



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

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

Coordinatore Prof.ssa Renza Vento

**Studio dei meccanismi di morte cellulari
indotti dal cannabinoide sintetico WIN
in cellule tumorali in coltura**

(SSD BIO/10)

Candidata

Dr.ssa Antonietta Notaro

Tutor

Prof. Giuseppe Calvaruso

Il Coordinatore del Dottorato

Prof.ssa Renza Vento

Triennio 2011-2013-Ciclo XXIV

INDICE

<i>Introduzione</i>	4
AUTOFAGIA	5
- Regolazione molecolare dell'autofagia	6
- Ruolo dell'autofagia nel cancro	7
APOPTOSI E AUTOFAGIA	8
- Crosstalk tra autofagia e apoptosi	10
CANNABINOIDI	14
- Cannabinoidi naturali (fitocannabinoidi)	14
- Cannabinoidi endogeni (endocannabinoidi)	15
- Cannabinoidi sintetici	15
- Recettori dei cannabinoidi	16
- Struttura dei recettori e meccanismo di trasduzione del segnale	17
- Cannabinoidi nella terapia farmacologica	18
- Cannabinoidi ed endocannabinoidi nel cancro	19
- Pathway apoptotico indotto dai cannabinoidi	19
- Pathway autofagico indotto dai cannabinoidi	20
CANNABINOIDI E RECETTORI PPAR	22
- Cannabinoidi e PPAR γ	24
<i>Obiettivo della tesi</i>	26
<i>Materiali e Metodi</i>	29
Colture cellulari	30
Saggi di vitalità	30
Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare	31
Valutazione del potenziale di membrane mitocondriale	32
Valutazione della permeabilizzazione della membrana liso somale	32
Analisi dell'autofagia	33
Analisi dei livelli proteici per immunoblotting	33
Silenziamento genico attraverso la tecnica dell' <i>RNA interfering</i>	33
Valutazione di GRP78 di superficie	34

<i>Risultati</i>	35
EFFETTI DEL CANNABINOIDE SINTETICO WIN SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI CARCINOMA COLORETTALE	36
- Effetti del WIN sulla vitalità di cellule HT29, HCT116 e Caco-2	36
- Il trattamento con il cannabinoide induce ER stress ed attiva il processo autofagico	40
- Il WIN riduce i livelli proteici di PPAR γ	44
- La caduta dei livelli di PPAR γ è responsabile dell'induzione di ER stress e del blocco del flusso autofagico	46
EFFETTI DEL CANNABINOIDE SINTETICO WIN SU CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG63	50
- Valutazione degli effetti del WIN sulla vitalità di cellule MG63	50
- Il trattamento con WIN induce stress del reticolo endoplasmatico e autofagia in cellule MG63	52
- Il trattamento con WIN è in grado di sensibilizzare le cellule MG63 all'apoptosi indotta da TRAIL attraverso un meccanismo che coinvolge GRP78 e PAR-4	56
- Meccanismo d'azione del WIN	59
<i>Discussione</i>	62
<i>Bibliografia</i>	68

Introduzione

Nel corso degli anni sono state descritte molte forme di morte cellulare. Alla necrosi, che rappresenta una forma di morte cellulare accidentale accompagnata da *swelling* mitocondriale, distruzione cellulare e danno alle membrane, negli anni '70 si è aggiunta l'apoptosi, caratterizzata da una serie di eventi programmati che includono il *blebbing* di membrana, l'attivazione delle caspasi e la frammentazione del DNA. Definita come una morte "pulita" che richiede l'impiego di energia, porta al cosiddetto "suicidio cellulare".

Più recentemente, accanto a queste due modalità di morte ne sono state descritte altre; per esempio, è stata identificata una forma regolata di necrosi, la necroptosi, caratterizzata da meccanismi controllati e programmati e vede come attore principale la proteina RIP (*Receptor interacting protein*). Altri percorsi alternativi, come l'autofagia e la paraptosi, sono caratterizzati dall'essere caspasi-indipendente e non si accompagnano a condensazione della cromatina, ma sono caratterizzate dalla formazione di vacuoli citoplasmatici.

La consapevolezza che la cellula può portare avanti differenti meccanismi di morte è ancor più interessante nelle cellule tumorali in cui accanto alla identificazione di composti citotossici è, pertanto, fondamentale studiare le molecole e i percorsi di morte ad essi associati.

AUTOFAGIA

L'autofagia è un processo catabolico coinvolto nella degradazione lisosomale di materiale citoplasmatico importante per il mantenimento dell'omeostasi cellulare.

La letteratura corrente è in accordo col definire l'autofagia come un processo in grado di svolgere diversi ruoli durante lo sviluppo e la progressione tumorale. Infatti, se da un lato l'autofagia funziona come meccanismo di soppressione tumorale, dall'altro può anche essere responsabile dell'insorgenza di resistenza alle terapie.

L'autofagia è un processo di autodigestione cellulare in cui il contenuto citoplasmatico viene sequestrato in vescicole delimitate da doppia membrana, chiamate autofagosomi; queste si fondono coi lisosomi per la degradazione e il riciclo del materiale. Sebbene tale processo sia stato descritto per la prima volta nei lieviti [1], numerosi e più recenti studi hanno confermato l'importanza dell'autofagia nella regolazione dei principali processi fisiologici e patologici delle cellule eucariote.

Il contributo dell'autofagia nel mantenimento dell'omeostasi cellulare è stato dimostrato in studi su topi in cui la delezione di alcuni dei geni regolatori dell'autofagia, i geni ATG (*AuTophagy genes*), provocava la morte ad un giorno dalla nascita [2,3]. D'altra parte, è stato anche dimostrato che un'autofagia spinta può essere responsabile dell'insuccesso di processi di morte cellulare dovuti ad un'eccessiva degradazione di costituenti cellulari [4] e pertanto, l'autofagia è stata anche denominata come “*meccanismo di morte cellulare programmata di tipo II*”, un processo di morte che può affiancarsi a quello più classico dell'apoptosi o sostituirsi ad esso.

Il mancato funzionamento di tale processo è stato legato a diverse condizioni patologiche che includono malattie neurodegenerative, infezioni e sviluppo di tumori [5].

Regolazione molecolare dell'autofagia

L'autofagia è un percorso a tappe caratterizzato da diverse fasi: *induzione*, *nucleazione*, *maturazione* e *degradazione* degli organelli chiamati autofagosomi.

Protagonista della fase di induzione è il complesso ULK (ULK1/2), chinasi regolate da mTOR che, in condizioni di abbondanza di nutrienti, fosforila ed inattiva le proteine ULK. La deprivazione di nutrienti porta alla defosforilazione e all'attivazione di ULK1 e ULK2 e alla loro localizzazione nei pressi del fagoforo [6].

La PI3K di classe III è, invece, protagonista degli stadi iniziali di nucleazione del fagoforo. Questa chinasi cellulare insieme alle proteine Vps34 e Beclina-1 forma un complesso che facilita il reclutamento di altre proteine ATG [7].

La tappa successiva di allungamento e maturazione del fagoforo, richiede due sistemi *Ubiquitin-like*, il primo forma un complesso multimerico che si localizza sulla membrana della vescicola in formazione, il secondo è responsabile del clivaggio e della coniugazione di fosfatidiletanolamina (PE) alla proteina LC3 che si va ad inserire sulla superficie della membrana dell'autofagosoma. Il completamento della maturazione consiste nella fusione con la membrana dei lisosomi gestita dalle proteine LAMP.

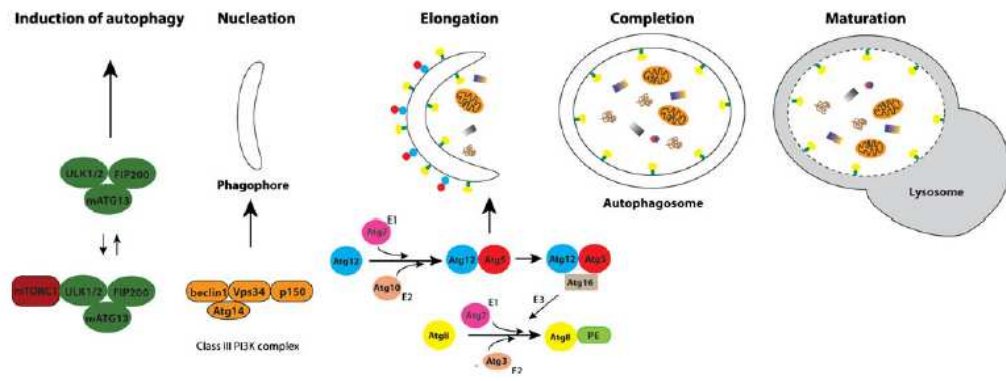


Figura 1. Rappresentazione schematica delle fasi del pathway autofagico.

Ruolo dell'autofagia nel cancro

Il contributo dell'autofagia nel cancro è estremamente complesso; molti dati bibliografici supportano l'evidenza che tale processo può avere sia la funzione di promotore che di soppressore tumorale. Questo paradosso può essere spiegato con i distinti ruoli che l'autofagia può assumere durante la progressione del tumore, ruoli che possono essere diversi a seconda del tipo di tumore, del contesto e della stadiazione. Mentre evidenze genetiche suggeriscono la funzione di *tumor suppressor* dell'autofagia negli stadi iniziali della trasformazione tumorale, ci sono altrettante prove che l'autofagia può anche essere utilizzata dalle cellule tumorali come meccanismo di sopravvivenza durante particolari condizioni di stress, condizioni che si presentano durante la progressione tumorale e la metastasi. Per tali motivi, l'autofagia è considerata un'arma a doppio taglio e lo studio del ruolo dell'autofagia nella tumorigenesi riscuote sempre più attenzione, tanto da far diventare le molecole chiave del percorso autofagico markers prognostici per la determinazione della trasformazione tumorale [8-10].

Autofagia come meccanismo soppressore del tumore

Dal momento che il ruolo principale dell'autofagia è quello di riciclare nutrienti essenziali per rifornire di energia la cellula in condizioni di stress, sembra facilmente intuibile che l'autofagia sia un meccanismo di potenziale difesa per prevenire la trasformazione tumorale. Studi genetici hanno dimostrato il ruolo di *tumor suppressor*

della proteina Beclina-1 in un'alta percentuale di tumori della mammella, delle ovaie ed della prostata; l'analisi di campioni di tessuti umani derivati da carcinoma mammario indicano una ridotta espressione della Beclina-1 rispetto al tessuto sano. A supporto del ruolo di soppressore tumorale dell'autofagia c'è anche l'osservazione che molti oncogeni come Akt, Ras ed ERK sono tra i più importanti inibitori del percorso autofagico e, dall'altra parte, molti soppressori tumorali come p53, PTEN ed ARF attivano l'autofagia.

L'autofagia è in grado di proteggere le cellule dallo stress genotossico e permettere il mantenimento dell'integrità genomica. Generalmente l'apoptosi è il primo meccanismo di difesa cellulare per rimuovere le cellule danneggiate, ma quando il meccanismo apoptotico è danneggiato, allora la cellula si serve dell'autofagia per il mantenimento del benessere cellulare. L'autofagia permette, infatti, di eliminare organelli danneggiati o aggregati proteici che portano ad un incremento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono causare danni al DNA.

Autofagia come meccanismo promotore del tumore

Accanto al suo importante ruolo nella soppressione tumorale, l'autofagia può anche essere un meccanismo per garantire la sopravvivenza delle cellule tumorali durante la crescita e la formazione di metastasi.

Molti studi hanno dimostrato l'esistenza di una connessione tra il core ipossico del tumore e l'autofagia. Il fattore inducibile dall'ipossia HIF-1 α è, infatti, un regolatore positivo dell'autofagia ed innesca tale processo con lo scopo di indurre una risposta di sopravvivenza della cellula in presenza di una condizione di stress [11,12]. In più, in modelli di cancro ovarico, è stato visto che l'autofagia è in grado di rendere alcuni gruppi di cellule resistenti ai chemioterapici e può farli rimanere dormienti per poi far riacquistare loro la capacità proliferativa e rimaniifestare il tumore [13].

INTERAZIONE TRA APOPTOSI E AUTOFAGIA

La transizione da organismi unicellulari a multicellulari ha reso indispensabile l'evolversi di un meccanismo molecolare controllato di "suicidio cellulare", chiamato apoptosi.

L'apoptosi costituisce il programma di morte cellulare programmata meglio conosciuto, di cui sono stati ben caratterizzati tutti i più importanti attori molecolari coinvolti nella

sua esecuzione e regolazione. E' un processo in grado di eliminare le cellule superflue durante il normale sviluppo e le cellule non funzionanti nell'organismo adulto.

Si distingue per specifiche caratteristiche morfologiche che riguardano le cellule coinvolte in tale processo; queste caratteristiche includono lo *shirkange* cellulare, la condensazione e la frammentazione della cromatina. La sua funzione è quella di mantenere l'omeostasi cellulare e può essere innescata da diversi segnali, sia intracellulari, come per esempio l'accumulo di calcio, il danno ossidativo e l'ipossia, sia extracellulari, come la presenza di batteri patogeni, tossine o molecole in grado di indurre apoptosi.

A seconda del segnale che innesca il processo, sono state distinte due diverse vie: la *via intrinseca*, caratterizzata da permeabilizzazione della membrana mitocondriale e dal rilascio del citocromo *c* e la *via estrinseca*, che prende il via dalla stimolazione dei recettori di morte posti sulla membrana cellulare. Le due vie, comunque, non sono separate in maniera netta, ma sono in grado di comunicare tra loro e portare all'attivazione delle caspasi, enzimi chiave del pathway apoptotico [14,15].

Il pathway intrinseco comincia con l'attivazione di differenti proteine della famiglia Bcl-2. Le proteine pro-apoptotiche di questa famiglia contribuiscono alla formazione di canali sulla membrana mitocondriale che ne incrementano la permeabilità e causano il rilascio del citocromo *c* e di AIF. Nel citoplasma, il citocromo *c* si associa ad APAF-1 e alla caspasi-9 formando un complesso chiamato *apoptosoma*. L'apoptosoma attiva le caspasi effettrici portando alla realizzazione della morte cellulare [16].

Il pathway estrinseco comincia con la stimolazione di specifici recettori di morte da parte di ligandi, come TRAIL, appartenenti alla famiglia TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Il legame dei ligandi causa la trimerizzazione del recettore e l'attivazione della caspasi-8 con la formazione del DISC (*Death-inducing signaling complex*) [17]. La caspasi-8 può attivare a cascata le altre caspasi fino a determinare la morte o portare al clivaggio della proteina BID che diventa responsabile dell'attivazione del pathway apoptotico intrinseco e per questo rappresenta il più importante anello di giunzione tra i due pathway.

Un'apoptosi deregolata porta all'accumulo di cellule e contribuisce allo sviluppo di tumori. Mutazioni nei recettori di morte e/o cambiamenti nella loro localizzazione ed espressione possono essere responsabili di difetti nella capacità di morire delle cellule; allo stesso modo, anche mutazioni genetiche nelle proteine della famiglia Bcl-2 possono contribuire allo sviluppo di tumori impedendo la realizzazione del percorso apoptotico.

Per tali motivi, strategie che mirano allo ristabilire il processo apoptotico sono sempre più alla base del meccanismo d'azione dei farmaci antitumorali [18,19].

Crosstalk tra autofagia e apoptosi

Sebbene l'autofagia e l'apoptosi rappresentino processi cellulari distinti con importanti differenze biochimiche e morfologiche, le proteine chiave, che ne controllano la regolazione e l'esecuzione, possono interloquire formando un *network*.

Sono entrambi pathway di degradazione necessari per il mantenimento dell'omeostasi cellulare e per tale motivo è facile comprendere come i due processi siano importanti per la difesa dell'organismo da una varietà di insulti, primo fra tutti il cancro [20-22].

Recentemente, molti gruppi di ricerca si sono dedicati allo studio dei punti di connessione, a livello molecolare, tra autofagia e apoptosi [23,24]; questi processi, infatti, non sono mutualmente esclusivi, ma possono attuarsi nella stessa cellula contemporaneamente o in maniera sequenziale. Generalmente segnali di stress possono indurre la cellula a morte attraverso l'attivazione dell'apoptosi ma, in cellule in cui il pathway apoptotico è stato alterato, può attivarsi, in alternativa, il percorso autofagico. Se la cellula ha, invece, il macchinario apoptotico perfettamente funzionante, l'autofagia può innescarsi dapprima come meccanismo di sopravvivenza e soltanto dopo uno stimolo prolungato può trasformare il tentativo di sopravvivenza in un evento di morte che può realizzarsi sia attraverso l'apoptosi classica che attraverso lo stesso meccanismo autofagico.

Numerosi studi hanno evidenziato la contemporanea presenza nelle cellule di caratteristiche morfologiche apoptotiche e autofagiche, suggerendo una interconnessione tra i due processi. Spesso il destino finale di una cellula dipende dal ruolo che apoptosi e autofagia assumono in quel determinato contesto e dal significato dell' *interplay* fra questi due processi.

La conferma dell'esistenza di un legame tra i due processi è data dall'individuazione di meccanismi molecolari dell'apoptosi in grado di regolare l'autofagia e viceversa.

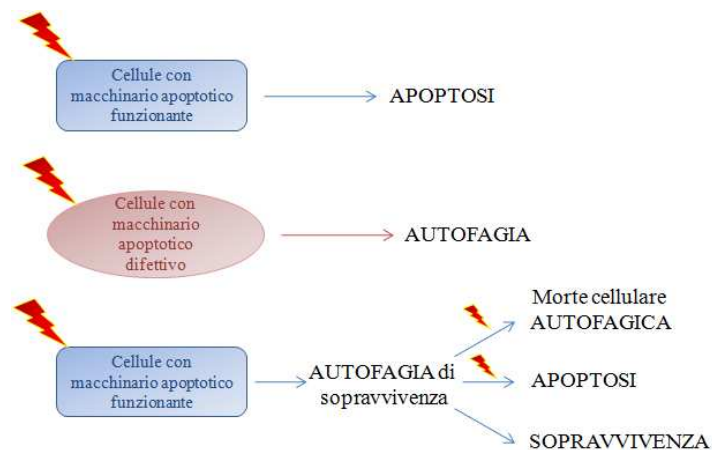


Figura 2. Rappresentazione schematica della relazione tra autofagia e apoptosi in seguito a stress cellulari.

Regolazione dell'autofagia da parte dell'apoptosi

I componenti del macchinario apoptotico possono avere un impatto importante sull'autofagia attraverso interazioni molecolari con proteine tipiche dell'autofagia. L'esempio meglio caratterizzato di questa relazione è la doppia funzione della proteina Bcl-2 nell'inibizione di entrambi i pathway.

La proteina Bcl-2, capostipite dell'omonima famiglia costituita da fattori con funzione pro- o anti-apoptotica, infatti è stata descritta come importante partner della proteina Beclina-1, la loro interazione è responsabile dell'inibizione del percorso autofagico. Pare infatti che questa interazione aiuti a mantenere l'autofagia a livelli basali per il mantenimento della normale omeostasi cellulare. In condizioni che prevedono l'attivazione del meccanismo autofagico, Bcl-2 si dissocia dalla Beclina-1 e consente l'insorgere dell'autofagia [25].

Fra i meccanismi proposti in grado di regolare la dissociazione di tale complesso, il più importante è stato, sicuramente, quello dell'identificazione della Beclina-1 come proteina della famiglia BH3-only; ciò ha suggerito che anche altri membri della famiglia Bcl-2 possano interagire con la Beclina-1, spiazzando in maniera competitiva Bcl-2 [26]. Questa evidenza sottolinea il fatto che le proteine della famiglia Bcl-2 possono

agire come regolatori positivi dell'autofagia e costituiscono, dunque, un livello aggiuntivo di crosstalk tra autofagia e apoptosi.

Anche la fosforilazione di Beclina-1 e Bcl-2 costituisce un sistema di controllo post-traduzionale della dissociazione del complesso Bcl-2/Beclina-1. La fosforilazione di Bcl-2, mediata da JNK1, è in grado di ridurre l'affinità per la Beclina-1, portando all'attivazione dell'autofagia in risposta a deprivazione di nutrienti [27] o a trattamento con ceramide. Allo stesso modo, anche la fosforilazione della Beclina-1 da parte della DAP Kinasi è in grado di indurre autofagia promuovendone la sua dissociazione dal complesso [28].

