

Università degli Studi della Tuscia



Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile (DECOS)

Dottorato di ricerca in Genetica e Biologia Cellulare - XXII Ciclo

**Apoptosi indotta da inibitori delle deacetilasi istoniche
in linee di adenocarcinoma pancreatico**

MED-04

Coordinatore: Prof. G. Prantera

Tutor: Dr.ssa M.S. Gilardini Montani

Dottorando: Dr. Claudio Santoni

Indice

Introduzione	pag. 1
1. Inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi)	pag. 1
1.1 Acetilazione: ruolo biologico.....	pag. 1
1.2 Acetil-transferasi istoniche (HAT)	pag. 3
1.3 Deacetilasi istoniche (HDAC).....	pag. 4
1.4 Classificazione strutturale ed effetti biologici degli HDACi.....	pag. 7
1.5 HDACi come antitumorali.....	pag. 11
1.6 Trichostatin A.....	pag. 14
1.7 Acido Valproico.....	pag. 16
2. Apoptosi	pag. 18
2.1 Aspetti morfologici e biologici dell'apoptosi.....	pag. 18
2.2 Via apoptotica estrinseca.....	pag. 20
2.2.1 Segnalazione attraverso CD95.....	pag. 21
2.2.2 Segnalazione attraverso TNF-R1.....	pag. 22
2.3 Via apoptotica intrinseca.....	pag. 23
2.3.1 Ruolo dei mitocondri.....	pag. 23
2.3.2 Famiglia proteica di Bcl-2.....	pag. 27
2.3.3 Proteine BH3-Only.....	pag. 30
2.4 Effettori dell'apoptosi: caspasi e meccanismi alternativi.....	pag. 36
2.5 Apoptosi e cancro.....	pag. 41
3. Adenocarcinoma pancreatico	pag. 42
3.1 Epidemiologia.....	pag. 42
3.2 Caratterizzazione morfologica.....	pag. 45
3.3 Alterazioni geniche.....	pag. 46
3.4 Terapia e meccanismi di farmaco resistenza.....	pag. 49
3.5 Chemioterapia.....	pag. 50
3.6 Radioterapia.....	pag. 52
3.7 Chemio-radioterapia.....	pag. 52
Scopo del lavoro	pag. 54
Materiali e metodi	pag. 56

1. Reagenti e anticorpi.....	pag. 56
2. Linee cellulari.....	pag. 56
3. Studio dell'apoptosi cellulare: analisi citofluorimetrica con Ioduro di Propidio.....	pag. 57
4. Studio dell'apoptosi cellulare: analisi citofluorimetrica con Annessina V e Ioduro di Propidio.....	pag. 58
5. Saggio MTT per lo studio dell'inibizione della crescita cellulare.....	pag. 58
6. Determinazione della caduta di potenziale di membrana mitocondriale.....	pag. 59
7. Lisi cellulare ed estratti proteici.....	pag. 59
8. Determinazione della concentrazione delle proteine estratte.....	pag. 60
9. SDS-PAGE.....	pag. 61
10. Western Blotting.....	pag. 61
11. Estrazione dell'RNA.....	pag. 62
12. Retrotrascrizione	pag. 63
13. PCR Real-Time.....	pag. 63
14. Attivazione di Bak: Immunofluorescenza.....	pag. 66
15. Attivazione di Bax: Immunoprecipitazione.....	pag. 66
16. Analisi statistica.....	pag. 67
Risultati	pag. 68
1. Il TSA ed il VPA inducono apoptosi in linee cellulari di Adenocarcinoma pancreatico.....	pag. 68
2. Il TSA ed il VPA inibiscono la proliferazione in linee cellulari di Adenocarcinoma pancreatico.....	pag. 72
3. Il TSA ed il VPA innescano la via apoptotica intrinseca: caduta del potenziale di membrana mitocondriale.....	pag. 74
4. Il TSA ed il VPA innescano la via apoptotica intrinseca: rilascio di Citocromo c ed attivazione della Caspasi-3.....	pag. 77
5. L'apoptosi indotta da TSA e VPA è contrastata da Cycloheximide.....	pag. 79
6. Il TSA ed il VPA aumentano l'espressione delle proteine BH3-only Bim e Puma.....	pag. 81
7. Effetti del TSA e del VPA sui membri multidominio Bax, Bak e Bcl-x _L	pag. 83
8. Il TSA ed il VPA inducono l'attivazione di Bax e Bak.....	pag. 84
Discussione	pag. 87
Bibliografia	pag. 92

Introduzione

1. Inibitori delle deacetilasi istoniche

1.1 Acetilazione ruolo biologico

L'acetilazione è una delle più importanti modificazioni proteiche post-traduzionali che, determinando la struttura, la funzione e la localizzazione intracellulare delle proteine, svolge un ruolo cruciale nella trasduzione del segnale e influenza le varie funzioni cellulari. Infatti, essa ha molteplici effetti che possono riguardare cambiamenti nell'interazione proteina-DNA o interazioni proteina-proteina (Dwarakanath *et al.*, 2008).

La più nota regolazione cellulare mediante acetilazione è quella che riguarda le code istoniche, in particolare quella degli istoni H3 e H4 le quali, una volta acetilate, determinano la perdita del compattamento della struttura cromatinica portando all'attivazione trascrizionale. Al contrario l'ipoacetilazione correla con la condensazione cromatinica e con la repressione trascrizionale (Durrin *et al.*, 1991). Ciò è determinato dal fatto che l'acetilazione porta ad una ridotta interazione ionica degli istoni carichi positivamente con il doppio filamento di DNA, carico negativamente, e di conseguenza anche ad una ridotta interazione internucleosomiale. In questo modo il DNA diventa accessibile ai fattori trascrizionali permettendo lo svolgimento del meccanismo che porta alla sintesi dell'RNA.

Questa alchilazione, inoltre, crea un sito di legame riconosciuto da alcune proteine quali fattori di trascrizione e acetiltransferasi istoniche (HAT). Le acetiltransferasi e le deacetilasi istoniche (HDAC) aggiungono e rimuovono continuamente gruppi acetile alle lisine al terminale degli istoni del core e generano uno stato di equilibrio dinamico di acetilazione. La combinazione delle diverse modificazioni istoniche è stata definita "codice istonico" (Strahl e Allis, 2000). I più recenti studi tendono ad attribuire minor importanza all'influenza dell'acetilazione sulla diretta attivazione trascrizionale, e quindi anche alla teoria del codice istonico (Spange *et al.*, 2009). L'approccio più recente riguardo l'acetilazione istonica è quello di considerarla di per sé un evento che modula direttamente processi quali trascrizione, replicazione e meccanismi di riparazione del DNA, integrato però, nel contesto cromatinico più ampio. Visto che l'acetilazione modula direttamente la struttura cromatinica è difficile discriminare tra acetilazione come un segnale di un "codice" per l'avvio della trascrizione e

gli effetti che riguardano la costituzione strutturale della cromatina vera e propria (Turner, 2007).

Le modificazioni istoniche rappresentano soltanto un esempio delle regolazioni svolte tramite l'acetilazione, questa modificazione post-traduzionale, infatti, è coinvolta in diversi meccanismi di regolazione che agiscono su vari livelli, dall'espressione genica fino alla modulazione dell'attività proteica (Spange *et al.*, 2009):

- modulazione dell'attività di fattori di trascrizione (STAT, NF-kB, p53 e FOXO);
- processazione dell'm-RNA e regolazione della stabilità del trascritto;
- regolazione della stabilità proteica sia dipendente dal proteasoma che indipendentemente da esso;
- modulazione dei regolatori del ciclo cellulare (p21, RB, E2F).

Il sito di legame del gruppo acetile è la catena laterale dei residui di lisina che costituisce il bersaglio di un'altra modificazione post-traduzionale molto importante l'ubiquitilazione. La poli-ubiquitilazione modula la degradazione proteica inducendo il complesso proteasomiale. Questo implica che, per competizione con il sito di ubiquitilazione, l'acetilazione possiede un ruolo importante sulla stabilità proteica (Gronroos *et al.*, 2002, Caron *et al.*, 2005, Seigneurin-Burnj, 2001). Tale meccanismo di regolazione della stabilità è stato osservato per p53 che presenta dei siti di acetilazione sovrapponibili a quelli di ubiquitilazione (Ito *et al.*, 2002).

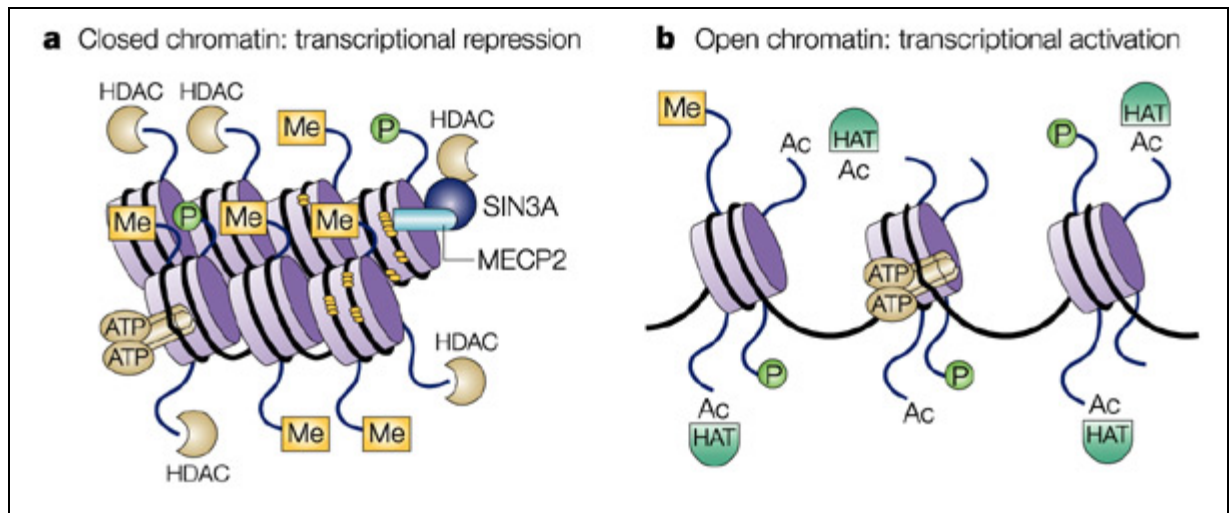
L'acetilazione di p53, però, svolge anche un altro tipo di regolazione correlata alla fosforilazione, infatti la fosforilazione all'N-terminale può facilitare l'acetilazione al C-terminale, ed entrambe queste modificazioni, sembrano influenzare sia l'associazione di p53 con le proteine regolatorie sia la sua capacità di modulare la trascrizione dei geni bersaglio (Dwarakanath *et al.*, 2008). Il conseguente effetto sulla funzionalità di p53 non è ancora chiarito è quindi intenso argomento di studio.

L'acetilazione può anche indurre un cambiamento conformazionale della proteina che la subisce inducendone la degradazione tramite il proteasoma stesso. Tale meccanismo regolatorio, ad esempio, riguarda il fattore angiogenico HIF-1 α che subisce ubiquitilazione in seguito ad acetilazione di un sito di regolazione (Jeong *et al.*, 2002).

Altri fattori di trascrizione vengono regolati direttamente ed indirettamente dall'acetilazione, quali i membri delle famiglie YY1, SREBP, Smad7 (Cohen *et al.*, 2004, Yang *et al.*, 2007).

Inoltre l'acetilazione è coinvolta nella modulazione di importanti processi che riguardano la maturazione dell'mRNA come lo splicing, le modificazioni in 5' ed in 3' e la stabilità del messaggero stesso, ad esempio sia la ribonucleoproteina A1 che la poli-(A)-polimerasi (PAP) sono modulate da acetilazione.

Infine l'acetilazione è coinvolta nel ciclo cellulare modulando direttamente fattori di trascrizione come p21, Rb ed E2F. L'acetilazione di E2F regola ad esempio la sua funzionalità positivamente se l'acetilazione riguarda i siti adiacenti al dominio di legame del DNA, negativamente se all'interno di esso. L'insieme dei meccanismi di segnalazione cellulare correlati ai segnali di acetilazione e deacetilazione è ancora intensa materia di studio (Spange *et al.*, 2009).



Variazione della struttura cromatinica in funzione dell'acetilazione.
(Johnstone, 2002)

1.2 Acetil-tranferasi istoniche (HAT)

Le HAT sono evolutivamente conservate dal lievito all'uomo e formano complessi composti da diverse subunità. Diversamente dalle HDAC possiedono delle strutture e funzioni molto diverse tra loro. Nei mammiferi più di trenta HAT mostrano diverse specificità di substrati istonici e non. Essi acetilano residui lisinici in maniera specifica. Dall'immagine cristallografica si distingue un potenziale motivo di riconoscimento dove un residuo di glicina è seguito da una lisina acetilabile (GKxxP) (Bannister *et al.*, 2000). Comunque la conoscenza di questo motivo è limitata per l'acetilazione di proteine non istoniche. Studi di proteomica hanno identificato differenti set di amminoacidi preferenzialmente acetilati, queste differenze sono attribuite alla localizzazione delle HAT che risultano essere substrato specifiche. Le proteine citoplasmatiche infatti non mostrano dei motivi *consensus* di acetilazione strettamente conservati (Kim *et al.*, 2006). Al contrario delle HDAC la classificazione delle HAT non è chiara. Esse sono raggruppate in due gruppi: le A- e B- HAT, rispettivamente nucleari e citoplasmatiche.

Le A-HAT sono principalmente coinvolte nell'acetilazione di proteine associate alla trascrizione. Queste si possono suddividere in 5 famiglie: GNAT, MYST, p300/CBP, fattori di trascrizione generali, e cofattori di recettori nucleari (Roth *et al.*, 2001). Le HAT di tipo A sono principalmente note contribuire alla formazione di complessi ad alto peso molecolare. Le HAT di tipo B acetilano proteine di neo-sintesi come istoni liberi promuovendo la loro localizzazione nucleare e la loro associazione al DNA libero appena sintetizzato. Molte HAT mostrano un diverso tipo di specificità, anche verso gli istoni, in funzione della composizione del complesso HAT e della specificità del sito bersaglio di acetilazione reclutato. I complessi HAT incidono sullo stato di decondensazione cromatinica, sui sistemi di riparazione del DNA danneggiato e sull'acetilazione di bersagli non istonici. Molte HAT possiedono un dominio evolutivamente conservato che riconosce specificamente le lisine acetilate: il bromodominio, il quale lega direttamente le proteine associate agli istoni acetilati (Waterborg *et al.*, 2002, Lee e Workman, 2007). Le HAT maggiormente studiate sono le CBP e p300, che sono entrambi complessi proteici. Apparentemente, p300 sembra avere un più vasta quantità di substrati sia istonici che non. La famiglia proteica delle GNAT (*Gcn5 related N-acetyltransferases*) include Gcn5 e PCAF (*p300/CBP associated factor*) che sono molto importanti per l'inizio della trascrizione. I membri della famiglia MYST agiscono come subunità catalitiche in diversi complessi funzionali quali Tip60, HBO1 e MOZ/MORF. Esistono altri enzimi con un'attività di trasferimento degli acetili, ma la loro scarsa omologia di sequenza non permette di raggrupparli in queste famiglie. Numerose sono le HAT che svolgono la funzione di auto-acetilazione (Spange *et al.*, 2009)

1.3 Deacetilasi Istoniche (HDAC)

Le deacetilasi istoniche rimuovono gruppi acetili da residui di lisina. Gli istoni sono il primo bersaglio delle deacetilasi ad essere stato scoperto, per questo motivo hanno assunto tale nomenclatura. C'è però un numero sempre crescente di bersagli non istonici che dimostrano che gli istoni sono soltanto alcuni dei substrati di questi enzimi. Le HDAC con la loro funzione associata agli istoni entrano a far parte dei complessi multiproteici di repressione trascrizionale.

Dal punto di vista funzionale possono essere raggruppate in due distinte famiglie. La famiglia zinco-dipendente strutturalmente correlata con le Hda1/Rpd3 di lievito, e la NAD⁺-dipendente omologa alle Sir2 di lievito. Dal punto di vista filogenetico le HDAC sono divise in quattro

classi. Nella I, II e IV vi sono i membri della famiglia zinco-dipendente, mentre nella III classe vi sono gli omologhi delle Sirt2 di lievito.

I membri della I classe (HDAC-1,-2,-3 e -8) sono ortologi degli enzimi di lievito Rpd3, un regolatore trascrizionale, hanno un peso molecolare tra 22 e 55 kDa e sono ampiamente espresse nei tessuti, con principale localizzazione nel nucleo (de Ruijter *et al.*, 2003). Le HDAC-1 e HDAC-2 sono quelle maggiormente caratterizzate. Entrambe mostrano un segnale di localizzazione nucleare ma non il segnale di esportazione, rimanendo in tal modo confinate nel nucleo (Haigis e Guarente, 2006; Gregoret *et al.*, 2004). Sono i principali componenti del complesso multiproteico di repressione trascrizionale SIN3-HDAC e del complesso di rimodellamento e di deacetilazione nucleosomale NuRD-Mi2-NRD. Indagini recenti suggeriscono che le deacetilasi di classe I possiedono un ruolo rilevante nella regolazione della proliferazione cellulare, in rapporto agli enzimi di classe II che invece hanno funzioni tessuto specifiche. Il knock-out di HDAC1 in topo, infatti, porta a difetti di proliferazione e sopravvivenza nonostante l'incremento "compensatorio" di livelli di attivazione di HDAC2 e 3. Inoltre è stato rilevato che HDAC1 e 3 si associano al fattore di trascrizione HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) modulando quindi l'espressione dei geni regolati da esso tra cui alcuni coinvolti nell'angiogenesi (Marks e Xu, 2009). HDAC2 può modulare l'attività trascrizionale interagendo con p53 e potrebbe essere coinvolto nella repressione dell'apoptosi in cellule tumorali (Zhu *et al.*, 2004).

I membri della classe II omologhi di Hda1 in mammifero possono essere suddivisi in due sottoclassi: la IIa (HDAC-4, -5, -7 e -9) e la IIb (HDAC-6 e -10), sono più grandi, avendo un peso molecolare di 120-135 kDa, manifestano una limitata distribuzione tissutale e possono muoversi tra il nucleo ed il citoplasma, mostrando funzioni e substrati diversi rispetto alla classe I (Kao *et al.*, 2001; Guardiola e Yao, 2002). HDAC-4 è implicato nella differenziazione dei condrociti, nella regolazione dello sviluppo osseo e muscolare e nella sopravvivenza neuronale retinica (Chen e Cepko 2009). HDAC-5 e -9 hanno un ruolo nello sviluppo del muscolo cardiaco. HDAC 7 contribuisce al mantenimento dell'integrità delle cellule T (Marks e Xu, 2009).

Le deacetilasi istoniche 6 e 10 sono uniche nel fatto di avere due domini catalitici (de Ruijter *et al.*, 2003). HDAC-6 possiede un sito di legame per l'ubiquitina coinvolto nella formazione dell'aggresoma nella via proteolitica di proteine che hanno perso il folding. Inoltre questa HDAC è una deacetilasi specifica per diverse proteine quali α -tubulina, cortactina, perossiredoxina, chaperonine come HSP90, mentre gli istoni non vengono acetilati da questo enzima *in vivo* (Marks e Xu, 2009).

HDAC-11 possiede delle sequenze conservate sia con le Rpd3 che con le Hda1 ed è quindi considerato l'unico componente della classe IV.

La classe III rappresenta un gruppo filogeneticamente conservato con 7 membri nell'uomo (SIRT-1 fino a -7). Questa famiglia è omologa alle proteine Sir2 di lievito, ed a differenza delle altre classi richiede come cofattore per svolgere la sua attività il NAD^+ . La classe III non viene inibita dagli HDACi delle classi I e II, ma dalla nicotinamide (vitamina B3).

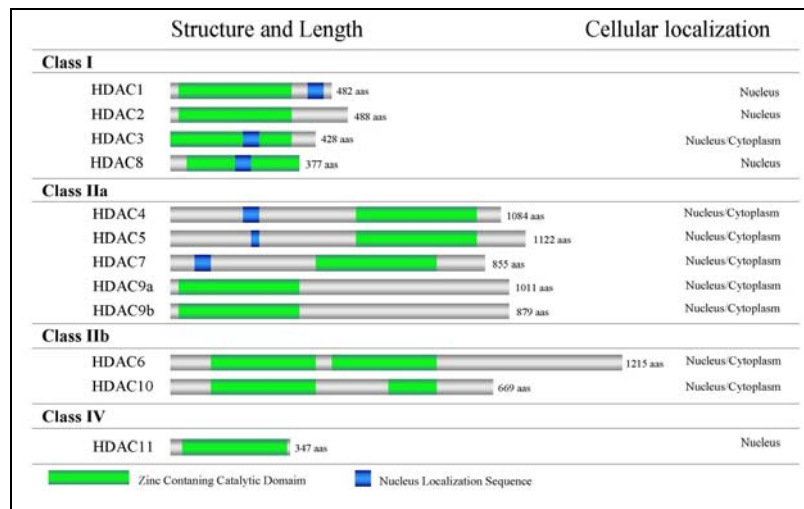
Le HDAC zinco dipendenti fanno tutte parte di complessi multiproteici nei quali possono essere coinvolte più di una HDAC. Le deacetilasi non legano direttamente il DNA ma interagiscono con esso tramite complessi multiproteici che comprendono corepressori e coattivatori (Marks e Xu, 2009). L'attività delle HDAC è regolata a diversi livelli inclusi interazioni proteina-proteina, traslocazione subcellulare, modificazioni post traduzionali come fosforilazione, acetilazione, sumoilazione e proteolisi. La fosforilazione, per esempio, porta all'associazione con la proteina citoplasmatica 14-3-3, questa interazione promuove l'esclusione nucleare delle HDAC della classe II. I substrati non istonici includono vari bersagli cellulari come fattori di trascrizione, regolatori trascrizionali, mediatori di trasduzione del segnale, enzimi di riparazione del DNA, regolatori degli scambi nucleari, chaperonine, proteine strutturali, mediatori flogistici, e proteine virali.

Molti tumori umani mostrano un'alterata espressione di HDAC. In alcune cellule trasformate HDAC1 è stato visto interagire direttamente con i repressori trascrizionali e con alcune proteine quali Rb, p107, p130, e YY1 associate con la regolazione della proliferazione cellulare. Aumentati livelli di espressione proteica di HDAC 2 e 3 è stata rilevata in alcuni tumori del colon e di HDAC 1 e 3 in alcuni tumori del seno. Mentre sono stati riscontrati ridotti livelli di HDAC 1, in tumori gastrici, e di HDAC 5 e 10, in cancro polmonari, rimane ancora da capire se questa associazione contribuisce al fenotipo maligno.

Oltre ad una alterata espressione delle HDAC anche reclutamenti aberranti di questi enzimi sono stati riscontrati in diversi tumori. Infatti HDAC coinvolti con proteine oncogeniche quali PML-RAR α , PLZF-RAR e la proteina di fusione AML1-ETO sono stati osservati rispettivamente in leucemia promielocitica acuta e leucemia mieloide acuta. Altro esempio è costituito dall'oncogene BCL-6, codificante per un fattore di trascrizione e sovraespresso in alcuni tipi di linfoma, che è stato osservato essere reso oncogenico dal reclutamento di HDAC2.

I substrati delle HDAC sono direttamente e indirettamente coinvolti in numerosi processi come regolazione dell'espressione genica, della proliferazione, della differenziazione, della migrazione e della morte cellulare. Per questo le deacetilasi istoniche rappresentano un bersaglio della terapia anti-tumorale, infatti inibitori delle deacetilasi possono innescare molti

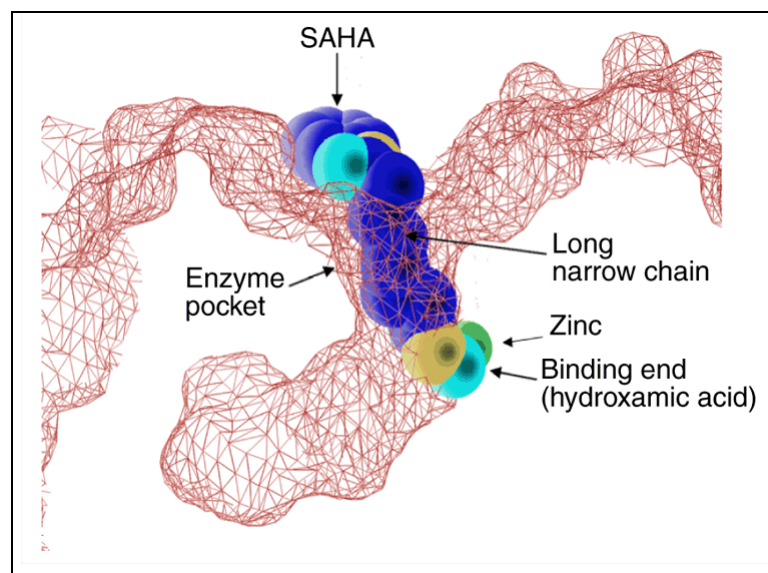
meccanismi che inducono l'arresto della crescita di cellule trasformate e la loro morte cellulare (Marks e Xu, 2009).



HDAC zinco dipendenti: struttura e localizzazione.
(Lucio-Eterovic *et al.*, 2008)

1.4 HDACi classificazione strutturale ed effetti biologici

La maggior parte degli studi che riguardano gli inibitori delle deacetilasi istoniche agiscono sulle HDAC zinco-dipendenti. Questi inibitori delle deacetilasi hanno, generalmente, in comune tre caratteristiche strutturali: una porzione legante lo zinco, un gruppo opposto di “capping” ed una catena alchilica, vinilica o arilica che collega le due parti.



Caratteristica strutturale delle HDACi zinco-dipendenti nel loro sito di interazione con le HDAC (Marks *et al.*, 2001)

Dal punto di vista strutturale si possono distinguere 5 classi:

- Derivati degli acidi idrossamici: di questo gruppo fa parte il trichostatin A (TSA), il primo prodotto naturale idrossamico ad essere scoperto. Tra gli altri vi sono l'acido idrossamico suberoililide (SAHA), l'oxamflatin e l'acido idrossamico cinnamico (CBHA). Per il loro elevato potere inibitorio, gli acidi idrossamici, in particolare SAHA, sono già utilizzati in trial clinici come agenti antitumorali.
- Peptidi ciclici: la categoria chimicamente più complessa con il depsipeptide (FK-288), il trapoxin (TPS) e l'apicidin. Questi composti agiscono a concentrazioni nano molari.
- Acidi grassi a catena corta: di questa gruppo fanno parte il butirrato, il fenilbutirrato e l'acido valproico. Sono attivi a concentrazioni millimolari, ciò è dovuto anche al fatto che possiedono una breve catena laterale, quindi prendono contatto con il sito catalitico in misura minore rispetto ad altri HDACi. Ad eccezione dell'acido valproico, essi sono relativamente poco adatti come antitumorali perché hanno una breve emivita nel sangue
- Benzamidi: includono le MS-275 e CI-994 che operano a concentrazioni micromolari.
- Chetoni: la categoria include i trifluorometilchetoni e i chetoamidi tra gli inibitori delle deacetilasi sono quelli scoperti più recentemente, agiscono a concentrazioni micromolari e necessitano ancora di analisi per saggiare la loro capacità anti-tumorale (Lindemann e Johnstone, 2004).

La diversità strutturale tra i diversi HDACi suggerisce che i meccanismi d'azione di questi composti possano coinvolgere l'interazione delle HDAC con altre proteine, non necessariamente legate alla loro attività come deacetilasi.

Gli HDACi provocano diversi effetti biologici conseguenti all'alterazione dello stato di acetilazione di istoni e di molte proteine non istoniche, quali componenti coinvolti nei processi di regolazione dell'espressione genica, apoptosi intrinseca ed estrinseca, progressione del ciclo cellulare, stato redox cellulare, divisione mitotica, riparazione del DNA, migrazione cellulare ed angiogenesi (Marks e Xu, 2009).

In seguito al trattamento con inibitori delle deacetilasi istoniche si ha un aumento dell'acetilazione degli istoni già a 2-4 h. Esperimenti di microarray hanno mostrato un cambiamento dell'espressione del 5-20% dei geni, inoltre è noto che questo effetto si ha in uguale misura sia come regolazione positiva che negativa (Smith e Workmann, 2009).

Il numero ed il tipo di geni la cui trascrizione è alterata dipende dalla durata dell'esposizione all'inibitore, del tipo di HDACi usato e dal tipo cellulare studiato (Ungerstedt *et al.*, 2005).

Alcuni cambiamenti nell'espressione genica appaiono essere un effetto diretto degli HDACi sul promotore genico e sul complesso di fattori di trascrizione, mentre altri sono invece dovuti

ad effetti a valle. Solo di una modesta parte di modulazioni geniche si attribuisce la diretta interazione con il cambiamento dell'acetilazione istonica (Reid *et al.*, 2005).

Tra i geni noti essere modulati vi sono regolatori del ciclo cellulare come l'inibitore delle chinasi-ciclina dipendenti, p21. Già dopo 6 h dal trattamento si ha un aumento dell'espressione proteica di p21 (Richon *et al.*, 2000). Questo aumento è stato rilevato in vari modelli tumorali anche in assenza del fattore di trascrizione p53 funzionante, che è noto regolare la sua espressione (Glaser *et al.*, 2003; Im *et al.*, 2008; Komatsu *et al.*, 2006; Petrella *et al.*, 2008; Vrana *et al.*, 1999). Oltre a p21 anche CDKN1 B e C (p27 e p57) sono risultati essere indotti in risposta ad HDACi (Reid *et al.*, 2005). Invece l'espressione delle cicline A e D1, che normalmente promuovono la progressione del ciclo cellulare, è stata vista essere inibita dal trattamento con derivati degli acidi idrossamici. Per la sola ciclina D1 è noto che ciò avviene anche in seguito al trattamento con valproato e butirato (Smith e Workman, 2009). La modulazione negativa delle cicline porta alla diminuzione dell'attività delle chinasi ciclina dipendenti. Queste regolazioni portano all'arresto del ciclo cellulare in fase G1, effetto che si è riscontrato sia in cellule trasformate che normali (Ungerstedt *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2007).

Un'altra categoria di geni regolati dagli HDACi sono i regolatori dell'apoptosi sia della via mitocondriale che recettore mediata. In diversi modelli è stato visto l'aumento di espressione dei pro-apoptotici della famiglia di Bcl-2 come Bim, Bmf, Bax, Bak, e Bik e/o la diminuzione di antiapoptotici quali Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 ed anche XIAP e survivin. Il meccanismo che regola questi effetti è ancora sconosciuto e sono diversi nei vari tipi cellulari (Marks e Xu, 2009; Bokelmann e Mahlknecht, 2008; Lindemann *et al.*, 2007).

L'inibizione delle deacetilasi provocano anche un accumulo di ROS (Specie reattive dell'ossigeno) in cellule trasformate piuttosto che nelle controparti normali, questo spiega almeno in parte la diversa sensibilità alle HDACi. L'accumulo di ROS è un evento precoce che può precedere il danno mitocondriale, ciò suggerisce che la produzione di ROS non è solo conseguenza del danno mitocondriale (Frew *et al.*, 2009). Infatti gli HDACi inducono la diminuzione di espressione di scavenger come la Thioredoxina (Trx) e l'N-acetilcisteina, e l'aumento di TBP-2 (Thioredoxin Binding Protein-2) che inibisce la Trx (Ungerstedt *et al.*, 2005). Questo scavenger, inoltre, inibisce anche la chinasi ASK-1 che induce l'apoptosi tramite l'attivazione di una cascata di segnali che coinvolgono varie fosforilazioni e facilitando l'aumento di espressione di Bim attraverso il feedback positivo dell'attività di E2F1. Quindi l'inibizione di Trx attiva ASK1 che promuove l'apoptosi (Tan *et al.*, 2006). Al contrario la perossiredoxina (Prx) è un bersaglio dell'HDAC-6, l'iperacetilazione indotta da HDACi aumenta l'abilità di Prx I e II a ridurre H₂O₂. Questo meccanismo contrasta

l'accumulo di ROS indotto da HDACi, e comporta una compensazione, effetto che potrebbe essere evitato usando inibitori specifici che non abbiano HDAC-6 come bersagli (Frew *et al.*, 2009).

Al contrario l'inibizione specifica di HDAC-6 è stata vista avere una sua funzionalità correlata all'efficacia degli HDACi. Riguardo a questa inibizione sono noti alcuni meccanismi. Uno tra questi riguarda le Heat Shock Protein HSP. Infatti, l'acetilazione di Hsp90, che è modulata tramite HDAC-6, ne determina la perdita della funzione come chaperon portando alla degradazione proteasomiale delle proteine di cui essa regola il folding come Akt, Bcr-Abl, c-Raf, ed ErbB2. Gli HDACi, inoltre, distruggono i complessi proteinafosfatasi1-HDAC attivando così la fosfatasi che inattiva Akt defosforilandola. L'inibizione di HDAC6, infatti, porta al blocco della via antiapoptotica regolata da Akt con questo meccanismo.

Anche il recettore per gli androgeni AR è regolato da HSP90, l'inibizione di HDAC6 può indurre la degradazione di questo recettore. Inoltre gli HDACi inibiscono la trascrizione di AR e possono bloccare i geni regolati da esso (Chen *et al.*, 2005; Welsbie *et al.*, 2009). Un altro effetto dell'inibizione di HDAC6 è la distruzione della via dell'aggresoma. Infatti HDAC6 è uno dei componenti dell'aggresoma, una struttura che permette la degradazione delle proteine che hanno perso il folding corretto, sia ubiquitilate che non. HDAC6 può legare sia proteine mono che poliubiquitilate, e anche p150, un componente del complesso motorio della dineina, che agisce come un ponte tra i motori dineici e le proteine ubiquitilate nella formazione dell'aggresoma. L'inibizione di HDAC6 rende le cellule maggiormente sensibili alle proteine con uno stress del folding indotto da inibitori delle proteasi quindi alla morte cellulare (Hideshima *et al.*, 2005). Questo meccanismo è alla base della strategia di cotrattamento con HDACi e inibitori del proteasoma per il trattamento di alcuni tumori.

Gli HDACi possono bloccare l'angiogenesi *in vitro* ed *in vivo* riducendo l'espressione dei fattori proangiogenici HIF-1 e VEGF. Gli HDACi possono distruggere la funzione di HIF-1 con diversi meccanismi, sia direttamente per degradazione della proteina acetilata, sia tramite Hsp90 che normalmente è associato a HIF-1. L'inibizione delle deacetilasi può bloccare questa associazione esponendo HIF-1 alla degradazione proteasomiale. L'attività di HIF-1, inoltre, può essere diminuita anche bloccando HDAC7 che in condizioni ipossiche funge da attivatore di HIF-1. Per quanto riguarda il ruolo degli HDACi nel modulare l'angiogenesi tramite VEGF è stato visto che il TSA e Vorinostat inibiscono la via attivata da questo fattore di crescita. (Bolden *et al.*, 2006; Minucci e Pelicci, 2006; Xu *et al.*, 2007)

Tra gli eventi indotti da queste sostanze vi sono anche modificazioni cromatiniche diverse dalle acetilazioni istoniche, come la metilazione sia del DNA che degli stessi istoni, infatti il Depsipeptide inibisce l'espressione di repressori come SUV39HI e G9a, i quali sono

metiltransferasi istoniche eterocromatiche (Wu *et al.*, 2008). Vari HDACi sono risultati diminuire l'espressione di DNMT1, una DNA metiltransferasi di mantenimento, inducendo la sua degradazione proteasomiale (You *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). Inoltre il TSA diminuisce la stabilità dell'mRNA di DNMT3B, una metiltransferasi *de novo*, diminuendone così l'espressione (Xiong *et al.*, 2005). Anche geni microRNA sono modulati da HDACi. Infatti dopo il trattamento con acidi idrossamici in cellule tumorali del seno il 40% dei microRNA analizzati cambia in quantità. Da notare il fatto che la maggior parte di essi vengono regolati negativamente. In particolare alcuni degli mRNA, di cui è favorita la trascrizione in seguito al trattamento con HDACi, presentano specifici elementi microRNA che vengono modulati negativamente (Scott *et al.*, 2006).

1.5 HDACi come antitumorali

Lo sviluppo clinico di HDACi è un'attiva area di studio. Ci sono attualmente almeno 15 diversi HDACi in trials clinici sia come monoterapia che in combinazione per neoplasie sia ematologiche che per tumori solidi.

Vorinostat è l'HDACi in più avanzato uso clinico. Esso infatti è il primo HDACi ad essere stato approvato dalla FDA per il trattamento di linfoma cutaneo a cellule T (Duvic e Vu, 2007; Marks e Breslow, 2007).

LBH-589, che è in fase I e II di trials clinici, sembra avere maggiore efficacia del Vorinostat. Tra gli HDACi in studi clinici le evidenze preliminari indicano un'attività antitumorale di stabilizzazione della malattia, risposta parziale ed, in pochi casi, una completa risposta di durata transitoria.

I test clinici con i diversi HDACi vengono svolti su pazienti con una grande varietà di tumori ematologici e solidi inclusi leucemia linfocitica cronica, leucemia mieloide acuta, mieloma multiplo, tumore del collo e del cranio, melanoma, e cancro di vari organi come cervello, polmone, seno, ovaio, rene e pancreas. Le prove accumulate ad oggi provano che gli HDACi possono essere più utili in combinazione con altri farmaci citotossici e/o mirati.

