

INTRODUZIONE

Gli estrogeni

Gli estrogeni sono ormoni steroidei derivanti dal colesterolo contenenti 18 atomi di carbonio. Gli estrogeni naturali sono il 17β -estradiolo (E_2), l'estrone (E_1) (12 volte meno potente) e l'estriolo (E_3) (80 volte meno potente). Il 17β -estradiolo (E_2) è l'ormone principale del periodo fertile della donna; esso si forma dal testosterone, grazie all'azione dell'enzima aromatasi, nelle cellule della granulosa dei follicoli ovarici ed in piccole quantità anche nei testicoli. L'estrone (E_1) è l'ormone principale del periodo della menopausa della donna; esso si forma dall'androstenedione per azione delle aromatasi e viene prodotto, oltre che nelle ovaie, nella ghiandola corticosurrenale e nei testicoli. L'estriolo (E_3) è un metabolita di estradiolo ed estrone, reazione che si verifica nel fegato e in misura minore anche in altri distretti dell'organismo; esso è inoltre prodotto dalla placenta durante la gravidanza a partire dal deidroepiandrosterone (DHEA). Gli estrogeni regolano numerosi processi fisiologici, quali la crescita, il differenziamento e le funzioni del sistema riproduttivo della donna; inoltre, tali ormoni controllano il metabolismo osseo, il sistema cardiovascolare e il sistema nervoso centrale.

Gli estrogeni regolano la risposta cellulare attraverso il legame con due specifici recettori intracellulari, $ER\alpha$ e $ER\beta$ (Estrogen Receptor α e β), fattori di trascrizione che, in assenza del ligando, sono localizzati a livello citoplasmatico e nucleare, dove sono associati alle proteine HSP (Heat Shock Proteins). In seguito al legame dell'ormone, tali recettori subiscono un cambiamento conformazionale, si dissociano dalle HSP, dimerizzano e all'interno del nucleo legano le sequenze ERE (Estrogen Response Elements), modulando l'espressione di specifici geni target. Inoltre, i recettori degli estrogeni, sono in grado di interagire con i fattori di trascrizione AP-1 (Activating Protein-1) e Sp-1 (Stimulating protein-1); tali complessi possono modulare così l'espressione di geni che non

contengono la sequenza ERE nel promotore (meccanismo ERE-indipendente) (Fig.1). La risposta agli estrogeni dipende dalla disponibilità del ligando, dalla concentrazione e dalla localizzazione dei recettori ERs, dai livelli delle proteine coregolatrici e dallo stato di condensazione della cromatina. Inoltre, il recettore ER può essere attivato indipendentemente dagli estrogeni; infatti, alcuni recettori per i fattori di crescita sono in grado di attivare chinasi responsabili della fosforilazione e dell'attivazione del recettore ER o di coregolatori ad esso associati. Un esempio è dato dal recettore HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2), il quale attiva ERK1/2 (Extracellular Regulator Kinase 1/2), che può a sua volta fosforilare e attivare ER anche in assenza degli estrogeni.

Lo stato di ER nel carcinoma mammario è stato sempre riferito al recettore ER α , anche se, oltre alle forme che coesprimono ER α e ER β , ne sono state individuate altre che esprimono solamente l'uno o l'altro recettore (Mann S et al, 2001). ER α induce l'espressione di geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, nella sopravvivenza e nella morfogenesi; inoltre, tale recettore si è rivelato importante nella prognosi dei tumori ER α -positivi, nei quali regola la risposta alla terapia endocrina. Il gene codificante ER α è regolato da diversi meccanismi, come l'amplificazione, il silenziamento determinato dalla metilazione del DNA a livello delle isole CpG localizzate nel promotore e mutazioni all'interno della ORF. Il ruolo di ER β , invece, risulta meno chiaro. La forma wild-type di tale recettore coesiste con altre quattro varianti, presenti sia nelle cellule normali che in quelle cancerose. Come indicato da alcuni studi, ER β sembra mediare effetti differenti: quando coespresso con ER α , agisce come antagonista di quest'ultimo nella regolazione della proliferazione cellulare e nell'espressione genica; quando espresso da solo, agisce in modo diverso. Infatti, studi condotti da Zhang e collaboratori hanno dimostrato che nel tumore al polmone non a piccole cellule (NSCLC), il quale esprime

soltanto il recettore ER β , gli effetti degli estrogeni sulla proliferazione cellulare sono mediati esclusivamente da tale recettore, che agisce attraverso un pathway non genomico a livello citoplasmatico (Zhang et al, 2009). ER β sembra, inoltre, regolare negativamente la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) in cellule di carcinoma alla prostata (Zhao et al, 2010).

Alterazioni nei recettori ERs o nei pathways mediati dagli stessi potrebbero essere responsabili degli effetti carcinogeni determinati dagli estrogeni, la cui azione prolungata predisporrebbe all'insorgenza del carcinoma mammario; inoltre, i metaboliti degli estrogeni, definiti catecolestrogeni (CEs), quali 4-idrossiestradiolo (4-OHE₂) e 2-idrossiestradiolo (2-OHE₂), possono essere ossidati con contemporanea formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Chen et al, 2009).

Oltre al classico meccanismo di azione degli estrogeni a livello genomico, esiste un meccanismo che si esplica mediante alcuni recettori per gli estrogeni localizzati sulla membrana plasmatica (mERs) che trasducono il segnale dopo pochi secondi o alcuni minuti dal legame ormone-recettore. Tale pathway alternativo determina l'incremento dello ione Ca²⁺, del cAMP e dell'Inositolo fosfato; si attivano così le proteine chinasi Calcio-Calmodulina-dipendenti (CAMK), PI3K/PKB (Phosphoinositide 3-kinase/Protein Kinase B), PKA (Protein Kinase A), PKC (Protein Kinase C) e la via della MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Questi pathways possono tutti interagire tra loro e convergere nella regolazione dell'espressione di specifici geni e nella sintesi proteica attraverso la rapida attivazione dei fattori di trascrizione CREBP (CRE Binding Protein) o NF-kB (Nuclear Factor kB). Gli estrogeni possono inoltre agire mediante recettori accoppiati alle proteine G. È stato infatti osservato che gli estrogeni legano, con un'affinità simile a quella per ERs, la proteina GPCR-30 (G-Protein-coupled receptor-30), un recettore accoppiato alla proteina

G eterotrimerica, costituita dalle subunità α , β e γ ; tale recettore mostra tutte le caratteristiche strutturali e funzionali dei recettori ERs associati alla membrana (mERs). GPCR-30 trasduce il segnale indotto dagli estrogeni attraverso il classico meccanismo dei recettori accoppiati alle proteine G, che prevede la dissociazione della subunità $G\alpha$, a cui segue il rilascio dei secondi messaggeri (Fig.1). Inoltre GPCR-30, mediante le subunità β/γ , è in grado di transattivare il recettore per il fattore di crescita dell'epidermide EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor); tale recettore può attivare così la via delle MAPK o di PI3K/PKB. Queste osservazioni indicano che il recettore GPCR-30 potrebbe avere un ruolo significativo nella proliferazione delle forme di carcinoma mammario che non esprimono il recettore per gli estrogeni (ER) (Filardo EJ, 2002).

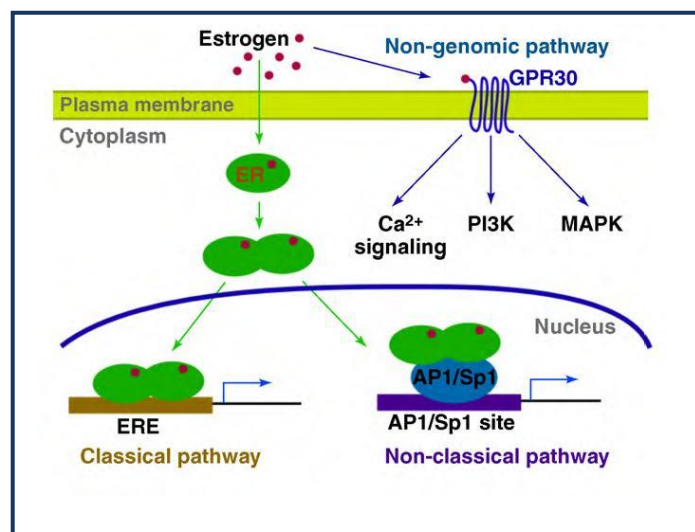


Fig.1 Pathways attivati dagli estrogeni

Il carcinoma mammario

Il carcinoma mammario è una patologia estremamente complessa ed eterogenea, caratterizzata da alterazioni biologiche che si associano a specifici aspetti morfologici e clinici. Le diverse forme di carcinoma mammario si distinguono, sulla base di analisi immunoistochimiche, per la presenza o l'assenza di tre recettori: il recettore per gli estrogeni ER α (Estrogen Receptor α), il recettore per il progesterone PR (Progesteron Receptor) e il recettore per il fattore di crescita dell'epidermide HER-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2). Più del 60% delle forme di carcinoma mammario risulta positivo a tali recettori. Una minore percentuale però, circa il 10-17%, non esprime nessuno di questi recettori e perciò è definita triplice negativa. Studi basati su analisi dei profili di espressione genica mediante microarrays, hanno consentito di effettuare un'ulteriore classificazione delle forme di carcinoma mammario: 1) la forma luminale A, positiva ai recettori ER e PR ma negativa a HER-2; 2) la forma luminale B, positiva ai recettori ER, PR e HER-2; 3) la forma che esprime elevati livelli di HER-2, ma che risulta negativa ai recettori ER e PR; 4) la forma "basal like" (BLBC), negativa a tutti e tre i recettori ER, PR ed HER-2, positiva al recettore per l'EGF (EGFR) e alle citocheratine 5 e 6 (Chen et al, 2009).

Le forme di carcinoma mammario triplici negative, che oltre alla forma "basal-like" (BLBC) comprendono anche rare forme metaplastiche e adenomatose-cistiche, presentano alcune caratteristiche comuni: a) sono prevalenti nelle giovani donne Afro-Americane e in quelle obese; b) sono associate ai geni che regolano la suscettibilità all'insorgenza del carcinoma mammario, come per esempio BRCA-1 e BRCA-2; c) sono scarsamente differenziate, altamente maligne e molto aggressive, con una cattiva prognosi e con un'elevata probabilità di sviluppare metastasi a distanza; d) presentano alterazioni nell'espressione di proteine, oncogeni e oncosoppressori coinvolti in diversi pathways che

regolano la proliferazione, la crescita cellulare e l'apoptosi; e) a causa della mancata espressione dei recettori ER, PR e HER-2, tali forme non sono sensibili alle terapie ormonali o a quelle dirette e specifiche contro tali recettori; la chemioterapia è così l'unica forma di trattamento per le forme di carcinoma mammario triplici negative, che risultano perciò associate ad un elevato tasso di recidiva locale e sistemica (Chen et al, 2009). Studi recenti hanno osservato però che terapie neoadiuvanti che impiegano antracicline e taxani possiedono una certa efficacia nel trattamento di tali forme tumorali, anche se in seguito ad una iniziale risposta, si instaurano dei meccanismi di resistenza che determinano un elevato rischio di recidiva e di mortalità (Reis-Filho et al, 2008). Le terapie neoadiuvanti prevalentemente utilizzate nei trials clinici sono gli agenti anti-tubulina, come l'Ixabepilone, i derivati del platino e i composti antiangiogenici diretti contro il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), come il Bevacizumab (Perez et al, 2010). In particolare, i derivati del platino, che agiscono formando addotti covalenti con il DNA e determinano il blocco della replicazione cellulare, si sono rivelati particolarmente efficaci. Anche gli inibitori dell'enzima PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase), che inducono tagli a livello del DNA con conseguente arresto della crescita cellulare in fase G2/M e apoptosi, trovano largo impiego in diversi trials clinici; tra questi inibitori, l'Olaparib (AZD2281) e il BSI-201, sembrano possedere una certa efficacia. Inoltre, sono in corso diversi studi per valutare l'efficacia di combinazioni dei composti neoadiuvanti, come l'associazione del Cisplatino con l'Olaparib, l'associazione del Carboplatino con il BSI-201, l'associazione del Paclitaxel e del Carboplatino con un inibitore di diverse chinasi, il Sutinib (Perez et al, 2010). Poiché il 45-70% delle forme di carcinoma mammario triplici negative overesprime il recettore dell'EGF (EGFR), è inoltre possibile impiegare delle strategie terapeutiche rivolte contro l'EGFR stesso. Esistono, infatti, diverse molecole in grado di inibire o il

dominio extracellulare dell'EGFR, come il Cetuximab (Erbix), o il suo dominio tirosin-chinasi, come il Gefitinib (Iressa) e l'Erlotinib (Tarceva); tali composti, associati alla radioterapia, mostrano potenziali effetti benefici per queste forme di carcinoma mammario. Di notevole interesse terapeutico si è rivelato inoltre l'impiego dei micro-RNAs (miRNAs), una classe di piccoli RNA non codificanti che regolano l'espressione proteica a livello post-trascrizionale; essi, infatti, interagiscono con gli mRNA e ne determinano l'inibizione della traduzione o la degradazione. In particolare, è stato osservato che la regione non tradotta al 3' dell'mRNA codificante l'EGFR contiene tre putativi siti target del microRNA-7. Studi condotti da Webster hanno dimostrato che il microRNA-7 causa il decremento di EGFR in linee cellulari di carcinoma al seno e al polmone, inducendo l'arresto del ciclo cellulare e la morte (Webster et al, 2009). Alcune forme di carcinoma mammario triplici negative mostrano un'iperattivazione della proteina mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), un target della chinasi PI3K/PKB, che regola positivamente la progressione del ciclo cellulare. Pertanto, l'inibizione di mTOR mediante macrolidi analoghi alla Rapamicina, come l'Everolimus e il Temsirolimus, sono oggetto di studio in diversi trials clinici in combinazione con la chemioterapia. Inoltre, è stata dimostrata l'efficacia del Dasatinib, un inibitore delle tirosina chinasi Src e c-Kit, in linee cellulari tumorali derivanti da forme di carcinoma mammario "basal-like" (BLBC) (Bosch et al, 2010). Alcuni dati sperimentali hanno anche dimostrato che gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) sono in grado di riesprimere il recettore ER α in linee cellulari tumorali negative per tale recettore. Ad esempio, la Tricostatina A (TSA) determina nella linea cellulare negativa al recettore α per gli estrogeni (ER α) MDA-MB231, la riespressione dell'mRNA codificante tale recettore e della proteina stessa. Tale effetto risulta più marcato quando il TSA è impiegato in associazione con l'agente demetilante 5-aza-2-

deossicitidina. Il recettore $ER\alpha$ è funzionale, come dimostrato sia dall'espressione del recettore per il progesterone (PR), un target di ER, che dalla sensibilizzazione di tali cellule al trattamento con Tamoxifene (Stearns et al, 2007).

Gli approcci terapeutici che vengono invece impiegati nel trattamento delle forme tumorali positive per ER sono molteplici: il blocco dell'interazione fra gli estrogeni (E_2) e i propri recettori (ER) impiegando antiestrogeni, definiti SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators); l'inibizione dell'enzima aromatasi, responsabile della sintesi degli estrogeni; l'impiego di specifici antagonisti del recettore $ER\alpha$, definiti SERDs (Selective Estrogen Receptor Down-Regulators). Inoltre, nelle forme di carcinoma mammario che overesprimono HER-2, viene impiegato il Trastuzumab, noto anche come Herceptin, un anticorpo monoclonale che interagisce con HER-2 e lo inibisce.

Tra tutti i SERMs, il Tamoxifene è stato il primo ad essere individuato; il Tamoxifene è un agente non steroideo, contenente un gruppo trifeniletilene in grado di interagire con il recettore ER e inibirne l'attività. Il Tamoxifene presenta comunque una parziale attività agonista a livello delle ossa e dell'endometrio, sui quali può indurre proliferazione cellulare e aumento del rischio di trasformazione tumorale in seguito a prolungata esposizione. Pertanto, nel corso degli anni, sono stati sviluppati altri SERMs con minore attività agonista, come il Raloxifene e altri SERMs di seconda e terza generazione, come il Lasofoxifene e il Bazedoxifene, senza però ottenere buoni risultati a causa dell'insorgenza di meccanismi di resistenza nelle pazienti. La classe degli inibitori dell'enzima aromatasi comprende composti steroidei, come l'Examestano e il Formastano, e non steroidei, come il Letrozolo e l'Anastrozolo. Il loro impiego è però limitato dall'insorgenza di effetti collaterali, come l'osteoporosi. I SERDs, invece, agiscono come potenti antagonisti del recettore $ER\alpha$ e, a differenza dei SERMs, non mostrano

alcuna attività agonista. Tra i SERDs maggiormente studiati troviamo il Fulvestrant, noto anche come ICI 182,780 o Faslodex, il quale possiede un'affinità di legame nei confronti del recettore ER di circa l'89% rispetto all'estradiolo (Osborne et al, 2004). Esso agisce impedendo la dimerizzazione e la traslocazione al nucleo del recettore ER α ; inoltre, il complesso Fulvestrant-recettore viene ubiquitinato, avviato al proteasoma e quindi degradato, causando una riduzione dei livelli di ER α (Long X et al, 2006). I risultati clinici ottenuti in seguito all'impiego del Fulvestrant sono stati però deludenti, per la sua scarsa biodisponibilità e per la difficoltà di raggiungere in circolo concentrazioni che risultano efficaci (McDonnel D et al, 2010).

L'anoikis

In un organismo multicellulare le cellule crescono e si differenziano se si trovano in un contesto tissutale dove interagiscono con la matrice extracellulare (ECM) e con le cellule vicine. La maggior parte delle interazioni cellula-matrice extracellulare è mediata dalle integrine, recettori eterodimerici transmembrana costituiti dalle subunità α e β , che legano le proteine della ECM. Nell'uomo sono state identificate 18 subunità α e 8 subunità β che si assemblano, mediante interazioni di tipo non covalente, costituendo 24 differenti eterodimeri. Entrambe le subunità mostrano un'ampia regione extracellulare, contenente i siti di legame per le componenti della ECM, un breve segmento transmembrana e un piccolo dominio citoplasmatico, contenente i siti di legame per le componenti del citoscheletro. In particolare, la subunità α contiene dei domini che legano lo ione Calcio (Ca^{2+}) e lo ione Magnesio (Mg^{2+}), che influenzano il legame con i ligandi della ECM, mentre la subunità β contiene un sito di legame o per la sequenza RGD (arginina- glicina- acido aspartico) presente nella fibronectina, nella laminina, nella vitronectina e nel fibrinogeno, o per la sequenza GFOGER (glicina- fenilalanina- idrossiprolina- glicina- acido glutammico- arginina), contenuta nel collagene in forma nativa. I recettori integrinici interagiscono con specifiche molecole della ECM: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, ad esempio, legano il collagene, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ legano la laminina, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ legano la fibronectina, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 1$ legano la vitronectina. Le integrine, attraverso siti diversi da quelli con cui interagiscono con le componenti della ECM, possono inoltre legare alcune tossine, che prendono il nome di disintegrine, e alcuni tipi di virus e batteri (Barczyk et al, 2010). Sul versante citoplasmatico, le integrine interagiscono con diverse proteine, quali talina, vinculina e α -actinina, che connettono le integrine con i filamenti di actina del citoscheletro formando i complessi di adesione focale; ciò determina un legame strutturale tra la matrice

extracellulare e il citoscheletro. Le integrine non provvedono soltanto all'ancoraggio fisico delle cellule alla matrice extracellulare, ma creano una struttura "scaffold" costituita da diverse proteine adattatrici e proteine chinasi, che rappresenta la sede di trasmissione di segnali tra la cellula e la matrice extracellulare; tali segnali sono in grado di indurre la proliferazione, la sopravvivenza e la migrazione (Desgrosellier et al, 2010), sia in cellule normali che in cellule cancerose. Le integrine attivano tali pathways mediante il reclutamento di proteine chinasi quali FAK (Focal Adhesion Kinase) e ILK (Integrin Liked Kinase). FAK è una tirosina chinasi non recettoriale di 125 kDa localizzata a livello delle adesioni focali. Tale proteina contiene tre domini principali: il dominio N-terminale, che rappresenta il sito di interazione con la porzione citoplasmatica della subunità β delle integrine, e la quale contiene il sito di autofosforilazione (Tyr 397); il dominio centrale con attività catalitica; e il dominio C-terminale che contiene la sequenza FAT (Focal Adhesion Targeting), che consente la localizzazione della chinasi FAK a livello dei complessi di adesione focale e la sua interazione con le proteine paxillina e talina. L'interazione fra le integrine e le molecole della ECM induce l'autofosforilazione di FAK sul residuo di Tirosina 397, creando così dei siti ad alta affinità per i domini SH2 (Src Homology 2) delle chinasi della famiglia Src e la formazione dei complessi FAK-Src. All'interno di tali complessi, Src può trans-fosforilare FAK sui residui di Tirosina 576 e 577, localizzati nel loop di attivazione, e sui residui di Tirosina 861 e 925, localizzati nel dominio C-terminale. Il complesso FAK-Src agisce così sulle proteine p130 Cas e paxillina; ciò determina la formazione di siti di legame per i domini SH2 delle proteine adattatrici Crk, che attivano piccole molecole GTPasi, come Rac1 o Cdc42, e la chinasi JNK (c-Jun N-terminal Kinase), promuovendo così la migrazione cellulare. FAK induce, inoltre, la sopravvivenza cellulare, mediante l'attivazione dei pathways mediati da PI3K/PKB e JNK, e la progressione del

ciclo cellulare attraverso la chinasi ERK e la ciclina D1. Nelle cellule tumorali, il complesso FAK-Src è inoltre in grado di promuovere sia l'invasività, mediante l'attivazione di ERK e di JNK, le quali promuovono la trascrizione dei geni codificanti le metalloproteasi MMP-2 e MMP-9, che l'angiogenesi, inducendo l'espressione di VEGF. Inoltre alcune integrine come $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$, mediante il coinvolgimento della proteina caveolin 1, reclutano due chinasi della famiglia Src, quali Fyn e Yes; queste possono reclutare le proteine Shc, Grb2 e Sos, che a loro volta attivano la chinasi ERK.