Uno degli aspetti più intriganti del crosstalk fra apoptosi e autofagia è il modo elegante in cui le cellule riescono a trovare una soluzione "economica" per la regolazione dei due pathway attraverso l'utilizzo di una singola proteina. Nel caso di Bcl-2 questo utilizzo "intelligente" si attua grazie alla diversa affinità di legame ed alla separazione spaziale dei componenti apoptotici ed autofagici.

Come Bcl-2, anche la proteina FLIP può inibire entrambi i processi. L'inibizione dell'apoptosi avviene a livello dei recettori di morte sulla membrana plasmatica, l'inibizione dell'autofagia, invece, avviene andando a bloccare il processo di lipidazione di LC3 a livello della membrana degli autofagosomi [29].

In più, sempre a supporto dell'esistenza di un crosstalk tra autofagia e apoptosi, è stato anche dimostrato il legame tra le caspasi e le proteine ATG. Sembra infatti che la Beclina-1 sia un target delle caspasi [30]. Il taglio operato dalle caspasi contribuisce a decrementare i livelli della proteina e conseguentemente i livelli di autofagia a favore dell'apoptosi.

Regolazione dell'apoptosi da parte dell'autofagia

Così come componenti del macchinario apoptotico possono avere un ruolo importante per la regolazione dell'autofagia, allo stesso modo proteine autofagiche possono avere un impatto importante sull'apoptosi. E' il caso, per esempio, delle proteine ATG5 e ATG12 implicate nelle fasi iniziali dell'autofagia. In recenti lavori è stato visto che ATG5 è un substrato delle calpaine in grado di migrare nel mitocondrio e permettere il rilascio del citocromo *c* [31]. ATG12 è richiesto per l'attivazione delle caspasi ed è in grado di inibire Bcl-2 e Mcl-1 e attivare l'apoptosi [32].

Molti gruppi di ricerca hanno descritto un meccanismo di reclutamento delle caspasi sugli autofagosomi che funzionerebbero come piattaforma per la loro attivazione.

Finora questo meccanismo è stato descritto in dettaglio per la caspasi-8 che può essere attivata da un complesso *DISC-like* sulla membrana degli autofagosomi [33,34]. Questa attivazione è indipendente da segnali di morte esterni e richiede l'intervento della proteina adattatrice p62 che funziona da *carrier* per il reclutamento della caspasi-8 sugli autofagosomi [34].

Inoltre, la risposta apoptotica può essere profondamente influenzata dalla capacità del processo autofagico di controllare la disponibilità energetica attraverso processi di degradazione e potrebbe essere in grado di regolare anche il bilancio tra fattori pro- ed anti-apoptotici, regolando il processo apoptotico in entrambe le direzioni.

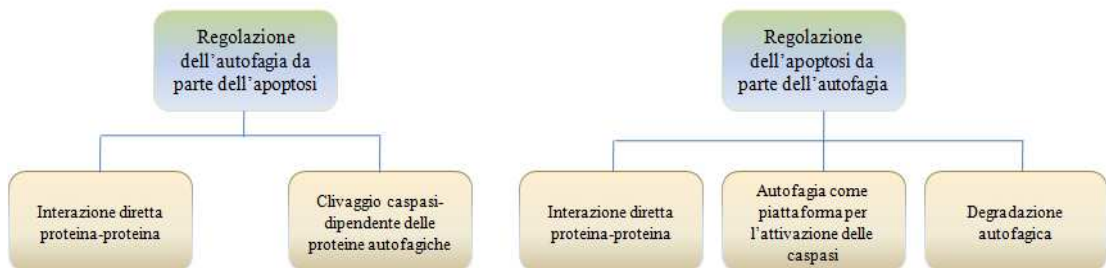


Figura 3. Crosstalk tra autofagia e apoptosi.

CANNABINOIDI

I cannabinoidi sono sostanze di origine naturale chimicamente classificati come terpenofenoli. Il termine cannabinoidi si riferiva al gruppo di composti con tipica struttura C₂₁ presenti nella *Cannabis sativa L.* La moderna definizione, basata con maggiore enfasi sulla chimica sintetica e sulla farmacologia, comprende molecole con struttura affine, e ogni altro composto capace di interagire con i recettori per i cannabinoidi.

Sono state distinte tre classi di cannabinoidi: naturali, endogeni e sintetici.

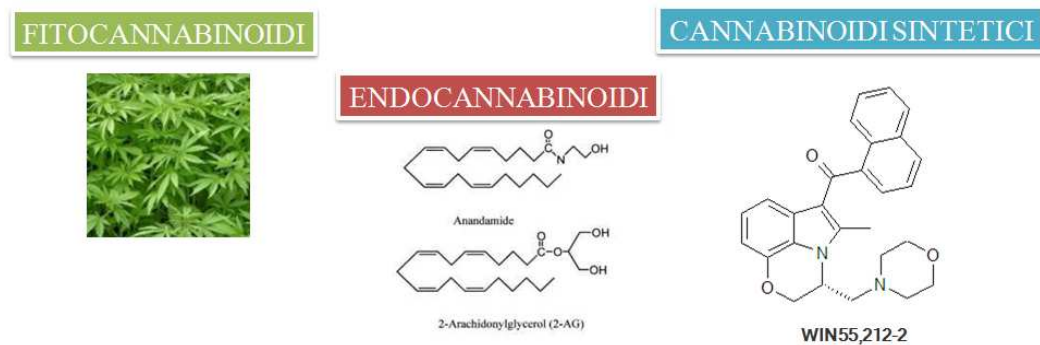


Figura 4. Classificazione dei cannabinoidi.

Cannabinoidi naturali (fitocannabinoidi)

Con questo termine si identifica una famiglia di composti naturali vegetali presenti nella *Cannabis sativa L.* A tutt'oggi sono stati identificati una settantina di tali composti, molti dei quali ancora poco studiati. I più importanti sono:

- ✓ tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), il componente principale
- ✓ il cannabidiolo (CBD)
- ✓ la tetraidrocannabivarina (THCV)
- ✓ il cannabinolo (CBN)

Cannabinoidi endogeni

Gli endocannabinoidi rappresentano una classe di composti naturali che fungono da messaggeri lipidici e accomunati dalla capacità di interagire con i recettori per i cannabinoidi. In seguito al legame con i recettori essi esercitano la loro azione nel controllo del movimento e della percezione, nei processi di apprendimento e memoria, nonché azione ipotensiva, immunosoppressiva, antinfiammatoria e antidolorifica.

Gli endocannabinoidi al momento più conosciuti sono:

- ✓ anandamide (arachidonoiletanolamina, AEA)
- ✓ arachidonoilglicerolo (2-arachidonoilglicerolo, 2-AG)
- ✓ 2-arachidonilglyceril etere (noladin etere)
- ✓ O-arachidonoil-etanolamina (virodamina)

Il primo cannabinoide endogeno isolato dal cervello di maiale nel 1992 è stato l'arachidonoiletanolamide (AEA) [35]. Il nome deriva dalla parola sanscrita *ananda* "stato di grazia" e *amide* in riferimento alla struttura chimica. Infatti, l'anandamide o arachidonoiletanolammide (AEA), è l'amide tra l'acido arachidonico e l'etanolamina, due composti ubiquitari delle membrane cellulari animali. L'AEA si comporta come un agonista parziale sia del recettore CB₁ che di CB₂ [36] e come ligando endogeno per i recettori vanilloidi. Viene prodotta dall'idrolisi del fosfolipide N-arachidonoil-fosfatidiletanolamina (NarPE) in una via metabolica in cui entra in gioco l'enzima N-Arachidonil-fosfatidiletanolamina fosfolipasi di tipo D [37].

Una volta sintetizzata, l'anandamide viene rilasciata all'esterno della cellula e può legarsi ai recettori presenti sulle cellule limitrofe o sulla stessa cellula che l'ha prodotta, comportandosi come mediatore paracrino o autocrino. Espletata la sua funzione biologica, l'anandamide viene ricaptata nelle cellule mediante trasportatori di membrana e subisce un'idrolisi enzimatica catalizzata dall'enzima FAAH (Acido Grasso Ammide Idrolasi) con conseguente formazione di acido arachidonico ed etanolamina.

Cannabinoidi sintetici

Il crescente interesse sui possibili effetti terapeutici dei cannabinoidi ha portato all'acquisizione di numerose conoscenze in campo clinico riguardanti le differenti proprietà di tali composti e alla sintesi di potenti agonisti dei cannabinoidi.

Questi composti agiscono come agonisti sintetici dei recettori per i cannabinoidi e mantengono le differenti proprietà terapeutiche dei cannabinoidi naturali senza

manifestare però nessun effetto psicoattivo [38]. I primi tentativi di sintesi si sono orientati verso la preparazione di molecole del tutto analoghe al THC. Successivamente si è assistito ad un'evoluzione delle caratteristiche strutturali delle molecole: si è cercato cioè di individuare quali fossero le regioni nella molecola del THC importanti nell'interazione con il recettore cannabinoide CB₁ e di riprodurre queste porzioni di molecole in modo analogo su nuove molecole di sintesi, che si discostassero dalla classica struttura tricyclica benzopiranic tipica dello scheletro del THC. Quindi si è passato a strutture diverse, come ad esempio agli amminoalchilindoli, di cui il WIN-55,212-2 può considerarsi il capostipite. In tale molecola è possibile riconoscere i tre siti di interazione con il recettore, localizzati nella porzione C-7 all'anello naftalenico, nel gruppo carbonilico e nella catena laterale lipofila (che si è dimostrata essere molto importante nella modulazione della potenza di questa classe di cannabinoidi sintetici) [39].

RECETTORI DEI CANNABINOIDI

Il corpo umano possiede specifici siti di legame per i cannabinoidi sulla superficie di molti tipi cellulari. Fino ad oggi sono stati identificati due tipi di recettori specifici per i cannabinoidi, indicati come recettori CB₁ e CB₂. Il nostro organismo produce diversi endocannabinoidi, derivati degli acidi grassi, che si legano ai recettori per i cannabinoidi attivandoli. Pertanto, si è definito “*sistema cannabinoide*” il sistema costituito dagli endocannabinoidi e dai loro recettori CB.

I recettori sono stati individuati nel sistema nervoso centrale (encefalo e midollo spinale) ed in molti organi e tessuti periferici (tra cui ghiandole endocrine, ghiandole salivari, leucociti, milza, cuore e parte dell'apparato riproduttivo, urinario e gastrointestinale). A seconda del tipo cellulare e dello stato dell'organismo, l'attivazione dei recettori CB può causare una moltitudine di effetti che includono euforia, ansietà, secchezza delle fauci, rilassamento muscolare, fame e riduzione del dolore, effetti analgesici, antinfiammatori e antitumorali [40].

Accanto a questi recettori ne sono stati identificati anche altri capaci di legare i cannabinoidi come il recettore TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid type 1 receptor*), un canale ionico che, quando viene attivato, permette l'ingresso attraverso la membrana di cationi mono e bivalenti (prevalentemente ioni calcio) [41].

Inoltre è stato dimostrato che i cannabinoidi possono interagire con le cellule attraverso i micro domini di membrana ricchi in colesterolo, denominati *lipid raft* [42].

Struttura dei recettori e meccanismo di trasduzione del segnale

I recettori CB₁ e CB₂ appartengono all'ampia famiglia dei recettori a 7 eliche transmembrana accoppiati alla proteina G di tipo inibitrice dell'adenilato ciclasi (AC).

In seguito all'interazione dei cannabinoidi con i recettori si osserva:

- inibizione dell'adenilato ciclasi con riduzione degli effetti mediati dal cAMP/PKA;
- stimolazione delle MAP chinasi (proteine chinasi attivate dai mitogeni);
- inibizione dei canali del Ca²⁺ voltaggio dipendenti di tipo N e P/Q, mentre effetti opposti si manifestano sui canali del K di tipo A;
- stimolazione della fosfatidilinositolo 3 chinasi;
- mobilitazione del Ca²⁺ intracellulare.

L'attivazione del recettore CB₁ porta, inoltre, all'innalzamento dei livelli intracellulari di ceramide, uno sfingolipide ubiquitario che svolge un importante ruolo nel controllo del destino cellulare. In seguito alla stimolazione del recettore si osservano due picchi distinti di ceramide: uno, a breve termine, è associato all'idrolisi della sfingomieline per azione della sfingomielinasi; in tale meccanismo non è coinvolta la proteina G ma una proteina adattatrice detta FAN (*factor associated with Sphingomyelinae activation*); invece il picco a lungo termine dipende dalla sintesi *de-novo* attraverso la stimolazione della palmitoil-transferasi [43]. Alla produzione di ceramide segue poi l'attivazione della cascata delle MAP chinasi che porta all'attivazione di ERK, di JNK (che fosforila c-Jun) e del fattore di sopravvivenza cellulare AKT. Tutti questi fattori hanno un ruolo importante nella regolazione della proliferazione cellulare, nel differenziamento e nella morte cellulare.

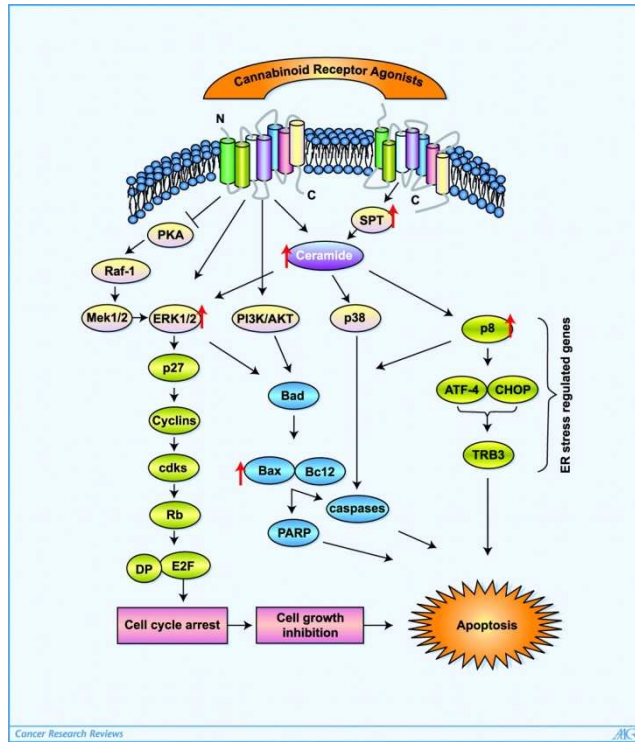


Figura 5. Pathway di trasduzione del segnale associato all'attivazione dei recettori dei cannabinoidi.

CANNABINOIDI NELLA TERAPIA FARMACOLOGICA

Con il DM 18 aprile 2007 sono stati inseriti nella Tabella II, sezione B delle sostanze stupefacenti e psicotrope, due farmaci derivati dalla *cannabis*, il Delta-9-tetraidrocannabinolo ed il Trans-delta-9-tetraidrocannabinolo (Dronabinol). Inoltre, nella stessa tabella, è stato inserito un farmaco cannabinoide di sintesi, il Nabilone. L'introduzione dei cannabinoidi in questa tabella rende possibile il loro impiego nella terapia farmacologica (terapia del dolore, sclerosi multipla) e crea le basi normative per autorizzarli all'immissione in commercio nel mercato italiano. Per quanto riguarda i possibili usi terapeutici, dalle pubblicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) risulta che i cannabinoidi vengono impiegati nel trattamento farmacologico della nausea e del vomito in pazienti affetti da neoplasie o AIDS sottoposti alle cure con farmaci antitumorali e antivirali.

Altri usi terapeutici si stanno studiando in sperimentazioni cliniche sull'uomo e riguardano il trattamento dell'asma e del glaucoma; inoltre si sta valutando la loro attività antidepressiva, anticonvulsivante, antispastica e come stimolanti dell'appetito. Infine i cannabinoidi si dimostrano efficaci nel migliorare la qualità della vita dei malati affetti da sclerosi multipla [44].

CANNABINOIDI ED ENDOCANNABINOIDI NEL CANCRO

Per lungo tempo, i cannabinoidi sono stati considerati come farmaci lenitivi ma non curativi della patologia cancerosa. Tuttavia, negli scorsi anni, è stata suggerita una potenziale applicazione dei cannabinoidi come droghe antitumorali. In molti modelli tumorali sia *in vitro* che *in vivo*, infatti, l'attivazione del sistema dei cannabinoidi ha indotto arresto del ciclo cellulare, inibizione della sopravvivenza e attivazione dei meccanismi di morte cellulare programmata in seguito alla modulazione di numerosi pathway [45] in cellule tumorali di glioma e linfoma, prostata, mammella e pancreas [46-49]. Oltre alla regolazione della crescita tumorale e della capacità di morire delle cellule tumorali, stanno sempre più emergendo meccanismi antitumorigenici innescati dai cannabinoidi su cui i ricercatori hanno focalizzato la loro attenzione, fra questi i processi di neovascolarizzazione, migrazione cellulare, adesione, invasione e metastasi [50].

Il potenziale antitumorale di questa classe di composti può essere molto diverso nei vari sistemi tumorali e questo dipende dal meccanismo usato dai cannabinoidi per interagire con le cellule. L'interazione dei cannabinoidi con i diversi tipi di recettori, spesso porta le cellule allo stesso destino, anche se possono essere attivate diverse cascate di segnali intracellulari [51].

Pathway apoptotico indotto dai cannabinoidi

L'analisi dei mediatori intracellulari della morte apoptotica indotta dai cannabinoidi, ha portato all'identificazione di alcune molecole che, più di altre, sembrano rappresentative della loro azione. Il ceramide è stata una delle prime molecole individuata come effettore dell'azione dei cannabinoidi. L'incremento dei suoi livelli può dipendere, come già detto, da sintesi *de novo* o dal rilascio di sfingolipidi dalla membrana in seguito all'attivazione di sfingomielinasi.

In molti pathway indotti dai cannabinoidi, occupa un ruolo importante l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono esercitare un ruolo cruciale nell'attivazione delle caspasi [52]. Il coinvolgimento dei ROS nell'apoptosi indotta dai cannabinoidi è stato confermato dall'impiego dell' N-acetil-cisteina, un tiolo antiossidante che elimina i ROS, o degli inibitori della NAD(P)H ossidasi, che sono in grado di attenuare gli effetti dei cannabinoidi. Lo studio degli eventi a valle della generazione dei ROS e di ceramide ha evidenziato il coinvolgimento dello stress del reticolo endoplasmatico come dimostrato dall'aumento dei livelli di specifici mediatori (p8, CHOP, TRB-3 e GRP-78) che, a loro volta, sono responsabili dell'attivazione della via apoptotica intrinseca mitocondriale [53,54].

Un altro pathway modulato dai cannabinoidi è rappresentato dalla cascata delle proteine chinasi attivate dai mitogeni (ERK, JNK e p38/MAPK). Una varietà di dati dimostrano che l'attivazione di queste chinasi è responsabile del controllo sulla proliferazione e sopravvivenza gestito dai cannabinoidi [55]

È ben noto che l'attivazione dei pathway di morte deve essere accompagnata dalla riduzione dei livelli dei fattori di sopravvivenza. Una via centrale di segnalazione intracellulare pro-sopravvivenza è rappresentata dal pathway PI3K/AKT, la cui importanza in diversi tumori è anche confermata da numerosi studi clinici. Questa chinasi è il nodo centrale della via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR che attiva processi cruciali come la sopravvivenza cellulare, la crescita, la proliferazione, l'angiogenesi, la migrazione cellulare e l'invasività [56]. Al contrario, l'inibizione di pAKT conduce all'arresto del ciclo cellulare che precede la risposta apoptotica molto spesso mediata dal coinvolgimento della via intrinseca mitocondrio-dipendente. L'inibizione di AKT è coinvolta nell'azione antitumorale dei cannabinoidi. Nelle cellule tumorali gastriche umane, è stato visto che gli agonisti dei recettori dei cannabinoidi inducono l'arresto del ciclo cellulare, conseguente all'inibizione di AKT correlata all'attivazione della via delle MAPK [57].

Pathway autofagico indotto dai cannabinoidi

Numerosi studi recenti hanno evidenziato che i cannabinoidi possono agire innescando il processo autofagico in diversi modelli sperimentali di cancro. L'inibizione farmacologica o genica dell'autofagia è in grado di prevenire l'apoptosi indotta dai cannabinoidi. In più, è stato dimostrato che il blocco dell'apoptosi previene la morte ma non l'autofagia in cellule trattate con i cannabinoidi, suggerendo che l'induzione di

autofagia è parte del meccanismo attraverso cui i cannabinoidi agiscono in cellule tumorali sia *in vivo* che *in vitro*.