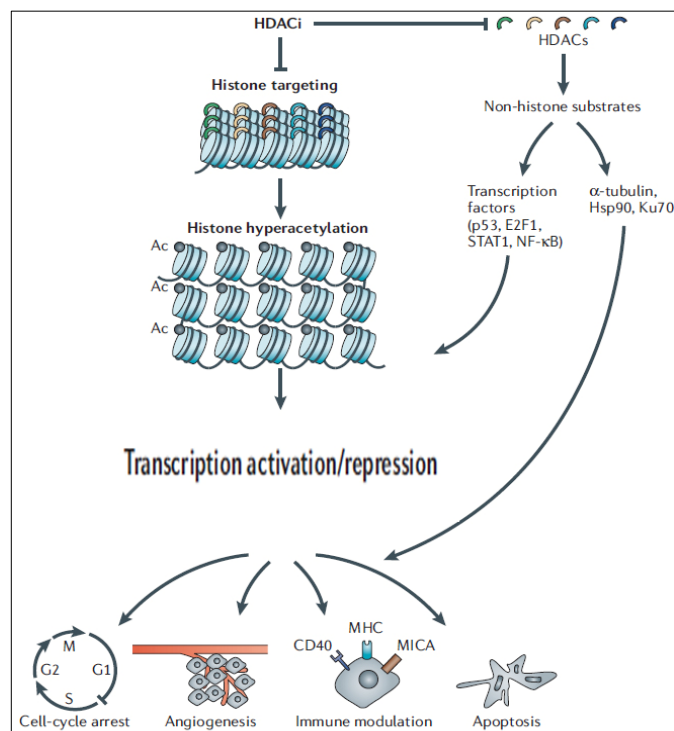
Dal momento che molti chemioterapici esercitano il loro potere antitumorale danneggiando direttamente o indirettamente il DNA, il trattamento combinato con HDACi può sensibilizzare le cellule tumorali con una combinazione di danno al DNA e di rimodellamento cromatinico alterato (Johnstone *et al.*, 2002). Infatti è noto che gli HDACi sinergizzano con le radiazioni γ aumentandone l'effetto citotossico in vari tipi di tumori. I meccanismi con cui gli HDACi sensibilizzano le cellule tumorali al danno al DNA sono diversi. La perdita del compattamento cromatinico in seguito all'iperacetilazione del core istonico può aumentare

l'accessibilità degli agenti genotossici ed aumentarne l'efficacia. Quindi in questo modello gli HDACi potenziano l'effetto indotto da agenti genotossici mimandone la risposta. Questo può essere dovuto per l'effetto indotto dalla produzione di ROS, ad azione genotossica, in seguito al trattamento con HDACi. Inoltre c'è anche l'evidenza che gli HDACi possano sopprimere i meccanismi di riparazione del DNA. Infatti la modulazione delle fosforilazioni dell'istone H2AX nel sito dove viene subito il danno al DNA è importante per consentirne la riparazione. La forma fosforilata di H2AX può essere indotta dal trattamento con HDACi ed i siti di H2AX fosforilati da danno al DNA persistono dopo l'esposizione ad HDACi, ciò comporta una diminuita capacità di riparare le rotture del filamento di DNA (Gaymes *et al.*, 2006). Molti dei componenti della via di riparazione del DNA come ATM, NBS1, PARP1, Ku 70 ed 80 sono regolati dall'acetilazione. Infine gli HDACi possono sensibilizzare le cellule all'apoptosi indotta da sostanze citotossiche diminuendo la soglia di attivazione apoptotica regolando l'espressione di proteine pro ed antiapoptotiche (Frew *et al.*, 2009).

Come già detto gli HDACi possono agire sui meccanismi che regolano la degradazione proteica tramite il coinvolgimento del complesso del proteasoma nel quale opera anche lo chaperon Hsp90. Per questo sono stati effettuati studi che valutano l'efficacia del cotrattamento con HDACi e inibitori di Hsp90 come 17-AAG. L'effetto sinergico di questi due trattamenti porta ad una degradazione più efficiente delle oncoproteine la cui emivita è regolata da questo chaperon come ad esempio BCR-ABL, con una conseguente maggior mortalità delle cellule tumorali. Un altro cotrattamento con promettenti risultati è quello con HDACi insieme con inibitori del proteasoma stesso, come ad esempio Bortezomib. L'inibizione dell'attività proteasomiale porta ad un accumulo di proteine ubiquitilate. Questo determina lo stress del reticolo endoplasmatico e l'apoptosi. Le cellule tumorali cercano di sopravvivere a questo stress "impacchettando" le proteine ubiquitilate in una struttura citoprotettiva perinucleare detta aggresoma. HDAC6 lega le proteine ubiquitilate portandole all'aggresoma. Quindi l'inibizione di questa HDAC non consente la formazione dell'aggresoma portando alla dispersione dei microaggregati tossici nella cellula. Questa proteotossicità favorisce l'attivazione della via dello stress del ER e all'induzione dell'apoptosi (Carew *et al.*, 2008).

I principali effetti collaterali in seguito all'assunzione di HDACi comprendono astenia, nausea, disidratazione, diarrea, e trombocitopenia. In generale questi effetti sono transitori e cessano con la fine del trattamento. I report definitivi con i risultati delle fasi cliniche II e III per le terapie affrontate con il Vorinostat per CTCL non sono stati ancora pubblicati. Gli sviluppi di approcci clinici con HDACi sono ancora materia di studio con diverse sostanze. Gli HDACi costituiscono un gruppo di sostanze antitumorali promettenti, visto che possono

indurre la morte di cellule maligne di una vasta categoria di tumori solidi e non. Il meccanismo con il quale svolgono questa azione è ancora da comprendere pienamente. Ma è chiaro che questi agenti chimici possono causare l'arresto della crescita e la morte di cellule cancerose con diversi meccanismi quali morte per apoptosi, o per autofagia, inibizione della metastatizzazione ed angiogenesi e alterazione della risposta immunitaria. Le cellule normali sono relativamente resistenti alla morte cellulare indotta da HDACi. Le basi di questa resistenza non sono note. È stato speculato che i difetti multipli delle cellule cancerose non permettano di contrastare lo stress indotto da HDACi cosa che riescono, invece, a compiere le cellule normali. Infatti gli HDACi sono ben tollerati in trials clinici. Mentre gli HDACi hanno dimostrato una buona efficacia come antitumorali in studi preclinici, in approcci clinici su una grande varietà di tumori, solo una porzione di pazienti con determinate diagnosi hanno risposto ai trattamenti con HDACi. Da ciò si comprende quanto sia ancora importante lo studio dei meccanismi d'azione e l'identificazione di marcatori che possano predire l'efficacia della risposta (Marks e Wu, 2009)



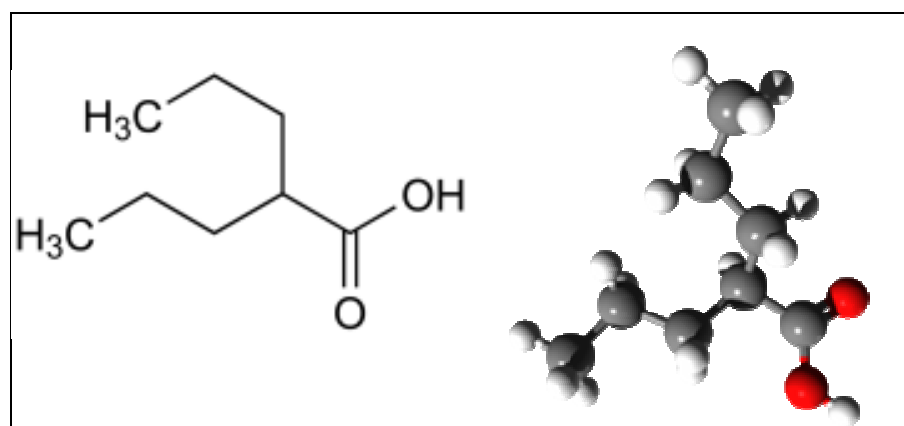
HDACi come anti-tumorali

l'espressione di geni pro-apoptotici. Il primo effetto è stato visto su linee cellulari di tumore al colon trattate con TSA, nelle quali è stato anche osservato un aumento di espressione del gene p21 in conseguenza di un selettivo incremento del grado di acetilazione delle proteine istoniche associate al gene, risultato dovuto all'inibizione delle deacetilasi istoniche da parte del TSA. La proteina p21, a sua volta, blocca il complesso attivato di ciclina D/Cdk 4, 6 necessario per il checkpoint G1, inducendo in tal modo l'arresto del ciclo cellulare in questa fase (Chen *et al.*, 2004). In linee cellulari umane di carcinoma polmonare, il trattamento con il tricostatin A, induce piuttosto l'apoptosi, associata con la regolazione negativa della proteina anti-apoptotica Bcl-2 e l'aumento di espressione della proteina pro-apoptotica Bax. Il trattamento induce l'attivazione proteolitica della caspasi-3 e -9 e una concomitante degradazione della proteina poli (ADP-ribosio)-polimerasi (Choi, 2005). Un altro modello in cui sono stati studiati gli effetti del TSA è quello delle cellule di melanoma, che a differenza della maggior parte dei tumori, spesso mantengono la forma *wild-type* della proteina p53. Nonostante questo, l'apoptosi mediata da questo oncosoppressore risulta bloccata. Il TSA può stabilizzare la forma *wild-type* di p53, tuttavia l'accumulo della proteina causa la simultanea regolazione negativa dell'RNA messaggero di p53, portando successivamente ad una sua diminuzione. L'arresto della crescita, indotto in tutte le linee cellulari analizzate e l'apoptosi innescata nella maggior parte di esse, risultano essere indipendenti da p53. Questo è stato dimostrato tramite esperimenti nei quali è stato utilizzato un dominante negativo di p53 che si è visto non influire sull'efficacia del TSA. Questo risultato suggerisce che gli inibitori delle deacetilasi istoniche possono fornire un approccio terapeutico per il trattamento del melanoma (Peltonen *et al.*, 2005). Per quanto riguarda gli effetti di questa sostanza su cellule di carcinoma pancreatico all'inizio di questo mio lavoro erano da poco stati pubblicati dei dati in particolare del gruppo di ricerca di Scarpa A., in tali studi si era riscontrato che il TSA inibisce la crescita ed induce l'apoptosi di linee cellulari pancreatiche inducendo l'aumento di espressione, sia genica che proteica, di p21, inoltre mediante studi di microarray è stato visto che tale trattamento induce l'espressione genica di *bim* mentre inibisce *bcl-w* e *bcl-x_L* dati confermati anche mediante la misurazione della variazione di quantità di mRNA mediante PCR quantitativa (Donadelli *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2004). Lo stesso gruppo ha successivamente valutato anche l'efficacia di questa sostanza insieme alla gemcitabina riscontrando un aumento dell'effetto antiproliferativo sinergico delle due sostanze (Piacentini *et al.*, 2006). Oltre ai lavori del gruppo di ricerca di Scarpa l'effetto proapoptotico del TSA su questo tipo di linee cellulari era stato valutato anche da uno studio di Morales *et al.*, 2005 in cui si è riscontrato apoptosi caspasi indipendente associata ad un'aumentata espressione di AIF e di Bax, non rilevando un aumento di p21. Successivamente all'inizio del mio studio,

poi, il gruppo di Scarpa A. ha ulteriormente approfondito l'effetto combinato con la gemcitabina, osservando che l'effetto sinergico era correlato alla presenza di Bim, mediante silenziamento genico per *interference* di questo proapoptotico, e che il TSA inibisce l'espressione di UMPH II, una nucleotidasi, associata a farmacoresistenza, che previene la metabolizzazione della forma attiva della gemcitabina, mostrando un potenziale meccanismo con cui questa HDACi sensibilizza al trattamento con questo chemioterapico (Donadelli *et al.*, 2007). In altri lavori è stato confermato l'effetto proapoptotico e antiproliferativo associato all'aumentata espressione di Bax, ma anche la modulazione di alcuni micro RNA tra cui la diminuzione in seguito a trattamento con TSA di miR21 noto avere effetti anti-apototici (Zhang *et al.*, 2008).

1.7 Acido Valproico

L'acido Valproico (VPA) è stato sintetizzato per la prima volta nel 1882 ma solo nel 1963 è stata scoperta la sua efficacia come antiepilettico. Da quel momento il VPA è stato utilizzato come farmaco per il trattamento dell'epilessia, e anche per altri disordini neurologici. Soltanto negli ultimi anni è stata scoperta la sua funzione come inibitore delle deacetilasi istoniche (Gottlicher *et al.*, 2001). L'acido valproico è un piccolo acido grasso ramificato ad 8 atomi di carbonio, la sua struttura molecolare offre molte possibilità di modificazioni chimiche.



Struttura chimica dell'acido Valproico

Gli analoghi del VPA, inclusi i suoi metaboliti, mostrano sovrapposte ma distinte attività che influenzano le convulsioni, i processi neuronali, la proliferazione cellulare e la differenziazione. Studi effettuati negli ultimi anni hanno confermato che il VPA ed i suoi analoghi mostrano un'azione antitumorale. In seguito alla scoperta di questa attività antiproliferativa del VPA, in cellule tumorali, diversi studi hanno mostrato che questo evento

è associato alla differenziazione delle cellule neoplastiche ed è correlato con l'inibizione delle deacetilasi istoniche.

Dal momento che è già utilizzato come farmaco ne sono già noti alcuni effetti sull'uomo. A differenza di altri acidi grassi a catena corta come l'acido butirrico l'emivita nel siero di questo farmaco è piuttosto prolungata, tra le 7-16 h. L'acido valproico è generalmente ben tollerato, alla concentrazione terapeutica nel plasma compresa tra 50 e 100 µg/ml, dai pazienti trattati per problemi neurologici. I maggiori effetti collaterali sono rilevabili a carico del fegato, inoltre è noto avere effetto teratogenico. Come inibitore delle deacetilasi è stato rilevato causare l'iperacetilazione delle code amino-terminali degli istoni H3 ed H4 sia *in vitro* che *in vivo* ed è stata dimostrata la sua capacità di inibire le deacetilasi istoniche dal punto di vista enzimatico (Gottlicher *et al.*, 2001). È stato in seguito dimostrato che l'acido valproico e composti analoghi, inibiscono le deacetilasi istoniche di classe I attraverso due differenti meccanismi: inibiscono l'attività catalitica ed inducono la degradazione proteosomiale, per esempio di HDAC-2 (Kramer *et al.*, 2003). Il VPA a differenza del TSA, non inibisce l'attività delle HDAC-6 e 10. L'effetto antiproliferativo dell'acido valproico è stato mostrato inizialmente da Regan nel 1985, il quale osservò un decremento dell'indice mitotico in cellule murine di neuroblastoma e glioma. Questo effetto era reversibile e non causato da citotossicità (Regan, 1985). L'acido valproico mostra una potente effetto come antitumorale in una vasta gamma di modelli sia *in vivo* che *in vitro*, modulando diversi meccanismi incluso l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi, l'angiogenesi, la metastatizzazione, il differenziamento e la senescenza. Tali effetti sembrano essere tipo cellulare specifici e possono dipendere dal livello di differenziamento e dalle alterazioni genetiche presenti. La maggior parte degli studi preclinici come antitumorali sono stati affrontati finora in neoplasie ematologiche, ma esistono molti studi anche su tumori solidi usati come modello. È stato infatti osservato che l'acido valproico induce apoptosi in molte linee leucemiche umane (di derivazione B, T e mieloide) innescando il rilascio di Citocromo c dai mitocondri e l'attivazione delle caspasi-3, -8 e -9. Quando la linea cellulare MV4-11 è stata pre-trattata con un inibitore delle caspasi, l'effetto pro-apoptotico dell'acido valproico veniva inibito nel nucleo, ma non sulla superficie cellulare (Kawagoe *et al.*, 2002). Questi risultati lasciano presupporre che l'acido valproico può attivare due differenti vie di segnalazione apoptotica: una caspasi-dipendente, e l'altra caspasi-indipendente. L'effetto antiproliferativo del VPA è stato inoltre esaminato su linee cellulari di carcinoma epatico e su epatociti umani primari. A dispetto del fatto che i carcinomi epatocellulari sono generalmente molto resistenti alla chemioterapia, il VPA inibisce la proliferazione nelle linee di carcinoma ma non negli epatociti primari (Armeanu *et al.*, 2005). L'inibizione della proliferazione è stata

associata ad aumentata espressione di p21 in cellule tumorali di glioma, della tiroide, melanoma, carcinoma ovarico, e medullo blastoma. L'effetto pro-apoptotico è stato osservato in molti modelli e associato a diversi componenti delle vie apoptotiche. In particolare sono stati rilevati aumento di fattori pro-apototici come Bik, in linee cellulari di tumore al seno, e di Bax in cellule della tiroide. Diminuzione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 e Bcl-x_L in cellule tumorali della prostata e della tiroide. Questi studi sono stati affrontati utilizzando concentrazioni che vanno da 0,2 mM fino a 10 mM. Per quanto riguarda linee cellulari di carcinoma pancreatico all'inizio del mio lavoro in letteratura non erano presenti lavori che valutavano l'effetto del VPA su questo modello cellulare. Tuttora in letteratura è presente un solo lavoro che valuta la capacità del VPA di influenzare l'adesione e la proliferazione in cellule di adenocarcinoma pancreatico (Jones *et al.*, 2008).

2. Apoptosi

2.1 Aspetti morfologici e biologici dell'apoptosi

Nel 1965 John Kerr descrisse un nuovo tipo di morte con caratteristiche diverse da quelle della necrosi. Lo stesso Kerr insieme a Searle nel 1972 propose il termine apoptosi per indicare questo tipo di morte cellulare, fisiologica non accidentale caratterizzata da stadi controllati (Kerr *et al.*, 1972). L'apoptosi riveste l'importante ruolo biologico di regolazione nella maggior parte dei processi fisiologici coinvolgendo il differenziamento, l'omeostasi e la rimozione di cellule anormali in tutti i tessuti. Nell'uomo i processi di morte cellulare programmata sono basilari nel normale sviluppo embrionale (Meier *et al.*, 2000) oltre che nella maturazione del sistema nervoso centrale (Naruse, 1995), nell'atrofia tissutale endocrino-dipendente (Kyprianou *et al.*, 1988) e nel turnover cellulare di un tessuto (Wyllie *et al.*, 1980; Lynch *et al.*, 1986). Al livello del sistema immunitario l'apoptosi riveste un ruolo importante di regolazione: la selezione timica, l'eliminazione di cellule infettate da virus o cancerose e lo spegnimento delle risposte immunitarie (Cohen *et al.*, 1992), sono tra gli eventi in cui è necessaria una morte cellulare programmata funzionante.

A differenza della cellula necrotica, la cellula apoptotica perde rapidamente volume condensandosi, si stacca dalle cellule vicine e perde le specializzazioni di membrana; inoltre, sulla porzione esterna della membrana, espone componenti normalmente poco o affatto espressi, come la fosfatidil serina, che vengono riconosciuti da cellule vicine in grado di operare la fagocitosi della cellula morente evitando l'accumulo di detriti cellulari nel tessuto.

Nelle fasi precoci del processo apoptotico, l'organizzazione cellulare interna è mantenuta, ma a livello nucleare si osserva la disgregazione del nucleolo, il taglio della lamina, e la condensazione e il taglio della cromatina in frammenti di 180-200 coppie di basi, o loro multipli, lunghezza che corrisponde a quella dei tratti di DNA inter-nucleosomale. Granuli compatti di cromatina degradata si spostano poi verso la periferia del nucleo, formando una caratteristica figura a mezzaluna. Frammenti discreti di materiale nucleare raggiungono successivamente la membrana plasmatica, e vengono circondati da evaginazioni della membrana stessa conferendo alla cellula un caratteristico aspetto a bolle ("blebbing"). Queste estroflessioni costituite da materiale nucleare e citoplasma, si staccano dalla cellula morente e formano i corpi apoptotici che sono fagocitati dalle cellule vicine. Poiché il contenuto citoplasmatico non si disperde nel tessuto, non ha origine alcun processo flogistico secondario (Golstein *et al.*, 1991; Majino *et al.*, 1995).

I meccanismi genetici e molecolari dell'apoptosi furono identificati per la prima volta nel nematode *Caenorabditis elegans*. Durante lo sviluppo dell'animale, infatti alcuni geni (chiamati ced, da *cell death*) si attivano determinando la morte di un numero determinato di cellule. Alcuni dei meccanismi ed i geni che li governano sono ampiamente conservati lungo la scala evolutiva dal verme all'uomo, e sebbene nell'uomo la situazione sia molto più complicata, è stato comunque possibile identificare gli analoghi strutturali e funzionali delle proteine ced che nel verme regolano l'apoptosi, dimostrando così l'importanza fondamentale di queste molecole nel corso dell'evoluzione.

Sulla base degli studi condotti nelle varie specie si è convenuto suddividere il processo apoptotico in tre fasi:

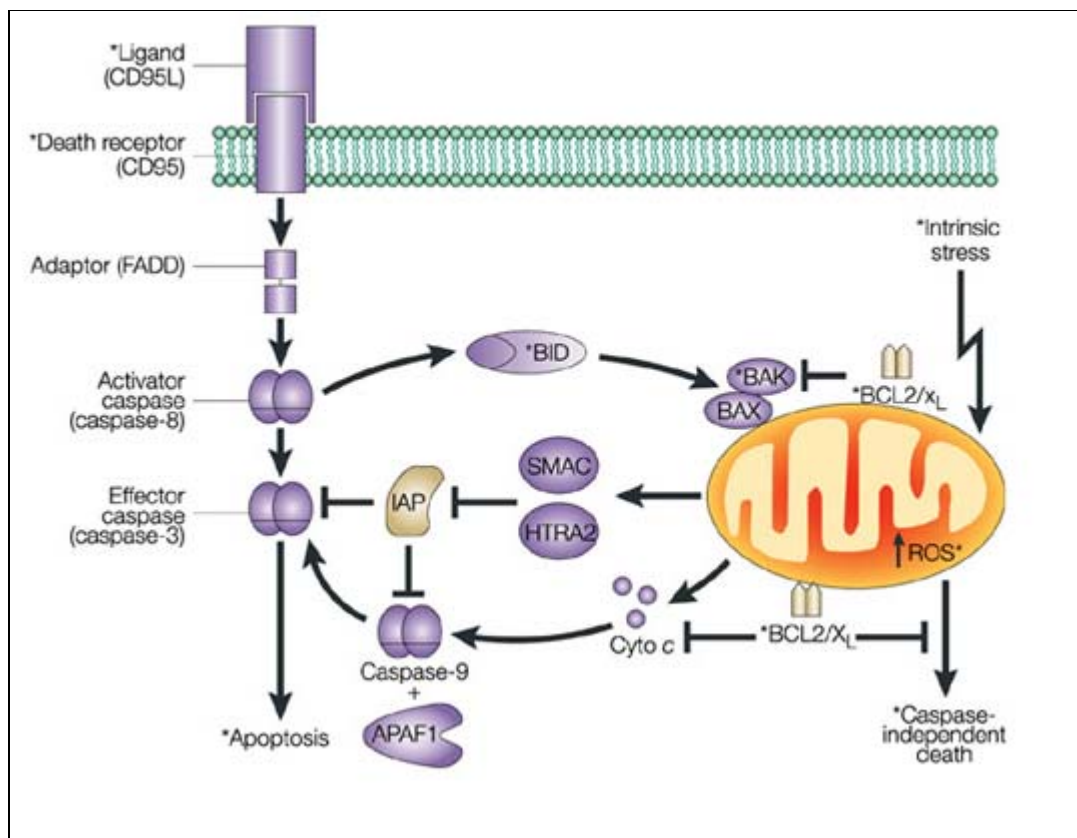
- inizio
- integrazione/decisione
- esecuzione/degradazione

La fase di inizio è altamente eterogenea e dipende dalla natura del segnale di induzione di morte che può attivare due diverse vie biochimiche: la via estrinseca e quella intrinseca.

La via di attivazione estrinseca, è innescata dal legame di specifici ligandi ai recettori di morte presenti sulla superficie cellulare, mentre la via intrinseca da diversi segnali quali danni al DNA, stress del reticolo endoplasmatico, accumulo di specie reattive dell'ossigeno, con un ruolo centrale dei mitocondri.

La seconda fase di integrazione/decisione coinvolge l'attivazione quasi simultanea delle caspasi e degli effettori di morte del mitocondrio. Questa fase è caratterizzata da una serie di reazioni enzimatiche a cascata che portano irreversibilmente alla morte cellulare.

La terza fase di esecuzione/degradazione è comune ai diversi tipi di apoptosi indipendentemente dagli stimoli iniziali (Kroemer *et al.*, 2007)



Le due vie di attivazione dell'apoptosi e loro interconnessione. (Johnstone, 2002)

2.2 Via estrinseca

L'apoptosi per via estrinseca è mediata dall'attivazione di recettori espressi sulla superficie cellulare, detti recettori di morte, che a seguito del legame con il proprio ligando, trasmettono il segnale apoptotico e l'attivazione del programma di morte all'interno della cellula. Tali recettori appartengono alla superfamiglia del TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), di cui fanno parte Fas/Apo-1/CD95, DR4 e DR5 (recettori di TRAIL, TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), TNF-R1 e TNF-R2, NGFR, GTR, CD27. I recettori di morte sono proteine transmembrana di tipo I, che presentano una sequenza conservata di cisteine ripetute nel dominio extracellulare ed una regione di omologia, chiamata dominio DD (Death Domain) nella parte citoplasmatica necessaria per trasferire il segnale dall'ambiente extra-cellulare all'interno della cellula (Budihardjo *et al.*, 1999). I corrispettivi ligandi di tali recettori si sono co-evoluti come una famiglia di ligandi di morte denominata famiglia TNF. Questi ligandi

sono proteine transmembrana di tipo II, dalle quali possono essere generate anche delle forme solubili tramite l'attività di metallo-proteasi (Krammer, 1999).

2.2.1 Segnalazione attraverso CD95

La via più comune di attivazione dei recettori di morte è mediata dal recettore Fas, classificato anche come CD95, che gioca un ruolo importante in tre principali tipi di processi apoptotici: delezione marginale di cellule T attivate al termine di una risposta immunitaria, uccisione di bersagli quali cellule infettate da virus o cellule tumorali attraverso cellule T citotossiche e cellule natural killer e soppressione di cellule infiammatorie in siti immunoprivilegiati quali l'occhio (Nagata, 1997). I recettori CD95 sono espressi sulla superficie esterna della membrana citoplasmatica come omotrimeri preassociati. Queste interazioni sono mediate dal primo dei domini ricchi in cisteine nella porzione N-terminale. Questa associazione è stata descritta attraverso il legame di proteine generate *in vitro*, in cellule transfettate con CD95 e mediante l'utilizzo di reagenti chimici ibridanti che ha consentito la visualizzazione degli omotrimeri associati presenti sulla superficie esterna delle cellule (Papoff *et al.*, 1999; Siegel *et al.*, 2000). Fu in seguito dimostrato da Siegel *et al.* (2000) che una delezione o mutazione, in alcune regioni del primo dominio ricco in cisteine, causava l'annullamento di queste interazioni. Nella sua regione citoplasmatica, CD95 possiede un dominio di interazione proteica, definito "dominio di morte" (DD), caratteristico di tutti i recettori appartenenti alla sottofamiglia dei TNF receptor (Peter *et al.*, 1999). Il legame del ligando a CD95 ne causa un cambiamento conformazionale che lo rende competente a formare un complesso di segnalazione inducente morte (DISC). La formazione del DISC inizia con il reclutamento della proteina adattatrice FADD, la quale si lega al CD95 attraverso un'interazione omotipica tra il proprio dominio di morte e quello del recettore. FADD contiene anche un dominio di interazione proteina-proteina nella regione N-terminale definito dominio effettore di morte (DED), necessario per il reclutamento di caspasi contenenti i DED, all'interno del DISC (Peter e Krammer, 2003). Una di queste, la caspasi-8 iniziatrice risiede principalmente nel citoplasma come zimogeno inattivo, e si ritiene che il reclutamento di un'elevata concentrazione di questa pro-caspasi a livello del DISC, attraverso il legame con FADD, sia necessaria alla sua auto-proteolisi e conseguente attivazione (Salvesen e Dixit, 1999). La caspasi-8 attivata è in grado di processare, a sua volta, ulteriori caspasi effettrici (caspasi-3, -6, -7). La reazione a catena può culminare con l'attivazione diretta della caspasi-3, vera effettrice della via di morte poiché capace di inattivare e processare gli enzimi indispensabili

alla vitalità cellulare (Apoptosi recettore-mediata di Tipo I), oppure nel processamento della proteina Bid, appartenente alla famiglia di Bcl-2, che integrandosi nel mitocondrio permette il rilascio dei fattori pro-apoptotici in esso contenuti (Apoptosi recettore-mediata di Tipo II) (Scaffidi *et al.*, 1998). L'attività della caspasi-8 è inibita da una molecola identificata inizialmente in γ -herpes virus ed in molluscipoxvirus e definita proteina inibitrice di FLICE (pro-caspasi-8) o v-FLIP, che possiede due domini effettori di morte (DED). Essa è richiamata attraverso FADD, al complesso di segnalazione di CD95 e previene il reclutamento e l'attivazione della caspasi-8, inibendo così il processo apoptotico. Sono stati identificati due omologhi umani di v-FLIP: una forma lunga (c-FLIP_L) di 55 kDa, strutturalmente omologa alla caspasi-8, caratterizzata da due domini effettori di morte tramite i quali si lega a FADD ed un dominio simile a quello caspasico, ma inattivo; ed una forma corta (c-FLIP_S) derivante da uno splicing alternativo di FLIP, possiede solo i due DED e ha una minore capacità anti-apoptotica (Kataoka *et al.*, 2000).

2.2.2 Segnalazione attraverso TNF-R1

Il fattore di necrosi tumorale (TNF) è un membro della famiglia dei ligandi TNF ed ha un ruolo chiave nella regolazione dei processi infiammatori, essendo prodotto principalmente da macrofagi attivati e cellule T in risposta ad infezioni. Esercita la sua funzione tramite l'interazione con il TNF-receptor 1 (TNF-R1), che contiene un dominio di morte e, allo stesso modo di CD95L, può esistere in forma solubile o legato alla membrana plasmatica; in questo caso la metalloproteasi TACE (TNF alpha converting enzyme) gioca un ruolo centrale nel processamento del TNF di membrana (Black *et al.*, 1997). Il TNF solubile, ugualmente agli altri membri della famiglia, possiede una tipica struttura a foglietto- β e forma un omotrimerico saldamente impacchettato (Jones *et al.*, 1989). Sono state identificate diverse proteine che interagiscono direttamente o indirettamente con il dominio citoplasmatico di questo recettore, definendo come sia interconnesso con la via apoptotica e la cascata di segnalazione che porta all'attivazione di NF- κ B e JNK. Diversi dati indicano che anche il TNF-R1 esiste in complessi pre-formati in assenza di ligando; questa associazione avviene grazie a un dominio ricco in cisteina sulla superficie esterna del recettore che contiene un motivo di assemblaggio pre-ligando (PLAD) (Chan *et al.*, 2000). Il legame del ligando, converte il recettore preformato, in cui i monomeri sono organizzati antiparallelamente, in un complesso competente alla segnalazione con i monomeri orientati parallelamente. Il complesso attivato,

possiede la capacità di reclutare proteine citoplasmatiche contenenti un dominio di morte, attraverso un'interazione omofila con il DD del recettore. La segnalazione spontanea del TNF-R1 guidata dalla tendenza intrinseca della aggregazione dei propri DD, sembra essere attivamente prevenuta dal legame di proteine contenenti un dominio silenziatore di morte (SODD) (Jiang *et al.*, 1999). Dopo pochi minuti dalla stimolazione del recettore, SODD si dissocia dal TNF-R1 e così, la proteina adattatrice TRADD può legarsi al recettore ed agire da “piattaforma” con il compito di legare diverse molecole segnale al recettore attivato. Tra queste, TRAF2 (fattore associato al recettore TNF) e RIP (proteina interagente col recettore), stimolano la via che porta all'attivazione di NF- κ B e di JNK/AP-1, mentre FADD media l'attivazione del processo apoptotico legando e attivando la caspasi-8 (Hsu *et al.*, 1996). Quindi, è chiaro che questo recettore svolge ruoli contrastanti, avendo un'azione sia apoptotica che proliferativa, ed i diversi passaggi di segnalazione sono interconnessi in una rete di comunicazione, all'interno della quale molecole segnale ed effettori regolano il risultato complessivo della risposta cellulare via TNF.

2.3 Via apoptotica intrinseca

2.3.1 Ruolo dei mitocondri

Nell'apoptosi che procede per la via intrinseca, anche nota come via mitocondriale, il segnale di attivazione può essere sia interno che esterno.

Danni al DNA, stress del Reticolo Endoplasmatico, e dei lisosomi, accumulo di calcio, di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, attivazione di oncogeni, deprivazione dei fattori di crescita sono tutti esempi di stimoli che inducono questa via apoptotica nella quale i mitocondri svolgono un ruolo cruciale (Kroemer e Reed 2000, Galluzzi *et al.*, 2008).

I mitocondri sono organelli con due compartimenti ben definiti, la matrice, circondata dalla membrana mitocondriale interna, e lo spazio intermembrana, circondato dalla membrana mitocondriale esterna. La membrana mitocondriale interna contiene varie molecole quali ATP sintetasi, gli enzimi che costituiscono la catena di trasporto degli elettroni e il traslocatore dell'adenin nucleotide (ANT). In condizioni fisiologiche queste molecole partecipano alla creazione di un gradiente elettrochimico attraverso la membrana (il potenziale di membrana) pompando elettroni dalla matrice allo spazio intermembrana.

Lo spazio intermembrana contiene il Citocromo c, alcune pro-caspasi, l'Adenilato-chinasi 2, il Fattore inducente l'apoptosi (AIF) e l'Endonucleasi G (EndoG). La membrana esterna invece contiene molti canali anionici voltaggio dipendenti (VDAC). L'evento critico che

porta all'attivazione delle caspasi o comunque all'esecuzione della via apoptotica intrinseca, è innescato dall'aumento della permeabilità della membrana mitocondriale. Questo evento è contraddistinto da diverse caratteristiche:

- il rilascio del Citocromo c e di attivatori secondari delle caspasi come Smac/Diablo ed Omi/HtrA2 attraverso la membrana mitocondriale esterna che determinano l'attivazione delle caspasi;
- il rilascio di effettori caspasi indipendenti come AIF ed EndoG;
- l'alterazione del potenziale di membrana e la distruzione dell'equilibrio bioenergetico con l'arresto della fosforilazione ossidativa e l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno.

La permeabilizzazione della membrana mitocondriale è regolata da due diversi meccanismi, parzialmente sovrapponibili. Da un lato quello che coinvolge il canale multidominio formato dai membri pro-apoptotici della famiglia di Bcl-2 che può selettivamente promuovere la permeabilizzazione della membrana esterna (MOMP). Dall'altro lato, il meccanismo innescato da induttori di morte cellulare come l'accumulo di Ca^{2+} e stress ossidativo che innescano la permeabilizzazione di membrana mitocondriale interna, favorendo così l'apertura del complesso poro di transizione di permeabilità (PTPC). Questo processo è noto come transizione della permeabilità mitocondriale (MPT). Le proteine anti-apoptotiche della famiglia di Bcl-2 (Bcl-2 e Bcl-x_L) sono attribuite inibire sia MOMP che MPT. Allo stesso modo i pro-apoptotici come Bax mediano MOMP ma legano il PTPC come ANT e VDAC per favorire la MPT.

La spiegazione del meccanismo con cui si compie il MOMP è basata su alcune teorie dedotte dal fatto che membri della famiglia di Bcl-2 sono in grado di formare delle strutture canale *de novo* sui foglietti fosfolipidici: l'ipotesi è sostenuta dal confronto tra la struttura di alcune proteine della famiglia di Bcl-2 e quella della tossina della difterite, in grado di formare pori nelle membrane lipidiche. In particolare, Bcl-x_L possiede una struttura molecolare molto simile a quella della tossina batterica (Minn *et al.*, 1997). A sostegno di questa teoria, la forma troncata al C-terminale di Bax mostra la capacità di creare dei pori in condizioni di pH neutro (Antonsson *et al.*, 1997). Inoltre, sembra che la proteina ricombinante di Bax sia in grado di associarsi in una struttura canale di quattro molecole, sufficiente al passaggio del Citocromo c, senza l'ausilio di macrocomplessi preformati (Saito *et al.*, 2000). Un'altra ipotesi considera la capacità delle proteine della famiglia di Bcl-2 di alterare le membrane, per produrre dei pori lipidici. Si è visto ad esempio che Bax è in grado di formare pori lipidici che causano la rottura della membrana fosfolipidica e può essere ostacolato in questa sua attività da Bclx_L.