Altra chinasi attivata dai recettori integrinici è la ILK (Integrin-Linked Kinase), una proteina costituita da tre domini strutturali: un dominio N-terminale, una piccola sequenza linker e un dominio C-terminale con attività chinastica. ILK interagisce con la paxiliina, la quale regola la localizzazione della ILK stessa a livello delle adesioni focali. ILK è in grado di regolare la sopravvivenza e la proliferazione cellulare mediante fosforilazione della GSK3 β e della proteina PKB. La proteina GSK3 β , nella forma fosforilata, è inattiva ed incapace di degradare la β -catenina, che si accumula a livello nucleare dove forma dei complessi con i fattori di trascrizione della famiglia TCF/LEF e trascrive per i geni che promuovono la progressione del ciclo cellulare, come le cicline e c-myc. PKB, fosforilata sul residuo di Ser473, fosforila e inattiva la procaspasi-9 e Bad, inibendo così l'apoptosi e favorendo la proliferazione. ILK induce in molte cellule tumorali anche l'espressione del VEGF in modo dipendente da HIF1 α (Grashoff et al, 2004).

Diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di un cross-talk tra le integrine e i recettori per i fattori di crescita. Il segnale trasmesso da molti recettori per i fattori di crescita risulta infatti influenzato dall'adesione delle cellule alla matrice extracellulare, regolando così la proliferazione cellulare in modo dipendente dall'ancoraggio. In particolare, la chinasi Src è in grado di fosforilare il recettore dell'EGF (EGFR) sul residuo di Tirosina 845,

determinandone così l'attivazione in modo indipendente dal ligando (Giannoni et al, 2008). L'EGFR è una proteina di 170 kDa che contiene tre domini funzionali principali: un dominio extracellulare di legame al ligando, un dominio idrofobico transmembrana e un dominio citoplasmatico che mostra attività tirosina-chinasi. L'interazione dell'EGFR con il fattore di crescita specifico induce la sua omo o etero-dimerizzazione, con conseguente attivazione del dominio tirosina-chinasi; tale dominio è in grado di reclutare e fosforilare diverse proteine citoplasmatiche che regolano la proliferazione cellulare, la riorganizzazione del citoscheletro, la motilità e l'angiogenesi. In particolare, l'EGFR induce l'attivazione di PI3K/PKB, della fosfolipasi C, della via JAK/STAT e della cascata delle MAP-chinasi, che comprende Ras, Raf, MEK ed ERK. La fosforilazione dell'EGFR da parte dei segnali indotti dalle integrine avviene prevalentemente sui residui di tirosina 845, 1068, 1086 e 1173, ma non sul residuo 1148, principale sito di fosforilazione in risposta all'attivazione da parte dell'EGF. Inoltre, la proteina FAK è in grado di influenzare direttamente la capacità di EGFR di controllare l'attivazione di ERK e la transizione G1/M (Fig.2).

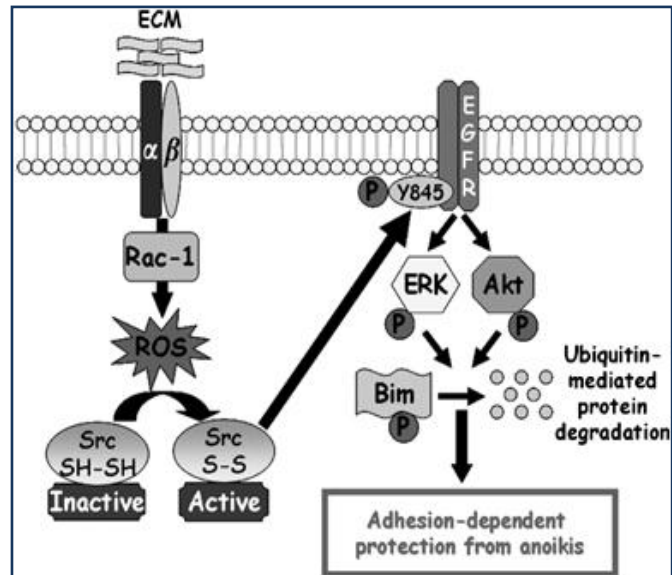


Fig.2 Cross-talk tra le integrine e il recettore dell'EGF (EGFR)

La mancata o anormale interazione delle cellule con la matrice extracellulare induce un meccanismo di morte cellulare programmata che prende il nome di “anoikis”, dal greco “senza casa”. Sebbene la dipendenza delle cellule dall’ancoraggio fosse un aspetto già conosciuto da anni, solo nel 1990 fu descritto per la prima volta il processo di anoikis da due studi condotti contemporaneamente da Schwartz e Frisch, i quali dimostrarono come la perdita di adesione delle cellule alla ECM inducesse il classico processo di apoptosi.

L’anoikis è essenzialmente una particolare forma di apoptosi mediata da diversi pathways, che convergono nell’attivazione delle caspasi, proteasi cisteina-dipendenti che agiscono su specifici residui di acido aspartico, determinando l’attivazione delle endonucleasi e la frammentazione del DNA. Tale processo vede il coinvolgimento del mitocondrio (via intrinseca) e dei recettori di morte localizzati sulla membrana citoplasmatica (via estrinseca) (Fig.3). La via intrinseca è indotta dal danno a livello del mitocondrio, dal quale vengono rilasciati nello spazio citoplasmatico Smac/DIABLO e il citocromo c. SMAC/DIABLO (Second Mitochondria derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding protein with Low pI) inibisce l’azione delle proteine IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), che regolano negativamente l’azione delle caspasi mediante la loro attività E3 ligasi. Il citocromo c si assembla con la procaspasi-9, con APAF1 (Apoptotic Protease Activation Factor 1) e con l’ATP per formare l’apoptosoma, nel quale la procaspasi-9 viene attivata. La caspasi-9, nella forma attiva, induce così l’attivazione delle caspasi effettrici -3 e -7. La via intrinseca è regolata dai fattori appartenenti alla famiglia Bcl-2, i quali regolano la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna e il rilascio di proteine mitocondriali nel citosol. Queste proteine sono caratterizzate dalla presenza dei domini BH (Bcl-2 Homology), che consentono una classificazione di tali fattori in tre gruppi. Il primo è costituito dai fattori antiapoptotici, quali Bcl-2, Bcl_{XL} e Bcl-w, i quali mostrano

quattro domini di omologia (BH1-BH4). Il secondo gruppo, che contiene i domini BH1-BH3, comprende proteine proapoptotiche come Bax, Bak e Bok. Infine, il gruppo più numeroso è costituito dalle proteine proapoptotiche contenenti un solo dominio BH e che pertanto sono indicate come BH-3 only. Fanno parte di questa famiglia Bim, Bid, Bad, Bik, Bmf, Noxa e Puma; in particolare, Bad e Noxa sono definiti “sensibilizzatori”, in quanto mancano della capacità di attivare direttamente Bax e Bak, ma sono in grado di antagonizzare le proteine antiapoptotiche. I fattori proapoptotici Bax e Bak si assemblano a formare oligomeri sulla membrana mitocondriale esterna, creando dei canali responsabili della permeabilizzazione del mitocondrio. Tale evento inoltre può derivare dall’interazione di Bax con proteine del canale mitocondriale come VDAC (Voltage Dependent Anion Channel). Sia Bax che Bak sono quindi dei mediatori essenziali dell’anoikis, come dimostrato anche da studi condotti in cellule di carcinoma mammario, nelle quali l’assenza di tali proteine impedisce l’induzione della morte per anoikis. Entrambe le proteine si trovano nelle cellule in forma inattiva; in particolare, Bak è localizzato nella membrana mitocondriale esterna, mentre Bax è localizzato nel citosol. La perdita delle interazioni della cellula con la matrice extracellulare causa una rapida traslocazione di Bax al mitocondrio, dove subisce un cambiamento conformazionale e forma complessi oligomerici. Altro membro della famiglia Bcl-2 che assume un ruolo cruciale nell’anoikis è Bim (Bcl-2 Interacting Mediator of cell death), il quale ha il ruolo di “attivatore”; infatti esso, in seguito al distacco delle cellule dalla matrice extracellulare, promuove rapidamente l’assemblaggio degli oligomeri Bax-Bak sulla membrana mitocondriale esterna. Bim è presente in tre principali isoforme generate per splicing alternativo, Bim_{EL} (extra-long), Bim_L (long) e Bim_S (short), anche se di recente ne sono state identificate molte altre. Bim_{EL} sembra essere l’isoforma più abbondante nelle

cellule, mentre Bim_S, quella che mostra una maggiore attività apoptotica, è quella meno rilevabile. L'attività apoptotica di Bim_{EL} ed _L è soppressa dal legame con la catena leggera della dineina DLC-1, una componente del complesso della dineina dei microtubuli. La perdita di adesione delle cellule alla matrice extracellulare induce il rilascio e la traslocazione di Bim_{EL} al mitocondrio, dove lega e neutralizza il fattore antiapoptotico Bcl_{XL}, mentre attiva il fattore proapoptotico Bax. Bim è regolata a livello trascrizionale da due proteine: PI3K/PKB, che fosforila e inattiva il fattore di trascrizione FOXO-3A (Forkhead Box class O), che diventa incapace di indurre la trascrizione di Bim_{EL}; ed ERK, che regola negativamente l'espressione di Bim attraverso un meccanismo ancora sconosciuto. L'inibizione di PKB o di ERK, come dimostrato da diversi dati sperimentali, induce un incremento dei livelli di mRNA per Bim_{EL}. Inoltre Bim_{EL} è regolato mediante fosforilazione sul residuo di Serina 69 da parte delle chinasi ERK1/2; tale modifica post-traduzionale favorisce un'ulteriore fosforilazione su due siti addizionali, probabilmente i residui di Ser59 e Ser104. Bim_{EL} è così ubiquitinato e degradato dal proteasoma 26S. La fosforilazione di Bim_{EL} impedisce anche il suo legame con il fattore proapoptotico Bax. La perdita dei contatti della cellula con la matrice extracellulare determina l'inibizione di ERK1/2, portando all'accumulo della forma defosforilata e attiva di Bim_{EL}.

Il pathway estrinseco della morte per anoikis è indotto dall'interazione dei ligandi di morte, come Fas Ligand (FasL), TNF- α o TRAIL, con i rispettivi recettori di morte transmembrana, Fas, TNFR e DR4/DR5. Tali recettori interagiscono, mediante i domini di morte DD, con la proteina adattatrice FADD (Fas-Associated Death Domain). FADD, a sua volta, interagisce mediante il dominio effettore di morte DED con la procaspasi-8 iniziatrice, formando così il complesso proteico DISC (Death Inducing Signaling Complex), a livello del quale la procaspasi-8 è attivata in modo auto-catalitico. Il meccanismo

attraverso cui le caspasi si attivano a livello del DISC non è esattamente noto, anche se sono state avanzate tre ipotesi. La prima spiega l'attivazione delle caspasi mediante un meccanismo di "prossimità indotta", che si verifica in seguito al reclutamento, da parte dei recettori di morte, della proteina FADD che determina a sua volta il clustering degli zimogeni delle caspasi iniziatrici, che si auto-attivano in seguito al taglio cross-proteolitico. Un altro meccanismo, di "dimerizzazione indotta dalla prossimità", ipotizza che le proteine adattatrici siano necessarie per promuovere la dimerizzazione delle procaspasi, evento fondamentale per l'attivazione delle caspasi stesse. Recentemente è stato proposto un altro modello, quello della "conformazione indotta", per cui è cruciale la conformazione dei siti attivi delle caspasi iniziatrici che interagiscono con le proteine adattatrici. Inoltre, studi condotti da Stupack e suoi collaboratori, hanno dimostrato che le integrine che perdono i contatti con la ECM sono in grado di reclutare la procaspasi-8 sulla membrana in modo indipendente da FADD. Quindi è possibile ipotizzare che in alcune linee cellulari, la perdita dei segnali indotti dalle integrine possa indurre l'attivazione della caspasi-8 attraverso un meccanismo indipendente dai recettori di morte (Valentijn et al, 2004). L'attivazione della caspasi-8 a livello del DISC può essere inibita dalla proteina c-FLIP (FLICE-Like Inhibitory Protein), della quale sono state identificate tre diverse isoforme: cFLIP_L, cFLIP_S e cFLIP_R. Tale proteina, come la procaspasi-8, possiede due domini effettori di morte e pertanto può legarsi alla proteina FADD, impedendo così il reclutamento e il processamento della procaspasi-8 stessa (Falschlehner C et al, 2007). I segnali provenienti dalle interazioni cellula-matrice extracellulare modulano sia l'attività dei recettori di morte, assieme ai rispettivi ligandi, che i livelli della proteina c-FLIP. È stato infatti osservato in cellule endoteliali, che l'adesione delle cellule alla matrice extracellulare determina l'incremento di c-FLIP,

inibendo così l'attivazione dell'apoptosi da parte di Fas. La perdita di ancoraggio alla ECM sembra invece incrementare i livelli di espressione di Fas e di Fas Ligand, e il decremento dei livelli di c-FLIP, a cui segue l'attivazione della caspasi-8 (Aoudjit et al, 2001). Inoltre, c-FLIP sembra essere regolato dalla chinasi ERK, in modo dipendente dall'adesione (Gilmore, 2005). Le cellule in cui i ligandi di morte inducono anoikis possono essere distinte in due classi, tipo 1 e tipo 2. In quelle di tipo 1 l'attivazione della caspasi-8 è sufficiente ad attivare le caspasi effettrici e la morte cellulare. In quelle di tipo 2 è necessario l'intervento di Bid, un fattore proapoptotico della famiglia Bcl-2 attivato dal taglio proteolitico operato dalla caspasi-8 in seguito all'attivazione da parte del complesso DISC. La caspasi-8 degrada Bid (p22) sul sito D59, dando origine al complesso t-Bid (p7/p15), in grado di attivare così Bax, che oligomerizza e induce la permeabilizzazione del mitocondrio. Entrambe le vie, intrinseca ed estrinseca, portano comunque all'attivazione delle caspasi effettrici, come le caspasi-3, -6 e -7. Queste caspasi attivano le nucleasi CAD (Caspase Activated endonuclease), che agiscono sul DNA rilasciando frammenti di 180-200 bp, che vengono evidenziati elettroforeticamente ed indicati come "DNA ladder"; inoltre, tali proteasi inattivano la proteina PARP, un enzima implicato nei processi di riparo del DNA e agiscono su molecole coinvolte nel signaling indotto dai recettori integrinici, quali FAK, Paxillina e Cas. In particolare, il taglio di FAK da parte delle caspasi determina il rilascio della porzione C-terminale di FAK, coinvolta nell'assemblaggio delle adesioni focali, determinando così la distruzione dell'architettura delle adesioni focali stesse e l'induzione dell'anoikis (Chiarugi et al, 2008).

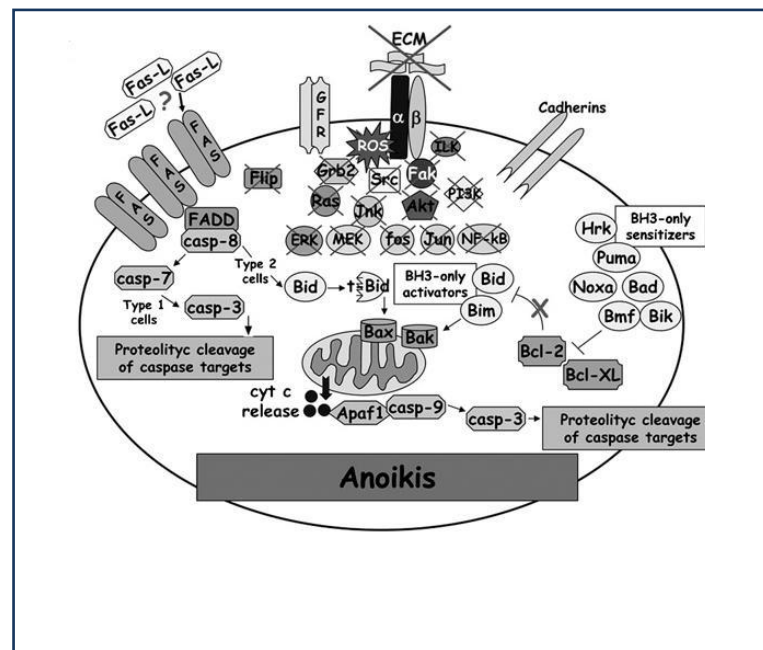


Fig.3 Via intrinseca ed estrinseca della morte per anoikis

Meccanismi di resistenza all'anoikis

L'importanza dell'anoikis in vivo può essere osservata quando le alterazioni che colpiscono il suo normale controllo favoriscono la migrazione cellulare e l'evento di metastatizzazione, processo in cui le cellule sopravvivono in assenza della ECM. Il processo di metastatizzazione, infatti, prevede il distacco delle cellule dal sito primario, le quali possono migrare così nel sistema linfatico e circolatorio, invadere i tessuti e iniziare la crescita di un tumore secondario. Le cellule tumorali che acquisiscono il potenziale maligno hanno sviluppato meccanismi per resistere all'anoikis e sopravvivere in assenza di adesione alla matrice extracellulare (Fig.4). Tali meccanismi di resistenza possono colpire sia la via intrinseca che quella estrinseca dell'anoikis. Infatti, è stato osservato che diverse cellule tumorali maligne, differentemente dalle cellule normali, nonostante l'espressione di FasL e FasR, non sono in grado di attivare le caspasi in seguito al distacco delle cellule dalla ECM. In parte la resistenza all'anoikis in cellule maligne potrebbe essere causata dall'overespressione di c-FLIP, i cui livelli risultano elevati anche in cellule che hanno perso adesione alla matrice extracellulare. Pertanto strategie terapeutiche che agiscono su c-FLIP, come l'impiego di siRNA, potrebbero ripristinare la sensibilità all'anoikis e prevenire l'insorgenza di metastasi. In diverse linee cellulari tumorali resistenti all'anoikis, si osservano inoltre elevati livelli della proteina XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), un inibitore delle caspasi -3, -7 e -9, che contrasta la via intrinseca dell'anoikis; l'impiego di siRNA diretti contro XIAP è in grado di sensibilizzare tali cellule alla morte per anoikis (Simpson et al, 2008).

