

INTRODUZIONE

Epatocarcinoma

L'epatocarcinoma, o carcinoma epatocellulare (HCC) è un tumore primitivo che prende origine dagli epatociti, le cellule parenchimali del fegato e rappresenta la forma più comune di tumore epatico maligno: esso è la quinta patologia neoplastica per frequenza di incidenza e la terza causa di morte per cancro (1, 2). Altre forme di tumore al fegato più rare, i colangiocarcinomi, sono neoplasie maligne delle vie biliari.

Diversi fattori di rischio aumentano la probabilità di ammalarsi di epatocarcinoma, tra i quali le infezioni croniche da virus dell'epatite B (HBV) e dell'epatite C (HCV), che spesso portano a cirrosi; l'abuso di alcool; il fumo; l'obesità e l'aflatossina, un contaminante ambientale (Fig. 1) (3).

Paesi del Sud-est asiatico e dell'Africa sub-sahariana, dove l'infezione da HBV è endemica, presentano il più alto tasso di HCC. Nei Paesi occidentali, il principale fattore di rischio per l'HCC è rappresentato dall'infezione da HCV, ma sono presenti anche casi di tumori al fegato correlati con l'HBV (1).

L'HCC è spesso associato ad altre patologie, come la cirrosi epatica: oltre l'80% dei pazienti affetti da epatocarcinoma presenta cirrosi epatica (3); ma l'HCC è associato anche alla steatosi epatica non alcolica (NAFLD), alla malattia cronica del fegato legata all'alcol (ALD) e all'emocromatosi ereditaria.

Fattori di rischio meno comuni includono l'abuso di steroidi anabolizzanti o ormoni maschili, la contaminazione da arsenico nell'acqua potabile e

l'esposizione ad alcune sostanze chimiche industriali. In aggiunta ai fattori di rischio ambientali, la predisposizione genetica individuale gioca un ruolo fondamentale nell'insorgenza dell'HCC.

Qualsiasi forma cronica di danno a livello del fegato che porta a processi infiammatori, a fibrosi e a cirrosi epatica, crea un microambiente permissivo per lo sviluppo dell'HCC (4). L'HCC è il risultato di un processo biologico lento "multi-step", durante il quale gli epatociti acquisiscono alterazioni geniche progressive, portando alla selezione di popolazioni monoclonali, con la formazione di noduli displastici (Fig. 2) (5). Durante la fase pre-neoplastica avvengono frequentemente modifiche epigenetiche che alterano l'espressione di numerosi geni, portando, ad esempio, all'aumentata espressione del TGF- α (Transforming Growth Factor- α), e dell'IGF-2 (Insulin-like Growth Factor-2), responsabili della stimolazione della proliferazione degli epatociti. Le modifiche epigenetiche sono spesso seguite da delezioni alleliche e da riarrangiamenti cromosomici (6).

Il trattamento dell'HCC varia in rapporto allo stadio della malattia, definito in base alle dimensioni, al numero e alla posizione dei noduli neoplastici all'interno del fegato, e alla gravità della concomitante cirrosi, stabilita mediante valutazione della riserva epatica del paziente.

Per stabilire la stadiazione dell'epatocarcinoma esistono diverse classificazioni, tra le quali le più comuni sono la Classificazione TNM (Tumore, Nodulo, Mestastasi), la Classificazione di Okuda, la Classificazione CLIP (Cancer of the

Liver Italian Program) e la Classificazione di Barcellona, mentre il metodo maggiormente impiegato per stabilire la gravità della cirrosi è la classificazione di Child-Pugh (Tab. 1) (7, 8).

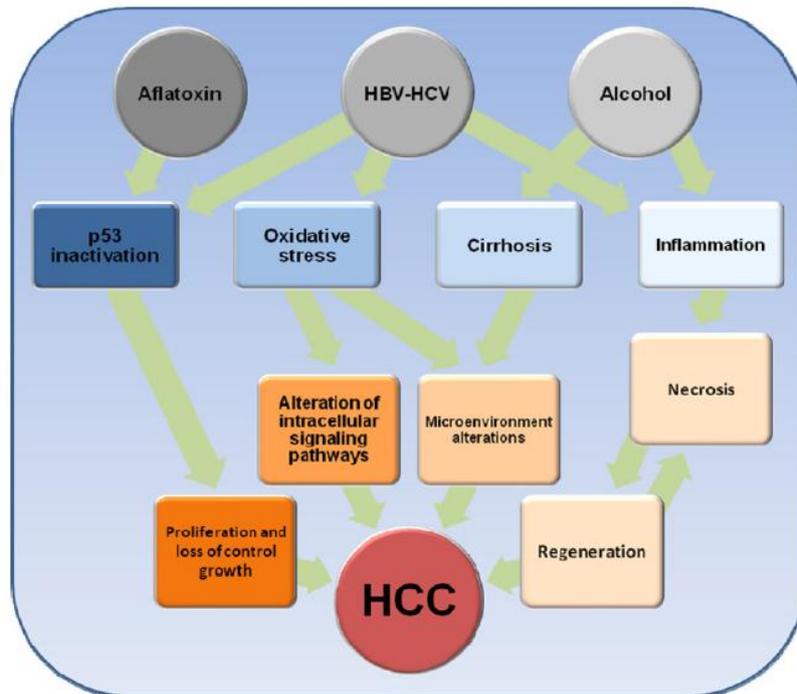


Figura 1: Fattori di rischio per l’insorgenza dell’HCC (Faloppi L. et al, 2010).

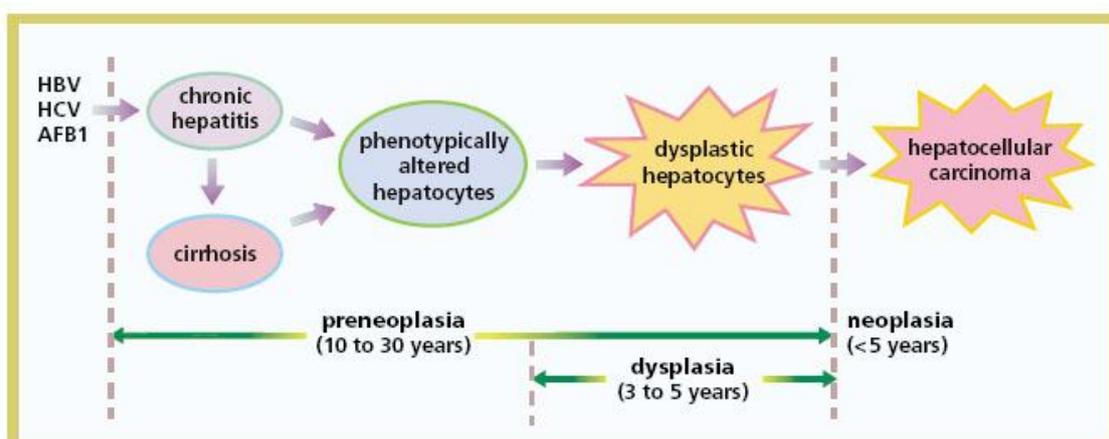


Figura 2: Patogenesi dell’HCC (Thorgeirsson S.S., 2002)

Table 1. Child-Pugh-Turcutte Score			
Scoring points	1	2	3
Bilirubin (mg/dL)	< 1.0	1.0–3.0	> 3.0
PT (%)	> 70 %	40–70	< 40
Albumin (g/dL)	> 3.5	3.0–3.5	< 3.0
Ascites	none	Controlled medically	Poorly controlled
Encephalopathy	none	1–2	3–4
Child A	5–6 points		
Child B	7–9 points		
Child C	>10 points		

Tabella 1: Classificazione di Child-Pugh per la valutazione della riserva epatica (Graziadei I., 2006).

Nella maggior parte dei casi l'HCC viene diagnosticato in uno stadio avanzato, spesso con la concomitante presenza di metastasi (solitamente ai polmoni e alle ossa), e l'intervento terapeutico risulta difficile o addirittura impossibile.

Le possibilità terapeutiche del carcinoma epatico primitivo sono rimaste sostanzialmente invariate nel corso degli ultimi dieci anni, e quindi la prevenzione rimane tutt'oggi la misura più efficace per il controllo di questa patologia.

Tra le strategie terapeutiche per il trattamento dell'HCC, la chirurgia rappresenta l'opzione con cui si ottengono i risultati migliori, sia in forma di resezione chirurgica o epatectomia, ossia rimozione chirurgica della porzione di fegato in cui è localizzato il carcinoma, che di trapianto ortotopico del fegato.

La resezione chirurgica è applicabile, però, solo nel 15-30 % dei casi, poiché molti pazienti presentano fegato cirrotico con inadeguata riserva epatica, lesioni multiple, metastasi extraepatiche, altre patologie e, pertanto, non sono candidati idonei per tale tipo di trattamento.

Il trapianto di fegato rappresenta una valida alternativa, ma è applicabile solo in pazienti con tumori di piccole dimensioni (preferibilmente di diametro inferiore ai 3 cm), con pochi noduli tumorali (non più di 3), nel caso in cui il tumore non abbia invaso la vena porta e in assenza di metastasi. Il trapianto epatico in pazienti con tumori di grosse dimensioni o con trombosi della vena porta riduce in genere la sopravvivenza anziché migliorarla. Purtroppo, il trapianto di fegato viene effettuato con scarsa frequenza per via della mancanza di donatori e quindi per la ridotta disponibilità di organi (3, 7).

In alternativa alla chirurgia è possibile utilizzare le terapie ablativo loco-regionali, che hanno il vantaggio di determinare la distruzione della sola massa tumorale risparmiando il tessuto circostante. Si tratta della termo- e della crioblazione, che prevedono la distruzione del nodulo tumorale attraverso il riscaldamento o il congelamento. Un'altra tecnica di ablazione si basa sull'iniezione percutanea di etanolo (PEI) direttamente nel fegato.

La chemioembolizzazione transarteriosa (TACE) è, invece, una tecnica che combina l'utilizzo di chemioterapici alla chiusura temporanea di un ramo dell'arteria epatica, determinando in tal modo necrosi ischemica della massa tumorale (2). I chemioterapici vengono iniettati direttamente nell'arteria epatica,

garantendone così un alto dosaggio e riducendo nel contempo la tossicità sistemica ed il flusso di sangue che alimenta il carcinoma.

Terapie non chirurgiche come l'ablazione, l'iniezione di etanolo o la TACE vengono utilizzate per il trattamento di tumori locali. Fino ad oggi, però, la resezione chirurgica ed il trapianto di fegato possono essere considerati le uniche terapie potenzialmente curative nel trattamento dell'HCC (5).

Per i pazienti con epatocarcinoma in stadio avanzato, che non possono essere sottoposti a resezione chirurgica, trapianto o tecniche ablativo, le terapie sistemiche, incluse chemioterapia, immunoterapia e terapia ormonale, assumono un ruolo importante (3, 5).

La terapia farmacologica oggi in uso prevede l'impiego di composti come il cisplatino, la mitomicina, l'adriamicina, il 5-fluorouracile (5-FU), la leucovirina e la doxorubicina.

Tuttavia, molte cellule tumorali, incluse le cellule di HCC spesso presentano farmacoresistenza intrinseca o acquisita, mediata principalmente da glicoproteine di membrana, come la P-glicoprotein, codificata dal gene MDR1 (Multi Drug Resistance Gene 1), e la MRP (Multidrug Resistance-associated Protein), codificata dall'omonimo gene, che agiscono come pompe protoniche determinando l'espulsione dei farmaci dalle cellule, con conseguente ridotta efficacia (9). Tali geni sono solitamente espressi a livelli elevati in cellule di HCC.

Ad oggi, l'unica opzione terapeutica promettente è rappresentata dall'inibitore di chinasi sorafenib, che agisce in maniera mirata in cellule tumorali, bloccandone la proliferazione, inibendo le chinasi Raf-1 e B-Raf, esercitando un effetto antiangiogenico mediante l'inibizione dell'attività dei recettori VEGFR-1,-2 e -3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) e PDGFR- β (Platelet-Derived Growth Factor β) e stimolando l'apoptosi (10).

Il sorafenib ha mostrato, per la prima volta, un prolungamento della sopravvivenza nei pazienti con HCC in stadio avanzato e rappresenta, quindi, il nuovo standard di riferimento per il trattamento sistemico di questi pazienti (7). Tale farmaco causa, però, diversi effetti collaterali, che comprendono reazioni cutanee, diarrea, affaticamento, ipertensione ed è stato testato solo in pazienti con tumore metastatico.

Inoltre, è importante sottolineare che, a differenza di altri tipi di tumori, l'HCC spesso si sviluppa in pazienti che presentano fegato compromesso, funzione renale alterata, asciti e trombocitopenia, e quindi l'efficacia di un chemioterapico viene enormemente ridotta a causa della minore tolleranza al trattamento.

Sarebbe dunque di fondamentale importanza per la cura dell'HCC individuare nuovi farmaci poco tossici per l'organismo e in grado di superare la resistenza delle cellule tumorali; a tale scopo è utile considerare la possibilità di impiegare combinazioni di composti che possano esercitare un effetto sinergico, in modo da ridurre le concentrazioni da utilizzare e quindi la loro eventuale tossicità.

TRAIL e i suoi recettori

Apo2L/TRAIL (Apo2 Ligand/Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) è un membro della famiglia di citochine correlate con il TNF (12). La forma nativa di TRAIL è una proteina transmembrana di tipo II di circa 33-35 kDa, che presenta una lunga porzione C-terminale localizzata nella regione extracellulare ed una corta regione N-terminale nel versante citoplasmatico (Fig. 3 A) (13, 14).

TRAIL può essere rilasciato dalle cellule associato a vescicole o subire il taglio da parte di metalloproteasi presenti nel microambiente extracellulare ed essere secreto come ligando solubile omotrimerico. L'integrità strutturale della forma omotrimerica solubile di TRAIL è assicurata da un atomo di zinco coordinato a livello del residuo di cisteina 230 di ogni monomero, essenziale per la sua stabilità e funzionalità (15).

Sono stati identificati cinque diversi recettori per TRAIL (TRAIL-R1/5), appartenenti alla superfamiglia genica del recettore del TNF (TNF-Rs), composta da più di venti proteine, tra le quali anche CD95/Fas e TNF-R1 (Fig. 3 B). Tra questi recettori, TRAIL-R1 (anche noto come TR1 o DR4) e TRAIL-R2 (noto come TR-2, DR5, TRICK2 o KILLER) sono in grado di trasdurre il segnale di morte attivato da TRAIL, poiché possiedono un dominio citoplasmatico di circa 80 amminoacidi (aa), chiamato dominio di morte, che

gioca un ruolo chiave nella trasmissione del segnale innescato dall'interazione del ligando di morte con il recettore.

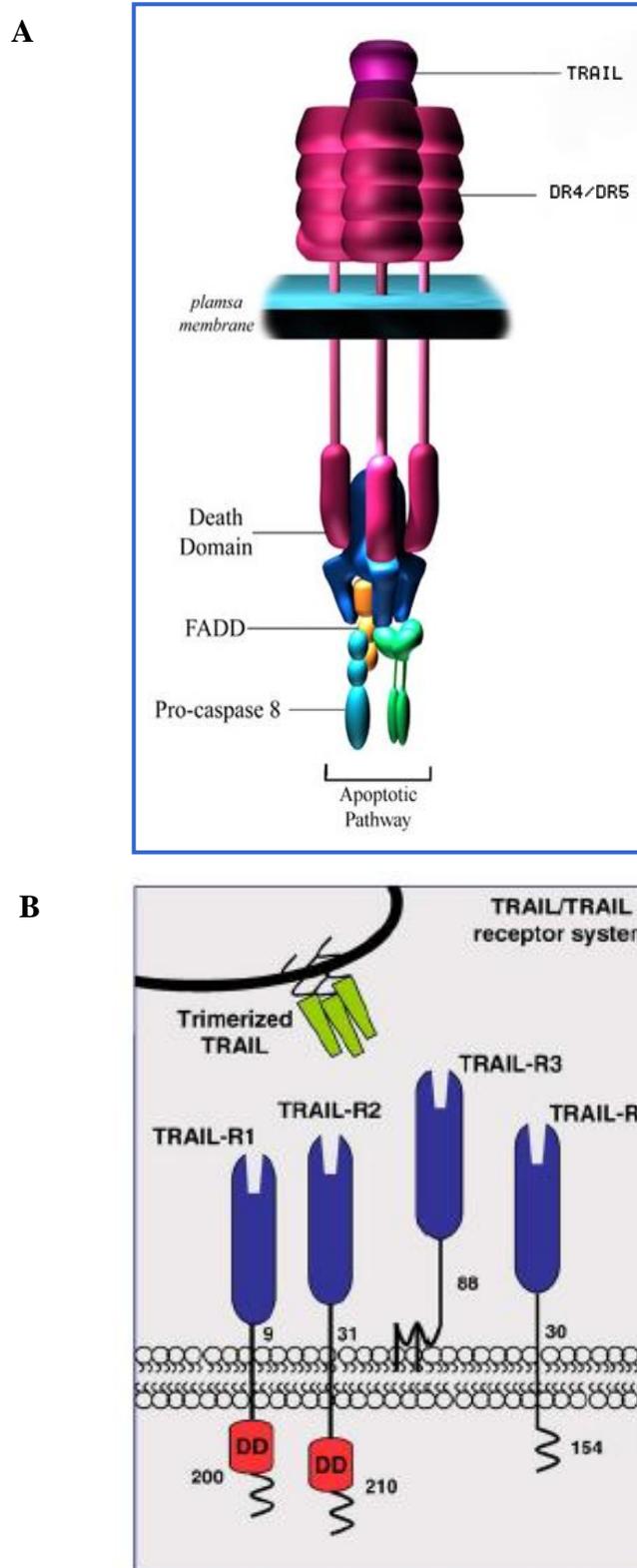


Figura 3: (A) Struttura di TRAIL. (B) Sistema recettoriale di TRAIL (Holoch P.A. et al, 2009).

TRAIL-R1 e TRAIL-R2 presentano una struttura simile: si tratta di proteine transmembrana di tipo I, ampiamente espresse in diversi tessuti e caratterizzate da una sequenza segnale, da un dominio extracellulare ricco in cisteine (CRD) e da dominio di morte citoplasmatico. TRAIL-R1 è costituito da 468 aa e presenta una sequenza segnale di 23 aa, una regione extracellulare di 226 aa ed una regione citoplasmatica di 19 aa, che contiene un dominio di morte. TRAIL-R2 è un recettore transmembrana di tipo I non glicosilato, che presenta un'omologia del 58% con il recettore TRAIL-R1; è costituito da 411 aa con una sequenza segnale molto ampia di 51 aa, una regione extracellulare di 132 aa, un dominio transmembrana di 22 aa e un dominio citoplasmatico di 206 aa (14). TRAIL-R2 presenta inoltre nella coda citoplasmatica un motivo di legame TRAF (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor), responsabile dell'attivazione di NF- κ B (16).

Sono state identificate due diverse isoforme di TRAIL-R2 generate da eventi di splicing alternativo del messaggero che differiscono per una sequenza di 23 aa a livello del dominio extracellulare; entrambe le isoforme sono attive nel mediare il segnale di morte cellulare (15).

TRAIL può, quindi, indurre il pathway apoptotico estrinseco legando i recettori di morte TRAIL-R1 e TRAIL-R2. TRAIL è anche in grado di interagire con altri due recettori, TRAIL-R3 (TR3, DcR1, LIT o TRID) e TRAIL-R4 (TR4, DcR2, TRUNDD), chiamati "recettori trappola" (decoy receptors) in quanto competono con i recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2 per il legame a TRAIL, ma risultano

incapaci di trasdurre il segnale apoptotico (Fig. 4). TRAIL-R3 è una proteina di 299 aa localizzata sulla superficie cellulare, priva del dominio citoplasmatico e, pertanto, legata alla membrana attraverso un'ancora lipidica di glicosilfosfatidilinositolo (GPI). In particolare, TRAIL-R3 è costituita da una sequenza segnale di 23 aa, da una regione extracellulare di 217 aa e da un dominio transmembrana di 19 aa che manca del dominio di morte citoplasmatico (14). È stato dimostrato che l'aumentata espressione di TRAIL-R3 induce resistenza a TRAIL, mentre la sua rimozione dalla superficie cellulare, per azione della fosfolipasi C, aumenta la sensibilità delle cellule all'effetto apoptotico di TRAIL (13).

TRAIL-R4 è una proteina transmembrana con il dominio di morte citoplasmatico tronco ed è, quindi, anch'essa incapace di trasmettere il segnale di morte cellulare ed agisce come inibitore dell'apoptosi indotta da TRAIL.

Numerosi studi sembrano indicare che TRAIL-R4 possa avere un'importanza maggiore rispetto a TRAIL-R3 nella fisiologia del sistema TRAIL/TRAILRs, in quanto risulta maggiormente espresso nei tessuti normali (12, 14).

Esiste, infine, un quinto recettore per TRAIL, noto come TRAIL-R5 (osteoprotegerina, OPG), un recettore solubile che mostra bassa affinità per TRAIL e che è espresso prevalentemente a livello tessuto scheletrico dove è coinvolto nella regolazione dell'osteoclastogenesi. Il ruolo di TRAIL-R5 nella normale fisiologia del sistema TRAIL/TRAIL-Rs non è ancora chiaro; tuttavia in alcune condizioni patologiche, come il cancro alla prostata e il mieloma

multiplo, TRAIL-R5 potrebbe agire in modo paracrino/autocrino legando TRAIL e promuovendo la crescita tumorale (14).

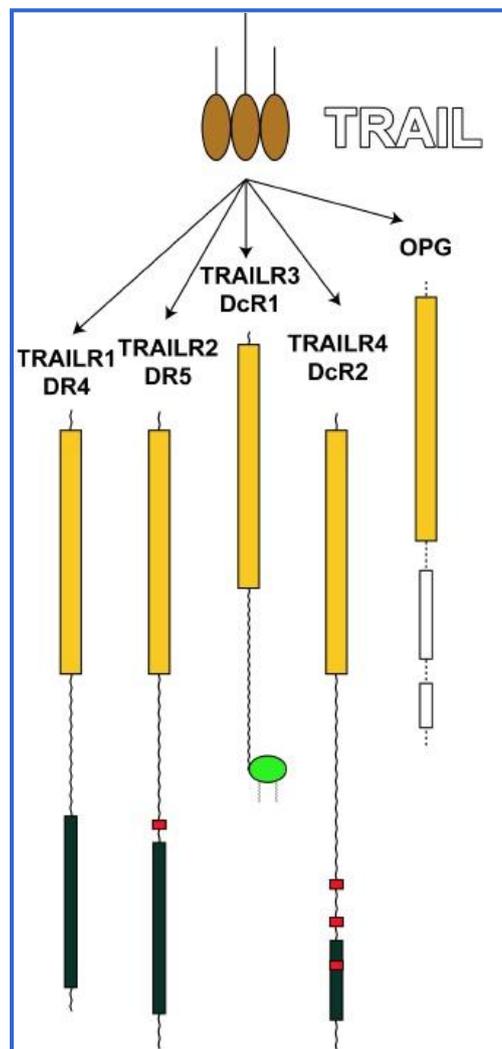


Figura 4: TRAIL è in grado di interagire con cinque recettori; i rettangoli neri indicano i domini di morte; i rettangoli rossi i motivi di legame a TRAF; il cerchio verde rappresenta l'ancora di GPI; (Pasquini L. et al, 2006).

Pathway apoptotico indotto da TRAIL

Il legame di TRAIL omotrimerico al recettore (TRAIL-R1 o TRAIL-R2), induce la trimerizzazione del recettore stesso sulla superficie della cellula target e la formazione di un complesso multiproteico noto come DISC (Death-Inducing Signalling Complex), che determina morte per apoptosi (14).

TRAIL-R1 e TRAIL-R2 attivi reclutano, infatti, la proteina adattatrice FADD (Fas-Associated Death Domain protein), attraverso l'interazione dei rispettivi domini di morte (DD, Death Domain); FADD, a sua volta, recluta la procaspasi-8, grazie all'interazione dei domini effettori di morte (DED, Death Effector Domain) (Fig. 5) (16).

La caspasi-8 viene sintetizzata sotto forma di zimogeno ed esiste in due isoforme, p55 and p53, ognuna contenente due domini DED. Mediante tali domini, la procaspasi-8 viene reclutata da FADD a livello del DISC e subisce un taglio proteolitico tramite un processo auto-catalitico a due tappe, con il conseguente rilascio delle sub-unità p10 e p18 che iniziano la cascata apoptotica, determinando il taglio delle caspasi esecutrici e di altri specifici substrati coinvolti nel processo apoptotico (17).

L'apoptosi classica può essere realizzata mediante due distinti pathways: il pathway apoptotico intrinseco ed il pathway apoptotico estrinseco, che culminano entrambi nell'attivazione delle caspasi esecutrici.

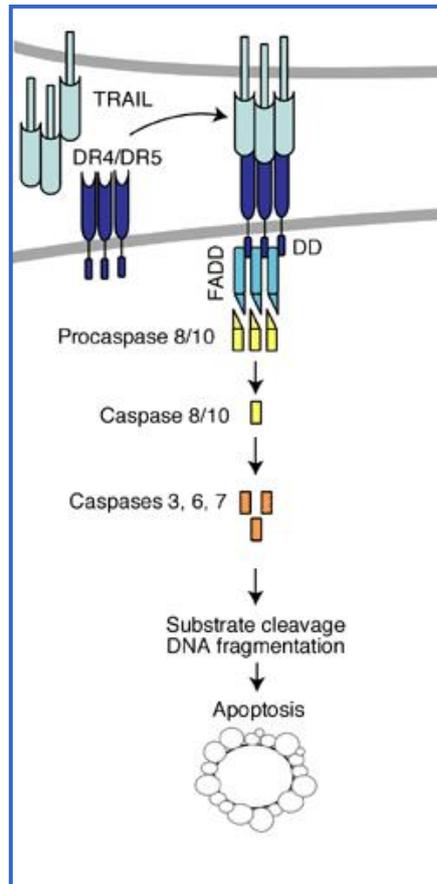


Figura 5: Apoptosi indotta da TRAIL (Clarke N. et al, 2004).