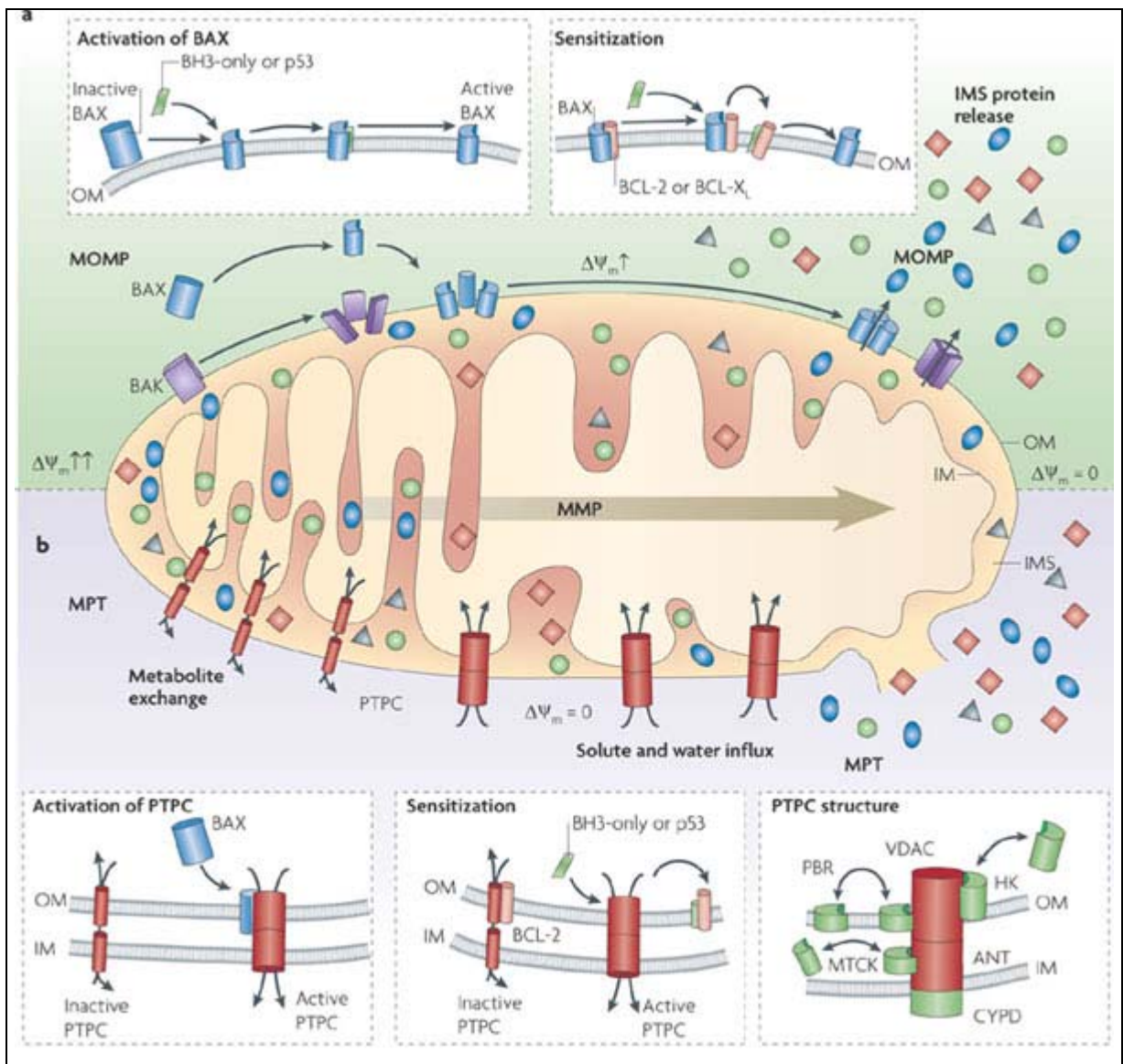
Bid, inoltre, interagisce attraverso il suo dominio BH3, con Bak e Bax, inducendo nel primo l'oligomerizzazione e nel secondo anche l'esposizione dell'epitopo all'N-terminale, in modo da renderlo adatto all'inserimento ed alla permeabilizzazione del mitocondrio (Sharpe *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda l'MPT sono stati riportati diversi studi che rilevano l'interazione di Bcl-x_L, Bax e Bak con il canale anionico voltaggio-dipendente (VDAC), una proteina presente abbondantemente sulla membrana mitocondriale esterna. Essa è nota anche come componente del PTPC (*permeability transition pore complex*), insieme ad ANT e ciclofillina D. Il rilascio di molecole coinvolte nell'apoptosi dal compartimento mitocondriale è la conseguenza dell'apertura del PTPC. Questo evento può essere determinato dal rilascio del Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico o dall'interazione delle proteine della famiglia di Bcl-2 con il canale stesso. Il PTPC è un canale proteico voltaggio-dipendente, posto sulla membrana mitocondriale interna, non selettivo per alcun catione, eccetto che per il Ca²⁺. La sua apertura determina il passaggio di soluti con massa molecolare inferiore a 1500 Da, che causa una transizione della permeabilità (PT) della membrana mitocondriale interna. La fuoriuscita dello ione Ca²⁺ dal reticolo endoplasmatico è indotta da alcuni stimoli apoptotici, come l'acido arachidonico ed i radicali dell'ossigeno. Se i sistemi di efflusso del Na⁺ dipendenti o indipendenti sono saturati, la concentrazione citoplasmatica di Ca²⁺ aumenta e lo ione è spinto ad entrare nel mitocondrio attraverso l'MTP (Bernardi *et al.*, 1999): questo evento induce il rigonfiamento della matrice e il conseguente calo del potenziale della membrana mitocondriale. L'entrata di soluti ed acqua nella matrice mitocondriale inducono un aumento della pressione interna al mitocondrio e quindi la rottura della membrana mitocondriale esterna. Attraverso il doppio strato fosfolipidico così disgregato, le proteine contenute nel mitocondrio sono libere di diffondere nel citoplasma: in particolare, le riserve di Citocromo c sono fortemente intaccate. La respirazione mitocondriale procede fintanto che il Citocromo c ha una concentrazione sufficiente, dopo di che la respirazione non è più funzionale e la concentrazione intracellulare di ATP cala drasticamente: di conseguenza, il differenziale di potenziale mitocondriale non è più mantenuto, ed il mitocondrio perde il controllo sugli scambi attraverso le membrane (Kuwana e Newmeyer, 2003).

Tutti i meccanismi ipotizzati, comunque, inducono a pensare che Bax e Bak con la loro oligomerizzazione possiedono un ruolo fondamentale nella permeabilizzazione di membrana mitocondriale (Kroemer *et al.*, 2007).

Questo evento, come detto, porta al rilascio del Citocromo c che promuove la formazione dell'apoptosoma un complesso in grado di attivare le caspasi effettrici.

Questo complesso si assembla mediante l'interazione di 7 molecole di APAF1, l'omologo umano della proteina CED-4 di *C.elegans*, che arrangiate simmetricamente formano una struttura a forma circolare. L'interazione delle molecole di APAF1 con il Citocromo c portano ad un cambiamento conformazionale che porta all'idrolisi di una molecola di ATP in ADP, ciò permette il legame di una nuova molecola di ATP, a questo punto viene reclutata la procaspasi-9 tramite i domini CARD (*Caspase Recruitment Domain*) comuni ad entrambe le proteine (Boatright e Salvesen 2003; Shi, 2006). La caspasi-9 così attivata rimarrà associata in questo complesso, che prende il nome di Apoptosoma, con le molecole di APAF1. Tale conformazione presenta una maggior efficienza enzimatica della caspasi-9 isolata. Questa caspasi quindi è in grado di processare gli effettori pro-caspasi-3, -6, -7 che taglieranno ulteriori proteine substrato con l'effetto di amplificare il segnale di morte e avviare i cambiamenti morfologici e biochimici caratteristici della cellula apoptotica (Garrido *et al.*, 2006).



Permeabilizzazione della membrana mitocondriale mediante MOMP e MTP.
(Galluzzi et al., 2009)

2.3.2 Famiglia proteica di Bcl-2

Qualsiasi sia il meccanismo che determina l'aumento della permeabilità mitocondriale è certo che il ruolo centrale nel modulare questo evento è svolto dalla famiglia proteica di Bcl2. I membri di questa classe di proteine mostrano una o più regioni di omologia definite BH (Bcl-2 Homology regions) che mediano l'interazione tra proteine per formare dimeri od oligomeri. Gli antagonisti dell'apoptosi, come Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1 e Mcl-1 possiedono quattro domini BH, mentre i promotori dell'apoptosi, possono essere divisi in due gruppi: le proteine multidominio, che presentano domini BH1, BH2 e BH3 (Bax, Bak e Bok) ed un gruppo di proteine dette "BH3-only", che possiede solo il dominio BH3 (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Puma, Noxa, Bcl-x_S).

In seguito agli stimoli di stress e danno cellulare le BH3-only, che svolgono la funzione di sensore, portano all'attivazione dei pro-apoptotici adattatori Bax (Bcl2-Associated X) e Bak (Bcl2 Antagonist/Killer) sulla membrana mitocondriale. Bax e Bak omo-oligomerizzano e partecipano alla transizione di permeabilità della membrana mitocondriale esterna.

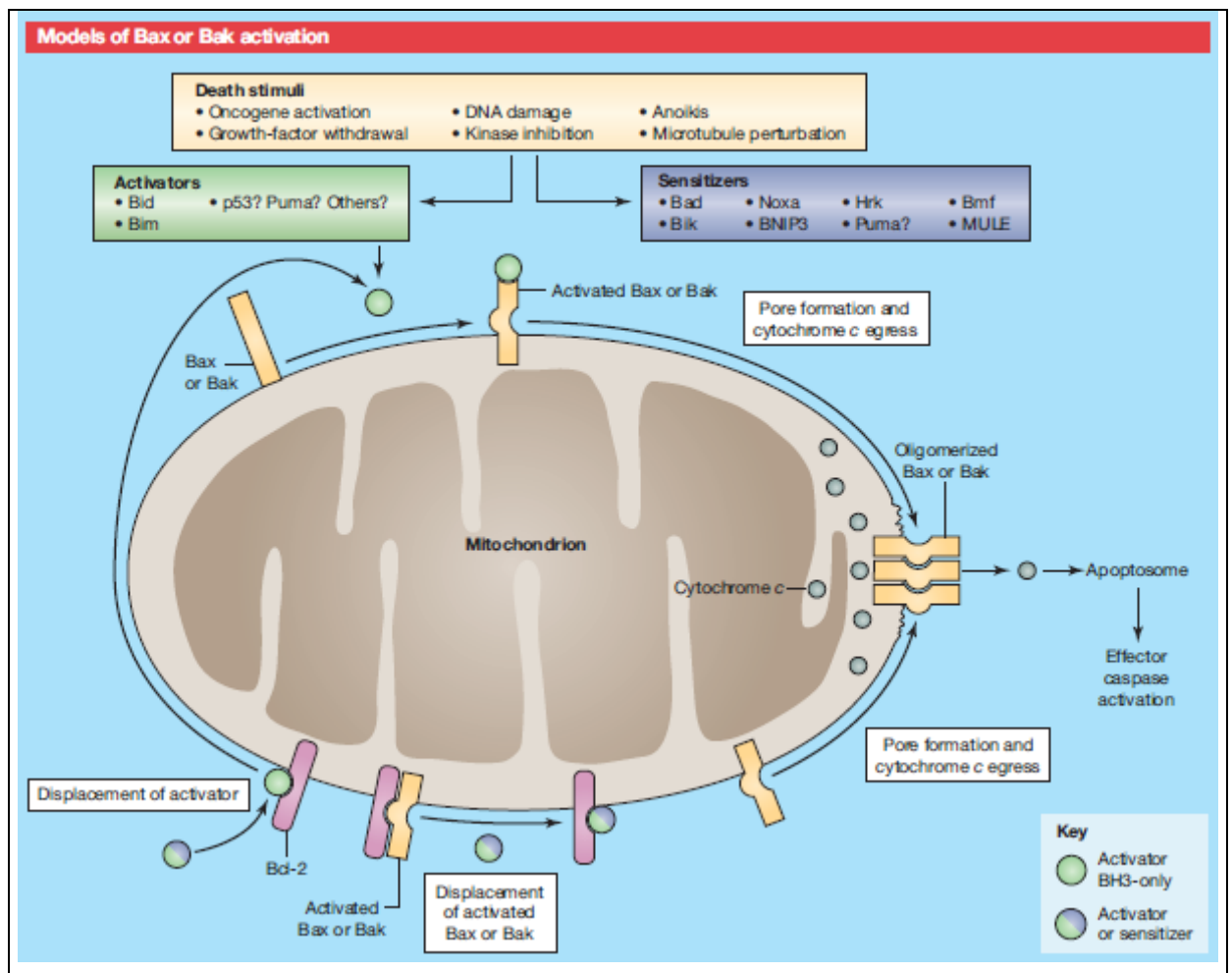
Nonostante le differenze funzionali, tutte queste proteine hanno una struttura terziaria simile, caratterizzata da 7 od 8 α eliche, due delle quali sono idrofobiche e quindi possono essere inserite in un doppio strato fosfolipidico (Petros *et al.*, 2001). Il dominio transmembrana posto all'estremità C-terminale è comune a molti membri della famiglia Bcl-2, ed è responsabile dell'inserzione nelle membrane di vari organelli cellulari (Kaufmann *et al.*, 2003). Studi di mutagenesi, indicano che i domini BH1, BH2, e BH3 influenzano fortemente l'omo- ed eterodimerizzazione di queste proteine. I membri pro-apoptotici come Bax che contengono le regioni BH1 e BH2 possono promuovere l'apoptosi attraverso le loro interazioni con le membrane mitocondriali. La regione BH3 invece è nota mediare le interazioni delle proteine pro-apoptotiche con quelle multidominio (Petros *et al.*, 2004); infatti le proteine BH3-only hanno il compito di monitorare la salute cellulare e, quando vengono attivate da segnali citotossici, possono ingaggiare le proteine anti-apoptotiche attraverso l'inserimento del loro dominio BH3, un' α -elica anfipatica, nella tasca idrofobica che si trova sulla superficie di quest'ultime, inattivando così la loro funzione (Zong *et al.*, 2001). Studi sistematici di legame delle proteine BH3-only con quelle anti-apoptotiche hanno rilevato che Bim, Puma e tBid legano tutti i membri anti-apoptotici, e quindi risultano induttori di apoptosi più potenti rispetto alle restanti proteine BH3-only che esibiscono una marcata selettività. Infatti, Bad e Bmf legano solo Bcl-2, Bcl-x_L e Bcl-w, mentre Noxa lega soltanto Mcl-1 e A1 (Chen *et al.*, 2005); di conseguenza se in una cellula sono espresse tutte le proteine anti-apoptotiche, l'attivazione di Bim o Puma dovrebbe essere sufficiente ad innescare l'apoptosi, mentre Bad per conto suo dovrebbe richiedere un ulteriore stimolo, che potrebbe essere fornito da Noxa. I membri della famiglia Bcl-2, possono trovarsi in forma solubile nel citosol, oppure inseriti nelle membrane intracellulari. Ad esempio, Bcl-2 sembra essere del tutto localizzata nelle membrane dell'ER e mitocondriale, mentre Bcl-x_L e Bcl-w sono distribuiti tra il citoplasma e la membrana mitocondriale. Bak è completamente espressa come proteina inserita nel foglietto mitocondriale esterno, mentre Bax nella maggior parte delle cellule si trova normalmente nel citosol ed in minor misura sul mitocondrio. Bax, come monomero, è trattenuto nel citosol da Ku 70, si inserisce nella membrana mitocondriale solo se stimolato da un segnale di morte che ne causa il cambiamento conformazionale, ciò porta all'omo-oligomerizzazione ed all'inserzione della sua coda C-terminale idrofobica all'interno del doppio strato lipidico (Kroemer *et al.*, 2007). Il ruolo delle BH3-only nell'attivazione di

Bax/Bak è ancora da comprendere. È noto che svolgono la loro funzione a monte di Bax/Bak in quanto mutanti mancanti di questi due proapoptotici non possono essere indotti in apoptosi tramite nessuna delle BH3-only (Zong et al Genes dev 2001). Sulla base delle conoscenze finora apprese sono stati proposti due modelli:

Il modello di *Attivazione Diretta* secondo il quale esiste un sottogruppo delle BH3-only, definito degli *attivatori*, che legherebbero direttamente Bax e Bak promuovendone l'attivazione. Bim, tBid e Puma sono le proteine che sembrano avere tale ruolo. I rimanenti componenti delle BH3-only rappresentano i *sensibilizzatori* che legano i membri antiapoptotici facilitando quindi l'interazione degli *attivatori* con Bax e Bak. Secondo tale modello quindi l'assenza degli attivatori dovrebbe bloccare l'apoptosi, invece il knockout di Bid e Bim insieme porta solo a difetti relativamente minori del processo apoptotico, ciò può essere spiegato con l'esistenza di altri attivatori, come appunto Puma, p53 ed il calore, e probabilmente anche altri non noti. Inoltre non esistono evidenze dell'interazione tra Bim_{EL} e Bax o Bak.

L'altro modello è quello di *Attivazione Indiretta* che invece considera per le proteine BH3-only la sola funzionalità di legare le proteine antiapoptotiche, liberando quindi Bax e Bak da questa inibizione. In questo modello Bim, tBid e Puma hanno una maggior efficacia perchè in grado di legare tutti gli anti-apoptotici. Secondo questo modello, quindi, la cellula per poter sopravvivere dovrebbe avere Bax e Bak sempre legati ad un anti-apoptotico come Bcl-2 ed Mcl-1. Esperimenti di co-immunoprecipitazione mostrano che solo una piccola parte di Bak della cellula risulta subire tale interazione, ciò potrebbe essere dovuto ad artefatti dovuti alla facile alterazione dello stato conformazionale di Bax e Bak (Willis e Adams, 2005).

È stato ipotizzato un modello unificante che mette in evidenza una caratteristica, in realtà accettata da tempo, l'esistenza di diversi stati attivati di Bax e Bak, che devono essere sequestrati dagli antiapoptotici per mantenere la cellula in vita. Essi acquistano lo stato attivato sia tramite l'interazione con le proteine attivatrici, proprietà attribuita solo ad alcuni membri delle BH3-only, per attivazione spontanea, o ancora tramite altri meccanismi ignoti. Gli antiapoptotici inibiscono la morte sequestrando gli attivatori e/o Bax e Bak attivi. In questo contesto le BH3-only inducono la morte spiazzando gli attivatori dalle proteine antiapoptotiche permettendo l'avanzamento del segnale di morte (Brunelle e Letai, 2009).



Modelli di attivazione di Bax e Bak. (Brunelle e Letai, 2009)

2.3.3 Proteine BH3 Only

È chiaro che le BH3-only posseggano la funzione di sensori del danno cellulare. Le proteine BH3-only sono attivate ad indurre l'apoptosi in seguito a diversi stimoli come deprivazione di citochine, perdita di adesione alla matrice extracellulare, danni al DNA ed attivazione di oncogeni.

Nel 1995 è stato identificato, mediante la caratterizzazione di una proteina proapoptotica fino ad allora sconosciuta Bik (Bcl-2 Interacting killer), un dominio conservato presente in tutti i membri della famiglia di Bcl-2, questo lavoro ha rilevato la funzione del dominio BH3 e delle altre proteine contenenti soltanto questo dominio BH3, le BH3-only protein. Questi studi hanno evidenziato che l'attività che porta alla morte cellulare di Bak e Bik dipendeva da questo dominio, che questo è necessario e sufficiente per l'etero-dimerizzazione con Bcl-x_L e che il dominio BH3 di Bik è coinvolto nella sua interazione con le proteine antiapoptotiche cellulari (Bcl-2/Bcl-x_L) e virali (E1B-19K e EBVBHRF1). L'importanza fisiologica delle BH3-only come effettori di morte è stata dimostrata in modelli animali da studi genetici su *C. elegans*. In questi studi la BH3-only EGL-1 è stata identificata ed è stato dimostrato essere

coinvolta come segnale di attivazione di morte cellulare programmata (Gumienny *et al.*, 1999; Gartner *et al.*, 2000). In seguito mediante esperimenti con topi knock-out è stato possibile identificare la funzione di Bim nello sviluppo murino e nella morte indotta da stimoli esterni ed individuare un ruolo delle BH3-only nei vertebrati. Dopo la scoperta di Bik la lista delle BH3 è cresciuta sostanzialmente. I membri più studiati sono Bid, Hrk e Bim sono stati scoperti in studi di clonaggio come interagenti con gli antiapoptotici della famiglia di Bcl-2. Puma, Noxa e Bmf sono stati identificati sulla base di variazioni di espressione di mRNA in cellule esposte a stress apoptotici oltre che ad esperimenti di clonaggio. Anche l'effettore della morte per autofagia Beclin-1 è stato identificato come una BH3. Alcune varianti di splicing di proteine Bcl-2 multidominio sono state aggiunte in questa categoria come Mcl-1_s e Bcl-Gs. Esistono diverse isoforme di splicing delle stesse BH3 che possono mantenere intatto il dominio BH3 come quelle di Bim o che lo perdono come quelle di Bmf o Noxa. Ciascuna di esse sembra essere indotta da uno stimolo diverso a seconda del contesto cellulare e tissutale (Lomonosova *et al.*, 2009) per questo verranno di seguito descritte in dettaglio anche nel loro ruolo nella tumorigenesi.

Puma:

Il suo nome deriva dalla contrazione di *p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*, ha una funzione come proapoptotico altamente efficiente, in particolare nell'apoptosi indotta dal danno genetico. È stato scoperto da tre diversi gruppi, due dei quali alla ricerca di geni p53 inducibili, infatti il promotore di *puma* contiene due siti consenso riconosciuti da p53, che lo caratterizza come un gene indotto da questo fattore di trascrizione. Non è nota una regolazione post-traduzionale per questa proteina, che dopo la trascrizione, localizza nel mitocondrio dove svolge un ruolo antagonista ai membri anti apoptotici della famiglia di Bcl-2. L'espressione di Puma è fortemente e rapidamente indotta in risposta ad agenti che inducono un danno al DNA, come ad esempio chemioterapici e radiazioni ionizzanti, in un meccanismo p53 dipendente. Ci sono molte evidenze a supporto del fatto che Puma sia un mediatore critico per l'apoptosi dipendente da p53. Per esempio fibroblasti di embrione di topo (MEF) trasdotti con l'oncoproteina E1A sono normalmente resi sensibili all'apoptosi mediata da p53, ma MEF knockout per Puma sono fortemente resistenti ad agenti che inducono danni al DNA nelle stesse condizioni. Inoltre, cellule tumorali di colon e polmone mancanti di p53 funzionante sono incapaci di indurre l'espressione di Puma in seguito a stimoli genotossici. Ciononostante l'espressione di Puma può essere anche indotta da stimoli indipendenti da p53, inclusi glucorticoidi, mancanza di siero ed ipossia.

Puma non è richiesto per il normale sviluppo, topi *puma* $-/-$ non possiedono anomalie dello sviluppo. Comunque i timociti ed i progenitori mieloidi di questi animali sono resistenti all'apoptosi indotta da diversi stimoli, inclusi farmaci antitumorali, radiazioni ionizzanti, deprivazione di citochine, trattamenti glucorticoidi, staurosporina ed esteri forbolici (Karst e Li, 2006).

Noxa:

Noxa è stata la prima BH3-only scoperta essere controllata da p53. Presenta analogie con Puma, infatti anche il suo promotore contiene un RE di p53 e la sua espressione risulta essere aumentata in seguito al danno subito dal DNA (Oda *et al.*, 2000). Noxa può funzionare anche indipendentemente da p53, infatti anche HIF-1 è stato dimostrato indurre la trascrizione di questo gene (Kim *et al.*, 2004). Finora non sono ancora state descritte modificazioni post-traduzionali della proteina Noxa. Come Puma, anche Noxa trasloca nel nucleo dove antagonizza con proteine antiapoptotiche di Bcl-2. Similmente a Puma, knockout di *noxa* non mostrano anomalie nello sviluppo. Sebbene MEF derivati da questi animali possiedono una resistenza ai farmaci, timociti *noxa* $-/-$ vanno in apoptosi prontamente in risposta a stimoli dipendenti da p53 (etoposide, radiazioni gamma) ma anche indipendenti da p53 (mancanza di citochine, trattamenti con glucorticoidi, esteri del forbolo (Villunger *et al.*, 2003; Shibue *et al.*, 2003). Inoltre topi *Noxa* $-/-$ sono resistenti alla morte cellulare delle cellule epiteliali gastrointestinali, indicando un ruolo di questa BH3 nel mantenimento omeostatico di questo tessuto (Shibue *et al.*, 2003). Diversamente da Puma, l'espressione di Noxa in MEF wild-type non induce l'apoptosi. Comunque Noxa sensibilizza i MEF a trattamenti con etoposide e radiazioni UV indipendentemente dal ruolo di p53 (Nawroz *et al.*, 1994).

Bim:

La funzione di Bim è quella di monitorare l'integrità della struttura citoscheletrica, esso induce infatti apoptosi in risposta alla distruzione dei microtubuli. La proteina Bim contiene un dominio ammino-terminale altamente conservato (*DLC-binding motif*) che si associa a DLC1 un componente del complesso motore dineina microtubuli. In seguito a danno cellulare, come radiazioni UV, Bim è attivato attraverso fosforilazione dalle chinasi JNK. La forma fosforilata di Bim è rilasciata dal citoscheletro e trasloca nel mitocondrio, dove antagonizza con i membri antiapoptotici di Bcl-2. La stabilità della proteina Bim sembra essere regolata da chinasi indotte da segnali extracellulari (ERK), la cui fosforilazione sito

specifica promuove la sua ubiquitilazione e la seguente degradazione proteasomiale. Al livello trascrizionale, invece, è stato dimostrato che il fattore di trascrizione Foxo-3a è sufficiente per indurre l'espressione di Bim in linfociti dopo mancanza di citochine. L'espressione di Bim è anche soggetta alla regolazione trascrizionale dei fattori di trascrizione FKHRL1 e c-myc. Studi condotti su topi knockout indicano che il ruolo di maggiore interesse funzionale di Bim è quello di regolare le cellule linfoidi, infatti topi *bim*^{-/-} esibiscono una serie di anomalie ematopoietiche. La sua assenza ha mostrato anche promuovere la tumorigenesi. In uno studio, Bim sopprime la crescita di cellule tumorali trasformate e p53 dominanti negative. In un altro studio la perdita di un singolo allele accelera in maniera rilevante lo sviluppo di linfoma a cellule B in topi transgenici c-myc (Egle *et al.*, 2004)

Riguardo al ruolo di Bim come sensore di danno dei microtubuli, si è osservato il rapido accumulo in cellule trattate con sostanze che agiscono contro i microtubuli come il paclitaxel e che tumori *bim*^{-/-} sono resistenti a tali trattamenti (Tan *et al.*, 2005). Questo può spiegare perché tumori indotti da H-Ras sono resistenti a paclitaxel, infatti, l'espressione costitutivamente aumentata di H-Ras attiva la cascata di segnalazione delle MAP chinasi che promuove la degradazione di Bim tramite il meccanismo proteasomiale. In accordo con questi dati è noto che inibitori di questa via biochimica sensibilizzano al paclitaxel e promuovono la regressione tumorale in tumori epiteliali con elevata espressione di H-Ras. In alcuni studi su melanoma si è evidenziata l'apoptosi indotta da Bim in risposta al trattamento con alcuni inibitori delle deacetilasi. Il gruppo di ricerca di Zhang ha dimostrato ad esempio che SBHA suberic bishydroxamate induce apoptosi in cellule di melanoma ma non in melanociti. Il trasferimento di Bim dal citosol al mitocondrio è associato al comportamento di Bcl-2 in seguito al trattamento con SBHA. Suggestendo che Bim è un iniziatore di questo tipo di apoptosi indotta. Bim è anche riportato essere un mediatore chiave di anoikis in cellule epiteliali e può sopprimere la crescita di cellule di melanoma ancoraggio dipendente (Zhang *et al.*, 2004).

Bmf:

Bmf analogamente a Bim è associato al citoscheletro. Il dominio DLC binding permette l'associazione con DLC-2, un componente del complesso motore miosina V actina. Bmf è attivato da segnali di danno come radiazione ultravioletta, perdita di adesione, ed *anoikis*. In seguito a questi stimoli Bmf subisce delle fosforilazioni e perde la sua associazione con la porzione actinica del citoscheletro. Quindi trasloca sul mitocondrio dove trova altri membri della famiglia di Bcl-2. Bmf è espresso in cellule ematopoietiche ed è anche mostrato mediare la morte di granulociti in seguito a mancanza di citochine (Villunger *et al.*, 2003; Puthalakath

et al., 2001). L'espressione di Bmf non sembra essere modulata in risposta a stimoli di stress che inducono morte apoptotica. Il suo ruolo sembra essere complementare a quello di Bim, in particolare Bmf sembra essere maggiormente coinvolto nella morte indotta in seguito alla perdita del segnale di ancoraggio *anoikis*.

La localizzazione cromosomiale di Bmf (15q14/15) è il sito di un probabile oncosoppressore rilevato assente in molti carcinomi metastatici ma non primari (Wick *et al.*, 1996).

Bad:

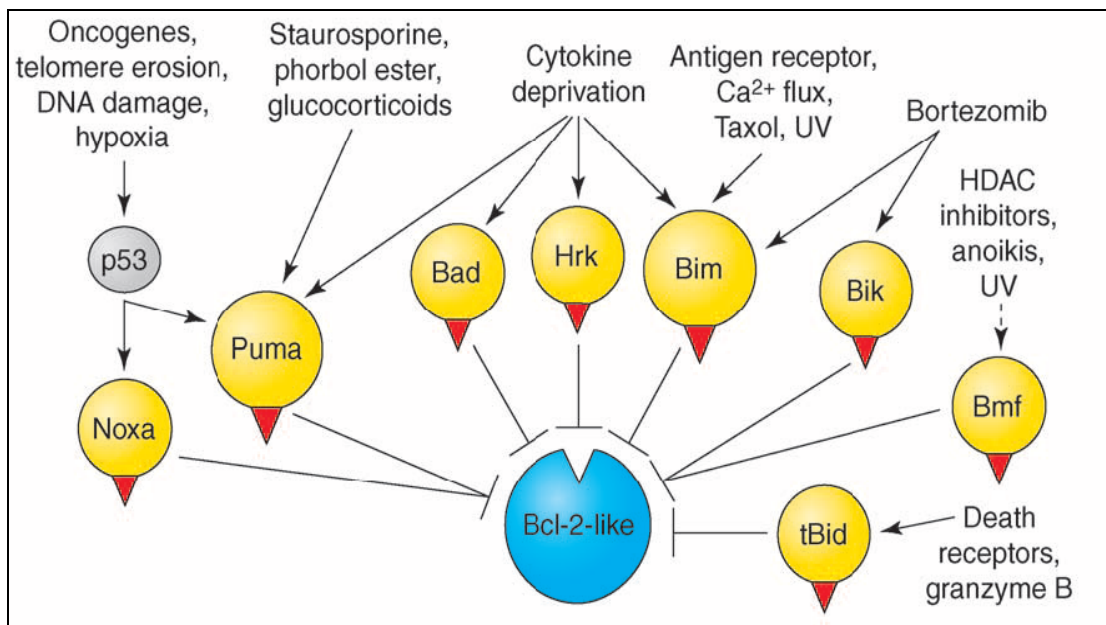
Bad è stata una delle prime proteine BH3 only identificate. La proteina Bad è regolata negativamente mediante fosforilazione di multipli siti serinici, in risposta a segnali di fattori di crescita. In condizioni normali, quando i fattori di crescita sono presenti, Bad è mantenuto fosforilato da varie protein chinasi come RSK, Akt, protein chinasi A, Raf-1 e p70 S6 chinasi. Bad fosforilato è sequestrato nel citosol dalla proteina 14-3-3. In seguito a deprivazione di fattori di crescita Bad è defosforilato e ciò porta alla sua traslocazione nel mitocondrio dove antagonizza con proteine della famiglia di Bcl-2 promuovendo l'apoptosi. Studi su topi knockout per Bad evidenziano il suo ruolo nel mantenimento del sistema ematopoietico. Infatti topi *bad* ^{-/-} sviluppano linfomi a cellule B ed esibiscono un aumento dell'incidenza di linfomi timici dopo radiazioni ionizzanti. Inoltre questi topi knockout esibiscono un'aumentata resistenza alla combinazione di mancanza dei fattori di crescita seguito da stimoli come FasL, TNF, o trattamenti con chemioterapici (Karst e Li 2006).

Bik:

L'espressione di Bik è indotta da diversi stimoli inclusi stress genotossici. Anche questo membro della famiglia delle BH3-only è regolato al livello post-traduzionale tramite fosforilazione, sui residui Thr-33 e Ser-35, che aumentano la sua potenzialità pro-apoptotica. Blk, l'ortologo murino di Bik, è espresso in diversi tipi cellulari del sangue, inclusi linfociti, cellule mieloidi ed eritrociti nucleati. Comunque Blk appare svolgere un ruolo ridondante nell'apoptosi, infatti topi *blk* ^{-/-} non mostrano alterazioni particolarmente rilevanti del processo apoptotico indotto da diversi stimoli come deprivazione di citochine, glucorticoidi, esteri del forbolo, ionomicina, etoposide o attivazione del *B cell receptor*. La perdita della proteina Bik è stata riscontrata in cellule di carcinoma renale e può essere un fattore che contribuisce alla farmacoresistenza, mutazioni di Bik sono rilevate anche in linfomi delle cellule B (Karst e Li 2006).

Bid:

Bid è noto per la sua funzione di anello di congiunzione delle due vie di attivazione estrinseca con la via intrinseca. Infatti in seguito all'attivazione della caspasi-8, iniziatrice della via estrinseca, la forma citosolica di Bid viene tagliata e questo induce un cambiamento conformazionale che espone completamente il suo dominio BH. tBid la forma troncata trasloca sul mitocondrio dove induce la omo-oligomerizzazione di Bax e Bak (Wei *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 1998) Bid in questo modo attiva la via estrinseca. Il processamento di Bid comunque è realizzato anche da altre proteasi come granzyme B, calpaina ed enzimi lisosomiali che sono attivati da diversi stimoli non necessariamente correlati alla via di attivazione mediata da recettori. La perdita dell'espressione di Bid promuove la tumorigenesi e contribuisce alla farmaco resistenza con meccanismi ancora non noti. Diversi studi di espressione proteica in tumori prostatici, ovarici, di colon e di cervello mostrano che l'espressione di Bid possa anche favorire la progressione (Krajewska *et al.*, 2002). Mentre è stato osservato che topi mutanti *bid*^{-/-} sviluppano spontaneamente neoplasie mieloidi che progrediscono in leucemie croniche mielomonocitarie. Si evidenzia comunque un suo ruolo come oncosoppressore importante nella regolazione dell'omeostasi mieloide. Bid non è coinvolto nell'apoptosi dipendente da p53 (Zinkel *et al.*, 2003).



BH3-only come sensori di stress cellulare.

(Willis e Adams, 2005)

2.4 Effettori dell'apoptosi: Caspasi e meccanismi alternativi

L'evento centrale, richiesto per una rapida e piena manifestazione delle caratteristiche proprie dell'apoptosi è l'attivazione delle Caspasi una famiglia di cistein proteasi, (Cistein dependent ASpartate specific proteASE che tagliano in seguito ad un residuo di acido aspartico e richiedono la presenza di una cisteina nel sito catalitico). In particolare entrambe le vie biochimiche di morte portano all'attivazione delle caspasi effettrici che agiscono su specifici substrati cellulari portando alla fase di esecuzione di apoptosi.

Nei mammiferi sono state identificate 14 diverse caspasi, e altrettanti rispettivi ortologhi in altre specie, quali, per esempio, insetti e nematodi: di queste, sette sono coinvolte nel processo apoptotico. Dal confronto tra le numerose varianti, si è visto che possiedono un sito attivo altamente conservato, mentre la sequenza di riconoscimento dei substrati è variabile a seconda della specificità di ogni singolo enzima. In base alle analisi filogenetiche, che rivelano l'omologia di sequenza dei diversi domini caspasici, la famiglia delle caspasi viene suddivisa in due gruppi: la sottofamiglia di caspasi-1 (caspasi-1, -4, -5, -11, -13), coinvolta nel controllo dell'infiammazione, la sottofamiglia di caspasi-3 (caspasi-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10), specializzata nel processo apoptotico (*Earnshaw et al., 1999*). Le proteasi coinvolte nel suicidio cellulare sono distinte in caspasi iniziatrici ed effettrici, classificate in base al loro ruolo nel complesso macchinario apoptotico. Le caspasi iniziatrici (casp-2, -8, -9, -10) sono le prime ad essere attivate e sono responsabili dell'attivazione delle caspasi effettrici (casp-3, -6, -7), che garantiscono la continuità del processo nei suoi eventi catalitici principali. Analisi cristallografiche confermano che, nel citoplasma di ogni cellula, le caspasi sono presenti costitutivamente sotto forma di zimogeni: sono espresse come proenzimi (precursori inattivi) composti da tre domini, uno N-terminale (o prodominio), una subunità maggiore (~20 amminoacidi) ed una minore (~10 amminoacidi). La proteina matura è un tetramero di due eterodimeri, dato dall'associazione tra le due subunità maggiore e minore, che espone due siti catalitici: la struttura quaternaria è mediata da interazioni idrofobiche, in cui i sei filamenti β antiparalleli di ogni subunità formano un singolo e continuo foglietto β ; altri piccoli filamenti e α eliche contribuiscono al folding globulare (*Shi, 2002*). La maturazione di queste proteasi è data da un primo taglio, che separa le due subunità maggiore e minore, poi da un secondo, a livello del sito specifico a monte della subunità maggiore, responsabile del distacco del prodominio. In generale, questo processamento è comune all'attivazione di tutte le caspasi, anche se per alcune, come le caspasi-8 e -9, si è visto che non sempre è necessario: in queste

caspasi, è il meccanismo di oligomerizzazione a diventare fondamentale per produrre un enzima maturo (Stennicke *et al.*, 1999; Boatright *et al.*, 2003). Mentre le due subunità sono responsabili dell'attività catalitica, il dominio N-terminale è coinvolto solo nella loro regolazione e si distingue per essere di lunghezza maggiore nelle caspasi iniziatrici e minore in quelle effettrici. Si possono distinguere due diversi meccanismi di attivazione caspasica: nel caso delle caspasi iniziatrici, l'attivazione è basata sull'interazione di più proteine (oligomerizzazione), mentre, per le caspasi effettrici, dipende dal processamento dovuto alle caspasi già funzionali. La forma proenzimatica può essere vista come un 'regolatore citoplasmatico' dell'apoptosi che, una volta attivato, è libero di traslocare dal citosol in altri compartimenti cellulari, come il reticolo endoplasmatico o il nucleo. In alcuni casi le proforme inattive vengono localizzate già in particolari sedi cellulari, come pro-caspasi-2 che risiede anche nel nucleo (Paroni *et al.*, 2004). Il processo di oligomerizzazione prevede il richiamo di una elevata concentrazione di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale apoptotico, che vanno a costituire una piattaforma molecolare adatta a rendere possibile la maturazione delle caspasi iniziatrici da zimogeni ad enzimi attivi. Si pensa che sia sufficiente l'attività caspasica basale presente nei proenzimi per processare e attivare completamente un'altra molecola omologa, se entrambe si trovano in prossimità dei macrocomplessi di attivazione (Boatright *et al.*, 2003). Gli esempi di caspasi-8 e -9 costituiscono dei modelli di attivazione molto ben caratterizzati. Le caspasi effettrici -3, -6 e -7 esistono a concentrazioni fisiologiche come dimeri preformati: nonostante siano in grado di autoattivarsi *in vitro*, non c'è evidenza di questa loro capacità negli esperimenti *in vivo*. E' probabile che ciò sia dovuto alle loro caratteristiche strutturali. Infatti, la forma inattiva possiede una conformazione 'chiusa', che rende inaccessibile il sito catalitico. Il taglio dell'Asp198 permette la traslocazione di un loop (L2') e la formazione della struttura che caratterizza l'enzima attivo. L'attivazione delle caspasi effettrici costituisce classicamente il meccanismo di esecuzione dell'apoptosi con il processamento di proteine cellulari che ne determinano i cambiamenti caratteristici di questo tipo di morte cellulare programmata.

I substrati delle caspasi sono molti e si pensa ce ne siano ancora da identificare. Queste proteasi infatti processano gli inibitori endogeni dell'apoptosi come Bcl-2 o Bcl-x_L, inattivando la loro funzione inibitoria.

Le caspasi agiscono, inoltre, su proteine del citoscheletro fodrina e gelsolina, associate ai cambiamenti morfologici della cellula apoptotica. Anche al livello del nucleo esse tagliano la lamina nucleare, causando il restringimento ed evaginazione del nucleo, esse inducono, poi, l'attivazione delle DNasi CAD (caspase activated DNasi) degradando l'inibitore ICAD, ciò porta alla frammentazione nucleosomiale del DNA. La visione che l'attività delle caspasi sia

necessaria per il manifestarsi dell'apoptosi sta venendo via via superata dal momento che sono stati trovati molti modelli di morte cellulare *in vivo* che possono avvenire in assenza di esse. Inoltre è sempre più evidente che oltre ai mitocondri si possono associare segnali dal reticolo endoplasmatico, dall'apparato di Golgi e dal lisosoma che sensibilizzano la cellula producendo degli intermediari che complementano la funzione delle caspasi. Vi sono infatti molte proteasi che sono associate all'esecuzione dell'apoptosi come le catepsine, le calpaine ed i granzymes (Hail *et al.*, 2006).