Anche il signaling indotto dal recettore per il fattore di crescita dell'epidermide EGFR sembra contrastare l'evento di anoikis; è stato infatti osservato che in cellule di epitelio mammario l'overespressione di EGFR inibisce l'anoikis. Inoltre, studi sperimentali condotti

in linee cellulari di carcinoma mammario HBC4 e MDA-MB 231, in cui ERK è costitutivamente attiva, risultano resistenti all'anoikis. L'impiego di U0126 o PD98059, inibitori delle MEK1/2, incrementa la mobilità elettroforetica di Bim_{EL}, indice del decremento della sua fosforilazione; ciò determina l'accumulo della forma attiva di Bim_{EL} e la sensibilizzazione all'anoikis (Fukazawa et al, 2004; Harada et al, 2004; Uehara et al, 2008). Inoltre, in cellule MCF-10A (derivanti da tessuto mammario normale) la perdita di adesione alla matrice extracellulare si accompagna al decremento dei livelli di EGFR e il conseguente incremento di Bim. Tale evento non si osserva in cellule di carcinoma mammario, dove i livelli di EGFR restano elevati nonostante la perdita di adesione delle cellule alla ECM. In molte cellule tumorali resistenti all'anoikis è stata osservata anche l'overespressione di FAK, indicando che tale chinasi può rimanere attiva nonostante la perdita di adesione delle cellule alla matrice. FAK, infatti, oltre a promuovere la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, è capace di inibire il fattore proapoptotico Bax e la caspasi-9 (Marconi et al, 2004). In diverse linee tumorali la resistenza all'anoikis può essere superata tramite l'impiego di forme dominanti negative di FAK o la microiniezione di anticorpi anti-FAK, che favoriscono la morte cellulare in seguito al distacco delle cellule dalla ECM.

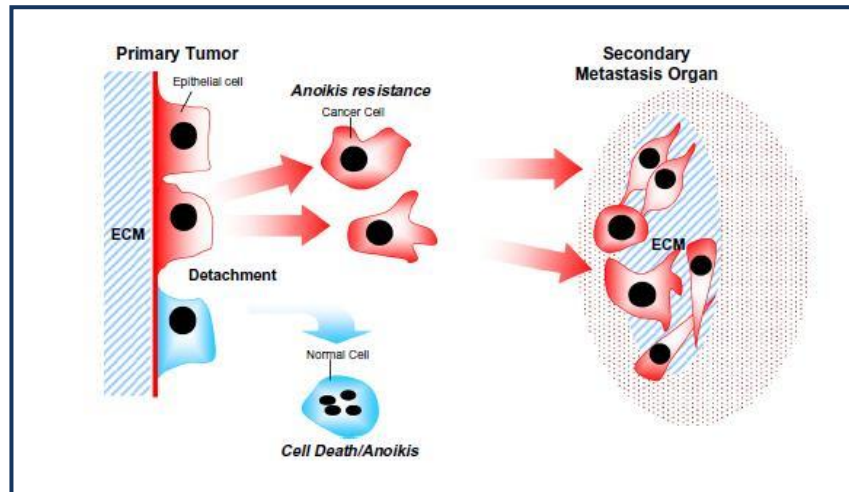


Fig.4 Resistenza all'anoikis

La regolazione dell'espressione genica

La cromatina è una struttura estremamente complessa, composta da DNA, RNA, proteine istoniche e proteine non-istoniche (Selvi BR et al, 2009). L'unità base della cromatina è il nucleosoma, che consiste in una sequenza di 146 paia di basi di DNA avvolta attorno all'ottamero che comprende due copie di ciascuna delle proteine istoniche H2A, H2B, H3 e H4. La regolazione dell'espressione genica negli eucarioti è legata, in parte, a cambiamenti dinamici della struttura della cromatina dovuti a modifiche post-traduzionali reversibili a livello delle code N-terminali degli istoni, quali acetilazione, metilazione, è quella meglio caratterizzata. Lo stato di acetilazione degli istoni è regolato da due classi di enzimi, le HAT (Histone Acetyl Trasferase) e le HDAC (Histone Deacetyl Trasferase). Le HAT trasferiscono gruppi acetili dall'Acetil Co-enzima A ai residui di lisina delle code N-terminali degli istoni; in tal modo neutralizzano la carica positiva dei residui di lisina e promuovono uno stato rilassato o "aperto" della cromatina, rendendola accessibile ai fattori di trascrizione. Le HAT possono essere classificate, in base alla propria localizzazione funzionale, in due gruppi, A e B; il gruppo A comprende le HAT presenti a livello nucleare, che sono coinvolte nella regolazione dell'espressione genica; il gruppo B comprende le HAT presenti a livello citoplasmatico, HAT1 e HAT2, maggiormente coinvolte nella modifica degli istoni di nuova sintesi prima dell'assemblaggio (Selvi BR et al, 2009).

Le acetiltrasferasi del gruppo A sono quelle maggiormente studiate e comprendono cinque famiglie classificate sulla base di omologia di sequenza e contengono tutte un dominio acetiltrasferasico (Dekker FJ et al, 2009). La famiglia GNAT comprende le acetiltrasferasi GCN5 e PCAF; GCN5 agisce prevalentemente sulle proteine istoniche, ma anche sui fattori di trascrizione TAF; PCAF, oltre ad agire a livello degli istoni, acetila le

proteine p53 ed E1A, interagisce con p300/CBP e funge da coattivatore trascrizionale. Tra le HAT, la famiglia meglio conosciuta è quella che comprende la proteina p300/CBP. Tale proteina funge da coattivatore trascrizionale e mostra una minore specificità di substrato rispetto alle altre HAT, in quanto agisce su tutte le proteine istoniche. La famiglia MYST comprende gli enzimi TIP60, MOZ, MOF, MORF e HBO1; essi sono coinvolti nella regolazione del differenziamento, dello sviluppo, del ciclo cellulare e del riparo del DNA. Talvolta, questi enzimi fanno parte di proteine di fusione responsabili dell'insorgenza del cancro. La famiglia HAT correlata ai recettori per gli ormoni nucleari comprende gli enzimi SRC4 e ACTR; essi hanno il ruolo di coattuatori dei recettori nucleari. Un'altra famiglia comprende fattori di trascrizione che posseggono attività acetiltrasferasica, come ATF2, TAF1, TFIIC90 e TAFII250; quest'ultima è una subunità del complesso TFIID, coinvolto negli eventi iniziali del processo di trascrizione (Khan SN et al, 2010).

Le HDAC, di contro, rimuovono i gruppi acetili dai residui di lisina, promuovendo una struttura condensata o "chiusa" della cromatina, impedendo così l'accesso del complesso trascrizionale alle sequenze del DNA (Emanuele et al, 2008; Mark et al 2007). Nell'uomo sono state identificate 18 differenti HDAC, classificate in base all'omologia con le HDAC di lievito e la cui attività sembra non essere ridondante.

La classe I delle HDAC risulta omologa alla deacetilasi RPD3 (Reduced Potassium Dependency 3) di *Saccharomyces cerevisiae* e comprende gli enzimi HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8. Analisi filogenetiche condotte recentemente hanno suggerito che questa classe può essere scissa in ulteriori sottoclassi: Ia, che comprende HDAC1 e HDAC2; Ib, che comprende HDAC3; Ic, costituita dalla sola HDAC8. Tale classe di enzimi, la cui struttura primaria comprende 350-500 amminoacidi e il cui peso molecolare è di circa 25-55 kDa, è localizzata prevalentemente nel nucleo (Karagiannis et al, 2007).

La classe II risulta omologa alla deacetilasi di lievito Hda1 e comprende due sottoclassi: IIa, che include HDAC 4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9, le quali presentano un unico sito catalitico; IIb, che include HDAC6 e HDAC10, le quali presentano due siti catalitici in tandem. Tale classe di enzimi, il cui peso molecolare è di circa 120-155 kDa, trasloca dal citosol al nucleo in risposta a diversi segnali cellulari e a diverse modifiche post-traduzionali.

Studi di cristallografia a raggi-X hanno individuato il sito catalitico di acetilazione delle deacetilasi istoniche di classe I e II; esso consiste in una sequenza altamente conservata di circa 390 amminoacidi, organizzato in una stretta tasca tubulare contenente pareti costituite da amminoacidi idrofobici e aromatici, e un fondo polare. Tale sito catalitico contiene due residui di istidina, due residui di acido aspartico e un residuo di tirosina; sul fondo della tasca polare è inoltre presente il cofattore metallico Zinco (II) coordinato a due residui di acido aspartico e un residuo di istidina; lo ione Zinco (II) è solitamente legato ad una molecola di H₂O, che rappresenta il sito nucleofilo che attacca il gruppo carbossilico del residuo di lisina acetilato durante la catalisi (Finnin MS et al, 1999; Vannini et al, 2004). Sulla base di studi effettuati mediante l'impiego di siRNA e modelli knock-out, sembra che gli enzimi di classe I giochino un ruolo prevalente nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare, mentre gli enzimi di classe II giochino un ruolo tessuto-specifico.

La classe III comprende le Sirtuine, omologhe alla deacetilasi Sir 2 (Silencing information regulator 2) di lievito, che presentano un unico meccanismo catalitico dipendente dal NAD⁺.

La classe IV comprende un solo enzima, HDAC11, il cui sito catalitico presenta domini di omologia con le HDAC di classe I e II, e come questi risulta dipendente dallo ione Zinco. Come le HDAC di classe II, questo enzima presenta una localizzazione tessuto-specifica.

Tutte le HDAC Zinco-dipendenti esistono come componenti di grandi complessi multiproteici, che includono coattivatori e corepressori. Per esempio l'interazione tra HDAC4 e HDAC3 è mediata da recettori ormonali nucleari che fungono da corepressori (N-CoR) e da mediatori "silencing" dei recettori degli ormoni tiroidei e dell'acido retinoico (SMRT) (Codd et al, 2009). L'attività delle HDAC è regolata a vari livelli, come le interazioni proteina-proteina, le modifiche post-traduzionali quali fosforilazione, acetilazione e sumoilazione, la proteolisi, la disponibilità dei cofattori metabolici e la localizzazione subcellulare. In particolar modo, la fosforilazione da parte di diverse chinasi (come ad esempio la proteina chinasi D1 che fosforila e regola HDAC7) e la conseguente interazione con la proteina 14-3-3 gioca un ruolo nello "shuttling" tra citosol e nucleo degli enzimi di classe II, quali HDAC4, HDAC5, HDAC7 HDAC9. L'enzima HDAC6 è invece localizzato a livello citoplasmatico grazie alla presenza di una sequenza ripetuta tetradecapeptidica.

Studi di filogenetica sulle HDAC di batteri hanno suggerito che tutte le classi di HDAC precedono l'evoluzione delle proteine istoniche. Ciò lascia ipotizzare che l'attività delle HDAC fosse inizialmente rivolta a proteine non istoniche. Infatti, le HDAC agiscono su molte proteine, modificandone la struttura e regolandone la stabilità, la funzionalità e le interazioni proteina-proteina. Tali target proteici includono: fattori di trascrizione, quali p53, NF- κ B, E2F, HIF-1 α ; mediatori della trasduzione del segnale; enzimi coinvolti nel riparo del DNA, come Ku70; proteine chaperon, come Hsp90; proteine strutturali, come l' α -tubulina; mediatori dell'infiammazione; recettori nucleari, come ER α e proteine virali (Lane et al 2009). Tali proteine target delle HDAC sono direttamente o indirettamente coinvolti in numerosi pathways cellulari, come l'espressione genica, la regolazione della proliferazione cellulare, il differenziamento, la migrazione cellulare e la morte.

Alterazioni tanto nelle HAT che nelle HDAC, responsabili di cambiamenti nell'equilibrio tra acetilazione e deacetilazione, sono state osservate in numerose forme tumorali. Modifiche della cromatina dovute alla ipercetilazione, e quindi alla derepressione di alcuni geni, o all'ipoacetilazione, e quindi alla repressione genica, potrebbero essere, infatti, alla base di alcune trasformazioni neoplastiche (Kouraklis et al, 2006). È stato osservato che soggetti con la sindrome di Rubinstein-Taybi presentano una mutazione nel gene codificante la proteina CREB, la quale inattiva la sua attività acetiltrasferasica. La perdita di eterozigotà nel gene codificante p300 è stata descritta rispettivamente nell'80% di glioblastomi e in alcune forme di carcinoma al polmone. Molte HDAC risultano overesprese in diverse forme tumorali, come il carcinoma gastrico, alla prostata e al colon. In alcuni tipi cellulari trasformati, HDAC1 interagisce direttamente con repressori trascrizionali, con le proteine "pocket" (Rb, p107 e p130) e con YY1, quest'ultime coinvolte nella deregolazione della proliferazione cellulare. Alcune forme di cancro al colon presentano livelli elevati di HDAC2 e HDAC3, coinvolte anche nella comparsa di lesioni precancerose al colon. Alti livelli di HDAC1 sono stati osservati nel carcinoma gastrico, mentre alcune forme di carcinoma mammario presentano elevati livelli di HDAC1 e HDAC3. Gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi), pertanto, mostrano un notevole interesse dal punto di vista terapeutico, in quanto possono indurre, mediante molteplici meccanismi, l'arresto della crescita e la morte per apoptosi in cellule neoplastiche.

Oltre ad alterazioni che determinano un'anormale espressione delle HDAC, è possibile osservare un loro aberrante reclutamento da parte di fattori di trascrizione generati da traslocazioni cromosomiche come PML-RAR α , che caratterizza la leucemia promielocitica acuta, e AML1-ETO, che caratterizza la leucemia mieloide acuta. Tale reclutamento è responsabile della repressione di specifici geni. Per esempio, AML1-ETO blocca i segnali

indotti dall'acido retinoico nelle cellule ematopoietiche, inibendo il differenziamento cellulare. Mutazioni strutturali delle HDAC sembrano invece essere rare nel cancro; solo una mutazione tronca di HDAC2 è stata riscontrata nelle linee cellulari di carcinoma del colon e dell'endometrio (Dokmanovic M et al 2007; Mark et al, 2009).

Inoltre, mostra un notevole interesse lo studio del legame esistente tra la deacetilazione degli istoni e la metilazione del DNA in prossimità dei promotori dei geni. La metilazione del DNA, infatti, facilita il legame delle HDAC a livello del promotore, promuovendo così la deacetilazione di quella regione. Pertanto, nei trials clinici vengono spesso impiegate combinazioni di HDACi e agenti demetilanti.

Il SAHA: un inibitore delle deacetilasi istoniche

Diverse forme tumorali sono caratterizzate da un'overespressione o da un'aberrante reclutamento delle HDAC, con conseguente ipoacetilazione degli istoni e repressione genica. Le HDAC rappresentano così un possibile bersaglio per la terapia antitumorale. È stato osservato che diversi composti sono in grado di inibire l'attività delle HDAC, favorendo uno stato acetilato e quindi decondensato della cromatina, che determina l'espressione di geni "selezionati" in grado di indurre l'arresto della crescita cellulare e la morte per apoptosi in cellule tumorali (Frew et al, 2009). Inizialmente, si riteneva che gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) modificassero l'espressione di un piccolo numero di geni (2-10%); recenti studi effettuati mediante l'impiego di microarrays, però, hanno indicato che gli HDACi modificano l'espressione di circa il 22% di geni. Diversi dati sperimentali hanno già dimostrato che gli HDACi risultano efficaci, sia da soli che in combinazione con altri agenti antitumorali, soltanto in cellule tumorali, senza mostrare alcun effetto in quelle normali; inoltre, gli HDACi, favorendo una conformazione rilassata della cromatina, possono favorire l'accesso da parte di diversi agenti antitumorali direttamente al DNA. Ad esempio, nella leucemia promielocitica acuta, dove si osserva un'aberrante reclutamento delle HDAC a livello della sequenza codificante la proteina di fusione PML-RAR α , è stata studiata l'associazione degli HDACi con l'acido trans-retinoico; tale associazione risulta efficace in modelli preclinici sia in vitro che in vivo. Inoltre, poiché l'ipermetilazione, assieme alla ipoacetilazione, coopera al compattamento della cromatina e al silenziamento genico, vengono anche impiegati in alcuni trials clinici combinazioni di HDACi con agenti demetilanti, quali 5-Azacitadina e Decitabina (Prince et al, 2009). Gli HDACi mostrano effetti sinergici quando usati in combinazione con agenti chemioterapici, come le antracicline, il carboplatino, i taxani; inibitori delle topoisomerasi,

come l'Etoposside, la Doxorubicina ed Ellipticina; analoghi dei nucleotidi, Gemcitabina e Fludarabine; inibitori delle chinasi, come l'Imatinib; inibitori del proteasoma, come il Bortezomib; induttori di apoptosi, come TRAIL; anticorpi monoclonali diretti contro l'EGFR-1, il Trastuzumab, o contro il CD20, il Rituximab; inibitori dell'EGFR, come l'Erlotinib; inibitori delle CDK, come il Flavopiridolo; inibitori della PI3K, LY294002; inibitori delle MEK 1/2, PD184352; inibitori del fattore NF-kB, BAY-117082 (Siegel et al, 2009; Codd et al, 2009; Richon et al, 2009; Carlisi et al, 2009; Emanuele et al, 2007).

Tutti gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) hanno in comune tre caratteristiche strutturali: un dominio di legame allo ione Zinco (II), una regione "capping" all'estremità opposta, ed una catena alchile, vinile o arile che connette le due regioni, la quale si inserisce nel tunnel idrofobico delle HDAC (Marks et al, 2009). Gli inibitori delle HDAC Zinco-dipendenti possono essere classificati in sei grandi gruppi: gli acidi grassi a catena corta, come il Sodio Butirrato (NaB) e l'Acido Valproico (VPA); gli acidi idrossammici, come la Tricostatina A (TSA), il SAHA, l'ITF2357, il Panobinostat, il PCI-24781; gli epossichetoni, come il Trapoxin e l'HC-toxin; i tetrapeptidi ciclici, come l'Apicidina e il Depsipeptide; gli epossidi, come il Depudecin, e le benzamidi, come l'Entinostat (MS27-275) e l'MGCD0103 (Lane et al, 2009; Tan et al, 2010). Molti di questi HDACi sono impiegati in diversi trials clinici, da soli o in associazione con altri composti antitumorali. Tali HDACi, che agiscono sulle HDAC di classe I e II, non mostrano però alcun effetto sulle HDAC di classe III, per le quali sono stati sviluppati specifici inibitori come il Sirtinol (Sir2 inhibitor naphthol). Gli acidi idrossammici rappresentano ad oggi la classe più efficace di HDACi, in quanto sono in grado di agire a basse concentrazioni, inducendo in cellule tumorali l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi e il differenziamento (Monneret, 2005). Il SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid), noto anche come Vorinostat o Zolinza, è un acido

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

carcinoma del seno, del Linfoma Non-Hodgkin (NHL), del Linfoma Hodgkin, del cancro al polmone non a piccole cellule (NSCLC), del carcinoma del colon-retto, del carcinoma ovarico (Siegel et al, 2009).

Il SAHA agisce inducendo l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 o G2/M; esso determina infatti un incremento dell'espressione degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti, come p21^{WAF1/CIP1} e p27^{Kip1}, o un decremento delle cicline, come ciclina D1 e ciclina A (Richon et al, 2000); è stato inoltre osservato che il SAHA favorisce uno stato ipofosforilato della pRb (Huang et al, 2000). Il SAHA è anche in grado di attivare i pathways intrinseco ed estrinseco dell'apoptosi in cellule trasformate. Esso agisce, infatti, incrementando l'espressione dei recettori di morte e dei rispettivi ligandi come Fas/FasL e TRAIL/DRs, e delle proteine proapoptotiche della famiglia Bcl-2, quali Bim, Bmf, Bak, Bid; inoltre, il SAHA decrementa l'espressione di c-FLIP, un regolatore negativo dell'attivazione della caspasi-8, dei fattori antiapoptotici della famiglia Bcl-2, quali Bcl-2 e Bcl-XL e dei fattori di sopravvivenza Akt, c-Raf, Survivina, XIAP e c-IAP2 (Emanuele et al, 2007; Bali et al 2005; Carlisi et al, 2009; Mtsiades et al, 2005).