Il pathway estrinseco viene innescato dal legame di ligandi della superfamiglia del TNF ai rispettivi recettori.

In alcuni casi, l'attivazione della caspasi-8 è sufficiente ad attivare le caspasi esecutrici -3, -6 e -7 e dare inizio alla cascata di eventi che inducono l'apoptosi.

In altri casi, è necessaria anche l'attivazione del pathway apoptotico intrinseco che vede il coinvolgimento del mitocondrio e dei membri della famiglia Bcl-2 (B-Cell Lymphoma-2), alla quale appartengono sia fattori pro- che anti-apoptotici (14). In particolare, tra i fattori anti-apoptotici vi sono Bcl-2 e Bcl-X_L, tra quelli pro-apoptotici, Bax, Bak, Bid, Bim, Bad, Noxa e Puma. La caspasi-8

determina il taglio proteolitico di Bid; Bid tronco (tBid) è in grado di traslocare nel mitocondrio dove attiva i fattori pro-apoptotici Bax e Bad, portando alla perdita di integrità della membrana mitocondriale e consentendo il rilascio, dal mitocondrio al citosol, di fattori pro-apoptotici come il citocromo c, AIF (Apoptosis-Inducing Factor), l'endonucleasi G (Endo G), HtrA2/Omi e la proteina SMAC/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct Inhibitor of Apoptosis protein Binding protein LOw isoelectric point). Il citocromo c interagisce, quindi, con la proteina adattatrice APAF-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1) e con la procaspasi-9, determinando la formazione dell'apoptosoma, il complesso di attivazione della caspasi-9. La caspasi-9 può quindi attivare le caspasi effettrici -3, -6 e -7, con conseguente induzione dell'apoptosi. SMAC/DIABLO facilita il processo di morte cellulare poiché favorisce l'inattivazione delle proteine IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), come XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), in grado di inibire direttamente le caspasi esecutrici (Fig.6) (18, 19).

Il complesso DISC può essere regolato negativamente da proteine quali c-Flip (cellular-FADD-Like IL-1 β -converting enzyme Inhibitory Protein) e l'adattatore TRADD (Tumour necrosis factor Receptor 1 (TNFR1)-Associated Death Domain), che inibiscono l'attivazione della caspasi-8 ed inducono invece pathway di sopravvivenza. c-Flip regola il reclutamento di FADD a livello del DISC poiché mostra omologia strutturale con la caspasi-8, ma manca dell'attività proteasica. c-Flip contiene domini DED: tale proteina esercita la sua

azione inibitrice sul pathway di segnalazione di TRAIL legando il dominio DED di FADD e bloccando in tal modo l'attivazione della procaspasi-8.

Sono state identificate diverse varianti di c-Flip, generate per splicing alternativo dell'RNA messaggero. Le forme maggiormente studiate sono c-Flip_L (long isoform) e c-Flip_S (short isoform), che possono essere entrambe reclutate a livello del DISC interagendo con FADD mediante i domini DEDs (20).

In aggiunta ai pathways apoptotici, TRAIL è anche in grado di innescare segnali di sopravvivenza cellulare mediante l'attivazione di NF- κ B, di PKB/Akt e delle MAPKs. Ad esempio, TRAIL-R1 e TRAIL-R2 possono interagire, mediante i domini di morte, con TRADD, che a sua volta recluta RIP (Receptor-Interacting Protein) e IKK (IkB Kinases) a livello del DISC, portando alla fosforilazione ed inibizione di I- κ B e all'attivazione di NF- κ B, fattore di trascrizione che regola positivamente l'espressione di geni anti-apoptotici (Fig. 7) (20, 21, 22).

Tuttavia, l'attivazione di NF- κ B da parte dei recettori TRAIL-Rs è molto più debole rispetto a quella innescata dai recettori TNF-Rs e l'attivazione del solo NF- κ B non è sufficiente ad inibire l'apoptosi mediata da TRAIL-R2 (22).

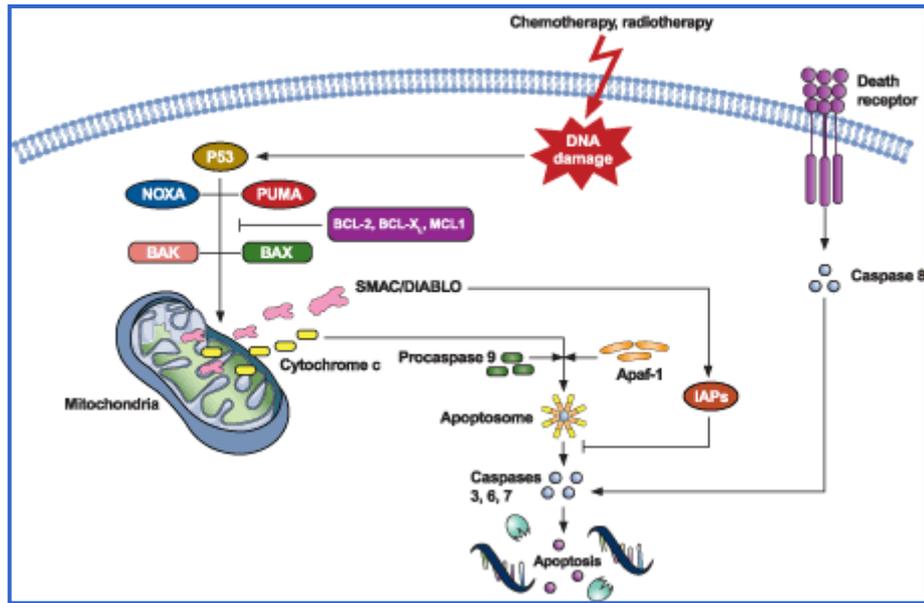


Figura 6: Morte cellulare per apoptosi; pathway intrinseco ed estrinseco (Ashkenazi, 2002).

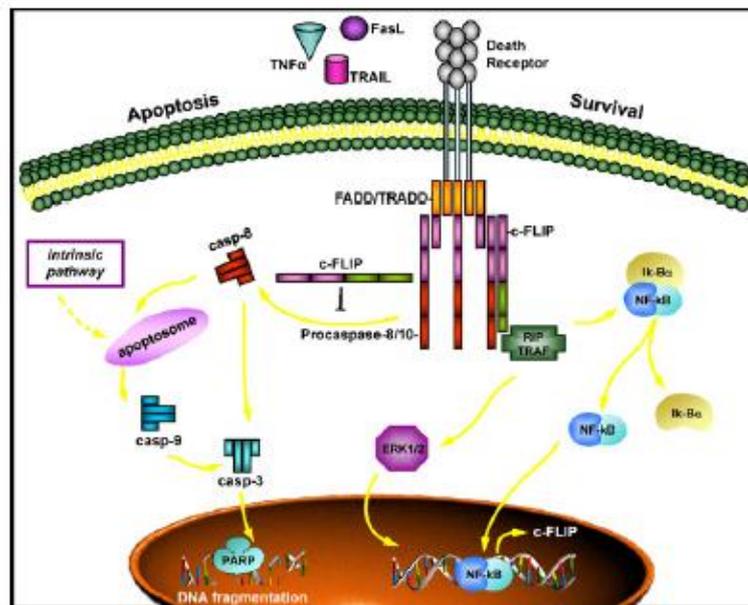


Figura 7: Attivazione di pathway di sopravvivenza da parte dei recettori di morte (Bagnoli M. et al, 2010).

Potenziale terapeutico di TRAIL e meccanismi di resistenza

TRAIL sembra offrire un potenziale terapeutico antitumorale molto promettente, poiché possiede la capacità, a differenza degli altri ligandi di morte, di indurre selettivamente morte cellulare per apoptosi in molte linee cellulari tumorali, senza danneggiare, invece, la maggior parte delle cellule normali (14).

Proprio per via di tali caratteristiche, fin dalla sua scoperta nel 1995 ad opera di due gruppi indipendenti (Wiley et al.; Pitti et al.), TRAIL è stato oggetto di intensi studi (12, 15). Inoltre, l'espressione di TRAIL risulta costitutiva in molti organi, inclusi milza, timo, prostata, ovaie, intestino, colon e placenta, ad eccezione di fegato, testicoli e cervello. Al contrario, l'espressione di altri membri della famiglia del TNF è altamente regolata e spesso transiente (12). In particolare, è stato dimostrato che TRAIL, espresso in cellule natural killer (NK), macrofagi, cellule T e cellule dendritiche, prende parte a meccanismi di difesa immunitaria, facilitando la morte di cellule infettate da virus e di cellule tumorali (15).

Per quanto riguarda la tossicità di TRAIL, è interessante osservare che alcune forme di TRAIL ricombinante umano (rhTRAIL) inducono morte cellulare in epatociti umani *in vitro* (23, 24). Ad esempio, una forma di TRAIL ricombinante che ha mostrato tossicità *in vitro* è dotata di una coda di istidine (poly-His), possiede un basso contenuto di Zn^{2+} e adotta una struttura tridimensionale aberrante rispetto a TRAIL nativo (23).

L'epatotossicità mostrata da TRAIL *in vitro* sembra interamente dovuta alla forma di TRAIL utilizzata e l'impiego di un ricombinante privo di poly-His non dovrebbe mostrare tossicità. Recentemente, sono stati condotti studi di sperimentazione clinica di fase I che hanno confermato che il ricombinante TRAIL umano senza poly-His è ben tollerato dai pazienti (21).

L'impiego di molecole in grado di stimolare i recettori per TRAIL (quali anticorpi monoclonali contro i recettori o TRAIL ricombinante) è tuttavia limitato dall'osservazione che molte forme tumorali, tra le quali l'epatocarcinoma umano, sono resistenti all'azione apoptotica indotta da TRAIL. I meccanismi molecolari alla base di tale resistenza sono numerosi e negli ultimi anni sono stati condotti intensi studi volti ad individuarli e a contrastarli.

Dal momento che sia TRAIL che i suoi recettori sono costitutivamente espressi in un'ampia varietà di tessuti, si è inizialmente ipotizzato che i recettori trappola potessero regolare negativamente il pathway mediato da TRAIL, mediante inibizione competitiva. Tuttavia, alcuni studi hanno mostrato che non vi è nessuna correlazione tra l'espressione dei recettori DcR1 e DcR2 e la resistenza a TRAIL (12). Alcuni autori hanno suggerito che la distribuzione dei recettori per TRAIL tra superficie cellulare e citoplasma possa essere un potenziale meccanismo di regolazione post-traduzionale. È stato inoltre dimostrato che la O-glicosilazione dei recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2 stimola la trimerizzazione

degli stessi recettori, con il conseguente reclutamento ed attivazione della caspasi-8 (12).

È importante sottolineare, inoltre, che le cellule tumorali accumulano mutazioni genetiche multiple, che portano alla produzione di proteine aberranti. Ciò lascia ipotizzare che alcuni tumori possiedano mutazioni a livello dei recettori di morte per TRAIL, che impediscano dunque l'attivazione del pathway di morte. Infatti, sono state identificate mutazioni a livello del gene TRAIL-R2 in numerose neoplasie, come il tumore testa collo, il tumore al polmone, il carcinoma mammario, il linfoma non-Hodgkin, il cancro colonrettale, il tumore gastrico ed il carcinoma epatocellulare, ed in tutti i casi le mutazioni sono state riscontrate a livello del dominio di morte (12).

Un'altra possibile spiegazione della diversa sensibilità a TRAIL da parte delle cellule tumorali si basa sulla differente espressione nei vari citotipi di proteine pro- ed anti-apoptotiche, che regolano i segnali di morte innescati da TRAIL.

La resistenza all'apoptosi indotta da TRAIL potrebbe essere causata, infatti, da difetti di espressione della caspasi-8 o di FADD a causa di mutazioni inattivanti, di ridotta espressione o incremento della loro degradazione; da un'incrementata espressione di c-Flip o delle IAPs; dall'attivazione di fattori trascrizionali quali NF- κ B e c-Jun, ma anche delle proteine Akt e MAPKs, capaci di indurre segnali di sopravvivenza (14). Per incrementare la sensibilità all'apoptosi indotta da TRAIL e superarne quindi la resistenza, tale ligando di morte è stato impiegato in studi preclinici in combinazione con diverse strategie terapeutiche (14, 15).

Tra i composti impiegati, il bortezomib, un inibitore del proteasoma approvato per il trattamento del mieloma multiplo, induce apoptosi inibendo la degradazione di proteine pro-apoptotiche, incrementando l'espressione di p53 e TRAIL-R2 e decrementando l'espressione di c-Flip. Inoltre, il bortezomib sensibilizza alcune linee cellulari derivanti da carcinoma mammario, carcinoma colonrettale e renale all'apoptosi mediata da TRAIL (12, 25, 26).

L'utilizzo di radiazioni ionizzanti sensibilizza cellule Jurkat alla via di TRAIL, incrementando l'espressione di TRAIL-R2 e facilitando il reclutamento di FADD a livello del DISC (15). L'inibitore di chinasi sorafenib è in grado di regolare negativamente Bcl_{XL}, Mcl-1 e c-Flip e di potenziare la morte cellulare mediata da TRAIL in cellule leucemiche umane (27).

Un'altra classe di chemioterapici, gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi), si è rivelata molto utile nel superare la resistenza mostrata da alcune cellule tumorali nei confronti di TRAIL. Alcuni studi hanno dimostrato che gli HDACi sono in grado di determinare la riduzione dell'espressione di molecole anti-apoptotiche come c-Flip e IAPs e di determinare l'incremento dei recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2, in diversi modelli tumorali (28-30).

In particolare, nei laboratori della Sezione di Scienze Biochimiche del Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNec) di Palermo, sono stati recentemente condotti degli studi che dimostrano l'azione sinergica tra un HDACi, il SAHA (SuberoylAnilide Hydroxamic Acid) e il ricombinante TRAIL in cellule di epatocarcinoma umano (31).

Il partenolide

Il partenolide è un composto naturale, isolato da *Tanacetum parthenium*, una pianta perenne appartenente alla famiglia delle Composite (genere Asteracee) ed utilizzata nella medicina tradizionale per trattare febbre, dolori articolari e cefalea (32). Dal punto di vista chimico, il partenolide appartiene alla classe dei sesquiterpeni lattoni (SL), una sottofamiglia di terpenoidi, metaboliti secondari di natura lipofilica, prodotti dalle piante. I SL sono composti da 15 atomi di carbonio e consistono di tre unità isopreniche (5-C) e di un gruppo lattone (estere ciclico) (Fig. 8).

L'attività biologica dei SL viene influenzata da alcune caratteristiche chimiche: il centro di reattività alchilante, la catena laterale e il grado di lipofilicità, la geometria molecolare e le caratteristiche elettroniche (33). In particolare, il partenolide contiene un anello α -metilene- γ -lattone ed un gruppo epossidico che sono responsabili della sua attività poiché sono in grado di interagire rapidamente con siti nucleofili di molecole biologiche (32, 33).

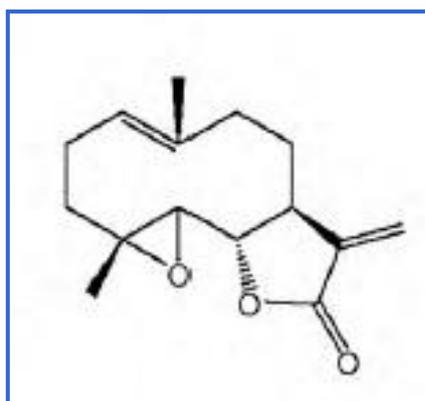


Figura 8: Struttura chimica del partenolide (Ghantous A. et al, 2010).

Infatti, l'anello α -metilene- γ -lattone, un importante centro alchilante, reagisce, mediante addizione di tipo Michael, con nucleofili biologici, tra i quali i più reattivi sono rappresentati dai residui di cisteina delle proteine, formando quindi addotti stabili. Per quanto riguarda la catena laterale ed il grado di lipofilicità, in generale, più lipofilo è un composto e più facilmente esso riesce a penetrare attraverso le membrane cellulari, incrementandone dunque la citotossicità *in vitro*. Tuttavia, spesso ad una maggiore lipofilicità corrisponde una bassa biodisponibilità della droga *in vivo*. Anche la flessibilità conformazionale esercita effetti importanti sulla bioattività dei SL.

Alcuni SL o loro derivati sono stati introdotti in trials clinici antitumorali, poiché hanno come target cellule tumorali e cellule tumorali staminali, mentre non danneggiano le cellule normali (Tab. 2). Ad oggi, i SL introdotti in trials clinici sono l'artemisina, estratta da *Artemisia annua* L, la thapsigargina, estratta da *Thapsia* (Apiaceae), ed il partenolide, estratto da *Tanacetum parthenium* (feverfew), e/o alcuni loro derivati sintetici (33). Studi condotti sia *in vitro* che *in vivo* indicano che composti derivati dall'artemisina sono promettenti contro il carcinoma alla laringe, il melanoma uveale ed il macroadenoma pituitario, e sono stati inoltre introdotti in trials di fase I-II per il trattamento del carcinoma mammario e colonrettale e del tumore al polmone a piccole cellule.

I composti derivati dalla thapsigargina sono stati inseriti in trials clinici di fase I per il trattamento del carcinoma mammario, renale e prostatico.

TABLE 1

Sesquiterpene lactones in cancer clinical trials

<i>Sesquiterpene lactone or derivative</i>	Cancer or inflammation condition	Clinical study	Refs
Artemisinin	Lupus nephritis Metastatic breast cancer Colorectal cancer		[39] ClinicalTrials.gov: NCT00764036 Isrctn.org: ISRCTN05203252
Artesunate	Nonsmall cell lung cancer Metastatic uveal melanoma Laryngeal squamous cell carcinoma		[40] [41] [42]
Artemether	Pituitary macroadenoma		[43]
Dimethyl-amino-parthenolide (LC-1)	AML, ALL and other blood-lymph tumors	Phase I clinical trial	http://www.globenewswire.com/newsroom/news.html?d=158480
Thapsigargin (G-202)	Advanced solid tumors	Phase I clinical trial	ClinicalTrials.gov: NCT01056029

Tabella 2: Sesquiterpeni lattoni introdotti in sperimentazione clinica per il trattamento del cancro (Ghantoud A. et al, 2010).

Negli ultimi anni il partenolide si è rivelato un composto estremamente versatile: diversi studi, condotti sia *in vitro* che *in vivo*, hanno infatti dimostrato che, oltre alla nota azione anti-infiammatoria, esso ha la capacità di indurre arresto della proliferazione cellulare, di promuovere differenziamento, o di indurre morte cellulare per apoptosi in vari tumori, inclusi il colangiosarcoma, il tumore alla prostata, il tumore al polmone, il carcinoma mammario, il mieloma multiplo, la leucemia ed il melanoma. Inoltre, il partenolide incrementa gli effetti citotossici esercitati da altri chemioterapici, da stress ossidativo e dal ricombinante TRAIL, quando impiegato in associazione con essi (34, 39).

Le proprietà uniche del partenolide sono dovute alla capacità di interagire con siti nucleofili di molecole biologiche, determinando numerose risposte, come la deplezione del glutatione e di altri tioli, con conseguente produzione di ROS, attivazione delle caspasi ed apoptosi (32).

Il partenolide esplica la sua azione anti-infiammatoria poiché è in grado di inibire l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B indotta da citochine appartenenti alla famiglia dell'interleuchina 1 (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , TNF- β , IL-18) (35). NF- κ B rappresenta una famiglia di fattori di trascrizione responsabili dell'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria ed infiammatoria, nello sviluppo e nella proliferazione cellulare, ma anche nell'apoptosi, nella progressione del ciclo cellulare e nei processi di invasione e metastasi. La famiglia dei fattori NF- κ B comprende cinque subunità: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 (NF- κ B1) e p52 (NF- κ B2) che, in seguito a dimerizzazione, possono legare la sequenza consenso dei promotori di geni target. NF- κ B, nella forma inattiva, si trova localizzato nel citoplasma, legato alle proteine appartenenti alla famiglia I κ B (Inhibitors of κ B), che comprende I κ B α , I κ B β , p105 (I κ B γ , precursore di p50), p100 (precursore di p52) e I κ B ϵ . Tali proteine sequestrano NF- κ B nel citosol, impedendone la migrazione al nucleo. L'attivazione di NF- κ B richiede la fosforilazione di I κ B ad opera del complesso di chinasi IKK, con la conseguente ubiquitinazione e degradazione proteasoma-dipendente. NF- κ B in tal modo, è libero di migrare al nucleo e di regolare la trascrizione di geni target. In particolare, NF- κ B regola la trascrizione di citochine della famiglia IL-6, di proteine appartenenti alla famiglia delle IAPs, di componenti anti-apoptotici della famiglia Bcl-2, e di c-FLIP (36) (Fig. 9). Il partenolide riduce l'attività di legame al DNA di NF- κ B sia inibendo la chinasi I κ B che direttamente impedendo il legame della sub-unità p65 al DNA.

Infatti, l'inibizione di NF- κ B ad opera del partenolide avviene mediante interazione diretta con la chinasi IKK2, facente parte del complesso di chinasi IKC. Il partenolide impedisce, quindi, la fosforilazione di I κ B che, così libera di agire, mantiene NF- κ B sequestrato nel citoplasma (32).

L'inibizione del segnale mediato da NF- κ B porta ad una ridotta espressione di numerose proteine, tra le quali anche fattori anti-apoptotici come TRAF-1 e -2. Ciò determina l'attivazione di p53 e delle caspasi, con il conseguente arresto del ciclo cellulare ed induzione di morte (37).

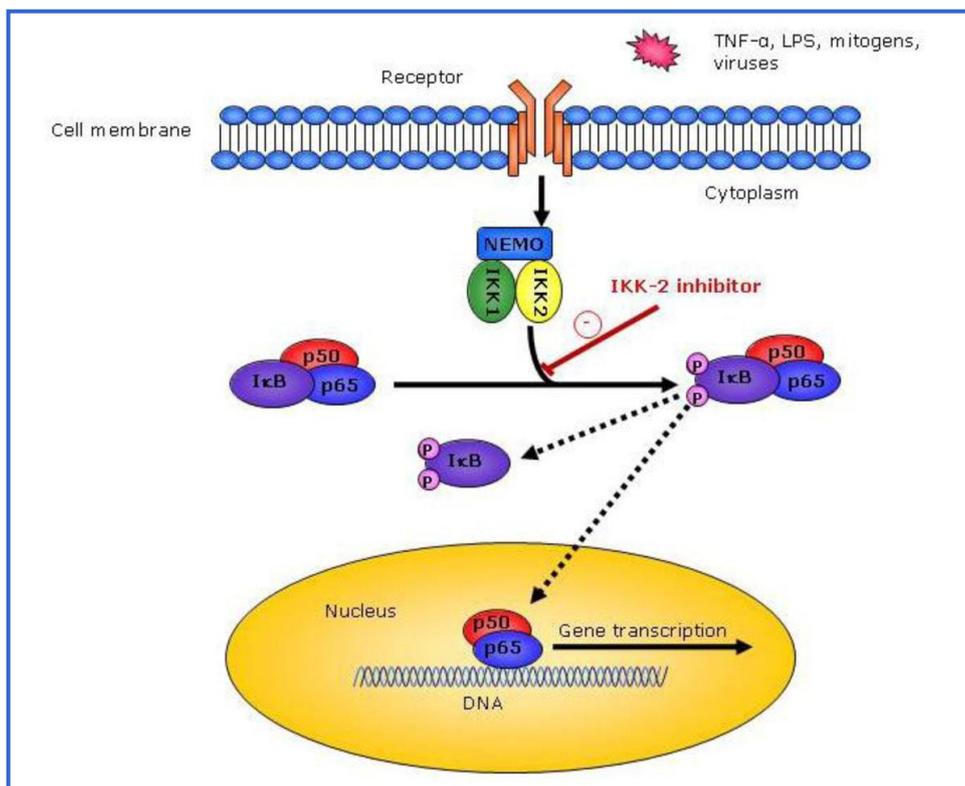


Figura 9: Pathway di segnalazione mediato da NF- κ B (www1.imperial.ac.uk).

È stato dimostrato anche un altro meccanismo molecolare che può spiegare gli effetti indotti dal partenolide: esso riguarda l'inibizione dei fattori di trascrizione STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription), che regolano numerose risposte biologiche, tra le quali infiammazione e risposta immunitaria, proliferazione cellulare, trasformazione, apoptosi, differenziamento, sviluppo fetale, e che risultano spesso costitutivamente attivi in varie linee tumorali umane (32).

Il partenolide inibisce la fosforilazione delle proteine STATs, essenziale per la loro dimerizzazione e migrazione al nucleo, impedendo anche in questo caso la trascrizione di geni target anti-apoptotici, tra i quali cyclin D1/D2, Myc, Bcl-XL, Mcl-1, p21^{WAF1/CIP1} e survivina (38).