Nelle cellule umane di glioma, il modello principale di cancro per lo studio dell'azione dei cannabinoidi, è stato osservato che il tetraidrocannabinolo induce morte cellulare attraverso la stimolazione dell'autofagia [58]. I dati indicano che il THC induce accumulo di ceramide, fosforilazione di eIF2 α ed ER-stress che attiva l'autofagia attraverso l'inibizione, TRB3-dipendente, dell'asse AKT/mTOR.

Studi *in vivo* su carcinoma epatocellulare hanno rivelato che l'inibizione della crescita indotta dal trattamento con THC viene meno quando l'autofagia è geneticamente o farmacologicamente bloccata. Tutto questo conferma che l'induzione dell'autofagia è, probabilmente, un passo chiave nella morte cellulare indotta dai cannabinoidi [59].

La coesistenza di autofagia e apoptosi in seguito al trattamento con i cannabinoidi è stata confermata da diverse osservazioni: in cellule di carcinoma mammario trattate con cannabidiolo, l'inibizione della produzione di ROS, blocca l'induzione di entrambi i processi e, dall'altra parte l'aumento dei livelli della Beclina-1, marker dell'autofagia, gioca un ruolo centrale anche nell'induzione dell'apoptosi mediata dal cannabidiolo [60].

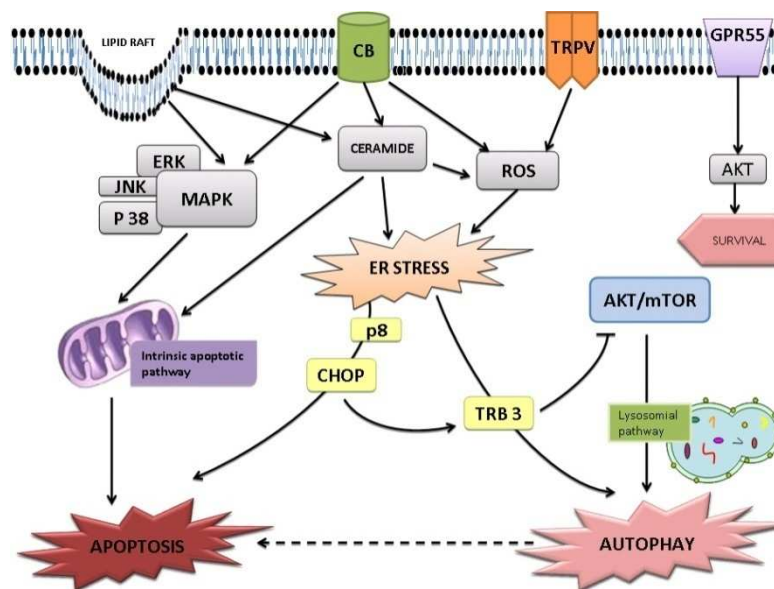


Figura 6. Rappresentazione schematica dei pathway indotti dai cannabinoidi [51].

CANNABINOIDI E RECETTORI PPAR

Molti ricercatori hanno focalizzato l'attenzione sul rapporto che i cannabinoidi hanno con un'importante famiglia di recettori nucleari, i recettori PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), in grado di influenzare il destino cellulare. Sono di norma localizzati nel citosol sotto forma di recettori non attivi-attivabili legati alla proteina chaperone Hsp90. Una volta attivati dai ligandi essi eterodimerizzano con il recettore X dell'acido retinoico (RARs) e, sotto forma di complesso PPAR-RXR, migrano nel nucleo dove si legano al promotore dei geni target nella regione PPRE del DNA costituita da una sequenza ripetuta di nucleotidi AGGTCA, intervallata da una o due sequenze di nucleotidi random, denominati DR1 e DR2.

In seguito al legame al DNA, i PPAR possono sia attivare che reprimere la trascrizione del gene target. Poiché l'attività di tali fattori è regolata per fosforilazione mediata da AMPK, ERK1/2 e JNK, il differente esito dell'attivazione dei PPAR potrebbe essere correlato proprio al tipo, al numero o alla sequenza di fosforilazioni che subisce.

Identificati, inizialmente, per il loro ruolo cruciale nel differenziamento adipocitario, recentemente è emerso anche il potenziale coinvolgimento dei recettori PPAR nell'infiammazione e nello sviluppo di patologie cardiovascolari nonché in alcuni processi neoplastici, soprattutto a carico dell'intestino e del fegato.

Come altri recettori nucleari, i PPAR hanno una struttura modulare organizzata in quattro domini funzionali: dominio A/B, dominio C, dominio D e dominio E/F. In posizione ammino-terminale si trova il dominio A/B di attivazione ligando-indipendente (Funzione di Attivazione AF-1), che viene regolato per fosforilazione da parte delle MAP-kinasi. Il dominio C contiene il dominio di legame al DNA DBD (DNA Binding Domain) che riconosce gli elementi di risposta a PPAR (PPRE) nel promotore dei geni target [61]. Il dominio D contiene i siti di reclutamento dei cofattori, ed infine il dominio E/F o "dominio ligando-obbligatorio" (LBD) è responsabile della specificità per il ligando e dell'attivazione del legame al PPRE (transattivazione ligando-dipendente o funzione AF-2 mediata dal reclutamento di cofattori), che incrementa l'espressione dei geni target. Oltre ai ligandi, altri fattori come il recettore RXR e i cofattori giocano un ruolo nell'attivazione della trascrizione.

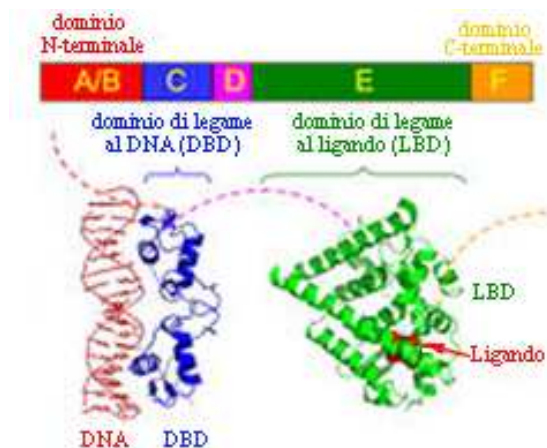


Figura 7. Struttura dei recettori PPAR.

Alla superfamiglia PPAR appartengono tre isoforme α , δ e γ .

Il recettore PPAR α è localizzato in tessuti metabolicamente attivi come il fegato, il cuore e il muscolo ed è coinvolto nella regolazione del catabolismo degli acidi grassi e in processi infiammatori [62]. Il recettore PPAR δ (conosciuto anche come PPAR β) è espresso in maniera ubiquitaria; la sua funzione è rimasta sconosciuta per parecchi anni, ma studi recenti lo collocano fra i più importanti regolatori metabolici [63], mentre PPAR γ è il recettore PPAR meglio caratterizzato. Sono stati individuati tre diversi isotipi di PPAR γ : PPAR γ 1, espresso in maniera ubiquitaria; PPAR γ 2, espresso nel tessuto adiposo; PPAR γ 3 espresso dai macrofagi [64]

Il recettore PPAR γ è coinvolto in molti processi cellulari, primo fra tutti il programma di differenziamento degli adipociti, cellule in cui questo fattore trascrizionale è altamente espresso [65]. Considerato, infatti, un regolatore fondamentale dell'adipogenesi, PPAR γ è coinvolto nella modulazione dei geni necessari al differenziamento dei fibroblasti in adipociti, dei geni che codificano proteine coinvolte nella sintesi dei lipidi e nel loro immagazzinamento negli adipociti stessi. PPAR γ è stato, inoltre, associato all'attivazione di geni coinvolti nella trasduzione del segnale dell'insulina aumentando la sensibilità delle cellule a questo ormone: è stato dimostrato che esso induce la trascrizione dei geni di IRS-1-2 e della fosfatidilinositolo-3-chinasi, l'overespressione delle traslocasi GLUT-4, aumentando l'ingresso del glucosio nella cellula; riduce l'espressione di enzimi coinvolti nella gluconeogenesi e aumenta i livelli

di adiponectina. PPAR γ svolge anche un importante ruolo nella regolazione del processo flogistico in quanto la sua attivazione inibisce il fattore TNF α , alcune interleuchine e i fattori trascrizionali NF-KB, AP-1 e STAT e quindi la trascrizione di geni infiammatori.

Accanto alle risposte metaboliche, l'attivazione di PPAR γ da parte dei suoi ligandi naturali, come gli acidi grassi polinsaturi omega 3 (ALA, DHA ed EPA), arresta il ciclo cellulare in fase G1 con induzione dei markers di differenziamento; in alcuni casi la sua attivazione riduce l'espressione dei geni antiapoptotici e conseguentemente la sua inibizione conduce la cellule verso l'acquisizione di caratteristiche neoplastiche [66,67].

Il dominio di legame al ligando dei recettori PPAR è, di solito, molto grande e, di conseguenza, possono essere attivati da ligandi con struttura chimica molto diversa.

Poiché i recettori PPAR sono sensori degli acidi grassi e gli endocannabinoidi sono derivati degli acidi grassi, non è sorprendente che i cannabinoidi siano anche in grado di attivare tali recettori e tramite questi espletare molti dei loro effetti biologici.

Cannabinoidi e PPAR γ

E' stato già ampiamente dimostrato il legame tra i cannabinoidi e il recettore PPAR γ ; la stimolazione dell'adipogenesi, di cui PPAR γ è protagonista, è accompagnata infatti da un incremento dei livelli degli endocannabinoidi e dell'efficienza di legame dei cannabinoidi ai loro recettori. Sembra, quindi, che l'attivazione di PPAR γ possa influenzare il sistema degli endocannabinoidi, ma nello stesso tempo sembra vero anche il contrario. I cannabinoidi possono legare direttamente PPAR γ , aumentarne la sua attività trascrizionale e stimolare il differenziamento di fibroblasti in adipociti.

Inoltre negli ultimi decenni è stata messa in luce la correlazione tra i recettori PPAR e l'insorgenza o la regressione dei tumori, pertanto la modulazione dell'attività di tali recettori da parte dei cannabinoidi diventa di notevole interesse.

Il fatto che il recettore PPAR γ è iperespresso in molti tipi di cancro, suggerisce che la sua regolazione possa influenzarne la patogenesi. Tuttavia, il ruolo della sua attivazione è ancora controverso [68].

Studi recenti hanno dimostrato il ruolo chiave della modulazione di PPAR γ nel determinare l'inibizione della proliferazione in diversi tumori sia in vivo che in vitro attraverso meccanismi che portano all'arresto della crescita, all'apoptosi e all'induzione del differenziamento [69,70].

Il gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio progetto di tesi ha dimostrato l'efficacia del cannabinoide sintetico WIN555,212-2 nell'indurre morte per apoptosi in cellule di epatocarcinoma umano HepG2 [71] in cui il WIN agisce determinando incremento dei livelli di alcuni fattori pro-apoptotici e riduzione dei fattori di sopravvivenza. L'apoptosi indotta dal WIN è accompagnata da un notevole incremento del livello di PPAR γ che sembra essere responsabile degli effetti indotti dal cannabinoide, infatti l'aggiunta di antagonisti di PPAR γ contrasta efficacemente la citotossicità del WIN.

Obiettivo della tesi

Questo progetto si è posto l'obiettivo di studiare gli effetti di differenti cannabinoidi e in particolare del WIN, un cannabinoide sintetico, ligando dei recettori CB1 e CB2, in cellule di carcinoma coloretale e osteosarcoma umano in coltura e di valutarne il meccanismo molecolare di azione. In studi precedenti condotti nel laboratorio presso cui ho svolto il dottorato di ricerca era stata già dimostrata l'efficacia del WIN nel sensibilizzare le cellule di epatocarcinoma umano HepG2 all'apoptosi indotta da TRAIL. Il WIN agisce determinando stress del reticolo endoplasmatico, incremento dei livelli di alcuni fattori pro-apoptotici e riduzione di fattori di sopravvivenza [54]. Sempre in cellule di carcinoma epatocellulare, l'apoptosi indotta dal WIN si accompagna a un notevole incremento dei livelli di PPAR γ [71].

I promettenti risultati ottenuti nelle cellule di epatocarcinoma ci hanno indotto a valutare gli effetti del WIN anche su altre linee di cellule tumorali. Abbiamo, quindi, intrapreso un nuovo studio utilizzando come modello sperimentale le cellule di carcinoma coloretale HT29, HCT116 e Caco-2, e le cellule di osteosarcoma umano MG63.

Il carcinoma del colonretto (CRC) è il tumore maligno che rappresenta la quarta più comune forma di cancro nei paesi occidentali. L'incidenza nei due sessi non mostra differenze per quanto riguarda la localizzazione colica, mentre a livello rettale sembra essere leggermente più frequente nel sesso maschile. Le sedi più colpite sono il retto (50% dei casi) ed il sigma (20% dei casi), il colon ascendente ed il trasverso con la flessura splenica sono interessati rispettivamente nel 16% e nell'8% dei casi. Le cause esatte di questo tumore non sono ancora ben chiare tuttavia la componente genetica è preponderante, solitamente, infatti, queste cellule tumorali possiedono mutazioni ereditate o acquisite nel corso della vita a carico di geni coinvolti nella via di trasduzione del segnale Wnt, e/o nella replicazione e riparazione del DNA. Fermo restando che in genere la predisposizione primaria a questo cancro è solitamente genetica, altri fattori possono influenzare il rischio di contrarre questa malattia soprattutto in persone geneticamente predisposte. Raramente il CRC colpisce soggetti con età inferiore ai 50 anni e i casi che colpiscono i giovani sono associati a condizioni di predisposizione familiare. Sono predisponenti anche la presenza di polipi nel colon, il fumo, fattori ambientali, la presenza di processi infiammatori cronici dell'intestino, come il morbo di Crohn e la rettocolite ulcerosa.

L'osteosarcoma è costituito da cellule mesenchimali maligne che si differenziano in senso osteoblastico, ossia che tendono a produrre sostanza ossea. Il tumore si sviluppa nelle zone con più attiva neoformazione e rimaneggiamento dell'osso e, per tale motivo,

la più alta incidenza della malattia si ha in una fascia di età composta da adolescenti e giovani adulti [72]. Le cause dell'insorgenza dell'osteosarcoma sono tuttora sconosciute. La correlazione con l'età adolescenziale e la comparsa del tumore, nella maggior parte dei pazienti, in coincidenza con il periodo di massimo accrescimento osseo, individuano nell'aumentata attività osteoblastica ed osteogenetica un fattore predisponente all'insorgenza della neoplasia [73]. L'unica relazione certa di causa-effetto esiste per l'esposizione a radiazioni. L'altro fattore per il quale sia stato accertato un sicuro coinvolgimento nell'insorgenza dell'osteosarcoma sono le anomalie genetiche (mutazioni e/o delezioni) a carico di geni oncosoppressori p53 e RB1, responsabili anche della comparsa di altri tipi di cancro. Nella genesi di osteosarcomi non ereditari sono anche state chiamate in causa anomalie dei geni che regolano il ciclo cellulare come CDK4, p16, INK4a, CICLINA D e MDM2 [74].

Materiali e Metodi

Colture cellulari

Le linee cellulari utilizzate in questo studio sono state: cellule di carcinoma colorettales HT29, HCT116 e Caco-2 e cellule di osteosarcoma MG63. Le cellule HT29 e Caco-2 sono state coltivate in terreno RPMI 1640, mentre le cellule HCT116 e MG63 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). I terreni sono stati sempre supplementati con siero bovino fetale (FBS) al 10% (precedentemente inattivato a 56°C per 30 minuti), L-glutamina 2 mM e una soluzione di antibiotici e antimicotici (100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina and 250 ng/ml amfotericina B). Le cellule sono state coltivate in fiasche da 75 cm² dove aderiscono disponendosi su un monostrato.

Al fine di valutare gli effetti indotti dai composti, le cellule, dopo distacco con la soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA), sono state seminate in piastre da 6 pozzetti o da 96 pozzetti a seconda degli esperimenti da effettuare. In seguito al piastramento, le cellule vengono lasciate ad incubare per circa 24 ore. Il giorno successivo le cellule sono state trattate con i composti a concentrazioni e a tempi variabili.

Nel caso degli studi condotti impiegando i cannabinoidi, 4-6 h prima dei trattamenti, il mezzo di coltura è stato rimosso e sostituito con terreno fresco contenente FBS al 2%, così come riportato da molti autori. Per ogni esperimento viene effettuata parallelamente una prova controllo costituita da cellule trattate con il solo mezzo in cui sono stati solubilizzati i composti.

Saggi di vitalità

La vitalità cellulare è stata analizzata con differenti saggi. Uno di questi è una tecnica che si basa su un dosaggio quantitativo colorimetrico che utilizza il sale MTT (3-(4,5-dimetthylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), un sale tetrazolico di colore giallo che, in seguito a riduzione da parte delle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali, forma un precipitato di colore blu-violetto (formazan) la cui intensità è direttamente proporzionale alla vitalità cellulare residua.

Le cellule sono state incubate in piastre da 96 pozzetti, trattate con i composti e, al termine, incubate con 20µl di una soluzione di MTT (11 mg/ml di PBS) per pozzetto per circa 2 ore a 37°C. Successivamente, il terreno è stato rimosso e le cellule sono state

lisate con una soluzione ottenuta solubilizzando SDS al 20% in dimetilformamide al 50% (pH 7.4).

La valutazione spettrofotometrica è stata effettuata mediante lettore per micropiastre ELISA (OPSYS MR, Dynex Technologies), che misura la differenza tra l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 570 e 630 nm.

I dati sono riportati come percentuale di vitalità residua rispetto al controllo in cui la capacità di riduzione del sale viene considerata il 100% di vitalità.

La vitalità cellulare è stata analizzata anche attraverso colorazione con ioduro di propidio (PI), un colorante che normalmente viene escluso dalle cellule vitali perché non riesce ad attraversare la membrana plasmatica. Le cellule vitali risulteranno negative a questo composto, mentre le cellule che presentano la membrana cellulare danneggiata risulteranno positive al fluorocromo ed emetteranno fluorescenza rossa. Maggiore è la positività delle cellule allo ioduro di propidio, maggiore sarà la percentuale di morte cellulare. Per l'analisi le cellule, dopo tripsinizzazione e centrifugazione, sono state risospese in PBS (5×10^5 cellule/500 μ l di PBS) e colorate con 2 μ g/ml di una soluzione isotonica di ioduro di propidio per 8 minuti a 4°C.

Dopo l'incubazione le cellule sono state analizzate utilizzando un citofluorimetro Epics XL (Beckman Coulter) dotato di software Expo32. I dati riportati in figura sono il risultato della media \pm S.D. di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

Infine, la vitalità è stata valutata anche attraverso colorazione con arancio di acridina ed etidio bromuro (AO/ET). Le cellule sono state piastrate in multiwell da 96 pozzetti, trattate con i composti e colorate con una soluzione composta da 50 μ g/ml di arancio di acridina e 50 μ g/ml di etidio bromuro. Le cellule sono state esaminate utilizzando un microscopio a fluorescenza Leica DM IRB, sfruttando i filtri FITC e Rodamina. Le cellule vitali appaiono uniformemente colorate di verde, mentre le cellule morte e che presentano addensamenti cromatinici presentano spot rossi. Le immagini sono state ottenute utilizzando una fotocamera collegata al microscopio (Leica DC300F). I dati riportati in figura rappresentano la media \pm S.D. di quattro esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

Per analizzare la distribuzione delle cellule lungo le fasi del ciclo proliferativo, dopo trattamento con i composti, le cellule sono state staccate e risospese in una soluzione ipotonica contenente 50 μ g/ml di ioduro di propidio, 0.1% sodio citrato, 0.01% Nonidet

NP-40 and 10 µg/ml di RNasi per almeno 2 ore a 4°C. L'analisi è stata effettuata utilizzando un citofluorimetro Epics XL (Beckman Coulter) dotato di software Expo32. La popolazione di detriti e aggregati è stata esclusa dall'analisi. La percentuale di cellule in fase sub-G0-G1 è considerata indice di cellule morte che presentano DNA frammentato. I dati riportati in figura rappresentano la media \pm S.D. di almeno quattro esperimenti indipendenti.

Valutazione del potenziale di membrane mitocondriale

La dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) è stata misurata usando 3,3-dihexyloxacarbocyanine (DiOC6) un fluorocromo lipofilo carico positivamente che emette fluorescenza verde quando si accumula nella matrice mitocondriale. Le cellule che mostrano una bassa fluorescenza sono cellule in cui è avvenuta dissipazione del potenziale che causa un minore ingresso del fluorocromo. L'analisi è stata effettuata utilizzando un citofluorimetro Epics XL (Beckman Coulter) dotato di software Expo32 in presenza di un controllo positivo, il CCCP (Carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone) 50 mM che causa completa dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale.