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

Il SAHA è anche in grado di bloccare l'angiogenesi, riducendo l'espressione di fattori proangiogenici, come HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1) e VEGF, e l'invasività, decrementando i livelli delle metalloproteasi (MMPs) (Emanuele et al, 2008; Heider et al,

2006) (Fig.5). HIF-1 α è in grado di interagire con la proteina HSP90, che viene inibita dal SAHA, determinando così la degradazione proteasoma-dipendente di HIF1 α stesso. È stato osservato che il SAHA è in grado di esercitare la sua azione citotossica anche mediante induzione di stress ossidativo e incremento dei ROS (specie reattive dell'ossigeno); tale evento è inibito dall'impiego della N-acetilcisteina (Portanova et al, 2008). L'incremento dei ROS è inoltre favorito dalla capacità del SAHA di indurre l'espressione della proteina TBP-2 (Thioredoxin Binding Protein-2), la quale inibisce l'attività dell'enzima tioredossina (TRX), uno "scavenger" endogeno dei ROS (Butler et al, 2002; Marks et al, 2005). L'enzima tioredossina è inoltre un inibitore della proteina ASK1, la quale promuove l'apoptosi attivando il pathway di JNK e MKK3/MKK6-p38 e incrementando l'espressione della proteina proapoptotica Bim.

Osservazioni sperimentali hanno dimostrato che il SAHA è in grado di acetilare, oltre alle proteine istoniche, anche alcune proteine non istoniche. Tra queste troviamo p53 (Carlisi et al, 2008), la quale induce il processo apoptotico, e HSP90 (Mühlenberg T, 2009), un target della HDAC6, la quale regola diverse proteine coinvolte nell'apoptosi e nella regolazione del ciclo cellulare. Il SAHA è inoltre in grado di indurre pathways di morte alternativi, come l'autofagia, un meccanismo di morte caspasi-indipendente, caratterizzato dall'accumulo di fagolisosomi (Hrzenjak et al, 2008; Yamamoto et al, 2008).

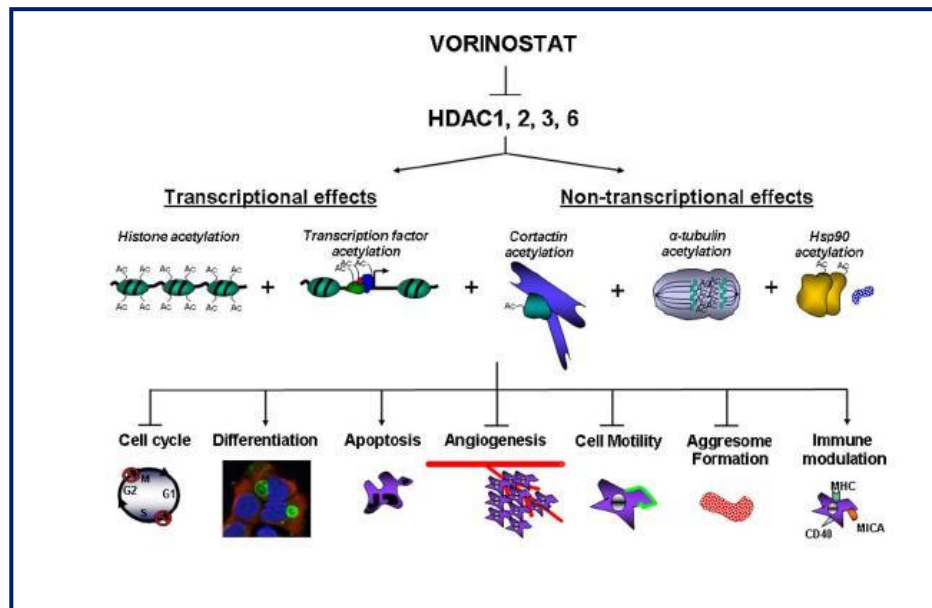


Fig.5 Meccanismi di azione del Vorinostat (SAHA)

TRAIL

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), chiamato anche Apo2L, è una proteina transmembrana di tipo II appartenente alla superfamiglia del TNF. TRAIL è espresso naturalmente sulla superficie di alcune cellule del sistema immunitario, come i linfociti T, le cellule NK, i macrofagi e le cellule dendritiche. TRAIL contiene un corto dominio citoplasmatico N-terminale e un lungo dominio C-terminale extracellulare, il quale può essere tagliato proteoliticamente, dando così origine alla forma solubile e attiva di TRAIL. TRAIL presenta una struttura omotrimerica, la quale contiene un atomo di Zinco legato ai residui di cisteina in posizione 230 di ciascuna subunità, legame che assicura la stabilità e l'attività biologica della stessa molecola di TRAIL. Tale omotrimerico agisce mediante il legame a specifici recettori: DR4 (Death Receptor-4 o TRAIL-R1) e DR5 (Death Receptor-5 o TRAIL-R2), definiti recettori di morte; DcR1 (Decoy Receptor-1 o TRAIL-R3) e DcR2 (Decoy Receptor-2 o TRAIL-R4), definiti recettori “decoy” o trappola, e il recettore solubile Osteoprotegerina (Holland PM, 2011) (Fig.6).

I recettori di morte DR4 e DR5 contengono nella porzione extracellulare dei domini ricchi in residui di cisteina (CRD, Cysteine-Rich Domain), che regolano l'affinità di tali recettori al ligando, e nella porzione citoplasmatica un dominio di morte (DD, Death Domain). Inoltre, DR5 presenta due varianti di splicing, la forma più lunga DR5_L (TRAIL-R2L) e quella più corta DR5_S (TRAIL-R2S), che differiscono per la presenza di 23 amminoacidi nel dominio extracellulare localizzato tra il dominio transmembrana e il primo dominio CRD; per tali forme di splicing non sono state però evidenziate delle differenze funzionali. Tali recettori di morte DR4 e DR5 sono in grado, mediante interazioni omo o eterotrimeriche, di trasdurre il segnale di morte.

Oltre a questi recettori di morte, vi sono anche i recettori definiti “decoy”, DcR1 e DcR2. Tali recettori mostrano omologia con il dominio extracellulare dei recettori di morte; tuttavia, essi non sono in grado di trasdurre il segnale apoptotico. DcR1, infatti, manca completamente del dominio citoplasmatico e di quello transmembrana ed è ancorato alla membrana citoplasmatica mediante un residuo GPI (glicosil-fosfatidilinositolo), diversamente da DcR2 che contiene una porzione citosolica con un dominio di morte DD tronco. I recettori “decoy” possono inibire l’apoptosi indotta da TRAIL perché competono con i recettori di morte DR4 e DR5 per il legame con il ligando oppure perché interagiscono con i recettori di morte e formano eterocomplessi non funzionali; è stato infatti osservato, mediante esperimenti di immunoprecipitazione, che DR5 e DcR2 interagiscono indipendentemente da TRAIL e che il dominio PLAD (pre-ligand assembly domain) dello stesso DcR2 è necessario in tale interazione per impedire l’azione di TRAIL (Falschlehner et al, 2007). In contrasto, Merino propone un modello dipendente da TRAIL nel determinare l’interazione DR5-DcR2, che impedisce la formazione di un complesso DISC funzionale (Merino et al, 2006).

L’Osteoprotegerina (OPG) è un altro recettore di TRAIL, che si trova in forma solubile. Essa agisce prevalentemente come regolatore dello sviluppo e dell’attivazione degli osteoclasti nel rimodellamento delle ossa. La sua funzione in seguito all’interazione con TRAIL rimane sconosciuta, anche se probabilmente lo sequestra nello spazio extracellulare e ne impedisce l’azione.

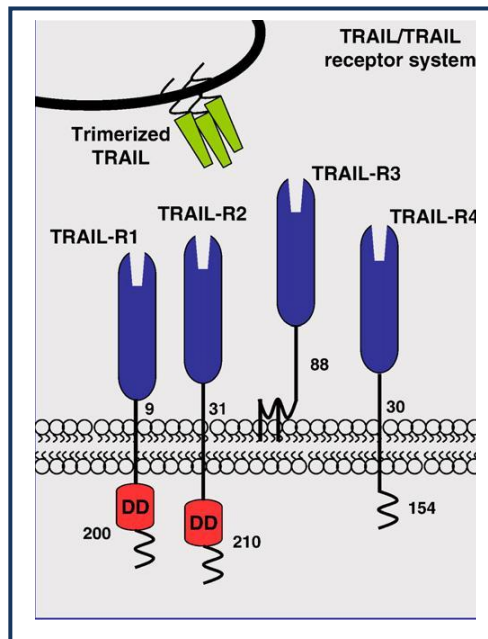


Fig.6 Recettori di TRAIL

Il legame di TRAIL induce la trimerizzazione degli stessi recettori di morte DR4 e DR5, i quali mediante i domini di morte DD interagiscono con la proteina adattatrice FADD (Fas-Associated Death Domain). FADD, mediante il dominio DED, interagisce con la procaspasi-8, formando così il complesso proteico DISC, a livello del quale la procaspasi-8 è attivata. Il segnale proveniente da questo complesso multiproteico attiva a sua volta le caspasi effettrici, come le caspasi-3, -6 e -7, che agiscono su diversi substrati e inducono apoptosi. La caspasi-8 inoltre può agire sulla proteina Bid, dando origine alla forma tronca e attiva, t-Bid, che attiva il pathway mitocondriale (Fig.7).

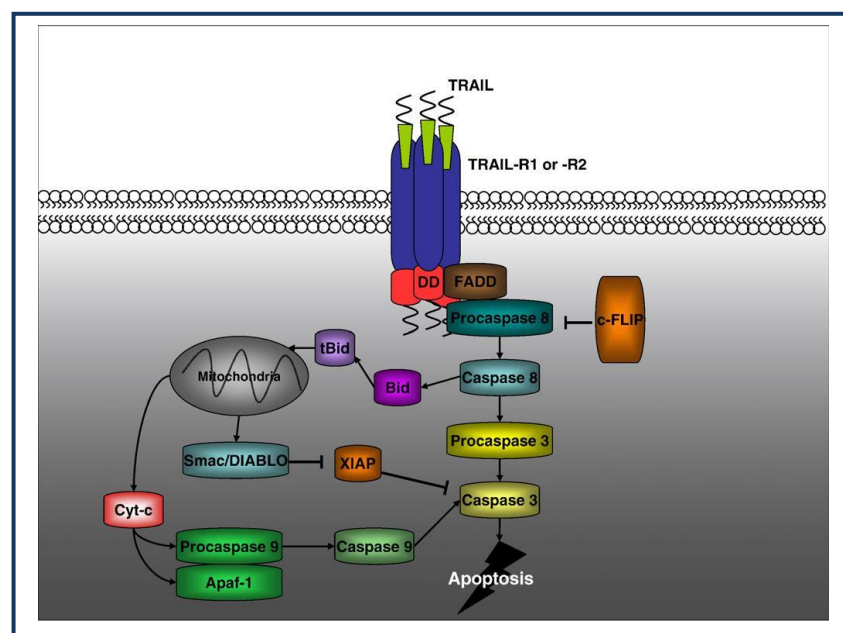


Fig.7 Pathway attivato da TRAIL

TRAIL induce apoptosi in un'ampia varietà di linee cellulari tumorali, ma non in cellule normali. TRAIL è impiegato in diversi trials clinici nella terapia del cancro, sia come molecola ricombinante rhApo2L/TRAIL, sia come anticorpo monoclonale con attività agonista legante i recettori di morte, quali DR4, attivato da Mapatumumab (HGS-ETR1), o DR5, attivato da Lexatumumab (HGS-ETR2), Apomab (PRO95780), TRA-8 (CS-1008), AMG-655 e LBY-135. Molte linee tumorali risultano però resistenti all'azione di TRAIL. Tale resistenza potrebbe essere causata da un decremento dei recettori di morte per TRAIL, DR4 o DR5, o da un incremento dell'espressione dei recettori "decoy" DcR1 e DcR2; inoltre è stato osservato che la resistenza a TRAIL potrebbe essere causata da un decremento dei livelli delle caspasi (dovuto per esempio al silenziamento epigenetico del gene codificante la caspasi-8, come si verifica nel neuroblastoma e in alcuni glioblastomi), dei fattori proapoptotici Bax o Bak, dalla diminuzione del rilascio di Smac/DIABLO dal mitocondrio o dall'overespressione degli inibitori delle caspasi come XIAP, cIAP2, del fattore antiapoptotico c-FLIP, dei fattori antiapoptotici della famiglia Bcl-2, quali Bcl-2, Bcl_{XL} o Mcl-1 (Thorburn A et al, 2008). Alterazioni dei recettori di morte DR4 e DR5 sono state osservate in diversi tumori, quali carcinoma al seno, al polmone, allo stomaco, al colon-retto, alla prostata, al fegato, all'ovaio, alla testa e al collo, e linfoma non-Hodgkin. In particolare mutazioni nel dominio di legame al ligando sono associate ad un'elevata incidenza di carcinoma alla vescica. È stato osservato inoltre che il cromosoma 8p21-22, ove sono localizzati i geni codificanti i recettori di TRAIL, rappresenta un hot-spot per delezioni ed è frequentemente soggetto a perdita di eterozigotà. I recettori di morte possono essere anche silenziati epigeneticamente, come si verifica per esempio nel melanoma e nel cancro all'ovaio. Per superare tale resistenza a TRAIL, sono stati individuati alcuni composti in grado di sensibilizzare tali cellule alla via di TRAIL. Tra questi

troviamo diversi agenti chemioterapici (Cisplatino, Paclitaxel, Carboplatino, 5-Fluorouracile), inibitori del proteasoma, inibitori delle deacetilasi istoniche, inibitori di NF- κ B, agenti che inducono danno al DNA, FANS, radiazioni ionizzanti, anticorpi monoclonali come Rituximab e Bevacizumab. In particolare, alcune osservazioni sperimentali hanno dimostrato una particolare efficacia degli inibitori delle deacetilasi istoniche nella sensibilizzazione di diverse linee cellulari tumorali all'apoptosi indotta da TRAIL. Il SAHA infatti determina non solo un incremento dei recettori di morte DR4 e DR5 e un decremento di c-FLIP, ma induce anche la formazione del complesso DISC (Carlisi et al, 2009). Inoltre, è stato osservato che la tricostatina A (TSA) induce il decremento di EGFR e la defosforilazione di ERK in cellule di carcinoma ovarico, suggerendo che l'inibizione del pathway dell'EGFR è associato alla sensibilizzazione alla via di TRAIL. Ciò potrebbe essere determinato dalla regolazione di c-FLIP da parte di PI3K/Akt e delle MAPK (Park et al, 2009). A determinare la sensibilità alla via di TRAIL contribuiscono anche i miRNAs, mediante il controllo dell'espressione dei recettori di morte e delle componenti del DISC. Ad esempio i MiR-145 e -216 regolano rispettivamente DR4 e DR5, mentre i MiR-182 e -96 regolano la proteina adattatrice FADD.

Alcune modifiche post-traduzionali a cui sono sottoposti i recettori DR4 e DR5, possono aumentare la sensibilità alla via di TRAIL. Tra queste troviamo la O-glicosilazione, che potrebbe aumentare il clustering dei recettori indotto dallo stesso TRAIL (Russo et al, 2010) e promuovere quindi la formazione del complesso DISC e l'attivazione della caspasi-8. Di recente è stato osservato che la localizzazione dei recettori di morte all'interno dei "lipid rafts" rappresenta un meccanismo essenziale per l'efficiente induzione dell'apoptosi da parte di TRAIL. Sebbene il meccanismo molecolare del "clustering" dei recettori di morte nei "lipid rafts" non sia stato completamente chiarito, è stato

ipotizzato un possibile meccanismo, nel quale TRAIL stimola l'accumulo di acido arachidonico mediante il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questo evento induce la traslocazione della sfingomielinasi (ASM) sulla membrana plasmatica e la sua attivazione, portando alla produzione di ceramide. Le caveole ricche in ceramide promuovono così il clustering del recettore DR5 e un incremento della sensibilità a TRAIL. L'importanza di questa iniziale reazione redox è supportata dal fatto che l'inibizione con antiossidanti come l'N-acetilcisteina blocca l'attivazione dell'enzima ASM e l'apoptosi indotta da TRAIL. Inoltre, la localizzazione dei recettori di morte DR4 e DR5 al di fuori dei lipid rafts può indurre segnali di sopravvivenza; infatti, è stato osservato che in cellule di carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) che risultano resistenti a TRAIL, i recettori di morte sono localizzati al di fuori dei lipid rafts e il trattamento con TRAIL determina l'attivazione di segnali di sopravvivenza mediati da NF- κ B ed ERK (Pennarun et al, 2010; Griffith et al, 2009). Oltre al pathway apoptotico mediato dalle caspasi, TRAIL può anche indurre un pathway non-apoptotico che porta alla sopravvivenza cellulare mediata da NF- κ B, PKB/Akt e MAPK. La decisione di quale pathway sarà attivato dipende dalla concentrazione di TRAIL e dalla cinetica e dalla stechiometria delle interazioni con il DISC. NF- κ B rappresenta una famiglia di fattori di trascrizione, che agiscono in forma omomero o etero-dimerica, responsabili dell'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria, nello sviluppo e nella proliferazione cellulare. NF- κ B nella forma inattiva è sequestrato nel citosol dai fattori appartenenti alla famiglia I κ B (Inhibitor of NF- κ B). In seguito all'attivazione delle Kinasi IKK, I κ B è fosforilato e poliubiquitinato e degradato dal proteasoma 26 S, consentendo il rilascio di NF- κ B che può traslocare al nucleo e regolare l'espressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare (ciclina D1) e nell'apoptosi (fattori antiapoptotici, quali c-IAP1, c-IAP2, XIAP, c-FLIP, Bcl-XL, Bcl-2). È noto che nel

sistema TNF/TNFR è reclutata, mediante il dominio di morte, la proteina RIP (Receptor-Interacting Protein) che può interagire con il complesso NEMO (NF- κ B Essential Modulator)/IKK γ (I κ B Kinase γ). Ciò determina il reclutamento delle proteine IKK α (I κ B Kinase α) e IKK β (I κ B Kinase β), le quali fosforilano la proteina I κ B, causando la degradazione di I κ B e l'attivazione di NF- κ B. È stato ipotizzato che un simile meccanismo potrebbe essere responsabile dell'attivazione di NF- κ B da parte di TRAIL in seguito al legame con i recettori DR4, DR5 e DcR2; alcune evidenze sperimentali hanno dimostrato infatti il coinvolgimento di RIP nell'attivazione di IKK all'interno del complesso DISC indotto da TRAIL. RIP inoltre può attivare la proteina NIK (NF- κ B-activating Kinase), un membro della famiglia delle MAPKKK (Mitogen- Activated Protein Kinase Kinase Kinase), che a sua volta può fosforilare e attivare il complesso IKK. È interessante il duplice ruolo che può avere RIP nel determinare il destino cellulare: uno dipendente dalla caspasi-8, dove il prodotto di taglio C-terminale di RIP generato durante la stimolazione con TRAIL o TNF è responsabile dell'induzione dell'apoptosi; forme mutate di RIP, che non possono essere attivate dal taglio della caspasi 8, attivano invece NF- κ B e proteggono la cellula dall'apoptosi. Nel reclutamento di RIP da parte del complesso TNF/TNFR è coinvolta anche la proteina adattatrice TRADD (TNF receptor-1 associated death domain protein). TRADD a sua volta recluta la proteina TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), che sembra essere essenziale per il reclutamento di IKK. Il coinvolgimento di TRAF2 nell'induzione di NF- κ B da parte di TRAIL, però, non è stato completamente accertato. TRAIL quindi può attivare un secondo complesso, oltre al DISC, che contiene FADD, TRADD, RIP, che potrebbe essere cruciale per l'attivazione di NF- κ B in seguito all'induzione da parte di TRAIL. Nelle cellule cancerose che mostrano un'attivazione

costitutiva di NF- κ B, la specifica down-regulation di NF κ B mediante inattivazione di IKK sensibilizza le cellule alla via di TRAIL (Le Blanc et al, 2003).

Inoltre, DR4 e DR5 attivano alcuni membri della famiglia delle MAPKs, che comprendono ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK e p38-MAPK. L'attivazione di ERK da parte di TRAIL è associata a funzioni antiapoptotiche. Infatti studi recenti dimostrano che l'attivazione di ERK sopprime l'apoptosi mediata da TRAIL e inibisce il processamento della caspasi-8 e di Bid. Pertanto, l'inibizione di ERK, favorisce l'apoptosi indotta da TRAIL in cellule di carcinoma mammario. Altro importante fattore di sopravvivenza attivato da TRAIL è la proteina Akt; essa appartiene alla famiglia di chinasi cAMP- dipendente (AGC) e gioca un ruolo importante nel metabolismo, nella crescita, nell'apoptosi e nella sopravvivenza cellulare. Akt agisce su diversi substrati, inattivandoli, quali IKK, le proteine CREB (cAMP response element binding protein), il coattivatore trascrizionale YAP (Yes-associated protein), il fattore proapoptotico Bad e la procaspasi-9, contrastando così la morte per apoptosi. L'attivazione di Akt da parte di TRAIL può selettivamente incrementare l'espressione dei livelli di c-FLIP e contribuire alla resistenza a TRAIL. Akt inoltre attiva mTOR, che a sua volta incrementa la traduzione di c-FLIP. Esiste inoltre una relazione tra Akt ed NF- κ B; infatti Akt può tanto fosforilare IKK α che attivare NF- κ B in modo dipendente dalla trascrizione stimolando il dominio di transattivazione di p65, una subunità di NF- κ B.