Il partenolide esercita, quindi, un'azione indiretta a livello genico, poiché regola negativamente la trascrizione di geni mediata da NF-kB e STATs, fattori di trascrizione coinvolti, non solo nella regolazione del processo infiammatorio, ma anche nel controllo dei meccanismi di sopravvivenza cellulare, di differenziamento, di proliferazione ed apoptosi. Inoltre, il partenolide determina l'incremento dei livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS), inducendo così il pathway apoptotico intrinseco (32). Conseguentemente, cellule tumorali che esprimono elevati livelli di fattori di sopravvivenza, diventano maggiormente sensibili all'induzione di apoptosi, per attivazione sia del pathway estrinseco che intrinseco (Fig. 10).

È interessante sottolineare che il partenolide sembra mostrare tossicità selettiva nei confronti di cellule tumorali, senza determinare alcun effetto in cellule normali e ciò lascia ipotizzare un suo possibile impiego in associazione con agenti che inducono apoptosi, rendendolo un candidato ideale nella terapia antitumorale.

Tuttavia, il partenolide presenta scarse proprietà farmaceutiche poiché presenta una limitata attività *in vivo* a causa della sua scarsa biodisponibilità (40) Infatti, alcuni studi hanno dimostrato che i SL legano proteine del sangue contenenti gruppi sulfidrilici e che formano anche addotti con il glutatione e ciò ne riduce la biodisponibilità ed impedisce che raggiungano concentrazioni tali da renderli citotossici (33). È stato, pertanto, sviluppato un amminoanalogo del partenolide, il dimethylaminoparthenolide (DMAPT) ed è stato introdotto trials clinici di fase I per la cura di leucemia mieloide acuta, leucemia linfoblastica acuta ed altri tumori al sangue ed ai linfonodi (37).

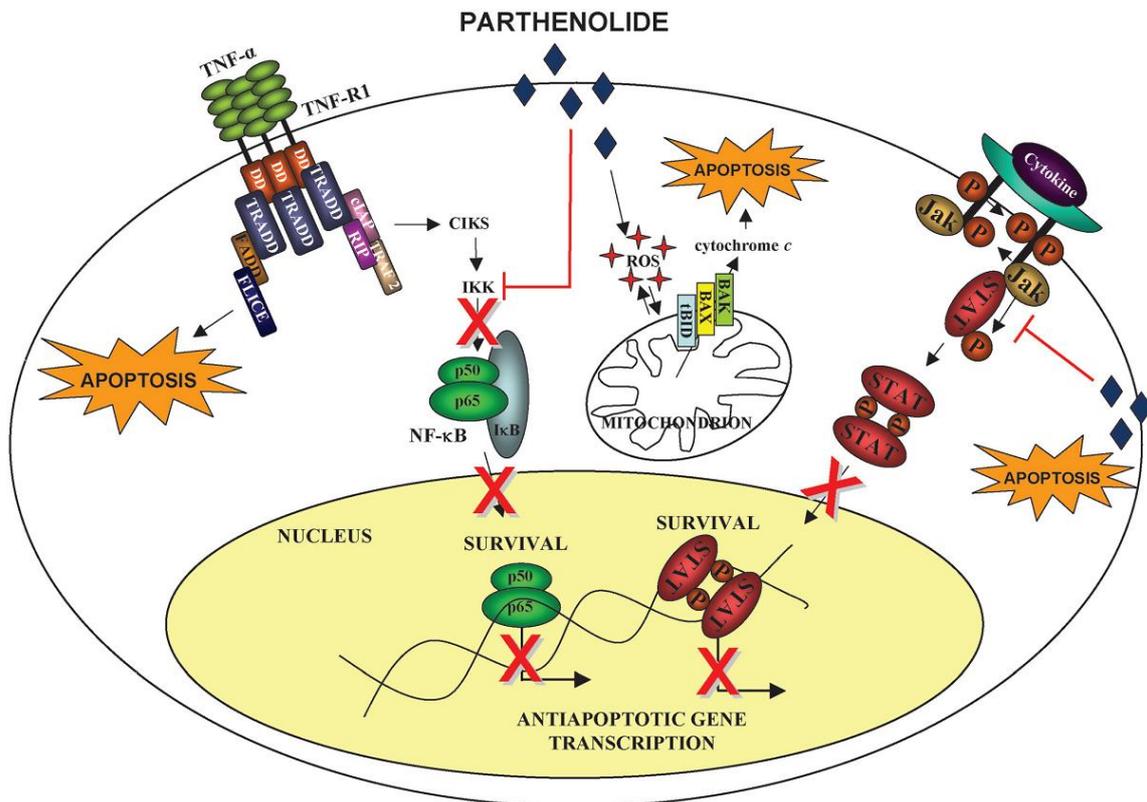


Figura 10: Induzione di morte cellulare per apoptosi mediata dal partenolide (Pajak B. et al, 2008).

Il pathway di segnalazione JAK/STAT

La famiglia di chinasi JAKs (JAnus family of tyrosine Kinases) e la famiglia di fattori di trascrizione STATs sono componenti fondamentali di diversi pathway di trasduzione del segnale, attivamente coinvolti in meccanismi cellulari quali sopravvivenza, proliferazione, differenziamento ed apoptosi. Recentemente è emerso anche il ruolo fondamentale svolto dalle proteine STATs nell'oncogenesi (41). Numerosi studi hanno dimostrato che le proteine STATs possiedono una duplice funzione: come sensori di stimoli extracellulari, esse ricevono i segnali nel citoplasma e, come fattori di trascrizione, trasducono il segnale al nucleo, partecipando direttamente alla regolazione dell'espressione genica (42, 43). Le proteine STATs costituiscono, infatti, una famiglia di fattori di trascrizione citoplasmatici, che trasducono segnali attivati da citochine, come i membri della famiglia IL-6, ormoni e fattori di crescita, come EGF (Epidermal Growth Factor) e PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), mediando così una varietà di processi biologici (Fig. 11 A) (44, 45).

Sono stati identificati sette membri appartenenti alla famiglia STATs altamente conservati dal punto di vista strutturale: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6. Le proteine STATs condividono lo stesso arrangiamento dei domini strutturali: la regione N-terminale svolge un ruolo fondamentale nell'interazione tra monomeri STATs; il dominio coiled-coil è coinvolto nelle interazioni con altre proteine; la regione centrale contiene il

dominio di legame al DNA (DBD), seguito da un dominio SH2 (Src Homology domain 2), motivo strutturale comune tra molecole segnale, che media le interazioni proteina-proteina attraverso il legame diretto a specifici residui di tirosina fosforilati, ed il dominio di trans-attivazione, necessario per l'attività trascrizionale. Nel dominio di trans-attivazione C-terminale è presente, inoltre, un residuo di tirosina (Y) conservato, essenziale per la dimerizzazione e per l'attività di legame al DNA (Fig. 11 B) (42, 43).

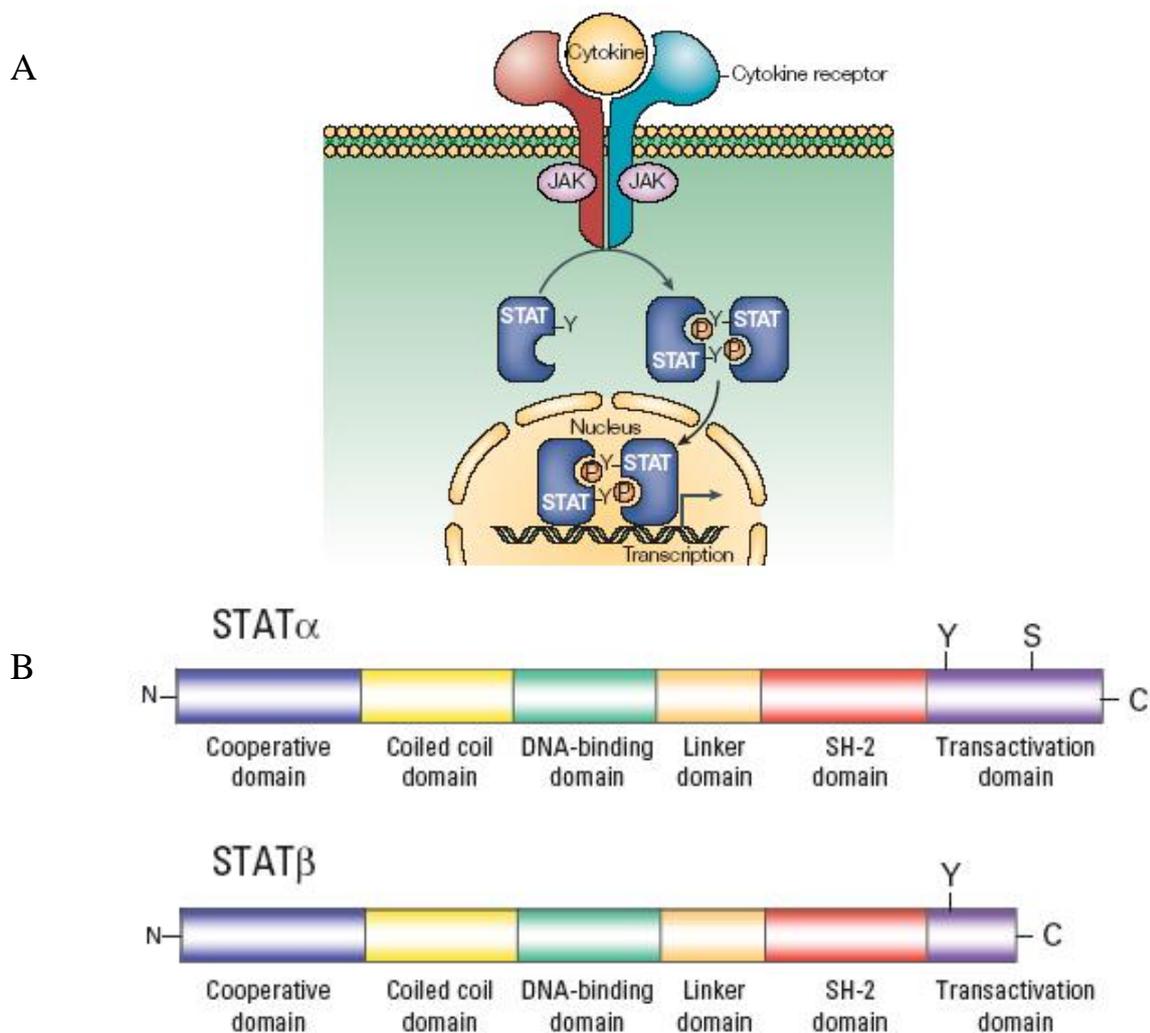


Figura 11: (A) Pathway JAK/STAT (Shuai K. et al, 2003); (B) Domini strutturali e funzionali delle molecole STATs (Benekli M. et al, 2009).

La fosforilazione di questo specifico residuo di tirosina attiva le proteine STATs, poiché ne modifica la conformazione e facilita l'interazione tra due monomeri STATs (43). In particolare, la fosforilazione della tirosina 705 di STAT3, mediata da JAK2, è coinvolta nella dimerizzazione di STAT3 e nella successiva traslocazione al nucleo, dove può interagire con il DNA (46). Sebbene le proteine STATs possano formare omodimeri o omotetrameri quando si trovano in un stato defosforilato, è la specifica conformazione dei dimeri che presentano i residui di tirosina fosforilati che permette a tali proteine di legare le proprie sequenze consensus presenti a livello dei geni target (43).

Inoltre, la fosforilazione di un residuo di serina (Ser727), presente nel dominio di trans-attivazione di alcuni membri della famiglia STATs, in particolare STAT1 e STAT3, incrementa l'attivazione trascrizionale, poiché facilita interazioni favorevoli tra STATs e co-attivatori (42).

Esistono diverse isoforme di proteine STATs, generate mediante splicing alternativo del messaggero o processamento proteolitico. Ad esempio, la proteina STAT3 funzionalmente attiva è nota come STAT α ed è la forma full-length; la forma mancante del dominio di trans-attivazione nella regione C-terminale, nota come STAT β , funge da dominante negativo, esplicando un effetto competitivo su STAT α e bloccandone quindi l'attività; la forma nota come STAT γ manca dei residui di tirosina dalla posizione amminoacidica 699 alla posizione 705, ed è funzionalmente inattiva. Esiste, infine, la forma STAT δ , di cui però non si conoscono le caratteristiche. Le differenti

isoforme non presentano la medesima attività trascrizionale, suggerendo che sia l'equilibrio tra di esse a determinare risposte biologiche differenti (Tab. 3) (44).

Isoform	Description	Molecular Weight (kDa)
STAT3 α	Full length	92
STAT3 β	Truncated COOH-terminal transactivation domain; functionally distinct, either dominant negative or altered binding	83
STAT3 γ	Missing tyrosine residue; able to bind to the remaining SH-2 domain, but functionally inactive	72
STAT3 δ	Unknown	64

Abbreviation: STAT, signal transducer and activator of transcription; COOH, carboxy; SH-2, Schmidt-Ruppin A-2 viral oncogene homolog-homology 2.

Tabella 3: Isoforme di STAT3 (Benekli M. et al, 2009).

Il pathway di segnalazione mediato da STATs può essere innescato da differenti segnali. Il pathway identificato per primo e maggiormente studiato è quello attivato dal legame di una citochina al proprio recettore localizzato sulla superficie cellulare. I domini intracellulari della maggior parte dei recettori per citochine, come il recettore per l'IL-6 (Interleuchina-6), per l'IL-2 o il recettore per l'IFN (interferone), mancano dell'attività chinasi intrinseca, ma sono fisicamente associati a membri della famiglia di tirosin-chinasi citoplasmatiche JAKs (43).

La famiglia di chinasi JAKs è costituita da quattro membri, Jak1, Jak2, Jak3 e Tyk2, ciascuno dei quali può essere attivato da una varietà di recettori.

In seguito al legame del ligando, i recettori si aggregano e le proteine JAKs ad essi associate vengono attivate mediante auto-fosforilazione e, a loro volta, fosforilano residui di tirosina al livello della coda citoplasmatica dei recettori.

Tali residui di tirosina fosforilati servono come siti di attracco per il reclutamento dei monomeri STATs citoplasmatici inattivi, mediante l'interazione con i domini SH2 di STATs. La fosforilazione mediata da JAKs del residuo di tirosina conservato nei monomeri STATs legati al recettore, ne induce la dimerizzazione, mediante l'interazione di un residuo di tirosina fosforilato di una molecola con il dominio SH2 di un'altra. I dimeri attivi migrano così al nucleo, dove legano specifici elementi di risposta sul DNA presenti sui promotori di geni target, regolandone quindi l'espressione (43).

Un altro meccanismo di attivazione delle proteine STATs avviene in seguito al legame di ormoni, come l'angiotensina II, o di chemochine, come CCL5 (CC-chemokine Ligand 5), e CXCL12 (CXC-chemokine Ligand 12), a recettori associati alle proteine G, noti anche come recettori a sette eliche transmembrana. Anche in questo caso si ha l'attivazione di STATs JAK-dipendente. Inoltre, le proteine STATs possono essere fosforilate direttamente dai recettori per i fattori di crescita, come i recettori per l'EGF ed il PDGF, che, a differenza dei recettori per citochine o chemochine, sono dotati attività chinastica intrinseca. Infine, oltre alle chinasi JAKs ed ai recettori per i fattori di crescita, altre chinasi

citoplasmatiche non recettoriali, come Src ed Abl, possono fosforilare le proteine STAT (43).

Numerosi studi suggeriscono, inoltre, che membri della famiglia di MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), incluse le ERKs (Extracellular signal-Regulated Kinases), JNK (c-Jun N-terminal Kinase), e p38, partecipano alla fosforilazione su serina di STAT1 e STAT3 (42).

Quindi, a seconda del recettore coinvolto e del contesto cellulare, diverse tirosin-chinasi possono essere coinvolte nell'attivazione del pathway mediato da STATs. Dopo il legame del ligando, le proteine STATs si accumulano rapidamente nel nucleo, dove possono regolare la trascrizione dei geni targets (Fig.12).

Il processo di traslocazione nucleare, che avviene grazie all'intervento di proteine di trasporto, come importine ed esportine, sembra essere dipendente dalla fosforilazione: le proteine STATs attive entrano nel nucleo più rapidamente rispetto a quelle non fosforilate. Le proteine STATs, defosforilate da fosfatasi nucleari come TC45, vengono attivamente esportate fuori dal nucleo. Il trasporto nucleare e la permanenza delle STATs all'interno del nucleo rappresentano anch'essi dei meccanismi di regolazione (44).

L'attività trascrizionale delle proteine STATs è, inoltre, strettamente regolata da un complesso insieme di meccanismi, come modifiche post-traduzionali, tra le quali ubiquitinazione, ISGylation (coniugazione con Interferon-Stimulated Gene

15), sumoilazione, metilazione ed acetilazione, e da molecole endogene inibitrici, come le proteine SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling), le proteine PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) e le tirosin-fosfatasi PTP (Protein Tyrosine Phosphatases) (44, 45, 47).

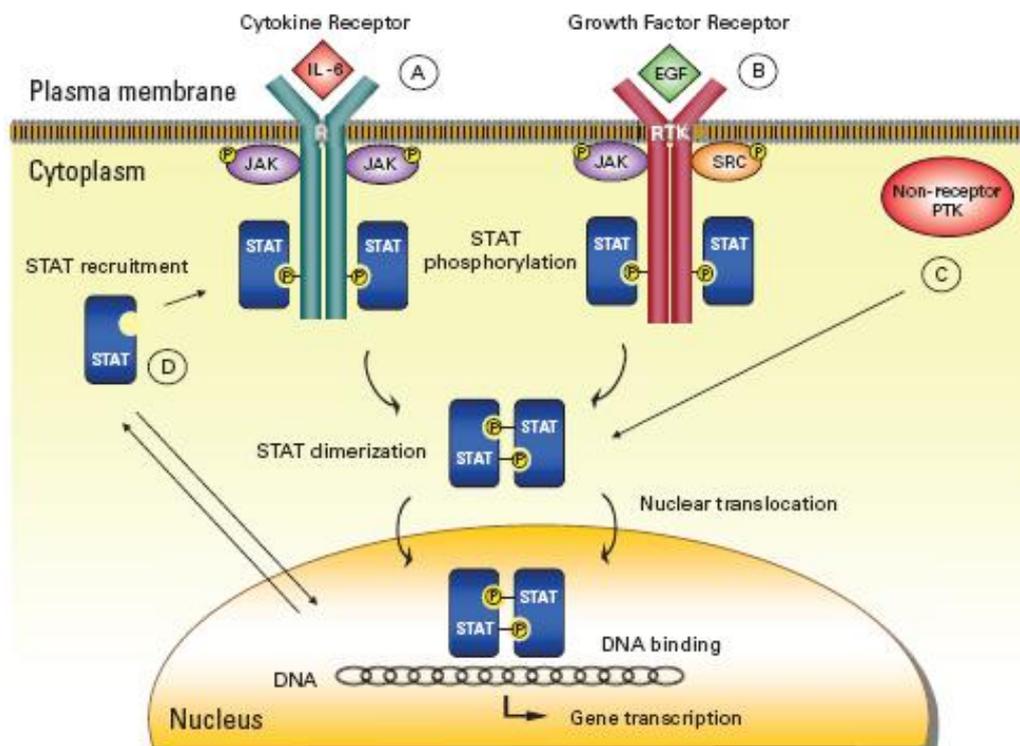


Figura 12: Meccanismi di attivazione del pathway di segnalazione mediato dalle proteine STATs (Benekli M. et al, 2009).

Ruolo delle proteine STATs nel cancro

I processi di trasduzione del segnale prevedono la trasmissione di uno stimolo dalla superficie cellulare al nucleo, portando all'attivazione di specifici programmi genetici, che permettono alla cellula di rispondere in maniera appropriata allo stimolo. In cellule normali, tali meccanismi di trasduzione del segnale sono strettamente controllati per impedire un'espressione genica deregolata e, quindi, risposte biologiche inappropriate.

È stato ampiamente dimostrato che la deregolazione del pathway di segnalazione mediato da STATs gioca un ruolo chiaro nell'oncogenesi; infatti, poiché tale proteine regolano direttamente l'espressione genica, la loro attivazione costitutiva porta ad alterazioni permanenti del programma genetico, contribuendo alla trasformazione maligna, promuovendo la progressione del ciclo cellulare e la sopravvivenza cellulare (41, 42). L'inibizione dell'attività aberrante di STATs risulta nell'arresto della progressione tumorale e nell'attivazione di morte per apoptosi (48).

I geni target regolati dalle proteine STATs sono implicati nel controllo della progressione del ciclo cellulare e dell'apoptosi: oltre al ruolo negativo esercitato sull'espressione di p53 e FAS, le proteine STATs sono coinvolte nel controllo positivo di geni come cyclin D1/D2, MYC, membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2, come Bcl-x (B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)/lymphoma), e Mcl-1 (Myeloid cell leukemia sequence-1) (50). Sia

STAT1 che STAT3 regolano l'espressione di p21^{WAF1/CIP1}, il cui incremento è generalmente associato con il blocco del ciclo cellulare (46, 48, 49). Ciononostante, numerosi studi hanno riportato la presenza di elevati livelli di p21^{WAF1/CIP1} in numerose forme tumorali umane e ciò è probabilmente dovuto al duplice ruolo di p21^{WAF1/CIP1} che, oltre ad indurre blocco del ciclo cellulare, facilita anche l'assemblaggio dei complessi ciclina D1/CDK. È stato anche dimostrato che STAT3 può mediare l'inibizione di p53, legandosi al promotore del suo gene e che può regolare l'espressione di AKT, che a sua volta regola processi di sopravvivenza e resistenza ai chemioterapici. Infine, STAT3 costitutivamente attivo stimola l'espressione di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), regolando in tal modo anche l'angiogenesi (44).

Sembra dunque chiaro che le proteine STATs, ed in particolare STAT3, regolino l'espressione di numerosi geni che possono contribuire all'oncogenesi mediante meccanismi che includono promozione della progressione del ciclo cellulare ed inibizione dell'apoptosi (Fig. 13).

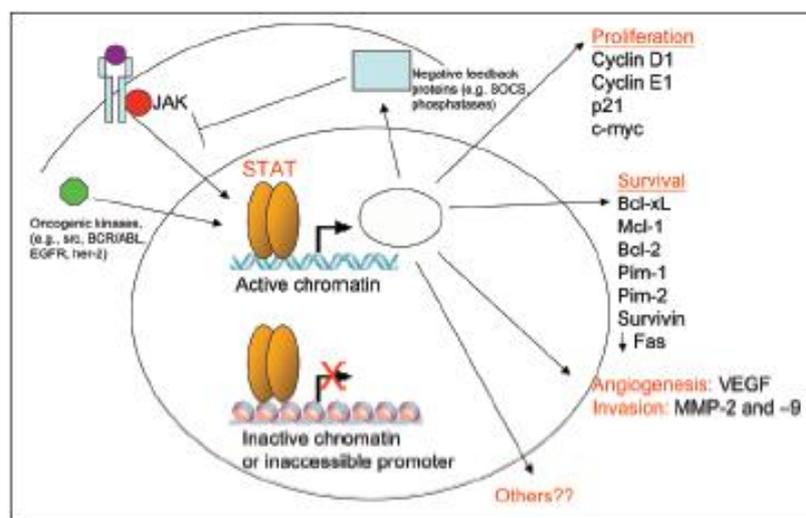


Figura 13: Geni target del pathway mediato da JAK/STATs (Alvarez J.V. et al, 2004).

OBIETTIVO DELLA TESI

Nei laboratori della Sezione di Scienze Biochimiche del Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNec) di Palermo, dove ho sviluppato questa tesi, da tempo si studiano i meccanismi apoptotici in cellule tumorali in coltura. Le ricerche sono mirate all'impiego di composti capaci di avviare il processo di morte cellulare programmata in modo selettivo, con l'obiettivo di valutare i pathways attivati nelle diverse linee cellulari e di individuare eventuali sistemi di difesa di cui possono servirsi i vari tipi tumorali per resistere all'induzione di morte (52-64). La ricerca è condotta su diverse linee cellulari di tumori umani, come l'epatocarcinoma, l'osteosarcoma, il tumore mammario, il tumore del colon retto, il melanoma ed il retinoblastoma.

Negli ultimi anni, particolare attenzione è stata rivolta all'utilizzo di diversi tipi di composti che, impiegati singolarmente a basse dosi, si sono rivelati inefficaci, ma che hanno determinato un effetto apoptotico sinergico quando usati in combinazione nelle cellule tumorali. In particolare, è stata dimostrata un'interazione apoptotica sinergica tra l'inibitore del proteasoma bortezomib e l'inibitore delle deacetilasi istoniche SAHA (64), e tra il ricombinante umano TRAIL ed il SAHA, in cellule di epatocarcinoma umano (31).

Gli studi condotti e riportati in questa tesi sono stati eseguiti utilizzando come modello sperimentale tre linee cellulari di epatocarcinoma umano (HCC), resistenti all'apoptosi mediata da TRAIL.

Numerosi studi hanno dimostrato che il partenolide è in grado di indurre morte cellulare in diverse linee tumorali, determinando invece effetti tossici modesti in cellule non cancerose, e che esso è anche in grado di sensibilizzare cellule di mieloma multiplo, di carcinoma mammario e di glioblastoma all'apoptosi indotta da TRAIL (34, 39).

Alla luce di queste osservazioni, lo studio riportato in questa tesi si è proposto di valutare la capacità del partenolide di sensibilizzare le cellule di HCC all'apoptosi indotta da TRAIL, nonché di identificare i possibili meccanismi molecolari implicati in tale interazione.