Oltre a queste una proteasi molto importante nel meccanismo caspasi indipendente è la serin-proteasi Omi/HtrA2 che normalmente è localizzata nello spazio mitocondriale intermembrana, in seguito agli stimoli apoptotici viene rilasciato nel citosol. Omi/HtrA2 ha un ruolo distinto come mediatore dell'attivazione delle caspasi legando e portando alla degradazione delle proteine della famiglia delle IAP e nello sviluppo di alcuni tumori. In alcuni studi si è riportata l'associazione tra resistenza al trattamento con cisplatino di carcinoma ovarico alla ridotta espressione ed o attività di Omi/HtrA2. Infatti i livelli citoplasmatici della proteina Omi/HtrA2 sembrano essere regolati dalle proteine IAP in cellule di carcinoma ovarico esposte a trattamento con cisplatino, suggerendo che l'espressione delle IAP possa essere associata a chemoresistenza. Omi/HtrA2 appare anche promuovere l'apoptosi direttamente attraverso la sua attività di serin proteasi. Per esempio esso induce la degradazione proteolitica e l'apoptosi in fibroblasti caspasi-9 deficienti, inoltre è stato osservato che l'espressione citoplasmatica di Omi/HtrA2 in HeLa e in cellule embrionali renali induce in maniera caspasi indipendente la permeabilizzazione di membrana mitocondriale. Inoltre Omi/HtrA2 mitocondriale è stato trovato processare la proteina anti-apoptotica HS1-associata X1 (Cilenti *et al.*, 2004). L'analisi della struttura cristallografica ha permesso di capire che la formazione da parte di Omi/HtrA2 di un complesso omo-trimerico è necessario per la sua funzionalità caspasi indipendente. Comunque considerando che i substrati cellulari di Omi/HtrA2 sono ancora da scoprire, si capisce quanto ancora sia poco caratterizzata questo tipo di apoptosi (Li *et al.*, 2002; Hedge *et al.*, 2002).

Oltre alle proteasi ci sono anche delle proteine mitocondriali rilasciate dal mitocondrio come AIF, Endonucleasi G, WOX1 e AMID.

AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) è una flavoproteina mitocondriale rilasciata nello spazio intermembrana durante l'apoptosi. Una volta liberato dal mitocondrio AIF trasloca nel nucleo dove induce la condensazione cromatinica e la frammentazione del DNA. Queste tre caratteristiche sono state associate all'apoptosi indotta da AIF in maniera caspasi indipendente in diversi modelli cellulari. Inoltre la presenza di AIF è risultata essere necessaria nell'induzione di apoptosi causata da infezione da HIV, danni cerebrali, distacco della retina,

neurodegenerazione. AIF è composto da tre domini strutturali: un amminotermine con una sequenza di localizzazione mitocondriale, una sequenza centrale, ed al carbossiterminale un dominio con funzione di ossidoreduttasi. Il dominio carbossiterminale è essenziale per la funzione di frammentazione del DNA, dal momento che la delezione di questo dominio abolisce questa attività. Inoltre questo dominio promuove l'interazione elettrostatica tra DNA e AIF necessaria per la degradazione del DNA. AIF mostra anche un'attività sia come NADH ossidasi che come deidrossiascorbato riduttasi. La funzione come ossidoreduttasi del dominio carbossiterminale di AIF appare essere associata anche agli effetti apoptotici nel nucleo, infatti il NADH come donatore di elettroni, è particolarmente efficiente nel favorire complessi tra AIF e DNA ed RNA ed il compattamento degli acidi nucleici nelle cellule apoptotiche. Sebbene AIF stesso possiede un'attività intrinseca come DNasi, può produrre comunque questo effetto reclutando o attivando delle endonucleasi. A tal riguardo recenti studi hanno messo in evidenza che AIF interagisce con la ciclofillinaA per formare una DNasi attiva, in altri lavori si è rilevato che AIF e la Endonucleasi G mitocondriale possono cooperare per promuovere la degradazione del DNA. La segnalazione apoptotica tra mitocondrio e nucleo può essere bidirezionale considerando che l'aumentata produzione dei ROS e l'attivazione di PARP (*polyADP-ribose polymerase*) può dare avvio ad un segnale nucleare che porta al rilascio da parte del mitocondrio di AIF in maniera caspasi indipendente, condensazione cromatinica, frammentazione del DNA e quindi apoptosi. La funzione pro-apoptotica di AIF può essere regolata negativamente da Hsp70 una chaperonina citoprotettiva. Infatti Hsp 70 che presenta un'aumentata espressione in diversi tipi di tumore può annullare la funzione di AIF e favorire la cancerogenesi. Da notare anche che la funzione redox di AIF nel mitocondrio potrebbe essere importante come meccanismo di difesa antiossidante. È stato visto che questa funzione mantiene lo stato trasformato in cellule di carcinoma del colon attraverso la sua attività NADH ossidasi, che appare regolare la funzione del complesso I nella catena di trasporto degli elettroni (Hail *et al.*, 2006).

L'endonucleasi G (Endo G) mitocondriale è la più abbondante nucleasi mitocondriale di cellule eucariotiche, e tra le più diffuse in generale. Di norma questa endonucleasi collabora nel mantenimento del genoma mitocondriale partecipando alla duplicazione e riparazione del DNA mitocondriale. Numerosi stimoli apoptotici provocano il rilascio di Endo G dal mitocondrio, che poi trasloca nel nucleo dove induce la frammentazione del DNA, in maniera molto simile alla frammentazione indotta da CAD. Diversamente da questa però Endo G non richiede il taglio da parte delle caspasi per essere attivata. Visto che EndoG, CAD e DNasi I producono ognuna frammenti nucleosomiali *in vitro*, è stato speculato che queste nucleasi possano lavorare cooperativamente per promuovere la degradazione del nucleo durante

l'apoptosi. È anche interessante l'ipotesi che Endo G possa sostituire CAD in alcuni tipi cellulari, specialmente quelli con un'abbondanza di mitocondri e deficienza di CAD (epatociti e neuroni).

Come precedentemente accennato anche i ROS (Specie reattive dell'ossigeno) agiscono come effettori dell'apoptosi. Infatti i mitocondri sono la principale fonte di produzione di ROS nella maggior parte dei tipi cellulari, ed anomalie nella generazione dei ROS possono svolgere un ruolo importante nei meccanismi di segnalazione dell'apoptosi. Ad esempio un'aumentata produzione di ROS e/o la distruzione dell'omeostasi redox mitocondriale può promuovere l'ossidazione dei tioli che regolano la conformazione delle proteine del complesso poro MPT, il quale può essere responsabile dell'aumento di permeabilità di membrana. L'MPT permette il passaggio di acqua e soluti minori di 1500 Da nella matrice mitocondriale, ciò può portare al rigonfiamento osmotico della matrice. Quando il rigonfiamento è piuttosto cospicuo può condurre alla rottura della membrana mitocondriale esterna e quindi alla liberazione delle proteine pro-apoptotiche. Analogamente le specie reattive dell'azoto RNS sono state riportate come attivatore dell'MPT in diversi modelli cellulari. Un'anomala produzione di ROS può anche promuovere i cambiamenti conformazionali dei membri pro-apoptotici della famiglia di Bcl-2 e il loro intervento nell'aumento della permeabilità di membrana mitocondriale. Dal momento che la generazione di ROS viene regolata sia dall'MPT che dai membri pro-apoptotici della famiglia di Bcl-2 questo può costituire un meccanismo di feedback positivo di amplificazione. La produzione di ROS, inoltre, facilita la diffusione di Citocromo c causando la degradazione della membrana mitocondriale interna, tramite l'associazione elettrostatica e/o idrofobica con la cardiolipina. Le membrane cellulari sono anche sensibili ai ROS che provengono da alterati stati redox cellulari. Ne sono esempi il rilascio regolato da redox del Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico e di catepsine dai lisosomi, anche l'ossidazione di fosfatidil serina e la sua esternalizzazione sulla membrana cellulare può dipendere direttamente dallo stress ossidativo e/o dall'accumulo di ROS. Inoltre la presenza di ROS è stata associata alla diminuzione del volume, evento che potrebbe dipendere dall'attivazione ossidativa dei canali per il Cl^- volume-sensibili sulla membrana plasmatica (Hail *et al.*, 2006).

Lo sfingolipide ceramide è stato dimostrato mediare la risposta apoptotica nella via di attivazione mediata da Fas e TNF, e/o da condizioni di stress ossidativo. Infatti la produzione di ceramide è associata alla generazione di ROS in maniera indipendente dalle caspasi, al contrario una produzione di ceramide caspasi dipendente è stata riscontrata in risposta ad alcune citochine infiammatorie. Ceramide può essere prodotta da cellule *de novo*, o attraverso l'idrolisi della sfingomieline. Durante una condizione di stress cellulare, la perdita di regolazione della produzione e/o utilizzo di ceramide sono ritenuti portare ad un incremento

della ceramide cellulare che è sufficiente ad innescare il processo apoptotico. Inoltre un'aberrante produzione di ROS e/o uno stress ossidativo possono condurre all'attivazione della sfingomielinasi ed al conseguente aumento di ceramide. La transizione di permeabilità di membrana mitocondriale sembra essere causata dalla ceramide, questo meccanismo può avvenire in associazione con lo stress ossidativo è probabilmente bidirezionale e costituisce un meccanismo di amplificazione (Hail *et al.*, 2006).

2.5 Apoptosi e Cancro

Il meccanismo mediante il quale una cellula normale acquisisce le caratteristiche di cellula tumorale richiede l'acquisizione diverse alterazioni cellulari. L'evasione dalla morte cellulare per apoptosi è una di queste. (Hanahan e Weinberg, 2000). Inoltre l'evasione dall'apoptosi è anche una caratteristica riscontrata spesso come meccanismo di resistenza alle terapie anti-tumorali (De Bruin e Medema, 2008; Johnstone *et al.*, 2002). L'apoptosi infatti è ritenuta essere uno dei più grandi ostacoli da superare da parte della cellula tumorale per permettere la sopravvivenza e la proliferazione nelle varie condizioni di stress. Per questo esistono molti gruppi di ricerca impegnati nella ricerca di meccanismi che restaurino la normale capacità di morte apoptotica al fine di migliorare l'efficacia delle terapie. Le cellule tumorali acquisiscono la resistenza all'apoptosi attraverso diversi meccanismi. La perdita di funzione dell'oncosoppressore p53 è riscontrata molto spesso ed è attribuita come responsabile del fallimento dell'induzione di apoptosi in seguito a diversi stress cellulari. Inoltre è noto che topi p53 deficienti subiscono molto facilmente la comparsa di tumori. Altre alterazioni antiapoptotiche rilevate in tumori umani coinvolgono la famiglia proteica di Bcl2, come la perdita di funzione di Bax e Bak, o l'aumentata espressione di membri anti-apoptotici. Nel linfoma di tipo B, Bcl-2 è altamente espresso in seguito ad una traslocazione con un gene immunoglobulinico (Tsujimoto *et al.*, 1984). A conferma dell'associazione di questa traslocazione con effetto antiapoptotico con la tumorigenesi è il fatto che essa induca un rilevante aumento nell'incidenza di tumori a cellule B in topi. Inoltre anche alterazioni del meccanismo di attivazione della via estrinseca è stato mostrato avere un ruolo nell'evasione dall'apoptosi. Per esempio il recettore Fas è espresso in maniera ridotta in cellule di carcinoma del colon in relazione alle cellule della normale mucosa dello stesso tessuto (Moller *et al.*, 1994). L'assenza di Fas consente l'evasione dalla citotossicità di linfociti di cellule tumorali mediante questa via di morte. Inoltre anche c-FLIP particolarmente espresso in cellule di carcinoma del colon è stato mostrato proteggere le cellule tumorali dagli effetti

proapoptotici di cellule T citotossiche indotte in vivo (Medema *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2005).

Altre mutazioni a carico dei componenti del pathway apoptotico, disattivato nei tumori, riguardano le proteine della famiglia IAPs (Inhibitors of Apoptosis), cIAP1, cIAP2, XIAP e survivina, che bloccano l'apoptosi attraverso l'interazione con membri della famiglia delle caspasi funzionando da inibitori. La funzione cellulare delle proteine della famiglia IAP non è ancora totalmente chiarita, tali proteine sembrano coinvolte nella patogenesi di molte malattie neoplastiche come tumore del polmone, leucemia mieloide e cancro della prostata, purtroppo ancora poco si sa sul loro ruolo in adenocarcinoma pancreatico. Notizia certa è che elevati livelli di espressione di tali proteine coincidono con un grado di massima resistenza all'apoptosi da parte del tumore, *in vitro* sembra che in cellule di adenocarcinoma pancreatico la sovra-espressione di tali proteine conduce ad una resistenza al processo apoptotico indotto per via estrinseca Fas- o TRAIL- mediata. L'indipendenza delle cellule tumorali dalla presenza dei fattori di crescita è una loro caratteristica che fornisce loro un vantaggio altamente selettivo rispetto alle cellule normali. Dal momento che l'insorgenza e l'espansione clonale di un tumore è conseguente alla mutazione di geni onco-soppressori ed oncogeni, e la relativa perdita di sensibilità delle cellule cancerose agli stimoli apoptotici fisiologici, la maggior parte della ricerca in termini oncologici si è spostata verso la comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della resistenza all'apoptosi, alcune terapie infatti mirano a ristabilire la sensibilità cellulare agli stimoli di morte utilizzando terapia genica diretta specificatamente verso i membri della via apoptotica variati (Westphal e Kalthoff, 2003)..

3 Adenocarcinoma pancreatico

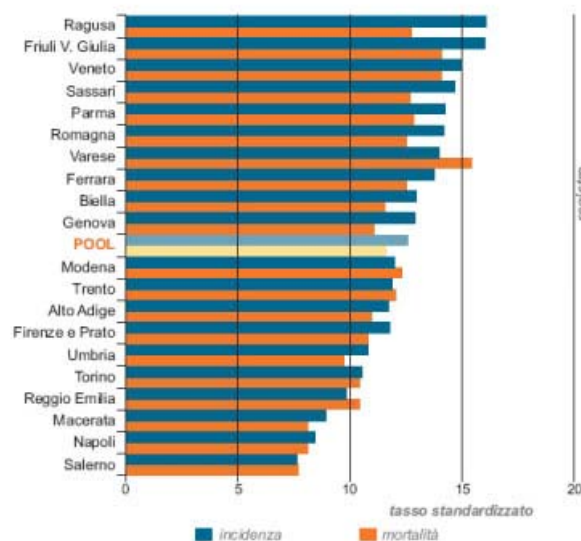
3.1 Epidemiologia

Lo studio del carcinoma del pancreas ha assunto, negli ultimi anni, un interesse sempre crescente da parte della comunità scientifica, in quanto rappresenta uno dei tumori con più alto tasso di mortalità. Tale neoplasia rappresenta infatti la quarta causa di morte per cancro negli Stati Uniti e la quinta in Europa (Jemal *et al.*, 2009, Ferlay *et al.*, 2007)

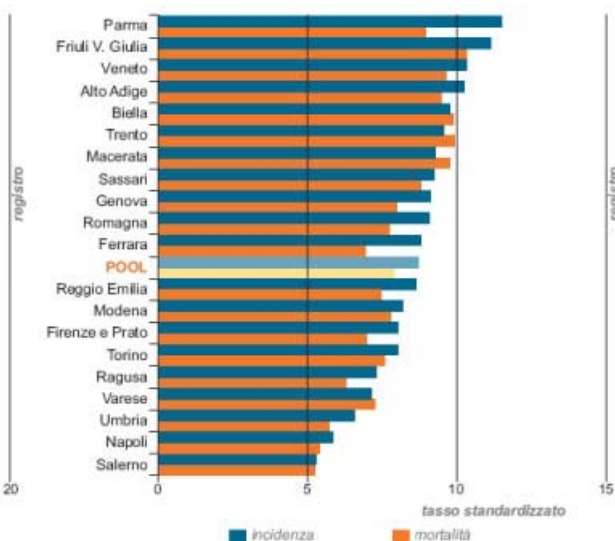
In Europa il tasso di mortalità più elevato legato a questa neoplasia è stato valutato in Ungheria, Austria e Repubblica Ceca mentre le nazioni meno colpite sembrano essere

l'Albania e la Lituania (Germanos *et al.*, 2006). Quanto riportato dimostra che esiste una variazione geografica su scala mondiale del grado di incidenza di tale neoplasia. Studi epidemiologici hanno comunque confermato che i continenti più colpiti sono quelli a più alto sviluppo economico (Stati Uniti, Europa e Giappone) mentre percentuali più basse sono state stimate in paesi del terzo mondo (Africa ed Asia) (*World Cancer Research Fund & American Institute for Cancer Research, 1997*). Tra i fattori di rischio accertati sono inclusi: età (la probabilità di sviluppare il tumore aumenta con l'età, infatti la maggior parte dei casi viene diagnosticata dopo i 60 anni), razza (gli Afro-Americani sembrano essere i più colpiti), inattività, alcolismo cronico e fumo (si stima che il fumo da solo sia causa di più del 25% di tutti i casi). E' stato dimostrato che patologie preesistenti come pancreatiti croniche, diabete mellito ed obesità innalzano il fattore di rischio per lo sviluppo della malattia. Anche una dieta ipercalorica e povera di frutta e verdura rientra a pieno titolo tra i fattori di rischio (Go *et al.*, 2005). Infine si stima che circa il 10% dei casi sia da attribuire a fattori ereditari (Lynch *et al.*, 1996). In Italia nel periodo 1998-2002 il tumore del pancreas è risultato all'11° posto in termini di frequenza fra le neoplasie diagnosticate nei maschi e al 10° nelle donne. Il tumore del pancreas ha rappresentato la settima causa di mortalità neoplastica (pari al 4,6% del totale dei decessi per tumore) nei maschi e la sesta nelle donne (6,6%). Nell'area AIRTUM (Associazione Italiana Registri Tumori) sono stati diagnosticati in media ogni anno 17,2 casi di tumore del pancreas ogni 100.000 uomini e 16,9 ogni 100.000 donne. Le stime per l'Italia indicano un totale di 4.388 nuovi casi diagnostici fra i maschi e di 4.214 tra le femmine, mentre per quanto riguarda la mortalità nel 2002 si sono verificati 4069 decessi per tumore del pancreas fra i maschi e 4280 decessi tra le femmine. Il rischio di avere una diagnosi di tumore del pancreas nel corso della vita (fra 0 e 74 anni) è di 9,9‰ fra i maschi (1 caso ogni 102 uomini) e di 6,3‰ tra le femmine (1 caso ogni 158 donne), mentre il rischio di morte è di 8,9‰ tra i maschi e 5,5‰ tra le femmine. Non c'è una grande variabilità geografica nell'incidenza del tumore del pancreas nel nostro Paese ed il rapporto fra le aree con i tassi più alti e quelle con i più bassi è di circa 2. Il tumore del pancreas mostra un'incidenza in crescita nel corso del tempo sia nei maschi che nelle femmine, con mortalità sostanzialmente stabile e questo potrebbe essere attribuibile ad un'anticipazione diagnostica, dovuta a migliori tecniche diagnostiche (Il cancro in Italia - Rapporto 2006, anno 30, 2006, supplemento 2).

♂ Maschi



♀ Femmine



Tassi standardizzati (x100.000) di incidenza e mortalità dell'adenocarcinoma pancreatico in alcuni capoluoghi di provincia e di regione italiani.

(Il cancro in Italia - Rapporto 2006, anno 30, 2006, supplemento 2)

L'alto tasso di mortalità dipende molto dall'impossibilità di avere una diagnosi precoce del tumore. Infatti la sintomatologia iniziale è aspecifica e tardiva, e varia a seconda del sito di sviluppo della neoplasia. I tumori che si sviluppano nel corpo e nella coda del pancreas sono quelli che presentano i sintomi più tardivi, che spesso insorgono quando la massa tumorale è cresciuta al punto tale da interferire con la funzionalità di stomaco, fegato e altri organi vicini. Il primo sintomo risulta comunque essere il dolore addominale. Tutto ciò fa sì che la patologia venga spesso scoperta solo in fase metastatica. Questo aspetto viene ulteriormente aggravato dalla mancanza di una chemioterapia efficace e dalla marcata resistenza dell'adenocarcinoma alle terapie radiologiche, ormonali e immunologiche (Germanos *et al.*, 2006). Ad oggi, l'unica possibilità di cura concreta peraltro efficace solo nel 10-20% dei casi, è la rimozione chirurgica della massa tumorale, previa assenza di metastasi secondarie e con una stretta localizzazione del tumore all'organo bersaglio (Cleary *et al.*, 2004; Lillemoe *et al.*, 2000). Nel caso in cui non si possa intervenire mediante asportazione, si adottano trattamenti palliativi tesi ad eliminare il dolore e a migliorare la qualità della vita del paziente. Le moderne terapie di trattamento prevedono l'azione concomitante di radio- e chemio-terapia combinata con Gemcitabina e/o 5-Fluorouracile, ma anche in questi casi, il guadagno in termini di sopravvivenza del malato è modesto e di poco superiore ai 5 mesi (Bakkevold *et al.*, 1993).

3.2 Caratterizzazione morfologica

Il pancreas è una voluminosa ghiandola mista annessa all'apparato digerente. Essa è implicata nella regolazione di due importanti processi fisiologici quali la digestione (con la porzione esocrina) e la regolazione omeostatica dei livelli di glucosio nel sangue (con la porzione endocrina). Il pancreas è suddiviso in tre porzioni: la testa collocata nella concavità dell'ansa duodenale, il corpo separato dalla testa da una parte ristretta detta istmo e la coda che presenta forma ed estensione piuttosto variabili. Le tipologie di tumori maligni che possono colpire la ghiandola pancreatica sono diverse ed ognuno di esse presenta caratteristiche istologiche e molecolari differenti a seconda del tipo di cellula dal quale si sviluppa. L'adenocarcinoma pancreatico duttale (PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma) è così definito per il fatto che il tumore origina dalle cellule del dotto pancreatico, e benché esse costituiscano solo il 10-30 % del parenchima pancreatico normale, il PDAC rappresenta la neoplasia pancreatica maligna più comune e costituisce da solo più dell' 85 % dei casi di tumore al pancreas esocrino (Li D. *et al.*, 2004), mentre più rari sono: l'adenocarcinoma squamoso, il carcinoma a cellule acinari, il cistoadenocarcinoma mucinoso e il pancreatoblastoma.

L'adenocarcinoma duttale invade organi circostanti quali il tessuto linfatico, la milza e la cavità peritoneale e provoca metastasi al fegato ed ai polmoni. Da un punto di vista istologico si presenta come una desmoplasia caratterizzata dalla presenza di un denso stroma di fibroblasti e cellule infiammatorie (Jaster, 2004). Lo stato di desmoplasia è caratterizzato dalla proliferazione di tessuto fibrotico e da una matrice extracellulare alterata che conducono a crescita tumorale e a metastasi (Cruickshank, 1986). E' stato dimostrato che le cellule pancreatiche stellate, una normale subpopolazione cellulare del pancreas con caratteristiche fibroblastiche, contribuiscono allo stato desmoplastico in risposta ad uno stato di malattia della ghiandola (Jaster, 2004).

Un adenocarcinoma pancreatico può originarsi a partire da lesioni *in situ* pre-invasive delle cellule duttali, che possono poi progredire verso un carcinoma invasivo. Studi clinici e istopatologici hanno identificato tre tipi di lesioni precursori: la neoplasia intra-epiteliale pancreatica (PanIN), il neoplasma cistico mucinoso (MCN) e il neoplasma mucinoso papillare intraduttale (IPMN) (Brugge *et al.*, 2004). Di queste lesioni la più comune e ampiamente studiata è la neoplasia intra-epiteliale pancreatica, contraddistinta da cellule diverse per forma (da colonnare a cuboidale), quantità varianti di mucine e da un differente grado di atipia strutturale e citonucleare. Sulla base di quest'ultimo parametro possiamo dividere tale neoplasia in tre fasi:

- PanIN-1 è la lesione di 1° grado con il livello minimo di atipia e può essere ulteriormente suddivisa in PanIN-1A e PanIN-1B sulla base della presenza o meno di una pseudo-stratificazione micro-papillare dell'epitelio.
- Le lesioni PanIN-2 sono caratterizzate da un moderato grado di atipia che include perdita di polarità, affollamento nucleare, pseudo-stratificazione e iper-cromatismo.
- PanIN-3 anche denominato “carcinoma *in situ*”, è associato con forti gradi di atipie e alterazioni come la perdita di polarità nucleare, necrosi luminale e anormale mitosi. Sebbene sia considerata una lesione pre-invasiva, la PanIN di 3° grado è ancora confinata internamente alla membrana basale (Koorstra *et al.*, 2008).

Numerosi studi di profilo molecolare hanno successivamente rinforzato il modello di progressione da lesioni PanIN ad adenocarcinoma pancreatico duttale attraverso la documentazione di un numero crescente di alterazioni geniche nel grado più alto di questo tipo di lesioni (Maitra *et al.*, 2003).

3.3 Alterazioni geniche

La progressione da lesioni precursori ad un tumore invasivo è associata con l'accumularsi da parte delle cellule di alterazioni genetiche. Ogni stadio della PanIN deriva dall'attivazione e/o la soppressione di diversi oncogeni e/o geni oncosoppressori quali *K-ras*, *p16^{INK4}*, *p53*, *DPC4/SMAD4* e *BRCA2* (Hezel *et al.*, 2006). Nell'ultima decade, infatti, diversi studi (Giovanetti *et al.*, 2006) hanno dimostrato che alla base dello sviluppo del PDCA può esserci:

1. l'amplificazione e/o la mutazione di diversi oncogeni:
 - *K-ras*, con una frequenza di alterazione del 75-100 %
 - *c-erb-3*, con una frequenza di alterazione del 60-70 %
 - *c-erb-2 (HER-2/neu)*, con una frequenza di alterazione del 10-20 %
2. la mutazione e/o la delezione di geni oncosoppressori:
 - *p53*, con una frequenza di alterazione del 50-75 %
 - *p16^{INK4A}*, con frequenza di alterazione dell'80-95 %
 - *Rb*, con una frequenza di alterazione del 60-70 %
 - *DPC4*, con una frequenza di alterazione del 50-55 %
3. l'amplificazione e/o la mutazione di diversi fattori di crescita:
 - *FGF*, con una frequenza di alterazione del 60-90 %
 - *FGFR*, con una frequenza di alterazione del 50-70 %

- *EGFR*, con una frequenza di alterazione del 25-65 %
- *TGFβ*, con una frequenza di alterazione del 40-50 %.

La grande varietà delle possibili anomalie molecolari e genetiche, suggerisce un'etiologia multifattoriale della carcinogenesi dell'adenocarcinoma pancreatico e l'insorgenza della malattia si realizza sempre attraverso l'accumulo progressivo di anomalie a carico dei dotti pancreatici (Li *et al.*, 2004). Il cancro al pancreas è, tra tutti i tumori conosciuti, quello con la più alta frequenza di mutazione di *K-ras*, la quale sembra indotta dal consumo di alcool, dal fumo di sigaretta e dall'esposizione a solventi organici (Porta *et al.*, 1999). *K-ras* è un oncogene, membro della famiglia *ras*, codificante una GTP-binding protein implicata in una vasta gamma di importanti funzioni cellulari, tra cui la proliferazione e la differenziazione cellulare (Campbell *et al.*, 1998; Malumbres e Barbacid, 2003). L'attivazione della proteina codificata da *K-ras* è indotta in seguito al legame di un ligando al proprio recettore ed è accelerata dalla proteina GEF (guanine nucleotide-exchange factor), la quale legandosi al complesso Ras-GDP, provoca la dissociazione del GDP e permette in tal modo al GTP di legarsi alla proteina Ras. L'inattivazione invece richiede la presenza del cofattore proteico GAP (GTPase activating protein), il quale promuove l'idrolisi del GTP e attenua la segnalazione a valle. È stato dimostrato che *K-ras* può essere attivato da una mutazione puntiforme a carico del codone 12 (dalla sequenza GGT a GAT o GTT o più di rado a CGT), che induce la sostituzione di una glicina con un aspartato, una valina o una arginina (Rozenblum *et al.*, 1997). Più raramente, in casi di adenocarcinoma pancreatico familiare, sono state osservate anche delle mutazioni a carico del codone 13 (Evans *et al.*, 1995). Queste mutazioni sono state osservate con una frequenza vicina al 100% in casi di PDCA avanzato, mentre nelle fasi precoci della neoplasia la frequenza osservata è vicina al 30% (Rozenblum *et al.*, 1997). È stato dimostrato che *K-ras*, oltre che nella genesi, gioca un ruolo essenziale anche nel mantenimento dell'adenocarcinoma pancreatico duttale (Fleming *et al.*, 2005). Inoltre, si ritiene che l'identificazione delle mutazioni a carico di *K-ras* possa essere un valido strumento per la diagnosi precoce del PDCA (Benerjee *et al.*, 2000).

Tra le varie alterazioni genetiche che si osservano in questo tumore, la perdita di funzionalità, attraverso mutazioni, delezioni o ipermetilazione del gene oncosoppressore INK4A (conosciuto anche come CDKN2 e MTS1) si riscontra nei casi di PDCA, con una frequenza che oscilla tra l'80 e il 90% (Hustinx *et al.*, 2005). Tale alterazione è di solito osservata in lesioni avanzate con caratteristiche neoplastiche. INK4A è un gene oncosoppressore situato sul cromosoma 9p21 che codifica per la proteina p16 la quale, agendo sui complessi Cdk4 e Cdk6, induce il blocco della fase S (sintesi del DNA) del ciclo cellulare (Sherr, 2000). In

analogia con *K-ras* anche la mutazione di INK4A sembra essere un evento molto precoce nella carcinogenesi pancreatica (Gerdes *et al.*, 2001) ed è stato visto che la perdita di espressione di p16, che porta di conseguenza alla duplicazione incontrollata delle cellule tumorali, occorre nel 30% circa delle lesioni PanIN-1, nel 55% circa delle PanIN-2 e nel 71% circa delle lesioni PanIN-3 (Wilentz *et al.*, 1998). Uno dei primi eventi molecolari che inequivocabilmente differenziano le lesioni PanINs dal normale epitelio duttale a livello genetico è la perdita dell'integrità telomerica (Meeker e De Marzo, 2004). Il logoramento dei telomeri probabilmente associato con la loro disfunzione e instabilità, è osservato in più del 90% delle neoplasie intraepiteliali pancreatiche incluse quelle di 1° grado mentre l'epitelio non neoplastico è caratterizzato da telomeri intatti (Van Heek *et al.*, 2002). Sebbene le PanINs condividono numerose alterazioni con il tumore pancreatico, non tutti i cambiamenti avvengono precocemente nei loro stadi di progressione; alcuni, come le mutazioni dei geni onco-soppressori p53 (cromosoma 17p) (Luttges *et al.*, 2001), BRCA2 (cromosoma 13q) (Goggins *et al.*, 2000) e SMAD4/DPC4 (cromosoma 18q) (Wilentz *et al.*, 2000) sono osservati negli stadi più avanzati delle lesioni (PanIN-2 e PanIN-3). La mutazione del gene *p53* rappresenta l'alterazione somatica più comune nei tumori umani. La proteina p53 gioca un ruolo centrale nel modulare la risposta cellulare a fattori citotossici contribuendo all'arresto del ciclo cellulare e alla morte cellulare programmata. La perdita della funzione regolatoria di p53 durante la carcinogenesi, può portare ad una inappropriata crescita cellulare, ad una instabilità genetica e ad una maggiore sopravvivenza delle cellule cancerose (Kirsch *et al.*, 1998). Questo gene oncosoppressore è inattivato nel 50-75% dei casi di adenocarcinoma pancreatico (Dong *et al.*, 2005). Un altro frequente evento associato con la progressione del PDCA è la perdita del regolatore trascrizionale SMAD4 (DPC4), inattivato nel 50% circa dei casi di tumore del pancreas (Hahn *et al.*, 1996). Questo oncosoppressore è un componente centrale nella cascata di segnalazione che parte dal TGF- β (Massague *et al.*, 2000). Il meccanismo attraverso cui la perdita di SMAD4 contribuisce alla genesi del tumore è probabilmente coinvolto con il suo ruolo nell'inibizione della crescita mediata da TGF- β . Questo fattore di crescita che segnala attraverso recettori chinasi serina/treonina è interconnesso con l'attivazione delle proteine SMAD tra cui SMAD4, regolando una varietà di funzioni cellulari quali la proliferazione, la differenziazione, la migrazione e l'apoptosi (Siegel e Massague, 2003). Recenti ricerche evidenziano che la perdita di SMAD4 può inibire l'arresto del ciclo cellulare indotto da TGF- β , mutando così il bilancio della segnalazione di questo fattore di crescita dalla soppressione alla promozione tumorale (Levy e Hill, 2005). Un altro aspetto tipico del PDCA, sembra essere la sovra-espressione dei fattori di crescita epidermici (EGF, epidermal growth factor) e dei loro recettori cellulari (EGF-R) (Durkin *et*

al., 2003). Tra i diversi fattori quello che sembra essere più coinvolto nella mitogenesi e nella angiogenesi tumorale è il FGF (Fibroblast growth factor). La sovraespressione recettoriale di FGF è stata dimostrata da Kornmann *et al.* (2002) nei tessuti tumorali di adenocarcinoma pancreatico. FGF sembra contribuire anche all'induzione e allo sviluppo della desmoplasia che si associa all'adenocarcinoma pancreatico (Kuniyasu *et al.*, 2001).

3.4 Terapia e meccanismi di farmaco resistenza

La particolare aggressività biologica che caratterizza l'adenocarcinoma pancreatico, unitamente alla difficoltà di raggiungere una diagnosi in tempi utili, sono alla base della poco soddisfacente situazione terapeutica per questa malattia. La resezione chirurgica rimane l'unica potenziale cura per il trattamento del tumore al pancreas ma, sfortunatamente, solo il 15-20% dei pazienti presenta una patologia tale da potersi sottoporre ad intervento chirurgico, in quanto i restanti, rivelano al momento della diagnosi una malattia localmente avanzata o metastatica. Malgrado una radicale chirurgia, attualmente la percentuale di sopravvivenza a cinque anni rimane approssimativamente del 20% (Smeenk *et al.*, 2005). Poiché l'intervento chirurgico non mostra un miglioramento delle aspettative di vita in maniera così rilevante, il trattamento con chemio e radio-terapie comunque rappresenta un'indispensabile strumento per combattere questo tipo di neoplasia nella maggior parte dei casi.

Purtroppo, in più del 70% dei casi, lo stadio della neoplasia al momento della diagnosi risulta così avanzato da rendere possibili solo provvedimenti palliativi, trattamenti tesi ad eliminare i sintomi che rendono difficile una normale vita al paziente ma con scarsa efficacia nell'eliminazione completa delle cellule cancerose.

La resistenza alle chemioterapie, associata a questo tipo di tumore, conferisce una prognosi infausta che non è cambiata in maniera significativa negli ultimi 30 anni.

Da recenti trends di studio, è emerso che la chemio- e radio-resistenza fortemente accentuate in diversi tumori e nota nell'adenocarcinoma pancreatico sono il risultato di profonde modifiche nell'espressione dei geni che sembrano responsabili dell'attivazione, oltre che dell'avanzamento del processo apoptotico cellulare. Sembra infatti che tale neoplasia abbia, oltre ad una variata espressione di p53, una elevata espressione del gene anti-apoptotico Bcl-x_L. Studi *in vitro* hanno dimostrato che utilizzando degli oligonucleotidi antisense contro mRNA di Bcl-x_L tali cellule sono risultate più sensibili all'apoptosi indotta da chemio- e radio-terapici. E' ancora teorica ma in via di studio, inoltre, la possibilità di eliminare il tumore inducendo le sue cellule ad esprimere la proteina pro-apoptotica Bax. Studi *in vitro*

evidenziano un incremento di sensibilità delle cellule verso gli agenti chemioterapici quali gemcitabina e 5-fluorouracile (5-FU). A sostegno della tesi sopraggiungono i dati *in vivo* di Schniewind (2004), secondo i quali un tumore pancreatico che esprime in maggiore quantità la proteina Bax impiantato in un topo SCID presenta una maggiore sensibilità all'apoptosi indotta dai chemioterapici, con conseguente regressione della massa tumorale.

Altri studi attribuiscono questa relativa refrattarietà del tumore al pancreas agli agenti citotossici a diverse teorie: mutazioni inattivanti che inibiscono la funzione della proteina p16, alterazione presente nel 90% dei PDAC, liberano l'inibizione trascrizionale dell'oncosoppressore Rb, l'overespressione di Rb può consentire alle cellule tumorali di evadere dall'apoptosi indotta dai chemioterapici (Plath *et al.*, 2002). Diverse alterazioni genetiche e/o epigenetiche sono state associate alla farmacoresistenza. Tra queste sono incluse:

- prodotti associati con il trasporto della gemcitabina e dei suoi metaboliti
- alterazioni del trasportatore dei nucleosidi (hENT1), importante nell'assunzione della gemcitabina
- espressione aberrante di geni associati con la sopravvivenza cellulare e l'apoptosi come ad esempio le chinasi Akt, c-Src e c-Met (Freitas *et al.*, 2009).

Questi sono alcuni esempi dei meccanismi noti dare farmaco-resistenza, da notare come l'evasione dall'apoptosi sia coinvolta in diversi meccanismi associati a resistenza ai trattamenti come anche alla carcinogenesi per questo è importante utilizzare sostanze in grado di indurre l'apoptosi o sensibilizzare all'apoptosi indotta da altri farmaci meccanismo associato al trattamento con inibitori delle deacetilasi istoniche.

Agenti antitumorali infatti inducono apoptosi nelle cellule tumorali ed anomalie nella segnalazione dell'apoptosi sono associate alla farmacoresistenza. Ciò implica che i fattori che regolano i meccanismi apoptotici giocano un ruolo importante.