Obiettivo della tesi

Nella Sezione di Scienze Biochimiche del Dipartimento di Biomedicina sperimentale e Neuroscienze cliniche, dove ho sviluppato tale progetto di ricerca, da tempo si studiano i meccanismi apoptotici indotti da diversi composti, impiegando come modello sperimentale cellule tumorali umane in coltura. Gli studi riportati in questa tesi sono stati condotti in cellule MDA-MB 231, una linea di adenocarcinoma mammario umano altamente aggressiva, isolata da metastasi a livello della pleura. Tale linea cellulare è caratterizzata dalla mancata espressione del recettore $ER\alpha$ degli estrogeni, dall'overespressione del recettore per l'EGF (EGFR) e dalla presenza di una forma mutata di p53, che mostra una sostituzione amminoacidica (G/A) nel codone 280 del gene corrispondente. Sembra che gli elevati livelli del recettore per l'EGF siano determinati dalla mancata espressione del recettore degli estrogeni ER. Infatti, l'mRNA dell'EGFR è regolato negativamente dal recettore ER, che interagisce con una sequenza di regolazione negativa di 96 bp localizzata nel primo introne del gene codificante l'EGFR (Zhou et al, 2009).

Evidenze sperimentali indicano che le cellule MDA-MB231 sono resistenti all'anoikis, una particolare forma di apoptosi indotta dalla perdita di adesione delle integrine con la ECM; ciò è probabilmente dovuto alla presenza in tale linea cellulare di una forma costitutivamente attiva della chinasi ERK e da livelli molto bassi della proteina BimEL. Inoltre, i recettori integrinici sono responsabili della trasmissione di segnali di proliferazione che favoriscono la crescita e l'invasività. Nelle cellule di carcinoma mammario MDA-MB 231 è stata osservata una iperespressione delle integrine $\alpha6\beta1$, $\alpha5\beta1$ e $\alpha3\beta1$ che mediano segnali di sopravvivenza e proteggono dall'anoikis.

Le forme di carcinoma mammario prive del recettore per gli estrogeni, oltre ad essere insensibili alla terapia ormonale, risultano quindi particolarmente aggressive. Pertanto, oggi la ricerca scientifica è rivolta all'individuazione di composti che risultino efficaci per il trattamento di queste forme tumorali altamente invasive. Presso i laboratori dove ho sviluppato questa tesi, è stata già dimostrata l'efficacia del SAHA in cellule di epatocarcinoma umano HepG2, dove agisce inducendo il pathway apoptotico estrinseco, con l'incremento di Fas/L, Fas receptor e attivazione della caspasi-8, e quello intrinseco, incrementando i livelli di Bim, stimolando lo splicing alternativo del trascritto Bcl_x, a favore dell'espressione dell'isoforma proapoptotica Bcl_{x_s}, ed inducendo l'attivazione di Bid. Inoltre, è stato dimostrato che il SAHA è in grado di sensibilizzare diverse linee cellulari di epatocarcinoma umano (HepG2, Hep3B, SkHep1) all'apoptosi indotta da TRAIL. Tale effetto si esplica mediante l'incremento dell'espressione dei recettori di morte DR4 e DR5 e il decremento dei livelli di c-FLIP. Studi sperimentali riportati in letteratura e da noi confermati, dimostrano che le cellule MDA-MB231 risultano resistenti all'azione del ricombinate TRAIL. Sulla base di queste osservazioni, l'obiettivo del mio studio è stato quello di valutare l'efficacia del SAHA nel sensibilizzare tale linea cellulare alla via di TRAIL.

MATERIALI E METODI

Condizioni di coltura delle cellule MDA-MB231

Le cellule MDA-MB231 sono coltivate in fiasche da 75 cm² in presenza di terreno di coltura Doubecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), addizionato con siero bovino fetale (FBS) al 10% inattivato al calore (56°C per 30 min.), amminoacidi non essenziali (NEA) all'1%, glutammina 2mM e antibiotico anti-micotico (1%) (miscela di penicillina-streptomicina 0.5%). Tale linea cellulare è mantenuta in incubatore alla temperatura di 37°C in atmosfera umidificata costituita dal 95% di aria e dal 5% di CO₂. Le cellule crescono adese al substrato di polistirene delle fiasche disponendosi in monostrato.

Per studiare gli effetti dei composti, le cellule sono state staccate dal substrato utilizzando una soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA) e seminate in piastre da 6 pozzetti (2x10⁵ cellule/2 ml di terreno di coltura). Le cellule sono state quindi poste in incubatore a 37°C overnight per favorirne l'adesione al supporto, ed in seguito sono state trattate con il SAHA, o il TRAIL ricombinante, o l'associazione SAHA/TRAIL. Le cellule che in seguito al trattamento combinato SAHA/TRAIL hanno perso adesione al substrato, sono state separate da quelle adese prima di essere sottoposte alle analisi successive.

Reagenti

La soluzione di SAHA è stata preparata in dimethylsulfoxide (DMSO), la cui concentrazione finale non eccede mai lo 0.04%, concentrazione oltre la quale il DMSO risulta essere tossico per le cellule; la soluzione di TRAIL è stata preparata invece in H₂O sterile. Tutti i composti sono stati diluiti poi alla concentrazione finale nel terreno di coltura. Per ogni esperimento viene riportata una prova controllo, che si riferisce a cellule MDA-MB231 trattate con il solo veicolo con cui è stato solubilizzato il composto preso in

esame. Il SAHA è stato acquistato presso la ditta Italfarmaco S.p.a (Milano). Il TRAIL ricombinante, contenente i residui amminoacidici compresi tra 141 e 281 del TRAIL naturale, è stato acquistato presso la ditta Peprotech (EC Ltd, Londra, UK). L'AG1478, un inibitore specifico dell'attività tirosina chinasi dell'EGFR, è stato acquistato presso la ditta Calbiochem (UK). Lo z-IETD-fmk, un inibitore specifico della caspasi-8, è stato acquistato presso la ditta Clontech (Palo Alto, CA).

Colorazione con Trypan blue

Le cellule MDA-MB231 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (2×10^5 cellule/2 ml di terreno di coltura) e poste in incubatore a 37°C overnight per favorirne l'adesione al supporto. Le cellule sono state quindi trattate con i composti. La percentuale di cellule che in seguito ai trattamenti ha perso adesione al substrato è stata calcolata mediante conta cellulare impiegando il Trypan blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) alla concentrazione finale di 0.1 % (diluito in PBS, Phosphate-Buffered Saline, pH 7.4).

Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

La distribuzione della popolazione di cellule MDA-MB231 nelle diverse fasi del ciclo cellulare è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica che impiega lo Ioduro di Propidio (IP), una molecola fluorescente che si intercala nella doppia elica del DNA. Per permettere che lo Ioduro di Propidio penetri all'interno del nucleo, le cellule sono state lisate con una soluzione ipotonica, che consente la rottura soltanto della membrana plasmatica lasciando integra quella nucleare. Il quantitativo di DNA che viene rilevato è correlato alle fasi del ciclo cellulare in cui le cellule si trovano. La fase G_0/G_1 è quella in cui

le cellule possiedono un corredo cromosomico diploide ($2N$). Dopo la sintesi del DNA nella fase S, le cellule entrano in fase G_2/M e, prima della citodieresi, presentano un corredo cromosomico tetraploide ($4N$). Poiché l'intensità della fluorescenza è proporzionale alla quantità di IP che si intercala nel DNA, risulta evidente che le cellule in fase G_2/M mostrano una fluorescenza maggiore rispetto a quella delle cellule in fase G_0/G_1 . Le cellule con DNA frammentato, indice di un possibile evento apoptotico, incorporano invece una minore quantità di Ioduro di Propidio e sono quindi confinate in un picco a più bassa fluorescenza detto picco sub- G_0/G_1 .

Per l'analisi del ciclo cellulare, le cellule MDA-MB231 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (2×10^5 /2ml di terreno di coltura per condizione) e, dopo incubazione con i composti, sono state staccate con una soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA), prelevate, lavate con PBS, risospese in una soluzione ipotonica di fluorocromo (Ioduro di propidio 50 μ g/ml, Sodio Citrato 0.1%, Nonidet P-40 0.1% e RNasi 100 μ g/ml) ed in seguito incubate al buio alla temperatura di 4 °C per almeno 2 ore. Per tale analisi è stato impiegato il citofluorimetro FACScan (Beckman Coulter Epics XL), utilizzando il software Expo32 per l'elaborazione dei dati, con un'eccitazione a 488 nm ed un'emissione a 620 nm.

Studio dell'apoptosi con Annessina V-FITC

In cellule che vanno incontro a morte per apoptosi è possibile osservare anche la modifica della membrana plasmatica, considerata come uno degli eventi più precoci in tale processo di morte. Nelle cellule apoptotiche la fosfatidilserina (PS), un fosfolipide di membrana localizzato sul versante interno della membrana plasmatica, è esposta sulla parte esterna. La fosfatidilserina lega con un'elevata affinità l'Annessina V, la quale

coniugata con fluorocromi come FITC, risulta essere un marcatore sensibile per l'analisi citofluorimetrica delle cellule in apoptosi. L'esternalizzazione della fosfatidilserina avviene già negli stadi iniziali dell'apoptosi e la marcatura con Annessina V-FITC può identificare l'apoptosi ad uno stadio precoce, che precede la perdita dell'integrità di membrana che accompagna le fasi tardive della morte cellulare. Quindi l'Annessina V viene in genere impiegata insieme ad un colorante vitale, lo Ioduro di Propidio (IP). Osservando la positività o meno delle cellule all'Annessina V-FITC e allo Ioduro di Propidio si possono distinguere: 1) cellule vitali, negative tanto all'Annessina V-FITC che allo Ioduro di Propidio; 2) cellule nello stadio iniziale dell'apoptosi, positive all'Annessina V-FITC e negative allo Ioduro di Propidio; 3) cellule in apoptosi tardiva o necrosi, positive sia all'Annessina V che allo Ioduro di Propidio; 4) cellule danneggiate o necrotiche, negative all'Annessina V-FITC e positive allo Ioduro di Propidio. Per tale analisi, le cellule MDA-MB231 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (2×10^5 cellule/2 ml di terreno di coltura) e quindi sottoposte ai trattamenti. In seguito, le cellule sono state lavate 2 volte con PBS freddo e risospese nel binding buffer 1X (10 mM Hepes/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl₂, 2.5 mM CaCl₂) (1×10^6 cellule/ml di buffer) fornito dal kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Quindi 100 µl della soluzione (1×10^5 cellule) sono stati trasferiti in un tubo e incubati con 5 µl di Annessina V-FITC e 5 µl di IP per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione, sono stati addizionati 400 µl di binding buffer 1X in ciascun tubo ed è stata eseguita l'analisi dei campioni al citofluorimetro entro un'ora dall'incubazione con Annessina V-FITC e Ioduro di Propidio.

Valutazione morfologica delle cellule mediante l'impiego del colorante Hoechst 33342

La morfologia apoptotica è stata studiata impiegando il colorante Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO), noto anche come bis-benzimide. L'Hoechst 33342 possiede un gruppo etilico che lo rende lipofilo e quindi adatto alla colorazione di cellule vitali. Tale colorante è in grado di legare il solco minore del DNA ed in particolare le sequenze ricche in A-T, formando un complesso fluorescente che evidenzia i nuclei e le modifiche della cromatina. L'Hoechst è eccitato ad una lunghezza d'onda di 355 nm ed emette fluorescenza blu-brillante con un'emissione massima a 465 nm. Per tale esperimento, le cellule MDA-MB231 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (2×10^5 cellule/2 ml di terreno di coltura) e poste in incubatore a 37°C overnight per favorirne l'adesione al supporto. Quindi è stato allontanato il terreno di coltura ed è stato addizionato in ciascun pozzetto 1 ml della soluzione di Hoechst (2.5 µg/1 ml di terreno di coltura), tenuto ad incubare alla temperatura di 37°C per 30 minuti. In seguito è stato accertato, mediante osservazione al microscopio a fluorescenza, l'ingresso del colorante all'interno delle cellule. Sono stati quindi effettuati 2 lavaggi in PBS al fine di rimuovere il fluorocromo in eccesso, è stato aggiunto il terreno di coltura (2ml/pozzetto) e le cellule sono state trattate con i vari composti per i tempi stabiliti. L'analisi al microscopio a fluorescenza, effettuata mediante un filtro DAPI, evidenzia cellule con nuclei di colore blu brillante ed addensamenti cromatinici tipici delle cellule in apoptosi.

Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\psi_M$

La perdita del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_M$) è uno dei primi eventi intracellulari indotti dal segnale apoptotico e coincide con l'aumento della permeabilità mitocondriale, portando infine al rilascio del citocromo c. Per valutare la depolarizzazione

della membrana mitocondriale, sono state condotte analisi citofluorimetriche che utilizzano il lipide cationico fluorescente, DiOC₆ (3,3-dihexyloxacarbocyanine) (Molecular Probes, Eugene, OR). Questo catione attraversa la membrana mitocondriale grazie alla sua natura lipofilica sfruttando il gradiente elettrochimico e si accumula nella matrice mitocondriale tanto più velocemente quanto maggiore è la differenza del potenziale di membrana mitocondriale. Nelle cellule che presentano una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale, indotto dal trattamento, il composto cationico entrerà in misura ridotta rispetto alle cellule vive in cui vi è un potenziale di membrana integro. Pertanto nelle cellule trattate si osserverà una minore fluorescenza. Dopo trattamento con i composti, le cellule MDA-MB231 sono state prelevate ed incubate con DiOC₆ 40 nM per 20 minuti a 37° C. Al termine dell'incubazione le cellule sono state centrifugate a 800 rpm per 5 min e il pellet è stato lavato due volte con PBS. I campioni quindi sono stati analizzati mediante il citofluorimetro Beckman Coulter Epics XL che utilizza il software Expo 32, con una eccitazione a 488 nm e una emissione a 525nm. La percentuale di cellule che mostra fluorescenza più bassa è determinata comparando il valore ottenuto rispetto a quello delle cellule controllo. Come controllo positivo per la depolarizzazione del mitocondrio, è stato impiegato il CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) 50 μ M, un protonoforo che determina la completa dissipazione del potenziale di membrane mitocondriale.

Poly-Hema

Il poly-Hema (poly 2-hydroxyethyl methacrylate) è un polimero inerte che per la sua natura non ionica impedisce la deposizione della matrice e l'adesione delle cellule al substrato in polistirene delle piastre di coltura (Evdokiou et al, 2003). Proprio per tale

caratteristica, il poly-Hema rappresenta un ottimo sistema sperimentale che consente di studiare il meccanismo di morte per anoikis.

Per impedire l'adesione delle cellule MDA-MB231, le piastre da 6 pozzetti sono state rivestite con 1 ml della soluzione di poly-Hema (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) (10 mg/ml di etanolo al 100%) ed incubate a 37°C tutta la notte. Quindi, è stato ulteriormente aggiunto 1 ml della soluzione di poly-Hema per pozzetto, al fine di assicurare la completa copertura della sua superficie. Al termine, le piastre sono state lasciate ad asciugare sotto una cappa a flusso laminare fino alla formazione di un film trasparente. Le piastre sono state poi sterilizzate mediante l'impiego degli UV per 2 h e le eventuali tracce di etanolo sono state rimosse mediante 2 lavaggi in PBS. Le cellule (2×10^5 /2 ml di terreno di coltura) sono state poi seminate, e 24 h dopo sottoposte al trattamento con i composti.

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

Le cellule MDA-MB231 seminate in piastre da 6 pozzetti (2×10^5 /2 ml di terreno di coltura), dopo incubazione con i composti, sono state lavate due volte con PBS, staccate con tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA), prelevate, centrifugate a 800 g per circa 8 min ed incubate per 30 minuti in ghiaccio con un tampone dissociante RIPA (20 μ l/ 10^6 cellule), costituito da Nonidet P-40 all'1%, Sodio Deossicolato allo 0.5% e SDS allo 0.1%, contenente inibitori delle proteasi Aprotinina 25 μ g/ml, PMSF 1 mM, Sodio Ortovanadato 10 mM, Sodio Fluoruro 10 mM, Leupeptina 25 μ g/ml e Sodio Pirofosfato 0.2 mM. Il lisato cellulare ottenuto è stato sonicato (3 cicli da 10 sec, intervallati da 5 sec) ad una intensità di 10 REV (Soniprep 150). Il contenuto proteico degli estratti cellulari è stato determinato mediante il metodo di Lowry. Quindi, ai campioni contenenti le stesse quantità di proteine (60 μ g), è stato aggiunto il Sample Buffer (Tris-HCl 50 mM, β -

mercaptoetanolo 100 mM, SDS al 2%, Blu di Bromofenolo allo 0.1%, Glicerolo al 10%, pH finale 6.8) in un rapporto 1:1. Dopo denaturazione per 5 min a 90°C, i campioni sono stati caricati, insieme a standard di proteine di peso molecolare noto, su gel di poliacrilammide (al 7.5%, 10%, 12% o 15% a seconda della proteina da valutare) e sottoposti a scorrimento elettroforetico verticale a 150 V per circa 2 ore in presenza del buffer di scorrimento.

Trasferimento delle proteine su membrana e immunoblotting

Al termine dello scorrimento elettroforetico le proteine sono state trasferite, mediante elettroblotting (20V, overnight), su un filtro di nitrocellulosa (Pharmacia Biothec), in presenza di Transfer Buffer (Glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS allo 0.037% e Metanolo al 20%). Per valutare l'omogeneità e l'avvenuto trasferimento delle proteine, il filtro di nitrocellulosa è stato colorato con Rosso Ponceau, un colorante che colora reversibilmente in rosso le proteine.

Il filtro, dopo una serie di lavaggi con TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 allo 0.05%, a pH 7.5), è stato mantenuto per un tempo variabile, in genere 1 h, in una soluzione di "blocking" (TBST e Albumina 1% o TBST e latte 1%) 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". Quindi è stata aggiunta una soluzione contenente l'anticorpo primario specifico (1µg/ml di TBST) e il filtro è stato incubato per tempi variabili a seconda dell'anticorpo impiegato. Gli anticorpi primari impiegati per l'identificazione di EGFR (O.N.268), pEGFR (Tyr 1173), pERK (E-4), FAK (C-20), FLIP_{S/L} (G-11), integrina $\beta 1$ (3H1192) e integrina $\alpha 5$ (H-104) sono stati acquistati presso la ditta Santa Cruz Biotechnology (St. Cruz, CA), quelli impiegati per l'identificazione di procaspasi-8 (1C12),

procaspasi-3 e Bim (C34C5) sono stati acquistati presso la ditta Cell Signalling Technology (Beverly, MA), mentre quelli diretti contro DR4 e DR5 sono stati acquistati presso la ditta Pro-Sci Incorporated (San Diego, CA). Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, il filtro è stato lavato 3 volte per 10 minuti con TBST ed incubato per 30 min con una soluzione contenente l'anticorpo secondario, coniugato con la fosfatasi alcalina (AP) (Promega Madison WI.USA), alla diluizione di 1:3000 in TBST. Il rilevamento delle bande è stato effettuato mediante l'aggiunta dei substrati della fosfatasi alcalina: 0,33% BCIP e 0,66% NBT in un tampone costituito da Tris-HCl 100 mM, $MgCl_2$ 5mM, pH 8.9. Le bande sono state quantificate mediante analisi densitometrica usando il software SMX Image.