Valutazione della permeabilizzazione della membrana lisosomale (LMP)

La permeabilizzazione della membrana lisosomale è stata valutata attraverso colorazione con arancio di acridina (AO). L'AO è un fluoroforo metacromatico in grado di emettere fluorescenza rossa quando si accumula nei compartimenti acidi della cellula e fluorescenza verde quando è libero nel citoplasma. L'aumento della permeabilità lisosomale viene monitorata come incremento della colorazione verde diffusa o decremento degli spot rossi. La tecnica utilizzata per questa valutazione è stata quella della rilocalizzazione dell'acridina.

Le cellule piastrate sono state colorate con una soluzione di arancio di acridina 5 µg/ml per 15 minuti a 37°C. Le cellule sono state lavate con PBS e trattate con le droghe per 5 ore. Alla fine del trattamento, le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza equipaggiato con filtri FITC e Rodamina o analizzate al citofluorimetro. Questa tecnica permette di saggiare le alterazioni precoci della membrana lisosomale. Tutte le tappe sono state effettuate al buio e i risultati riportati sono una media di quattro diversi esperimenti.

Analisi dell'autofagia

La formazione di organelli vescicolari acidi è stata analizzata anche attraverso colorazione con monodansilcadaverina (MDC). Le cellule sono state colorate, direttamente in piastra, con MDC 0,05 mM in PBS per 10 minuti a 37°C al buio e analizzate al microscopio a fluorescenza usando il filtro DAPI.

L'autofagia è stata analizzata anche colorando le cellule con arancio di acridina (AO) (1µg/ml in PBS) a 37°C per 15 minuti al buio. Le immagini sono state visualizzate al microscopio a fluorescenza usando i filtri FITC e Rodamina. Per quantificare l'emissione di fluorescenza rossa e verde le cellule sono state staccate, risospese in PBS ed analizzate al citofluorimetro. L'incremento della fluorescenza rossa è indicativo di aumento del numero di autofagosomi.

Analisi dei livelli proteici per immunoblotting

Gli estratti proteici sono stati preparati lavando le cellule in PBS e lisandole utilizzando un buffer di lisi contenente un cocktail di inibitori di proteasi. Dopo aver sonicato ciascun campione per tre cicli da 10 secondi, il contenuto proteico è stato quantizzato utilizzando il metodo di Bradford. Dopo il dosaggio, campioni di 40 µg di proteine sono stati caricati su gel di poliacrilammide (*SDS-PAGE*) per la separazione delle proteine. Terminata la corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su un filtro di nitrocellulosa attraverso la tecnica dell'elettroblotting. I filtri sono stati incubati con anticorpi specifici per le proteine di nostro interesse. La visualizzazione finale è stata effettuata attraverso un sistema colorimetrico o attraverso un sistema chemiluminescente. Il controllo di caricamento è stato fatto sfruttando sia la colorazione con rosso Ponceau, sia la rilevazione dell'actina. La densità relativa delle bande è stata valutata utilizzando il software Image J e Quantity One.

Silenziamento genico attraverso la tecnica dell'*RNA interfering*

Gli *small interfering RNA* (siRNA) utilizzati sono stati rivolti verso il messaggero delle proteine CHOP, PPAR γ e Beclina-1. Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati anche dei *siRNA scramble* come controllo negativo.

Le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti e il silenziamento è stato effettuato quando queste avevano raggiunto circa il 50% di confluenza. Gli *small interfering RNA* sono stati trasfettati nelle cellule utilizzando due diversi agenti trasfettanti, il Metafectene per i *siRNA* di CHOP e PPAR γ e la Lipofectamina 2000 per il *siRNA* della

Beclina-1. La trasfezione è avvenuta in terreno privo di siero e di antibiotici. Dopo circa 6 ore dall'inizio della trasfezione il terreno è stato rimpiazzato con terreno fresco completo. Le cellule sono state trattate con i composti dopo circa 24 ore dal blocco della trasfezione.

Valutazione di GRP78 di superficie

Valutazione qualitativa al microscopio a fluorescenza

Per la valutazione di GRP78 di superficie le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti, trattate per 16 ore, fissate utilizzando formaldeide al 3,7% per 5 minuti e incubate con l'anticorpo primario contro GRP78 per tutta la notte a 4°C. La piastra è stata lavata con PBS e incubata per 1 ora al buio con un anticorpo secondario specifico coniugato con il fluorocromo FITC. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate, i nuclei sono stati colorati con Hoechst vitale e analizzate al microscopio a fluorescenza, usando i filtri FITC e DAPI.

Valutazione quantitativa al citofluorimetro

Per quantizzare l'espressione di GRP78 sulla superficie, le cellule sono state staccate attraverso tripsinizzazione, risospese in PBS contenente albumina allo 0,1% e incubate con l'anticorpo specifico per GRP78 o con un controllo isotipico per 30 minuti. Al termine, le cellule sono state lavate per rimuovere l'eccesso di anticorpo e incubate con l'anticorpo secondario coniugato con FITC. Dopo 30 minuti trascorsi al buio e a 4°C, le cellule sono state risospese in PBS e analizzate al citofluorimetro.

Risultati

EFFETTI DEL CANNABINOIDE SINTETICO WIN SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI CARCINOMA COLORETTALE

Effetti del WIN sulla vitalità di cellule HT29, HCT116 e Caco-2

Lo studio sull'azione del cannabinoide sintetico WIN55,212-2 (WIN), un potente agonista dei recettori dei cannabinoidi, in cellule tumorali in coltura, è cominciato con la valutazione dei suoi effetti sulla vitalità in cellule di carcinoma coloretale HT29, HCT116 and Caco-2 attraverso il saggio MTT.

Come mostrato in figura 1a il WIN 10 μ M causa una riduzione della vitalità cellulare. L'effetto ha un andamento tempo- e dose-dipendente ed è già evidente dopo 8 ore di trattamento e raggiunge il massimo dopo 48 ore, quando la vitalità residua, nelle cellule HT29, che risultano le più sensibili al trattamento, è di circa il 25% rispetto al valore controllo.

Gli effetti del WIN sulle cellule HT29 sono stati confermati anche attraverso analisi citofluorimetrica dopo colorazione con ioduro di propidio isotonico che evidenzia un progressivo incremento della fluorescenza, indicativo di una progressiva perdita di integrità della membrana plasmatica dopo lunghi periodi di trattamento (figura 1b).

Per valutare se gli effetti citotossici indotti dal WIN fossero associati all'induzione di apoptosi, abbiamo valutato l'attività delle caspasi, un gruppo di proteasi di cui è stato ampiamente dimostrato il coinvolgimento ed il ruolo fondamentale nel processo apoptotico [75]. Dopo 36 ore di trattamento abbiamo osservato attivazione della caspasi effettrice-3, evidenziata come riduzione della forma pro-enzimatica. L'attivazione della caspasi-3 è stata confermata dal concomitante clivaggio della poly(ADP-ribosio)polimerasi (PARP), evidente solo nelle cellule HT29 e HCT116. PARP è una proteina coinvolta nei meccanismi di riparazione del DNA soprattutto in condizioni di stress e la sua degradazione, operata dalla caspasi-3, ne inattiva la funzione separando il dominio di legame al DNA N-terminale dal suo dominio catalitico C-terminale (figura 1c).

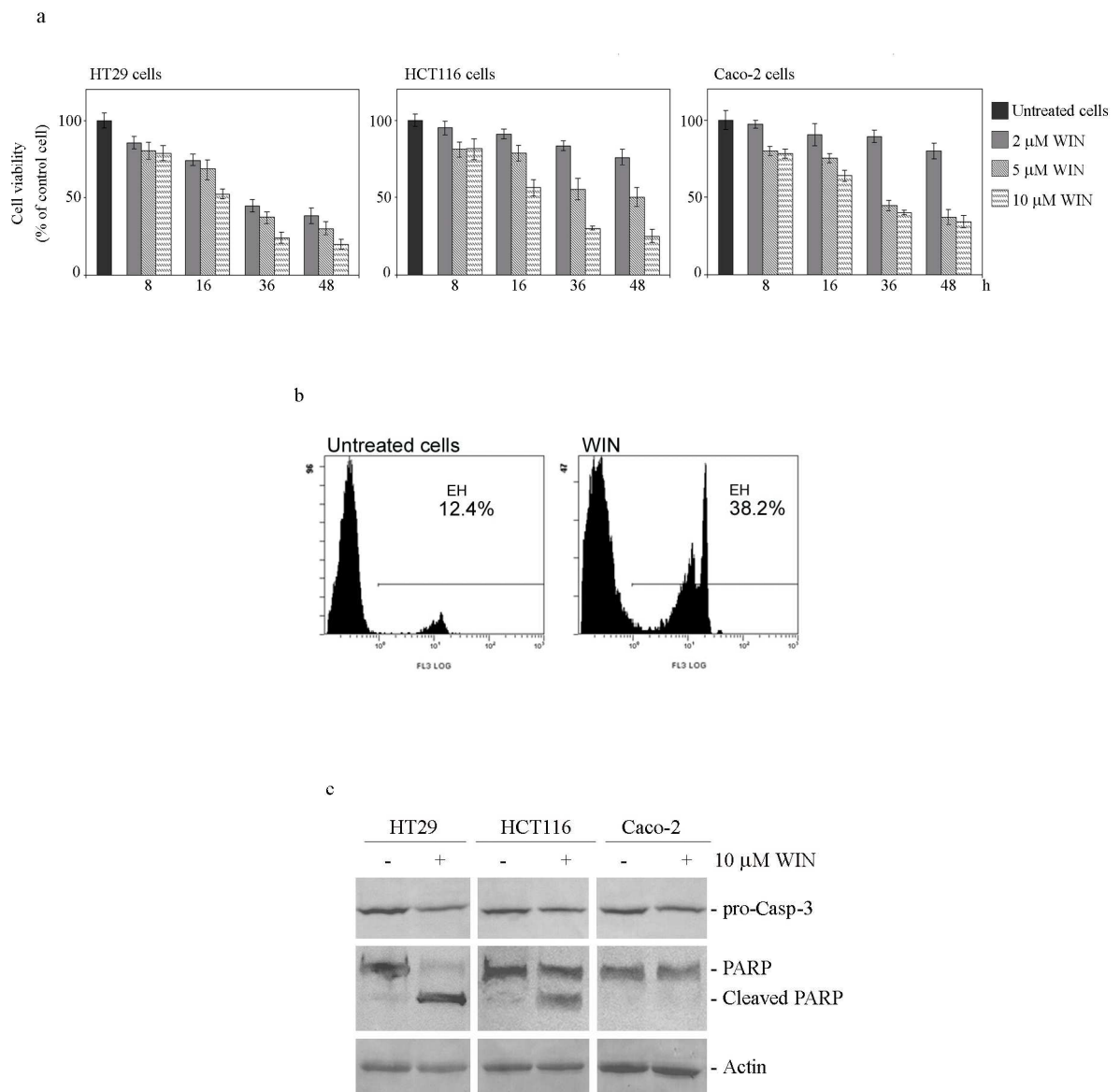


Figura 1. Il trattamento con WIN induce riduzione della vitalità cellulare. (a) Effetti del WIN sulla vitalità di cellule HT29, HCT116 e Caco-2 trattate con il cannabinoide alla concentrazione e per il tempo indicato. La sopravvivenza cellulare è stata valutata attraverso saggio MTT, come descritto in Materiali e Metodi, ed è stata espressa come percentuale di vitalità residua rispetto alle cellule controllo. (b) Valutazione citofluorimetrica della vitalità di cellule HT29 trattate per 36 ore con WIN 10 μM e colorate con ioduro di propidio come descritto in Materiali e Metodi. (c) Analisi di western blotting dei livelli di Caspasi-3 e PARP in cellule di carcinoma colorettale. Dopo trattamento per 36 ore con il WIN 10 μM i lisati cellulari sono stati analizzati attraverso immunoblotting come descritto in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato inserito come controllo di caricamento.

Poiché le cellule HT29 si sono mostrate le più sensibili al trattamento con WIN abbiamo scelto di continuare le nostre valutazioni su questa linea cellulare. In queste cellule, analisi di western blotting hanno mostrato l'attivazione della caspasi-9, che consiste nella marcata riduzione della forma pro-enzimatica e nella comparsa del frammento attivo a più basso peso molecolare (figura 2a). Poiché questo risultato ci ha suggerito un possibile coinvolgimento del mitocondrio nel meccanismo molecolare indotto dal WIN, abbiamo valutato la variazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) attraverso l'uso di un saggio citofluorimetrico che sfrutta la capacità di uno specifico fluorocromo lipofilo, il DiOC₆, di attraversare la membrana mitocondriale e di accumularsi nella matrice in modo inversamente proporzionale alla dissipazione del potenziale. Come mostrato in figura 2b nella condizione controllo la percentuale di cellule a bassa fluorescenza è minima. Il trattamento delle cellule HT29 con WIN 10 μ M causa caduta del potenziale di membrana mitocondriale, il catione lipofilo entra in misura minore e di conseguenza incrementa la percentuale di cellule confinate nella regione del grafico a più bassa fluorescenza. Questo risultato ci ha confermato l'attivazione del pathway intrinseco dell'apoptosi.

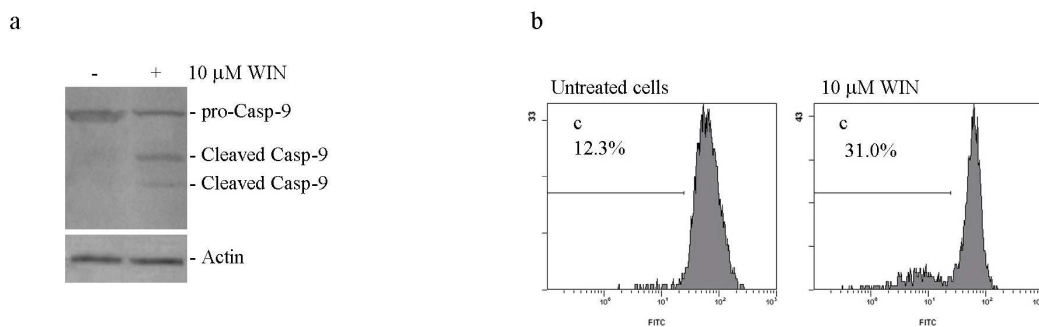


Figura 2. Il WIN induce dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale. (a) Western blotting rappresentativo della Caspasi-9. Dopo 36 ore di trattamento con WIN le cellule HT29 sono state lisate e analizzate attraverso immunoblotting utilizzando un anticorpo specifico, come riportato in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento. (b) Determinazione della caduta del potenziale di membrane mitocondriale in HT29 trattate per 16 ore con WIN. Il $\Delta\psi_m$ è stato quantificato citofluorimetricamente in presenza del catione lipofilo DiOC₆.

In ultimo, abbiamo voluto valutare se il decremento della vitalità cellulare a seguito del trattamento con il cannabinoide fosse associato a variazioni nella distribuzione delle cellule lungo le fasi del ciclo proliferativo.

L'analisi del ciclo cellulare effettuata attraverso citometria a flusso dopo colorazione con ioduro di propidio, ha evidenziato una variazione nella distribuzione delle cellule HT29 nelle fasi del ciclo cellulare. In particolare, dopo 36 ore di trattamento la percentuale di cellule confinata in fase pre-G0-G1, fase in cui si accumulano cellule con DNA frammentato, raggiunge il 36% (figura 3).

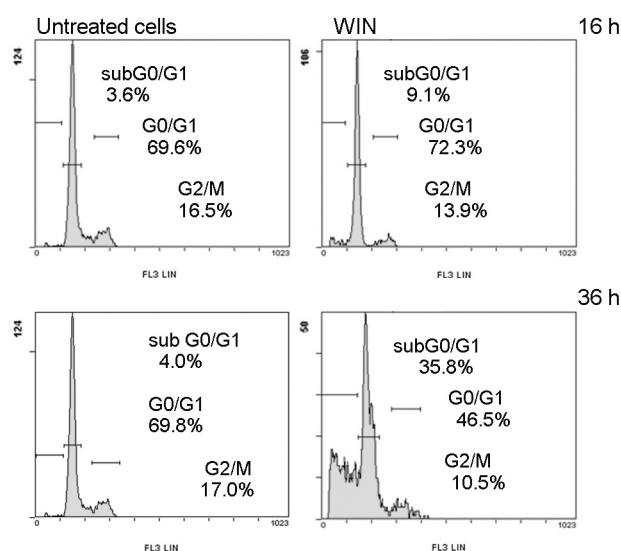


Figura 3. Effetti del WIN sulla distribuzione delle cellule HT29 lungo le fasi del ciclo proliferativo. L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata dopo colorazione con ioduro di propidio ipotonico in cellule trattate per 16 e 36 ore con WIN 10 μ M.

Il trattamento con il cannabinoide induce ER stress ed attiva il processo autofagico

E' stato dimostrato che i cannabinoidi possono indurre stress del reticolo endoplasmatico (ER stress) in cellule tumorali [76] e che questo evento è spesso associato all'induzione di autofagia, un pathway che può portare a differenti destini cellulari in accordo alle diverse caratteristiche molecolari delle cellule e al momento in cui tale meccanismo si innesca.

In questo studio, dopo aver valutato gli effetti del cannabinoide sulla vitalità cellulare, abbiamo voluto approfondire il meccanismo molecolare indotto dal trattamento con WIN e, a tale proposito, abbiamo rivolto l'attenzione alla possibile induzione di stress del reticolo endoplasmatico e del percorso autofagico attraverso lo studio dei livelli dei principali markers dell' ER stress, GRP78/Bip, CHOP e TRB3 e dell'autofagia, Beclina-1, LC3 e p62.

GRP78, chaperon molecolare presente nel reticolo endoplasmatico, è in grado di legarsi alle proteine nascenti favorendone il folding. Il fattore di trascrizione CHOP (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein) è considerato uno dei principali sensori dello stress del reticolo endoplasmatico. La sua attivazione avviene come tappa finale dell'UPR (*unfolded protein response*) e sembra essere essenziale per l'induzione del processo apoptotico mediante l'attivazione di TRB3 [77]. TRB3 è, invece, un regolatore negativo di AKT, una serina/treonina chinasi ampiamente riconosciuta come mediatore chiave della sopravvivenza cellulare [78] e inibitore del processo autofagico.

Analisi di western blotting hanno mostrato che i livelli dei tre sensori dello stress del reticolo endoplasmatico incrementano significativamente dopo trattamento con WIN nelle tre linee di carcinoma coloretale analizzate, sebbene gli effetti sono più evidenti in cellule HT29 e HCT116. L'incremento è tempo-dipendente e raggiunge il massimo dopo 16-36 ore di trattamento (figura 4a).

Per valutare la possibile induzione del processo autofagico abbiamo analizzato i livelli di espressione dei principali markers, Beclina-1, LC3 e p62. I livelli della Beclina-1 (conosciuta anche come ATG6), una molecola coinvolta nella fase iniziale del processo autofagico, non sono stati modificati dal trattamento con WIN mentre i livelli di p62, un

marker della fase finale della degradazione proteica, risultano incrementati sia nelle cellule HT29 che nelle cellule HCT116, tale risultato potrebbe indicare un blocco del flusso autofagico [79].

La proteina LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) è un componente dell'autofagosoma, la sua forma solubile citosolica (LC3-I) è processata, lipidata e reclutata sulla membrana dell'autofagosoma (LC3-II) durante le fasi finali dell'autofagia. Analisi di immunoblotting, utilizzando un anticorpo che riconosce entrambe le forme della proteina, hanno rivelato un chiaro incremento dei livelli di espressione soprattutto della forma a più basso peso molecolare (LC3-II) (figura 4b). Nelle cellule HT29 gli effetti su p62 e LC3 sono tempo-dipendenti e raggiungono il massimo dopo 36 ore di trattamento (figura 4c).

Per escludere il coinvolgimento della Beclina-1 nell'autofagia indotta dal WIN in cellule HT29, abbiamo condotto esperimenti di silenziamento della Beclina-1 e, dopo averne confermato l'abbattimento, abbiamo valutato i livelli di LC3, proteina a valle della Beclina-1. Analisi di western blotting hanno mostrato che LC3 continua ad incrementare anche nelle cellule silenziate e trattate con WIN. Questo risultato ci ha suggerito che il WIN attivi un percorso autofagico di tipo Beclina-indipendente (figura 4d).