3.5 Chemioterapia

Nel trattamento del tumore del pancreas, la terapia con farmaci antitumorali, può essere applicata prima dell'intervento chirurgico (chemioterapia primaria o neoadiuvante), al fine di ridurre le dimensioni della massa tumorale, oppure può essere somministrata dopo l'intervento chirurgico (chemioterapia adiuvante) (Berlin, 2007; Regine *et al.*, 2006). Comunque, nei pazienti con malattia metastatica, la chemioterapia rimane un trattamento palliativo molto utilizzato per alleviare i sintomi e migliorare la qualità della vita (Evans *et al.*, 1997) e

consiste in pratica, nella somministrazione di farmaci allo scopo di distruggere le cellule tumorali. Il meccanismo d'azione di questi farmaci citotossici, consiste nell'impedire la divisione e la riproduzione di queste cellule. Il beneficio della chemioterapia nel tumore pancreatico in stadio avanzato è stato dimostrato in precedenti studi, nei quali, pazienti trattati con chemioterapia hanno avuto una media di sopravvivenza di 6-10 mesi, comparata ai 2-3,5 mesi di pazienti non sottoposti tale trattamento (Haller, 2003). I farmaci utilizzati nella chemioterapia sono scelti dopo lunghe e accurate sperimentazioni da parte delle comunità scientifiche e il trattamento può prevedere l'impiego di un solo farmaco o più di uno in concomitanza. La scelta della terapia dipende da molti fattori, tra i quali il tipo e le caratteristiche del tumore, l'età e le condizioni generali del paziente. Per buona parte del secolo scorso, il 5-fluorouracile (5-FU) è stato visto essere il farmaco più attivo nel trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico. In seguito, prove randomizzate eseguite da Burris e colleghi, che comparavano la sostanza 2',2'-difluorodeossi-citidina, comunemente chiamata Gemcitabina con il 5-FU come terapia di prima linea, hanno mostrato miglioramenti clinici nel 23,8% dei pazienti trattati con Gemcitabina rispetto al 4,8% dei pazienti trattati con 5-FU (Burris *et al.*, 1997); di conseguenza, è divenuta la sostanza standard per il trattamento del PDAC. La Gemcitabina è un analogo del nucleoside citidina, che viene fosforilato all'interno della cellula in difluorodeossicitidintrifosfato (dFd-CTP) e compete con il dCTP per l'incorporazione nel DNA, determinando così l'arresto della sintesi del DNA (Plunkett *et al.*, 1995). Una peculiare caratteristica della Gemcitabina è la sua abilità, una volta integrata nel DNA, di permettere l'incorporazione di un ulteriore nucleoside naturale. Questo previene la riparazione del DNA e determina la morte cellulare apoptotica, la quale è generalmente mediata dall'attivazione di p53 (Plunkett *et al.*, 1995). La presenza dell'inattivazione del gene *p53* in gran parte dei tumori pancreatici, è una delle principali cause di resistenza al trattamento con Gemcitabina. Effettivamente, è stato dimostrato che la reintroduzione del gene *p53 wild-type* in linee cellulari tumorali, incrementa fortemente la loro sensibilità alla Gemcitabina (Cascallo *et al.*, 2000). Si è scoperto, che la combinazione di farmaci con differenti meccanismi di azione può compensare l'insufficiente funzionamento di passaggi cruciali nell'attività di uno specifico agente, in questo modo superando il meccanismo di resistenza. Ad esempio, è stato visto che la Gemcitabina in combinazione con altre sostanze quali il 5-FU, il Cisplatino, l'Oxaliplatino o l'Irinotecan causa una percentuale di risposta in saggi di fase II leggermente più alta rispetto alla Gemcitabina impiegata da sola (Haller, 2003). Tuttavia, prove randomizzate in fase III, non hanno ancora dimostrato un beneficio clinico nella sopravvivenza per la terapia combinata, comparata con la singola Gemcitabina.

3.6 Radioterapia

La radioterapia può essere prescritta prima dell'intervento chirurgico, al fine di ridurre le dimensioni del tumore, oppure dopo l'intervento chirurgico (radioterapia adiuvante). La radioterapia sfrutta fotoni di energia nominale pari a 10-18 MV con dosaggi di 1,8 Gy/45-50 frazioni per trattamenti adiuvanti e 4 Gy/25-28 frazioni per trattamenti neoadiuvanti (Thomas, 1996). Nei casi di neoplasia avanzata inoperabile, può essere effettuata una applicazione in sovradosaggio, sino alla dose totale di 59,4-61,2 Gy. Con la metodica di radioterapia intraoperatoria (IORT) è possibile somministrare una parte della radiazione totale direttamente sulla neoplasia giudicata inoperabile o in caso di intervento chirurgico su di un eventuale residuo micro/macroscopico postchirurgico proteggendo al contempo gli organi adiacenti. Impiegando dosi di 25-40 Gy, si può ottenere un controllo locale del tumore o comunque un controllo del dolore con moderata percentuale di effetti secondari (Sindelar e Kinsella, 1999). La IORT può anche essere utilizzata in combinazione con una radioterapia esterna e in tal modo è possibile ridurre la dose di radiazione cutanea a 40-50 Gy conservando un incrementato controllo locale del tumore (Furuse et al., 2003). Fin quando non è stato dimostrato un sicuro vantaggio della sopravvivenza, dosi particolarmente alte di IORT hanno provocato considerevoli complicazioni come le emorragie. Gli effetti collaterali della radioterapia dipendono dalla quantità di dose irradiata e dall'area sottoposta a irradiazione e possono includere nausea, vomito, diarrea, anemia. Durante il trattamento possono manifestarsi anche stanchezza, modificazioni cutanee e alopecia. La maggior parte di questi effetti è comunque prevedibile, curabile e si risolve rapidamente al termine del trattamento radiante.

3.7 Chemio-radioterapia

Molti studi clinici hanno dimostrato la validità dell'associazione del trattamento chemioterapico a quello radiologico nel controllo locale della neoplasia e più in generale nel miglioramento della sopravvivenza. Il trattamento chemioradioterapeutico rimane ad oggi il trattamento di scelta nelle malattie localmente avanzate inoperabili e il massimo effetto sinergico si ha quando vi è una azione concomitante dell'effetto della chemio e della radioterapia. Negli ultimi tre decenni la contemporanea somministrazione del 5-fluoro-uracile (5-

FU) e radiazioni è stato il protocollo standard per la cura di neoplasie locali avanzate. Trial clinici condotti su di un campione di 64 pazienti da Moertel e collaboratori (*Moertel et al., 1999*) hanno dimostrato che la l'associazione di 5-FU ad un trattamento radioterapico di 35-40Gy (per 3-4 settimane) aumentava la percentuale di sopravvivenza oltre il primo anno dal 6 al 22%. Questi dati hanno dimostrato un vantaggio significativo nelle risposte obiettive a favore della combinazione radiochemioterapica rispetto al singolo trattamento. In tal senso è importante sottolineare l'azione radiosensibilizzante di alcuni agenti chemioterapici nei confronti delle sole cellule neoplassiche dimostrata da altri agenti chemioterapici come la gemcitabina e i farmaci anti-angiogenetici. La gemcitabina è il chemioterapico standard utilizzato nei casi di adenocarcinoma metastatico, avendo dimostrato rispetto al 5-FU un incremento dei benefici clinici e della sopravvivenza. La radiosensibilizzazine da gemcitabina è maggiore quando la chemio-terapia precede la radioterapia e si realizza con somministrazioni prolungate di dosi non tossiche di farmaco. Attualmente comunque sembra che l'azione sinergica di gemcitabina e radiazioni possa aumentare in media l'aspettativa di vita dei pazienti oltre i 12 mesi, anche se in tal senso sono necessari ulteriori studi ed approfondimenti (*Wolff et al., 2000; Mornex, 2002*).

Scopo del Lavoro

Nel mio lavoro di tesi sono andato a valutare la capacità di indurre apoptosi di due inibitori delle deacetilasi istoniche, il Trichostatin (TSA) e l'acido Valproico (VPA), in linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico ed ho analizzato i meccanismi molecolari coinvolti in tale processo.

Dal momento che i trattamenti finora usati contro il tumore al pancreas risultano ancora piuttosto inefficaci, in quanto risulta particolarmente resistente ai comuni farmaci chemioterapici, si stanno studiando nuove sostanze in grado di contrastare e/o sensibilizzare questo tipo di cancro. Negli ultimi anni ha suscitato particolare interesse un gruppo di sostanze, gli inibitori delle deacetilasi istoniche, come agenti anti-tumoralmente efficaci in neoplasie di origine diversa. Questi, infatti, inducono in modo più o meno diretto apoptosi, in cellule tumorali normalmente resistenti ad altri stimoli pro-apoptotici, oltre ad arrestare la crescita, ridurre l'angiogenesi e modulare la risposta immunitaria. Gli inibitori delle deacetilasi istoniche presentano, inoltre, il pregio di non essere particolarmente tossici per le cellule sane, anche se il meccanismo con il quale svolgono la loro funzione anti-tumorale non è chiaro ed è imputabile sia alla loro interazione con le deacetilasi istoniche che con numerosi altri bersagli molecolari.

In questo lavoro si è quindi scelto di saggiare l'efficacia pro-apoptotica e anti-proliferativa di due inibitori delle deacetilasi istoniche appartenenti a due categorie chimiche differenti: il VPA, un acido grasso a catena corta, ed il TSA, un derivato degli acidi idrossamici. Il VPA è un farmaco antiepilettico utilizzato ormai da anni a tale scopo, con un'emivita nel sangue maggiore di altre sostanze appartenenti alla stessa categoria come il Sodio Butirrato, utilizzato in un nostro precedente studio con promettenti risultati. Inoltre il VPA non era ancora mai stato saggiato come apoptotico su cellule tumorali pancreatiche. Il TSA, invece, è già noto avere tale funzione in cellule tumorali di questo tessuto, per questo adatto ad un'analisi comparativa per la caratterizzazione di questo tipo di morte cellulare indotta, di cui non sono comunque chiari i meccanismi molecolari.

Si è quindi determinato quale dose di VPA e TSA potesse essere utile per indurre apoptosi nelle linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico in esame ASPC-1, PACA-44 e PANC-1, da utilizzare nei successivi esperimenti allo scopo di identificare i bersagli molecolari su cui agiscono questi due HDACi. Si sono scelte le dosi di 500 nM per il TSA e 10 mM per il VPA che sono state utilizzate per determinare l'effetto apoptotico a 24, 48 e 72h misurando la quantità di DNA ipodiploide e la quantità di fosfatidilserina sulla porzione esterna della

membrana a 24h. Si è realizzato anche uno studio di cinetica dell'inibizione della crescita cellulare. Si è quindi visto per la prima volta in questo tipo di cellule che anche il VPA, come il TSA, induce apoptosi e inibisce la crescita, in maniera dose e tempo dipendente.

Si è dimostrato che la via di attivazione apoptotica coinvolta è quella intrinseca che procede attraverso la caduta di potenziale di membrana mitocondriale ed il rilascio di Citocromo c nel citoplasma. Si è visto che la fase di esecuzione dell'apoptosi è compiuto dalla caspasi-3 la quale risulta essere attivata, diversamente da quanto visto in precedenti lavori in cui si era riscontrata un tipo di apoptosi caspasi indipendente.

Si è poi studiato il coinvolgimento della famiglia proteica di Bcl-2, valutando la variazione di espressione genica e proteica dei più importanti membri delle proteine BH3-only, note avere ruolo di innesco dell'apoptosi. Si è riscontrato un aumento dell'espressione genica e proteica di Bim e Puma, più marcatamente in seguito al trattamento con VPA rispetto al TSA mentre non si è riscontrato aumento di Bad e Bmf, come era stato osservato in altri modelli.

Per vedere se l'aumento di questi pro-apoptotici portasse all'attivazione di Bax e Bak siamo andati a valutare dapprima il loro livello di espressione confrontandolo con quello presente in seguito al trattamento. Abbiamo osservato che non c'è induzione dell'espressione proteica di Bax, mentre Bak aumenta in seguito al trattamento con VPA in modo significativo nella linea ASPC-1. Si è anche riscontrata l'inibizione dell'espressione proteica di Bcl-x_L in seguito al trattamento con VPA in tutte le linee analizzate, meccanismo che si era osservato anche con il trattamento con Sodio Butirrato. Diversamente il TSA non mostra questa capacità nelle linee cellulari usate.

Siamo poi andati a valutare lo stato di attivazione di Bak e Bax, rilevando l'esposizione delle porzioni amminoterminali, che risultano essere esposte solo nelle proteine attivate. Tali caratteristiche sono state analizzate usando due metodiche diverse, mediante immunofluorescenza per Bak e tramite immunoprecipitazione per Bax. In questo modo abbiamo riscontrato che i due proapoptotici vengono attivati da entrambi i trattamenti.

Si è quindi dimostrato che VPA e TSA inducono l'espressione di Bim e Puma che portano all'attivazione di Bax e Bak. Ciò determina la caduta del potenziale di membrana ed il rilascio di Citocromo c nel citoplasma. Questo lavoro descrive un meccanismo con cui TSA e VPA innescano la via apoptotica intrinseca e verifica che questa si compia sino alla sua fase esecutoria classica con l'attivazione della caspasi-3, valutando anche la loro efficacia come inibitori della crescita. Questi dati sono utili per ulteriori studi di ricerca per nuovi approcci terapeutici, con queste due sostanze o loro derivati, nel trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico particolarmente aggressivo e frequentemente resistente ai classici farmaci citotossici.

Materiali e Metodi

1. Reagenti e Anticorpi

Il terreno di coltura (RPMI 1640), il siero bovino fetale (FBS), la soluzione 100X di Penicillina/Streptomicina, la soluzione di L-Glutammmina 200 mM e la Tripsina-EDTA sono state acquistate dalla EuroClone (EuroCLone Ltd. U.K.). Il trichostatin A, l'acido valproico e la cycloheximide sono stati forniti dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo). La soluzione stock (3,3 mM) di TSA è stata preparata solubilizzando la polvere in etanolo e poi questa è stata diluita con RPMI 1640 prima di ciascun esperimento. L'acido valproico, invece, è stato preparato e diluito ad ogni esperimento.

Gli anticorpi utilizzati per i Western Blotting sono anti-caspasi-3 (clone H-277) anti-Bcl-X_L (clone H-202), anti-Bak, anti-Bax, anti-Bim, anti GAPDH della Santa Cruz Biotechnology, anti-citocromo c (clone 7H8.2C12), anti-caspasi 9 (clone 2-22), anti-Bad, della BD Pharmingen, anti-Puma, anti-Bmf, anti-Bad della Cell Signaling Technology e anti-GAPDH HRP (mAbcam 9484, Abcam).

Per l'immunoprecipitazione è stato usato l'anticorpo monoclonale anti-Bax clone 6-A7 (Sigma), per l'immunofluorescenza l'anticorpo monoclonale Anti-Bak clone AM03 (Calbiochem-Novabiochem).

2. Linee cellulari

Le linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico duttale ASPC-1 e PANC-1 sono state ottenute dalla American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA); la linea PACA 44 da Dr. M. v Bulow (University of Mainz, Germany). Le tre linee tumorali, in precedenti studi sono state caratterizzate in base alla loro origine, in quanto ASPC-1 deriva da ascite di topo usato come ospite nel quale sono state innestate cellule provenienti a sua volta da ascite di un paziente con tumore al pancreas; la linea PANC-1 deriva da tumore primario di 2° grado, mediamente differenziato, e la linea PACA44 deriva da tumore primario di 3° grado ovvero fortemente indifferenziato (Verdoodt *et al.*, 1997). Queste tre linee cellulari sono state anche studiate in termini di markers molecolari dell'adenocarcinoma

pancreatico e tutte hanno mostrato una mutazione attivante del proto-oncogene *k-ras* e mutazioni inattivanti dei geni onco-soppressori *p53* e *p16* (Moore *et al.*, 2001). Le tre linee di adenocarcinoma pancreatico sono state cresciute in atmosfera saturata al 5% di CO₂ a 37°C e coltivate in RPMI 1640 supplementato con Penicillina/Streptomicina 1X, L-Glutammina 2 mM e il 10% di FBS. Poiché tutte le linee, crescono adese alle piastre di coltura è stata utilizzata una soluzione di Tripsina-EDTA per staccarle.

3. Studio dell'apoptosi cellulare: analisi citofluorimetrica con Ioduro di Propidio

L'analisi dell'apoptosi è stata condotta marcando le cellule con Ioduro di Propidio (PI), un colorante fluorescente che si intercala nella doppia elica di DNA. Con questo metodo l'apoptosi può essere studiata analizzando il contenuto ipodiploide di DNA, risultato della fluorescenza emessa dai corpi apoptotici contenenti non solo citoplasma ma anche frammenti di materiale genetico. Dopo il distacco con Tripsina-EDTA dalla piastra, le cellule (circa $3 \cdot 10^5$) trattate e non trattate come controllo con il TSA e il VPA sono state lavate per due volte con PBS 1X e risospese in 200 µl di soluzione ipotonica contenente Ioduro di Propidio (50µg/ml di PI, 0,1% di Sodio Citrato, e 0,1% di Triton-X-100). In questo modo lo ioduro di propidio può entrare in tutte le cellule analizzate, perchè permeabilizzate con detergente. I campioni sono stati incubati per 15 minuti a 37°C e poi trasferiti a +4°C al buio per un'ora. Il contenuto di DNA delle cellule è stato poi misurato tramite citofluorimetro FACScan (Becton and Dickinson, Lincoln park NJ. U.S.A.). I detriti cellulari vengono esclusi dall'analisi alzando la soglia del forward scatter. La curva di fluorescenza ottenuta dall'elaborazione dei dati, detta Histogram Plot, presenta due picchi, il primo dei quali rappresenta la fase G1 del ciclo cellulare, interposta tra la fine della mitosi e l'inizio della sintesi del DNA, ed il secondo picco è indicativo della fase G2 pre-mitotica. La depressione tra i due picchi rappresenta la fase di sintesi del DNA o fase S. La percentuale di cellule apoptotiche è stata determinata misurando il numero di cellule con una fluorescenza minore del picco in G1 riferito al controllo.

4. Studio dell'apoptosi cellulare: analisi citofluorimetrica con Annessina V e Ioduro di Propidio

Per valutare l'esposizione della fosfatidilserina (PS), sullo strato fosfolipidico esterno della membrana citoplasmatica, è stata utilizzata l'annexina V, una proteina con alta affinità per la PS, legata ad un fluoroforo, FITC (Annexin V conjugates Molecular Probes) insieme ad un colorante intercalante come lo Ioduro di Propidio (PI). In questo modo si può discriminare tra morte per apoptosi e necrosi, infatti PI non riesce ad entrare in cellule vive e cellule nella prima fase dell'apoptosi, mentre riesce a penetrare, e quindi colora solo, cellule in tarda apoptosi e necrosi. L'annexina invece si lega sia alle cellule in apoptosi che a quelle morenti che hanno perso l'integrità della membrana. Si valutano quindi apoptotiche solo le cellule positive all'annexina V, ma negative allo ioduro di propidio. Dopo il trattamento con il tricostatin A e l'acido valproico, le cellule sono state staccate dalla piastra con Tripsina-EDTA, lavate e risospese in un tampone contenente 10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM CaCl_2 ad un pH di 7,4. Sono stati poi aggiunti ad ogni campione 5 μl di Annessina V e lasciato incubare a temperatura ambiente ed al buio per 15 min. Dopodiché è stato aggiunto il tampone e lo ioduro di propidio. Quindi i campioni sono stati letti al citofluorimetro (FACScalibur, Becton-Dickinson). L'annexina coniugata al FITC è stata letta in FL1 mentre lo Ioduro di Propidio in FL3.

5. Saggio MTT per lo studio dell'inibizione della crescita cellulare

L'effetto inibitorio esercitato dal trichostatin A e dall'acido valproico sulla proliferazione delle cellule di adenocarcinoma pancreatico, è stato valutato tramite il saggio MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2yl)-2-5 diphenil tetrazolium bromide) che misura l'attività metabolica cellulare. Questo saggio si basa sulla riduzione da parte delle cellule, del sale di tetrazolio, che è incolore e solubile in acqua, e tale reazione porta alla formazione di formazano, composto insolubile e colorato. Il sale di tetrazolio è ridotto nel colorato formazano solo da cellule metabolicamente attive: infatti questa reazione avviene per opera del sistema della succinato-reduttasi che appartiene alla catena respiratoria mitocondriale, sistema attivo solo nelle cellule vive. Il saggio MTT è stato effettuato sulle linee cellulari tumorali ASPC-1, PACA 44 e PANC-1 trattate con varie concentrazioni di tricostatin A e acido valproico.

Per ogni linea cellulare sono state piastrate 10^4 cellule/pozzetto in piastre da 96 pozzetti (100µl di terreno per pozzetto), e sono state lasciate aderire per tutta la notte. Il giorno successivo le cellule sono state trattate con TSA 500nM e VPA 10mM per 24h, 48h, e 72h. Al termine di ciascuna incubazione, le cellule sono state incubate per 4 ore a 37°C con 20 µl di MTT 5mg/ml risospeso in PBS. Dopo aver rimosso l'MTT, tramite centrifugazione delle piastre a 2500 rpm per 5min e scarto del sovranatante, i cristalli di formazano formati sono stati poi dissolti in 100 µl di isopropanolo anidro e 0,1N di acido cloridrico (Sigma Diagnostic St. Louis MO.). La densità ottica è stata valutata tramite un microculture plate reader (BIORAD MICROPLATE READER) a 590 nm. Ogni saggio è stato condotto in triplicato, ed i valori di assorbanza ottenuti sono stati normalizzati con quelli ottenuti da cellule non trattate per determinare la percentuale di sopravvivenza.

6. Determinazione della caduta di potenziale di membrana mitocondriale

Per misurare la variazione del potenziale di membrana mitocondriale è stato usato il colorante cationico lipofilico JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianato ioduro, Molecular Probes), alla concentrazione di 5 mg/ml in DMSO (dimetisolfossido, Sigma).

Dopo il trattamento con il tricostatin A e l'acido valproico, le cellule sono state staccate dalla piastra con Tripsina-EDTA, lavate per due volte e colorate con JC-1 alla concentrazione finale di 10 µg/ml in 500 µl di terreno completo per 15 minuti a 37°C al buio. Dopo questa incubazione, le cellule sono state lavate per due volte e risospese in PBS e acquisite con il FACScan (Becton Dickinson, Lincoln park NJ. U.S.A.) usando il software Cell Quest (Becton Dickinson) in FL-1 e FL-2. Quando è presente potenziale di membrana mitocondriale il JC-1 passa dalla forma monomerica, che emette nel verde (FL-1), alla forma aggregata che, invece, emette nel rosso (FL-2).

7. Lisi cellulare ed estratti proteici

Per ottenere gli estratti cellulari, circa 10^6 cellule di ogni linea cellulare sono state staccate dalla piastra di crescita tramite tripsina-EDTA, centrifugate a 1400 rpm per 10 minuti e lavate almeno 3 volte in PBS. La lisi cellulare è stata effettuata

mediante incubazione del pellet di cellule nel buffer di lisi contenente Tris-HCl 20mM pH 7,5, NaCl 150mM, NP40 1%, glicerolo 10% e un cocktail di inibitori delle fosfatasi e delle proteasi (PMSF 2mM, NaVO₄ 1mM, Aprotinina 10µg/ml, Leupeptina 10µg/ml, Pefabloc 0,25µg/ml), per 30 minuti in ghiaccio. Gli estratti cellulari sono poi centrifugati a 14000 rpm per 20 minuti a +4°C e il sovrantante, contenente le proteine totali è stato recuperato, mentre il pellet, contenente residui cellulari, acidi nucleici, organelli, ecc. è stato scartato. Per valutare la presenza di Citocromo c nel citoplasma si è proceduto ad un'estrazione frazionata di proteine citoplasmatiche separate da quelle associate alle membrane con una lisi più blanda. Dopo aver staccato con tripsina EDTA 3·10⁶ cellule sono state lavate e risospese in un buffer contenente digitonina (75 mM NaCl, 1 mM NaH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 250 mM saccarosio, 190 µg/ml digitonina), un detergente non ionico, che a basse concentrazioni rende le membrane cellulari permeabili, rilasciando i componenti del citosol e gli organelli intatti. Dopo 5 minuti in ghiaccio la sospensione viene centrifugata per 10 minuti a 14000 rpm a 4°C. Il supernatante costituisce la porzione citoplasmatica cellulare. Il contenuto proteico del sovrantante è stato dosato mediante misurazione spettrofotometrica a 595nm.

8. Determinazione della concentrazione delle proteine estratte

La concentrazione proteica degli estratti è stata determinata mediante il test colorimetrico "Bio-Rad Protein Assay". Questo metodo si basa sul cambiamento di colore del Blu Comassie in risposta a varie concentrazioni di proteina. Il colorante si lega ai residui aminoacidici basici e aromatici, soprattutto a residui di arginina. La variazione colorimetrica si può misurare mediante l'uso di uno spettrofotometro a singolo raggio, valutando l'Assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm. Il cambiamento di colore dei singoli campioni viene paragonato a quello avvenuto in campioni standard a concentrazione proteica nota. A questo scopo è stata determinata una curva standard, misurando l'Assorbanza a 595 nm di concentrazioni note di albumina bovina purificata (BSA: 10µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1µg/ml), scelte nell'intervallo in cui il rapporto Assorbanza/Concentrazione è lineare.

9. SDS-PAGE

L'SDS-PAGE è una tecnica di elettroforesi su gel di poliacrilammide, condotta in condizioni denaturanti. L'opportuna quantità di ogni campione proteico è stata sospesa nel tampone di caricamento o SDS-loading buffer (glicerolo 10%, β -mercaptoetanolo 10%, SDS 2%, 625mM di Tris-HCl pH 6,8 e blu di bromofenolo 0,1%) e portata ad ebollizione per 10 minuti. Gli estratti totali sono stati quindi sottoposti a SDS-PAGE, utilizzando un gel di poliacrilammide al 12,5% ed al 15% per gli estratti totali, citoplasmatici e gli immunoprecipitati. L'elettroforesi è stata condotta ad un amperaggio costante di 25 mA, per 90-120 minuti in un Running-Buffer contenente Tris, Glicina e SDS (Bio-Rad Laboratories). L'uso di condizioni denaturanti nell'elettroforesi permette di uniformare la carica delle proteine, in modo che la separazione avvenga solo in base al peso molecolare.

10. Western Blotting

Questa tecnica permette l'identificazione e la quantizzazione di proteine specifiche in un estratto cellulare precedentemente separato con SDS-PAGE. Dopo la separazione, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa, Hybond c Extra (Amersham, NY, USA), ad un voltaggio costante di 100V per 1 ora, in un tampone composto da Tris HCl 0,025M, glicina 0,2M, etanolo 20%. Le membrane sono state quindi lavate in PBS-Tween 0,2% ed incubate per 1 h a temperatura ambiente in una soluzione saturante composta da latte al 5 % in PBS-T. In questa fase le proteine presenti nel latte saturano aspecificamente e con bassa affinità di legame i siti potenziali presenti sul filtro. I filtri sono stati poi incubati per tutta la notte a 4°C in agitazione con una soluzione di latte al 2,5% in PBS-T con l'opportuna diluizione di anticorpo primario. Dopo 4 lavaggi in PBS-T, i filtri sono stati incubati con l'anticorpo secondario, specifico per la regione costante del primo e coniugato con la perossidasi di rafano (HRP). Ciò ha permesso di evidenziare le proteine di interesse immobilizzate sul filtro con un metodo (ECL, Western Blotting detection, Amersham Pharmacia) che sfrutta la chemio-luminescenza.

La luminescenza è l'emissione di luce che risulta dalla dissipazione di energia da parte di una sostanza che si trova in uno stato eccitato. Nel caso della chemiluminescenza l'eccitazione si ha in seguito ad una reazione chimica. L'HRP

in presenza di perossido di idrogeno si ossida e a sua volta catalizza l'ossidazione del luminolo 8 (una diacilazione ciclica), in condizioni alcaline. Dopo l'ossidazione, il luminolo si trova in uno stato eccitato che decade allo stato fondamentale emettendo luce. Il picco di emissione di luce ha una lunghezza d'onda di 428 nm e può essere evidenziato grazie ad una breve esposizione su una lastra fotografica. Incubando quindi il filtro per 1 minuto in una miscela contenente perossido d'idrogeno, luminolo e fenolo in ambiente alcalino, l'HRP, coniugata con l'anticorpo secondario, catalizza la reazione descritta, evidenziando la proteina d'interesse, il cui peso molecolare può essere dedotto per confronto con un marker di peso molecolare noto. Gli anticorpi secondari utilizzati sono anti-mouse, e anti-rabbit ed anti-goat (Amersham Pharmacia).

11. Estrazione dell'RNA

L'estrazione di RNA totale è stata svolta utilizzando Trizol reagent (Invitrogen) secondo il protocollo previsto dalla casa produttrice. In breve, $2 \cdot 10^5$ cellule delle linee ASPC-1, PACA44, PANC-1 ed EJ sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti, lasciate aderire per 24 ore e, dopo aver raggiunto il 60% di confluenza, il medium è stato sostituito da terreno fresco preventivamente aggiunto di TSA alla concentrazione di 500 nM e di VPA alla concentrazione di 10 mM per un tempo di trattamento di 24h. Nei pozzetti è stato quindi aggiunto 1 ml di Trizol e sono stati lasciati per 5 minuti a temperatura ambiente. La fase successiva di estrazione è stata eseguita aggiungendo 200 μ l di cloroformio ad ogni campione che verrà poi centrifugato per 15 minuti a 12000 RPM. Dopo aver recuperato il surnatante e aggiunto 500 μ l di isopropanolo, i campioni sono stati centrifugati per far precipitare l'RNA. A seguito di ripetuti lavaggi con etanolo al 75%, il pellet di RNA è stato portato a secco e successivamente risospeso in 20 μ l H₂O (priva di RNasi e DNasi). La concentrazione dell'RNA estratto è stata determinata misurando l'assorbanza dei campioni alla lunghezza d'onda di 260 nm, caratteristica degli acidi nucleici, mediante l'uso di uno spettrofotometro a doppio raggio. Dal valore della densità ottica è stato possibile ricavare la concentrazione dell'RNA secondo la seguente formula $1 \text{ O.D.} = 40 \mu\text{g RNA}$ e normalizzarla a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La qualità dell'RNA totale estratto è stata valutata sia analizzando il rapporto di assorbanza dei campioni alle lunghezze d'onda di 260 e 280 nm (abs 260/280

nm), per valutare la possibile contaminazione da proteine, sia con una corsa elettroforetica su gel d'agarosio 1%.

12. Retrotrascrizione

Gli RNA totali estratti, sono stati retrotrascritti utilizzando l'enzima trascrittasi inversa (ImProm-II, Promega), che servendosi di un primer non specifico è in grado di "retrotrascrivere" sequenze di RNA in sequenze complementari di DNA (cDNA). Per selezionare e retrotrascrivere solo gli mRNA presenti nella miscela, sono stati aggiunti nucleotidi di deossitimidina (oligo dT 12-18 GIBCO 0,5U/μl), che si appaiano specificatamente alla coda di poli A, presente solo all'estremità 3' delle molecole di RNA messaggero. Per denaturare eventuali strutture secondarie e permettere l'appaiamento dell'oligo dT all'RNA, 1μg di RNA delle linee cellulari è stato incubato per 10 minuti a 72°C in presenza di 0,1 μg di oligo dT. Dopo il raffreddamento in ghiaccio, per ottenere le copie complementari di DNA, il campione è stato incubato per 1 ora a 37°C in una miscela composta da RT buffer (Tris HCl 2mM pH 8,3, KCl 15mM, MgCl₂ 3mM), DTT 10mM, DNTP mix 0,5mM e trascrittasi inversa 50U.

13. PCR Real-Time

I trascritti di interesse sono stati specificatamente amplificati in una fase successiva con la PCR Real-Time, un tipo di reazione a catena della polimerasi che permette di monitorare l'andamento della reazione di amplificazione mentre è ancora in svolgimento, tramite l'impiego di marcatori fluorescenti. I dati che si ottengono a fine ciclo, si possono utilizzare per effettuare una quantificazione relativa del frammento amplificato. La fluorescenza emessa in seguito ad uno specifico irraggiamento da parte della sorgente luminosa del termociclatore (Roche, LightCycler 2.0), viene quindi misurata in tempo reale da una telecamera CCD. Tutte le operazioni relative alle misurazioni avvengono sotto il controllo di un software gestito dal computer. La reazione PCR Real-Time è stata allestita utilizzando il colorante SYBR Green I DYE, un intercalante che si lega in maniera

aspecifica alla doppia elica del DNA emettendo fluorescenza, differentemente quando è libero in soluzione non emette in maniera rilevabile.

La rivelazione si basa sulla lettura a 530 nm in tempo reale, della fluorescenza emessa dai prodotti di amplificazione ad ogni ciclo, evidenziando così la cinetica della reazione. È possibile quantificare la concentrazione del cDNA target confrontando a quale numero del ciclo della reazione (Crossing Point, Cp) i diversi campioni raggiungono la fase esponenziale della PCR, dal momento che questo fattore è inversamente correlato con la concentrazione iniziale del DNA target. Dal momento che il SYBR Green è un colorante aspecifico, per poter validare la misurazione, è necessario che il prodotto dell'amplificazione sia rappresentato soltanto dall'amplificato del gene in esame per questo è necessario caratterizzare il prodotto della PCR mediante l'analisi della temperatura di Melting (T_m). Ogni frammento di DNA a doppio filamento si dissocia ad una caratteristica T_m , che è definita come la temperatura alla quale il 50% del DNA è a singolo filamento. Per determinare la temperatura di Melting, dopo l'amplificazione del DNA target si deve far eseguire al termocilatore una curva di Melting, in cui si monitora continuamente la fluorescenza in corrispondenza dell'aumento graduale della temperatura. Quando la temperatura della reazione raggiunge la T_m del frammento analizzato, la fluorescenza comincia a decadere velocemente fino a scomparire. La decadenza della fluorescenza viene visualizzata dal software associato al LC 2.0 che utilizza la temperatura di Melting per effettuare l'analisi degli eventuali prodotti amplificati. Confrontando difatti il punto di flesso sulla curva realizzata con il vertice del picco di Melting, è possibile determinare il valore della T_m specifica per il gene amplificato. L'analisi della curva di Melting permette l'identificazione del prodotto di amplificazione, poiché ciascuno ha una propria T_m si può identificare la presenza di eventuali prodotti aspecifici. La conferma della specificità dell'amplificato è data dall'analisi elettroforetica su gel di agarosio. Per la preparazione delle miscele di reazione, nel presente lavoro è stato utilizzato il:

- LightCycler-Faststart DNA Master SYBR Green I (Quiagen) (contenente la Taq polimerasi, i dNTP e $MgCl_2$ 2,5 mM)
- I primers per la β -Actina, Bcl- x_L , Bmf, Puma, Bad, Bid e Bax, le cui sequenze sono:

β -Actina S (5'→3') GATCCACACGGAGTACTT

β -Actina AS (5'→3') TGTGGCATCCACGAAACT (amplificato di 548 bp);

Bmf S (5'→3') GACTTCAGCTCTTCCCTCTC
 Bmf AS (5'→3') CGTTCCTCAACTCTTCTCCA (amplificato di 402 bp);
 Puma S (5'→3') CCTCAACGCACAGTACGA
 Puma AS (5'→3') CTAATTGGGCTCCATCTCGG (amplificato di 241bp);
 Bad S (5'→3') GGATGAGTGACGAGTTTGTG
 Bad AS (5'→3') GCCCATATTCAAGATGGCTG (amplificato di 227 bp);
 Bim S (5'→3') GCCTTCAACCACTATACTCAG
 Bim AS (5'→3') CGTTAAACTCGTCTCC (amplificato di 117 bp)

Mentre le temperature di denaturazione e di allungamento sono costanti nelle reazioni di PCR e corrispondono a 95°C e 72°C rispettivamente, la T di annealing varia secondo i primers utilizzati. Nel presente lavoro la T di annealing utilizzata per tutti i geni amplificati è di 60°C.

Il ciclo di amplificazione effettuato prevede:

- una prima fase di denaturazione condotta a 95°C per 15 minuti;
- la fase ciclica di amplificazione con le seguenti temperature: 95°C per 15 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 15 secondi;
- un ciclo di Melting a 95°C per 5 secondi, 40°C per 15 secondi e 95°C per 5 secondi;
- un ciclo di raffreddamento a 40°C per 30 secondi.

Per far avvenire la reazione di amplificazione, 1µl del cDNA ottenuto dalla trascrizione inversa è amplificato in 20µl di miscela di reazione, contenente 1 µl dei primers S e AS e 10 µl di SYBR Green. Per ogni coppia di primers utilizzata, bisogna effettuare una curva standard di calibrazione che rappresenta un valore di riferimento esterno indipendente dal trattamento e dall'efficienza della reazione, nel nostro caso, cDNA proveniente dalla linea cellulare EJ.

La quantificazione relativa si realizza mediante la comparazione tra i Cp del gene target, un controllo interno (gene di riferimento, actina) ed il calibratore, amplificato nelle stesse reazioni in cui sono stati saggiati i campioni, il quale rappresenta un punto sperimentale della curva di taratura. La misurazione della concentrazione relativa di un acido nucleico target viene effettuata mediante il "Relative Quantification Software" che in questo modo risulta essere:

Normalizzata rispetto ad un calibratore

Corretta relativamente all'efficienza del processo di amplificazione

Il valore di concentrazione relativa viene dunque espresso dal rapporto:

$$\frac{[\text{target}] \text{ campione} / [\text{reference}] \text{ campione}}{[\text{target}] \text{ calibratore} / [\text{reference}] \text{ calibratore}} \times 100$$

14. Attivazione di Bak: Immunofluorescenza

Dopo 24 h di trattamento con TSA e VPA, 10^6 cellule trattate e non trattate sono state lavate e fissate con Paraformaldeide 0,25% per 5 min a temperatura ambiente e lavate con PBS freddo per tre volte. Le cellule sono state mantenute a 4°C fino all'acquisizione. Sono state poi incubate, per 30 min, con l'anticorpo monoclonale anti Bak (1:30, AM03 Calbiochem-Novabiochem), che riconosce la porzione amminoterminale 1-52. L'anticorpo è stato risospeso in una soluzione di PBS 0,5% FCS e 250 µg/ml digitonina. Il detergente digitonina è stato utilizzato per permettere il passaggio dell'anticorpo attraverso la membrana plasmatica. Dopo tre lavaggi in PBS 0,5% FCS le cellule sono state incubate, per 30 min., con l'anticorpo anti mouse coniugato con FITC, diluito 1:100 in PBS 0,2% FCS; lavate e risospese in PBS ed infine le cellule sono state lette al citofluorimetro. Per ogni campione sono stati preparati dei replicati in cui si è aggiunto soltanto l'anticorpo secondario per verificare che l'aumento della fluorescenza misurata fosse dovuto soltanto alla maggior quantità di anticorpo secondario legato al primario e non dal legame aspecifico.