RISULTATI

Il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce distacco delle cellule MDA-MB231 dal substrato e anoikis

Dati presenti in letteratura, e da noi confermati in risultati preliminari, indicano che le cellule MDA-MB231, una linea di adenocarcinoma mammario umano prive del recettore α degli estrogeni ($ER\alpha$), risultano resistenti al trattamento con TRAIL ricombinante. Al fine di valutare se il SAHA, un inibitore delle deacetilasi istoniche, fosse in grado di sensibilizzare le cellule MDA-MB231 all'apoptosi indotta da TRAIL, le cellule sono state trattate per vari tempi con diverse concentrazioni di SAHA e TRAIL, impiegati da soli e in associazione. I risultati ottenuti indicano che sia il SAHA (0.2-2 μ M) che il TRAIL (10-50 ng/ml) impiegati singolarmente non inducono effetti tossici nelle cellule MDA-MB231 anche dopo tempi lunghi di incubazione (36-48 h) (dati non mostrati). Tuttavia, quando il SAHA (2 μ M) e il TRAIL (50 ng/ml) sono impiegati in associazione, si osserva il distacco delle cellule dal substrato già dopo brevi tempi di incubazione. Come si osserva in Fig.1, dopo 8 h di trattamento circa il 25 % delle cellule ha perso adesione al substrato. Tale effetto aumenta progressivamente nel tempo e dopo 24 h quasi tutte le cellule (83 %) sono staccate dal substrato. L'effetto indotto dalla combinazione SAHA/TRAIL sul distacco cellulare è contrastato dall'aggiunta dello z-IETD-fmk (100 μ M), un inibitore specifico della caspasi-8, lasciando supporre che l'attivazione di tale caspasi sia coinvolta nel distacco delle cellule MDA-MB231 dal substrato (Fig.1).

Inoltre, in seguito al trattamento combinato SAHA/TRAIL per tempi brevi (8-10 h) le cellule staccate dal substrato si presentano raggruppate in clusters vitali, mentre dopo tempi più lunghi (14-24 h) il numero di tali clusters si riduce e le cellule tendono ad isolarsi e a ridurre il volume cellulare (Fig.2).

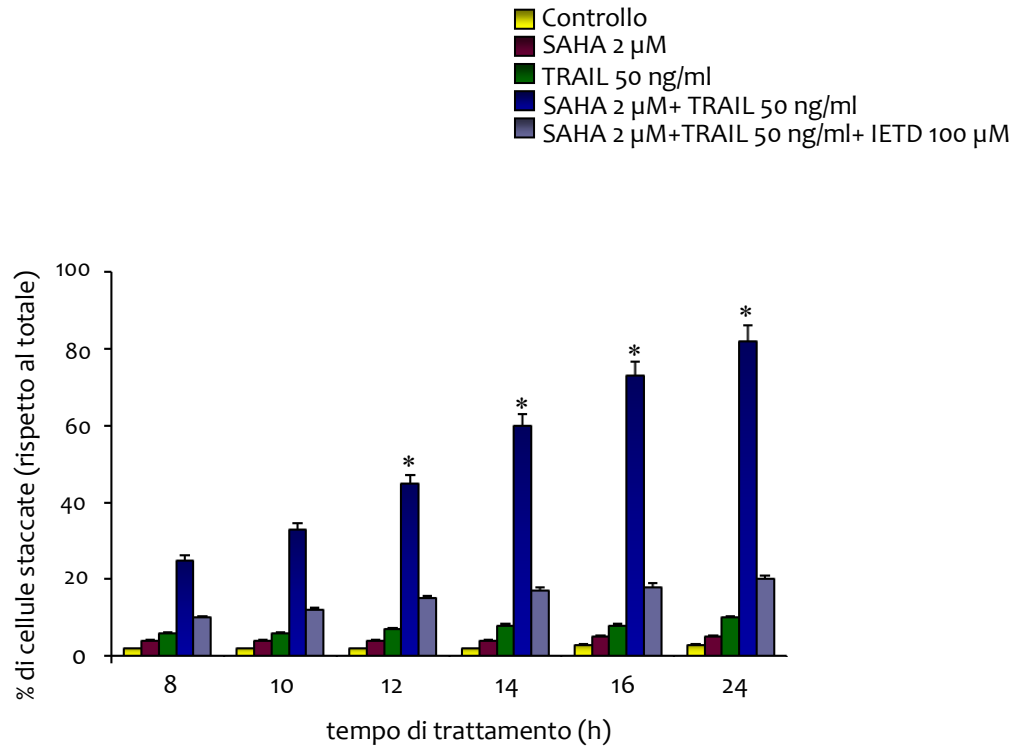


Fig.1 Il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce distacco delle cellule MDA-MB231.

Le cellule MDA-MB231 sono state trattate con SAHA 2 μ M, TRAIL 50 ng/ml, o la combinazione SAHA/TRAIL, con o senza z-IETD-fmk 100 μ M per vari tempi (8-24 h). La popolazione di cellule staccate è stata quindi separata da quella adesa. Entrambe le popolazioni sono state colorate con Trypan blue, e sono state sottoposte a conta cellulare mediante la camera di Neubauer. È stata quindi calcolata la percentuale di cellule staccate rispetto al totale (asse delle y) a vari intervalli di tempo (asse delle x). I risultati ottenuti rappresentano la media \pm S.E. di tre esperimenti indipendenti. * $P < 0.01$ rispetto al controllo.

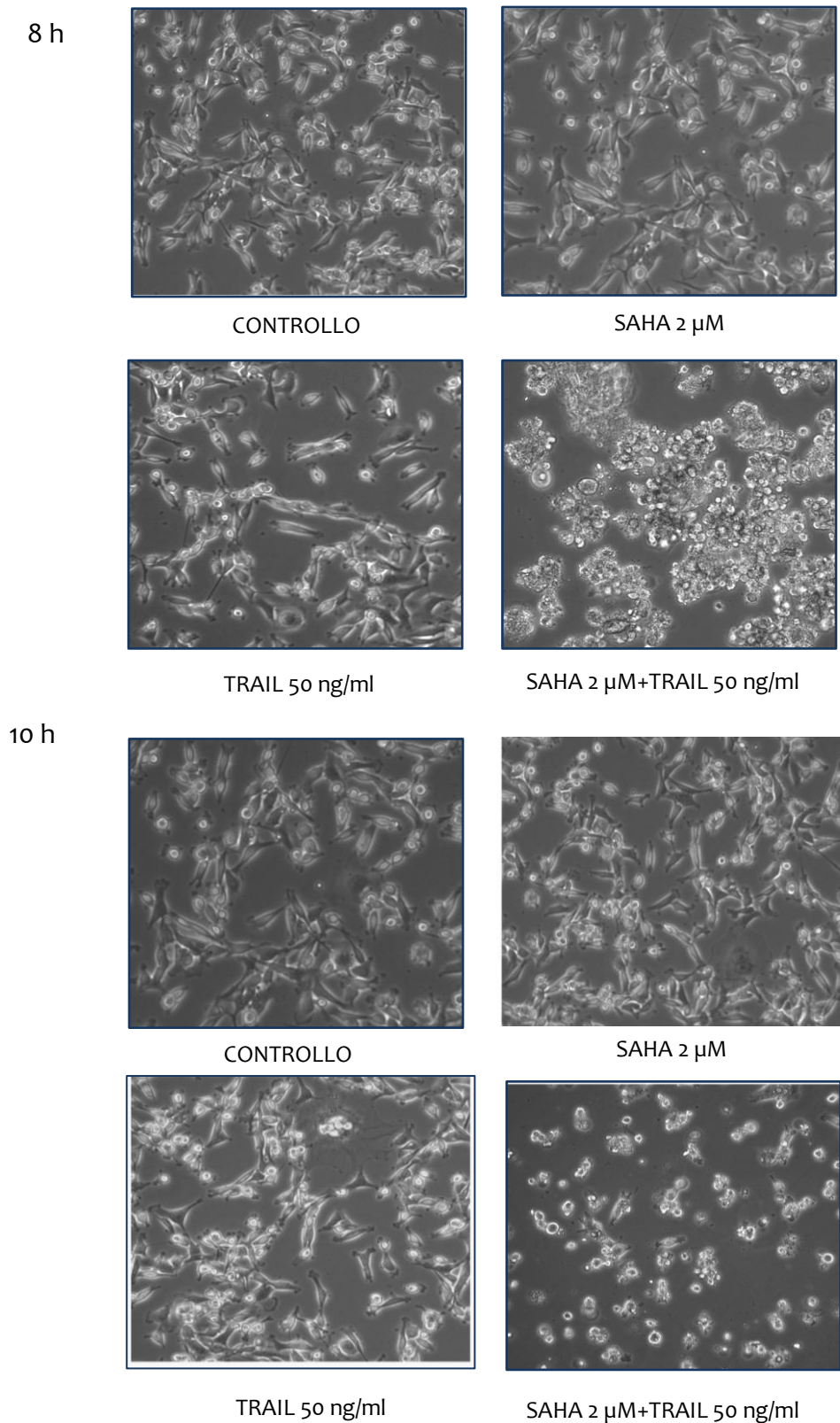


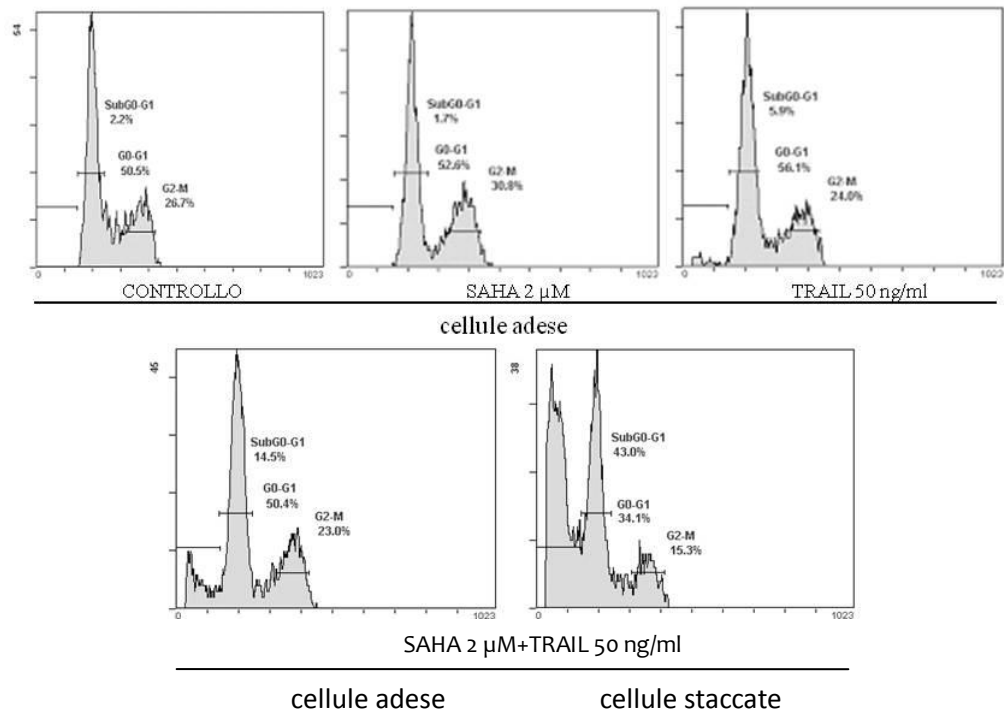
Fig.2 Osservazioni al microscopio ottico a contrasto di fase. Le cellule MDA-MB231 sono state trattate con SAHA 2 μ M, TRAIL 50 ng/ml, o la combinazione SAHA/TRAIL per vari 8 e 14 h). Quindi le cellule sono state osservate al microscopio a contrasto di fase e sono state acquisite le immagini al microscopio

Poiché il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce in cellule MDA-MB231 la perdita di adesione al substrato, è stato ritenuto opportuno condurre le successive analisi separando la popolazione delle cellule adese da quella delle cellule staccate dal substrato. Per comprendere se il distacco delle cellule MDA-MB231 fosse accompagnato da frammentazione del DNA, sono state condotte analisi citofluorimetriche per valutare la distribuzione delle cellule lungo le fasi del ciclo cellulare (come descritto in materiali e metodi). I risultati ottenuti dimostrano che il trattamento con SAHA o TRAIL impiegati singolarmente non determina variazioni significative del profilo citofluorimetrico delle cellule MDA-MB231 rispetto al controllo; invece, i composti impiegati in associazione, determinano un incremento della percentuale di cellule in fase sub-G₀/G₁. Dopo 14 h di trattamento tale percentuale è pari al 43% nella popolazione di cellule staccate dal substrato, mentre è solo del 15 % nella popolazione di cellule adese (Fig.3A). Inoltre, analisi morfologiche ottenute dopo colorazione delle cellule con Hoechst 33342, evidenziano che il trattamento con SAHA e TRAIL in combinazione induce nelle cellule MDA-MB231 la comparsa di caratteristiche tipiche del processo apoptotico, quali condensazione della cromatina e frammentazione del DNA; tali effetti risultano particolarmente evidenti nella popolazione di cellule in cui la combinazione SAHA/TRAIL ha determinato la perdita di adesione al substrato (Fig.3B).

L'induzione di apoptosi dopo trattamento con la combinazione SAHA/TRAIL in cellule MDA-MB231 è stata inoltre confermata da analisi citofluorimetriche condotte mediante l'impiego dell'Annessina V/Ioduro di Propidio. I risultati ottenuti dimostrano che il cotrattamento induce un incremento della percentuale di cellule positive all'Annessina V, evento caratteristico di cellule in apoptosi. Tale positività si osserva solo dopo 14 h di trattamento nella popolazione di cellule staccate dal substrato. L'effetto incrementa nel

tempo, raggiungendo valori del 65 % dopo 24 h (Fig.4A). L'effetto apoptotico indotto dall'associazione SAHA/TRAIL è prevenuto dall'aggiunta dello z-IETD-fmk (100 μ M), lasciando ipotizzare che tale effetto possa dipendere dall'attivazione della caspasi-8. È interessante osservare come dopo 8 h di trattamento l'effetto apoptotico è presente soltanto in una minima percentuale della popolazione di cellule che ha perso adesione al substrato, mentre dopo 24 h queste caratteristiche si osservano nella maggior parte di cellule staccate (Fig.4B). Tale risultato suggerisce chiaramente che gli effetti apoptotici si manifestano in una fase successiva rispetto al distacco cellulare, caratteristica peculiare dell'anoikis, una particolare forma di apoptosi che si manifesta in seguito alla perdita delle interazioni delle cellule con la matrice extracellulare (Gilmore et al, 2005).

A



B

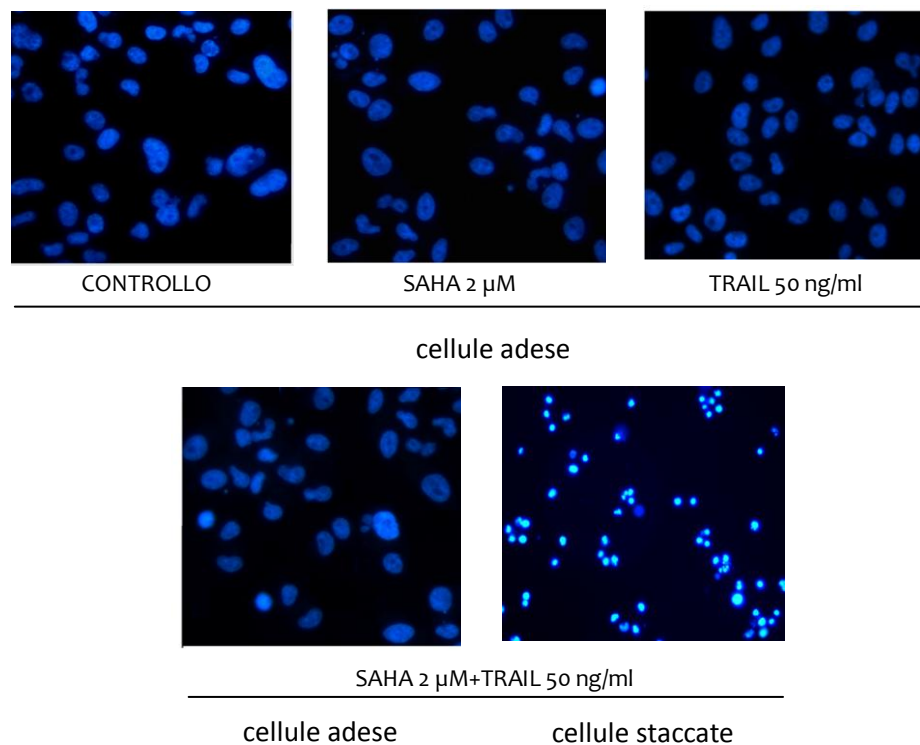


Fig. 3 Il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce frammentazione del DNA in cellule MDA-MB 231.

Le cellule sono state trattate con SAHA 2 μ M e TRAIL 50 ng/ml, da soli o in associazione, per 14 h. Le cellule che in seguito al trattamento combinato SAHA/TRAIL si staccano dal substrato, sono state analizzate separatamente dalla popolazione di cellule adese. (A) Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare mediante l'impiego dello ioduro di Propidio dopo trattamento con i composti. I dati sono stati analizzati al citofluorimetro mediante il software Expo32. (B) Analisi della morfologia cellulare mediante colorazione con Hoechst 33342 dopo trattamento con i composti. Per l'osservazione morfologica delle cellule è stato impiegato un microscopio a fluorescenza Leica DM IRB con telecamera DC 300F (software Leica Dfluoro). I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

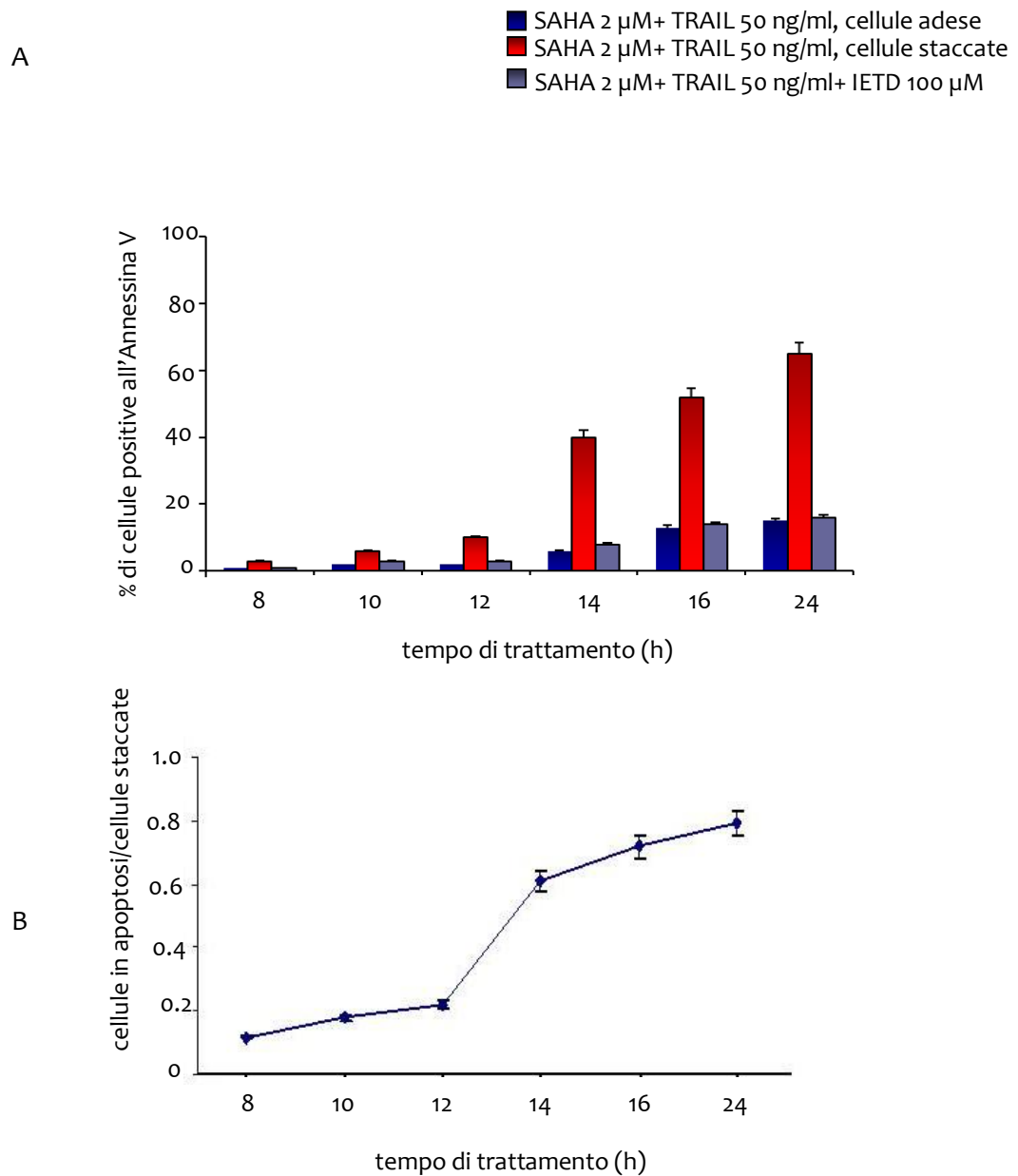


Fig. 4 Il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce anoikis in cellule MDA-MB231. Le cellule sono state trattate con la combinazione SAHA 2 μ M/TRAIL 50 ng/ml per vari tempi (8-24 h). Le cellule che in seguito al trattamento combinato SAHA/TRAIL hanno perso adesione al substrato, sono state analizzate separatamente dalla popolazione di cellule adese. L'effetto apoptotico è stato valutato mediante analisi citofluorimetriche impiegando il kit AnnexinV-FITC, come descritto in materiali e metodi. (A) Tempo-dipendenza dell'effetto apoptotico indotto dalla combinazione SAHA/TRAIL, con o senza z-IETD-fmk 100 μ M. * $P < 0.01$ rispetto alle cellule adese. (B) Rapporto tra cellule in apoptosi e cellule staccate, calcolato a vari intervalli di tempo, dopo trattamento combinato SAHA/TRAIL. I risultati rappresentano la media \pm S. E. di tre esperimenti indipendenti.

