevkina EM, Zhivotovsky B. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation. *Autophagy.* 2012; **8**: 1032-44.

Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 2013; **1**: 45-49

Karagiannis TC, El-Osta A. Will broad-spectrum histone deacetylase inhibitors be suppressed by more specific compounds?. *Leukemia* 2007; **21**: 61-65.

Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cell Biology* 2001; **225**: 7-20.

Kawasaki BT, Hurt EM, Kalathur M, Duhagon MA, Milner JA, Kim YS, Farrar WL. Effects of the sesquiterpene lactone parthenolide on prostate tumor-initiating cells: An integrated molecular profiling approach. *Prostate.* 2009; **69**: 827-37.

Kelly WK, Marks PA. Drug Insight: histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nature Clinical Practice Oncology.* 2005; **2**: 150-157.

Kelsey JL, Gammon MD. The epidemiology of breast cancer. *CA Cancer J Clin* 1991; **41**:146-

165.

Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002; **181-182**: 471-4.

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.

Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2005; **7**: 385-94.

Kouraklis G, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors: A novel target of anticancer therapy. *Oncology Reports.* 2006; **15**: 489-494.

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

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.

Kreuger MR, Grootjans S, Biavatti MW, Vandenabeele P, D'Herde K. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anticancer Drugs.* 2012; **23**: 883-96.

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.

Lacroix M, Lequercq G. relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumors: an update. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2004; **83**:249-289.

Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane J P. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst.* 1998; **90**:1138-1145

Lakind J S, Wilkins A A, Bates M N. Human breast biomonitoring and environmental chemicals: use of breast tissues and fluids in breast cancer etiologic research. *J Expo Sci Environ Epidemiol*

2007; **17**:525-540.

Lane AA, Chabner BA. Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2009; **27**: 5459-5468.

Lauricella M, Ciruolo 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**: 287-99.

Laussmann MA, Passante E, Dussmann H, Rauen JA, Wurstle ML, Delgado ME, Devocelle M, Prehn JH, Rehm M. Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of caspase-8. *Cell Death Differ*. 2011; **18**: 1584-1597.

Lee JS, Li Q, Lee JY, Lee SH, Jeong JH, Lee HR, Chang H, Zhou FC, Gao SJ, Liang C. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat. Cell Biol*. 2009; **11**: 1355-1362.

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

Li J, Liu R, Lei Y, Wang K, Lau QC, Xie N, Zhou S, Nie C, Chen L, Wei Y, Huang C. Proteomic analysis revealed association of aberrant ROS signaling with suberoylanilide hydroxamic acid-induced autophagy in Jurkat T-leukemia cells. *Autophagy*. 2010; **6**:711-24.

Liang B, Kong D, Liu Y, Liang N, He M, Ma S, Liu X. Autophagy inhibition plays the synergetic killing roles with radiation in the multi-drug resistant SKVCR ovarian cancer cells. *Radiat Oncol*. 2012; **7**: 213.

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**: 505-14.

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; **10**: 29-108.

Liu YL, Yang PM, Shun CT, Wu MS, Weng JR, Chen CC. Autophagy potentiates the anti-cancer effects of the histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* 2010; **6**:1057-65.

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.

Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell.* 2002; **10**: 457-68.

Long X, Nephew KP. Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor- α . *The Journal of Biological Chemistry.* 2006; **281**: 9607-9615.

Lo Piccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat.* 2008; **11**: 32-50.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; **193**: 265-275.

Luo S, Rubinsztein DC. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ.* 2010; **17**: 268-277.

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.

Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 2007; **26**: 2527-2539.

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

- Marino N, Woditschka S, Reed LT, Nakayama J, Mayer M, Wetzel M, Steeg PS. Breast cancer metastasis: issues for the personalization of its prevention and treatment. *Am J Pathol.* 2013; **183**:1084-95.
- Mark PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *Journal of the National Cancer Institute.* 2000; **92**: 1210-1216.
- Marks PA, Jiang X. Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy. *Cell Cycle.* 2005; **4**: 549-551.
- Marks PA, Xu WS. Histone Deacetylase Inhibitors: Potential in Cancer Therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009; **107**: 600-608.
- Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell* 2011; **21**: 92-101.
- 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.
- Mauri D, Polyzos NP, Salanti G, Pavlidis N, Ioannidis JP. Multiple-treatments meta-analysis of chemotherapy and targeted therapies in advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008; **100**: 1780-91.
- McDonnell D, Wardell SE. The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications of new drug discovery in breast cancer. *Current Opinion in Pharmacology.* 2010; **10**: 1-9.
- Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet.* 1998; **14**: 410-6.
- Meyer T, Vinkemeier U. STAT nuclear translocation: potential for pharmacological intervention. *Expert Opin Ther Targets.* 2007; **11**:1355-65.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Hideshima T, Akiyama M, Chauhan D, Munshi N, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Richon VM, Marks PA, Anderson KC. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 2004; **101**: 540-5.