15. Attivazione di Bax: Immunoprecipitazione

Per valutare lo stato di attivazione di Bax le cellule sono state lisate in 300 µl di buffer di lisi (HEPES 10mM, NaCl 150 mM, 1% CHAPS, con inibitori delle proteasi), incubando in ghiaccio per 30 min e centrifugando a 14000 rpm per 20 min. Gli estratti (500 µg) sono stati incubati per una notte con 2 µg di anti Bax (6-A7) (Sigma Mouse monoclonale) che riconosce la forma attiva di Bax. In seguito si è precipitato incubando 50 µl di biglie proteina G per 2 ore. Dopo tre lavaggi in buffer di lisi si sono recuperate le biglie mediante centrifugazione e si sono caricati

gli estratti immunoprecipitati in un SDS-PAGE in seguito a bollitura del campione in buffer Laemli contenente DTT

16. Analisi statistica

La significatività delle differenze tra i due trattamenti nelle tre linee cellulari ASPC-1, PACA44 e PANC-1 è stata determinata usando il test t Welch a due campioni, considerando il valore di $p \leq 0,05$ come significativo.

Risultati

1. Il TSA ed il VPA inducono apoptosi in linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico

Negli ultimi anni gli inibitori delle deacetilasi istoniche hanno suscitato particolare interesse per la loro efficacia come antitumorali, ma ancora non sono stati chiariti con certezza i meccanismi con cui essi agiscono. In particolare non è ancora stato compreso il modo con cui essi inducono apoptosi in maniera preferenziale in cellule tumorali. Dal momento che il tumore al pancreas costituisce una delle neoplasie con maggiore resistenza ai comuni farmaci chemioterapici sono andato a valutare quali effetti avessero due inibitori delle deacetilasi in linee di adenocarcinoma pancreatico. Il Trichostatin A (TSA), un derivato degli acidi idrossiamici, sviluppato come antibiotico e negli ultimi anni studiato come anti-tumorale, di cui non si conoscono approfonditamente i meccanismi legati all'apoptosi in queste linee tumorali e l'Acido Valproico (VPA), un'acido grasso a catena corta noto come farmaco anti-epilettico, di cui non è mai stato valutato l'effetto pro-apoptotico in cellule tumorali originate da questo tessuto.

Come prima cosa sono andato a verificare se queste due sostanze avessero un effetto apoptotico su tre linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico ASPC-1, PACA44 e PANC-1. A questo scopo ho allestito esperimenti di induzione di apoptosi utilizzando concentrazioni diverse di TSA e VPA. Le dosi maggiormente utilizzate in letteratura rientrano nei seguenti range: 0,5-2 μ M per il TSA e di 0,23-10 mM per il VPA (Garcia-Morales *et al.*, 2005; Piacentini *et al.*, 2006; Duenas Gonzales *et al.*, 2008). Le cellule, in fase di crescita esponenziale, sono state trattate con TSA alle concentrazioni di 80 nM, 200 nM, 500 nM, 1,25 μ M e 3,1 μ M e con VPA alle concentrazioni di 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM. L'analisi è stata effettuata esaminando le cellule al citofluorimetro per valutare il contenuto di DNA, dopo marcatura con Ioduro di Propidio. Con questa metodica si considerano apoptotiche le cellule con un contenuto di DNA ipodiploide e con una elevata granularità. Per quanto riguarda la durata del trattamento si è scelto 48 h, in quanto da precedenti dati acquisiti nel nostro laboratorio con il Butirrato di Sodio, un altro inibitore delle deacetilasi istoniche, sapevamo che queste linee tumorali mostrano livelli di apoptosi rilevabili con questa tecnica a partire da 48h di trattamento. In Fig. 1 si può osservare che il TSA e il VPA sono in grado di indurre apoptosi in tutte e tre le linee tumorali e che, l'effetto apoptotico del TSA è evidente a partire dalla dose 200 nM solo nelle ASPC-1, mentre nelle PACA44 e nelle PANC-1 bisogna

arrivare alla dose 500 nM. Invece l'effetto del VPA appare ben evidente a 10 mM e non viene modificato in modo consistente raddoppiando la dose. Quindi, si è deciso di utilizzare nelle successive analisi, la concentrazione 500 nM per il TSA e la concentrazione 10 mM per il VPA.

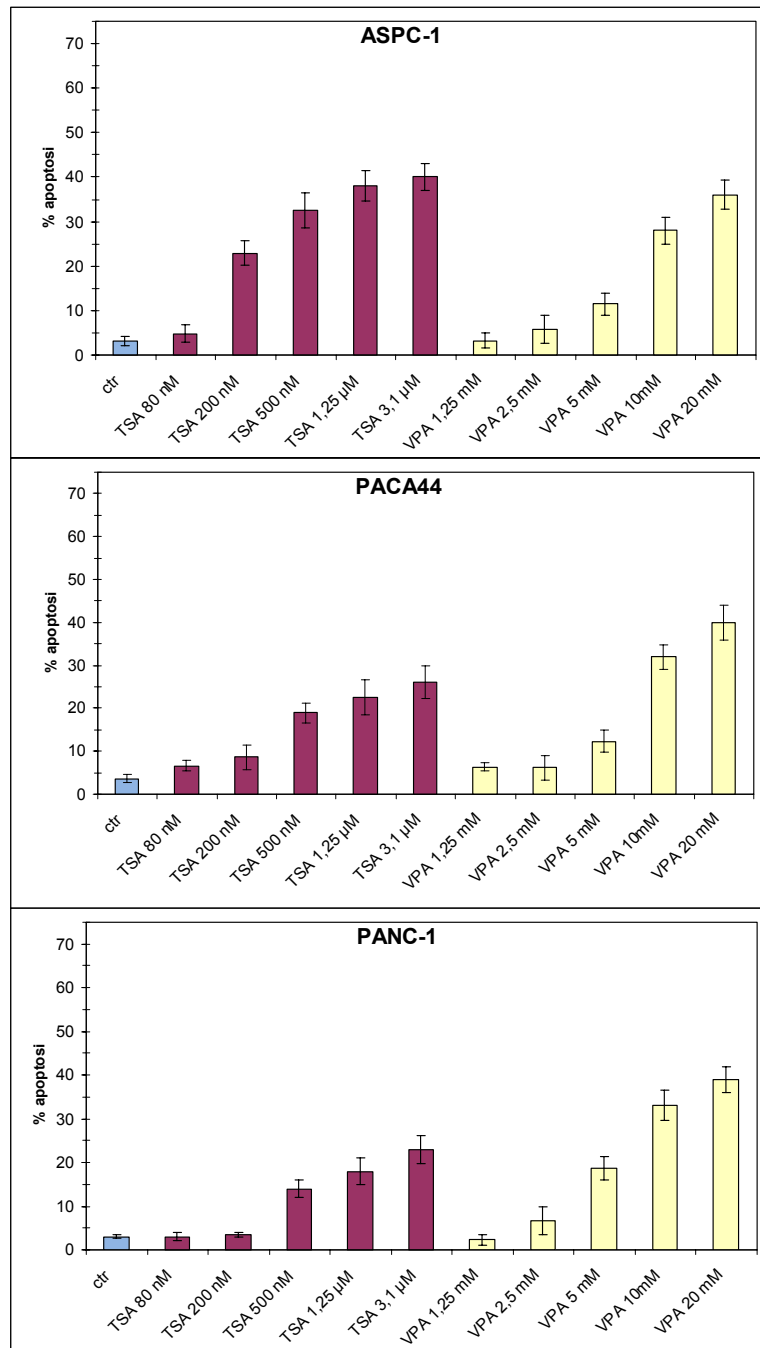


Fig. 1 Le tre linee cellulari ASPC-1, PACA44 e PANC-1 sono state trattate con il TSA alle concentrazioni 80 nM, 200 nM, 500 nM, 1,25 µM e 3,1 µM e con il VPA alle concentrazioni 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM per 48h. Alla fine di ciascuna incubazione, le cellule sono state permeabilizzate, marcate con Ioduro di Propidio (PI) ed analizzate al citofluorimetro. I risultati sono stati espressi come percentuale di apoptosi e rappresentano le medie $\pm$ deviazioni standard di tre esperimenti indipendenti.

Dopo aver stabilito la dose da utilizzare per ciascuna sostanza sono andati a verificare se le 48h corrispondevano realmente al tempo più opportuno per effettuare le successive indagini molecolari. A tale scopo ho allestito degli esperimenti per valutare l'apoptosi indotta da TSA e VPA in cinetica, a tre tempi: 24, 48 e 72 h.

Nelle cellule non trattate si misura una percentuale di apoptosi mai superiore al 5%, in linea con l'attesa quantità di apoptosi spontanea in coltura. Dai risultati ottenuti si può osservare (Fig. 2 A) che il TSA innesca una percentuale di apoptosi maggiore nelle ASPC-1 rispetto alle altre linee ($p<0,01$): infatti si può osservare che il livello di morte cellulare con TSA a 48h raggiunge il 34,6% in ASPC-1, mentre è del 19% in PACA44 e del 14% in PANC-1. Alle 72h, si può riscontrare un aumento di apoptosi con questo inibitore in tutte e tre le linee cellulari, rimanendo sempre più elevata in ASPC-1 (52%) che in PACA44 (32,7%) e in PANC-1 (28%) ($p<0,01$). Il trattamento con il VPA dopo 48h ha, invece, un effetto simile in tutte e tre le linee, passando dal 28% in ASPC-1 al 32% in PACA44 e al 33% in PANC-1, e dopo 72h il VPA induce apoptosi in misura maggiore nelle PACA44 (43%) e nelle PANC-1 (45%) rispetto alle ASPC-1 (35,5%) (**: $p<0,05$). Come si può osservare entrambi i trattamenti a 24 h hanno un effetto minore del 10 % nelle tre linee cellulari.

Riguardo a ciascuna linea, si può osservare che le ASPC-1 dopo 48h di trattamento, non presentano una significativa differenza di suscettibilità alle due sostanze, mentre tale differenza aumenta e diventa significativa dopo 72h (*: $p<0,01$). Un andamento diverso si osserva per le linee PACA44 e PANC-1 che risultano più sensibili al VPA che al TSA sia dopo le 48h che le 72h (Δ : $p<0,01$; $\Delta \Delta$: $p<0,05$).

Per valutare se l'efficacia di induzione di apoptosi di queste due sostanze fosse rilevabile anche a tempi più brevi sono andati a verificare la presenza di fosfatidilserina (PS) sullo strato esterno della membrana plasmatica, mediante l'utilizzo di annessina V marcata. Questo evento, infatti, si manifesta precocemente durante lo svolgimento della morte per apoptosi. Come si può osservare dal Fig.2 B si rileva un livello significativo di cellule apoptotiche già a 24 h ($p<0,01$). Come evidenziato dalla precedente analisi come la linea ASPC1 mostra una maggiore sensibilità al TSA rispetto al VPA (*: $p<0,01$). Anche in questo caso la sensibilità all'acido valproico risulta essere di simile entità nelle tre linee.

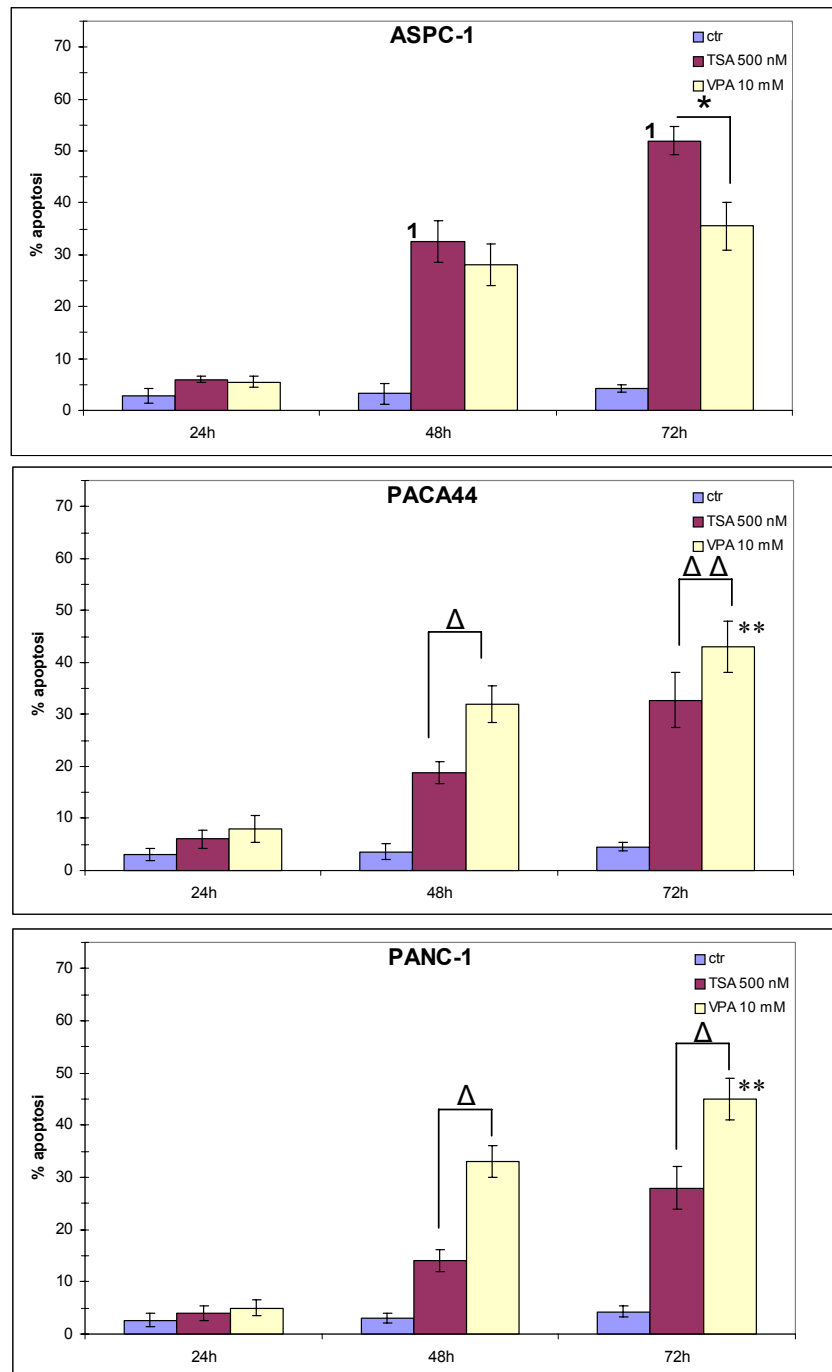


Figura 2 A: Le tre linee cellulari ASPC-1, PACA44 e PANC-1 sono state trattate con il TSA e VPA rispettivamente alla concentrazione di 500 nM e 10 mM per 24, 48 e 72 h. Alla fine di ciascuna incubazione, le cellule sono state permeabilizzate, marcate con Ioduro di Propidio (PI) ed analizzate al citofluorimetro. I risultati sono stati espressi come percentuale di apoptosi e rappresentano le medie $\pm$ deviazioni standard di sette diversi esperimenti. L'analisi statistica per valutare le differenze tra i due trattamenti (*, Δ : $p < 0,01$; $\Delta\Delta$ $p \leq 0,05$) e tra le diverse linee (1: $p < 0,01$; **: $p < 0,05$) è stata calcolata con il test t Welch a due campioni.

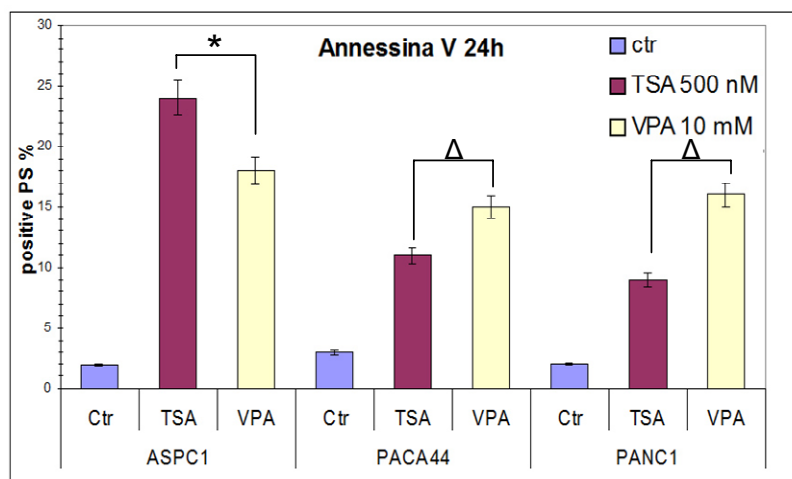


Figura 2 B: Le tre linee cellulari sono state trattate per 24 h con TSA 500 nM e VPA 10mM ed è stata analizzata la quantità di cellule positive all'Annessina V FITC, escluse le cellule positive allo Ioduro di Propidio. I valori considerati sono stati ottenuti calcolando le medie $\pm$ deviazioni standard di tre esperimenti indipendenti. Le differenze tra i due trattamenti sono significative con $p < 0,01$ (*, Δ) secondo il test *t* Welch.

2. Il TSA ed il VPA inibiscono la proliferazione cellulare in linee di adenocarcinoma pancreatico

Dal momento che tra gli effetti indotti dagli inibitori delle deacetilasi istoniche vi è anche l'inibizione della crescita cellulare, sono andato a verificare se TSA e VPA avessero questa capacità nelle linee cellulari prese come modello. A tale scopo ho effettuato il saggio di proliferazione cellulare MTT. Le linee cellulari ASPC1, PACA44 e PANC1 sono state trattate per 24, 48 e 72 h con TSA 500 nM e VPA 10 mM. L'analisi è stata effettuata in relazione a cellule non trattate prese come controllo, che è espresso nei grafici come valore unitario di riferimento. Come viene mostrato in Fig. 3, sia il TSA che il VPA inibiscono fortemente la crescita cellulare, con un andamento simile a quello che si è osservato nell'analisi apoptotica. Infatti, la prima cosa che si può osservare è che l'effetto inibitorio aumenta con l'aumentare del tempo di incubazione e nonostante sia evidente con entrambe le sostanze utilizzate, si nota che le linee cellulari mostrano una diversa sensibilità al TSA. Infatti la linea cellulare ASPC-1 risulta essere più sensibile al TSA rispetto alle altre linee, con un'inibizione della crescita del 47% dopo 24h, del 69% dopo 48h e del 78% dopo 72h, rispetto a PACA44 (12% in 24h, 28% in 48h, 40% dopo 72h) e PANC-1 (10% in 24h, 38% dopo 48h e 52% dopo 72h) (Δ : $p < 0,01$). Si può notare invece che l'inibizione della proliferazione indotta dal VPA, non presenta differenze significative nelle tre linee tumorali

dopo 24, 48 e 72h essendo del 30%, del 58% e del 67% in ASPC-1, del 31%, del 60% e del 75% in PACA44 e del 28%, 57% e 71% in PANC-1. All'interno delle tre linee si può notare che le ASPC-1 sono più sensibili al TSA rispetto al VPA in maniera statisticamente significativa a 24 e 72h (*: $p \leq 0,01$), mentre un andamento opposto viene rilevato per le altre due linee con una significatività di $p \leq 0,01$ (Δ) per tutti e tre i tempi di trattamento.

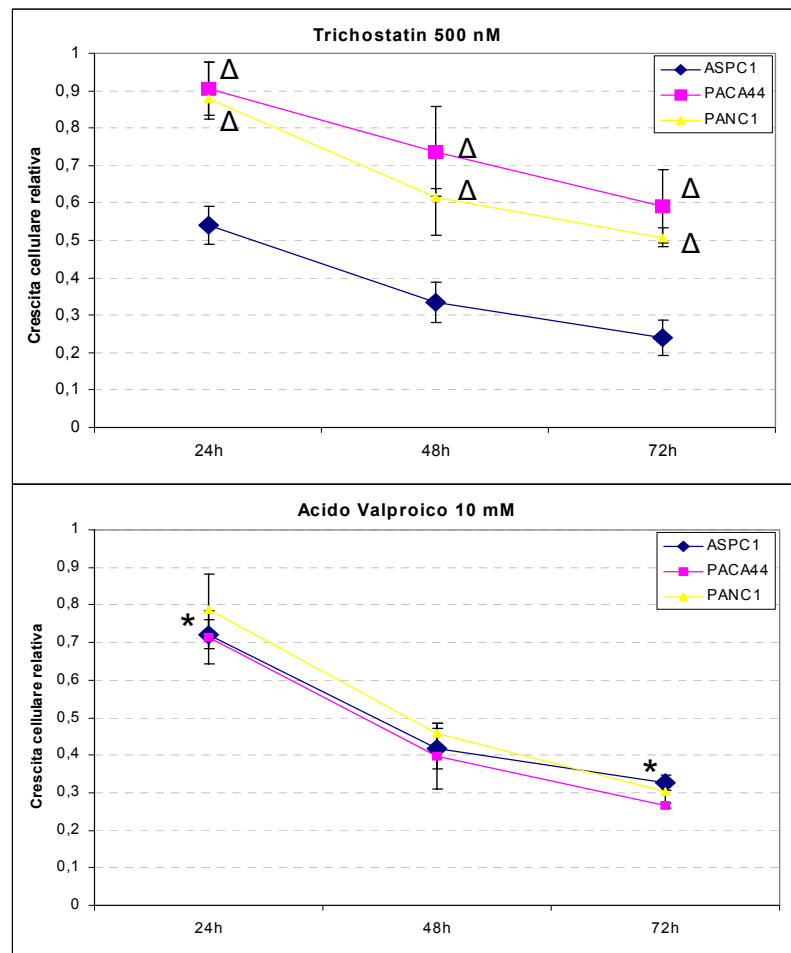


Figura 3: Le tre linee sono state trattate con TSA e VPA per 24, 48 e 72h. Al termine di ciascuna incubazione, la proliferazione cellulare è stata valutata tramite il saggio MTT. I valori considerati sono stati ottenuti calcolando le medie $\pm$ deviazioni standard di cinque esperimenti indipendenti. Le differenze tra i due trattamenti sono significative con $p \leq 0,01$ (*, Δ) secondo il test *t* Welch.

3. Il TSA e il VPA innescano la via apoptotica intrinseca: caduta del potenziale di membrana mitocondriale

Per determinare se la via apoptotica indotta dal TSA e dal VPA procede attraverso la via apoptotica intrinseca, è stato valutato l'effetto di questi due inibitori sul potenziale di membrana mitocondriale, dopo trattamento per 48h e 72h, con il colorante cationico lipofilico JC-1. È stata quindi analizzata al citofluorimetro la fluorescenza nel rosso (FL-2), rappresentante la forma aggregata del colorante che si rileva nelle cellule in cui è mantenuto un potenziale di membrana mitocondriale e la fluorescenza nel verde (FL-1) che rappresenta la forma monomerica del colorante presente nelle cellule in cui si è persa la polarizzazione di membrana mitocondriale. Come si può vedere in Fig. 4 e 5, il TSA ed il VPA inducono depolarizzazione della membrana mitocondriale, ciò è rappresentato dagli eventi compresi nella regione indicata. Anche con questa tecnica si conferma il dato che la linea ASPC-1 risulta più sensibile al TSA rispetto alle altre due linee ($p < 0,01$). Minori sono le differenze riscontrate tra le linee in seguito al trattamento con VPA. All'interno di ciascuna linea cellulare si osserva per entrambi i tempi di trattamento, che la linea tumorale ASPC-1 presenta una depolarizzazione maggiore con il TSA piuttosto che con il VPA, mentre per le linee PACA44 e PANC-1 si ha l'effetto opposto ($p < 0,05$). Inoltre si può osservare che la depolarizzazione aumenta nel tempo, nelle tre linee cellulari dopo 72h rispetto alle 48h con entrambi i trattamenti. Questo stato di alterazione della membrana mitocondriale è un evento necessario per innescare la via apoptotica intrinseca, che procede poi con il rilascio del Citocromo c nel citosol per l'attivazione della cascata apoptotica che porta alla morte cellulare.

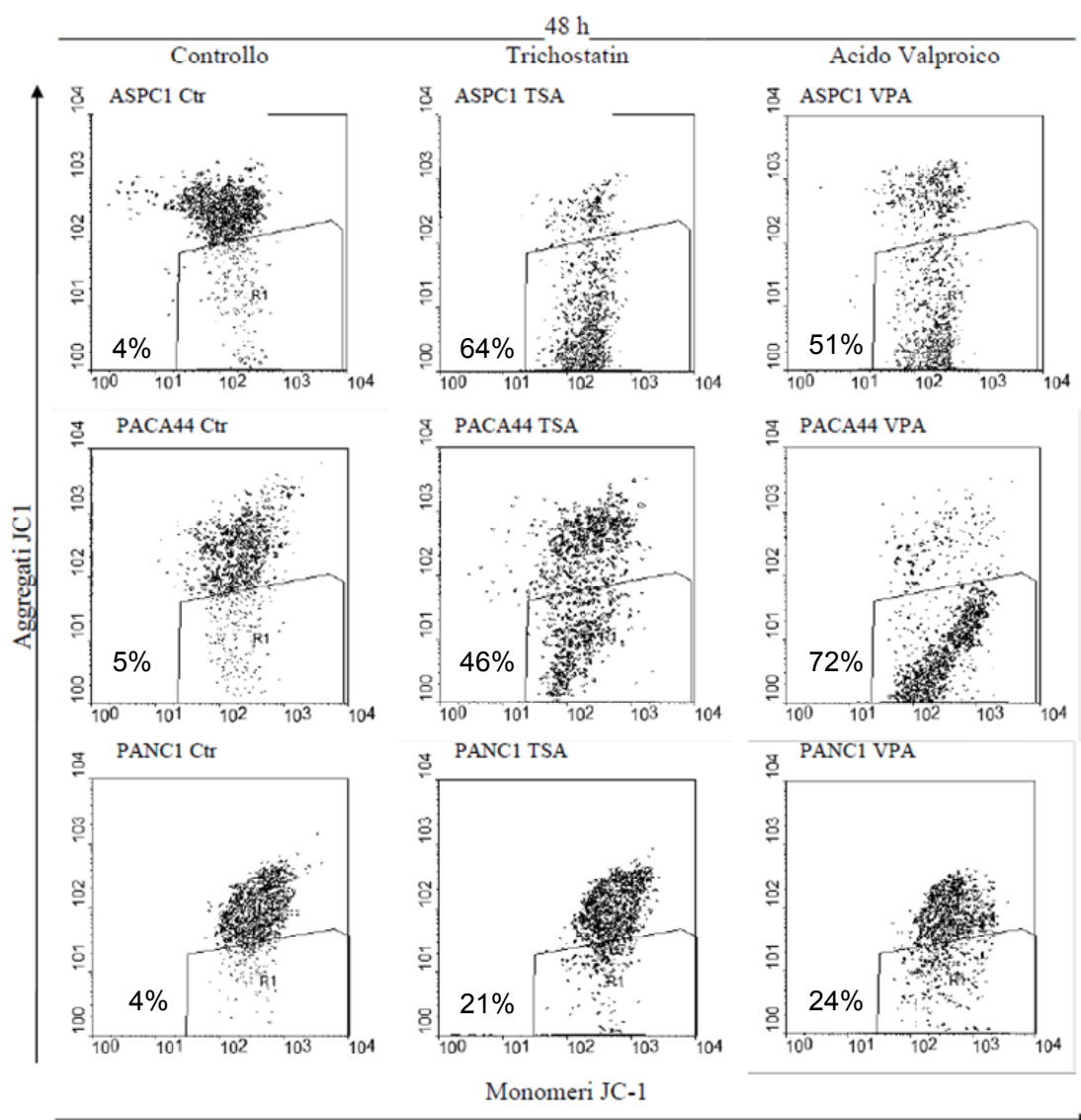


Figura 4: Le tre linee cellulari ASPC-1, PACA44 e PANC-1 sono state trattate con il TSA e VPA rispettivamente alla concentrazione di 500 nM e 10 mM per 48 h e sono state analizzate al citofluorimetro dopo colorazione con JC-1. I dati presentati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili.

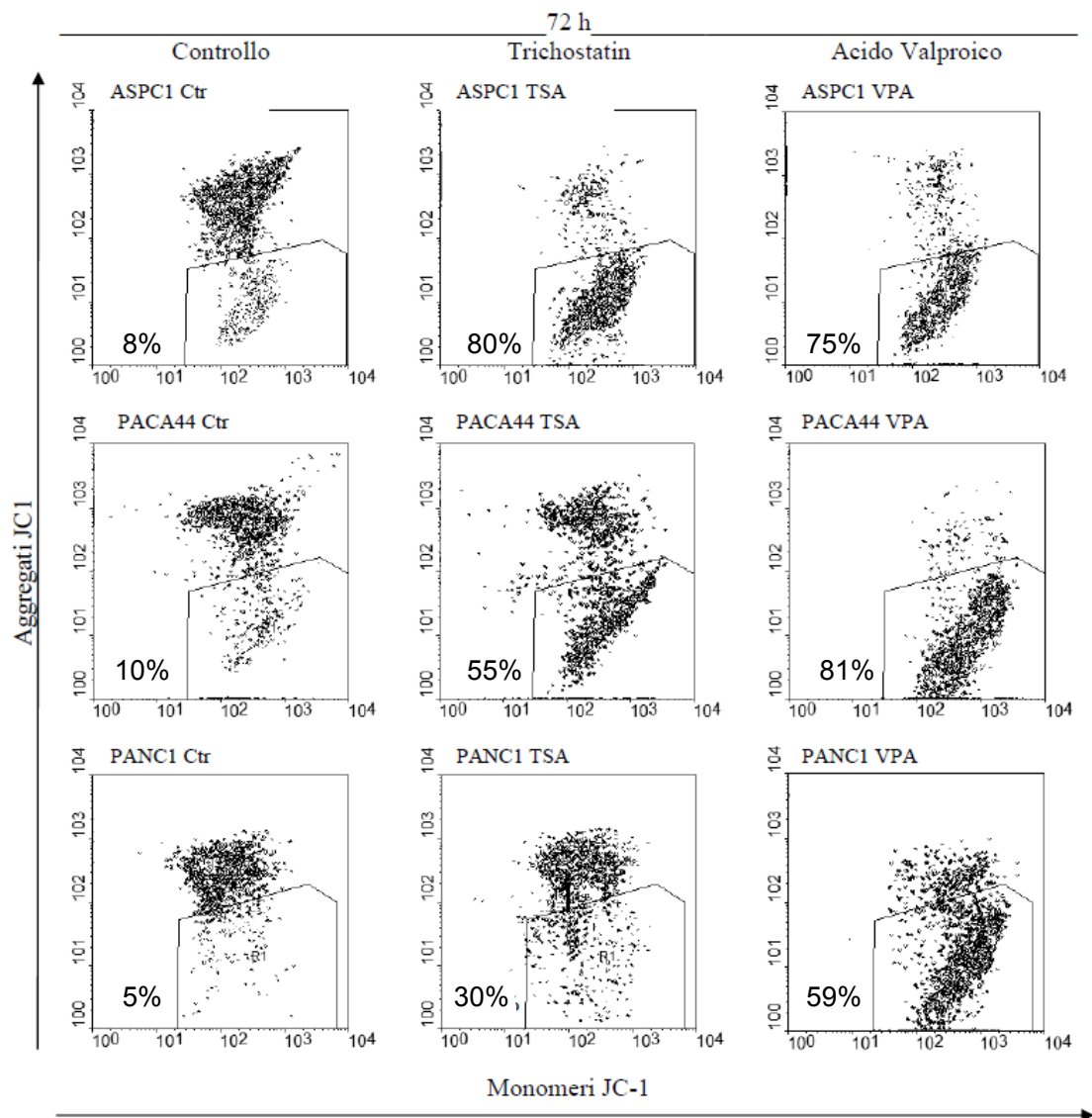


Figura 5: Le tre linee cellulari ASPC-1, PACA44 e PANC-1 sono state trattate con il TSA e VPA rispettivamente alla concentrazione di 500 nM e 10 mM per 72 h e sono state analizzate al citofluorimetro dopo colorazione con JC-1. I dati presentati sono relativi ad un esperimento rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati comparabili.

4. Il TSA e il VPA innescano la via apoptotica intrinseca: rilascio di Citocromo c nel citoplasma ed attivazione della Caspasi 3

Visto che l'analisi dello stato del potenziale di membrana mitocondriale ci ha permesso di evidenziare che in seguito al trattamento con TSA e VPA si verifica una depolarizzazione della membrana mitocondriale, sono andato a verificare se questa comportasse anche la traslocazione del Citocromo c dal mitocondrio al citosol. A tale scopo ho lisato le cellule con un tampone contenente digitonina che permette di separare il contenuto citoplasmatico lasciando gli organelli integri.

Quindi ho analizzato tramite Western Blotting la presenza di Citocromo c nell'estratto proteico citosolico dopo 48h di trattamento con TSA e VPA rispetto al controllo. Come si può vedere in fig. 6 nella linea ASPC-1 si rileva evidente la presenza della banda corrispondente al Citocromo c in risposta al TSA ed una banda di entità di poco inferiore in risposta al VPA, mentre nelle altre due linee cellulari si ha una quantità più rilevante di Citocromo c in risposta al VPA rispetto a quella dovuta al trattamento con TSA. Sugli stessi estratti si è analizzata, anche la presenza della caspasi-3 attivata in quanto in un precedente lavoro in seguito ad un induzione di apoptosi in cellule di adenocarcinoma pancreatico gli autori descrivevano un meccanismo caspasi indipendente (Garcia Morales *et al.*, 2005).

I risultati evidenziano che la forma inattiva della caspasi-3 (pro-caspasi-3 PM. 32 kD) è abbondantemente presente nel controllo, mentre diminuisce in seguito ai trattamenti con VPA e TSA in tutte le tre linee, conseguenza dell'attivazione. Inoltre l'attivazione delle caspasi 3 è evidente per la comparsa negli estratti delle cellule trattate della forma attiva di queste proteasi (PM 17 kD). In particolar modo nelle PACA44 e nelle PANC-1 in risposta al VPA e nelle ASPC-1 in risposta al TSA. I risultati ottenuti attraverso questi esperimenti mi permettono di affermare che il TSA ed il VPA inducono l'apoptosi nelle suddette linee tumorali pancreatiche, e che questo processo coinvolge la via intrinseca portando all'attivazione della caspasi-3.

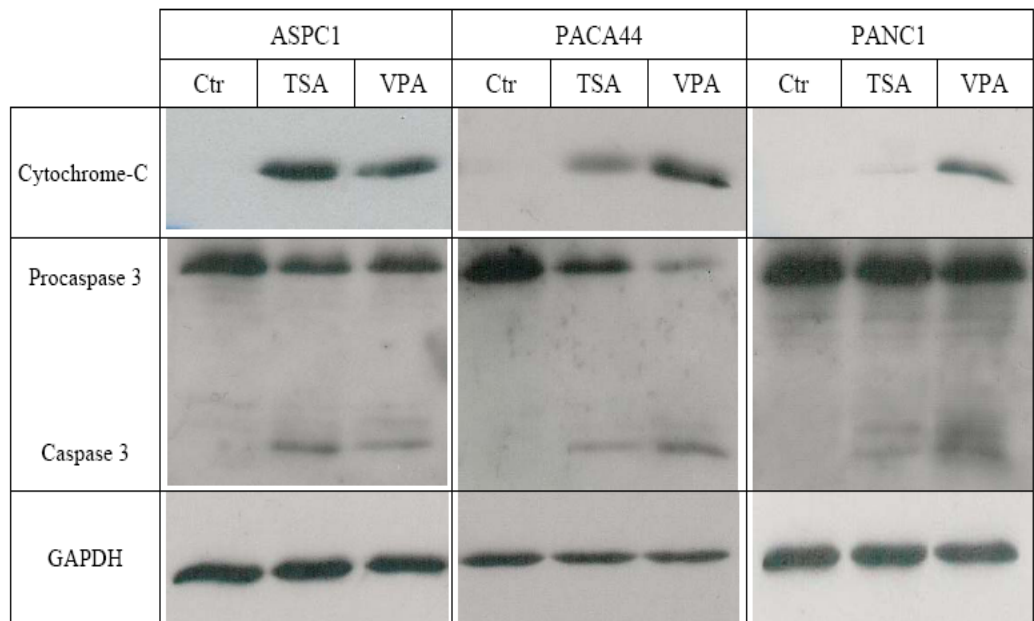


Figura 6: Le linee cellulari ASPC-1, PACA44 e PANC-1 sono state trattate con TSA 500 nM e VPA 10 mM per 48h ed in seguito all'estrazione proteica frazionata, è stata valutata la presenza di Citocromo c nella frazione citosolica ed il processamento della procaspasi-3 mediante Western Blotting. Una pari quantità di estratti proteici (30 µg) è stata analizzata con gli specifici anticorpi anti-citocromo c e anti-caspasi-3 ed il segnale di espressione delle proteine è stato rilevato tramite il metodo ECL.

5. L'apoptosi indotta da TSA e VPA è contrastata da Cycloheximide.

Il meccanismo mediante il quale gli inibitori delle deacetilasi inducono apoptosi è ancora per la maggior parte da comprendere. È noto che il trattamento con queste sostanze modula l'espressione di molti geni, sia in positivo che in negativo. In alcuni modelli è stato visto che l'effetto proapoptotico degli inibitori è dipendente da nuova sintesi proteica (Medina *et al.*, 2007). Sono andato a verificare cosa succedeva in seguito al trattamento con TSA e VPA con e senza cycloheximide (CHX), un inibitore della sintesi proteica. In particolare ho allestito esperimenti di trattamento combinato TSA o VPA con CHX alla concentrazione di 3 μ M sulle tre linee ASPC1, PACA44, PANC1 per 48h. Questa concentrazione è stata scelta entro l'intervallo di utilizzo (15nM - 50 μ M) per esperimenti simili in diversi modelli riportati in letteratura; in particolare abbiamo scelto una dose che potesse avere un effetto sulla sintesi proteica senza causare una mortalità cellulare consistente. Come si può osservare in fig. 7, infatti, la mortalità per la linea cellulare ASPC1 trattata con la sola CHX risulta essere intorno al 15%. Nonostante questo, l'inibizione della sintesi proteica non aumenta l'efficacia dei due trattamenti TSA e VPA, al contrario ne riduce notevolmente la capacità proapoptotiche. Per quanto riguarda la diminuzione di efficacia delle due sostanze il TSA risulta essere contrastato nelle tre linee cellulari in quantità statisticamente significativa nelle linee ASPC1 e PACA44 (*: $p < 0,01$). Invece per il VPA tale diminuzione è significativa in tutte le tre linee cellulari (*: $p < 0,01$). Si può quindi affermare che l'apoptosi indotta da TSA e VPA nelle tre linee cellulari è notevolmente favorita da sintesi proteica de novo. La relazione tra apoptosi indotta da questi HDACi e sintesi proteica fa ipotizzare che essi siano responsabili dell'aumento di espressione proteica di un qualche fattore che favorisce l'apoptosi.