Il SAHA sensibilizza le cellule MDA-MB231 alla via di TRAIL

TRAIL induce apoptosi in seguito all'interazione con i recettori di morte DR4 e DR5, che mediante i domini di morte DD reclutano la proteina adattatrice FADD; essa, mediante il dominio effettore di morte DED, è in grado di reclutare la procaspasi-8, formando il complesso DISC a livello del quale tale procaspasi si attiva. La caspasi-8 è in grado a sua volta di attivare la caspasi-3 effettrice (Le Blanc et al, 2003).

Per comprendere i meccanismi molecolari mediante cui il SAHA è in grado di sensibilizzare la linea cellulare MDA-MB231 all'apoptosi indotta da TRAIL, sono stati condotti degli esperimenti di Western Blotting impiegando anticorpi che riconoscono in modo specifico i recettori di morte DR4 e DR5 e il fattore antiapoptotico c-FLIP. I risultati ottenuti mostrano che le cellule MDA-MB231 esprimono entrambi i recettori di morte DR4 e DR5, i cui livelli proteici non subiscono variazioni in seguito al trattamento con SAHA o TRAIL, da soli o in associazione. Differentemente, il trattamento per 14 h con SAHA 2 μ M, da solo e in associazione a TRAIL 50 ng/ml, determina il decremento dei livelli di entrambe le isoforme di c-FLIP, c-FLIP_S e c-FLIP_L (Fig.5A). Tale effetto risulta più evidente nella popolazione di cellule che ha perso adesione al substrato in seguito al cotrattamento SAHA/TRAIL e si evidenzia già dopo 8 h di incubazione (Fig.5B). Inoltre, per comprendere se il trattamento combinato SAHA/TRAIL determinasse effetti sui livelli delle procaspasi-8 e -3, sono state condotte analisi di Western Blotting impiegando anticorpi specifici per tali proteasi. I risultati ottenuti mostrano che il trattamento con SAHA 2 μ M o TRAIL 50 ng/ml, impiegati singolarmente, non determina variazioni sui livelli tanto della procaspasi-8 che della procaspasi-3. Quando tali composti sono impiegati in associazione, invece, determinano il decremento delle forme full-length di entrambe le caspasi analizzate, evento accompagnato dalla comparsa dei frammenti di degradazione attivi (Fig.6A).

Inoltre, è possibile osservare che il decremento della procaspasi-8 è evidente dopo tempi brevi di trattamento (8 h), mentre per la procaspasi-3 il decremento si manifesta solo dopo 14 h (Fig.6B).

A

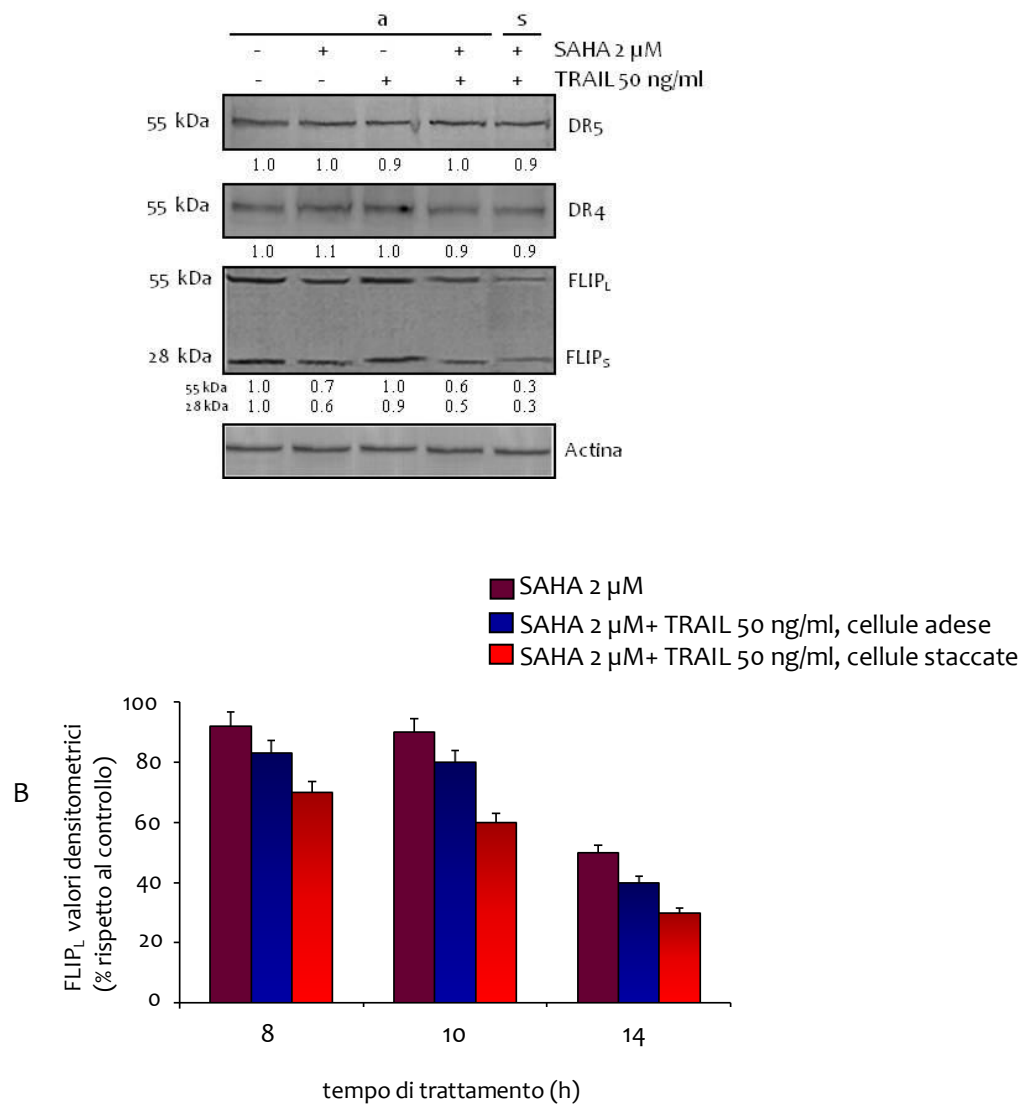
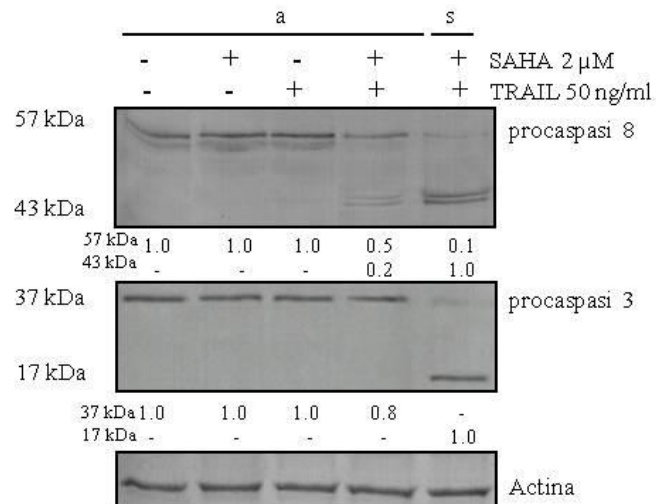


Fig. 5 Effetti di SAHA e TRAIL, da soli e in associazione, sui recettori di morte DR4 e DR5 e sul fattore antiapoptotico c-FLIP. Le cellule MDA-MB231 sono state trattate con SAHA 2 μ M e TRAIL 50 ng/ml, da soli e in combinazione. Le cellule che in seguito al trattamento combinato SAHA/TRAIL hanno perso adesione al substrato (s), sono state analizzate separatamente da quelle adese (a). (A) Dopo 14 h di incubazione con i composti, sono stati preparati i lisati cellulari, come descritto in materiali e metodi, e le proteine (60 μ g/ campione) sono state analizzate mediante Western Blotting impiegando anticorpi specifici per DR4, DR5 e c-FLIP_{L/S} (G-11). I valori densitometrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La valutazione dell'actina è inclusa per dimostrare l'omogeneità delle prove. (B) Tempo-dipendenza dell'effetto del trattamento combinato SAHA/TRAIL su c-FLIP_L. I valori densitometrici sono espressi come percentuale rispetto al controllo, rappresentato dalle cellule non sottoposte a trattamenti. I risultati rappresentano la media \pm S. E. di tre esperimenti indipendenti.

A



B

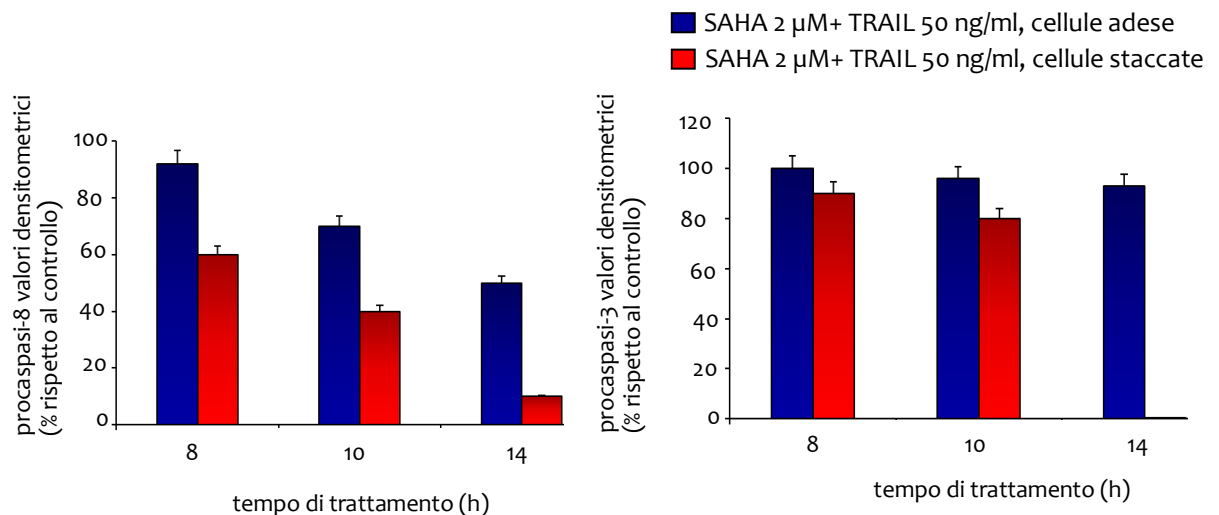
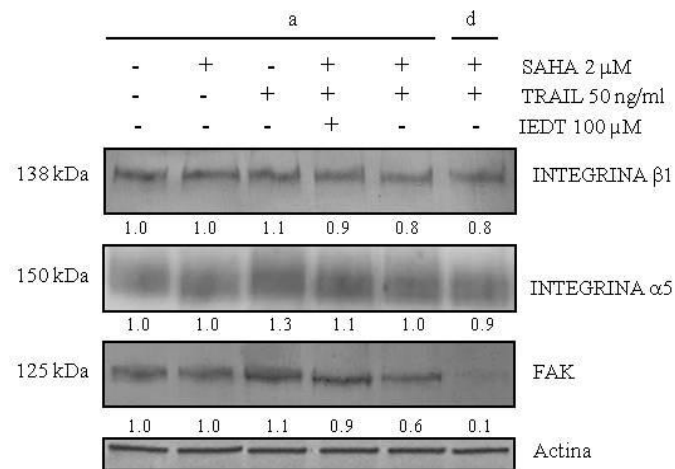


Fig. 6 Effetti di SAHA e TRAIL, da soli e in associazione, sui livelli delle procaspasi -8 e -3. Le cellule MDA-MB 231 sono state trattate con SAHA 2 μM e TRAIL 50 ng/ml, da soli e in combinazione. Le cellule che in seguito al trattamento combinato SAHA/TRAIL hanno perso adesione al substrato (s), sono state analizzate separatamente da quelle adese (a). (A) Dopo 14 h di incubazione con i composti, sono stati preparati i lisati cellulari, come descritto in materiali e metodi, e le proteine (60 μg/ campione) sono state analizzate mediante Western Blotting impiegando anticorpi specifici per la procaspasi-8 (1C12) e la procaspasi-3. I valori densitometrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La valutazione dell'actina è inclusa per dimostrare l'omogeneità delle prove. (B) Tempo-dipendenza dell'effetto del trattamento combinato SAHA/TRAIL sulle procaspasi-8 e -3. I valori densitometrici sono espressi come percentuale rispetto al controllo, rappresentato dalle cellule non sottoposte a trattamenti. I risultati rappresentano la media ± S. E. di tre esperimenti indipendenti.

Effetti del trattamento combinato SAHA/TRAIL sulle integrine e FAK

L'adesione delle cellule alla matrice extracellulare (ECM) è mediata prevalentemente dalle integrine; inoltre, tali molecole sono in grado di trasdurre segnali di sopravvivenza e proliferazione all'interno della cellula, effetti mediati prevalentemente dalla proteina chinasi FAK. La perdita di adesione delle cellule alla matrice extracellulare blocca la trasmissione di questi segnali e induce in cellule staccate la morte per anoikis (Chiarugi et al, 2008). Per comprendere se la perdita di adesione delle cellule MDA-MB231 indotta dal trattamento combinato SAHA/TRAIL fosse conseguenza di variazioni del livello delle integrine o di FAK, sono state condotte analisi di Western Blotting impiegando anticorpi che riconoscono tali proteine. Dati presenti in letteratura indicano che le cellule MDA-MB231 presentano livelli elevati delle subunità integriniche $\alpha 5$ e $\beta 1$, le quali sono responsabili dell'adesione e della trasduzione di segnali di sopravvivenza. Analisi di Western Blotting confermano che le cellule MDA-MB231 presentano elevati livelli di $\alpha 5$ e $\beta 1$. Tuttavia il trattamento con SAHA o TRAIL, sia da soli che in combinazione, dopo 14 h non induce variazioni significative dei livelli delle integrine analizzate (Fig.7A). Invece, il trattamento combinato SAHA/TRAIL determina un marcato decremento dei livelli di FAK già dopo 8 h (Fig.7B). Tale effetto risulta essere tempo-dipendente ed è più evidente nella popolazione di cellule che ha perso adesione al substrato. Il decremento di FAK non si osserva dopo trattamento con SAHA o TRAIL impiegati da soli. Inoltre, l'impiego dello z-IETD-fmk 100 μ M, è in grado di prevenire il decremento dei livelli di FAK indotto dal trattamento combinato SAHA/TRAIL; tale risultato indica che il decremento di FAK è conseguenza dell'attivazione della caspasi-8 (Fig.7A) (Wen et al, 1997; Xu et al, 2000).

A



B

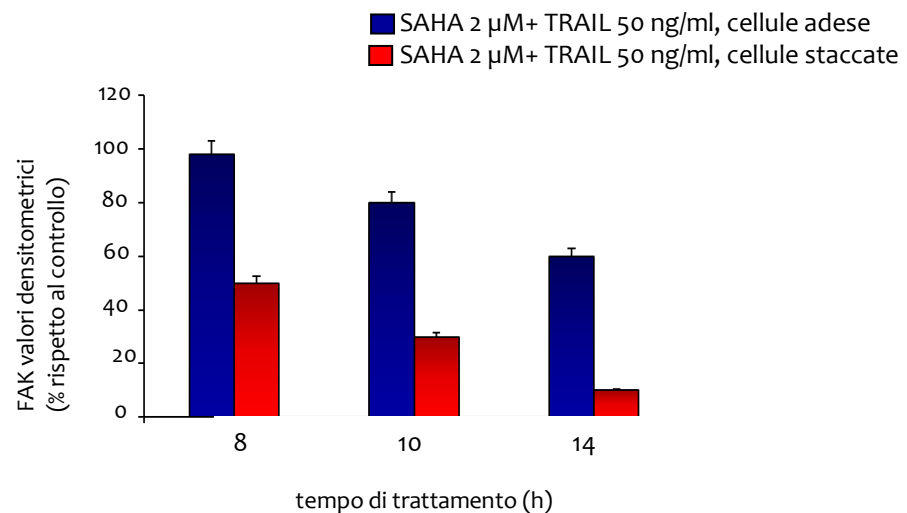


Fig. 7 Effetti di SAHA e TRAIL, da soli e in associazione, sui livelli delle subunità integriniche α 5 e β 1, e FAK. Le cellule MDA-MB231 sono state trattate con SAHA 2 μ M e TRAIL 50 ng/ml, da soli e in combinazione, con o senza IETD 100 μ M. Le cellule che in seguito al trattamento combinato SAHA/TRAIL hanno perso adesione al substrato (s), sono state analizzate separatamente da quelle adese (a). (A) Dopo 14 h di incubazione con i composti, sono stati preparati i lisati cellulari, come descritto in materiali e metodi, e le proteine (60 μ g/ campione) sono state valutate mediante Western Blotting impiegando anticorpi specifici per α 5 (H-104), β 1 (3H1192), e FAK (C-20). I valori densitometrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La valutazione dell'actina è inclusa per dimostrare l'omogeneità delle prove. (B) Tempo-dipendenza dell'effetto della combinazione SAHA/TRAIL sulla proteina FAK. I valori densitometrici sono espressi come percentuale rispetto al controllo, rappresentato dalle cellule non sottoposte a trattamenti. I risultati rappresentano la media \pm S. E. di tre esperimenti indipendenti.

Effetti del trattamento combinato SAHA/TRAIL sui livelli della proteina Bim

Bim è un membro proapoptotico della famiglia Bcl-2 di cui sono state descritte tre principali isoforme di splicing: Bim_{EL}, che risulta la forma prevalentemente espressa, Bim_L e Bim_S. I livelli di Bim_{EL} sono regolati dalla chinasi ERK1/2, che ne determina la fosforilazione. Nello stato fosforilato Bim_{EL} è ubiquitinato e degradato dal proteasoma 26S; nello stato defosforilato, Bim_{EL} è in grado invece di attivare la proteina proapoptotica Bax e di inibire il fattore di sopravvivenza Bcl-2, mediando così il pathway intrinseco dell'apoptosi (Ley et al, 2005). L'attivazione di Bim_{EL}, in seguito ad interruzione dei segnali di sopravvivenza dipendenti da ERK, è stata correlata con l'induzione dell'anoikis (Fukazawa et al, 2004).