MATERIALI E METODI

Condizioni di coltura

Le cellule HepG2 sono state acquistate presso l'“Istituto Scientifico Tumori” (Genova, Italia), le cellule Hep3B ed SK-Hep1 presso l'“European Collection of Animal Cell Cultures” (ECACC, Health Protection Agency, Porton Down, Wiltshire, UK). Le linee cellulari di epatocarcinoma umano (HCC) HepG2, Hep3B ed SK-Hep1 sono state mantenute in coltura in fiasche da 75 cm² in terreno di coltura RPMI-1640 arricchito con siero bovino fetale (FBS) al 10% e inattivato al calore (56°C per 30 minuti), antibiotico/anti-micotico (penicillina-streptomicina) all'1% e glutammina 2mM. Inoltre, alle cellule HepG2 è stato aggiunto sodio piruvato 1mM, mentre alle cellule Hep3B amminoacidi non essenziali (NEAA). Tutte le cellule di HCC crescono in monostrato, adese al substrato in polistirene delle fiasche.

Le cellule HepG2 sono caratterizzate dalla presenza della proteina Rb iperfosforilata, un basso livello della proteina Bcl-2 e un'alterazione del gene della β -catenina, in particolare una delezione degli esoni 3-4 (62, 65, 66). Le cellule Hep3B sono invece caratterizzate dalla delezione genica di due importanti oncosoppressori p53 e Rb (67), presentano integrato nel proprio DNA il genoma del virus HBV e, come le cellule HepG2, presentano bassi livelli del fattore anti-apoptotico Bcl-2. Per quanto riguarda le cellule SK-Hep1, in letteratura non è riportata alcuna alterazione molecolare.

Gli epatociti primari umani (PHH) sono stati acquistati presso la “Cambrex Bio Science” (Walkersville, MD) e fatti crescere in monostrato su piastre da 6 pozzetti ($1,5 \times 10^6$ cellule/2 ml di terreno di coltura) rivestite di collagene di tipo I, come suggerito dalla ditta fornitrice. Tutte le cellule impiegate in questo studio sono mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C , con un’atmosfera costituita dal 95% di aria e dal 5% di anidride carbonica.

Per studiare gli effetti dei composti, le cellule, dopo distacco con tripsina-EDTA (2,5 mg/ml di tripsina; 1 mg/ml EDTA), sono state seminate o su capsule Petri ($2,5 \times 10^6$ cellule/6 ml di terreno di coltura) o su piastre da 6 pozzetti (2×10^5 cellule/2 ml di terreno di coltura) o da 96 pozzetti (1×10^4 cellule/200 μl di terreno di coltura). Dopo il piastramento, le cellule sono state fatte aderire al supporto per circa 24 ore ed in seguito sono state trattate con i composti. Per ogni esperimento è stata riportata una prova controllo, che si riferisce a cellule trattate con il solo veicolo con cui è stato solubilizzato il composto preso in esame.

Composti chimici e reagenti

Il TRAIL ricombinante umano solubile TRAIL/APO2L, contenente i residui amminoacidici da 114 a 281 del TRAIL naturale, è stato acquistato presso la ditta “Peprotech” (EC Ltd., Londra, UK). TRAIL è stato solubilizzato in acqua

distillata sterile in modo da realizzare una soluzione di 0,5 mg/ml e quindi diluito alla concentrazione finale di 25 ng/ml nel terreno di coltura.

Il partenolide, acquistato presso la ditta "Sigma-Aldrich" (Milano, Italia), è stato solubilizzato in dimetilsulfossido (DMSO) e diluito alla concentrazione finale di 15 μ M nel terreno di coltura.

La concentrazione finale di DMSO non ha mai ecceduto lo 0,04%, concentrazione oltre la quale il DMSO risulta essere tossico per le cellule di HCC.

L'inibitore generale delle caspasi z-VAD-fmk (benzyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketone) è stato acquistato presso la ditta "Promega Spa" (Milano, Italia) ed è stato impiegato alla concentrazione di 100 μ M.

Tutti gli altri composti chimici utilizzati in questa tesi sono stati acquistati presso la ditta "Sigma" (St. Louis, MO).

Valutazione della morfologia cellulare mediante microscopia a fluorescenza dopo colorazione con Hoechst 33258, arancio di acridina ed etidio bromuro

La morfologia apoptotica è stata messa in evidenza mediante osservazione al microscopio a fluorescenza, dopo colorazione delle cellule con fluorocromi che intercalano gli acidi nucleici (Hoechst 33258, arancio di acridina/etidio

bromuro). L'Hoechst 33258 è stato utilizzato come fluorocromo per evidenziare le modifiche della cromatina tipiche del processo apoptotico. Tale colorante viene eccitato ad una lunghezza d'onda di 360 nm ed emette a 490-500 nm. Le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti e trattate, dopo 24 ore dalla semina, con partenolide e TRAIL alle concentrazioni e ai tempi stabiliti. Al termine dell'incubazione con i composti, le cellule sono state fissate aggiungendo in ogni pozzetto 30 µl di una soluzione di metanolo e acido acetico (in rapporto 3:1) e l'incubazione è stata protratta per 10 minuti a temperatura ambiente. Al termine, dopo allontanamento del fissativo e lavaggi con PBS (Phosphate Buffered Saline), sono stati aggiunti 30 µl della soluzione Hoechst 33258 (0,1 µg/ml di PBS) per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, sono stati effettuati due lavaggi con PBS per asportare il fluorocromo in eccesso e sono stati aggiunti 20 µl di una soluzione mista di PBS e glicerolo (in rapporto di 1:1). L'osservazione al microscopio a fluorescenza evidenzia immagini di cellule con nuclei di colore blu che, nelle cellule in apoptosi, presentano addensamenti di colore blu-brillante.

La morfologia apoptotica è stata, inoltre, studiata colorando le cellule con una soluzione di arancio di acridina ed etidio bromuro in PBS, alla concentrazione finale di 100µg/ml per ogni colorante. Anche in questo caso, le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti e trattate, dopo 24 ore dalla semina, con partenolide e TRAIL alle concentrazioni e ai tempi stabiliti. Al termine dell'incubazione con i composti, le cellule sono state lavate con PBS, trattate

con la soluzione contenente arancio di acridina ed etidio bromuro per circa 1 minuto, la soluzione colorante è stata allontanata e le cellule sono state osservate immediatamente al microscopio a fluorescenza.

L'arancio di acridina è in grado di permeare all'interno delle cellule vitali colorando il DNA in verde e l'RNA in rosso; l'etidio bromuro, invece, non è in grado di attraversare le membrane cellulari, riuscendo così a colorare di rosso DNA ed RNA delle cellule quasi o interamente danneggiate e non vitali.

Utilizzando i due fluorocromi simultaneamente è possibile distinguere:

1. cellule vive con nuclei integri, diffusamente colorate in verde;
2. cellule vitali con nuclei apoptotici, che si presentano con macchie di colore verde intenso tipiche degli addensamenti cromatinici;
3. cellule morte con nuclei non apoptotici, intensamente colorate di rosso;
4. cellule morte con nuclei apoptotici, con macchie variamente colorate in rosso e verde con tipici addensamenti cromatinici.

Per l'osservazione morfologica dei preparati cellulari è stato impiegato un microscopio a fluorescenza Leica DM IRB con telecamera DC 300F (software Leica Q-Fluoro).

Analisi del ciclo cellulare mediante valutazione citofluorimetrica

L'analisi del ciclo cellulare è stata condotta mediante citometria a flusso, come precedentemente riportato (64), utilizzando un citofluorimetro Beckman Coulter

Epics XL. Tale tecnica sfrutta la fluorescenza emessa dallo Ioduro di Propidio (IP), molecola che intercala le basi del DNA. La fluorescenza emessa dal campione viene posta, secondo una scala crescente, sull'asse delle ascisse del diagramma, mentre in ordinata viene riportato il numero degli eventi. Nell'ambito di tale diagramma è possibile distinguere quattro zone che corrispondono alle diverse fasi del ciclo cellulare. Nel caso di cellule controllo la maggior parte della popolazione ha un contenuto di DNA diploide e tale zona del diagramma viene indicata come G0/G1. Le cellule che hanno duplicato il loro DNA, che quindi hanno un corredo tetraploide, emetteranno una fluorescenza doppia rispetto a quelle della zona G0/G1 e si troveranno, pertanto, nella fase G2/M del ciclo cellulare. Tra le due zone appena descritte vi è la fase S, in cui le cellule stanno replicando il loro genoma, pertanto l'entità della fluorescenza emessa sarà intermedia tra quella della zona G0/G1 e quella della zona G2/M. Infine, l'ultima zona che possiamo distinguere è la zona preG0/G1, o subG0/G1, detta così perché si trova prima della zona G0/G1, dove sono confinate le cellule con DNA frammentato che emettono una fluorescenza inferiore rispetto a quella emessa in tutte le altre condizioni. Questa tecnica permette di apprezzare la variazione di distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare in seguito al trattamento con vari composti. Se un composto induce frammentazione del DNA, si osserverà la comparsa, o l'incremento, del picco preG0/G1, la cui intensità sarà proporzionale alla quantità di DNA frammentato, presumibilmente correlato a morte cellulare.

Per questo tipo di analisi le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti e trattate, dopo 24 ore dalla semina, con partenolide e TRAIL alle concentrazioni e ai tempi stabiliti. Le cellule sono state quindi prelevate, lavate in PBS, centrifugate a 800 g e risospese in una soluzione ipotonica contenente il fluorocromo (IP 50 µg/ml, citrato di sodio 0.1%, Nonidet-P40 0,1%, RNAsi A 100µg/ml) ed incubate per 2 ore al buio alla temperatura di 4 °C. Dopo un successivo lavaggio, le cellule sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica. Tutti i dati sono stati elaborati con il software Expo 32 in dotazione allo strumento.

Studio dell'apoptosi con annessina V-FITC

Il saggio dell'annexina V-FITC consente di valutare alterazioni a carico della membrana che si accompagnano al processo di morte cellulare per apoptosi. Nelle cellule che vanno incontro a morte per apoptosi, un fosfolipide di membrana, la fosfatidil-serina (PS), trasloca dalla porzione interna della membrana plasmatica a quella esterna, diventando così esposta all'ambiente extracellulare. L'annexina V può essere coniugata a fluorocromi come il FITC (Fluorescein IsoThioCyanate), e il complesso che ne deriva mantiene la sua affinità per la PS, venendo quindi utilizzato come marcatore sensibile per l'analisi citofluorimetrica delle cellule che vanno incontro ad apoptosi.

L'annessina V-FITC viene generalmente utilizzata insieme ad un agente intercalante il DNA, lo Ioduro di Propidio (IP), per determinare le varie fasi che portano all'apoptosi e per discriminare le cellule morte per apoptosi dalle cellule morte per necrosi. Osservando la positività o meno all'annessina V-FITC ed allo IP possiamo determinare:

- a) cellule vitali: negative alla colorazione con annessina V-FITC e IP;
- b) cellule in apoptosi precoce: positive alla colorazione con annessina V-FITC e negative allo ioduro di propidio;
- c) cellule morte in apoptosi tardiva o necrotiche: positive alla colorazione sia con annessina V-FITC che allo ioduro di propidio.

Le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti e trattate, dopo 24 ore dalla semina, con partenolide e TRAIL alle concentrazioni e ai tempi stabiliti. Al termine dell'incubazione con i composti, le cellule sono state prelevate, lavate con PBS, risospese in una soluzione di binding buffer 1X in cui sono stati aggiunti 5 μ l di annessina V-FITC e 5 μ l di IP, incubate al buio per 15 min a temperatura ambiente e quindi analizzate al citofluorimetro entro un'ora.

L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata con l'uso di un citofluorimetro FACScan (Beckman Coulter Epics XL), tutti i dati ottenuti sono stati elaborati con il software Expo32.

I dati riportati nei risultati di questa tesi sono stati ottenuti con l'impiego del kit "Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I" (BD Pharmingen™).

Per valutare gli effetti sinergici espliciti dalle combinazioni dei composti partenolide e TRAIL impiegati in tale studio, è stato utilizzato il metodo dell'effetto mediano descritto da Chou e Talalay (68). In questi esperimenti è stato valutato, mediante il saggio dell'annessina V-FITC, l'effetto dose-dipendente per ogni composto, utilizzato da solo o in combinazione, mantenendo tra i due un rapporto costante. È stato poi calcolato l'indice di combinazione (CI): secondo il metodo di Chou e Talalay, se tale valore è minore, uguale o maggiore di 1 si parla rispettivamente di effetto sinergico, additivo o antagonista esercitato dalla combinazione dei composti impiegati.

Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale

Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato mediante l'uso del catione lipofilo 3,3-dihexyloxacarbo-cyanine (DiOC_6). Questo catione è un composto fluorescente che attraversa la membrana del mitocondrio grazie alla sua natura lipofila e si accumula nella matrice mitocondriale tanto più rapidamente quanto più alta è la differenza di potenziale della membrana mitocondriale. Dopo l'incubazione con le droghe, le cellule sono state prelevate, incubate a 37°C con la soluzione di DiOC_6 40 nM per 30 minuti, lavate due volte con PBS e quindi analizzate mediante citofluorimetro (Beckam Coulter Epics XL) con una eccitazione a 488 nm e una emissione a 525 nm. I dati sono stati elaborati mediante il software Expo 32. Nelle cellule in cui si verifica una

riduzione del potenziale di membrana mitocondriale, il composto cationico entra in misura ridotta rispetto alle cellule in cui vi è un potenziale di membrana inalterato. Pertanto, le cellule con una riduzione del potenziale di membrana presentano una minore fluorescenza rispetto alle cellule con potenziale integro. Come controllo positivo per una dissipazione totale del potenziale di membrana mitocondriale è stato impiegato il protonoforo Arbonilcyanine m-clorofenilidrazone (CCCP) alla concentrazione 50 μM (dato non riportato).

Preparazione degli estratti cellulari e separazione delle proteine tramite SDS-PAGE

Le cellule sono state piastrate in capsule Petri e trattate, dopo 24 ore dalla semina, con partenolide e TRAIL alle concentrazioni e ai tempi stabiliti. Al termine dell'incubazione con i composti, le cellule sono state staccate con tripsina-EDTA e centrifugate a 800 g per 8 minuti. Il pellet cellulare è stato risospeso in tampone dissociante RIPA buffer (150 $\mu\text{l}/10^6$ cellule) ed incubato in ghiaccio per 30 minuti. Il RIPA buffer è un tampone fosfato costituito da Nonidet P-40 1%, sodio deossicolato 0,5% ed SDS 0,1%. A questa soluzione vengono aggiunti gli inibitori delle proteasi (aprotinina 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PMSF 1mM, sodio ortovanadato 10 mM, sodio fluoruro 10 mM, sodio pirofosfato 0,2 mM,

leupeptina 25 µg/ml). Le cellule vengono quindi sonicate (3 volte per 10 secondi) ed il contenuto proteico dei singoli soprannatanti viene determinato mediante il metodo di Lowry (69). Quote contenenti le stesse quantità di proteine (30 µg), opportunamente diluite con il tampone di Laemli (Tris-HCl 50 mM, β-mercaptoetanololo 100 mM, SDS al 2%, blu di bromofenolo allo 0,1%, glicerolo al 10%, pH 6,8), dopo denaturazione per 5 min a 90 °C, vengono caricate su minigel di poliacrilammide, la cui concentrazione percentuale varia in rapporto al peso molecolare della proteina da separare. Successivamente il gel viene sottoposto a scorrimento elettroforetico a 150 V per circa 2 ore.

Western Blotting

Al termine dello scorrimento elettroforetico, le proteine vengono trasferite su un filtro di nitrocellulosa mediante elettroblotting (20 V overnight), in presenza di un tampone di trasferimento (glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS allo 0,037%, metanolo al 20%). Come controllo dell'avvenuto trasferimento e dell'uniformità della quantità di proteine caricate nei vari pozzetti, il filtro è stato sottoposto a colorazione con rosso Ponceau (dati non mostrati), un colorante reversibile delle proteine. Dopo una serie di lavaggi con tampone TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 allo 0,005%, pH 7,5), è stata aggiunta al filtro una soluzione di blocking (Albumina o latte solubilizzati in TBST a concentrazioni comprese tra 1 e 5 % in base al tipo di anticorpo

utilizzato), per schermare il filtro, riducendo così i legami aspecifici tra le proteine presenti sul filtro e l'anticorpo da impiegare nella successiva fase di detection.

Successivamente è stata aggiunta una soluzione contenente l'anticorpo primario specifico (1 µg/ml di TBST) overnight.

Dopo incubazione, il filtro è stato lavato tre volte con una soluzione di TBST ed incubato per 1 ora in TBST contenente l'anticorpo secondario (anti-IgG) coniugato con HRP (perossidasi di rafano) (1 µg/3 ml di TBST). Il rilevamento delle bande è stato effettuato attraverso il sistema ECL (Enhanced ChemiLuminescence), con l'utilizzo del kit "West Femto" della Pierce, (Rockford, IL) ed il segnale ottenuto tramite sviluppo in ECL è stato rilevato con il CHEMIDOC ed elaborato con l'utilizzo del software "Quantity One" della Bio-Rad (Hercules, CA).

In ogni esperimento è stata valutata la β -actina per mostrare l'omogeneità dei campioni proteici nelle diverse condizioni. Il controllo è rappresentato dalle cellule trattate con il solo veicolo.

Gli anticorpi primari impiegati per l'identificazione delle proteine c-FLIP, Bcl-X_L, Bcl-2, Bid e Bax sono stati acquistati presso la ditta "Santa Cruz Biotechnology" (St. Cruz, CA); l'anticorpo per la β -actina è stato acquistato presso la ditta "Sigma" (Saint Louis, Missouri, USA); gli anticorpi per le caspasi 3 e 8 sono stati acquistati presso la ditta "Cell Signaling Technology" (Beverly, MA); gli anticorpi per i recettori DR5 e DR4, sono stati acquistati presso la ditta

“ProSci Incorporated” (San Diego, CA). Infine, per la valutazione delle proteine STAT3, STAT5, STAT3 fosforilato e STAT5 fosforilato è stato impiegato il kit “STAT and phospho-STAT antibody sampler kit”, e per la valutazione delle proteine JAK1, JAK2, JAK1 fosforilato e JAK2 fosforilato è stato impiegato il kit “JAK isoform sampler kit”, entrambi prodotti dalla ditta “Cell Signaling Technology” (Beverly, MA).

Trasfezione con siRNA per STAT3

Le cellule di HCC sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti ed incubate a 37°C in terreno RPMI-1640 privo di antibiotico/antimicotico, con siero al 10%, fino al raggiungimento di circa il 60% di confluenza. Per ogni trasfezione sono state preparate due soluzioni: una soluzione contenente 92 µl di RPMI senza siero, in cui sono stati diluiti 8 µl (80 picomoli) di siRNA duplex; una soluzione contenente 94 µl di RPMI senza siero, in cui sono stati diluiti 6µl di metafectene Pro, l’agente trasfettante policationico. Le due soluzioni sono state quindi unite, miscelate delicatamente ed incubate a temperatura ambiente per 20 minuti, per permettere la formazione di complessi metafectene Pro-siRNA.

Prima della trasfezione le cellule sono state lavate 2 volte con PBS per rimuovere il siero fetale bovino, che interferisce con la trasfezione. L’incubazione con i complessi metafectene Pro-siRNA è stata effettuata per 5 ore a 37°C in terreno di coltura RPMI privo di siero. Dopo l’incubazione, il

terreno di coltura per la trasfezione è stato sostituito con RPMI contenente siero al 20% e le cellule sono state trattate con i composti, per i tempi e per le concentrazioni indicate nei risultati. Per valutare l'efficienza della trasfezione è stato impiegato un siRNA scramble, utilizzato come controllo, coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC), che non interferisce con nessun RNA messaggero cellulare; l'intensità della fluorescenza emessa dal fluorocromo, analizzata mediante microscopia a fluorescenza, è proporzionale alla quantità di siRNA che è penetrato all'interno della cellula mediante l'agente trasfettante (dati non mostrati).

Il siRNA specifico per STAT3, costituito da una miscela di oligonucleotidi a doppio filamento, ed il siRNA fluoresceinato utilizzato come controllo, sono stati acquistati presso la ditta "Santa Cruz Biotechnology" (St Cruz, CA); l'agente trasfettante metafecteneTM PRO, è stato acquistato presso la ditta "Biontex" (Martinsried/Planegg, GmbH).

Estrazione dell'RNA

L'espressione dei messaggeri codificanti le proteine di interesse è stata valutata mediante analisi di Real-Time PCR. Le cellule sono state seminate in capsule Petri e sottoposte a trattamento con i diversi composti. Ai tempi stabiliti, è stato allontanato il terreno di coltura e le cellule sono state staccate mediante cell scraper e lisate in presenza di un tampone di lisi contenente β -mercaptoetanololo,

prodotto dalla “Qiagen” (Valencia, CA). Il lisato così ottenuto, è stato fatto passare delicatamente attraverso l’ago di una siringa (7-8 volte) per la disgregazione meccanica del DNA. L’RNA totale è stato isolato utilizzando il kit “RNeasy mini kit”, prodotto dalla “Qiagen” (Valencia, CA), come precedentemente riportato (31).

Dopo l’estrazione, l’RNA è stato quantificato mediante lettura allo spettrofotometro, eseguita valutando l’assorbanza degli estratti nucleici ad una lunghezza d’onda di 260 nm e rapportandola al valore di 1 O.D. = 40 µg/ml di RNA. Dal rapporto di assorbanza 260/280nm si ottiene una stima del grado di purezza dell’RNA: quando tale rapporto mostra un intervallo di valori tra 1,8 e 2,1 allora l’RNA estratto risulta privo di contaminazioni. Tale valutazione è stata condotta leggendo 5µl di campione/ml di H₂O DNasi/RNasi free, e impiegando H₂O sterile per l’azzeramento.

Per valutare l’integrità del materiale estratto, 1 µg di RNA è stato sottoposto a scorrimento elettroforetico su gel di agaroso, in presenza di etidio bromuro (0,5 µg/ml). La corsa elettroforetica è stata condotta in Tris-acetato EDTA (TAE buffer) (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM, 520 µl di acido acetico glaciale) per 60 min a 100V.

L’integrità dell’RNA è stata accertata, al termine dello scorrimento, grazie all’identificazione delle bande relative agli RNA ribosomali (28S, 18S, 5.8S).

Dopo aver accertato l'integrità del materiale estratto, i campioni di RNA sono stati sottoposti a trattamento con DNasi RNase-free (Promega, Madison, WI) e successivamente alla fase di retrotrascrizione.

Retrotrascrizione e analisi di Real-Time PCR

A seguito del trattamento con DNasi, l'RNA messaggero è stato retrotrascritto in cDNA, dal quale è stato poi possibile amplificare i geni di interesse.

I preparati (1 µg di RNA), dopo aggiunta degli oligo-dT, sono stati inattivati al termociclatore (Perkin ELMER GenAmp PCR System 2400) per 10 minuti alla temperatura di 65°C ed immediatamente trasferiti in ghiaccio. A ciascun campione è stata, quindi, aggiunta la Master Mix contenente MgCl₂ 1,5mM, PCR Buffer II 1X, dGTP 1mM, dATP 1mM, dTTP 1mM, dCTP 1mM, inibitore dell'RNasi 1U/µl, retrotrascrittasi MuLV 2,5U/µl. Tutti i reagenti della Master Mix sono stati acquistati presso la ditta "Applied Biosystems" (Gene Amp PCR kit).

Per la retrotrascrizione sono state eseguite le seguenti fasi:

1. Retrotrascrizione: 60 minuti a 42°C
2. Denaturazione: 10 minuti a 99°C
3. Raffreddamento: 5 minuti a 5°C

Al termine si è proceduto con la fase di amplificazione.

Per la reazione di Real-Time PCR, per ogni campione di cDNA (5 µl) è stato impiegato il kit “IQ SYBR Green Supermix” (BioRad, Hercules, CA). I primers impiegati per ciascuna reazione di amplificazione sono stati disegnati impiegando il software “Beacon Designer 6.0”. Le sequenze sono riportate in Tab. 4.

I campioni preparati in triplicato sono stati posti nel termociclatore “iCycler IQ5 Real Time PCR Detection System” e sottoposti ad un ciclo iniziale di denaturazione di 95°C per 3 minuti e successivi 40 cicli di amplificazione di 95 °C per 10 secondi e di 55°C per 30 secondi.

La quantizzazione relativa dell’espressione genica, per ciascuno dei trascritti analizzati è stata condotta paragonando il ciclo soglia, (Ct, Threshold Cycle) e i valori sono stati normalizzati rispetto ai livelli della GAPDH, costitutivamente espressa.

I risultati sono stati analizzati impiegando il software “IQ5 Optical System Software” (BioRad).

GENE TARGET	TIPO DI PRIMER	SEQUENZA (5'-3')	DIMENSIONI (bp)	T DI ANNEALING (°C)
DR5	FORWARD	5'-GCACTCACTGGAATGACCTC-3'	20	°55
	REVERSE	5'-GCCTTCTTCGCACTGACAC-3'	19	
DR4	FORWARD	5'-CAGAACGTCCTGGAGCCTGTAAC-3'	23	°63
	REVERSE	5'-ATGTCCATTGCCTGATTCTTTGTG-3'	24	
GAPDH	FORWARD	5'-TGACATCAAGAAGGTGGTGA-3'	20	°55
	REVERSE	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	20	

Tabella 4: Sequenze dei primers impiegati per la reazione di amplificazione.