Per confermare l'attivazione del processo autofagico abbiamo valutato anche i livelli di AKT, la chinasi inibitrice del processo autofagico. Analisi di immunoblotting hanno mostrato che i livelli della forma fosforilata di AKT decrementano in maniera tempo-dipendente nelle cellule HT29 trattate con WIN (figura 4c).

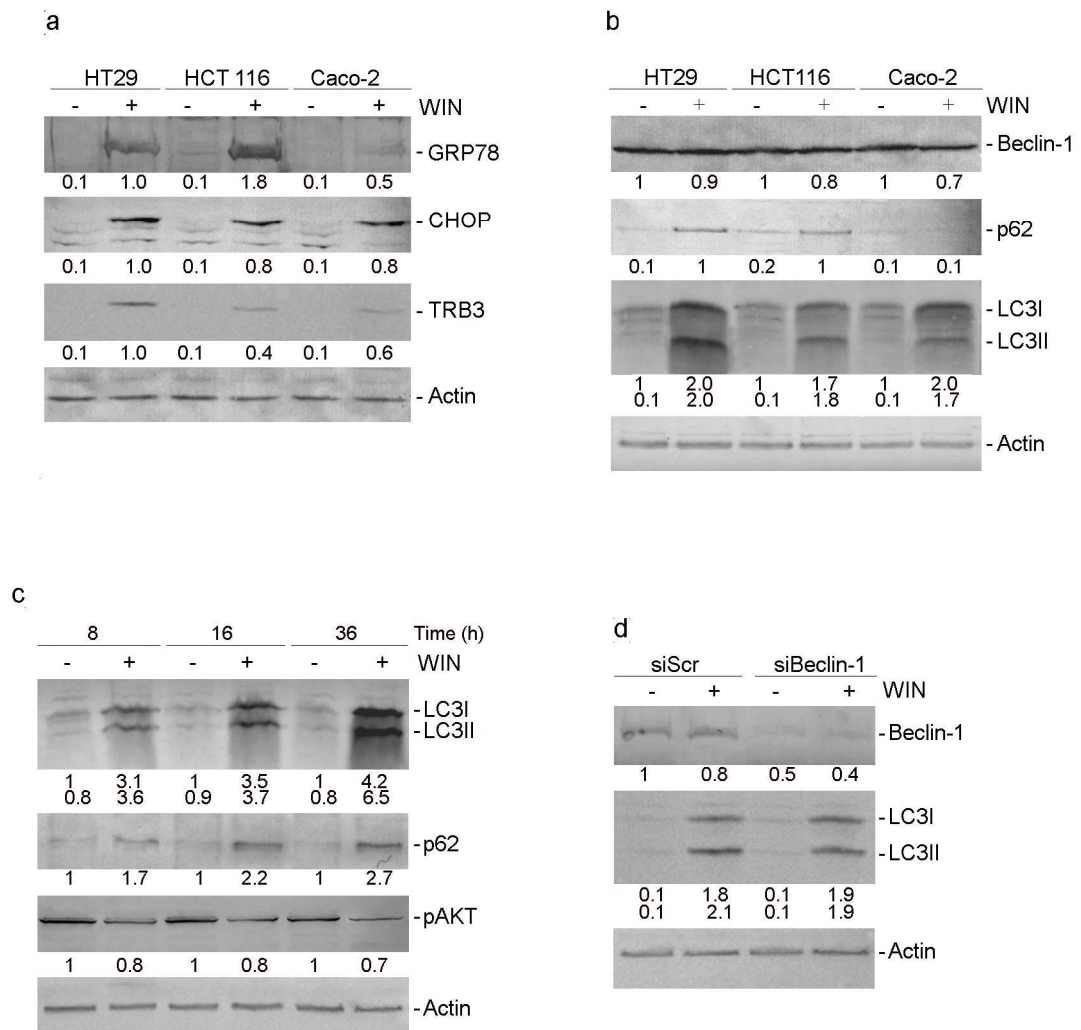


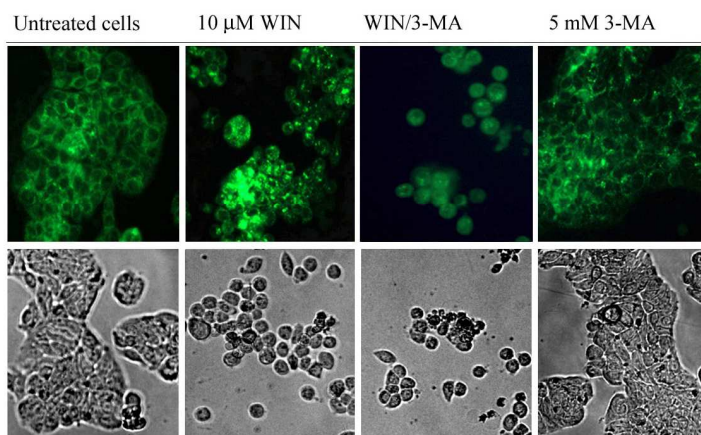
Figura 4. Il WIN induce incremento dei markers dell'ER stress e dell'autofagia. In figura (a) e (b) sono riportati i livelli dei principali marker dell'ER stress e dell'autofagia in cellule HT29, HCT116 e Caco-2 trattate per 36 ore con WIN 10 μ M. (c) Analisi di western blotting di LC3, p62 e pAKT in cellule HT29 trattate per i tempi indicati con WIN 10 μ M. (d) Effetti del silenziamento della Beclina-1 sui livelli di LC3 valutati prima e dopo il trattamento con WIN 10 μ M. Nelle figure il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

Una ulteriore conferma dell'induzione del processo autofagico si è avuta dalle osservazioni al microscopio a fluorescenza in seguito a colorazione con monodansilcadaverina (MDC), una molecola fluorescente che evidenzia la presenza di

organelli vescicolari acidi [80]. I dati presentati in figura 5a (pannello superiore) mostrano una fluorescenza puntata verde nelle cellule HT29 trattate per 16 ore con il cannabinoide, rispetto alla fluorescenza verde diffusa osservata nelle cellule controllo. L'accumulo di autofagosomi viene revertito dall'utilizzo della 3-metiladenina (3-MA), un inibitore degli stadi precoci dell'autofagia [81]. L'aggiunta di 3-MA al WIN riduce significativamente il numero di spot verdi brillanti e parallelamente aumenta gli effetti citotossici della droga (pannello inferiore). Come è possibile osservare in figura, le cellule mostrano, in maniera ancora più evidente, le tipiche caratteristiche di cellule non vitali, risultano con membrane dai contorni irregolari, tondeggianti, in numero ridotto e staccate dal substrato.

I risultati sono stati confermati da analisi citofluorimetrica in seguito a colorazione con ioduro di propidio. I dati riportati in figura 5b mostrano che l'aggiunta della 3-MA alle cellule trattate con WIN induce un ulteriore incremento della percentuale di cellule morte.

a



b

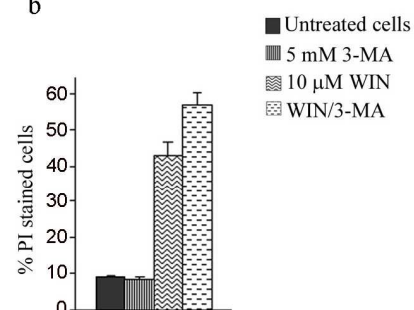


Figura 5. Il trattamento con WIN causa formazione di organelli vescicolari acidi. (a) Effetto del WIN e dell'inibitore dell'autofagia, 3-metiladenina (3-MA), utilizzato alla concentrazione 5 mM, sulla formazione di autofagosomi. Dopo 16 ore di trattamento le cellule HT29 sono state incubate con 0,05 mM di MDC per 15 minuti a 37°C e analizzate usando un microscopio a fluorescenza come descritto in Materiali e Metodi. (b) Effetti della 3-MA sulla tossicità indotta dal WIN in cellule HT29. Le cellule sono state trattate per 16 ore con WIN in presenza o assenza di 3-MA. La percentuale di cellule morte è stata valutata citofluorimetricamente in seguito a colorazione con ioduro di propidio isotonic come riportato in Materiali e Metodi.

Il WIN riduce i livelli proteici di PPAR γ

Uno studio precedentemente condotto nei nostri laboratori aveva dimostrato che il WIN incrementa i livelli di PPAR γ e ne aveva evidenziato il ruolo nell'apoptosi indotta dal WIN in cellule di epatocarcinoma umano HepG2 [71]. Per tale motivo, abbiamo voluto valutare se il pathway di morte indotto dal cannabinoide in cellule HT29 fosse accompagnato, anche in questo caso, da una variazione dei livelli di questa proteina e se questo evento potesse essere responsabile dell'induzione di stress del reticolo endoplasmatico e del blocco del flusso autofagico.

Dati bibliografici riportati da Tsukahara et al. [82] indicano che le cellule HT29 sono caratterizzate da elevati livelli di PPAR γ rispetto ad altre linee di carcinoma coloretale e che tale caratteristica le rende meno responsive alla terapia farmacologica.

Differentemente dalle cellule di epatocarcinoma, analisi di western blotting effettuate in seguito a trattamento con WIN hanno messo in evidenza che, in cellule HT29, i livelli di PPAR γ decrementano in maniera tempo-dipendente; l'effetto è evidente già dopo 8 ore di trattamento (figura 6a).

Per capire se la *down-regulation* di PPAR γ abbia un ruolo chiave nel meccanismo di morte indotto dal WIN in cellule HT29, abbiamo utilizzato due diversi antagonisti di PPAR γ , GW9662 e T007 impiegati da soli o in combinazione con il WIN.

Come mostrato in figura 6b, dopo 36 ore di trattamento con GW9662 o T007, la vitalità delle cellule HT29 è ridotta di circa il 30%; in più, l'aggiunta degli antagonisti di PPAR γ alle cellule trattate con il WIN incrementa, in maniera significativa, gli effetti del cannabinoide. Già dopo 16 ore di trattamento la vitalità cellulare si riduce del 75% rispetto al 45% osservato in presenza del solo WIN.

Gli effetti degli antagonisti di PPAR γ sulla vitalità cellulare sono stati confermati anche da analisi di microscopia ottica. Le cellule trattate con il WIN appaiono isolate e mostrano restringimento citoplasmatico, questo effetto viene potenziato in presenza del GW9662.

In più, l'analisi dei livelli di PPAR γ ha mostrato che il trattamento con GW9662 oltre a bloccarne l'attività è in grado anche di regolarne negativamente l'espressione (figura 6c).

In accordo ai dati ottenuti sulla vitalità cellulare, il trattamento con gli antagonisti di PPAR γ potenzia gli effetti indotti dal WIN sulla dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale e sulla percentuale di cellule con DNA frammentato indotta dal solo WIN (Tabella1).

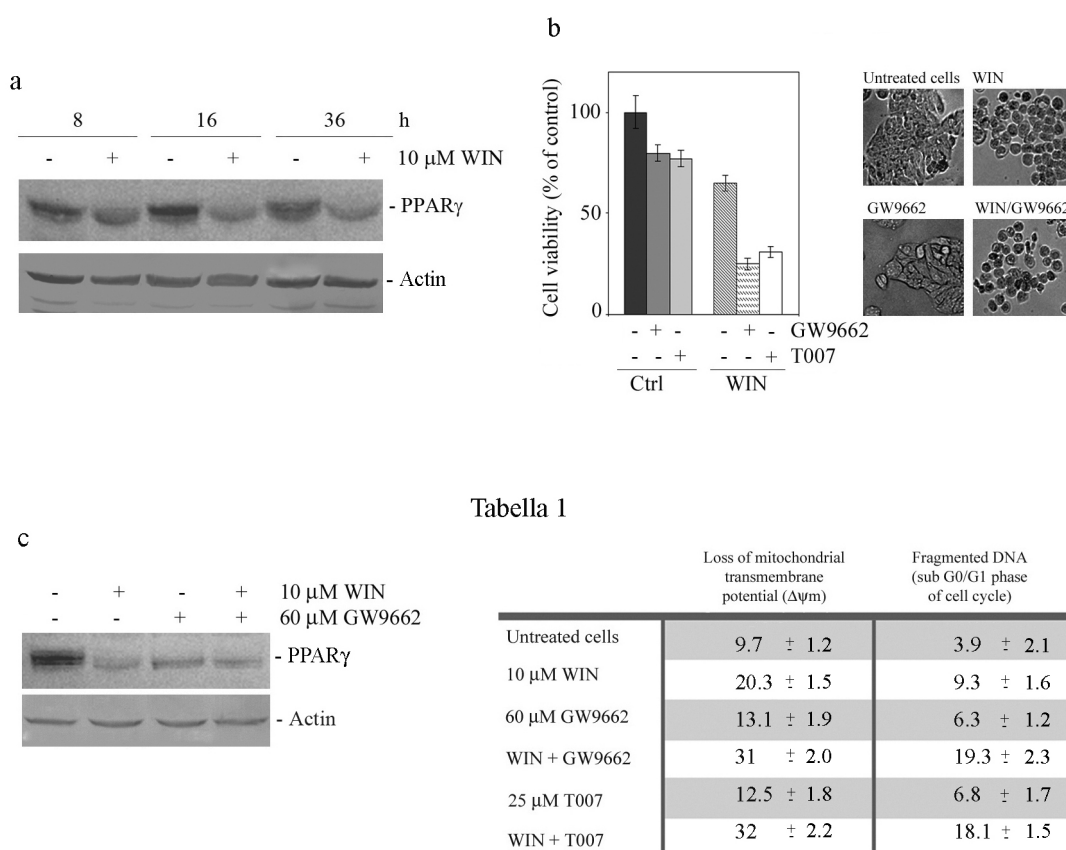


Figura 6. Gli effetti del WIN sono mediati dalla *down-regulation* di PPAR γ .(a) Analisi di western blotting dei livelli di PPAR γ in cellule HT29 trattate per 8, 16 e 36 ore con WIN 10 μ M. (b) Effetti degli agonisti di PPAR γ GW9662 (60 μ M) e T007 (25 μ M) usati da soli o in associazione con WIN per 16 e 36 ore. La vitalità cellulare è stata valutata attraverso saggio MTT come descritto in Materiali e Metodi. A destra immagini rappresentative della morfologia cellulare valutata attraverso microscopia a luce diretta. (c) Analisi di western blotting dei livelli di PPAR γ in seguito al trattamento con GW9662 da solo o in associazione con WIN. In (a) e (c) il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento. (Tabella 1) Valutazione citofluorimetrica della dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale dopo colorazione con DiOC6 e della percentuale di cellule in fase sub-G0-G1 del ciclo cellulare dopo colorazione con ioduro di propidio come descritto in Materiali e Metodi.

La caduta dei livelli di PPAR γ è responsabile dell'induzione di ER stress e del blocco del flusso autofagico

Recentemente è stata riportata la correlazione tra induzione di ER stress e espressione di PPAR γ [83]. Per studiare tale relazione nel nostro modello sperimentale abbiamo condotto esperimenti di silenziamento genico, sia dell'espressione di CHOP che dell'espressione di PPAR γ . In un primo set di esperimenti, dopo aver silenziato CHOP e averne confermato l'efficienza di silenziamento, abbiamo valutato i livelli di espressione di PPAR γ . I dati presentati in figura 7a mostrano che il silenziamento di CHOP non ha alcun effetto sull'espressione di PPAR γ , i cui livelli non si modificano rispetto alle cellule non silenziate. Come aspettato, invece, i livelli di GRP78 e TRB3 si abbassano nelle cellule silenziate e trattate con WIN rispetto a quelle trattate con il cannabinoide in presenza del siRNA scramble.

In altri esperimenti abbiamo valutato gli effetti del silenziamento di PPAR γ sull'espressione di CHOP e degli altri markers dell'ER stress. Il silenziamento di PPAR γ induce incremento dei livelli basali di CHOP, i quali incrementano ancor di più nelle cellule silenziate e trattate con WIN. Effetti simili sono stati osservati per GRP78 e TRB3 (figura 7b). Poiché i risultati sembrano indicare una dipendenza diretta di CHOP dai livelli di PPAR γ , ci siamo chiesti se ci fosse anche una relazione fra PPAR γ e l'autofagia.

Per confermare l'ipotesi della relazione inversa fra la *down-regulation* di PPAR γ , l'ER stress e l'autofagia, abbiamo valutato i più importanti marker di tali processi in cellule trattate con GW9662, antagonista farmacologico di PPAR γ .

Come mostrato in figura 7c, le bande corrispondenti a CHOP, LC3 e p62 incrementano in maniera significativa dopo trattamento con GW9662, mimando gli effetti del WIN.

Infine, abbiamo analizzato gli effetti del silenziamento di CHOP o PPAR γ sulla vitalità cellulare. Come riportato in figura 7d, il silenziamento di CHOP riduce gli effetti citotossici del WIN, mentre il silenziamento di PPAR γ potenzia gli effetti citotossici indotti dal cannabinoide ad indicare che la diminuzione dei livelli di PPAR γ è funzionale agli effetti citotossici indotti dal WIN.

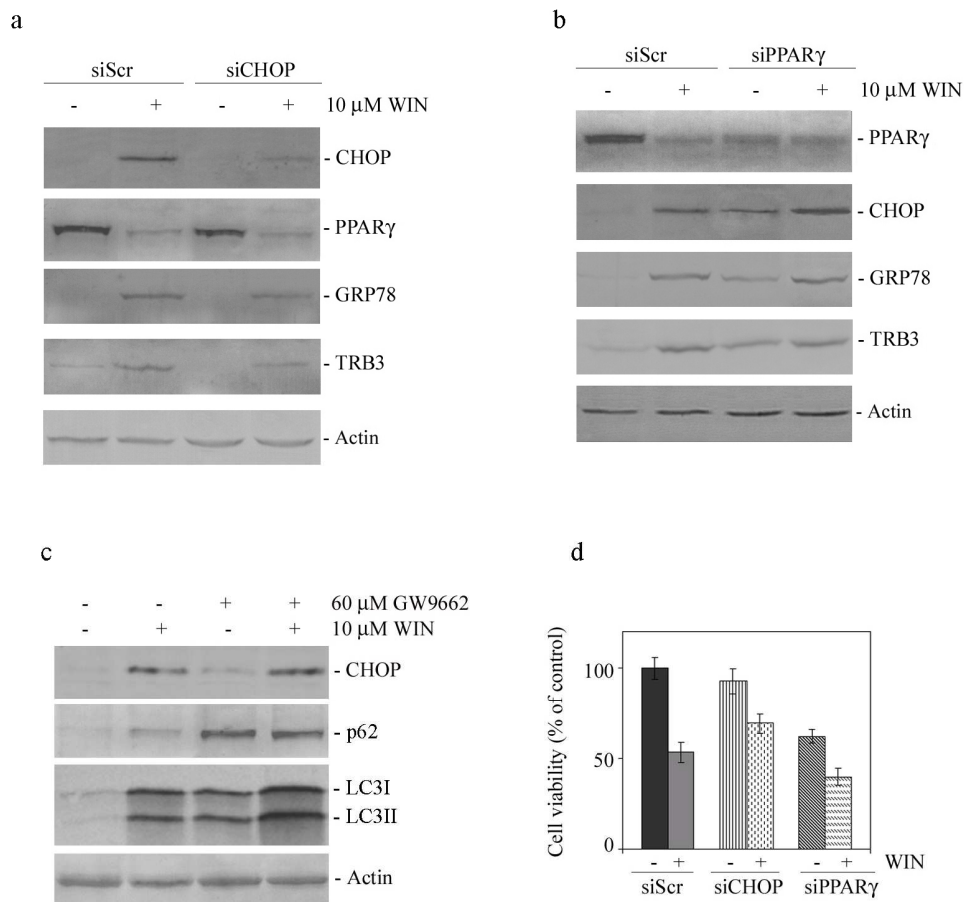


Figura 7. La caduta di PPAR γ è responsabile dell'induzione di ER stress e del blocco dell'autofagia. (a) Analisi di western blotting dei livelli di CHOP, PPAR γ , GRP78 e TRB3 in cellule HT29 silenziate per CHOP e trattate con WIN 10 μ M per 16 ore. (b) Analisi di western blotting dei livelli di PPAR γ , CHOP, GRP78 e TRB3 in cellule HT29 silenziate per PPAR γ e trattate con WIN 10 μ M per 16 ore. (c) Analisi di western blotting dei livelli di CHOP, p62 e LC3 dopo trattamento per 16 ore con WIN 10 μ M e/o GW9662 60 μ M. In (a),(b) e (c) il blot dell'actina è stato inserito come controllo di caricamento. (d) Saggio di vitalità cellulare MTT in cellule HT29 silenziate per CHOP o PPAR γ e trattate con WIN 10 μ M per 36 ore.