- Mitsiades CS, Poulaki V, McMullan C, Negri J, Fanourakis G, Goudopoulou A, Richon VM, Marks PA, Mitsiades N. Novel histone deacetylase inhibitors in the treatment of thyroid cancer. *Clinical Cancer Research*. 2005; **11**: 3958-3965.
- Monneret C. Histone deacetylase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2005; **40**:1-13.
- 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.
- Moulder S, Hortobagyi GN. Advances in the Treatment of breast Cancer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2008; **83**: 26-36.
- Mühlenberg T, Zhang Y, Wagner AJ, Grabellus F, Bradner J, Taeger G, Lang H, Taguchi T, Schuler M, Fletcher JA, Bauer S. Inhibitors of Deacetylases Suppress Oncogenic KIT Signaling, Acetylate HSP90, and Induce Apoptosis in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Research*. 2009; **69**: 6941-6950.
- 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.
- 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.
- National Cancer Institute. Breast Cancer Treatment (PDQ®)-Stages of Breast Cancer. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/healthprofessional/page7>
- Newman B, Millikan R C, King M C. Genetic Epidemiology of Breast and Ovarian Cancers. *Epidemiol Rev*. 1997; **19**:69-79.
- Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB.. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003; **43**: 233-260.
- Nicholas R, Park B, Park M. Breast cancer — one term, many entities? *J Clin Invest*. 2011; **121**:3789-3796.

- Norman JM, Cohen GM, Bampton ET. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy*. 2010; **6**: 1042-1056.
- Oakman C, Moretti E, Galardi F, Biagioni C, Santarpia L, Biganzoli L, Di Leo A. Adjuvant systemic treatment for individual patients with triple negative breast cancer. *Breast*. 2011; **20**: 135-141.
- Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y. Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J. Biol. Chem*. 2007; **282**: 13123-13132.
- Oger F, Lecorgne A, Sala E, Naredese V, Demay F, Chevance S, Desravines DC, Aleksandrova N, Le Guevel R, Lorenzi S, Beccari AR, Barath P, Hart DJ, Bondon A, Carettoni D, Simonneaux G, Salbert G. Biological and Biophysical Properties of the Histone Deacetylase Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid Are Affected by the Presence of Short Alkyl Groups on the Phenyl Ring. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; **53**: 1937-1950.
- Oka D, Nishimura K, Shiba M, Nakai Y, Arai Y, Nakayama M, Takayama H, Inoue H, Okuyama A, Nonomura N. Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF-kappaB. *Int J Cancer*. 2007; **120**: 2576-81.
- Oral O, Oz-Arslan D, Itah Z, Naghavi A, Deveci R, Karacali S, Gozuacik D. Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis*. 2012; **17**: 810-820.
- Orlando L, Schiavonea P, Fedele P, Calvania N, Nacci A, Rizzo P, Marino A, D'Amico M, Sponziello F, Mazzonia E, Cinefra M, Fazio N, Maiello E, Silvestris N, Colucci G, Cinieri S, Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2010; **36S3**: S67-S71.
- Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *British Journal of Cancer*. 2004; **90**: S2-S6.
- 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.

- Pagliarini V, Wirawan E, Romagnoli A, Ciccocanti F, Lisi G, Lippens S, Cecconi F, Fimia GM, Vandenabeele P, Corazzari M. Proteolysis of Ambra1 during apoptosis has a role in the inhibition of the autophagic pro-survival response. *Cell Death Differ.* 2012; **19**: 1495-1504.
- Pajak B, Gajkowska B, Orzechowski A. Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008; **46**: 129-135.
- 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 apoptosis proteins (c-IAP1 and c-IAP2) in vitro. *FEBS Lett.* 2004; **566**: 151-156.
- Pattingre S, Bauvy C, Carpentier S, Levade T, Levine B, Codogno P. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J. Biol. Chem.* 2009; **284**: 2719-2728.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005; **122**: 927-939.
- 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 Research and Treatment.* 2010; **120**: 285-291.
- Pickar JH, MacNeil T, Ohleth K. SERMs: Progress and future perspectives. *Maturitas.* 2010; **67**: 129-138.
- Portanova P, Russo T, Pellerito O, Calvaruso G, Giuliano M, Vento R, Tesoriere G. The role of oxidative stress in apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *International Journal of Oncology.* 2008; **33**: 325-331.
- Pozarowski P, Halicka DH, Darzynkiewicz Z. NF- κ B 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.

- Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi B, Lee H, Kim JH. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J. Biol. Chem.* 2005; **280**: 20722-20729.
- Pyo JO, Nah J, Jung YK. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med.* 2012; **44**: 73-80.
- Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; **52**:108-118.
- Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist.* 2006; **11**: 342-357.
- Richon VM, Sandhoff T, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene associated histone acetylation. *PNAS* 2000; **97**: 10014-10019.
- Richon VM, Vargas JG, Hardwick JS. Development of Vorinostat: Current applications and future perspectives for cancer therapy. *Cancer Letters.* 2009; **280**: 201-210.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005; **6**: 597-610.
- Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control.* 2007; **14**: 295-304.
- Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess K S, Stec J, Ayers M, Wagner P, Morandi P, Fan C, Rabiul I, Ross J S, Hortobagyi G N, Puztai L. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical Cancer Research.* 2005; **11**: 5678-5685.
- Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S and Kimchi A. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell.* 2011; **44**: 698-709.
- Rubinstein AD, Kimchi A. Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci.* 2012; **125**: 5259-68.

- Sarkar FH, Li Y. NF- κ B: a potential target for cancer chemoprevention and therapy. *Front. Biosci.* 2008; **13**: 2950-2959.
- Sen S, Hassane DC, Corbett C, Becker MW, Jordan CT, Guzman ML. Novel mTOR inhibitory activity of ciclopirox enhances parthenolide antileukemia activity. *Exp Hematol.* 2013, **41**:799-807.
- Sendur MA, Aksoy S, Altundag K. Pertuzumab in HER2-positive breast cancer. *Curr Med Res Opin.* 2012; **28**:1709-16.
- Shang L, Wang X. AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation. *Autophagy.* 2011; **7**: 924-6.
- 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- κ B and generating reactive oxygen species. *Int J Cancer.* 2011; **128**: 2481-2494.
- 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 NF κ B and generating reactive oxygen species. *Prostate.* 2010; **70**: 1074-1086.
- 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.
- Shibata A, Nagaya T, Imai T, Funahashi H, Nakao A, Seo H. Inhibition of NF-kappaB activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; **73**: 237-43.
- Siegel D, Hussein M, Belani C, Robert F, Galanis E, Richon VM, Garcia-Vargas J, Sanz-Rodriguez C, Rizvi S. Vorinostat in solid and hematologic malignancies. *Journal of Hematology & Oncology.* 2009; **2**: 1-11.

- Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anticancer Drugs*. 2014; **25**: 140-9.
- 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.
- Sohrab P, Shah, Roth A, Goya R et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* 2012.
- Stearns V, Zhou Q, Davidson N, Epigenetic Regulation as a New Target for Breast Cancer Therapy. *Cancer Investigation*. 2007; **25**: 659-665.
- Strappazon, F., Vietri-Rudan, M., Campello, S., Nazio, F., Florenzano, F., Fimia, G. M., Piacentini, M., Levine, B. and Ceconi, F. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *EMBO J*. 2011; **30**: 1195-1208.
- 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 cyclo-oxygenase 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 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.

- 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.
- Tan AR, Swain SM. Therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Cancer Journal.* 2008; **14**: 343-351.
- Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *Journal of Ematology & Oncology.* 2010; **3**: 1-13.
- 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.
- Vrba L, Junk DJ, Novak P, Futscher BW. p53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters. *BMC Genomics.* 2008; **9**:486.
- Wang T., Zhang X., Li JJ. The role of NF-kB in the regulation of cell stress responses. *Int. Immunopharmacol.* 2002; **2**: 1509-1520.
- 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.
- Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, Roelandt R, De

Rycke R, Verspurten J, Declercq W. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis.* 2010; **1**, e18.

Wu C, Chen F, Rushing JW, Wang X, Kim HJ, Huang G, Haley-Zitlin V, He G. Antiproliferative activities of parthenolide and golden feverfew extract against three human cancer cell lines. *J Med Food.* 2006; **9**: 55-61.

Wu JT, Kral JT. The NF- κ B signaling system, a molecular target in breast cancer therapy. *J. Surg. Res.* 2005; **123**: 158-169.

Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanism of action. *Oncogene.* 2007; **26**: 5541-5552.

Yamamoto S, Tanaka K, Sakimura R, Okada T, Nakamura T, Li Y, Takasaki M, Nakabeppu Y, Iwamoto Y. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces apoptosis or autophagy-associated cell death in chondrosarcoma cell lines. *Anticancer Research.* 2008; **28**: 1585-1591.

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.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; **5**: 37-50.

Young MM, Takahashi Y, Khan O, Park S, Hori T, Yun J, Sharma AK, Amin S, Hu CD, Zhang J. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2012; **287**: 12455-12468.

Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2006; **8**:1124-1132.

Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* 2009; **10**: 285-292.

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 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. a

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. b

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**: 143-53. c

Zhang XH, Rao M, Loprieto JA, Hong JA, Zhao M, Chen GZ, Humphries AE, Nguyen DM, Trepel JB, Yu X, Schrupp DS. Aurora A, Aurora B and survivin are novel targets of transcriptional regulation by histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Biology & Therapy.* 2008; **7**: 1388-1397.

Zhao L, Wientjes MG, Au JL. Evaluation of combination chemotherapy: Integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *ClinCancer Res* 2004; **10**: 7994–8004.

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.