RISULTATI

Il trattamento con il partenolide sensibilizza le cellule di epatocarcinoma umano all'apoptosi indotta da TRAIL

Durante la fase iniziale di tale studio, l'attenzione è stata rivolta all'analisi degli effetti esercitati dal partenolide, da solo o in combinazione con una molecola ricombinante TRAIL, (Apo2L/TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), un ligando di morte appartenente alla famiglia del TNF, in diverse linee di epatocarcinoma umano (HCC) in coltura.

Studi condotti precedentemente presso la Sezione di Scienze Biochimiche del Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNec), hanno dimostrato che le cellule di HCC HepG2, Hep3B ed SK-Hep1 risultano resistenti al trattamento con TRAIL ricombinante (31).

Si è, pertanto, deciso di utilizzare il partenolide in associazione al ricombinante TRAIL, per stabilire se tale trattamento potesse sensibilizzare le cellule di HCC all'apoptosi indotta da tale ligando.

A tale scopo, sono state, dapprima, condotte analisi citofluorimetriche, mediante marcatura con lo ioduro di propidio (come riportato nei metodi di tale tesi), in modo da valutare la distribuzione lungo le fasi del ciclo cellulare delle cellule di HCC trattate per 24 ore con partenolide e ricombinante TRAIL, da soli e in associazione, a concentrazioni sub-tossiche (rispettivamente 15 μ M e 25 ng/ml) (Fig.14).

Come è noto, l'incremento del picco pre-G0/G1 indica l'aumento di cellule che presentano DNA frammentato e si può dunque correlare ad eventi di morte.

I risultati ottenuti mostrano che il trattamento con il solo TRAIL ricombinante non determina alcun effetto nelle tre linee cellulari analizzate. Il trattamento con il solo partenolide induce, invece, l'arresto in fase G2/M delle tre linee cellulari.

In particolare, dopo 24 ore di trattamento con partenolide 15 μM , in tutti e tre i casi, circa il 30-35% delle cellule si distribuiscono in fase G2/M.

I risultati mostrano chiaramente che il partenolide è in grado di sensibilizzare le cellule di HCC all'azione del ricombinante TRAIL. Infatti, quando le tre linee cellulari vengono trattate con la combinazione partenolide 15 μM /TRAIL 25 ng/ml, si osserva un notevole incremento del picco pre-G0/G1, che raggiunge circa il 60-70 % dopo 24 ore di trattamento (Fig.14).

Per valutare se l'effetto indotto dalla combinazione partenolide/TRAIL nelle cellule HCC fosse dipendente dall'azione delle caspasi, è stato impiegato l'inibitore generale delle caspasi z-VAD-fmk. È interessante osservare che gli effetti indotti dal trattamento combinato partenolide/TRAIL sono quasi del tutto prevenuti dall'aggiunta dello z-VAD 100 μM , indicando, quindi, che probabilmente la combinazione partenolide/TRAIL stimola un processo di morte caspasi-dipendente.

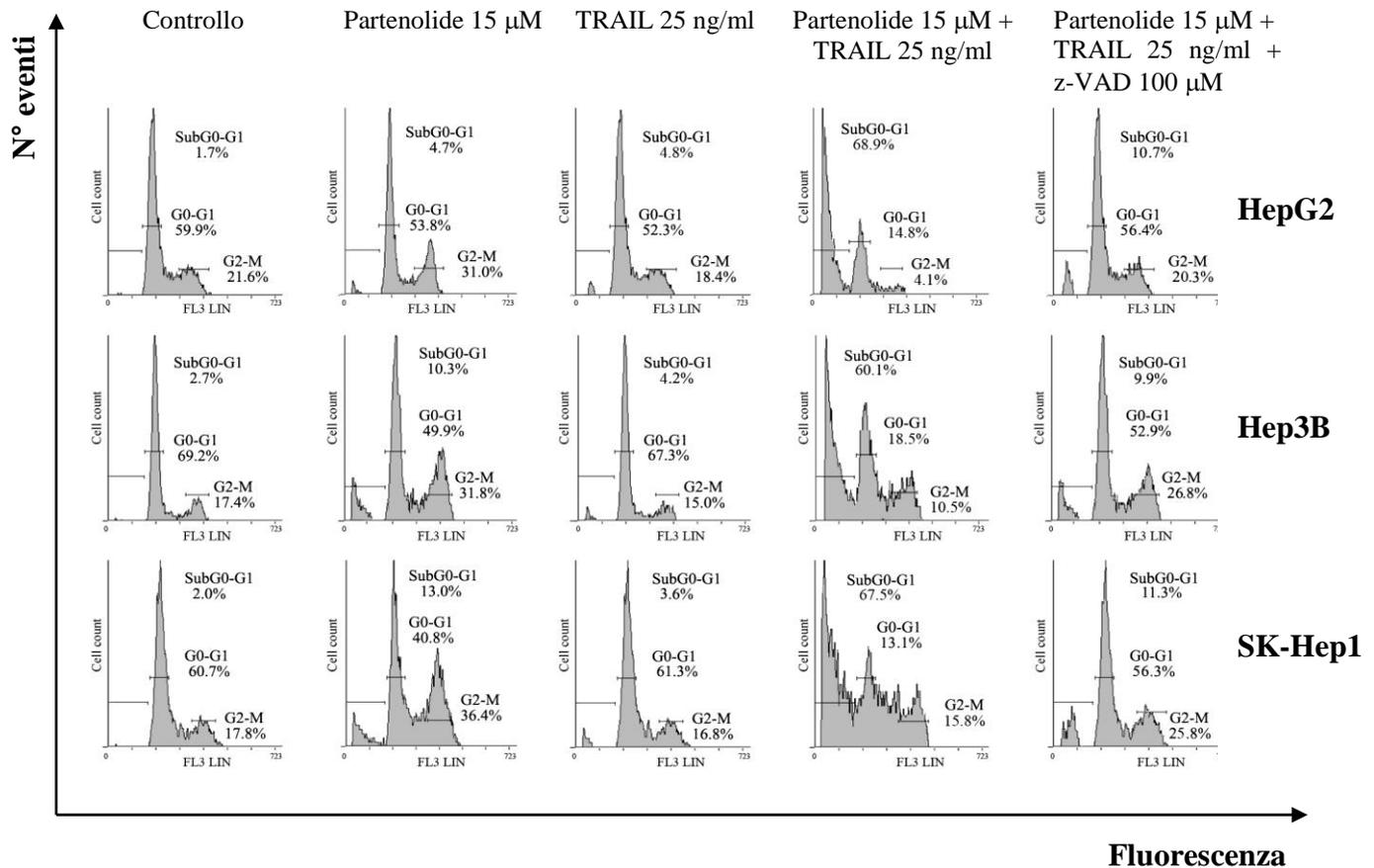


Figura 14: Il partenolide sensibilizza le cellule di HCC all'azione del ricombinante TRAIL. Analisi citofluorimetrica condotta mediante marcatura con lo ioduro di propidio. Le cellule HepG2, Hep3B, SK-Hep1 sono state trattate per 24 h con partenolide 15 μ M e TRAIL 25 ng/ml, usati da soli e in combinazione, in presenza o in assenza di z-VAD 100 μ M. Al termine del trattamento si è proceduto all'incubazione con ioduro di propidio, come indicato nei materiali e metodi. Sull'asse delle ascisse è riportata l'intensità della fluorescenza su scala lineare, sull'asse delle ordinate il numero degli eventi. I dati sono stati analizzati al citofluorimetro mediante il software EXPO 32.

Per stabilire se l'effetto indotto dal trattamento combinato partenolide/TRAIL potesse essere attribuibile ad un evento apoptotico, sono state condotte analisi morfologiche mediante microscopia a fluorescenza, impiegando le colorazioni con i fluorocromi Hoechst 33258 ed acridina orange/etidio bromuro, le quali rivelano lo stato di condensazione e frammentazione della cromatina tipico degli eventi apoptotici.

In particolare, la colorazione con Hoechst 33258, ha permesso di accertare che un numero considerevole di cellule HepG2, trattate con la combinazione partenolide/TRAIL per 24 ore, mostra condensazione e frammentazione della cromatina, mentre questo aspetto non si osserva quando le cellule sono trattate con le concentrazioni sub-tossiche dei singoli composti (partenolide 15 μ M o TRAIL 25 ng/ml) (Fig. 15 A). Le analisi morfologiche hanno mostrato chiari effetti apoptotici anche nelle cellule Hep3B ed Sk-Hep1 trattate con la combinazione partenolide/TRAIL.

Inoltre, l'impiego dei fluorocromi arancio di acridina ed etidio di bromuro ha permesso di distinguere (come descritto nei materiali e metodi) le cellule morte per apoptosi da quelle morte per necrosi.

Come mostrato in Fig. 15 B, le cellule controllo trattate con il solo veicolo e le cellule trattate con i singoli composti per 24 ore mostrano un colore verde diffuso per effetto dell'arancio di acridina.

Le cellule trattate con la combinazione partenolide/TRAIL presentano, invece, nuclei tipicamente apoptotici, con addensamenti verdi e rossi, indice della

penetrazione dell'etidio bromuro e dell'aumentata condensazione e frammentazione della cromatina (Fig. 15 B).

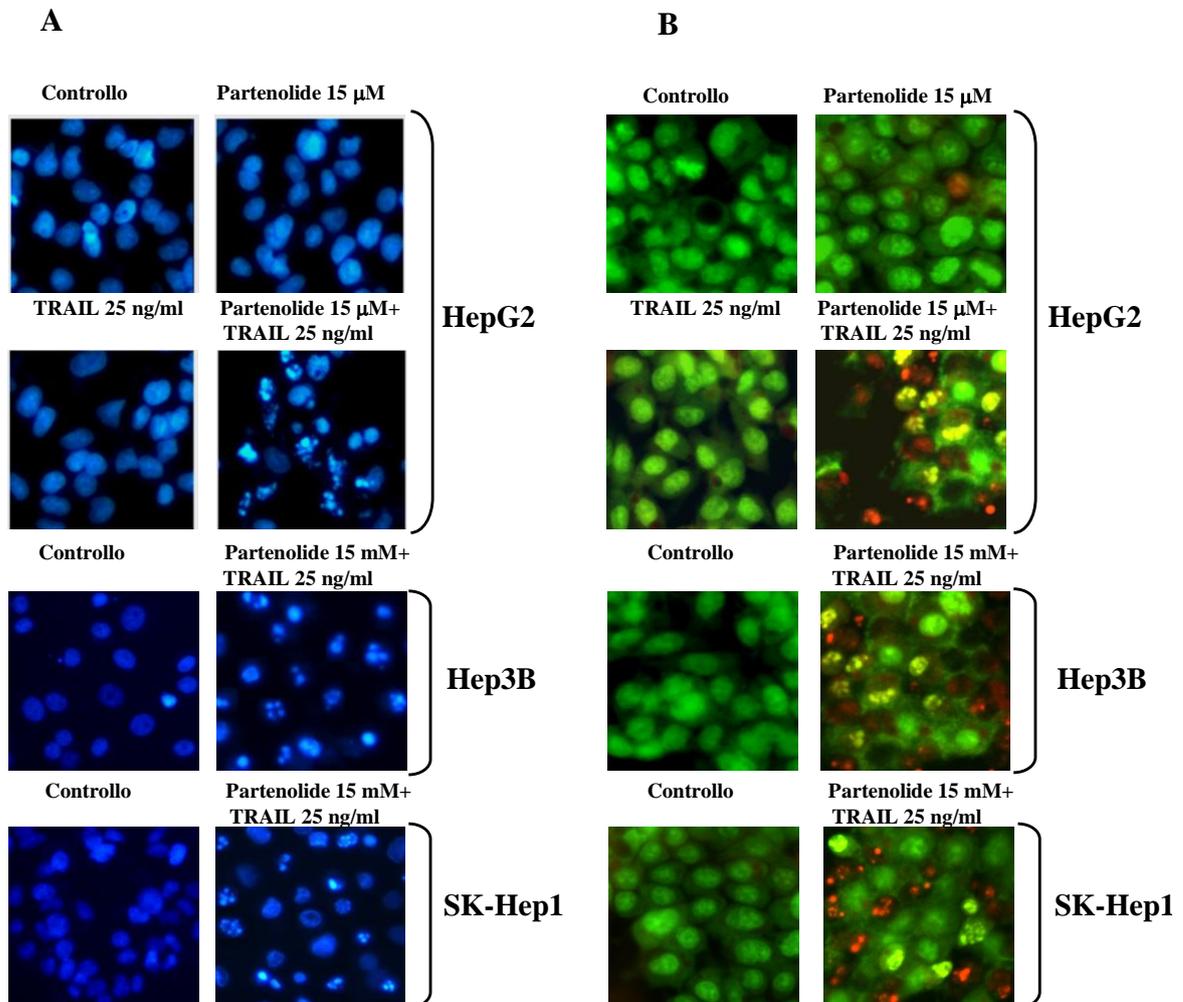


Figura 15: Effetto apoptotico esercitato da partenolide e TRAIL in cellule di HCC. Valutazione morfologica delle cellule HepG2, Hep3B ed SK-Hep1 mediante colorazione con Hoechst 33258 (A) e acridina orange/etidio bromuro (B). Le cellule sono state trattate per 24h con partenolide 15 μ M e TRAIL 25 ng/ml, da soli e in combinazione. L'effetto apoptotico indotto dal trattamento è stato osservato al microscopio a fluorescenza mediante colorazione con i fluorocromi Hoechst 33258 (A) e acridina orange/etidio bromuro (B), come riportato nei materiali e metodi. Per l'osservazione morfologica delle cellule è stato impiegato un microscopio a fluorescenza Leica DM IRB con telecamera DC 300F (software Leica QFluoro).

Per confermare l'effetto apoptotico indotto dalla combinazione partenolide/TRAIL sono state successivamente condotte analisi citofluorimetriche, impiegando il saggio dell'annessina V-ioduro di propidio. Tali esperimenti sono stati condotti a tempi diversi di trattamento (8-32 ore).

Come indicato nei materiali e metodi, tale tecnica consente di discriminare cellule morte per apoptosi da cellule morte per necrosi. In particolare, cellule negative alla colorazione con annessina V-FITC e ioduro di propidio sono cellule vitali; cellule positive alla colorazione con annessina V-FITC e negative allo ioduro di propidio sono cellule in apoptosi precoce; cellule positive alla colorazione sia con annessina V-FITC che con ioduro di propidio sono cellule morte in apoptosi tardiva o necrotiche.

In Fig. 16 viene riportata solo la percentuale di cellule positive all'annessina V e quindi in apoptosi precoce.

I risultati indicano che il trattamento con i singoli composti non determina effetti significativi sulla percentuale di cellule positive all'annessina V. La combinazione partenolide/TRAIL determina, invece, il marcato incremento della popolazione positiva all'annessina V, indice di eventi apoptotici, e tale percentuale aumenta all'aumentare del tempo di trattamento.

E' interessante notare inoltre che, contrariamente a quanto riscontrato nelle cellule di HCC, il trattamento con partenolide e TRAIL, sia da soli che in associazione, non induce alcun effetto tossico negli epatociti primari umani (PHH) impiegati come linea cellulare controllo non tumorale (Fig. 16).

I risultati fin qui ottenuti suggeriscono che il partenolide sensibilizza le cellule di epatocarcinoma umano alla via di TRAIL attivando morte per apoptosi.

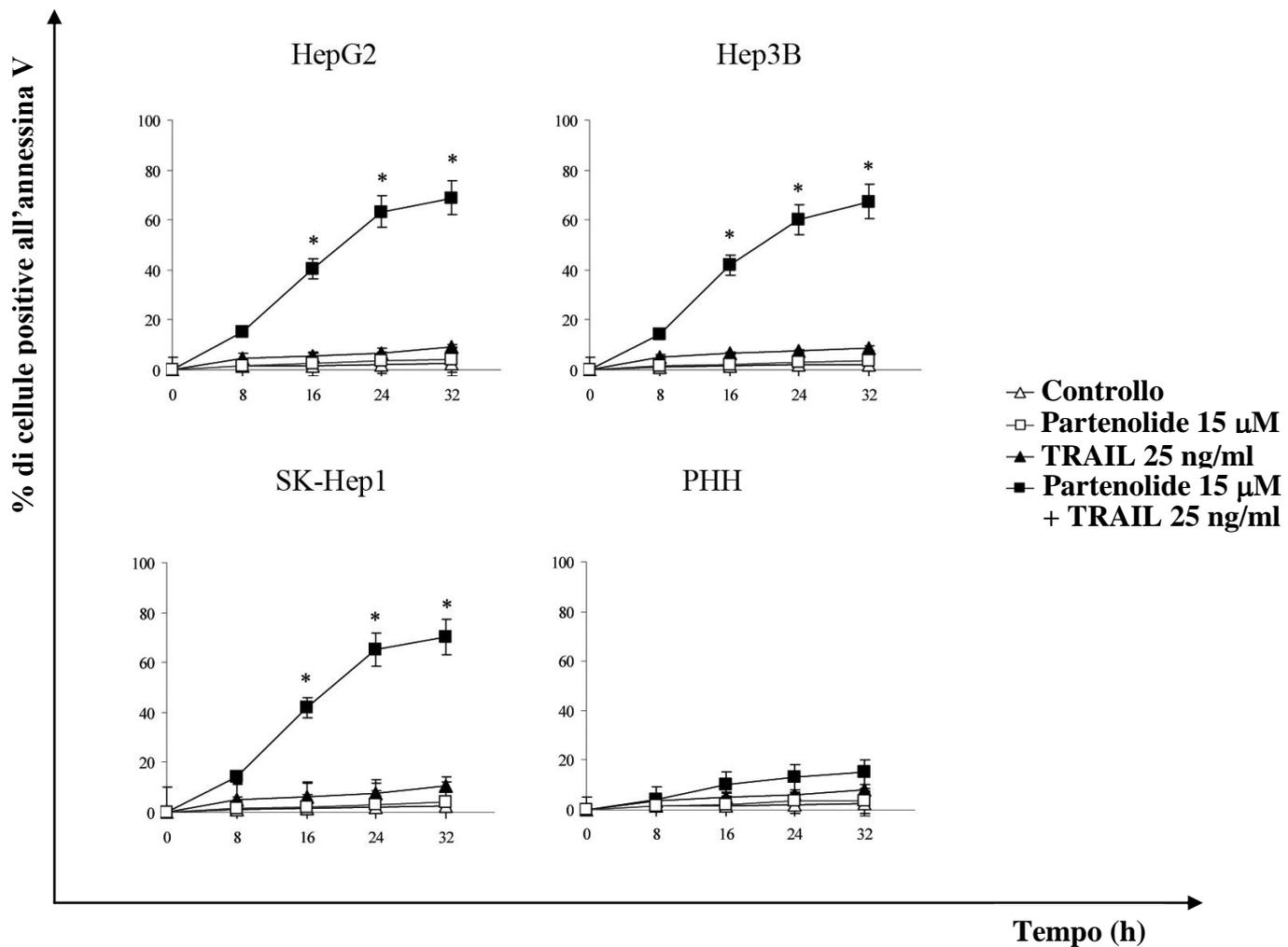


Figura 16: Tempo-dipendenza dell'effetto apoptotico indotto da partenolide e TRAIL. Le cellule HepG2, Hep3B, SK-Hep1 e PHH sono state trattate per tempi diversi (8-32 h) con partenolide 15 μM e TRAIL 25 ng/ml, da soli e in combinazione. Al termine del trattamento le cellule sono state analizzate mediante citometria a flusso, dopo colorazione con annessina V-FITC. L'asse delle ascisse rappresenta il tempo di trattamento e l'asse delle ordinate la percentuale di cellule apoptotiche positive all'annessina V. I valori sono la media ± SD di tre esperimenti condotti separatamente. *P<0.01 rispetto al solo TRAIL.

Per valutare l'esistenza di una possibile interazione sinergica tra partenolide e TRAIL, è stato impiegato il metodo matematico dell'effetto mediano descritto da Chou e Talalay (68). A tale scopo, le cellule HepG2, Hep3B ed Sk-Hep1 sono state co-trattate per 24 ore con combinazioni di varie concentrazioni sub-tossiche di partenolide e TRAIL, mantenendo costante il rapporto tra le concentrazioni impiegate.

Sono state quindi condotte analisi citofluorimetriche, mediante marcatura con annessina V-FITC/ioduro di propidio, per determinare la percentuale di cellule apoptotiche. All'aumentare delle concentrazioni impiegate per i singoli composti è possibile osservare solo un modesto incremento della percentuale di cellule apoptotiche, mentre combinando tra loro concentrazioni via via crescenti dei due composti aumenta in modo drammatico la frazione di cellule apoptotiche (Fig. 17 A).

I valori dell'indice di combinazione (CI) calcolati rispetto alla percentuale di cellule morte (fraction affected, Fa) mostra un'interazione sinergica tra partenolide e TRAIL. Infatti, i valori di CI ottenuti risultano inferiori a 1 nelle cellule HepG2 (Fig. 17 B), indice di effetto sinergico, così come in cellule Hep3B ed Sk-Hep1 (dati non mostrati).

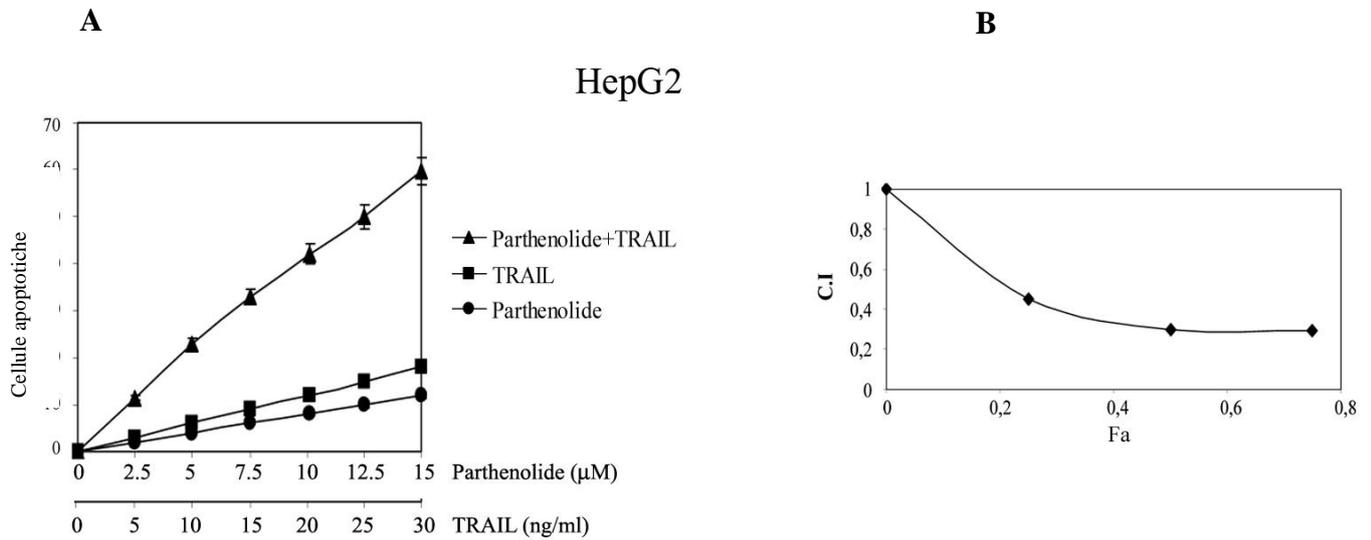


Figura 17: Effetto apoptotico indotto dal trattamento combinato con partenolide e TRAIL in cellule HepG2; analisi dell'effetto sinergico. Le cellule HepG2 sono state trattate per 24 h con concentrazioni crescenti di partenolide e TRAIL, mantenute in un rapporto costante. Le cellule positive all'annessina V, quantificate mediante analisi citofluorimetrica, indicano le cellule apoptotiche (A).

I dati sono stati analizzati secondo il metodo di Chou e Talalay (68) per calcolare l'indice di combinazione (CI) stimato in rapporto alla percentuale di cellule apoptotiche (fraction affected, Fa). I valori di CI minori di 1 indicano un'interazione sinergica tra i due composti (B). I valori riportati sono la media \pm SD di tre esperimenti condotti separatamente.

Effetto del partenolide sull'espressione dei recettori di morte in cellule di HCC

I risultati finora riportati indicano che il trattamento combinato partenolide/TRAIL è in grado di esplicare un potente effetto sinergico nell'induzione di apoptosi in tre linee cellulari di HCC umano. Al fine di individuare il meccanismo mediante il quale il partenolide è in grado di sensibilizzare le cellule di HCC al trattamento con TRAIL, l'attenzione è stata rivolta a proteine chiave del pathway apoptotico mediato da TRAIL ed in particolare sono stati analizzati i recettori di morte riconosciuti dal ricombinante TRAIL. Per quanto concerne tali recettori, è noto che TRAIL-R1 (DR4) e TRAIL-R2 (DR5) sono entrambi in grado di trasdurre il segnale di morte (14, 15).

Sono stati quindi valutati, mediante esperimenti di western blot, i livelli dei recettori di morte DR4 e DR5, dopo trattamento con partenolide 15 μ M e TRAIL 50 ng/ml.

È interessante notare che il partenolide, impiegato da solo, determina un marcato incremento dei livelli di DR5 in tutte e tre le linee cellulari di HCC, e dei livelli di DR4, effetto che risulta particolarmente evidente nelle cellule HepG2 ed SK-Hep1. Tale incremento si mantiene quando al partenolide viene aggiunto anche il ricombinante TRAIL (Fig. 18 A).

Per verificare che l'incremento del livello dei recettori di morte fosse dovuto alla loro aumentata espressione, è stata effettuata un'analisi di Real-Time PCR, volta a valutare i livelli dei messaggeri di DR4 e DR5.