Come già detto, dati bibliografici riportano che l'accumulo di p62 è indice di un blocco del flusso autofagico nella fase finale di degradazione proteica [76]. L'incremento di questa proteina nelle cellule trattate con il solo GW9662 ci ha fatto ipotizzare una relazione anche fra il decremento di PPAR γ e il blocco del flusso autofagico. Poichè questo evento è spesso associato ad un aumento della permeabilità lisosomale, per confermare la nostra ipotesi abbiamo valutato lo stato della membrana dei lisosomi, attraverso l'utilizzo dell'arancio di acridina, sia in cellule trattate con il solo WIN che in cellule trattate con l'associazione WIN/GW9662.

L'arancio di acridina (AO) è un fluoroforo metacromatico che si accumula nei compartimenti acidi della cellula, dove, essendo ad elevata concentrazione, emette una fluorescenza rossa se eccitato. In seguito a permeabilizzazione della membrana lisosomale il colorante viene rilasciato nel citoplasma dove il suo spettro di fluorescenza cambia da rosso a verde. Come mostrato in figura 8a, l'analisi citofluorimetrica effettuata dopo la colorazione con AO mostra un significativo incremento della fluorescenza verde, indicativa di rottura della membrana lisosomale, sia nelle cellule trattate con WIN che in quelle trattate con l'associazione.

L'incremento della permeabilità dei lisosomi è stato anche confermato dall'osservazione attraverso microscopia a fluorescenza; le cellule controllo mostrano una fluorescenza puntata rossa indice di lisosomi intatti; nelle cellule trattate, invece, prevale una fluorescenza verde diffusa indice di destabilizzazione lisosomale (figura 8b). Questo risultato, ottenuto anche in presenza del solo GW9662, ci ha fatto concludere che il trattamento con WIN e in particolare la caduta dei livelli di PPAR γ , è responsabile del blocco del flusso autofagico.

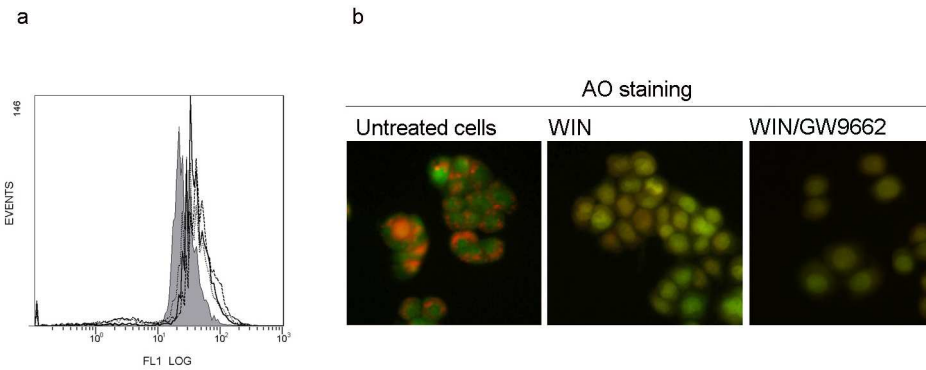


Figura 8. Il WIN causa permeabilizzazione della membrana lisosomale. (a) Studio citofluorimetrico della permeabilizzazione della membrana lisosomale (LMP) in seguito a colorazione con arancio di acridina (AO) e valutazione dell'incremento di emissione di fluorescenza verde (FL1) rispetto alle cellule controllo. Per l'esperimento le cellule sono state colorate con arancio di acridina 5 $\mu\text{g/ml}$ per 15 minuti prima di essere trattate per 5 ore con i composti. Il picco grigio pieno indica cellule controllo, la linea nera indica la fluorescenza di cellule trattate con WIN e la linea tratteggiate indica la fluorescenza di cellule trattate con WIN e GW9662. (b) Valutazione di microscopia a fluorescenza dell'LMP in seguito a colorazione con AO e trattamento con WIN 10 μM e GW9662 60 μM .

EFFETTI DEL CANNABINOIDE SINTETICO WIN SU CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG63**Valutazione degli effetti del WIN sulla vitalità di cellule MG63**

Nella seconda fase di sviluppo del mio progetto di tesi ho voluto studiare se gli effetti del WIN fossero simili anche in altri modelli sperimentali tumorali, quali le cellule di osteosarcoma MG63.

A tale scopo, sono stati analizzati gli effetti del WIN a diversi tempi di trattamento. L'analisi, effettuata attraverso saggio MTT, mette in evidenza una riduzione del numero cellulare evidente già dopo 8 ore di trattamento.

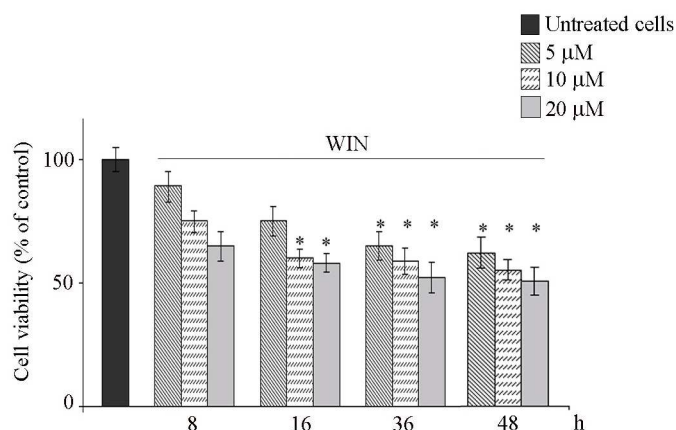


Figura 9. Il trattamento con il cannabinoide sintetico WIN induce un rallentamento proliferativo nelle cellule MG63. (a) Le cellule MG63 sono state trattate per 8,16,36 e 48 ore con dosi crescenti del composto (5,10,20 μM). La vitalità è stata valutata attraverso saggio MTT come descritto in Materiali e Metodi.

In seguito, per capire se la riduzione del numero cellulare fosse associata all'induzione di morte cellulare abbiamo colorato con arancio di acridina ed etidio bromuro. Differentemente da quanto osservato nelle cellule di carcinoma coloretale, come mostrato in figura 10a le cellule appaiono uniformemente colorate in verde diffuso e soltanto in una piccola percentuale i nuclei mostrano spot rossi indicativi di morte cellulare. L'assenza di induzione di morte è stata valutata anche attraverso l'analisi della distribuzione delle cellule lungo le fasi del ciclo proliferativo dopo colorazione con ioduro di propidio. In seguito al trattamento con WIN non si modifica in maniera significativa la percentuale di cellule confinate in fase sub G0-G1 dove si ritrovano le cellule con DNA frammentato. Significativa è, invece, la percentuale di cellule confinata in fase G2-M del ciclo cellulare (tabella 2). Questo dato giustifica la riduzione del numero cellulare osservata attraverso il saggio MTT; il trattamento con WIN è responsabile, quindi, di un blocco della proliferazione.

L'analisi al microscopio ottico mostra anche importanti modifiche morfologiche indotte dal trattamento; le cellule trattate con WIN mostrano una forma più poligonale, con nuclei rigonfi e citoplasma fortemente vacuolizzato (figura 10b).

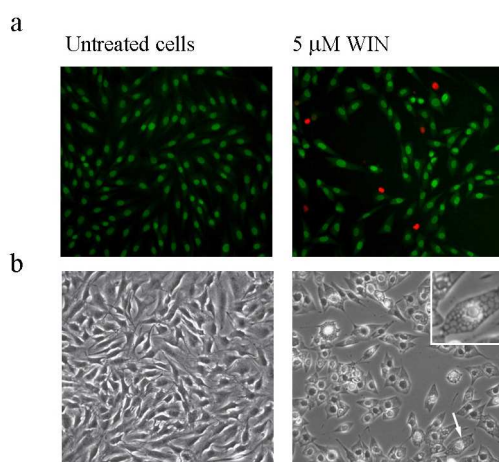


Table 2

	Sub G0-G1	G0-G1	G2-M
CO	1.2 %	89.9 %	8.4 %
5 μM WIN	5.7%	60.0%	26.7 %

Figura 10. Effetti morfologici e citotossici indotti dal cannabinoide sintetico WIN in cellule MG63. (a) Immagini di microscopia a fluorescenza dopo trattamento per 36 ore e colorazione con arancio di acridina ed etidio bromuro. La fluorescenza verde è indicativa di cellule vive, gli spot rossi indicano cellule con DNA frammentato. (b) Valutazione degli effetti morfologici indotti dal cannabinoide dopo 36 ore di trattamento. (Tabella 2). Valutazione citofluorimetrica del ciclo cellulare dopo trattamento con il WIN per 36 ore e colorazione con ioduro di propidio come descritto in Materiali e Metodi.

Il trattamento con WIN induce stress del reticolo endoplasmatico e autofagia in cellule MG63

Come osservato nelle cellule HT29, anche in cellule MG63 il WIN è in grado di indurre stress del reticolo endoplasmatico, infatti, come mostrato in figura 11a, il WIN 5 μM induce un progressivo incremento dei livelli delle tre proteine marker di tale processo, CHOP, GRP78 e TRB3. Gli effetti sono evidenti già dopo 8 ore di trattamento e raggiungono il massimo dopo 36 ore.

Poiché molti dati bibliografici indicano una relazione tra l'ER stress e la vacuolizzazione citoplasmatica [84], abbiamo valutato gli effetti del silenziamento di CHOP, principale sensore dello stress del reticolo, sulla morfologia cellulare in seguito a trattamento con il WIN. Il silenziamento di CHOP è stato in grado di contrastare la formazione delle strutture vacuolari indotta dal WIN; nelle cellule silenziate infatti, la morfologia cellulare torna ad essere molto simile a quella delle cellule controllo (figura 11b). Inoltre, dal momento che la vacuolizzazione citoplasmatica è spesso associata all'incremento della concentrazione di calcio, abbiamo utilizzato il BAPTA-AM, un chelante del calcio intracellulare, per dimostrare la correlazione tra la vacuolizzazione citoplasmatica e concentrazione di calcio.

I dati riportati in figura 11b mostrano che il BAPTA è in grado di contrastare gli effetti morfologici indotti dal cannabinoide e, nello stesso tempo, di contrastare anche l'incremento dei livelli di CHOP e di GRP78, confermando la dipendenza dell'ER stress dalla concentrazione del calcio intracellulare (figura 11c).

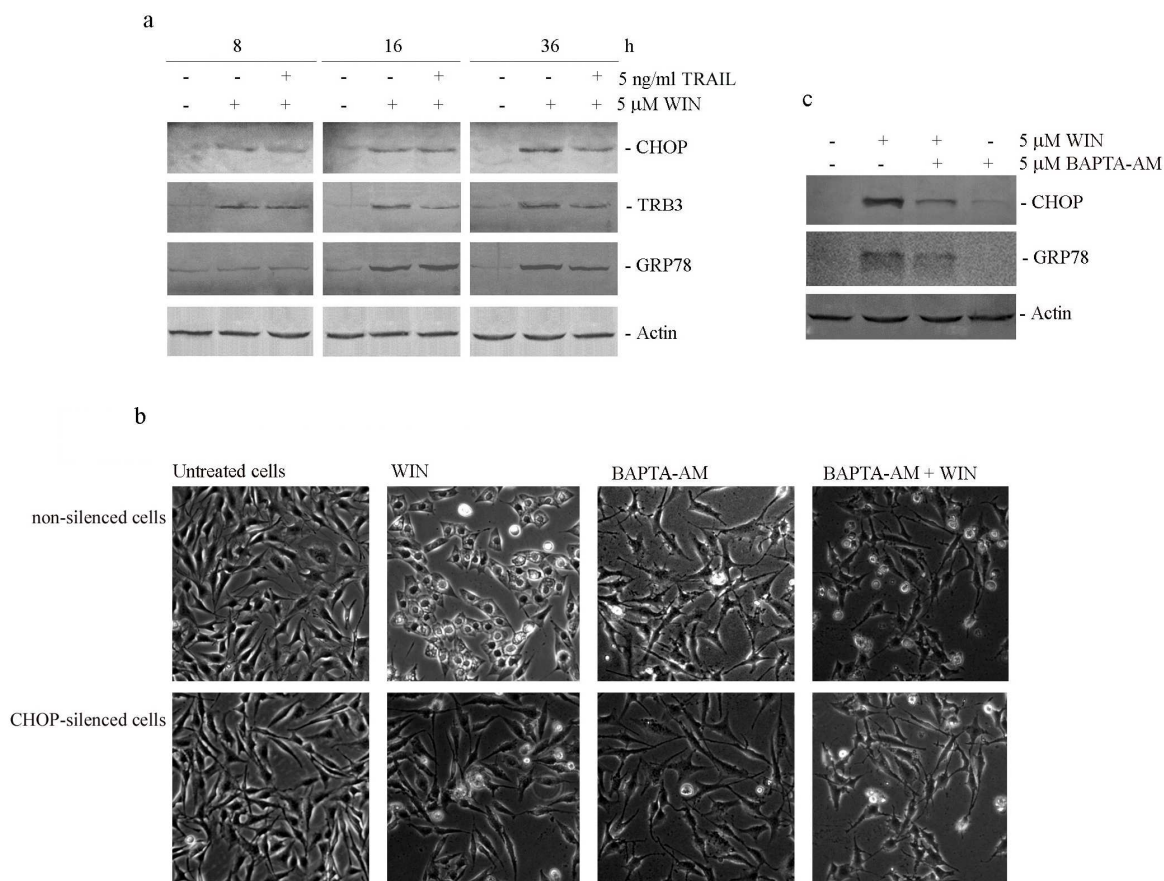


Figura 11. Il WIN causa ER stress. (a) Effetti del trattamento con WIN 5 μ M e TRAIL 5 ng/ml sui livelli proteici di CHOP, GRP78 e TRB3 dopo 8, 16 e 36 ore di trattamento. L'analisi è stata effettuata dopo western blotting come descritto in Materiali e Metodi. (b) Effetti morfologici dell'aggiunta del BAPTA-AM in cellule silenziate e non per CHOP. La vacuolizzazione è stata analizzata al microscopio a luce diretta dopo 24 ore di trattamento con WIN 5 μ M e/o BAPTA 10 μ M. (c) Analisi di western blotting dei livelli di CHOP e GRP78 dopo 36 ore di trattamento con WIN 5 μ M e/o BAPTA 10 μ M. In (a) e (c) il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

Successivamente abbiamo analizzato il possibile coinvolgimento del pathway autofagico. L'analisi dei livelli della proteina LC3, marker degli autofagosomi, ha mostrato un significativo incremento della proteina in seguito al trattamento con WIN; nessuna variazione è stata osservata, anche in questa linea cellulare, nei livelli della beclina.

L'analisi di p62, marker dell'andamento del flusso autofagico, mostra invece un progressivo decremento dei livelli proteici, indicando il completamento del flusso autofagico con la degradazione del contenuto autofagosomale (figura 12).

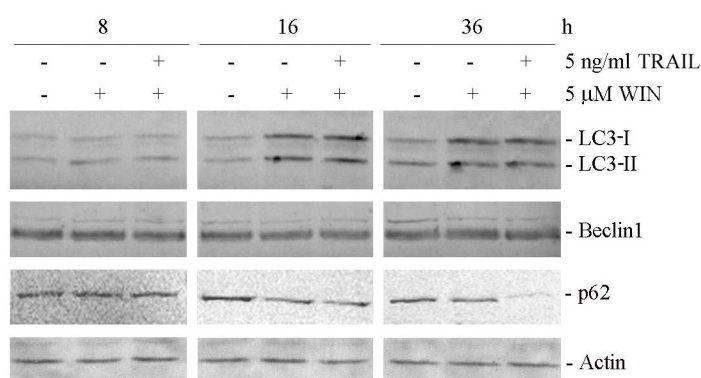


Figura 12. Il WIN induce l'incremento dei marker autofagici. Effetti del trattamento per 8, 16 e 36 ore con WIN 5 μ M sull'espressione dei principali marker dell'autofagia. L'analisi è stata effettuata dopo western blotting come descritto in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

La risposta autofagica al trattamento con WIN è stata valutata anche in seguito a colorazione con monodansilcadaverina (MDC). Come mostrato in figura 13a, il trattamento delle cellule MG63 con WIN per 16 ore causa un incremento della fluorescenza puntata verde indicativa di formazioni vescicolari acide. Gli organelli acidi (AVOs), sono stati visualizzati anche in seguito a colorazione con arancio di acridina (AO) che emette fluorescenza rossa quando si accumula all'interno di compartimenti acidi. L'incremento della fluorescenza rossa è anche confermato dall'analisi citofluorimetrica. Il grafico in figura 13b evidenzia lo spostamento verso destra del picco relativo alla fluorescenza rossa.

I risultati ottenuti mediante analisi di microscopia a fluorescenza e citofluorimetrica, che confermano l'incremento di strutture autofagosomali indotte dal WIN, vengono contrastate dall'utilizzo della 3-metiladenina, il più importante inibitore del processo autofagico.

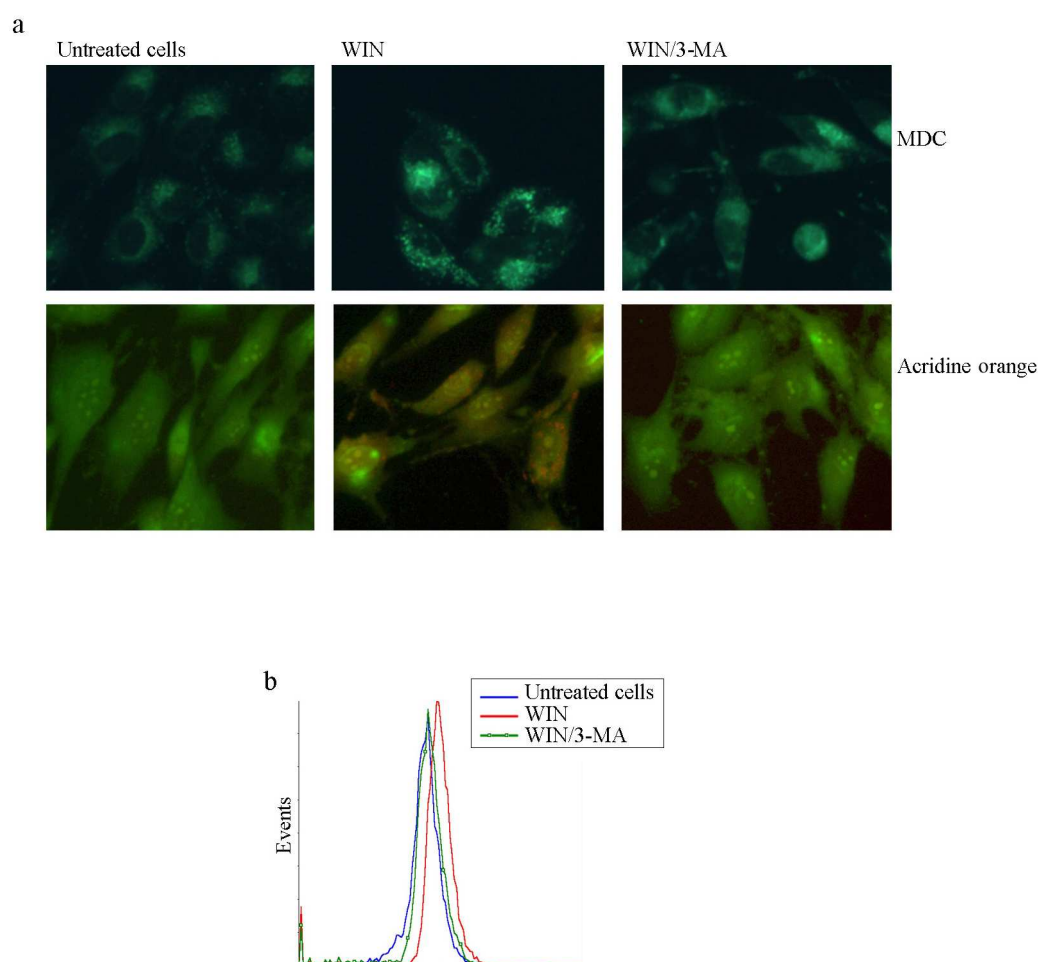


Figura 13. Il WIN induce la formazione di autofagosomi. (a) Valutazione dei vacuoli autofagici indotti dal trattamento per 16 ore con WIN da solo o in combinazione con 3-metiladenina 5 mM. Dopo il trattamento le cellule sono state colorate con MDC 0.05 mM (pannello superiore) e arancio di acridina (AO) 2 µg/ml (pannello inferiore) per 15 minuti a 37 °C e analizzate al microscopio a fluorescenza come descritto in Materiali e Metodi. (b) Analisi citofluorimetrica dell'emissione di fluorescenza rossa dopo colorazione con AO per 15 minuti a 37 °C.