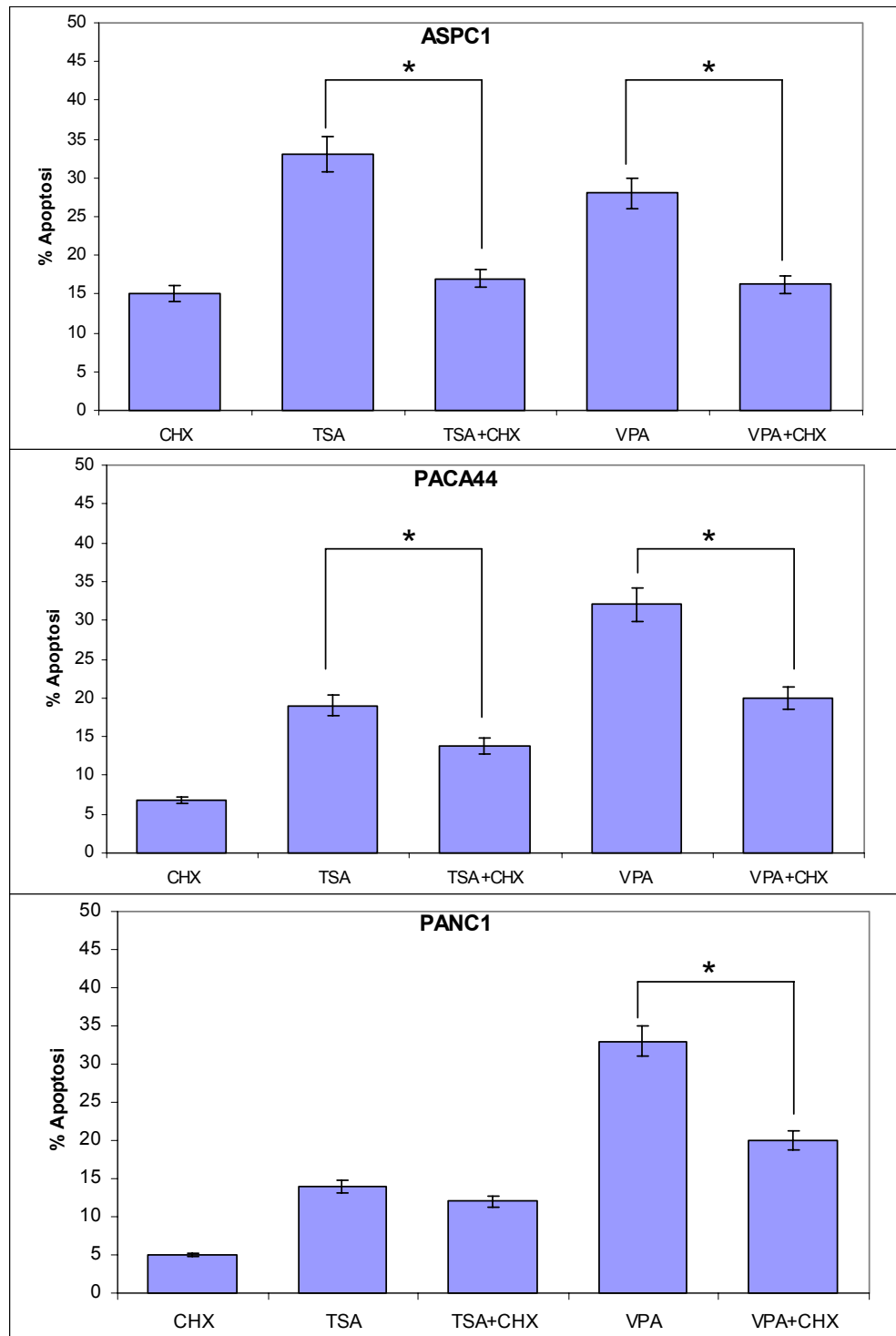


Figura 7: Le tre linee cellulari ASPC-1, PACA44 e PANC-1 sono state trattate con TSA 500 nM e VPA 10 mM con e senza Cycloheximide 3 μ M per 48 h. Alla fine di ciascuna incubazione, le cellule sono state permeabilizzate, marcate con Ioduro di Propidio (PI) ed analizzate al citofluorimetro. Le medie e le deviazioni standard sono state calcolate dai risultati ottenuti in tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica per determinare la diminuita efficacia dei due trattamenti in seguito ad inibizione della sintesi proteica è stata effettuata con il test *t* di Welch a due campioni (*: $p < 0,01$).

6. Il TSA ed il VPA aumentano l'espressione delle proteine BH3-only Bim e Puma

Per verificare l'ipotesi che TSA e VPA inducono direttamente o indirettamente l'espressione di fattori pro-apoptotici, sono andato a valutare quali potessero essere. Ho analizzato la modulazione dei membri della famiglia di Bcl-2. In particolare sono andato a saggiare l'espressione di alcune BH3-only, visto che si ritiene siano i sensori del danno cellulare, infatti essi sono i componenti a monte del meccanismo di segnalazione biochimica della via apoptotica intrinseca. Sono quindi andato a valutare se l'apoptosi, indotta da questi due inibitori delle deacetilasi, fosse dovuta alla variazione di espressione di alcuni geni delle BH3-only quali *bim*, *puma*, *bad* e *bmf*. In particolare ho scelto questi membri tra le BH3-only in quanto Bim e Puma, insieme a tBid, rappresentano i più efficaci induttori di apoptosi sia mediante la loro interazione con i pro-apoptotici che con gli anti-apoptotici, secondo le teorie ipotizzate per il meccanismo d'azione delle BH3-only (Willis e Adams 2005; Brunelle e Letai 2009). Per quanto riguarda Bim, inoltre, è già stato osservato l'aumento dell'espressione genica in seguito al trattamento con TSA (Moore *et al.*, 2004). Bad e Bmf invece sono tra le BH3-only che sono state osservate essere indotte dagli inibitori delle deacetilasi istoniche ma mai in linee pancreatiche. Ho quindi effettuato un'estrazione di RNA totale dalle cellule dopo trattamento per 24h con il TSA 500 nM ed il VPA 10 mM. L'RNA estratto è stato retrotrascritto mediante trascrittasi inversa in cDNA. I retrotrascritti così ottenuti sono stati amplificati tramite PCR Real Time con Sybr Green come colorante. Come si può vedere in fig. 8A in seguito al trattamento con VPA *bim* e *puma* vengono regolati positivamente, mentre in seguito al trattamento con TSA soltanto *bim* risulta essere indotto in tutte e tre le linee a differenza di *puma* che risulta aumentare solo nella linea ASPC-1. Per valutare se questa variazione di espressione genica si traducesse anche in un aumento dell'espressione proteica sono andato ad analizzare mediante SDS-PAGE, seguito da Western Blotting, la quantità degli stessi membri della famiglia di BH3-only, in seguito al trattamento per 48h.

Come si può vedere dalla fig. 8B queste linee presentano un livello di espressione rilevabile di tutte e quattro le proteine e l'espressione di Bim e Puma risulta essere aumentata sia in seguito al trattamento con TSA che con VPA, anche se quest'ultimo ha una maggior efficacia. Invece per quanto riguarda Bmf e Bad, come si può vedere in fig. 8, non sembrano essere regolate dai trattamenti. Si può quindi affermare che nel nostro modello sia il TSA che il VPA, quest'ultimo in misura maggiore, portano all'innescio della via apoptotica tramite l'aumento dell'espressione proteica di Bim e Puma. Bmf e Bad, diversamente da quanto visto

in altri modelli, non risultano essere indotti dal trattamento con TSA e VPA né al livello genico né al livello proteico.

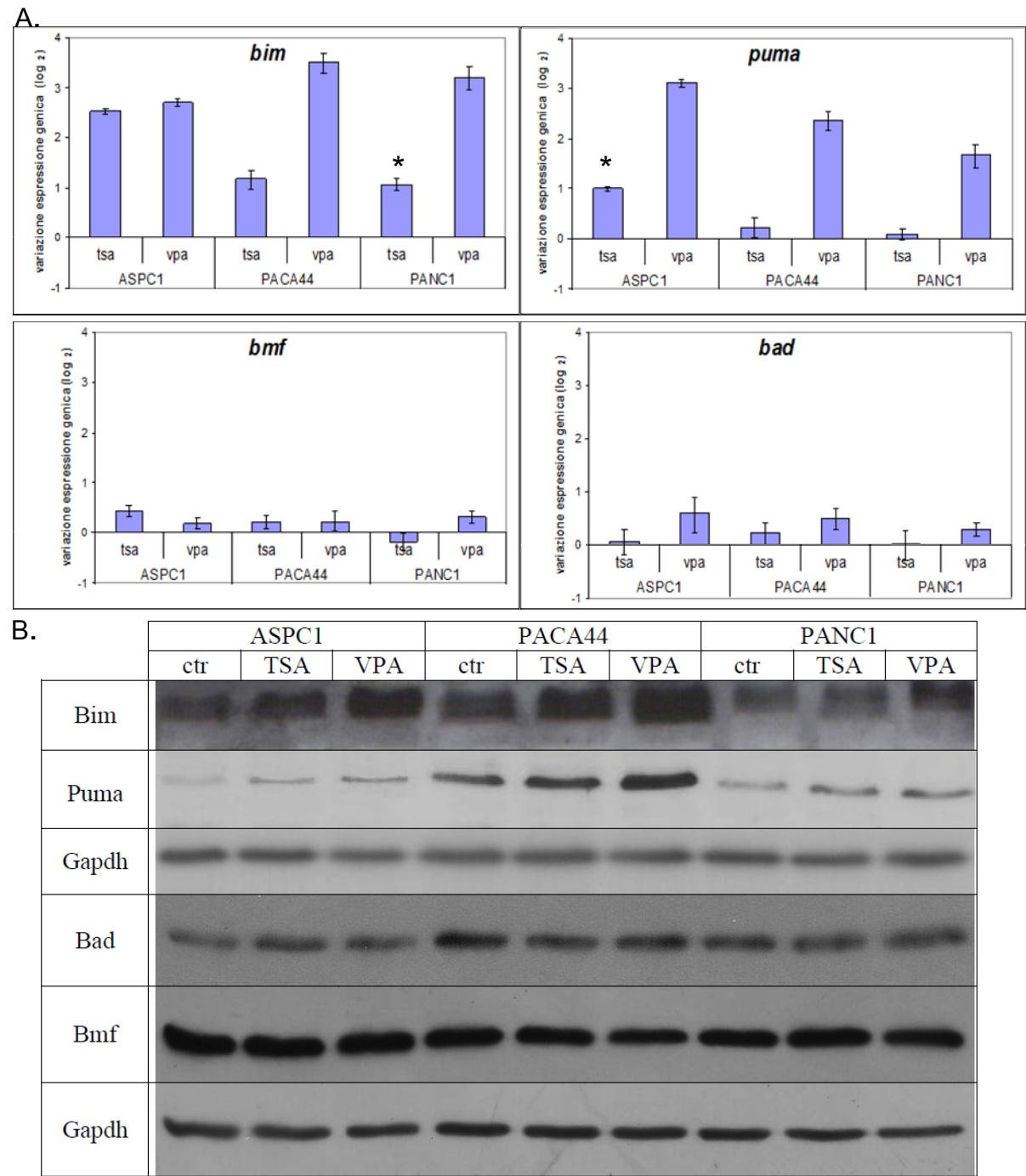


Figura 8: A. Modulazione espressione genica: le tre linee sono state trattate con TSA e VPA per 24 h ed in seguito ne è stato estratto RNA che è stato retrotrascritto in cDNA ed amplificato mediante PCR-Real Time. Ciascuna barra rappresenta il log₂ dei rapporti di espressione genica trattato/actina normalizzati rispetto al controllo. I risultati rappresentano le medie e le deviazioni standard di tre diversi esperimenti. L'aumento di espressione è statisticamente significativo con $p<0,01$ (*) **B.** Modulazione espressione Proteica:Le linee cellulari ASPC-1, PACA44 e PANC-1 sono state trattate con TSA e VPA per 48h ed in seguito all'estrazione proteica, è stata valutata la presenza di Bim, Puma, Bad e Bmf mediante Western Blotting. Una pari quantità di estratti proteici (30 µg) è stata analizzata con gli specifici anticorpi ed il segnale di espressione delle proteine è stato rilevato tramite il metodo ECL.

7. Effetti del TSA e del VPA sui membri multidominio Bax, Bak e

Bcl-xL

Dal momento che, come osservato nel precedente lavoro con il sodio butirrato (Natoni et al., 2005), il trattamento portava ad una diminuzione dell'espressione di Bcl-x_L, nelle stesse linee cellulari, sono andato a verificare se anche TSA e VPA avessero tale effetto con la tecnica del Western Blotting, dopo 48h di trattamento. Come si può vedere in figura 9 solo il VPA risulta inibire l'espressione proteica di Bcl-x_L, nelle tre linee ASPC1, PACA44 e PANC1 diversamente dal TSA che invece sembra non avere effetti su questo anti-apoptotico. Visto che, in diversi modelli, in risposta ad alcuni inibitori delle deacetilasi istoniche si ha un aumento dell'espressione di Bax e Bak (Garcia-Morales *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2004), sono andato a valutare anche i livelli di espressione di questi due membri multidominio della famiglia di Bcl-2. Come si può osservare in figura 9 l'espressione proteica di Bax non subisce una rilevante variazione, nelle tre linee cellulari, con entrambi i trattamenti. Per Bak, invece si ha un aumento dell'espressione, evidente nella linea cellulare ASPC1, in seguito al trattamento con VPA.

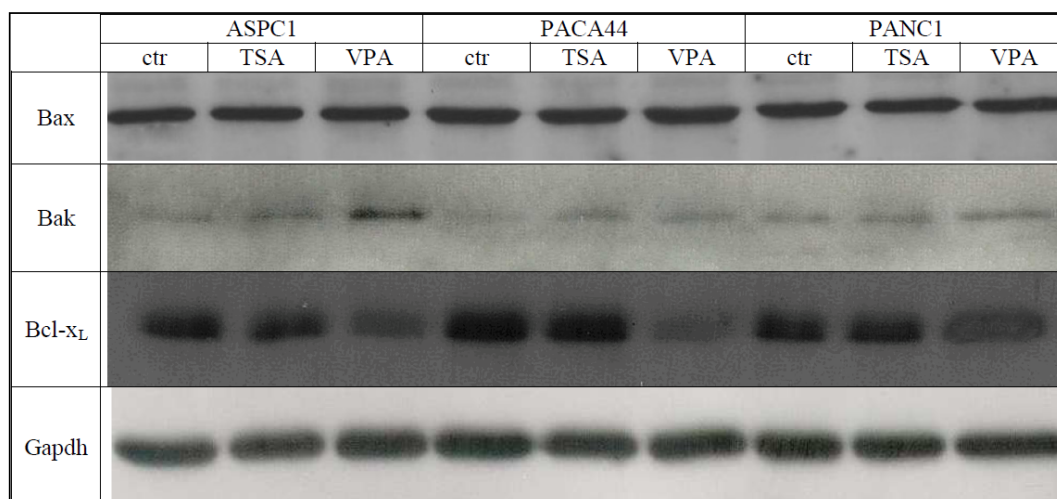


Figura 9: Le linee cellulari ASPC-1, PACA44 e PANC-1 sono state trattate con TSA 500 nM e VPA 10 mM per 48h ed in seguito all'estrazione proteica è stata valutata la presenza di Bax, Bak e Bcl-x_L mediante Western Blotting. Una pari quantità di estratti proteici (50 µg) è stata analizzata con gli specifici anticorpi ed il segnale di espressione delle proteine è stato rilevato tramite il metodo ECL.

8. Il TSA ed il VPA inducono l'attivazione di Bak e Bax

Visto che sia l'aumento di Puma e di Bim che la diminuzione di Bcl-x_L favoriscono l'oligomerizzazione di Bax e Bak, evento che porta al rilascio di Citocromo c dal mitocondrio ed alla caduta del potenziale di membrana mitocondriale, sono andato a studiare l'attivazione di queste due proteine in seguito al trattamento con TSA e VPA.

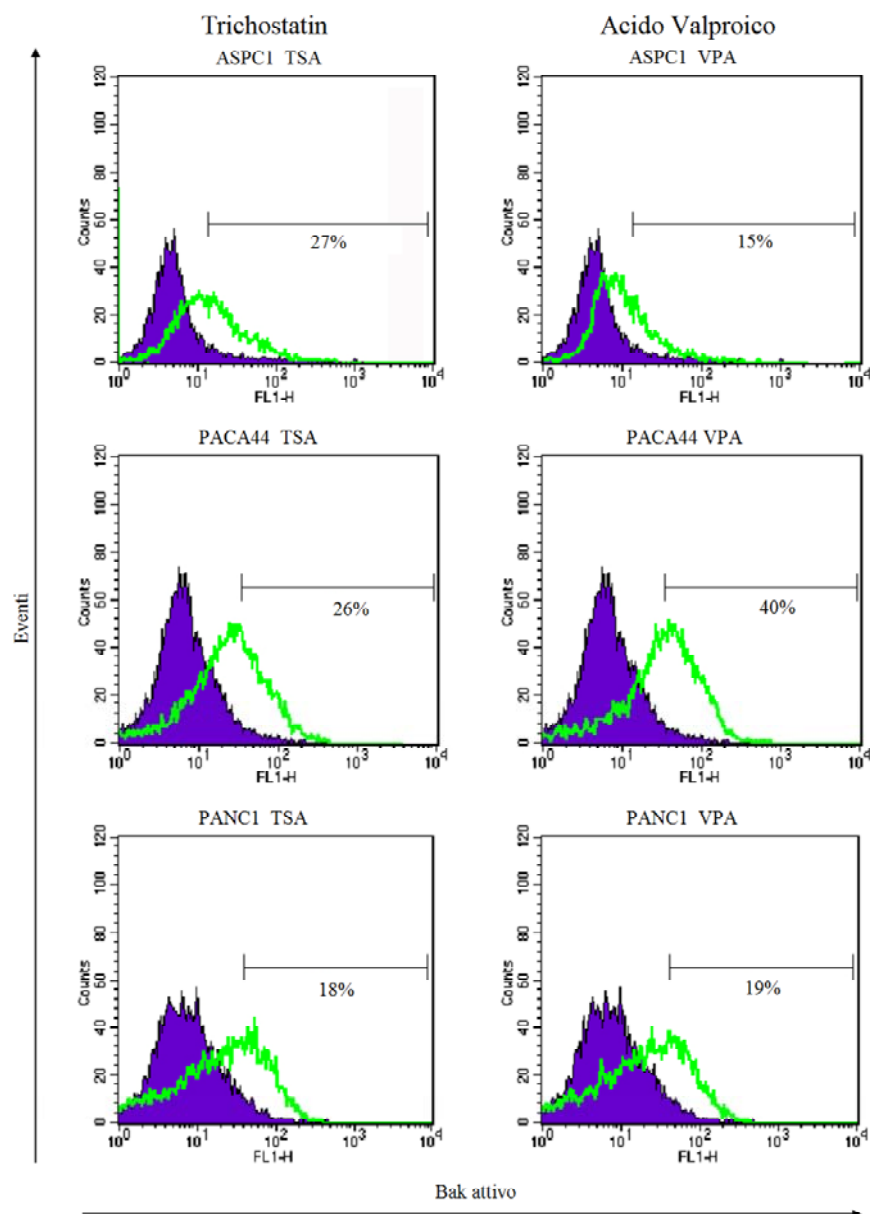
Infatti anche se l'espressione delle proteine, come valutato in Western Blotting, non mostrava rilevanti differenze tra trattati e non trattati è l'attivazione delle proteine Bak e Bax che permette l'innescare dell'apoptosi e non la semplice espressione.

L'attivazione comporta l'esposizione degli epitopi della porzione ammino-terminale di Bak e Bax dovuta al cambiamento conformazionale della proteina (Griffiths *et al.*, 2001). Questo cambiamento è rilevabile mediante l'utilizzo di anticorpi specifici che riconoscono l'epitopo che viene esposto. Per valutare l'attivazione di Bak ho allestito un esperimento di immunofluorescenza utilizzando l' anticorpo anti Bak specifico per la porzione aminoterminale (1-52). Dopo aver trattato con TSA e VPA per 48 h le tre linee cellulari ASPC1, PACA44 e PANC1 ho fissato le cellule e le ho incubate con l'anticorpo anti Bak in una soluzione contenente il detergente digitonina che permette l'ingresso dell'anticorpo attraverso la membrana citoplasmatica. Come si può osservare dalla fig. 10A Bak si attiva in seguito al trattamento. Considerando la risposta delle tre linee cellulari il trend di attivazione mostrato da questa proteina, in seguito al trattamento con TSA e VPA, correla con l'andamento dell'apoptosi e della variazione del potenziale di membrana mitocondriale. Infatti la linea ASPC1, che aveva mostrato una sensibilità relativamente maggiore al TSA rispetto al VPA, risulta avere anche un'attivazione relativa maggiore in seguito al trattamento con TSA piuttosto che con il VPA. Per l'analisi dell'attivazione di Bax abbiamo scelto di immunoprecipitare con l'anticorpo monoclonale 6-A7 che riconosce la porzione ammino-terminale della proteina esposta in seguito ad attivazione. Gli estratti proteici sono stati ottenuti lisando, le tre linee cellulari trattate con TSA e VPA, con il detergente zwitterionico CHAPS all'1% (è noto che altri detergenti come il Triton e l'NP40 possono dare artefatti in quanto determinano essi stessi l'esposizione della porzione ammino-terminale di Bax). Quindi gli immunoprecipitati sono stati risolti mediante Western Blotting ed è stata rilevata la quantità di Bax attivo con un secondo anticorpo policlonale anti-Bax. Come si può osservare in fig.10B, in seguito al trattamento con VPA si ha un considerevole aumento della forma

attiva di Bax in tutte le linee esaminate mentre minore è l'effetto riscontrato in seguito al trattamento con il TSA.

Questi dati ci permettono di dire che la riduzione della proteina di sopravvivenza Bcl-x_L, l'aumento dell'espressione delle proteine proapoptotiche Bim e Puma contribuiscono all'attivazione della via apoptotica intrinseca mediata dal VPA, portando all'attivazione di Bax e Bak. Per quanto riguarda il TSA questo ha minori effetti sulla variazione di espressione, provoca un più lieve aumento di attivazione di Bax ed una comparabile attivazione di Bak. Questi effetti correlano solo in parte con la capacità di indurre apoptosi di questo HDACi quindi si suppone che esso agisca anche su altri meccanismi non ancora analizzati.

A.



B.

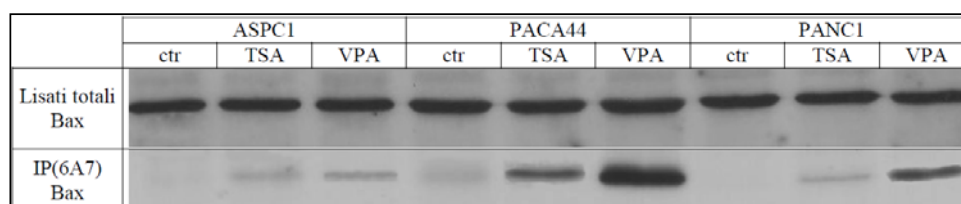


Figura 10: Le tre linee sono state trattate con TSA e VPA per 48h. In seguito al trattamento. **A.** L'attivazione di Bak è stata misurata mediante colorazione con Anti-Bak ed un anticorpo secondario marcato. La fluorescenza emessa è stata rilevata al citofluorimetro. **B.** L'attivazione di Bax è stata rilevata immunoprecipitando gli estratti proteici con anti-Bax 6A-7 e rilevando la presenza della proteina mediante Western Blotting con anti-Bax policlonale. Il segnale di espressione è stato rilevato tramite il metodo ECL.

Discussione

Lo scopo di questo lavoro di dottorato di ricerca è stato quello di valutare la capacità dell'acido valproico (VPA) e del trichostatin A (TSA) di indurre apoptosi, in linee di adenocarcinoma pancreatico duttale e di studiare quali fossero i meccanismi molecolari coinvolti in questo tipo di morte cellulare. I risultati ottenuti confermano ed ampliano i dati presenti in letteratura che indicano il TSA come un buon induttore di apoptosi per questo tipo di tumore. I risultati inoltre dimostrano per la prima volta in questo modello che il VPA è anch'esso un buon induttore di apoptosi con un'efficacia maggiore del TSA. Inoltre il meccanismo apoptotico che risulta essere innescato per entrambe le sostanze, coinvolge i mitocondri attraverso l'attivazione dei membri della famiglia di Bcl-2, Bak e Bax.

L'adenocarcinoma pancreatico duttale rappresenta una delle neoplasie con il più alto tasso d'incidenza e con una spiccata farmacoresistenza. Per questo motivo si stanno sperimentando diversi composti che possano indurre apoptosi o favorire quella indotta dai chemioterapici. Tra le sostanze in sperimentazione come anti-tumorali, negli ultimi anni, ha suscitato particolare interesse la classe degli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi). Questi sono stati osservati indurre apoptosi, inibire la crescita, sopprimere l'angiogenesi e modulare la risposta immunitaria. Quale sia il meccanismo con cui mediano questi effetti non è ancora stato chiarito, ma è comunque attribuito sia alla loro azione sulle deacetilasi istoniche che su numerosi altri bersagli. Perciò risulta necessario approfondire lo studio di queste sostanze, dei meccanismi d'azione e l'identificazione di marcatori in grado di predire la risposta ad essi (Marks e Xu 2009; Frew *et al.*, 2009).

Si è quindi scelto di approfondire gli studi riguardo l'apoptosi indotta da due HDACi, quali TSA e VPA, in modo da poter confrontare i diversi effetti ed i meccanismi imputabili ad essi. La scelta di queste due composti è dovuta a vari motivi. Innanzitutto il VPA è un farmaco già utilizzato come anti-epilettico, quindi come tale ne sono già noti dosaggi ed effetti collaterali, è chimicamente affine al Sodio Butirrato, già analizzato in un nostro precedente lavoro, ma a differenza di questo presenta una maggiore emivita nel sangue. Per i risultati ottenuti *in vitro* in diversi tipi cellulari questo HDACi è recentemente entrato in molti studi clinici, sia per il trattamento di tumori ematologici che per tumori solidi. Nel 2008 è stato pubblicato un lavoro di Jones *et al.* che dimostra l'inibizione della crescita tumorale, associandola all'inibizione di adesione, su alcune linee cellulari pancreatiche. Inoltre in un recente studio in cui, tra le altre, viene utilizzata anche la linea PANC-1 è stata mostrata la capacità di questo HDACi di sinergizzare con chemioterapici quali etoposide e gemcitabina senza, però, valutare i

meccanismi che coinvolgono l'apoptosi (Fritsche *et al.*, 2009). Per quanto riguarda il TSA, invece, diversi studi erano già stati affrontati su linee cellulari pancreatiche dal gruppo di ricerca di Scarpa e da quello di Garcia-Morales, ma non si era indagato approfonditamente sui meccanismi che coinvolgono la famiglia di Bcl-2, sia a livello genico che proteico (Donadelli *et al.*, 2007, Moore *et al.*, 2004; Garcia-Morales *et al.*, 2005). Sulla base di queste conoscenze, quindi, siamo andati a verificare l'efficacia dei trattamenti sulle tre linee.

Come prima cosa si sono individuate le concentrazioni da usare nei successivi esperimenti. Dall'analisi dei risultati di un esperimento di dose risposta si è scelto 10 mM per il VPA e 500 nM per il TSA, che rientrano nei limiti utilizzati nei lavori presenti in letteratura (Garcia-Morales *et al.*, 2005; Piacentini *et al.*, 2006; Duenas Gonzales *et al.*, 2008). Per quanto riguarda la risposta al TSA questi risultati si affiancano bene con quelli ottenuti dal gruppo di Scarpa. Infatti in questi lavori, in cui sono state studiate diverse linee cellulari tra cui, PACA44 e PANC-1, osserviamo gli stessi effetti di induzione di apoptosi e inibizione della proliferazione, oltre ad attivazione della caspasi-3 e regolazione genica positiva di *bim*.

Per la prima volta in questo tipo di linee cellulari si dimostra che, come il TSA, anche il VPA inibisce la crescita cellulare in maniera tempo dipendente.

Il coinvolgimento della via di attivazione apoptotica mitocondriale è dimostrato dalla caduta del potenziale di membrana, analizzato mediante colorazione con JC-1, e dalla determinazione del rilascio di Citocromo C, osservata tramite Western Blotting. Tali eventi sono caratteristici della via apoptotica intrinseca che è dunque coinvolta in seguito al trattamento con TSA e VPA.

Siamo poi andati a cercare quali fossero i fattori proteici implicati in questo processo. Poiché ci sono molti studi che hanno riscontrato l'associazione tra inibizione delle deacetilasi ed aumento di espressione proteica di pro-apoptotici, siamo andati a verificare se l'apoptosi indotta da TSA e VPA fosse o meno correlata alla sintesi proteica. Abbiamo inibito la traduzione mediante cycloheximide, uno specifico inibitore dell'apparato di allungamento della sintesi proteica, ed abbiamo misurato l'apoptosi in seguito al trattamento con i due HDACi. Questo ci ha permesso di verificare che l'inibizione dell'apparato traduzionale diminuisce l'efficacia apoptotica e ciò induce a pensare che questo effetto apoptotico sia dovuto alla sintesi *de novo* di fattori pro-apoptotici.

Quindi ci siamo concentrati sullo studio della famiglia di Bcl-2, in particolare siamo andati a valutare l'espressione di alcune proteine BH3-only e come veniva modulata in risposta ai due trattamenti. Infatti queste proteine sono note come onco-soppressori che mediano molti segnali citotossici associati a chemioterapici ed i bassi livelli di espressione di queste proteine sono associate a farmacoresistenza (Fernandez-Luna, 2008). Inoltre è chiaro che le BH3-only

costituiscono i sensori di danno cellulare, quindi che sono a monte del meccanismo di segnalazione molecolare della via di attivazione intrinseca. Per questo abbiamo valutato la modulazione di espressione di Bim, Puma, Bmf e Bad. In particolare Bim e Puma sono stati scelti in quanto, insieme a t-Bid, costituiscono le BH3-only con le maggiori potenzialità proapoptotiche. Infatti secondo i modelli che descrivono l'apoptosi regolata dalla famiglia di Bcl-2, esse legano, inibendone la funzione, tutte le proteine anti-apoptotiche e/o sono in grado di favorire l'attivazione dei proapoptotici Bax e Bak (Willis e Adams, 2005).

I nostri risultati dimostrano un aumento dell'espressione genica sia di *bim* che di *puma*. In particolare si può notare come il trattamento con il VPA porti ad un aumento significativo di questi due geni delle proteine BH3-only nelle tre linee cellulari. Il trattamento con TSA porta ad un aumento più lieve di espressione genica, ma comunque statisticamente significativo per *bim* in tutte le tre linee e per *puma* solo in ASPC1. L'analisi dell'espressione proteica conferma l'aumento di espressione di entrambe le proteine in seguito ai due trattamenti nelle tre linee cellulari. Bim e Puma sono regolati entrambi dal fattore di trascrizione E2F1, quindi possiamo ipotizzare che questi HDACi (il VPA in misura maggiore) abbiano come loro bersaglio questo fattore di trascrizione. I dati in letteratura riguardo gli effetti su E2F1 sono discordanti ma l'induzione di Bim è stata associata alla regolazione di E2F1 in cellule in cui si ha RB mutato (Zhao *et al.*, 2005). In particolare nel lavoro di Zhao Y. si è evidenziato il ruolo dell'induzione di Bim in risposta al trattamento sia al TSA che al SAHA, ma non è stato riscontrato un evidente aumento dell'espressione genica e proteica di Puma, fattore che invece si è riscontrato nel nostro modello in seguito al trattamento con VPA. Comunque per quanto riguarda *puma* la sua induzione in seguito a trattamento con HDACi, non era ancora stato dimostrato essere associata ad effetti su E2F1 (Hershko *et al.*, 2004). Questo meccanismo risulta essere molto interessante in quanto è indipendente da p53, onco-soppressore che risulta essere mutato nelle nostre linee cellulari (Moore *et al.*, 2001) e necessita di essere confermato in questo ed in altri modelli. Per quanto riguarda Bmf, esso è stato trovato essere regolato positivamente in seguito a trattamento con inibitori delle deacetilasi istoniche in una vasta gamma di cellule tumorali (Fernandez-Luna, 2008; Zhang *et al.*, 2006), e recentemente anche Bad è stato trovato essere indotto in seguito al trattamento con un derivato degli acidi idrossamici (Dietrich *et al.*, 2009). Tuttavia nelle linee cellulari pancreatiche utilizzate nel nostro studio non si riscontra una rilevante variazione di espressione genica e proteica in seguito al trattamento con TSA e VPA, per Bmf e Bad diversamente da quanto osservato per Bim e Puma.

Per quanto riguarda, invece, la modulazione di espressione dei membri multidominio i nostri dati mettono in evidenza che il VPA regola negativamente la proteina anti-apoptotica Bcl-x_L a

differenza del TSA che invece non agisce in tal senso. L'individuazione di Bcl-x_L, come bersaglio degli HDACi, era già stato riscontrato in diversi modelli (Cao *et al.*, 2001) ed era stato osservato anche nel nostro precedente lavoro in risposta al sodio butirrato (Natoni *et al.*, 2005).

Per quanto concerne i membri pro-apoptotici multidominio Bax e Bak, che sono fondamentali per la transizione della permeabilità di membrana mitocondriale, essi sono stati osservati essere indotti in diversi modelli cellulari in risposta ad HDACi. Nel nostro modello ciò non si verifica, infatti il livello di espressione di Bax, con entrambi i trattamenti, rimane inalterato ed è lieve per Bak, in risposta al VPA. Tuttavia la funzionalità di questi membri pro-apoptotici è regolata mediante attivazione per cambiamento conformazionale, piuttosto che per aumento dell'espressione proteica. Infatti Bax è normalmente presente nella cellula, in forma citosolica monomerica inattiva, che trasloca nel mitocondrio per poter oligomerizzare (Hsu *et al.*, 1997, Wolter *et al.*, 1997), mentre Bak è sempre localizzato nel mitocondrio anche se normalmente in forma inattiva (Wei *et al.*, 2000). Il cambiamento conformazionale di queste due proteine, dovuto all'attivazione, porta all'esposizione della porzione ammino-terminale che nella forma inattiva è nascosta (Yethon *et al.*, 2003). La marcatura per immunofluorescenza con l'anticorpo conformazionale anti Bak ha permesso di dimostrare come i due trattamenti inducano l'attivazione di questo pro-apoptotico in tutte le tre linee saggiate. L'attivazione di Bax è stata riscontrata mediante immunoprecipitazione con l'anticorpo 6A7, che riconosce la porzione ammino-terminale. Questa è maggiormente rilevante nelle tre linee pancreatiche in seguito al trattamento con VPA. Si può quindi concludere che sia il TSA sia il VPA inducono apoptosi in linee di adenocarcinoma pancreatico attraverso l'attivazione della via intrinseca.

Inoltre in questo lavoro si è fatta maggior chiarezza nel meccanismo che porta all'apoptosi indotta dal VPA, mediante l'identificazione della modulazione di alcuni membri della famiglia di Bcl-2. Infatti i dati qui riportati dimostrano che questo farmaco, finora usato come antiepilettico, agisce sulle cellule tumorali pancreatiche inducendo l'aumento di Bim e Puma e causando la riduzione di Bcl-x_L. Questi tre eventi favoriscono l'attivazione e quindi l'oligomerizzazione di Bax e Bak, che portano al rilascio del Citocromo C e la caduta di potenziale di membrana mitocondriale. Il TSA, invece, mostra una minore capacità nell'indurre l'espressione genica e proteica di Bim e Puma, e non ha effetti nella regolazione negativa di Bcl-x_L. Per quanto riguarda poi la sua efficacia come proapoptotico, nel nostro modello risulta avere un'efficacia diversa tra una linea e l'altra. In particolare il TSA risulta indurre apoptosi più facilmente nella linea maggiormente differenziata ASPC-1, di derivazione ascitica, mentre mostra minore capacità pro-apoptotica e anti-proliferativa nelle due linee PANC-1 e PACA44 che sono rispettivamente, poco differenziata e altamente

indifferenziata. Il VPA, invece, mostrando un'efficacia comparabile in tutte le tre linee cellulari, risulta indipendente dal grado di differenziamento, perciò sembra essere un miglior candidato come antitumorale in questo tipo di cancro.

Mentre il TSA è considerato un HDACi a largo spettro, in quanto la sua azione di inibitore si estende sia alle HDAC di classe I che a quelle di classe II, il VPA è considerato selettivo per la classe I. Negli ultimi anni è stato dimostrato che l'HDAC-2 viene fortemente inibita dal VPA che ne induce la degradazione attraverso il proteasoma, cosa che non accade in seguito al trattamento con TSA (Kramer *et al.*, 2003).