Tale analisi ha confermato che i livelli dei messaggeri DR4 e DR5 incrementano, dopo trattamento per 8 e 16 ore, sia con il solo partenolide che con la combinazione partenolide/TRAIL in tutte e tre le linee cellulari (Fig. 18 B). Il trattamento con il solo TRAIL non determina invece alcun effetto sui livelli né delle proteine né dei messaggeri DR4 e DR5 (Fig. 18 A e B).

Il partenolide sembra dunque indurre l'espressione dei recettori per TRAIL e tale evento sembra essere precoce, poiché si manifesta già dopo tempi brevi di trattamento.

Il partenolide è probabilmente in grado di sensibilizzare le cellule di epatocarcinoma umano all'apoptosi indotta da TRAIL poiché incrementa i livelli dei recettori di morte DR4 e DR5.

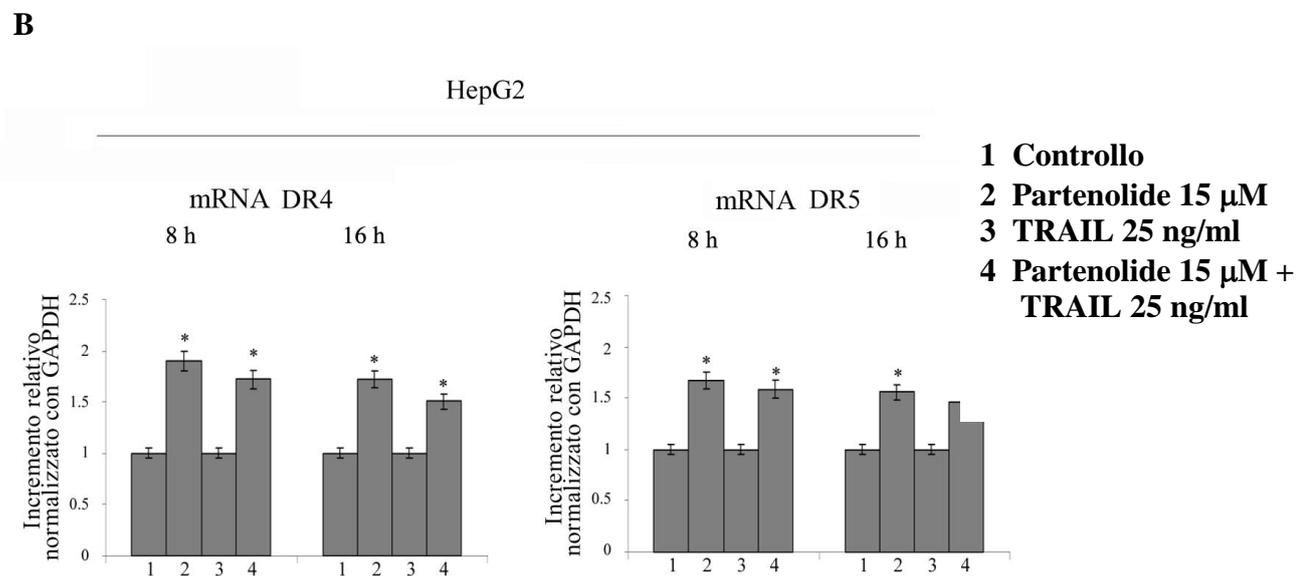
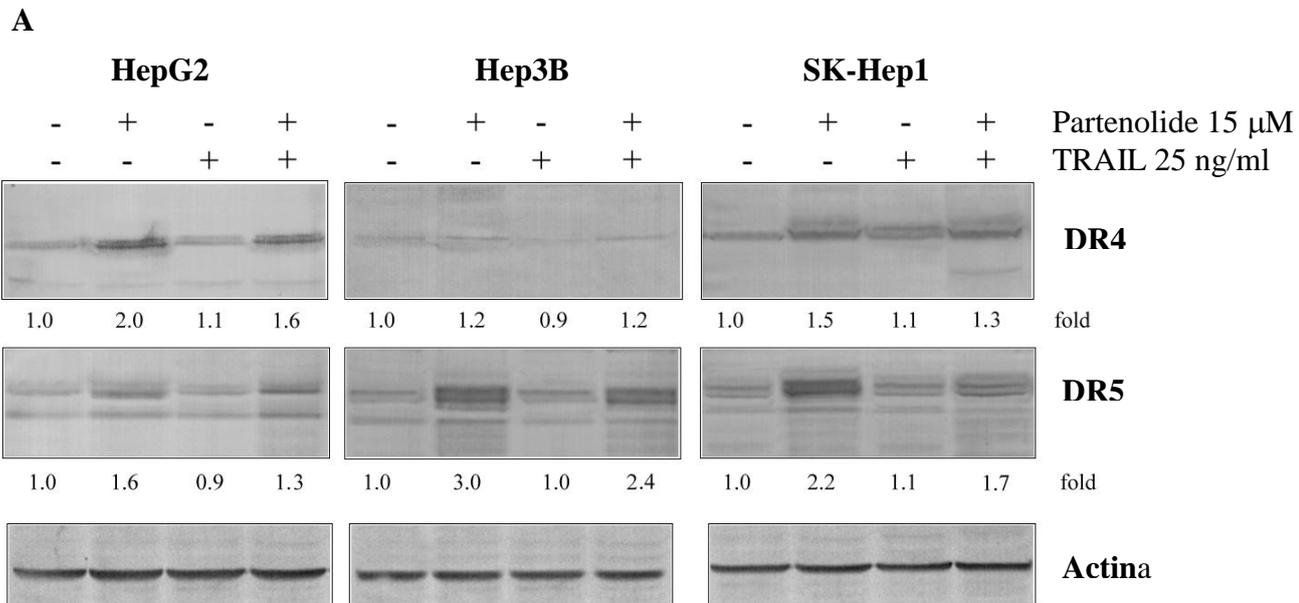


Figura 18: Valutazione dell'espressione dei recettori di morte DR4 e DR5 in cellule di HCC. (A) Valutazione dei livelli proteici di DR4 e DR5 mediante analisi di western blot. Le cellule HepG2, Hep3B e SK-Hep1 sono state trattate per 16 h con partenolide 15 μ M, TRAIL 25 ng/ml e con la combinazione. Gli estratti proteici sono stati preparati e le proteine valutate mediante western blot, come descritto nei materiali e metodi, utilizzando anticorpi specifici per DR4 e DR5. Si riporta l'analisi di western blot dell'actina per mostrare l'omogeneità dei campioni proteici nelle diverse condizioni. **(B)** Analisi di Real-Time PCR per la valutazione dell'espressione dei recettori DR4 e DR5 in cellule HepG2. Le cellule sono state trattate per 8 e 16 h con partenolide 15 μ M, TRAIL 25 ng/ml e con la combinazione. Dopo estrazione dell'RNA (RNeasy mini Kit Qiagen) e trattamento con DNasi I, l'RNA messaggero è stato retrotrascritto in cDNA e amplificato per DR4 o DR5 utilizzando primers specifici, mediante Real-Time PCR (Kit IQ SYBR Green Supermix), come riportato nei metodi. I valori sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene costitutivamente espresso GAPDH e rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti condotti separatamente. *P<0.01 rispetto al solo TRAIL.

La combinazione partenolide/TRAIL induce in cellule di HCC apoptosi mediata dalle caspasi

È noto che il ligando di morte TRAIL interagisce sotto forma di omotrimerico con i recettori di morte DR4 e DR5, inducendone la trimerizzazione. DR4 e DR5 attivati reclutano a livello dei loro domini di morte (DD, Death Domain) la proteina adattatrice FADD (Fas-Associated Death Domain protein), che a sua volta interagisce con la procaspasi-8 tramite i domini effettori di morte (DED, Death Effector Domain), formando quindi un complesso multiproteico noto come DISC (Death-Inducing Signalling Complex), che innesca l'attivazione a cascata delle caspasi (16, 70).

In molti casi, la conversione della procaspasi-8 in caspasi-8, mediante taglio autocatalitico, è sufficiente per attivare le caspasi esecutrici -3, -6 e -7 e dare inizio alla cascata di eventi che inducono l'apoptosi (14).

Per valutare se nel meccanismo di sensibilizzazione a TRAIL indotto dal partenolide in cellule di HCC vi fosse il coinvolgimento delle caspasi, sono state condotte analisi di western blot dei livelli delle caspasi-8 e -3, dopo trattamento per 8 e 16 ore con i singoli composti e con la combinazione partenolide 15 μ M/TRAIL 25 ng/ml (Fig.19). Tale combinazione determina, in cellule HepG2, l'attivazione precoce della caspasi-8 già dopo 8 ore di trattamento, evidenziabile con la degradazione della procaspasi-8 e la produzione della caspasi-8 attiva. Il trattamento combinato induce anche il taglio proteolitico della procaspasi-3 con

la conseguente attivazione della caspasi-3, ma in questo caso gli effetti compaiono più lentamente, si manifestano infatti in modo consistente dopo 16 ore di trattamento.

L'attivazione della caspasi-8 e -3 non si osserva quando le cellule HepG2 vengono trattate con i singoli composti.

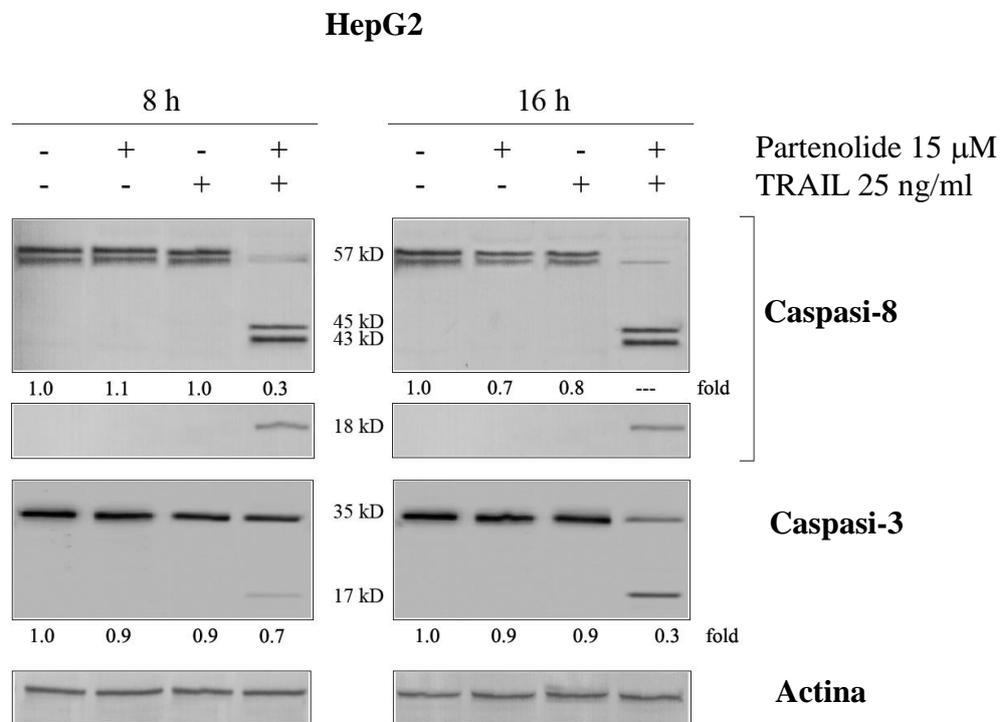


Figura 19: Valutazione dei livelli delle caspasi-8 e -3 in cellule di HCC. Valutazione dei livelli proteici di caspasi-8 e -3 mediante analisi di western blot. Le cellule HepG2 sono state trattate per 8 e 16 h con partenolide 15 μ M, TRAIL 25 ng/ml e con la combinazione. Gli estratti proteici sono stati preparati e le proteine valutate mediante western blot, come descritto nei materiali e metodi, utilizzando anticorpi specifici per le caspasi-8 e -3. Si riporta l'analisi di western blot dell'actina per mostrare l'omogeneità dei campioni proteici nelle diverse condizioni.

Il reclutamento di FADD a livello del DISC viene regolato dalla proteina c-Flip (cellular-FADD-Like IL-1 β -converting enzyme Inhibitory Protein), che presenta omologia strutturale con la caspasi-8; tale proteina esercita la sua azione inibitrice sul pathway di segnalazione di TRAIL legando il dominio DED di FADD e bloccando in tal modo l'attivazione della procaspasi-8 (20).

Sono state quindi condotte analisi di western blot per valutare gli effetti di partenolide e TRAIL su due isoforme di splicing del fattore anti-apoptotico c-Flip, indicate come L (Long) ed S (Short), ambedue con ruolo anti-apoptotico. In Figura 20 è possibile osservare che il trattamento con i composti non determina alcuna variazione dei livelli di entrambe le isoforme di c-Flip.

Inoltre, è stato valutato l'eventuale coinvolgimento del pathway apoptotico intrinseco dopo trattamento con partenolide e TRAIL, ed in particolare sono stati analizzati i livelli di alcuni membri della famiglia Bcl-2, regolatori fondamentali dell'integrità del mitocondrio e del pathway intrinseco dell'apoptosi.

Analisi di western blot hanno messo in evidenza che il trattamento per 16 ore con i singoli composti e con la combinazione partenolide/TRAIL non determina variazioni significative dei livelli delle proteine pro-apoptotiche Bid e Bax, e delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 e Bcl-X_L (Fig. 20). Tali risultati suggeriscono che l'azione prevalente della combinazione partenolide/TRAIL si espliciti a livello del pathway apoptotico estrinseco e coinvolga poco il mitocondrio. A conferma di tale ipotesi, analisi condotte impiegando il catione lipofilo DiOC₆, che si accumula nella matrice mitocondriale tanto più

rapidamente quanto più elevata è la differenza di potenziale della membrana mitocondriale, indicano che il trattamento con il partenolide o con la combinazione partenolide/TRAIL, per 8, 16 e 24 ore, non induce dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) in cellule HepG2 (Fig. 21). Ulteriori analisi, tuttavia, sarebbero necessarie per escludere il coinvolgimento del mitocondrio nell'apoptosi indotta dalla combinazione partenolide/TRAIL.

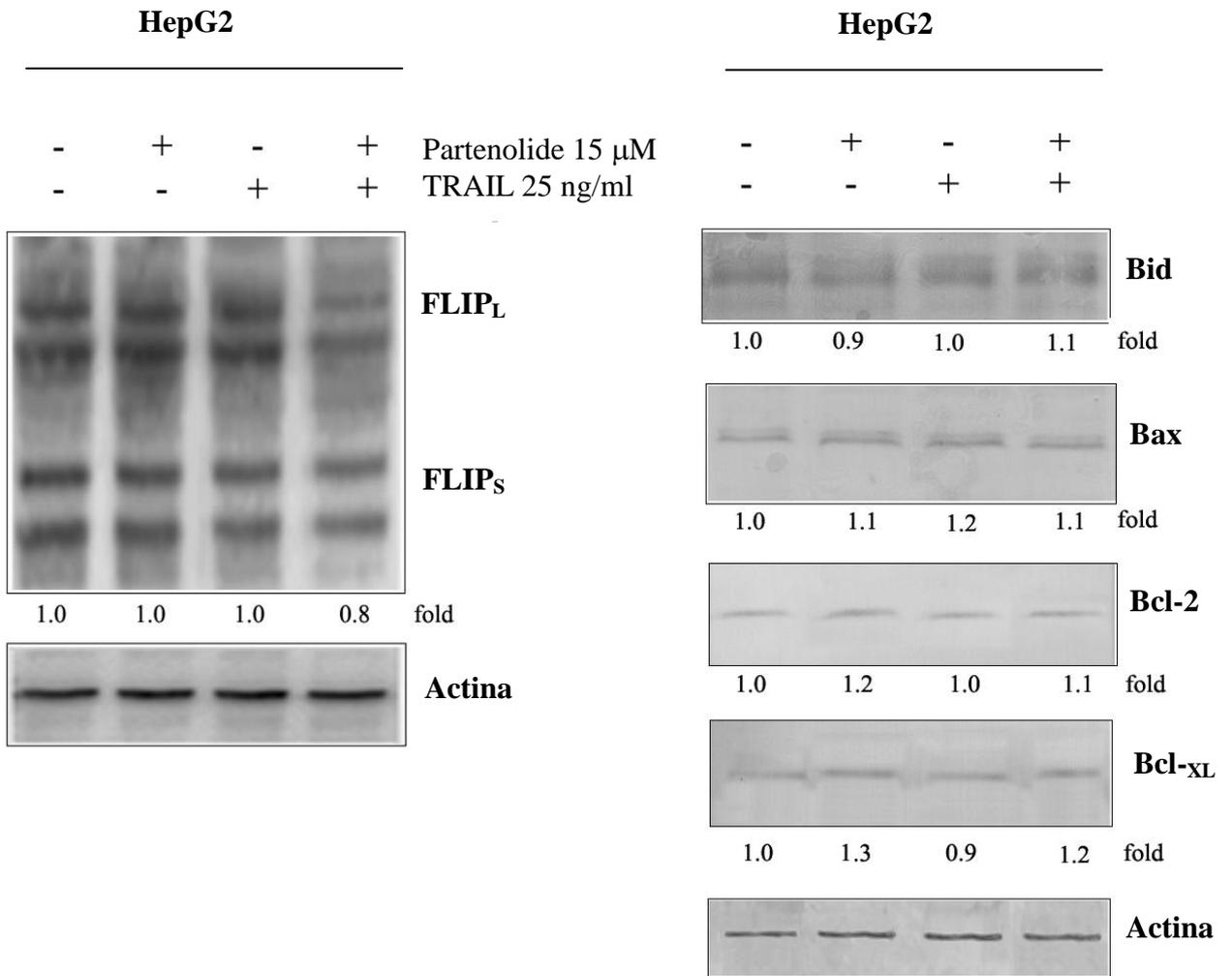


Figura 20: Valutazione dei livelli proteici delle due isoforme di c-Flip (L e S) e dei membri della famiglia Bcl-2 in cellule di HCC. Valutazione dei livelli proteici di c-Flip (a sinistra), Bid, Bax, Bcl-2 e Bcl-XL (a destra) mediante analisi di western blot. Le cellule HepG2 sono state trattate per 16 h con partenolide 15 μ M, TRAIL 25 ng/ml e con la combinazione. Gli estratti proteici sono stati preparati e le proteine valutate mediante western blot, come descritto nei materiali e metodi, utilizzando anticorpi specifici per c-Flip, Bid, Bax, Bcl-2 e Bcl-XL. Si riporta l'analisi di western blot dell'actina per mostrare l'omogeneità dei campioni proteici nelle diverse condizioni.

HepG2

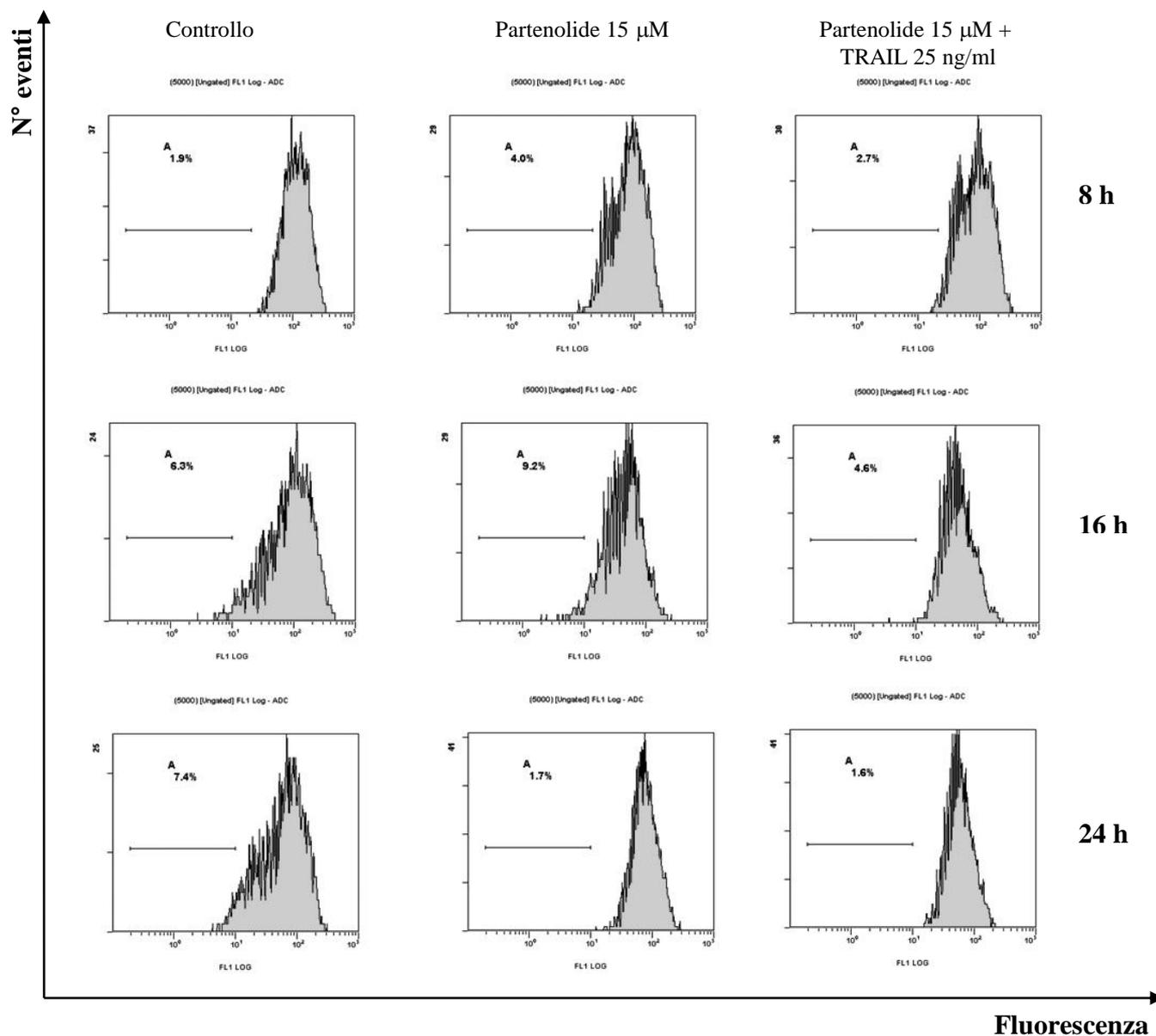


Figura 21: Effetto del trattamento combinato partenolide/TRAIL sul potenziale di membrana mitocondriale. La dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) è stata valutata in cellule HepG2 dopo 8, 16 e 24h di trattamento mediante analisi citofluorimetriche, usando il catione lipofilo DioC6, come riportato nei materiali e metodi. L'asse delle ascisse indica l'intensità della fluorescenza su scala logaritmica; l'asse delle ordinate riporta il numero degli eventi.

Il partenolide inibisce la fosforilazione delle proteine STATs e JAKs

È noto che il partenolide è in grado di inibire l'attività dei fattori di trascrizione STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription), che regolano numerose risposte biologiche, tra le quali infiammazione e risposta immunitaria, proliferazione cellulare, trasformazione, apoptosi, differenziamento e sviluppo fetale (32).

In particolare, è stato dimostrato che STAT3, ed in misura minore STAT5, è costitutivamente attivo in numerose forme tumorali, incrementando così la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, l'invasività e sopprimendo l'immunità antitumorale e l'apoptosi (42). STAT3 è inoltre in grado di indurre e mantenere un microambiente infiammatorio procarcinogenico (50).

Il partenolide agisce inibendo la fosforilazione delle proteine STATs, necessaria per la loro dimerizzazione, migrazione al nucleo e conseguente regolazione della trascrizione di geni target (38).

Sono stati pertanto valutati, mediante analisi di western blot, gli effetti del partenolide da solo e in associazione con il ricombinante TRAIL, sui livelli e sullo stato di fosforilazione delle proteine STAT3 e 5 (Fig. 22).

È interessante osservare che il partenolide 15 μ M impiegato da solo per 16 ore di trattamento induce riduzioni significative delle forme fosforilate sia di STAT3 che di STAT5, in tutte e tre le linee cellulari di HCC, mentre determina solo una

lieve riduzione dei livelli totali di entrambe le proteine, particolarmente evidente per quanto riguarda STAT3 in cellule Hep3B (Fig. 22).

Tali risultati sono evidenti sia quando le cellule vengono trattate con il solo partenolide che con la combinazione partenolide/TRAIL, mentre il trattamento con il solo TRAIL 25 ng/ml non determina variazioni significative sia dello stato di fosforilazione che del livello totale di tali proteine.