Il trattamento con WIN è in grado di sensibilizzare le cellule MG63 all'apoptosi indotta da TRAIL attraverso un meccanismo che coinvolge GRP78 e PAR-4

Poiché in un lavoro precedente abbiamo dimostrato la capacità del WIN di sensibilizzare cellule di epatocarcinoma HepG2 all'apoptosi indotta da TRAIL [54], abbiamo voluto valutare se l'aggiunta di TRAIL alle cellule MG63 trattate con il WIN potesse condurre queste cellule a morte. Saggi MTT hanno evidenziato che le cellule MG63 risultano resistenti a TRAIL, mentre l'aggiunta di basse concentrazioni di TRAIL (5ng/ml) alle cellule trattate con WIN è in grado di innescare il pathway apoptotico e ridurre la vitalità fino a circa l'80% dopo 24 ore di trattamento (figura 14a). La riduzione della vitalità in seguito al trattamento combinato è stata confermata anche da analisi microscopica. Le immagini mostrate in figura 14b (pannello superiore) evidenziano la comparsa della tipica morfologia apoptotica, le cellule appaiono tondeggianti e dai contorni irregolari, staccate dal substrato e flottanti nel mezzo di coltura, mentre analisi citofluorimetriche hanno confermato l'incremento della percentuale di cellule confinate in fase sub G0-G1 dopo 24 ore di trattamento combinato WIN/TRAIL ad indicare cellule con DNA frammentato (pannello inferiore).

Il trattamento con z-VAD, un inibitore generale dell'attività delle caspasi, alla concentrazione di 100 μ M, è in grado di contrastare la citotossicità indotta dal trattamento combinato WIN/TRAIL infatti, dopo 24 ore, la percentuale di cellule vitali è paragonabile a quella delle cellule trattate con il solo WIN.

Per meglio capire quale fosse il contributo dell'autofagia nel meccanismo di morte indotto dal trattamento combinato abbiamo analizzato anche gli effetti dell'aggiunta della 3-metiladenina, inibitore del percorso autofagico, sulla vitalità di cellule MG63 trattate con l'associazione WIN/TRAIL. Il risultato da noi ottenuto mostra che l'inibizione dell'autofagia è in grado di ridurre gli effetti citotossici del trattamento combinato (figura 14c).

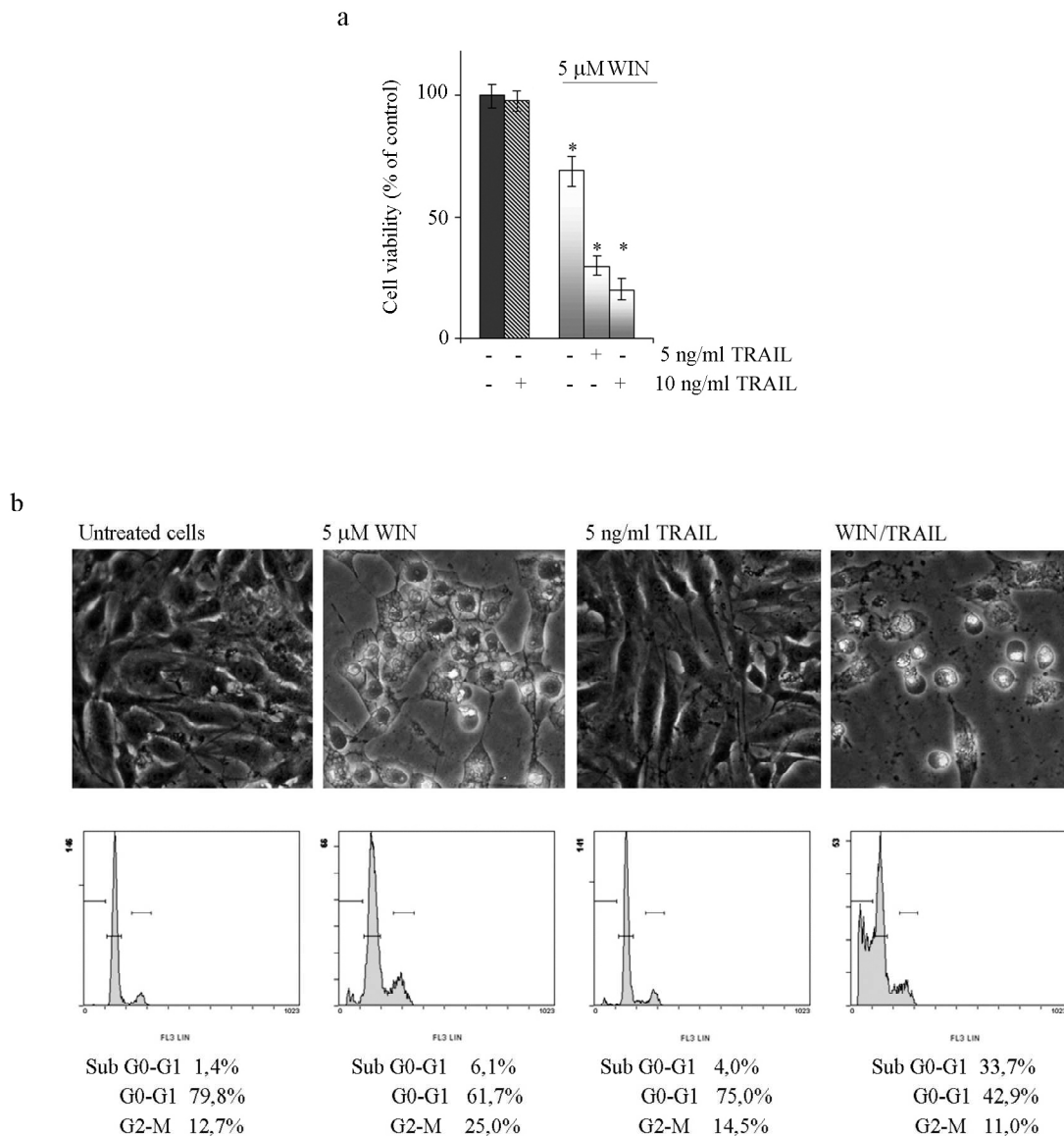


Figura 14 A. Il WIN sensibilizza le cellule MG63 all'apoptosi indotta da TRAIL. (a) Effetti del cannabinoide sintetico WIN e di TRAIL sulla vitalità di cellule MG63. Le cellule sono state trattate per 24 ore con i composti alle concentrazioni indicate. La vitalità è stata valutata attraverso saggio MTT come descritto in Materiali e Metodi. (b) (pannello superiore) Valutazione degli effetti morfologici indotti dal trattamento con WIN, TRAIL o la combinazione dei due composti in cellule MG63. (pannello inferiore) Analisi citofluorimetrica della distribuzione delle cellule lungo le fasi del ciclo proliferativo. Le cellule sono state trattate per 24 ore con i composti alle concentrazioni indicate e colorate con ioduro di propidio come descritto in Materiali e Metodi.

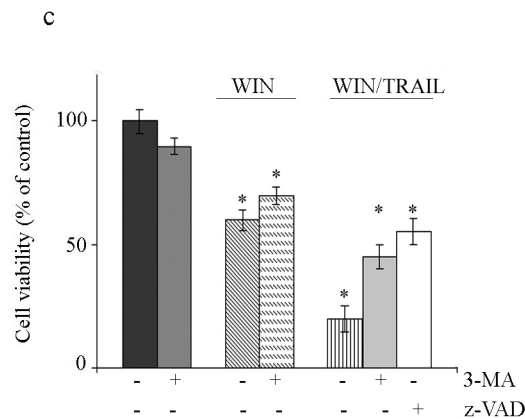


Figura 14 B. Il WIN sensibilizza le cellule MG63 all'apoptosi indotta da TRAIL. (c) Valutazione degli effetti dell'aggiunta di z-VAD 100 μ M e 3-MA 5 mM sulla vitalità di cellule MG63 trattate con WIN o con l'associazione WIN/TRAIL per 36 ore. La vitalità è stata valutata mediante saggio MTT come descritto in Materiali e Metodi.

Le analisi di western blotting dei livelli delle caspasi, confermano l'attivazione di un percorso di morte di tipo apoptotico caspasi-dipendente. Il risultato riportato in figura 15 mostra che il trattamento con WIN induce soltanto una leggera riduzione della forma pro-enzimatica delle caspasi-8 e -3, mentre il trattamento per 24 ore con l'associazione WIN/TRAIL porta alla riduzione delle forme pro-enzimatiche a più alto peso molecolare ed alla comparsa dei frammenti attivi a più basso peso molecolare della caspasi-8. L'attivazione della caspasi-3 è confermata, invece, dall'analisi dei livelli della Poly-(ADP-ribose) polimerasi (PARP), uno dei principali target della caspasi-3 attiva. Questi risultati evidenziano che il trattamento con WIN è in grado di sensibilizzare le cellule MG63 all'apoptosi indotta da TRAIL.

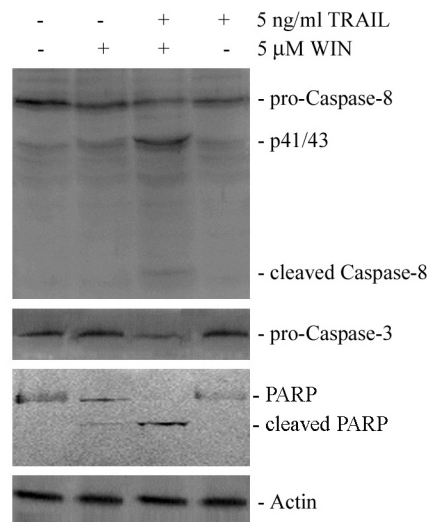


Figura 15. Il WIN sensibilizza le cellule MG63 all'apoptosi indotta da TRAIL. Analisi di western blotting dei livelli di espressione di caspasi-8, -3 e PARP in cellule MG63 trattate per 24 ore con WIN e/o TRAIL. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

Meccanismo d'azione del WIN

Poiché nelle cellule HT29 avevamo dimostrato l'importanza del decremento di PPAR γ nel meccanismo d'azione del WIN, abbiamo voluto valutare i livelli di questo fattore di trascrizione anche in cellule MG63 dopo trattamento. Esperimenti di immunoblotting hanno però mostrato che, in questo modello sperimentale, il WIN non induce alcuna variazione sui livelli della proteina, pertanto abbiamo cercato altri attori molecolari in grado di mediare gli effetti del cannabinoide.

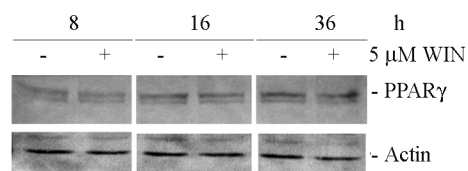


Figura 16. Il trattamento con WIN non modifica i livelli di PPAR γ . Analisi di western blotting dei livelli di PPAR γ dopo trattamento per 8, 16 e 36 ore con WIN 5 μM. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

Nel tentativo di trovare una relazione tra l'induzione di ER stress e la sensibilizzazione delle cellule MG63 agli effetti di morte indotti da TRAIL, studi bibliografici ci hanno suggerito una possibile correlazione tra GRP78, chaperon reticolare marker dello stress del reticolo e PAR-4 (*Prostate Apoptosis Response-4*, conosciuta anche come PAWR). Alcuni recenti lavori, infatti, mostrano che l'oncosoppressore PAR-4 è in grado di attivare il pathway apoptotico estrinseco interagendo con GRP78 a livello citoplasmatico e mediandone la sua traslocazione sulla membrana plasmatica. GRP78 di superficie agirebbe da recettore per fattori solubili extracellulari in grado di indurre apoptosi [85]. Per valutare il possibile coinvolgimento di questo pathway nel nostro sistema sperimentale, per prima cosa, abbiamo analizzato i livelli di espressione di PAR-4 in seguito al trattamento con WIN e/o TRAIL. Come mostrato in figura 17a, i livelli della proteina incrementano soprattutto dopo 16 ore di trattamento con WIN e si mantengono elevati anche nella condizione WIN/TRAIL. Per valutare se il meccanismo proposto dagli autori che per primi hanno parlato della traslocazione di GRP78 sulla superficie cellulare fosse lo stesso anche nel nostro sistema sperimentale, abbiamo valutato i livelli di espressione di GRP78 sulla membrana attraverso analisi di immunofluorescenza e citofluorimetrica. L'utilizzo di un anticorpo specifico per la porzione c-terminale di GRP78 e la non permeabilizzazione delle cellule ci ha permesso di valutare l'incremento di espressione della proteina sulla membrana cellulare in seguito al trattamento con WIN (figura 17b).

Infine, per analizzare la relazione tra l'ER stress e l'espressione di PAR-4, abbiamo analizzato i livelli della proteina PAR-4 nelle cellule silenziate per CHOP. Come mostrato in figura 17c, nelle cellule silenziate per CHOP i livelli di PAR-4 si abbassano, indicando una possibile dipendenza dell'incremento di PAR-4 dall'attività di CHOP.

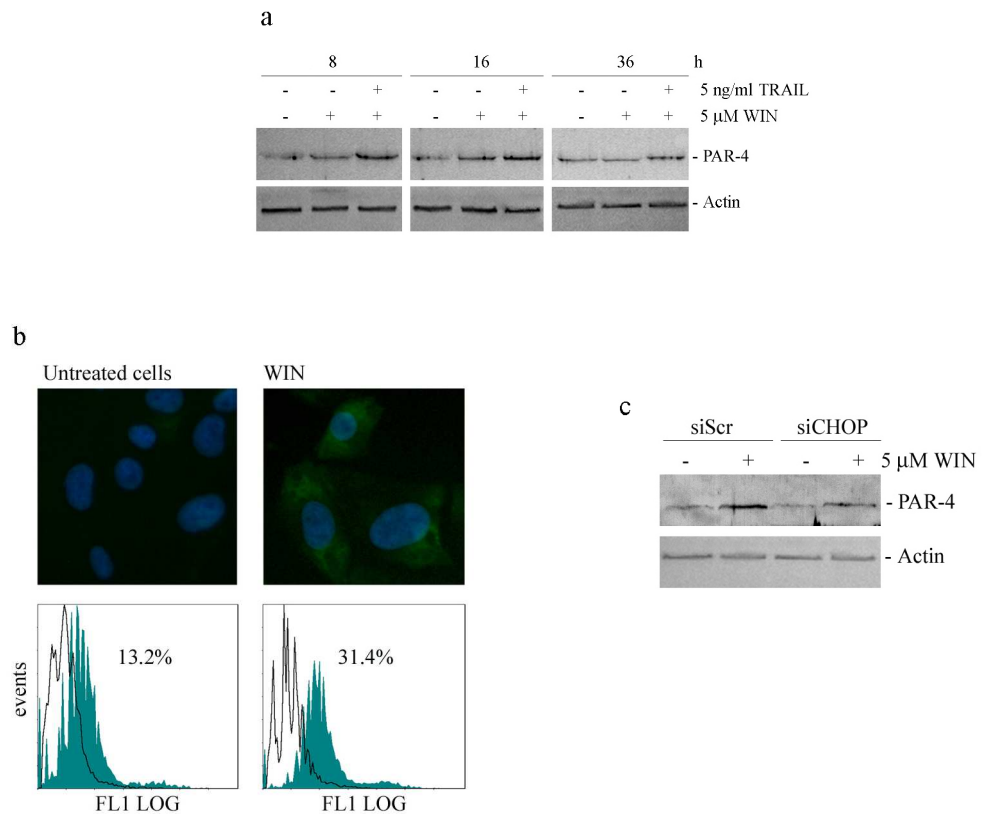


Figura 17. Il WIN induce incremento dei livelli di PAR-4 e di GRP78 sulla superficie cellulare. (a) Analisi tempo-dipendente degli effetti del trattamento con WIN e con WIN/TRAIL sui livelli della proteina PAR-4. Dopo il trattamento con i composti usati alle concentrazioni indicate, i lisati cellulari sono stati analizzati attraverso immunoblotting usando un anticorpo specifico per la proteina PAR-4 come riportato in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento. (b) Effetti del WIN sull'espressione di GRP78 sulla superficie cellulare. (Pannello superiore) Le cellule sono state trattate per 16 h con WIN 5 μM, incubate dapprima con un anticorpo contro GRP78 e poi con un secondario coniugato con FITC, infine sono state analizzate al microscopio a fluorescenza come descritto in Materiali e Metodi. (Pannello inferiore) Analisi citofluorimetrica dell'incremento di espressione di GRP78 sulla superficie in seguito al trattamento con WIN. L'istogramma vuoto indica il controllo isotipico, l'istogramma pieno indica l'espressione di GRP78 nelle cellule non trattate e trattate con WIN. (c) analisi dei livelli di PAR-4 in cellule silenziate per CHOP. Le cellule silenziate sono state trattate con WIN e dopo il trattamento sono state analizzati i livelli di espressione di PAR-4 attraverso immunoblotting usando un anticorpo specifico per la proteina PAR-4 come riportato in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

Discussione

In questi ultimi anni la ricerca di farmaci in grado di arrestare la crescita tumorale ha visto l'identificazione di numerosi composti ad azione antiblastica e, fra questi, recentemente sono stati inseriti anche i cannabinoidi o altre molecole di sintesi in grado di interagire con i recettori dei cannabinoidi. Per tale motivo, molti studi sono rivolti alla valutazione del meccanismo d'azione di questi composti su differenti modelli di cellule tumorali *in vivo* e *in vitro*.

In questo studio, svolto durante il triennio di Dottorato di Ricerca in Oncobiologia Sperimentale, ho rivolto la mia attenzione agli effetti dei cannabinoidi su linee tumorali di carcinoma coloretale e di osteosarcoma umano.

Da questo studio è emerso, da una parte che gli effetti indotti dal trattamento coi cannabinoidi nelle diverse linee cellulari testate sono simili, dall'altra il coinvolgimento di differenti attori molecolari e, talvolta, il ruolo diverso di uno stesso pathway nei differenti modelli.

Nella prima parte del nostro lavoro abbiamo studiato gli effetti del trattamento con il cannabinoide sintetico WIN in cellule di carcinoma coloretale e abbiamo analizzato il ruolo chiave del fattore di trascrizione PPAR γ in questo pathway. Il nostro studio ha messo in evidenza che il WIN è in grado di indurre un marcato effetto citotossico, accompagnato da disfunzione mitocondriale e attivazione del pathway apoptotico (figura 18a).

Nella seconda parte del nostro lavoro abbiamo analizzato gli effetti del cannabinoide sintetico WIN, su cellule di osteosarcoma MG63. In questo modello sperimentale è emerso che il WIN induce soltanto un rallentamento del ciclo proliferativo che però non si accompagna a morte cellulare (figura 18b). In particolare, è stato molto interessante verificare che il WIN induce una chiara vacuolizzazione citoplasmatica visibile al microscopio a luce diretta.

I dati riportati nel presente studio evidenziano, comunque, nelle diverse linee cellulari testate, un meccanismo d'azione dei cannabinoidi simile solo per certi aspetti. In particolare, nei modelli sperimentali utilizzati, il trattamento con WIN è in grado di indurre ER stress come dimostrato dall'incremento dei più importanti marker GRP78, CHOP e TRB3. Il coinvolgimento di questo pathway nel meccanismo d'azione dei cannabinoidi, era stato da noi dimostrato anche in un precedente lavoro svolto su cellule di epatocarcinoma HepG2 [54].

L'induzione di stress del reticolo endoplasmatico potrebbe essere responsabile della successiva attivazione del pathway autofagico, attivato nelle differenti linee cellulari

testate, e della vacuolizzazione citoplasmatica osservata nelle cellule MG63. La relazione tra la vacuolizzazione citoplasmatica, l'ER stress e il WIN è stata oggetto di studio di un lavoro condotto su cellule di linfoma [86]. L'incremento dei livelli di CHOP, TRB3 e GRP78 nelle cellule MG63 trattate con WIN evidenzia il ruolo dell'ER stress e del calcio nella vacuolizzazione citoplasmatica, infatti il silenziamento di CHOP o l'utilizzo del chelante del Ca^{2+} prevengono la formazione di strutture vacuolari indotte dal WIN.