L'HDAC-2 è particolarmente espressa nell'adenocarcinoma pancreatico inoltre in un recente lavoro è stato mostrato che la sua presenza correla con un fenotipo resistente al trattamento con etoposide. Infatti andando ad inibire l'espressione di HDAC-2 con siRNA specifico o con VPA, gli autori mostrano che le linee trattate acquisiscono un fenotipo sensibile al trattamento con il chemioterapico (Fritsche *et al.*, 2009). Inoltre gli autori identificano Noxa come proteina inibita dalla presenza di HDAC-2. Nel loro sistema il VPA, così come il siRNA HDAC-2 specifico, non influenza né la vitalità cellulare né l'apoptosi. La dose da loro utilizzata, 1,5 mM, è decisamente inferiore alla nostra e questo potrebbe essere il motivo per cui noi riusciamo ad osservare degli effetti che loro non vedono. Alcuni studi clinici in corso hanno dimostrato che il VPA raggiunge l'effetto farmacologico, rimanendo nei limiti della dose di tossicità (DLT), alla concentrazione plasmatica di 2 mM. Tuttavia, a seconda del protocollo usato, la concentrazione plasmatica non tossica è stata anche misurata fino a 5 mM (Munster *et al.*, 2007). La dose da noi utilizzata, quindi, anche se superiore a quella utilizzata in altri studi, non è distante da dosi raggiungibili in terapia e ci ha permesso di investigare in modo più evidente sui bersagli molecolari del VPA.

Complessivamente questi risultati aggiungono nuovi elementi sulle capacità di TSA e VPA di indurre apoptosi in linee tumorali pancreatiche, mettendo in particolare evidenza che il VPA rappresenta un buon candidato come antitumorale in questo modello per l'efficacia e la ripetibilità mostrata in questo ed in altri lavori. Ulteriori studi, sia per il VPA che per il TSA, sono necessari per comprendere appieno gli effetti molecolari indotti da queste sostanze per poterne sfruttare al meglio le loro potenzialità.

Bibliografia

1. Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*. 1997; 277(5324): 370-372.
2. Armeanu S., Pathil A., Venturelli S., Mascagni P., Weiss T.S., Gottlicher M., Gregor M., Lauer U.M., Bitzer M. Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. *J. Hepatol.* 2005; 42:210-217.
3. Bakkenist C.J., Kastan M.B., DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003, 421: 499–506.
4. Bakkevold K.E., Kambestad B. Morbidity and mortality after radical and palliative pancreatic cancer surgery. Risk factors influencing the short-term results. *Ann. Surg.* 1993; 217(4):356-68.
5. Bannister AJ, Miska EA, Gorlich D *et al.* Acetylation of importin- α nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol*. 2000; 10(8): 467-70
6. Benerjee S.K., Zoubine M.N., Tran T.M., Weston A.P., Campbell D.R. Tumor angiogenesis in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma: impact of K-ras mutations. *Pancreas* 2000; 20:248–255.
7. Berlin JD. Adjuvant therapy for pancreatic cancer: to treat or not to treat? *Oncology* (Williston Park). 2007;21(6):712-8
8. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1127-55.
9. Black R.A., Rauch C.T., Kozlosky C.J., Peschon J.J., Slack J.L., Wolfson M.F., Castner B.J., Stocking K.L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K.A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J.N., Johnson R.S., Paxton R.J., March C.J., Cerretti D.P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature*. 1997; 385:729-733.
10. Boatright K.M., Salvesen G.S. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2003; 15(6):725-31.
11. Bokelmann I., Mahlkecht U. Valproic acid sensitizes chronic lymphocytic leukemia cells to apoptosis and restores the balance between pro- and antiapoptotic proteins. *Mol Med*. 2008 Jan-Feb; 14 (1-2): 20-7.
12. Bolden J.E., Peart M.J., Johnstone R.W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:769–784.
13. Brugge W.R., Lewandrowski K., Lee-Lewandrowski E., Centeno B.A., Szydlo T., Regan S., del Castillo C.F., Warshaw A.L. Diagnosis of pancreatic cystic neoplasms: a report of the cooperative pancreatic cyst study. *Gastroenterology*. 2004 May;126(5):1330-6.
14. Brunelle J.K., Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of cell Science* 2009, 122 (4):437-41

15. Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1999; 15:269-90.
16. Burris H.A., Moore M.J., Andersen J. et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15:2403-2413.
17. Campbell S.L., Khosravi-Far R., Rossman K.L., Clark G.J. and Der C.J. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene.* 1998; 17:1395-1413.
18. Cao XX, Mohuiddin I, Ece F *et al.* Histone Deacetylase Inhibitor Downregulation of bcl-xl Gene Expression Leads to Apoptotic Cell Death in Mesothelioma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Vol.* 2001, 25, pp. 562–568
19. Carew J. S., Giles F. J., Nawrocki S.T. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Letters* 2008, 269: 7–17
20. Caron C., Boyault C., Khochbin S. Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays* 2005, 27: 408-15.
21. Cascallo M., Calbo J., Gelpi J.L., Mazo A. Modulation of drug cytotoxicity by reintroduction of wild-type p53 gene (Ad5CMV-p53) in human pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther.* 2000; 7:545-556.
22. Chan F.K., Chun H.J., Zheng L., Siegel R.M., Bui K.L., Lenardo M.J. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science.* 2000; 288:2351–2354.
23. Chen B., Cepko C.L. HDAC4 regulates neuronal survival in normal and diseased retinas. *Science.* 2009; 323 (5911): 256-9.
24. Chen L., Meng S., Wang H., Bali P., Bai W., Li B., Atadja P., Bhalla K.N., Wu J. Chemical ablation of androgen receptor in prostate cancer cells by the histone deacetylase inhibitor LAQ824. *Mol Cancer Ther* 2005, 4: 1311–1319.
25. Chen L.F, Fischle W., Verdin E., Greene W.C. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* 2001; 293: 1653-7.
26. Chen Y.X., Fang J.Y., Lu J., *et al.* Regulation of histone acetylation on the expression of cell cycle-associated genes in human colon cancer cell lines. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2004; 84:312-317.
27. Choi Y.H. Induction of apoptosis by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, is associated with inhibition of cyclooxygenase-2 activity in human non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2005; 27:473-479.
28. Cilenti L., Soundarapandian M.M, Kyriazis G.A., *et al.* Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death. *J Biol Chem* 2004; **279**: 50295–50301.
29. Cleary S.P., Gryfe R., Guindi M., Greig P, Smith L, Mackenzie R, *et al.* Prognostic factors in resected pancreatic adenocarcinoma: analysis of actual 5-year survivors. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 722–31.

30. Cohen T., Yao T.P. AcK-knowledge reversible acetylation. *Sci STKE (Signal transduction knowledge environment)* 2004; 42: 1-30
31. Cohen, Duke, Fadok, Sellins. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 267-93.
32. Cruickshank A.H. Solid carcinomas of the exocrine pancreas. *Pathology of the Pancreas*. Springer-Verlag. 1986; p.155-77.
33. De Bruin E.C., Medema J.P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews* 2008, 34, 737– 749
34. De Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B. Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; 370 (Pt 3): 737–49.
35. Dietrich, Greenberg P., DeSimone, *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) potentiates paclitaxel-induced apoptosis in ovarian cancer cell lines. *Gynecologic Oncology*, 2010, 116; 1:126-130
36. Donadelli M., Costanzo C., Beghelli S., Scupoli M.T., Dandrea M., Bonora A., Piacentini P., Budillon A., Caraglia M., Scarpa A., Palmieri M. Synergistic inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by trichostatin A and gemcitabine. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jul; 1773(7):1095-106.
37. Donadelli M., Costanzo C., Faggioli L., Scupoli M.T., Moore P.S., Bassi C., Scarpa A., Palmieri M. Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells. *Mol Carcinog*. 2003; 38(2):59-69.
38. Dong M., Ma G., Tu W. *et al.* Clinicopathological significance of p53 and mdm2 protein expression in human pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol*. 2005; 11:2162-2165.
39. Duenas-Gonzalez A., Candelaria M., Perez-Plascencia C., Perez-Cardenas E., de la Cruz-Hernandez E., Herrera L.A. Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2008 May; 34 (3): 206-22
40. Durkin A.J., Bloomston P.M., Rosemurgy A.S., Giarelli N., Cojita D., Yeatman T.J., Zervos E.E. Defining the role of the epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer grown in vitro. *Am. J. Surg*. 2003; 186: 431–436.
41. Durrin LK, Mann RK *et al.* Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell* 1991; 65(6): 1023-31.
42. Duvic M, Vu J. Vorinostat: A new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin Invest Drugs* 2007; 16: 1111–1120.
43. Dwarakanath BS, Verma A. *et al.* Targeting protein acetylation for improving cancer therapy. *Indian J Med Res* 2008; 128(7): 13-21
44. Egle A., Harris A.W., Bouillet P. and Cory S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004 101: 6164 – 6169.

45. Evans D.B., Abbruzzese J.L., Rich T.R. Cancer of the pancreas. In: DeVita V.T., Hellman S., and Rosenberg S.A. (eds) . *Cancer Principles and Practice of Oncology*. Fifth Edition. Lippincott- Raven, Philadelphia. 1997; pp 1054-1087.
46. Evans J.P., Burke W., Chen R., Bennett R.L., Schmidt R.A., Dellinger E.P., Kimmey M., Crispin D., Brentnall T.A., Byrd D.R. Familial pancreatic adenocarcinoma: association with diabetes and early molecular diagnosis. *J. Med. Genet.* 1995; 32:330–335.
47. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 2007 Mar;18(3):581-92.
48. Fernandez-Luna JL. Regulation of proapoptotic BH3-only Proteins and its contribution to cancer progression and chemoresistance. *Cellular signalling.* 2008; 20: 1921-1926
49. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature.* 1999 Sep 9; 401(6749):188-93.
50. Fleming J.B., Shen G.L., Holloway S.E., Davis M., Brekken R.A. Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: Justification for K-ras-directed therapy. *Mol. Cancer. Res.* 2005; 3:413-423.
51. Freitas D., Santos Fernandes G., Hoff P. M., Cunha J.E. Medical Management of Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreatology.* 2009; 9: 223–232
52. Frew A.J., Johnstone R.W., Bolden J.E. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Letters.* 2009; 280: 125-133
53. Friedmann I., Atmaca A., Chow KU., et al. Synergistic effects of valproic acid and mitomycin C in adenocarcinoma cell lines and fresh tumor cells of patients with colon cancer. *J Chemother* 2006; 18: 415–20.
54. Fritsche P, Seidler B, Schöler S, Schnieke A, Göttlicher M, Schmid RM, Saur D, Schneider G. HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut.* 2009 Oct;58(10):1399-409
55. Furuse J, Kinoshita T, Kawashima M, et al. Intraoperative and conformal external-beam radiation therapy with protracted 5-fluorouracil infusion in patients with locally advanced pancreatic carcinoma. *Cancer.* 2003 Mar 1; 97(5): 1346-52.
56. Galluzzi L., Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G. Viral Control of Mitochondrial Apoptosis. 2008 PLoS Pathog 4(5)
57. Galluzzi L, Blomgren K e Kroemer G. Mechanisms of mitochondrial membrane permeabilization and the BCL-2 protein family. 2009, *Nature Reviews Neuroscience* 10, 81-494
58. García-Morales P., Gómez-Martínez A., Saceda M., et al. Histone deacetylase inhibitors induced caspase-independent apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther.* 2005 Aug; 4(8): 1222-30

59. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M., Puig P.E., Didelot C. and Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*. 2006; 13: 1423–1433
60. Gartner A., Milstein S., Ahmed S., Hodgkin J., Hengartner M.O. A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage–induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. *Mol Cell* 2000; 5: 35–443.
61. Gaymes T.J., R.A. Padua, M. Pla, S. Orr, N. Omidvar, C. Chomienne, G.J. Mufti, F.V. Rassool, Histone deacetylase inhibitors (HDI) cause DNA damage in leukemia cells: a mechanism for leukemia-specific HDI dependent apoptosis?, *Mol Cancer Res.* 4 (2006) 563–573.
62. Gerdes G., Ramaswamy A., Kersting M., Ernst M., Lang S., Schuermann M., Wild A., Bartsch D.K. p16 INK4a alterations in chronic pancreatitis-indicator for high-risk lesions for pancreatic cancer. *Surgery* 2001; 129:490–497.
63. Germanos N., Gourgiotis S., Stavrothanasopoulou A., Alepas P., Zampitis N., Panteli A. Diagnostic and Therapeutic Approach to Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Gastrointestin. Liver Dis.* 2006; 15:257-263.
64. Giovannetti E., Mey V., Nannizzi S., Pasqualetti G., Del Tacca M., Danesi R. Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer. *Mol. Cancer. Ther.* 2006; 5(6):1387-1395.
65. Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 151–63
66. Go V.L.W., Gukovskaya A., Pandol S.J. Alcohol and pancreatic cancer. *Alcohol*. 2005; 35:205–211.
67. Goggins M., Hruban R.H., Kern S.E. Brca2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am. J. Pathol.* 2000; 156:1767-1771.
68. Golstein P., Ojcius D.M., Young J. D.E. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* 1991, 121: 29-65.
69. Gottlicher M. Minucci S., Zhu P., et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001; 20: 6969–78.
70. Gregoret I.V., Lee Y.M., Goodson H.V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 2004; 338 (1):17–31.
71. Griffiths G.J., Corfe B.M., Savory P. et al. Cellular damage signals promote sequential changes at the terminus and BH-1 domain of the pro-apoptotic protein Bak. *Oncogene*. 2001 Nov 15; 20 (52): 7668-6.
72. Gronroos E., Hellman U., Heldin C.H., Ericsson J. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell* 2002; 10: 483-93.

73. Guardiola A.R., Yao T.P. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 3350–3356.
74. Gumienny T.L., Lambie E., Hartwig E., Horvitz H.R., Hengartner M.O. Genetic control of Programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development* 1999; 126: 1011–1022.
75. Hahn S.A., Schutte M., Hoque A.T., Moskaluk C.A., Da Costa L.T., Rozenblum E., Weinstein C.L., Fischer A., Yeo C.J., Hruban R.H., et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1 *Science*. 1996; 271:350-353.
76. Haigis M.C., Guarente L.P. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 2006; 20 (21): 2913–21.
77. Hail N. Jr., Carter, B. Z. Konopleva M. and Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis* 2006; 11: 889–904
78. Haller D.G. New perspectives in the management of pancreas cancer. *Semin. Oncol.* 2003; 30: 3-10.
79. Haller DG. Chemotherapy For Advanced Pancreatic Cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 2003 56, No. 4, S. 16–23.
80. Hanahan D e Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000 Vol. 100, 57–70,
81. Hegde R., Srinivasula S.M., Zhang Z., et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 2002; 277: 432–438.
82. Hershko T., Ginsberg D. Up-regulation of Bcl-2 Homology 3 (BH3)-only Proteins by E2F1 Mediates Apoptosis. *The Journal Of Biological Chemistry* 2004; 279, 10, 5: 8627–8634
83. Hezel A.F., Kimmelman A.C., Stanger B.Z., Bardeesy N., Depinho R.A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes. Dev.* 2006; 20:1218-1249.
84. Hideshima T., Bradner J.E., Wong J., Chauhan D., Richardson P., Schreiber S.L., Anderson K.C. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 8567–8572.
85. Hsu H., Shu H.B., Pan M.G., Goeddel D.V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 1996; 84(2):299-308.
86. Hsu, Y. T., Wolter, K. G. and Youle, R. J. Cytosol to membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94, 3668-3672.
87. Hustinx S.R., Leoni L.M., Yeo C.J., Brown P.N., Goggins M., Kern S.E., Hruban R.H., Maitra A. Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Mod. Pathol.* 2005; 18: 959-963.
88. Im JY, Park H, Kang KW, Choi WS, Kim HS. Modulation of cell cycles and apoptosis by apicidin in estrogen receptor (ER)-positive and-negative human breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2008; 172(3):235–44.

89. Inoue S., M MacFarlane¹, N Harper¹, LMC Wheat¹, MJS Dyer¹, GM Cohen. Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies. *Cell Death and Differentiation* 2004; 11, S193–S206.
90. Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, et al. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J* 2002; 21 (22): 6236–45.
91. Jaster R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol. Cancer*. 2004; 3: 26.
92. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009 Jul-Aug; 59 (4): 225-49.
93. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002;111(5):709–20.
94. Jiang Y., Woronicz J.D., Liu W., Goeddel D.V. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science*. 1999; 283:543-546.
95. Johnstone R.W., A.A. Ruefli, S.W. Lowe, Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy, *Cell* 108 (2002) 153–164.
96. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 2002. 1, 287-299.
97. Jones E.Y., Stuart D.I., Walker N.P. Structure of tumour necrosis factor. *Nature*. 1989; 338: 225-228.
98. Jones J., Bantas W, Blaheta RA, Makarevic J, Hudak L, Wedel S, Probst M, Jonas D, Juengel E. Modulation of adhesion and growth of colon and pancreatic cancer cells by the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Int J Mol Med*. 2008 Sep; 22(3): 293-9.
99. Kao H.Y., Verdel A., Tsai C.C., Simon C., Juguilon H., and Khochbin S Mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of histone deacetylase 7. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 47496–47507.
100. Karst A. M. e Li G. BH3-only proteins in tumorigenesis and malignant melanoma. *Cell. Mol. Life Sci*. 64 (2007) 318 – 330
101. Kataoka T., Budd R.C., Holler N., Thome M., Martinon F., Irmeler M., Burns K., Hahne M., Kennedy N., Kovacsovics M., Tschopp J. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. *Curr. Biol*. 2000; 10:640-648.
102. Kaufmann T., Schlipf S., Sanz J., Neubert K., Stein R., Borner C. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell. Biol*. 2003; 160(1):53-64.
103. Kawagoe R., Kawagoe H., Sano K. Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways. *Leuk. Res*. 2002; 26:495-502.

104. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue Kinetics. *Br. J. Cancer*. 1972; 26(4):239-57.
105. Kim J. Y., Ahn H. J., Ryu J. H., Suk K. and Park J. H. (2004) BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1. *J. Exp. Med*. 199, 113 – 124.
106. Kim SC, Sprung R, Chen Y *et al*. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*. 2006; 23 (4): 607-18.
107. Kirsch D.G., Kastan M.B. Tumor suppressor p53: implication for tumor development and prognosis. *J. Clin. Oncol*. 1998; 16:3158–3168.
108. Komatsu N, Kawamata N, Takeuchi S, Yin D, ChienW, Miller CW, et al. SAHA, a HDAC inhibitor, has profound anti-growth activity against non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 2006;15(1):187–91.
109. Koorstra JB, Feldmann G, Habbe N, Maitra A. Morphogenesis of pancreatic cancer: role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs). *Langenbecks Arch Surg*. 2008 Jul; 393(4): 561-70.
110. Kornmann M., Ishiwata T., Matsuda K., Lopez M.E., Fukahi K., Asano G., Beger H.G., Korc M. IIIc isoform of fibroblast growth factor receptor 1 is overexpressed in human pancreatic cancer and enhances tumorigenicity of hamster ductal cells. *Gastroenterology*. 2002; 123:301-313.
111. Kouzarides T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* 2000; 19: 1176-9.
112. Krajewska M., Zapata J. M., Meinhold-Heerlein I., Hedayat H., Monks A., Bettendorf H., Shabaik A., Bubendorf L., Kallioniemi O. P., Kim H., Reifemberger G., Reed J. C. and Krajewski S. (2002) Expression of Bcl-2 family member Bid in normal and malignant tissues. *Neoplasia* 4, 129 – 140.
113. Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzel T, Göttlicher M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J*. 2003; 22(13):3411-20.
114. Krammer P.H. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol*. 1999; 71:163-210.
115. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death, 2007 *Physiol Rev* 87:99-163.
116. Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med*. 2000; 6 (5):513-519
117. Kuniyasu H., Abbruzzese J.L., Cleary K.R., Fidler I.J. Induction of ductal and stromal hyperplasia by basic fibroblast growth factor produced by human pancreatic carcinoma. *Int. J. Oncol*. 2001; 19:681-685.
118. Kuwana T., Newmeyer D.D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr. Opin. Cell. Biol*. 2003; 15(6):691-699.

119. Kyprianou, English, Isaacs. Activation of a Ca²⁺-Mg²⁺-dependent endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate*. 1988;13(2):103-17.
120. Lee K.K., Workman J.L. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(4):284–95.
121. Levy L. and Hill C.S. Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor β (TGF- β) target genes and distinguishes TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25:8108-8125.
122. Li D., Xie K., Wolff R., e Abbruzzese J.L.. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2004; 363:1049–1057.
123. Li W, Srinivasula SM, Chai J, *et al*. Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol* 2002; 9: 436–441.
124. Lillemoe K.D., Yeo C.J., Cameron J.L. Pancreatic cancer: state-of-the-art care. *CA Cancer. J. Clin.* 2000; 50(4):241-68. Review
125. Lindemann KR, e Johnstone RW. Histone deacetylase inhibitors: promising candidates for chemotherapeutic drugs. *Gene Ther Mol Biol* 2004; 8: 61-74.
126. Lindemann RK, Newbold A, Whitecross KF, Cluse LA, Frew AJ, Ellis L, *et al*. Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (19): 8071–6
127. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, *et al*. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell*. 2000 Dec;6(6):1389-99.
128. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 2009 27, S2–S19
129. Lucio-Eterovic AK, Cortez MA, Valera ET, *et al*. Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer* 2008 8: 243
130. Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. and Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998, 94, 481–490.
131. Luttges J., Galehdari H., Brocker V., Schwarte-Waldhoff I., Henne-Bruns D., Kloppel G., Schmiegel W., Hahn S.A. Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and dpc4 genes during pancreatic carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 2001; 158:1677-1683.
132. Lynch H.T., Smyrk T., Kern S.E., *et al*. Familial pancreatic cancer: a review. *Semin. Oncol.* 1996; 23:251-275.

133. Lynch, Nawaz, Gerschenson. Evidence for soluble factors regulating cell death and cell proliferation in primary cultures of rabbit endometrial cells grown on collagen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83 (13): 4784-8.
134. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH. *Mod Pathol*. 2003 Sep;16 (9): 902-12. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray.
135. Maitra A., Adsay N.V., Argani P., Iacobuzio-Donahue C., De Marzo A., Cameron J.L., Yeo C.J. and Hruban R.H. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol*. 2003 Sep;16 (9): 902-12.
136. Majino G., Jorris L. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol*. 1995, 146: 3-15.
137. Malumbres M. and Barbacid M. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat. Rev. Cancer*. 2003; 3:459-465.
138. Marks P.A., Richon V.M., Rifkind R.A. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst*. 2000; 92:1210–1216.
139. Marks PA, Breslow R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: Development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* 2007, 25:84–90.
140. Marks PA, Rifkind RA, Richon VM, *et al*. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Reviews Cancer* 2001. 1, 194-202
141. Marks PA, Xu WS. Histone Deacetylase Inhibitors: Potential In Cancer Therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009, 107:600-8
142. Martinez-Balbás MA, Bauer UM., Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T. Regulation of E2F-activity by acetylation. *EMBO J* 2000; 19: 662-71.
143. Massague J., Blain S.W. and Lo R.S. TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000; 103:295-309.
144. Medema JP, de Jong J, van Hall T, Melief CJ, Offringa R. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 1999;190:1033–8.
145. Medina V, Belinda Edmonds, Graeme P. Young, Robert James, Sarah Appleton, and Peter D. Zalewski Induction of Caspase-3 Protease Activity and Apoptosis by Butyrate and Trichostatin A (Inhibitors of Histone Deacetylase): Dependence on Protein Synthesis and Synergy with a Mitochondrial/ Cytochrome c-dependent Pathway. *Cancer Research* 1997, 57, 3697-3707.
146. Medina V. Edmonds B Young GP *et al*. Induction of Caspase-3 Protease Activity and Apoptosis by Butyrate and Trichostatin A (Inhibitors of Histone Deacetylase): Dependence on Protein Synthesis and Synergy with a Mitochondrial/Cytochrome c-dependent Pathway. *Cancer Research* 1997 57, 3697-3707.

147. Meeker A.K., De Marzo A.M. Recent advances in telomere biology: implications for human cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 2004; 16:32-38.
148. Meier, Finch, Evan. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407: 796-801.
149. Minn A.J., Velez P., Schendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W., Fill M., Thompson C.B. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*. 1997; 385 (6614): 353-7.
150. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* . 2006. 6: 38–51.
151. Moertel C.G., Childs D.S. Jr, Reitemeier R.J., Colby M.Y. Jr, Holbrook M.A. Combined 5-fluorouracil and supervoltage radiation therapy of locally unresectable gastrointestinal cancer. *Lancet* 1999; 2: 865-7.
152. Moller P, Koretz K, Leithauser F, et al. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 1994; 57: 371–7.
153. Moore P S. Sipos B Orlandini S, *et al.* Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines *Virchows Arch* 2001, 439:798–802
154. Moore PS, Barbi S, Donadelli M, Costanzo C, Bassi C, Palmieri M, Scarpa A. Gene expression profiling after treatment with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A reveals altered expression of both pro- and anti-apoptotic genes in pancreatic adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1693(3): 167-76.
155. Mornex F. Association gemcitabine-radiotherapie. *Bull. Cancer* 2002; 89: S127-33.
156. Münster P, Marchion D, Bicaku E, *et al.* Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study. *J Clin Oncol.* 2007 May 20;25(15):1979-85.
157. Nagata. Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 1996;406:119-24.
158. Naruse, Keino. Apoptosis in the developing CNS. *Prog Neurobiol.* 1995;47(2):135-155.
159. Natoni F, Diolordi L, Santoni C, Gilardini Montani MS. Sodium butyrate sensitises human pancreatic cancer cells to both the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2005 30; 1745(3): 318-29.
160. Nawroz H., van der Riet P., Hruban R. H., Koch W., Ruppert J. M. and Sidransky D. Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1994 54, 1152 – 1155.
161. Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T. and Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000 288, 1053 – 1058.
162. Papoff G., Hausler P., Eramo A., Pagano M.G., Di Leve G., Signore A. and Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:38241-38250.

163. Paroni G., Mizzau M., Henderson C., Del Sal G., Schneider C., Brancolini C. "Caspase-dependent regulation of histone deacetylase 4 nuclear cytoplasmic shuttling promotes apoptosis." *Mol. Biol. Cell.* 2004; 15(6):2804-18.
164. Peltonen K., Kiviharju T.M., Jarvinen P.M., Ra R., Laiho M. Melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis. *Pigment. Cell. Res.* 2005; 18:196-202.
165. Peter M.E. and Krammer P.H. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation.* 2003; 10:26-35.
166. Peter M.E., Scaffidi C., Medema J.P., Kischkel F., Krammer P.H. The death receptors. *Results Probl. Cell. Differ.* 1999; 23: 25-63.
167. Petrella A, D'Acunto CW, Rodriguez M, Festa M, Tosco A, Bruno I, et al. Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1. *Eur J Cancer* 2008; 44 (5): 740–9.
168. Petros A.M., Medek A., Nettesheim D.G., Kim D.H., Yoon H.S., Swift K., Matayoshi E.D., Oltersdorf T., Fesik S.W. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98(6):3012-7.
169. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 1;1644(2-3):83-94.
170. Piacentini P, Donadelli M, Costanzo C, Moore PS, Palmieri M, Scarpa A. Trichostatin A enhances the response of chemotherapeutic agents in inhibiting pancreatic cancer cell proliferation. *Virchows Arch.* 2006; 448 (6): 797-804.
171. Plath T, Peters M, Detjen K, Welzel M, von Marschall Z, Radke C, Wiedenmann B, Rosewicz S: Overexpression of PRB in human pancreatic carcinoma cells: function in chemotherapy-induced apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 129–142.
172. Plath T, Peters M, Detjen K, Welzel M, von Marschall Z, Radke C, Wiedenmann B, Rosewicz S. Overexpression of pRB in human pancreatic carcinoma cells: function in chemotherapy-induced apoptosis. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jan 16;94(2):129-42.
173. Plunkett W., Huang P., Gandhi V. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs.* 1995; 6:7-13.
174. Porta M., Malats N., Jariod M. Serum concentrations of organochlorine compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *PANKRAS* Study Group. 1999; 354:2125-9.
175. Puthalakath H., Villunger A., O'Reilly L. A., Beaumont J. G., Coultas L., Cheney R. E., Huang D. C. and Strasser A. Bmf: a pro-apoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 2001, 293, 1829 – 1832.
176. Regan C.M. Therapeutic levels of sodium valproate inhibit mitotic indices in cells of neural origin. *Brain. Res.* 1985; 347:394-398.
177. Regine WF, Abrams RA. Adjuvant therapy for pancreatic cancer: current status, future directions. *Semin Oncol.* 2006 Dec;33(6 Suppl 11):S10-3.

178. Reid G, Métivier R, Lin CY, Denger S, Ibberson D, Ivacevic T, Brand H, Benes V, Liu ET, Gannon F. Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A. *Oncogene*. 2005; 24 (31): 4894-907.
179. Richon V.M., Sandhoff T.W., Rifkind R.A., Marks P.A. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97:10014-10019.
180. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 81–120.
181. Rozenblum E., Schutte M., Goggins M., Hahn S.A., Panzer S., Zahurak M., Goodman S.N., Sohn T.A., Hruban R.H., Yeo C.J. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 1997; 57:1731-1734.
182. Saito M., Korsmeyer S.J., Schlesinger P.H. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell. Biol.* 2000; 2(8): 553-555.
183. Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, et al. DNA damage activates p53 through a phosphorylation/acetylation cascade. *Genes Dev* 1998; 12: 2831-41.
184. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):10964-7.
185. Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H. and Peter M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *EMBO. J.* 1998; 17(6):1675-1687.
186. Schniewind B, Christgen M, Kurdow R, Haye S, Kremer B, Kalthoff H, Ungefroren H. Resistance of pancreatic cancer to gemcitabine treatment is dependent on mitochondria-mediated apoptosis. *Int J Cancer.* 2004 Mar 20;109(2):182-8.
187. Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, Benz CC. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res* 2006; 66(3):1277–81.
188. Seigneurin-Burnj D, Verdel A, Curtet S, Lemerrier C, Garin J, Rousseaux S, et al. Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 8035-44.
189. Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Mar 1;1644(2-3):107-13.
190. Sherr C.J. Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect.* 2000; 96:73-92.
191. Shi Y Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 2006, 18:677–684
192. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell.* 2002; 9(3):459-70.

193. Shibue T., Takeda K., Oda E., Tanaka H., Murasawa H., Takaoka A., Morishita Y., Akira S., Taniguchi T. And Tanaka N. (2003) Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev.* 17, 2233 – 2238.
194. Siegel P.M. and Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3:807-821.
195. Siegel R.M., Frederiksen J.K., Zacharias D.A., Chan F.K., Johnson M., Lynch D., Tsien R.Y. and Lenardo M.J. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Scienze.* 2000; 288:2354-2357.
196. Sindelar W.F., Kinsella T.J. Studies of intraoperative radiotherapy in carcinoma of the pancreas. *Ann. Oncol.* 1999; 4:226-30.
197. Smeenk H.G., Tran T.C., Erdmann J., Van Eijck C.H., Jeekel J. Survival after surgical management of pancreatic adenocarcinoma: does curative and radical surgery truly exist? *Langenbecks Arch. Surg.* 2005; 390(2):94-103.
198. Smith KT, Workman JL. Histone deacetylase inhibitors: Anticancer compounds. *Int J Biochem Cell Biology* 2009; 41: 21-25
199. Spange S, Wagner T et al Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41: 185-198
200. Stennicke H.R., Deveraux Q.L., Humke E.W., Reed J.C., Dixit V.M., Salvesen G.S. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(13):8359-62.
201. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403(6765):41–5.
202. Takemura R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci* 1992; 103: 953-64.
203. Tan J, Zhuang L, Jiang X, Yang KK, Karuturi KM, Yu Q.. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a direct target of E2F1 and contributes to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through positive feedback regulation of E2F1 apoptotic activity. *J Biol Chem* 2006, 281:10508–10515.
204. Tan T. T., Degenhardt K., Nelson D. A., Beaudoin B., Nieves-Neira W., Bouillet P., Villunger A., Adams J. M. and White E. (2005) Key roles of BIM-driven apoptosis in epithelial tumors and rational chemotherapy. *Cancer Cell* 7, 227 – 238.
205. Thomas P.R.M. Radiotherapy for Carcinoma of the Pancreas. *Semin. Oncol.* 1996; 23:213-219.
206. Tsuji N. e Kobayashi M. Trichostatin C, a glucopyranosyl hydroxamate. *J. Antibiot.* 1978; 31:939–944.
207. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226: 1097–9.

208. Turner BM. Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol* 2007; 9(1): 2-6.
209. Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, Ngo L, Holmgren A, Jiang X, Marks PA. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:673–678.
210. Van Heek N.T., Meeker A.K., Kern S.E., Yeo C.J., Lillemoe K.D., Cameron J.L., Offerhaus G.J., Hicks J.L., Wilentz R.E., Goggins M.G., De Marzo A.M., Hruban R.H., Maitra A. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* 2002; 161:1541-1547.
211. Vanhaecke T., Papeleu P, Elaut G, Rogiers V. Trichostatin A – Like Hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Agents: Toxicological Point of View. *Current Medicinal Chemistry.* 2004; 11:1629-1643
212. Verdoodt B Charlette I Maillet B, et al. Numerical Aberrations of Chromosomes I and 17 in Tumor Cell Lines of the Exocrine Pancreas as Determined by Fluorescence In Situ Hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1997, 94:125-130
213. Villunger A., Michalak E. M., Coultas L., Mullauer F., Bock G., Ausserlechner M. J., Adams J. M. and Strasser A. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3- only proteins puma and noxa. *Science.* 2003, 302, 1036 – 1038.
214. Vogelstein B, Lane D, Levine A. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307–10.
215. Vrana JA, Decker RH, Johnson CR, Wang Z, Jarvis WD, Richon VM, *et al.* Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene* 1999; 18 (50): 7016–25.
216. Waterborg JH. Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover? *Biochem Cell Biol* 2002; 80(3):363–78.
217. Wei M. C., Lindsten T., Mootha V. K., Weiler S., Gross A., Ashiya M., Thompson C. B. and Korsmeyer S. J. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 2000 14, 2060 – 2071.
218. Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* (2001). 292, 727-730.
219. Welsbie DS, Xu J, Chen Y, Borsu L, Scher HI, Rosen N, Sawyers CL. Histone deacetylases are required for androgen receptor function in hormone- sensitive and castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2009; 69:958– 966.
220. Westphal S. and Kalthoff H. Apoptosis: Targets in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer* 2003; 2 (6).
221. Wick W., Petersen I., Schmutzler R. K., Wolfarth B., Lenartz D., Bierhoff E., Hummerich J., Muller D. J., Stangl A. P., Schramm J., Wiestler O. D. and von Deimling A. Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15

- associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene* 1996, 12, 973 – 978.
222. Wilentz R.E., Geradts J., Maynard R., Offerhaus G.J., Kang M., Goggins M., Yeo C.J., Kern S.E., Hruban R.H. Inactivation of the p16 (ink4a) tumor suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res.* 1998; 58:4740-4744.
 223. Wilentz R.E., Iacobuzio-Donahue C.A., Argani P., McCarthy D.M., Parson J.L., Yeo C.J., Kern S.E., Hruban R.H. Loss of expression of dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that dpc4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 2000; 60:2002-2006.
 224. Willis S.N. e Adams J.M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis *Curr Op Cell Bio* 2005, 17:617-25
 225. Wolff R.A., Chiao P., Lenzi R., Pisters P.W.T., Lee J.E., JanJan N.A., Crane C.H., Evans D.B. and Abbruzzese J.L. Current approaches and future strategies for pancreatic carcinoma. *Investigational New Drugs* 2000; 18: 43-56.
 226. Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G. and Youle, R. J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* (1997). 139, 1281-1292.
 227. Wu LP, Wang X, Li L, Zhao Y, Lu S, Yu Y, et al. HDAC inhibitor depsipeptide activates silenced genes through decreasing both CpG and H3K9 methylation on the promoter. *Mol Cell Biol* 2008.
 228. Wyllie, Kerr, Currie. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68:251-306.
 229. Xiaobo X. Cao, Imran Mohiuddin, Ferah Ece, David J. McConkey, and W. Roy Smythe Histone Deacetylase Inhibitor Downregulation of bcl-xl Gene Expression Leads to Apoptotic Cell Death in Mesothelioma *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001, Vol. 25, pp. 562–568.
 230. Xiong Y, DowdySC, PodratzKC, Jin F,Attewell JR, Eberhardt NL, et al. Histone deacetylase inhibitors decreaseDNAmethyltransferase-3B messenger RNA stability and down-regulate de novo DNA methyltransferase activity in human endometrial cells. *Cancer Res* 2005; 65(7):2684–9.
 231. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: Molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007. 26:5541–5552.
 232. Yang XJ, Gregoire S. Metabolism, cytoskeleton and cellular signalling in the grip of protein Nepsilon- and O-acetylation. *EMBO Rep* 2007; 8: 556-62.
 233. Yethon, J. A., Epand, R. F., Leber, B., Epand, R. M. and Andrews, D. W. Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2003 278, 48935-48941.
 234. You JS, Kang JK, Lee EK, Lee JC, Lee SH, Jeon YJ, et al. Histone deacetylase inhibitor apicidin downregulates DNA methyltransferase 1 expression and induces

- repressive histone modifications via recruitment of corepressor complex to promoter region in human cervix cancer cells. *Oncogene* 2008; 27 (10): 1376–86.
235. Zhang S Cai X Huang F Zhong W Yu Z. Effect Of Trichostatin A On Viability And Microrna Expression In Human Pancreatic Cancer Cell Line Bxpc-3. *Exp Oncol* 2008, 30, 4, 265-268
 236. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, Olashaw N, Parsons JT, Yang XJ, Dent SR, Yao TP, Lane WS, Seto E. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell* 2007, 27:197–213.
 237. Zhang X. D., Gillespie S. K., Borrow J. M. and Hershey P. (2004) The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 3, 425 – 435.
 238. Zhang Y Adachi M Kawamura R Imai K. *Cell Death Differ* 2006. 13,129
 239. Zhao, TanJ, Zhuang L, *et al* Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim 2005 PNAS 102,44: 16090–16095
 240. Zhou Q, Agoston AT, Atadja P, Nelson WG, Davidson NE. Inhibition of histone deacetylases promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of DNA methyl-transferase 1 in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2008; 6 (5): 873–83.
 241. Zhou XD, Yu JP, Chen HX, Yu HG, Luo HS. Expression of cellular FLICE-inhibitory protein and its association with p53 mutation in colon cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11: 2482–5.
 242. Zhu P., Huber E., Kiefer F., Gottlicher M. Specific and redundant functions of histone deacetylases in regulation of cell cycle and apoptosis. *Cell. Cycle.* 2004; 3: 1240-1242.
 243. Zinkel S. S., Ong C. C., Ferguson D. O., Iwasaki H., Akashi K., Bronson R. T., Kutok J. L., Alt F.W. and Korsmeyer S. J. Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *Genes Dev.* 2003, 17, 229 – 239.
 244. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev.* 2001 Jun 15;15(12):1481-6.