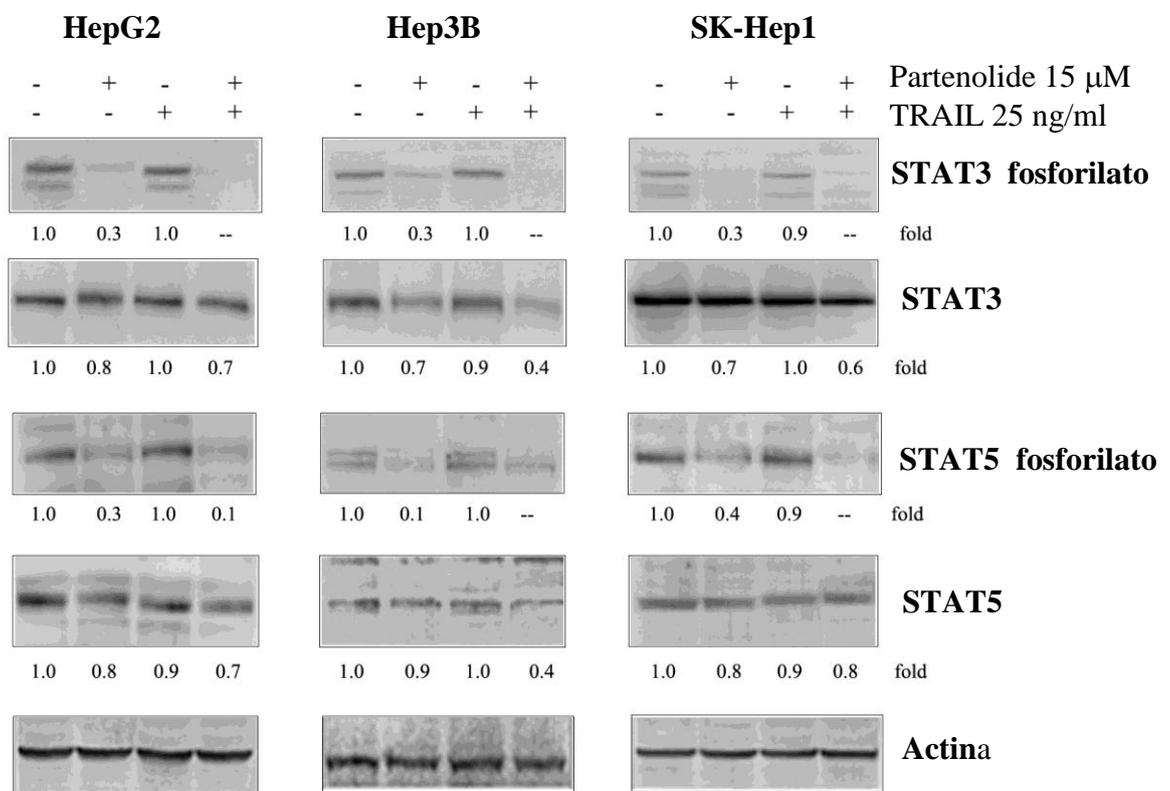


Figura 22: Valutazione dei livelli e dello stato di fosforilazione delle proteine STAT3 e 5 in cellule di HCC. Valutazione dei livelli proteici di STAT3, STAT5 e delle rispettive forme fosforilate mediante analisi di western blot. Le cellule HepG2, Hep3B ed SK-Hep1 sono state trattate per 16 h con partenolide 15 μ M, TRAIL 25 ng/ml e con la combinazione. Gli estratti proteici sono stati preparati e le proteine valutate mediante western blot, come descritto nei materiali e metodi, utilizzando anticorpi specifici per STAT3, STAT3 fosforilato (Tyr705), STAT5 e STAT5 fosforilato (Tyr694). Si riporta l'analisi di western blot dell'actina per mostrare l'omogeneità dei campioni proteici nelle diverse condizioni.

Alcuni autori hanno dimostrato che l'inibizione di STAT3 sensibilizza cellule di epatoma umano all'apoptosi indotta da TRAIL, incrementando i livelli dei recettori di morte DR4 e DR5 (48). Altri autori hanno dimostrato, inoltre, che le proteine STATs sono in grado di ridurre l'espressione di DR4 e DR5 (71).

Alla luce di tali considerazioni, i dati fin qui ottenuti inducono ad ipotizzare una possibile correlazione tra i due effetti indotti dal partenolide, ossia l'aumentata espressione di entrambi i recettori di morte, DR4 e DR5, ed il decremento di STAT3.

Per verificare tale correlazione e valutare il possibile effetto della riduzione di STAT3 nell'induzione di apoptosi da parte di partenolide e TRAIL, le cellule HepG2 sono state trasfettate in modo transiente con un siRNA (short interfering RNA) per STAT3 (come riportato nei materiali e metodi). È stato impiegato come controllo un siRNA scramble, ossia una sequenza che non silenzia alcun gene cellulare.

Mediante analisi di western blot, è stato osservato che il livello totale di STAT3 diminuisce del 50% nelle cellule trasfettate con il siRNA per STAT3 mentre il livello della proteina non subisce modifiche in cellule controllo trasfettate con un siRNA scramble (Fig. 23 A).

Le cellule trasfettate con il siRNA per STAT3 sono state quindi trattate con il partenolide 15 μ M, per valutare gli effetti sull'espressione dei recettori di morte.

I risultati ottenuti mostrano che il silenziamento di STAT3 sensibilizza fortemente le cellule HepG2 al trattamento con il partenolide. Gli effetti indotti

da quest'ultimo sui livelli di entrambi i recettori di morte DR4 e DR5 sono infatti molto più evidenti in cellule trasfettate con il siRNA per STAT3 rispetto alle cellule trasfettate con il solo siRNA scramble. L'aumento dei livelli sia delle proteine che dei messaggeri di DR4 e DR5 si può chiaramente osservare dopo 8 e 16 ore di trattamento, essendo l'effetto più consistente dopo 8 ore per i messaggeri e dopo 16 ore per le proteine (Fig. 23 B).

Complessivamente questi risultati suggeriscono che in cellule HepG2 il decremento di STAT3 possa contribuire alla sensibilizzazione delle cellule all'apoptosi indotta da TRAIL, determinando l'incremento dei livelli dei recettori di morte DR4 e DR5.

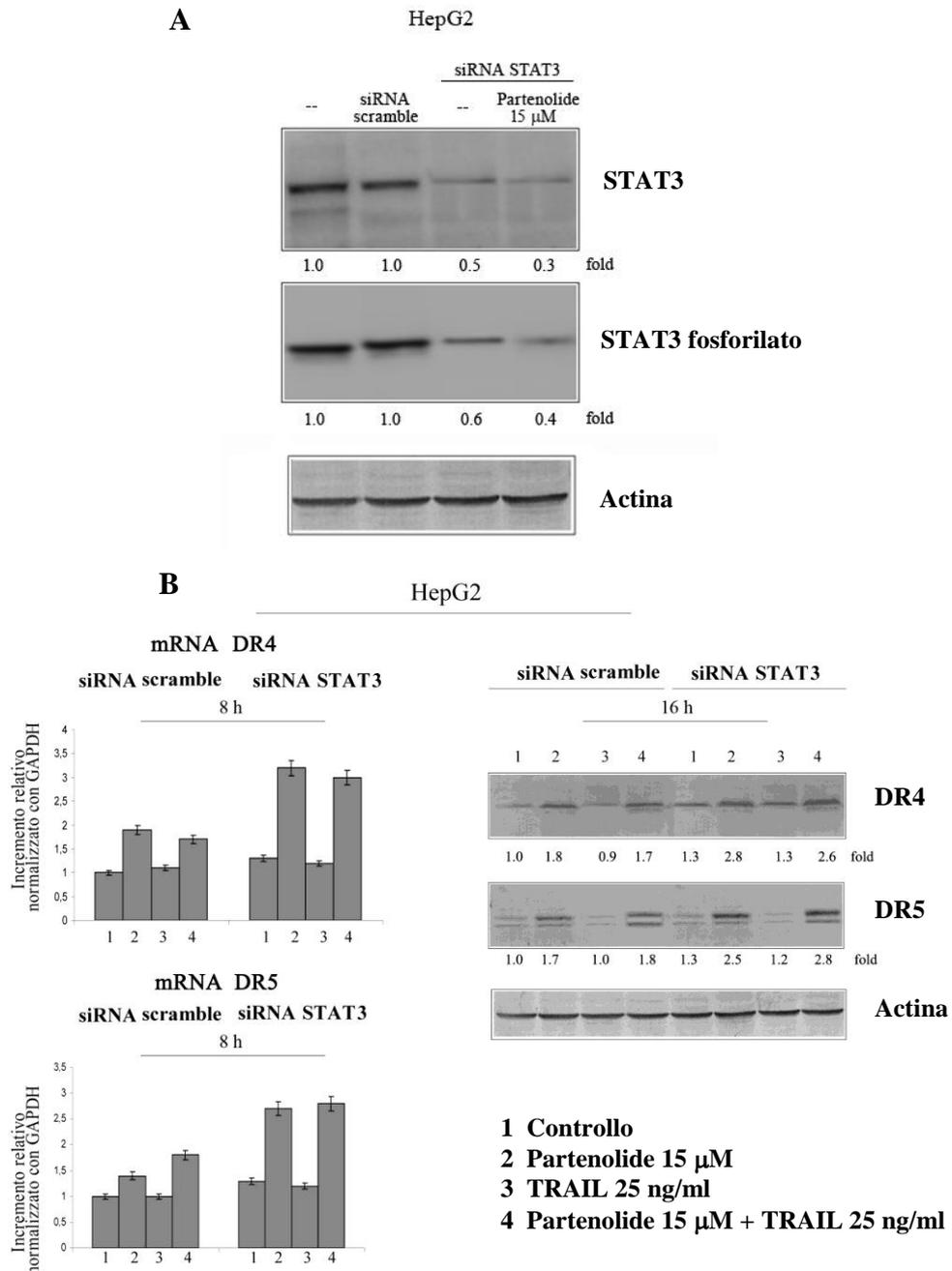


Figura 23: Il silenziamento di STAT3 incrementa l'efficacia del partenolide sull'espressione dei recettori di morte DR4 e DR5. Le cellule HepG2 sono state trasfettate con siRNA specifico per STAT3 per 24 h (come descritto nei materiali e metodi) ed è stato utilizzato come controllo un siRNA scramble. **(A)** Analisi di western blot mostrano i livelli proteici di STAT3 e di STAT3 fosforilato in cellule HepG2 trasfettate con il siRNA specifico per STAT3 e successivamente trattate per 16 h con partenolide 15 μ M. **(B)** Analisi di Real-Time PCR (a sinistra) e di western blot (a destra) per la valutazione dell'espressione dei recettori DR4 e DR5 in cellule HepG2 trasfettate con il siRNA specifico per STAT3 e trattate per 8 e 16 h con partenolide 15 μ M, TRAIL 25 ng/ml e con la combinazione. I messaggeri di DR4 o DR5 sono stati analizzati utilizzando primers specifici; i valori sono stati normalizzati rispetto ai livelli della GAPDH, costitutivamente espressa e rappresentano la media \pm SD di tre esperimenti condotti separatamente. Gli estratti proteici sono stati preparati e le proteine valutate mediante western blot, come descritto nei materiali e metodi, utilizzando anticorpi specifici per STAT3, STAT3 fosforilato (Tyr705), DR4 e DR5. Si riporta l'analisi di western blot dell'actina per mostrare l'omogeneità dei campioni proteici nelle diverse condizioni.

È noto che le proteine STATs vengono attivate mediante fosforilazione su tirosina, dipendente da chinasi appartenenti alla famiglia JAKs (JANus family of tyrosine Kinase). Tali chinasi vengono attivate per auto- o trans-fosforilazione in seguito all'oligomerizzazione di recettori per citochine, stimolata dal legame degli specifici ligandi, come l'interferone o IL-6 (InterLeuchina-6). Le proteine JAKs, a loro volta, fosforilano i recettori a livello di specifici residui di tirosina, reclutando in tal modo le proteine STATs citoplasmatiche, che vengono quindi fosforilate da JAK, possono dimerizzare e in questa forma traslocare al nucleo, dove regolano l'espressione genica (41, 43).

È stato dimostrato che l'inibizione di JAK2 determina un blocco della crescita, sia in vitro che in vivo, di cellule leucemiche (72) e che l'AG490, un noto inibitore di JAK2, promuove morte per apoptosi in cellule di mieloma ed in cellule leucemiche, inibendo l'espressione dipendente da STAT3 di Bcl-xL e di Mcl-1 (42, 44).

Tali studi hanno suggerito di valutare gli effetti esercitati dal partenolide sull'attivazione delle proteine JAKs. I risultati ottenuti mostrano che il partenolide, sia da solo che in combinazione con TRAIL, decrementa in modo notevole il livello di JAK2 fosforilato nelle tre linee cellulari analizzate. Il partenolide determina, inoltre, una consistente riduzione di JAK1 fosforilato nelle cellule HepG2 ed Hep3B, mentre l'effetto è poco chiaro in cellule SK-Hep1 (Fig. 24).

Il partenolide decrementa anche il livello di JAK1 e JAK2, ma anche in questo caso l'effetto è modesto rispetto a quello determinato per le forme fosforilate.

Il solo TRAIL non determina variazioni significative né del livello di fosforilazione né del livello totale di JAK-1 e -2 (Fig. 24).

Tali risultati suggeriscono quindi che il partenolide possa agire decrementando la fosforilazione delle proteine JAKs e determinando la conseguente inibizione dei fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia STATs.

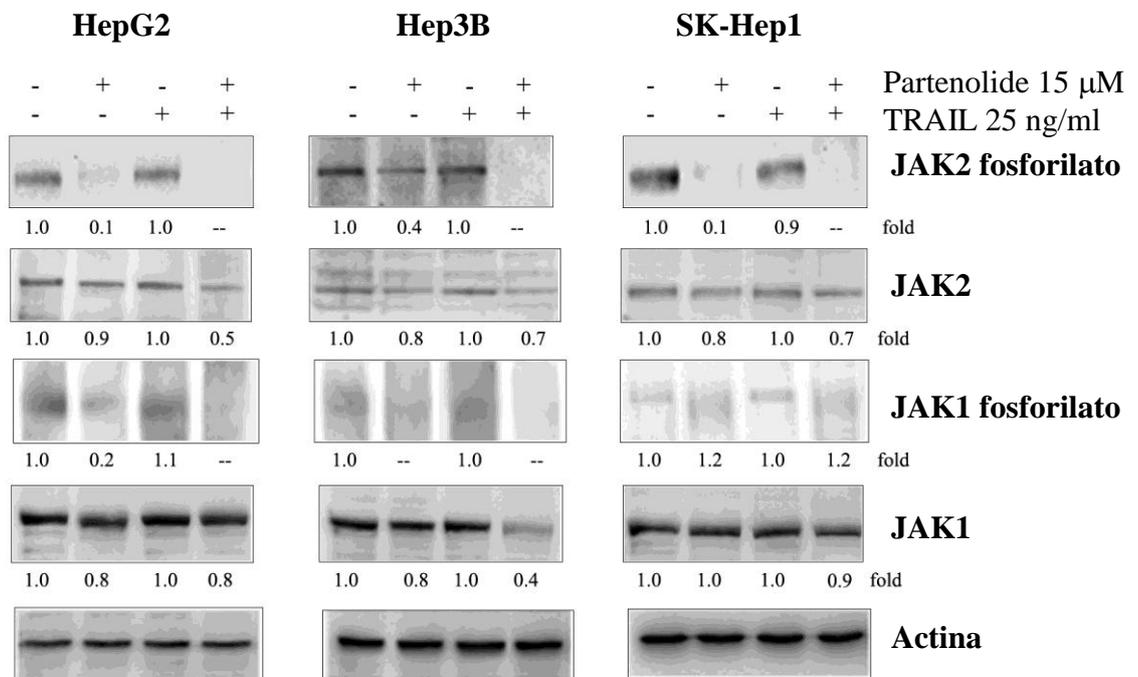


Figura 24: Valutazione dei livelli e dello stato di fosforilazione delle proteine JAK1 e 2 in cellule di HCC. Valutazione dei livelli proteici di JAK1, JAK2 e delle rispettive forme fosforilate mediante analisi di western blot. Le cellule HepG2, Hep3B ed SK-Hep1 sono state trattate per 16 h con partenolide 15 μM, TRAIL 25 ng/ml e con la combinazione. Gli estratti proteici sono stati preparati e le proteine valutate mediante western blot, come descritto nei materiali e metodi, utilizzando anticorpi specifici per JAK1, JAK1 fosforilato (Tyr1022), JAK2 e JAK2 fosforilato (Tyr1007). Si riporta l'analisi di western blot dell'actina per mostrare l'omogeneità dei campioni proteici nelle diverse condizioni.

DISCUSSIONE

TRAIL (Apo2L/TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), un ligando di morte appartenente alla famiglia del TNF, è in grado di indurre selettivamente apoptosi in una grande varietà di linee cellulari tumorali, esplicando nel contempo effetti tossici modesti in cellule normali (14). Per tali ragioni, TRAIL sembra offrire un potenziale terapeutico antitumorale molto promettente. Purtroppo, molte forme tumorali, tra le quali l'epatocarcinoma umano, sono resistenti all'azione apoptotica indotta da TRAIL.

Numerosi studi suggeriscono, tuttavia, che composti di varia natura siano in grado di superare i meccanismi di resistenza a TRAIL e di sensibilizzare dunque le cellule cancerose all'apoptosi mediata da tale ligando di morte, migliorandone l'efficacia terapeutica (14, 15).

Tra le strategie utilizzate per superare la resistenza a TRAIL vi è l'impiego di radiazioni ionizzanti (15), di inibitori del proteasoma (26), di inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) (28-30), di inibitori di NF- κ B (73) o di Akt (74).

Recentemente, il partenolide, principale sesquiterpene lattone estratto dalla pianta *Tanacetum parthenium*, è stato impiegato in combinazione a TRAIL in diversi studi preclinici (34, 39, 73).

Studi condotti presso la Sezione di Scienze Biochimiche del Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNec) hanno dimostrato che le cellule di epatocarcinoma umano (HCC) sono resistenti all'apoptosi mediata dal ricombinante TRAIL. Per lo svolgimento di tale tesi sono stati pertanto condotti studi *in vitro* in cellule di HCC HepG2, Hep3B e SK-Hep1,

impiegando il partenolide in combinazione con TRAIL, per stabilire se tale trattamento potesse sensibilizzare le cellule all'apoptosi indotta da tale ligando di morte.

Questo studio ha dimostrato che l'impiego di dosi sub-tossiche di partenolide è in grado di sensibilizzare cellule di HCC all'apoptosi indotta da TRAIL, mentre questi effetti non vengono osservati in epatociti primari umani (PHH), impiegati come linea cellulare controllo non tumorale.

In particolare, basse concentrazioni di partenolide, che risultano del tutto inefficaci quando impiegate singolarmente, sono invece in grado di indurre in queste linee cellulari un potente effetto apoptotico quando impiegate in combinazione con dosi sub-tossiche di TRAIL ricombinante.

La sensibilizzazione all'apoptosi mediata da TRAIL ad opera del partenolide è stata verificata sia mediante analisi citofluorimetriche, che evidenziano un notevole incremento del picco pre-G₀/G₁, che mediante microscopia a fluorescenza, che rivela una chiara morfologia apoptotica esclusivamente delle cellule sottoposte al trattamento combinato.

L'induzione di apoptosi è stata, quindi, successivamente confermata mediante analisi con annessina V-ioduro di propidio, e tale effetto risulta essere tempo-dipendente.

La combinazione partenolide/TRAIL sembra stimolare un processo di morte caspasi-dipendente, dal momento che gli effetti indotti dal trattamento

combinato sono quasi del tutto prevenuti dall'aggiunta dell'inibitore generico delle caspasi z-VAD.

Inoltre, come evidenziato dai risultati ottenuti valutando l'indice di combinazione mediante il metodo matematico di Chou e Talalay, concentrazioni sub-tossiche dei due composti, che impiegate singolarmente non determinano alcun effetto in cellule di HCC, inducono, invece, effetti di tipo sinergico quando utilizzate in combinazione.

Dunque, partenolide e TRAIL interagiscono in modo sinergico determinando morte cellulare per apoptosi nelle tre linee di HCC.

Allo scopo di chiarire i meccanismi molecolari alla base degli effetti indotti dalla combinazione partenolide/TRAIL, l'attenzione è stata rivolta a proteine chiave del pathway apoptotico mediato da TRAIL ed in particolare sono stati analizzati i livelli dei recettori di morte DR4 e DR5, che trasducono il segnale indotto dal ricombinante TRAIL.

Tale studio dimostra che il partenolide da solo induce un notevole incremento dell'espressione dei recettori di morte DR4 e DR5, effetto che si evidenzia chiaramente tanto dall'incremento dei messaggeri quanto delle proteine, in tutte e tre le linee cellulari analizzate.

Il legame di TRAIL ai propri recettori DR4 e DR5 determina la formazione del complesso DISC (Death-Inducing Signalling Complex), che induce morte per apoptosi, innescando l'attivazione a cascata delle caspasi (16).

L'attivazione della caspasi-8 a livello del complesso DISC rappresenta l'evento iniziale dell'induzione del processo apoptotico, poiché porta all'attivazione delle caspasi esecutrici -3, -6 e -7, dando inizio alla cascata di eventi che determinano morte per apoptosi.

È stato dunque valutato il coinvolgimento della caspasi-8 nel meccanismo di sensibilizzazione a TRAIL da parte del partenolide ed è stato osservato che la combinazione partenolide/TRAIL determina l'attivazione della caspasi-8, evento che si manifesta precocemente, già dopo 8 ore di trattamento e si accompagna all'attivazione della caspasi-3 esecutrice (evento ben visibile dopo 16 ore).

Come indicato precedentemente, l'inibitore generico delle caspasi z-VAD previene quasi completamente gli effetti indotti dalla combinazione partenolide/TRAIL osservati mediante analisi citofluorimetriche; pertanto, tali risultati, associati all'effetto della combinazione partenolide/TRAIL sulle caspasi, suggeriscono che l'attivazione di tali proteasi sia cruciale nel meccanismo di induzione di morte cellulare attivato in cellule di HCC dal trattamento combinato.

È noto che l'attivazione della caspasi-8 viene regolata negativamente dalla proteina c-FLIP (cellular-FADD-Like IL-1 β -converting enzyme Inhibitory Protein), che inibisce il pathway di TRAIL, legando il dominio DED di FADD ed impedendo in tal modo il reclutamento della procaspasi-8 a livello del DISC (20).

E' interessante sottolineare che il trattamento con il partenolide non modifica significativamente il livello di due isoforme di splicing di c-Flip, L (Long) ed S (Short), entrambe con ruolo anti-apoptotico. Quindi, tale proteina non sembra svolgere un ruolo di rilievo nel meccanismo apoptotico indotto dalla combinazione partenolide/TRAIL.

Ulteriori risultati ottenuti mediante analisi di western blot indicano che il trattamento combinato partenolide/TRAIL non induce modifiche significative dei livelli né dei membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2, Bid e Bax, né dei membri anti-apoptotici Bcl-2 e Bcl-X_L regolatori fondamentali dell'integrità del mitocondrio e del pathway apoptotico intrinseco (14). Inoltre, l'analisi del potenziale di membrana mitocondriale, indica che il trattamento combinato partenolide/TRAIL non ne induce la dissipazione. Pertanto, tali risultati indurrebbero ad escludere il coinvolgimento del pathway intrinseco dell'apoptosi. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per approfondire il ruolo dei mitocondri nella morte indotta dalla combinazione partenolide/TRAIL. Ad ogni modo, risulta evidente che il pathway estrinseco indotto da TRAIL è un evento fondamentale per la sensibilizzazione delle cellule operata dal partenolide.

E' noto che il partenolide è in grado di inibire proteine appartenenti alla famiglia STATs, una famiglia di fattori di trascrizione citoplasmatici, che trasducono segnali attivati da citochine, ormoni e fattori di crescita, mediando così una

varietà di processi biologici inclusi crescita cellulare, differenziamento ed apoptosi (32, 44).

I risultati ottenuti in tale studio confermano che il partenolide è in grado di inibire l'attivazione delle proteine STATs, poiché il trattamento con tale composto decrementa notevolmente i livelli delle forme fosforilate attive sia di STAT3 che di STAT5 nelle tre linee di HCC, lasciando ipotizzare la possibile riduzione dell'attività trascrizionale di tali fattori.

È stato ampiamente dimostrato che STAT3 (ed in misura minore STAT5) è coinvolto nella regolazione dell'espressione di numerosi geni che possono contribuire all'oncogenesi, mediante meccanismi che includono stimolazione della progressione del ciclo cellulare ed inibizione dell'apoptosi (41, 42).

Inoltre, è stato riportato che l'inibizione della fosforilazione e della conseguente attività trascrizionale di STAT3, determina l'aumento di espressione dei recettori di morte DR4 e DR5, attivando l'apoptosi in cellule di HCC (48).

Recentemente, è stato confermato che il fattore di trascrizione STAT3 è in grado di regolare negativamente l'espressione di DR5 e che l'inibizione della fosforilazione di STAT3 è accompagnata dall'incremento dei livelli di DR5 in cellule di melanoma (46).

Si è quindi ipotizzato che il partenolide possa sensibilizzare le cellule di HCC alla via di TRAIL determinando l'incremento dei livelli dei recettori di morte DR4 e DR5 in seguito all'inibizione dei membri della famiglia STATs, ed in particolare di STAT3.

Tale ipotesi è fortemente supportata dall'osservazione che il silenziamento di STAT3, indotto in cellule di HCC mediante un siRNA specifico per STAT3, potenzi l'effetto del partenolide sull'espressione dei recettori di morte. Tali dati avvalorano, quindi, l'ipotesi che il partenolide espliciti i suoi effetti in cellule di HCC inibendo STAT3 e, così facendo, facilitando l'aumento di espressione dei recettori di morte per TRAIL.

Le proteine STATs possono essere fosforilate su tirosina da parte dei membri della famiglia JAKs (JANUS family of tyrosine Kinase) (42), chinasi associate ai recettori per le citochine, che vengono attivati per auto- o trans-fosforilazione su residui di tirosina. È stato dimostrato che l'AG490, un noto inibitore di JAK2, determina blocco della proliferazione di cellule leucemiche (72) ed induce apoptosi in cellule di mieloma ed in cellule leucemiche, inibendo l'espressione dipendente da STAT3 di fattori anti-apoptotici (42, 44).