I nostri studi hanno evidenziato una sequenzialità tra l'induzione di ER stress e l'attivazione del pathway autofagico, caratterizzato dall'incremento dei livelli di LC3II e dalla comparsa di organelli vescicolari acidi.

Come è noto, l'autofagia può avere differenti ruoli a seconda del contesto in cui questo pathway viene attivato. Nei nostri modelli sperimentali abbiamo potuto apprezzare le diverse sfaccettature di questo meccanismo molecolare. L'autofagia può contrastare insulti cellulari, come lo stress del reticolo endoplasmatico, favorendo la sopravvivenza, oppure può promuovere la morte cellulare, innescando l'apoptosi classica o sostituendosi ad essa.

Nelle cellule di adenocarcinoma coloretale HT29 l'autofagia indotta in seguito al trattamento con il WIN sembra avere un ruolo pro-sopravvivenza, quindi l'attivazione di questo percorso è stata da noi interpretata come risposta, da parte delle cellule tumorali, al trattamento con la droga. Questo dato è confermato dal fatto che l'utilizzo della 3-metiladenina, il maggiore inibitore del pathway autofagico, non soltanto non è in grado di contrastare gli effetti del WIN ma piuttosto li incrementa. Il tentativo di sopravvivenza della cellula al trattamento con il cannabinoide viene superato grazie al fatto che la droga riesce a bloccare il flusso autofagico e favorire l'evento di morte. Il blocco dell'autofagia, confermato dall'accumulo della proteina p62 e dalla permeabilizzazione della membrana lisosomale, avviene nella fase di degradazione finale, quando gli autofagosomi dovrebbero fondersi con i lisosomi.

I risultati ottenuti nelle cellule MG63 hanno indicato, invece, che l'autofagia innescata in seguito al trattamento con WIN, contribuisce positivamente agli effetti citotossici indotti dal cannabinoide. Infatti il trattamento con 3-metiladenina contrasta, in parte gli effetti della droga.

Il nostro studio suggerisce un ruolo chiave di PPAR γ nella morte cellulare indotta dal WIN in cellule HT29. Abbiamo dimostrato che il WIN decrementa i livelli di questo fattore di trascrizione, probabilmente inducendone la degradazione. L'importanza della

riduzione dei livelli di PPAR γ nella morte indotta dal WIN è stata confermata dall'utilizzo di GW9662 e T007, due antagonisti di PPAR γ , e dalla riduzione dei livelli di PPAR γ attraverso silenziamento genico. Questi trattamenti sono stati in grado di mimare gli effetti del WIN quando impiegati singolarmente e hanno amplificato gli effetti citotossici quando impiegati in associazione con il cannabinoide.

I nostri risultati tuttavia sono in disaccordo con studi recenti che associano gli effetti citotossici di molte droghe alla incremento di PPAR γ [87]. Noi stessi avevamo dimostrato che l'apoptosi indotta dal WIN in cellule di epatocarcinoma HepG2 era legata all'incremento dei livelli di PPAR γ [54]. Comunque è stato dimostrato che in cellule tumorali PPAR γ può comportarsi in maniera ambigua, talvolta da soppressore tumorale, talvolta da promotore. Questa ambiguità può dipendere dalla sua capacità di agire sia come attivatore che come soppressore trascrizionale. In più Tsukahara [82] ha dimostrato una significativa correlazione tra i livelli di espressione basale di PPAR γ in differenti modelli cellulari e la capacità proliferativa delle cellule. In particolare, l'overespressione di PPAR γ inibisce la proliferazione in quelle cellule che hanno bassi livelli endogeni di tale fattore, mentre le HT29, che sono caratterizzate da livelli basali alti di PPAR γ , appaiono più resistenti all'inibizione della crescita. La nostra ipotesi è che la *down-regulation* di PPAR γ abbia un ruolo strategico per l'induzione di morte cellulare, perchè è responsabile sia dell'induzione di stress del reticolo endoplasmatico che del blocco dell'autofagia di sopravvivenza. Questa ipotesi è confermata dal fatto che il blocco di PPAR γ sia attraverso l'uso dei suoi antagonisti che la sua *down-regulation* tramite l'utilizzo di un siRNA specifico è in grado di causare l'accumulo della proteina p62 e aumentare i livelli di CHOP. Infine, il silenziamento di PPAR γ o la sua inibizione farmacologica sembrano confermare l'importanza dell'abbattimento dei suoi livelli negli effetti citotossici indotti dal WIN e nel dare origine ad un intricato interplay tra autofagia e apoptosi mediata dall'ER stress.

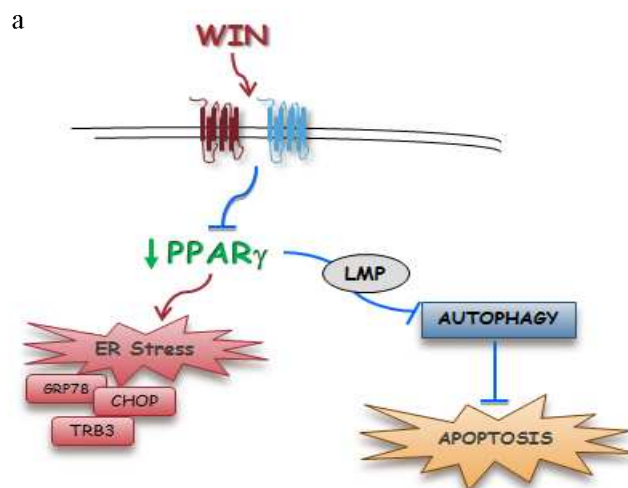
Se i livelli di PPAR γ sono importanti per gli effetti del WIN sulle cellule HT29, ciò non vale per le cellule MG63. In questa linea cellulare, infatti, il trattamento con WIN non è in grado di modificarne i livelli e come già detto, non è in grado di indurre morte cellulare. Solo l'aggiunta di basse dosi di TRAIL alle cellule trattate con WIN è in grado di ridurre la vitalità cellulare di circa l'80% rispetto alle cellule non trattate. Questo evento di morte è associato all'attivazione di un pathway apoptotico classico sia da un punto di vista morfologico che biochimico. E' importante sottolineare che

l'aggiunta di TRAIL alle cellule trattate con altri cannabinoidi (anandamide e metanandamide) non è stata in grado di modificare gli effetti esercitati di soli cannabinoidi.

Dopo aver stabilito che la sensibilizzazione a TRAIL è legata all'azione del WIN, abbiamo identificato la proteina PAR-4 come probabile mediatore chiave di questa sensibilizzazione. In un lavoro pubblicato su *Cell* [88], gli autori hanno proposto un meccanismo che correla l'ER stress all'attivazione del pathway estrinseco dell'apoptosi attraverso PAR-4 e GRP78 di superficie.

Nelle cellule MG63 noi abbiamo osservato un marcato incremento di PAR-4 in seguito al trattamento con WIN e in più abbiamo valutato l'incremento di GRP78 sulla superficie cellulare oltre che a livello intracellulare. L'incremento di PAR-4 è correlato all'ER stress indotto dal WIN e sarebbe responsabile della traslocazione di GRP78 sulla superficie cellulare. Una volta sulla membrana, GRP78 fungerebbe da recettore sia per lo stesso PAR-4 secreto che per altri ligandi, come TRAIL, in grado di attivare il pathway estrinseco dell'apoptosi.

Sebbene i risultati riportati in questa tesi siano ulteriormente da approfondire, noi riteniamo che questi dati diano un importante contributo allo studio sulla relazione tra stress del reticolo endoplasmatico e autofagia nei processi cellulari, sul meccanismo d'azione dei cannabinoidi e sul loro potenziale antitumorale.



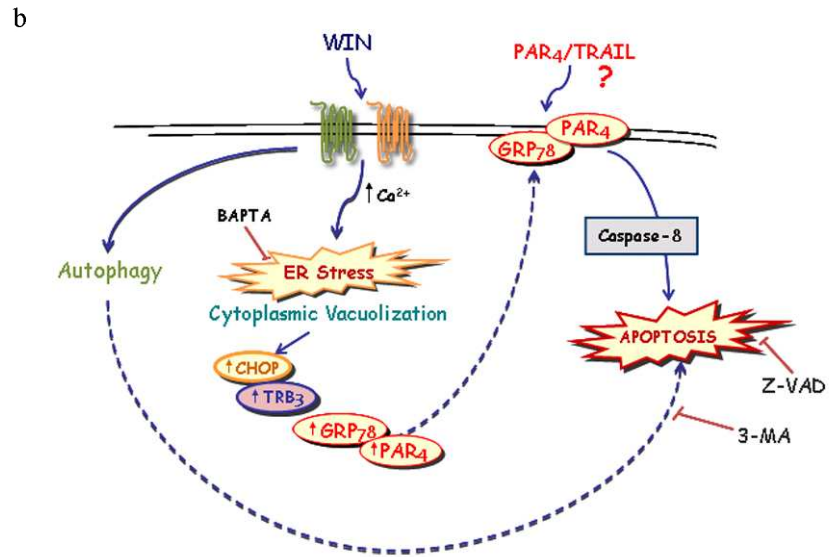


Figura 18. (a) Schema rappresentativo del meccanismo d'azione del WIN in cellule di carcinoma coloretale HT29. (b) Schema rappresentativo del meccanismo d'azione del WIN in cellule di osteosarcoma umano MG63.

Bibliografia

1. Suzuki K, Ohsumi Y (2007) Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 581:2156-2161
2. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169:425-434
3. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432:1032-1036
4. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G (2005) Does Autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1:66-74
5. Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132:27-42
6. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 20:1992-2003
7. Simonsen A, Tooze SA (2009) Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* 186:773-782
8. Ding ZB, Shi YH, Zhou J, Qiu SJ, Xu Y, Dai Z, Shi GM, Wang XY, Ke AW, Wu B, Fan J (2008) Association of Autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68:9167-9175
9. Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, Kinoshita T, Ueno T, Esumi H, Ochiai A (2008) Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci* 99:1813-1819
10. Pirtoli L, Cevenini G, Tini P, Vannini M, Oliveri G, Marsili S, Mourmouras V, Rubino G, Miracco C (2009) The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas. *Autophagy* 5:930-936
11. Papandreou I, Lim AL, Laderoute K, Denko NC (2008) Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell Death Differ* 15:1572-1581
12. Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ,

Koritzinsky M, Wouters BG (2010) The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* 120:127-141

13. Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB, Liao WS, Bast RC Jr (2008) The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* 118:3917-3929

14. Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, vol. 35, no. 4, pp. 495-516

15. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 9, no. 3, pp. 231-241

16. Byrne GI, Ojcius DM (2004) Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, no. 10, pp. 802-808

17. Pennarun B, Meijer A, de Vries EGE, Kleibeuker JH, Kruyt F, de Jong S (2010) Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1805, no. 2, pp. 123-140

18. Ashkenazi A (2008) Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 19, no. 3-4, pp. 325-331

19. Cotter TG (2009) Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 7, pp. 501-507

20. Lowe SW, Lin AW (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 3, pp. 485-495

21. Levine B (2006) Unraveling the role of autophagy in cancer. *Autophagy*, vol. 2, no. 2, pp. 65-66

22. Liu EY, Ryan KM (2012) Autophagy and cancer-issues we need to digest. *Journal of Cell Science*, vol. 125, no. 10, pp. 2349-2358

23. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 8:741-752.

24. Giansanti V, Torriglia A, Scovassi A. I (2011) Conversation between apoptosis and autophagy: is it your turn or mine? *Apoptosis*, vol. 16, no. 4, pp. 321-333

25. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122:927-939.
26. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N (2007) Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 26:2527-2539.
27. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B (2008) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol. Cell* 30:678-688.
28. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A (2009) DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* 10:285-292.
29. Lee JS, Li Q, Lee JY, Lee SH, Jeong JH, Lee HR, Chang H, Zhou FC, Gao SJ, Liang C (2009) FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat. Cell Biol.* 11:1355-1362
30. Cho D, Jo Y, Hwang J, Lee Y, Roh S, Kim J (2009) Caspase mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to Autophagy in HeLa cells. *Cancer Lett.*, 274:95-100.
31. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 8:1124-1132.
32. Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A (2011) The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* 44:698-709
33. Laussmann MA, Passante E, Du'ssmann H, Rauén JA, Wu'rstle ML, Delgado ME, Devocelle M, Prehn JH, Rehm M (2011) Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of caspase-8. *Cell Death Differ.* 18:1584-1597.
34. Young MM, Takahashi Y, Khan O, Park S, Hori T, Yun J, Sharma AK, Amin S, Hu CD, Zhang J (2012) Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 287:12455-12468
35. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the CB receptor. *Science* 258:1946-1949.

36. Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptor. *Prog Lipid Res* 45: 405-446.
37. Astarita G, Ahmed F, Piomelli D (2008) Identification of biosynthetic precursors for the endocannabinoid anandamide in the rat brain. *J Lipid Res* 49(1):48-57.
38. Fine PG, Rosenfeld MJ (2013) The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain. *Rambam Maimonides Med J*. 4(4):e0022. doi: 10.5041/RMMJ.10129.
39. Compton DR, Gold LH, Ward ST, Balster RL, Martin BR (1992) Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of class of compounds structurally distinct from THC. *Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* 263(3):1118-1126.
40. Bird KD, Boleyn T, Chesher GB, Jackson DM, Starmer GA, Teo RKC (1980) Inter-cannabinoid and cannabinoid-ethanol interactions and their effects on human performance. *Psychopharmacology* 71:181-188.
41. Chávez AE, Chiu CQ, Castillo PE (2010) TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 13(12):1511-8.
42. Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78: 549-563.
43. Velasco G, Galve-Roperh I, Sánchez C, Blázquez C, Haro A, Guzmán M (2005) Cannabinoids and ceramide: two lipids acting hand-by-hand. *Life Sci*. 77(14):1723-31.
44. Pertwee RG (2002) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther*. 95(2):165-74.
45. Guzmán M (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3:745-755.
46. Gustafsson K, Christensson B, Sander B, Flygare J (2006) Cannabinoid receptor-mediated apoptosis induced by R(+)-methanandamide and Win55,212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma. *Mol Pharmacol* 70:1612-20.
47. Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Malik A, Mukhtar H (2006) Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. *J Biol Chem* 281:39480-91.

48. Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K (2006) Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 318:1375-87.
49. Carracedo A, Gironella M, Lorente M (2006) Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res* 66:6748-55.
50. Freimuth N, Ramer R, Hinz B (2010) Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 332:336-344.
51. Calvaruso G, Pellerito O, Notaro A, Giuliano M (2012) Cannabinoid-associated cell death mechanisms in tumor models (review). *Int J Oncol*. Aug;41(2):407-13. doi: 10.3892/ijo.2012.1476. Epub May 14.
52. Massi P, Vaccani A, Bianchessi S, Costa B, Macchi P and Parolaro D (2006) The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cell Mol Life Sci* 63:2057-2066.
53. Malhotra JD and Kaufman RJ: Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? (2007) *Antioxid Redox Signal* 9: 2277-2293.
54. Pellerito O, Calvaruso G, Portanova P, De Blasio A, Santulli A, Vento R, Tesoriere G and Giuliano M (2010) The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)- induced apoptosis by activating p8/CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP)/death receptor 5 (DR5) axis. *Mol Pharmacol* 77: 854-863.
55. Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortes ML, del Pulgar TG, Izquierdo M, Guzman M (2000) Anti tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med* 6:313-319.
56. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM (2011) Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23: 1515-1527.
57. Park JM, Xian XS, Choi MG, Park H, Cho YK, Lee IS, Kim SW, Chung IS (2011) Antiproliferative mechanism of a cannabinoid agonist by cell cycle arrest in human gastric cancer cells. *J Cell Biochem* 112: 1192-1205.
58. Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vázquez P, Blázquez C, Torres S, García S (2009) Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* 119: 1359-1372.

59. Vara D, Salazar M, Olea-Herrero N, Guzmán M, Velasco G, Díaz-Laviada I (2011) Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death Differ* 18: 1099-1111.
60. Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A (2011) Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther* 10:1161-1172.
61. Escher P, and Wahli W (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors: Insight into multiplexed function. *Mutat Res* 448: 121-138
62. Stienstra R, Duval C, M 252 Ller M, Kersten S (2007) PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res* 95: 974.
63. Barish GD, Narkar VA, Evans RM (2006) PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116: 590-597.
64. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H (1997) Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 46: 1319-1327.
65. Spiegelman BM (1998) PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47: 507-514.
66. Muller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans R.M., Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelmanet BM (1998) Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* 1:465-470.
67. Tronstad KJ, Bruserud O, Berge K, Berge RK (2002) Antiproliferative effects of a non- beta-oxidizable fatty acid, tetradecylthioacetic acid, in native human acute myelogenous leukemia blast cultures. *Leukemia* 16:2292-2301.
68. Ondrey F (2009) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma pathway targeting in carcinogenesis: implications for chemoprevention. *Clin Cancer Res* 15:2-8.
69. Koeffler HP (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor γ and cancers. *Clin Cancer Res* 9:1-9.
70. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT (2004) Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* 5:419-429.

71. Giuliano M, Pellerito O, Portanova P, Calvaruso G, Santulli A, De Blasio A, Vento R, Tesoriere G (2009) Apoptosis induced in HepG2 cells by the synthetic cannabinoid WIN: involvement of the transcription factor PPARgamma. *Biochimie* 91(4):457-65.
72. Longhi A, Errani C, De Paolis M, Mercuri M, Bacci G (2006) Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer Treat. Rev.* 32(6):423-436.
73. Ottaviani G, Jaffe N (2009) The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res.* 152: 15-32
74. Hansen MF (1991) Molecular genetics considerations in osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 270: 237-46
75. Das H, Koizumi T, Sugimoto T, Chakraborty S, Ichimura T, Hasegawa K, Nishimura R (2000) Quantitation of Fas and Fas ligand gene expression in human ovarian, cervical and endometrial carcinomas using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Cancer* 82(10):1682-8.
76. Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vázquez P, Blázquez C, Torres S, García S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, Cecconi F, Pandolfi PP, González-Feria L, Iovanna JL, Guzmán M, Boya P, Velasco G (2009) Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* 119, 1359-72.
77. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, and Hayashi H (2005) TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* 24:243-255.
78. Carnero A (2010) The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm* 16:34-44.
79. Adiseshiaiah PP, Clogston JD, McLeland CB, Rodriguez J, Potter TM, Neun BW, Skoczen SL, Shanmugavelandy SS, Kester M, Stern ST, McNeil SE (2013) Synergistic combination therapy with nanoliposomal C6-ceramide and vinblastine is associated with autophagy dysfunction in hepatocarcinoma and colorectal cancer models. *Cancer Lett* 337:254-65.
80. Biederbick A, Kern HF, and Elsässer HP (1995) Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* 6:3-14
81. Seglen PO and Gordon PB (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1889-92

82. Tsukahara T, Haniu H, Matsuda Y (2013) PTB-associated splicing factor (PSF) is a PPAR γ -binding protein and growth regulator of colon cancer cells. *PLoS One* 8(3):e58749.
83. Kang JH, Chang YC, and Maurizi MR (2012) 4-O-carboxymethyl ascochlorin causes ER stress and induced autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. *J Biol Chem* 287:15661-71
84. Cheng CH, Shu KH, Chang HR, Chou MC (2012) Cyclosporine-induced tubular vacuolization: the role of Bip/Grp78. *Nephron Exp Nephrol* 122:1-12.
85. Burikhanov R K, Zhao Y, Goswami A, Qiu S, Schwarze SR, Rangnekar VM (2009) The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell* 138:377-88.
86. Wasik AM, Almestrand S, Wang X, Hultenby K, Dackland ÅL, Andersson P, Kimby E, Christensson B, Sander B (2011) WIN55,212-2 induces cytoplasmic vacuolation in apoptosis-resistant MCL cells. *Cell Death Dis.* 2:e225. doi: 10.1038/cddis.2011.106.
87. Vara D, Morell C, Rodríguez-Henche N, Diaz-Laviada I (2013) Involvement of PPAR γ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* 4:618. doi:10.1038/cddis.2013.141
88. Burikhanov RK, Zhao Y, Goswami A, Qiu S, Schwarze SR, Rangnekar VM (2009) The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. *Cell* 138:377-88.