Per stabilire mediante quale meccanismo il partenolide possa inibire il fattore di trascrizione STAT3 in cellule di HCC, sono stati valutati gli effetti del partenolide sui livelli totali e delle forme fosforilate e dunque attive delle proteine JAKs.

I risultati ottenuti indicano che il partenolide, sia da solo che in combinazione con il ligando di morte TRAIL, decrementa in modo notevole il livello di JAK2 fosforilato nelle tre linee cellulari analizzate e determina una consistente riduzione di JAK1 fosforilato nelle cellule HepG2 ed Hep3B.

Il partenolide decrementa anche il livello di JAK1 e JAK2, ma in questo caso l'effetto è modesto rispetto a quello determinato per le forme fosforilate. Il partenolide sembra quindi inibire l'attivazione delle proteine JAK1 e 2 in cellule di HCC, con il conseguente decremento dello stato fosforilato di STAT3. Ciò impedirebbe la dimerizzazione di STAT3, la sua traslocazione nucleare e la conseguente azione sull'espressione di geni target. Tale evento sembrerebbe essere responsabile dell'incremento di espressione dei recettori di morte indotta dal partenolide.

È noto che il partenolide contiene un anello α -metilene- γ -lattone ed un gruppo epossidico, che sono responsabili della sua attività poiché sono in grado di interagire rapidamente con siti nucleofili di molecole biologiche ed in particolare con i gruppi sulfidrilici (75).

L'osservazione che STAT3 non contenga alcun residuo di cisteina, importante per la sua attivazione, sembra escludere la possibilità di un'interazione diretta tra STAT3 ed il partenolide (76).

Alcuni autori hanno suggerito che il partenolide possa inibire la proteina JAKs attraverso coniugazione diretta con i loro gruppi sulfidrilici (38).

Tuttavia, Kurdi e Booz hanno dimostrato che le proteine JAKs non sono target diretti dell'azione del partenolide in cardiomiociti ed hanno avanzato l'ipotesi che il partenolide inibisca l'attivazione di JAKs attraverso la formazione di ROS (76).

Sono quindi necessari ulteriori studi per definire l'esatto meccanismo di inibizione di JAKs indotto dal partenolide.

Diversi autori hanno riportato dei dati che avvalorano i risultati riportati in tale tesi e che supportano l'ipotesi che STAT3 eserciti un ruolo importante nel controllo della crescita e dell'apoptosi di cellule tumorali. In particolare, mediante l'impiego dell'RNA interference (77, 78) e dei dominanti negativi (79, 80) è stato dimostrato che l'inibizione del pathway di segnalazione mediato da STAT3 sopprime la crescita cellulare ed induce apoptosi in cellule tumorali. Al contrario, altri eventi che inducono l'attivazione di STATs stimolano la proliferazione cellulare ed impediscono la morte cellulare per apoptosi (42).

Il trattamento con la combinazione partenolide/TRAIL potrebbe dunque rappresentare una nuova importante strategia terapeutica per la cura dei tumori epatici.

Il carcinoma epatocellulare è classificato tra le dieci neoplasie più frequenti al mondo e, ad oggi, la resezione chirurgica ed il trapianto di fegato possono essere considerati le uniche terapie potenzialmente curative nel trattamento dell'HCC, ma queste cure sono applicabili ad un numero ristretto di pazienti che si trovano negli stadi iniziali della malattia (3, 5).

La terapia farmacologica oggi in uso prevede l'impiego di composti come il cisplatino, la mitomicina, l'adriamicina, il 5-fluorouracile (5-FU), la leucovirina e la doxorubicina. Purtroppo, però, molte cellule tumorali, incluse le cellule di HCC spesso presentano farmaco-resistenza intrinseca o acquisita (9).

Ad oggi, l'unica opzione terapeutica promettente è rappresentata dall'inibitore di chinasi sorafenib, che, utilizzato in trials clinici di fase 3, si è rivelato molto efficace nell'incrementare la sopravvivenza dei pazienti con HCC non resecabile (10).

Pertanto, sarebbe importante per la cura dei tumori epatici, sviluppare strategie terapeutiche che impieghino composti a bassa tossicità, in modo da non compromettere la funzionalità epatica, che possano superare la resistenza indotta dai classici agenti chemioterapici, e che inducano la morte selettivamente di cellule tumorali, senza determinare invece effetti in cellule normali.

In questo contesto, l'utilizzo del ligando di morte TRAIL potrebbe rappresentare una valida strategia terapeutica, poiché esso è in grado di indurre una cascata di segnalazione che porta a morte cellulare per apoptosi cellule tumorali, esercitando effetti citotossici minimi in cellule normali.

Sono stati fatti numerosi tentativi per incrementare la sensibilità di cellule tumorali a TRAIL, utilizzando diversi tipi di trattamenti combinati.

A sua volta il partenolide, che mostra tossicità selettiva nei confronti di cellule tumorali, senza determinare alcun effetto in cellule normali, lascia ipotizzare un suo possibile impiego in associazione con agenti sensibilizzanti l'apoptosi, e lo rende un candidato ideale nella terapia antitumorale.

Sulla base dei risultati riportati in tale tesi, il trattamento combinato partenolide/TRAIL potrebbe rappresentare un approccio terapeutico efficace per il trattamento di HCC.

BIBLIOGRAFIA

1. Dragani TA. *Risk of HCC: Genetic heterogeneity and complex genetics*, Journal of Hepatology, 52; 252–257; 2010.
2. Stefaniuk P., Cianciara J., Wiercinska-Drapalo A. *Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma*, World Journal of Gastroenterology, 16 (4):418-24; 2010.
3. Schafer DF., Sorrell MF. *Hepatocellular carcinoma*, The Lancet, 353: 1253–57; 1999.
4. Malhi H., Guicciardi M.E., Gores G.J. *Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger*, Physiol Rev, 90: 1165–1194; 2010.
5. Faloppi L., Scartozzi M., Maccaroni E., Di Pietro M .P., Berardi R., Del Prete M., Cascinu S. *Evolving strategies for the treatment of hepatocellular carcinoma: From clinical-guided to molecularly-taylored therapeutic options*, Cancer Treatment Reviews; 2010.
6. Thorgeirsson S.S., Grisham J.W. *Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*, Nature Genetics, 31(4):339-46; 2002.
7. Cha CH., Saif MW., Yamane BH., Weber SM. *Hepatocellular Carcinoma: Current Management*, Curr Probl Surg, 47(1):10-67; 2010.

8. Graziadei I. *Liver transplantation organ allocation between Child and MELD*, Wiener Medizinische Wochenschrift, 156/13–14: 410–415; 2006.
9. Thomas M.B., O’Beirne J.P., Furuse J., Chan A.T.C., Abou-Alfa G., Johnson P. *Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: cytotoxic chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy*, Annals of Surgical Oncology, 15(4):1008–1014; 2008.
10. Takeuchi A., Kaneko S., Matsushita E., Urabe T., Shimoda A., Kobayashi K. *Interferon- α modulates resistance to cisplatin in three human hepatoma cell lines*, J Gastroenterol., 34:351-358; 1999.
11. Siegel A.B., Olsen S.K., Magun A., Brown R.S. *Sorafenib: Where Do We Go from Here?*, Hepatology, 52:360-369; 2010.
12. Holoch P.A., Griffith T.S. *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): A new path to anti-cancer therapies*, European Journal of Pharmacology; 2009.
13. Falschlehner C., Emmerich H.C., Gerlach B., Walczak H. *TRAIL signalling: Decisions between life and death*, The international Journal of Biochemistry and Cell Biology, 39:1462-1475; 2007.
14. Pasquini L., Petrucci E., Riccioni R., Petronelli A., Testa U. *Sensitivity and resistance of human cancer cells to TRAIL:*

- mechanisms and therapeutical perspectives*, *Cancer therapy*, 4:47-72; 2006.
15. Pennarun B., Meijer A., de Vries E.G.E., Kleibeuker J.H., Kruyt F., de Jong S. *Playing the DISC: Turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1805:123–140; 2010.
16. Russo M., Mupo A., Spagnuolo C., Russo G.L. *Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy*, *Biochemical Pharmacology*, 80: 674–682; 2010.
17. G.M. Cohen. *Caspases: the executioners of apoptosis*, *Biochem. J.*, 326: 1-16; 1997.
18. Burz C., Berindan-Neagoe I., Balacescu O., Irimiei A. *Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets*, *Acta Oncologica*, 48: 811-821; 2009.
19. Ashkenazi A. *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*, *Nat. Rev. Cancer*, 2 (6):420-30; 2002.
20. Bagnoli M., Canevari S., Mezzanzanica D. *Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: A key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42: 210–213; 2010.

21. Bellail A.C, Tse M.C.L., Song J.H., Phuphanich S., Olson J.J., Sun S.Y., Hao C. *DR5-mediated DISC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas*, *J. Cell. Mol. Med.*, 14: 1303-1317; 2010.
22. Gonzalez F., Ashkenazi A. *New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL*, *Oncogene*, 29, 4752–4765; 2010.
23. Lawrence D., Shahrokh Z., Marsters S., Achilles K., Shih D., Mounho B., Hillan K., Totpal K., DeForge L., Schow P., Hooley J., Sherwood S., Pai R., Leung S., Khan L., Gliniak B., Bussiere J., Smith C.A., Strom S.S., Kelley S., Fox J.A., Thomas D., Ashkenazi A. *Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions*, *Nat Med.*, 7(4):383-5; 2001.
24. Jo M., Kim T.H., Seol D.W., Esplen J.E., Dorko K., Billiar T.R., Strom S.C. *Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*, *Nat Med.*, 6(5):564-7; 2000.
25. Rajikumar S.V., Richardson P.G., Hideshima T., Anderson K.C.. *Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer*, *J Clin. Oncol.* 23:630-639; 2005.
26. Sayers T.J., Brocks A.D., Koh C.Y., Ma W., Saki N., Raziuddin A., Blazar B.R., Zhang X., Elliot P.J., Murphy W.J. *The proteasome*

- inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP*, Blood 102:303-310; 2003.
27. Rosato R.R., Almenara J.A., Coe S., Grant S. *The multikinase inhibitor sorafenib potentiates TRAIL lethality in human leukemia cells in association with Mcl-1 and cFLIPL down-regulation*, Cancer Res. 67, 9490–9500; 2007.
28. Pathil A., Armenau S., Venturelli S., Mascagni P., Weiss T.S., Gregor M., Lauer U.M., Bitzer M. *HDAC inhibitor Treatment of Hepatoma Cells induced both TRAIL-independent apoptosis and restoration of sensitivity to TRAIL*, Hepatology, 43:425-434; 2005.
29. Butler L.M., Liapis V., Bouralexis S., Welldon K., Hay S., Thai le M., Labrinidis A., Tilley W.D., Findlay D.M., Evdokiou A. *The histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, overcomes resistance of human breast cancer cells to Apo2L/TRAIL*, Int J Cancer, 119:944-954; 2006.
30. Fandy T.E., Shankar S., Ross D.D., Sausville E., Srivastava R.K. *Interactive effects of HDAC inhibitors and TRAIL on apoptosis are associated with changes in mitochondrial functions and expressions of cell cycle regulatory genes in multiple myeloma*, Neoplasia, 7:646-657; 2005.
31. Carlisi D., Lauricella M., D'Anneo A., Emanuele S., Angileri L., Di Fazio P., Santulli A., Vento R., Tesoriere G. *The histone deacetylase*

- inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid sensitises human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-DISC activation*, Eur J Cancer, 45:2425-2438; 2009.
- 32.Pajak B., Gajkowska B., Orzechowski A. *Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells*, Folia Histochemica et Cytobiologica, 46, 2 129-135; 2008.
- 33.Ghantous A., Gali-Muhtasib H., Vuorela H., Saliba N.A., Darwiche N. *What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?*, Drug Discovery Today, 15:15/16; 2010.
- 34.Guzman M.L., Rossi R.M., Karnischky L., Li X., Peterson D.R., Howard D.S., Jordan C.T. *The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells*, Blood, 105, 11; 2005.
- 35.Saadane A., Masters S., DiDonato J., Li J., Berger M. *Parthenolide inhibits I κ B Kinase, NF- κ B activation, and inflammatory response in cystic fibrosis cells and mice*, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 36; 2007.
- 36.Ravi R., Bedi A. *NF- κ B in cancer-a friend turned foe*, Drug Resistance Updates, 7, 53–67; 2004.
- 37.Shanmugam R., Kusumanchi P., Cheng L., Crooks P., Neelakantan S., Matthews W., Nakshatri H., Sweeney C.J. *A water soluble parthenolide analogue suppresses in vivo tumor growth of two*

- tobacco associated cancers, lung and bladder cancer, by targeting NF- κ B and generating reactive oxygen species*, Prostate, 70(10):1074-86; 2010.
38. Sobota R., Szwed M., Kasza A., Bugno M., Kordula T. *Parthenolide inhibits activation of Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 267, 329–333; 2000.
39. Suvannasankha A., Crean C.D., Shanmugam R., Farag S.S., Abonour R., Boswell H.S., Nakshatri H. *Antimyeloma effects of a Sesquiterpene Lactone Parthenolide*, Clin Cancer Res. 14(6); 2008.
40. Curry E.A., Murry D.J., Yoder C., Fife K., Armstrong V., Nakshatri H., O'Connell M., Sweeney C.J. *Phase I dose escalation trial of feverfew with standardized doses of parthenolide in patients with cancer*, Investigational New Drugs, 22: 299–305; 2004.
41. Spano J.P., Milano G., Rixe C., Fagard R. *JAK/STAT signalling pathway in colorectal cancer: A new biological target with therapeutic implications*, European Journal of Cancer, 42 2668–2670; 2006.
42. Bowman T., Garcia R., Turkson J., Jove R. *STATs in oncogenesis*, Oncogene, 19, 2474-2488; 2000.

- 43.Reich N.C. and Liu L. *Tracking STAT nuclear traffic*, Nature Reviews, 6; 2006.
- 44.Benekli M., Baumann H., Wetzler M. *Targeting Signal Transducer and Activator of Transcription signaling pathway in leukemias*, J Clin Oncol. 27:4422-4432; 2009.
- 45.Shuai K. and Liu B. *Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system*, Nature Reviews, 3; 2003.
- 46.Ivanov V.N., Zhou H., Partridge M.A., Hei T.K. *Inhibition of Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase activity enhances TRAIL-mediated apoptosis in human melanoma cells*, Cancer Res. 69(8):3510–9; 2009.
- 47.Kisseleva T., Bhattacharya S., Braunstein J., Schindler C.W. *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*, Gene, 285, 1–24; 2002.
- 48.Kusaba M., Nakao K., Goto T., Nishimura D., Kawashimo H., Shibata H., Motoyoshi Y., Taura N., Ichikawa T., Hamasaki K., Eguchi K. *Abrogation of constitutive STAT3 activity sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-mediated apoptosis*, Journal of Hepatology, 47, 546–555; 2007.
- 49.Kim H.S., Lee M.S. *STAT1 as a key modulator of cell death*, Cellular Signalling, 19, 454–465; 2007.

50. Aggarwal B.B., Sethi G., Ahn K.S., Sandur S.K., Pandey M.K., Kunnumakkara A.B., Sung B., Ichikawa K. *Targeting Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription-3 for prevention and therapy of cancer*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1091: 151–169; 2006.
51. Alvarez J.V., Frank D.A. *Genome-Wide analysis of STAT target genes*, Cancer Biology & Therapy, 3:11, 1045-1050; 2004.
52. Vento R., Giuliano M., Lauricella M., Carabillò M., Main H., Gerbino E., Tesoriere G. *Differentiation of Y79 cells induced by prolonged exposure to insulin*. Molecular and Cellular Biochemistry, 170: 163-170; 1997.
53. Vento R., Giuliano M., Lauricella M., Carabillò M., Di Liberto D., Tesoriere G. *Induction of programmed cell death in human retinoblastoma Y79 cells by C2-ceramide*, Molecular and Cellular Biochemistry, 185: 7-15; 1998.
54. Lauricella M., Giuliano M., Emanuele S., Carabillò M., Vento R., Tesoriere G. *Increased cyclin E level in retinoblastoma cells during programmed cell death*, Cell. Mol. Biol. 44: 1229-1235; 1998.
55. Lauricella M., Giuliano M., Emanuele S., Vento R., Tesoriere G. *Apoptotic effects of different drugs on cultured retinoblastoma Y79 cells*, Tumor Biology, 19: 356-363; 1998.
56. Giuliano M., Lauricella M., Calvaruso G., Carabillò M., Emanuele S., Vento R., Tesoriere G. *The apoptotic effects and synergistic*

- interaction of sodium butyrate and MG132 in human retinoblastoma Y79 cell*, Cancer Res. 59: 5586-5595; 1999.
57. Lauricella M., Calvaruso G., Giuliano M., Carabillò M., Emanuele S., Vento R., Tesoriere G. *Synergistic cytotoxic interaction between sodium butyrate, MG132 and camptothecin in human retinoblastoma Y79 cells*, Tumour Biol. 21: 337-348; 2000.
58. Vento R., D'Alessandro N., Giuliano M., Lauricella M., Carabillò M., Tesoriere G. *Induction of apoptosis by arachidonic acid in human retinoblastoma Y79 cells: Involvement of oxidative stress*, Exp. Eye Res. 70: 503-517; 2000.
59. Calvaruso G., Carabillò M., Giuliano M., Lauricella M., D'Anneo A., Vento R., Tesoriere G. *Sodium phenilbutyrate induces apoptosis in human retinoblastoma Y79 cells: the effect of combined treatment with topoisomerase inhibitor I topotecano*, International Journal of Oncology, 18: 1233-1237; 2001.
60. Emanuele S., Calvaruso G., Lauricella M., Giuliano M., Bellavia G., D'anneo A., Vento R., Tesoriere G. *Apoptosis induced in hepatoblastoma HepG2 cells by the proteasome inhibitor MG132 is associated with hydrogen peroxide production, expression of Bcl-xS and activation of caspase-3*, Intern J Onc. 21: 857-865; 2002.
61. De Blasio A., Musmeci M.T., Giuliano M., Lauricella M., Emanuele S., Vassallo B., Tesoriere G., Vento R. *The effect of 3-*

- aminobenzamide, inhibitor of poly(ADP-ribose)polimerase, on human osteosarcoma cells*, International Journal of Oncology, 23: 1521-1528; 2003.
62. Emanuele S., D'Anneo A., Bellavia G., Vassallo B., Lauricella M., De Blasio A., Vento R., Tesoriere G. *Sodium butyrate induces apoptosis in human hepatoma cells by a mitochondria/caspase pathway, associated with degradation of β -catenin, pRB and BclXL*, European J Canc. 40: 1441-1452; 2004.
63. Lauricella M., Emanuele S., D'Anneo A., Calvaruso G., Vassallo B., Carlisi D., Portanova P., Vento R., Tesoriere G. *JNK and AP-1 mediate apoptosis induced by bortezomib in HepG2 cells via FasL/caspase-8 and mitochondria-dependent pathways*, Apoptosis, 11: 607-625; 2006.
64. Emanuele S., Lauricella M., Carlisi D., Vassallo B., D'Anneo A., Di Fazio P., Vento R., Tesoriere G. *SAHA induces apoptosis in hepatoma cells and synergistically interacts with the proteasoma inhibitor Bortezomib*, Apoptosis, 12:1327-1338; 2007.
65. De La Coste A., Romagnolo B., Billuart P., Renard C.A., Soubrane O., Fabre M., Chelly J., Beldjord C., Kahn A., Perret C. *Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas*, Proc. Natl. Acad. Sci U S A, 95:8847-8851; 1998.

66. Takehara T., Liu X., Fujimoto S.L., Takahashi H. *Expression and role of Bcl-XL in human hepatocellular carcinomas*, *Hepatology*, 34:55-61; 2001.
67. Puisieux A., Galvin K., Troalen F., Bressac B., Marcais C., Galun E., Ponchel F., Yakicier C., Ji J., Ozturk M. *Retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes in human hepatoma cell lines*, *FASEB J*, 7:1407-1413; 1993.
68. Chou T.C., Talalay P. *Quantitative analysis of dose effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*, *Advances in Enzyme Regulation*, 22:27–55; 1984.
69. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. *Protein measurement with Folin phenol reagent*, *J. Biol. Chem.* 193:265-275; 1951.
70. Ganten T.M., Haas T.L., Sykora J., Stahl H., Spric M.R., Fas S.C., Krueger A., Weigand M.A., Grosse-Wilde A., Stremmel W., Krammer P.H., Walczak H. *Enhanced caspase-8 recruitment to and activation at the DISC is critical for sensitization of human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by chemotherapeutic drugs*, *Cell Death Diff.* 11:86-96; 2004.
71. Tanaka F., Kawakami A., Tamai M., Nakamura H., Iwanaga N., Izumi Y., Arima K., Aratake K., Huang M., Kamachi M., Ida H., Origuchi T., Eguchi K. *IFN-gamma/JAK/STAT pathway-induced*

inhibition of DR4 and DR5 expression on endothelial cells is cancelled by cycloheximide-sensitive mechanism: novel finding of cycloheximide-regulating death receptor expression, Int J Mol Med. 15(5):833-9; 2005.

72. Meydan N., Grunberger T., Dadi H., Shahar M., Arpaia E., Lapidot Z., , Leeder J.S., Freedman M., Cohen A., Gazit A., Levitzki A., Roifman C.M. *Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor, Nature 379:645-648; 1996.*

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

74. Peuhu E., Rivero-Müller A., Stykki H., Torvaldson E., Holmbom T., Eklund P., Unkila M., Sjöholm R., Eriksson J.E. *Inhibition of Akt signaling by the lignan matairesinol sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis, Oncogene, 29:898-908; 2010.*

75. Miglietta A., Bozzo F., Gabriel L., Bocca C. *Microtubule-interfering activity of parthenolide, Chem Biol Interact. 15;149(2-3):165-73; 2004.*

76. Kurdi M., Booz G.W. *Evidence that IL-6-type cytokine signaling in cardiomyocytes is inhibited by oxidative stress: parthenolide targets*

- JAK1 activation by generating ROS*, J. Cell. Physiol. 212(2):424-31; 2007.
- 77.Ling X., Arlinghaus R.B. *Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice*, Cancer Res. 1;65(7):2532-6; 2005.
- 78.Gao L., Zhang L., Hu J, Li F., Shao Y., Zhao D., Kalvakolanu D.V., Kopecko D.J., Zhao X. and Xu D.Q. *Down-regulation of signal transducer and activator of transcription 3 expression using vector-based small interfering RNAs suppresses growth of human prostate tumor in vivo*, Clin Cancer Res. 11:6333-6341; 2005.
- 79.Catlett-Falcone R., Landowski T.H., Oshiro M.M., Turkson J., Levitzki A., Savino R., Ciliberto G., Moscinski L., Fernández-Luna J.L., Nuñez G., Dalton W.S., Jove R. *Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells*, Immunity, 10:105-1151; 1999.
- 80.Niu G., Heller R., Catlett-Falcone R., Coppola D., Jaroszeski M., Dalton W., Jove R., Yu H. *Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo*, Cancer Res. 59(20):5059-63; 1999.

INDICE

<i>INTRODUZIONE</i>	<i>pag.1</i>
<i>Epatocarcinoma</i>	<i>pag.2</i>
<i>TRAIL e i suoi recettori</i>	<i>pag.9</i>
<i>Pathway apoptotico indotto da TRAIL</i>	<i>pag.14</i>
<i>Potenziale terapeutico di TRAIL e meccanismi di resistenza</i>	<i>pag.19</i>
<i>Il partenolide</i>	<i>pag.23</i>
<i>Il pathway di segnalazione JAK/STAT</i>	<i>pag.31</i>
<i>Ruolo delle proteine STATs nel cancro</i>	<i>pag.38</i>
<i>OBIETTIVO DELLA TESI</i>	<i>pag.40</i>
<i>MATERIALI E METODI</i>	<i>pag.42</i>
<i>Condizioni di coltura</i>	<i>pag.43</i>
<i>Composti chimici e reagenti</i>	<i>pag.44</i>
<i>Valutazione della morfologia cellulare mediante microscopia a fluorescenza dopo colorazione con Hoechst 33258, arancio di acridina ed etidio bromuro</i>	<i>pag.45</i>
<i>Analisi del ciclo cellulare mediante valutazione citofluorimetrica</i>	<i>pag.47</i>
<i>Studio dell'apoptosi con annessina V-FITC</i>	<i>pag.49</i>
<i>Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale</i>	<i>pag.51</i>

<i>Preparazione degli estratti cellulari e separazione delle proteine tramite SDS-PAGE</i>	<i>pag.52</i>
<i>Western Blotting</i>	<i>pag.53</i>
<i>Trasfezione con siRNA per STAT3</i>	<i>pag.55</i>
<i>Estrazione dell'RNA</i>	<i>pag. 56</i>
<i>Retrotrascrizione e analisi di Real-Time PCR</i>	<i>pag. 58</i>
<i>RISULTATI</i>	<i>pag.60</i>
<i>Il trattamento con il partenolide sensibilizza le cellule di epatocarcinoma umano all'apoptosi indotta da TRAIL</i>	<i>pag.61</i>
<i>Effetto del partenolide sull'espressione dei recettori di morte in cellule di HCC</i>	<i>pag.70</i>
<i>La combinazione partenolide/TRAIL induce in cellule di HCC apoptosi mediata dalle caspasi</i>	<i>pag.73</i>
<i>Il partenolide inibisce la fosforilazione delle proteine STATs e JAKs</i>	<i>pag.78</i>
<i>DISCUSSIONE</i>	<i>pag.85</i>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	<i>pag.96</i>