Per comprendere se l'evento di morte per anoikis indotto dal trattamento combinato SAHA/TRAIL in cellule MDA-MB231 fosse accompagnato da variazioni dei livelli di Bim, sono state condotte analisi di Western Blotting impiegando un anticorpo specifico per tale proteina. I risultati ottenuti mostrano che nelle cellule MDA-MB231 controllo, Bim_{EL} è presente in due forme con diversa mobilità elettroforetica: una a minore velocità di migrazione, che è stato dimostrato essere la forma fosforilata e inattiva, e una a maggiore velocità di migrazione, che rappresenta la forma defosforilata e attiva (Gong et al, 2007; Gragg et al, 2007; Costa et al, 2007). Il trattamento con SAHA 2 μ M per 14 h, in accordo con i risultati ottenuti da Bali (Bali et al, 2005), determina l'incremento dei livelli di Bim_{EL}, mentre il TRAIL 50 ng/ml non determina variazioni né dei livelli né della velocità di migrazione di Bim_{EL} rispetto al controllo. Il trattamento combinato SAHA/TRAIL per 14 h, invece, causa il decremento dei livelli della forma fosforilata di Bim_{EL} e il concomitante incremento della sua forma defosforilata. Tale effetto risulta più marcato nella popolazione di cellule che ha perso adesione al substrato (Fig.8A).

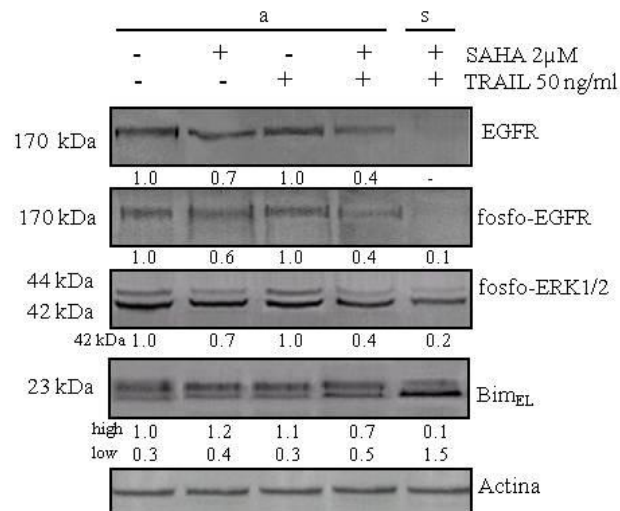
Ruolo dell'EGFR nell'anoikis indotta dalla combinazione SAHA/TRAIL

La linea cellulare MDA-MB231 è caratterizzata dalla presenza di elevati livelli del recettore per il fattore di crescita dell'epidermide EGF (EGFR). Tale evento sembra essere in rapporto con l'assenza, in tali cellule, del recettore α degli estrogeni (ER α). È stato infatti dimostrato che ER α reprime la trascrizione di EGFR (Zhou et al, 2009). In seguito a stimolazione ligando-dipendente, l'EGFR dimerizza e si autofosforila, mediando all'interno della cellula segnali di sopravvivenza e proliferazione, che culminano nell'attivazione di ERK 1/2. È noto che il decremento dei livelli di EGFR favorisce la morte per anoikis. Tale effetto è stato messo in relazione con l'inibizione di ERK e con l'incremento della forma defosforilata di Bim_{EL}(.).

Al fine di valutare gli effetti della combinazione SAHA/TRAIL sui livelli del recettore EGFR, sono state condotte analisi di Western Blotting impiegando anticorpi specifici che riconoscono EGFR e la sua forma fosforilata. Ulteriori analisi hanno consentito di studiare inoltre gli effetti di tali composti sui livelli della forma fosforilata e attiva di ERK1/2. I risultati ottenuti mostrano che il SAHA 2 μ M, da solo e in associazione a TRAIL 50 ng/ml, determina dopo 14 h di trattamento un notevole decremento dei livelli di EGFR, di fosfo-EGFR e di fosfo-ERK1/2 rispetto al controllo (Fig.8A). Tale decremento risulta più evidente nella popolazione di cellule in cui il trattamento combinato SAHA/TRAIL determina perdita di adesione al substrato. Questo effetto risulta essere tempo-dipendente e si manifesta dopo tempi brevi (8 h) (Fig.8B). I risultati ottenuti lasciano ipotizzare che l'incremento della forma defosforilata di Bim_{EL} indotto dalla combinazione SAHA/TRAIL potrebbe essere causato dall'inibizione della via mediata dall'EGFR. Per confermare tale ipotesi, è stato quindi impiegato un inibitore dell'attività tirosin-chinasi del recettore EGFR, l'AG1478, utilizzato a varie concentrazioni per 8 h di trattamento. Come mostrato in

figura 9, l'AG1478 determina, in modo dose-dipendente, un notevole decremento di fosfo-EGFR e fosfo-ERK1/2, con il contemporaneo incremento della forma a più basso peso molecolare di Bim_{EL}.

A



B

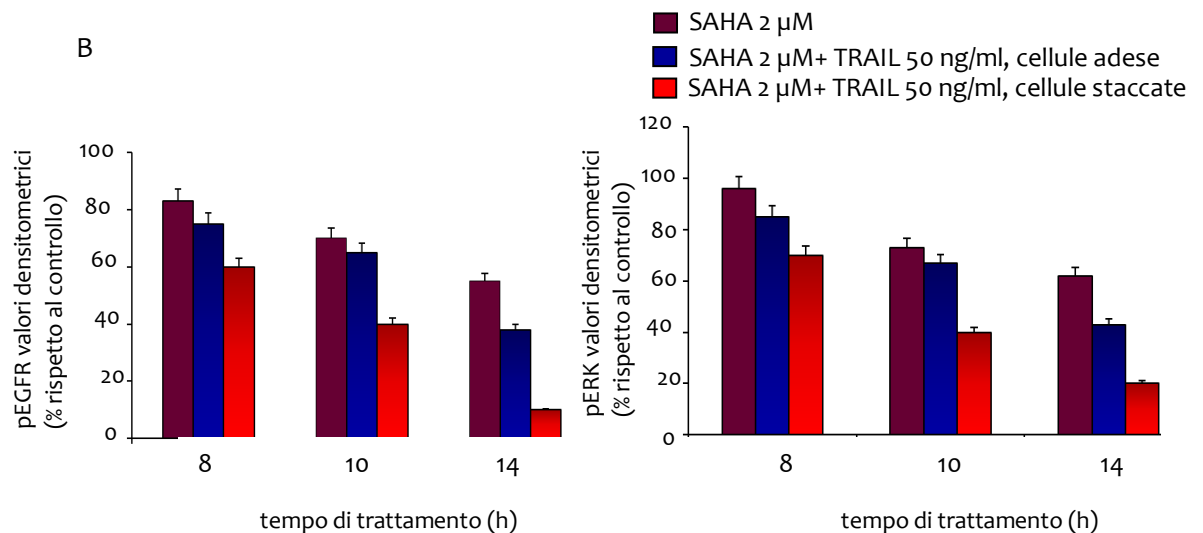


Fig. 8 Effetti di SAHA e TRAIL, da soli e in associazione, sui livelli di EGFR, fosfo-EGFR, fosfo-ERK e Bim. Le cellule MDA-MB231 sono state trattate con SAHA 2 μ M e TRAIL 50 ng/ml, da soli e in combinazione. Le cellule che in seguito al trattamento combinato SAHA/TRAIL hanno perso adesione al substrato (s), sono state analizzate separatamente da quelle adese (a). (A) Dopo 14 h di incubazione con i composti, sono stati preparati i lisati cellulari, come descritto in materiali e metodi, e le proteine (60 μ g/ campione) sono state valutate mediante Western Blotting impiegando anticorpi specifici per EGFR (O.N.268), pEGFR (Tyr 1173), pERK (E-4) e Bim (C34C5). I valori densitometrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La valutazione dell'actina è inclusa per dimostrare l'omogeneità delle prove. (B) Tempo-dipendenza dell'effetto della combinazione SAHA/TRAIL su fosfo-EGFR e fosfo-ERK. I valori densitometrici sono espressi come percentuale rispetto al controllo, rappresentato dalle cellule non sottoposte ai trattamenti. I risultati rappresentano la media \pm S. E. di tre esperimenti indipendenti.

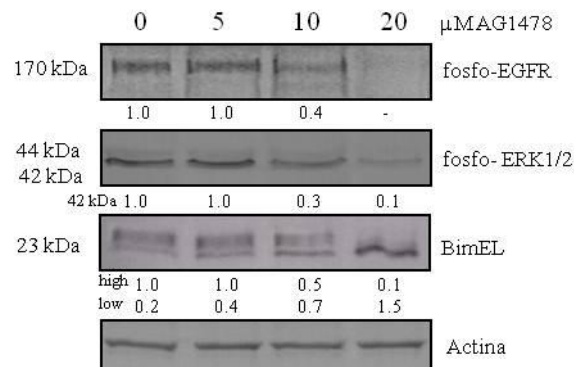


Fig. 9 Effetti dell'AG1478 sui livelli di fosfo-EGFR, fosfo-ERK e Bim. Le cellule MDA-MB231 sono state trattate con AG1478 (0-20 μ M) per 8 h. Al termine dell'incubazione sono stati preparati i lisati cellulari, come descritto in materiali e metodi, e le proteine (60 μ g/ campione) sono state valutate mediante Western Blotting impiegando anticorpi specifici per pEGFR (Tyr 1173), pERK (E-4) e Bim (C34C5). I valori densitometrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La valutazione dell'actina è inclusa per dimostrare l'omogeneità delle prove.

Effetti del trattamento combinato SAHA/TRAIL sul potenziale di membrana mitocondriale

È stato dimostrato che Bim_{EL}, nella forma defosforilata, induce oligomerizzazione del fattore proapoptotico Bax a livello della membrana mitocondriale esterna. Tale evento favorisce la formazione di canali responsabili della permeabilizzazione del mitocondrio (Harada et al, 2004). Per comprendere se l'effetto apoptotico indotto dal trattamento combinato SAHA/TRAIL si accompagnasse a depolarizzazione della membrana mitocondriale, sono state condotte analisi citofluorimetriche mediante l'impiego del DiOC₆, un catione di natura lipofilica che nelle cellule apoptotiche si accumula a livello della matrice mitocondriale in misura ridotta rispetto alle cellule vive, dove il potenziale di membrana è integro. Come si può osservare in figura 10, il trattamento con SAHA 2 μ M o TRAIL 50 ng/ml impiegati singolarmente non determina variazioni significative sul potenziale di membrana mitocondriale rispetto al controllo. Invece, il trattamento combinato SAHA/TRAIL per 14 h induce nella popolazione di cellule che ha perso adesione al substrato un notevole incremento della percentuale di cellule depolarizzate, caratterizzate da un valore basso di $\Delta\psi_M$ (Fig.10).

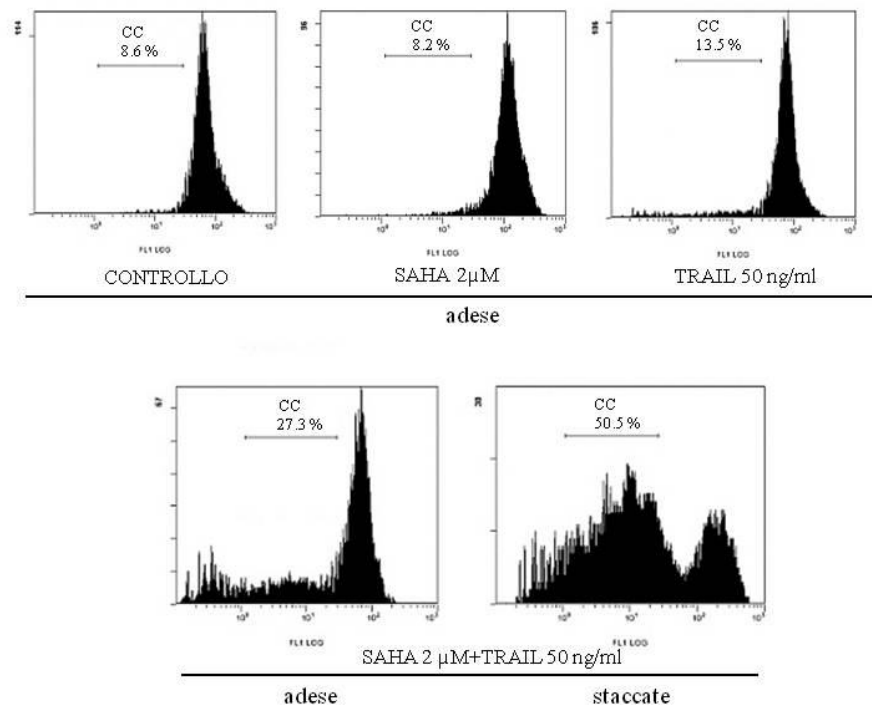
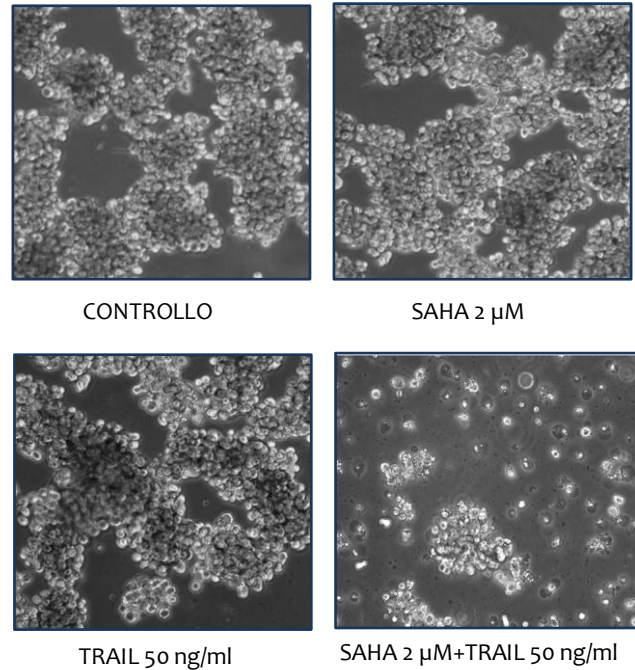


Fig. 10 Effetti di SAHA e TRAIL, da soli e in associazione, sul potenziale di membrana mitocondriale. Le cellule MDA-MB231 sono state trattate con SAHA 2 μM o TRAIL 50 ng/ml, da soli e in associazione, per 14 h. In seguito al cotrattamento, sono state analizzate separatamente le cellule adese e quelle in sospensione. Al fine di valutare il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_M$), sono state condotte analisi citofluorimetriche impiegando il catione lipofilico DiOC6. I risultati ottenuti sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Effetti del trattamento combinato SAHA/TRAIL in cellule MDA-MB231 coltivate in poly-Hema

È noto che la linea cellulare MDA-MB231 è in grado di sopravvivere e proliferare anche in assenza di adesione al substrato, risultando così resistente alla morte per anoikis (Fukazawa et al, 2004; Simpson et al, 2008; Kim et al, 2009). Dopo aver quindi dimostrato che l'associazione SAHA/TRAIL determina il distacco e la morte per anoikis in cellule MDA-MB231, è stata valutata l'efficacia della combinazione di tali composti nelle stesse cellule coltivate in poly-Hema, un polimero sintetico che impedisce l'adesione delle cellule alla superficie delle piastre. I risultati ottenuti mostrano che le cellule MDA-MB231 non trattate crescono aggregandosi in clusters vitali, senza mostrare segni di sofferenza (Fig.11A). È possibile osservare, invece, come la combinazione SAHA/TRAIL induce alterazioni morfologiche, che si accompagnano alla comparsa di un picco sub-G₀/G₁. Tali effetti sono visibili dopo 14 h di trattamento (picco sub-G₀/G₁ del 38%) e non si manifestano quando i composti sono impiegati singolarmente (Fig.11B). Analisi di Western Blotting condotte in cellule MDA-MB231 coltivate in poly-Hema, dimostrano che le cellule controllo mantengono elevati livelli di EGFR, fosfo-EGFR, fosfo-ERK1/2 e FAK, mentre mostrano bassi livelli di Bim_{EL}. Il trattamento delle cellule con l'associazione SAHA/TRAIL determina un marcato decremento di fosfo-EGFR, fosfo-ERK1/2 e FAK, evento accompagnato dall'incremento dei livelli della forma defosforilata e quindi attiva di Bim_{EL} (Fig.12). Questi effetti non si osservano con i singoli composti.

A



B

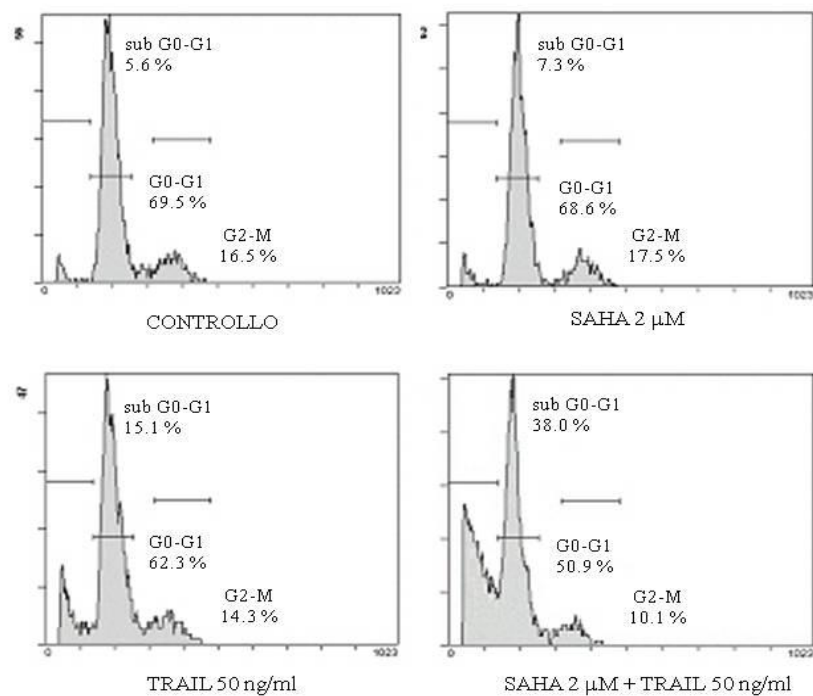


Fig. 11 Il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce frammentazione del DNA in cellule MDA-MB 231 coltivate in poly-Hema. Le cellule MDA-MB 231 sono state piastrate su poly-Hema e sono state trattate per 14 h con SAHA 2 μ M e TRAIL 50 ng/ml, da soli e in combinazione. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state osservate al microscopio ottico a contrasto di fase (A) e quindi sono state condotte analisi citofluorimetriche (B) impiegando lo Ioduro di Propidio, come riportato in materiali e metodi. I dati sono stati analizzati al citofluorimetro FACScan (Beckman Coulter Epics XL) mediante il software Expo32. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

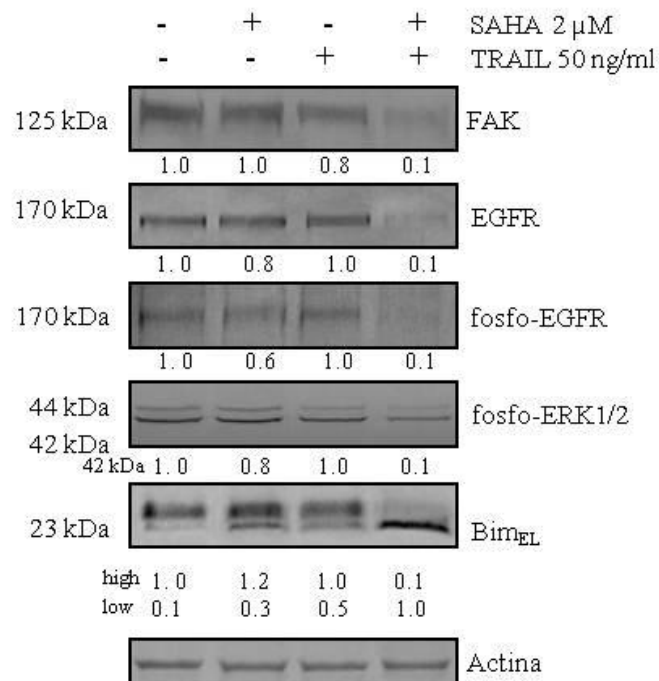


Fig. 12 Effetti di SAHA e TRAIL, da soli e in associazione, sui livelli di EGFR, fosfo-EGFR, fosfo-ERK, FAK e Bim_{EL} in cellule MDA-MB231 coltivate in poly-Hema. Le cellule MDA-MB231 sono state piastrate in poly-Hema e successivamente trattate con SAHA 2 μ M e TRAIL 50 ng/ml, da soli e in combinazione, per 14 h. Sono stati quindi preparati i lisati cellulari, come descritto in materiali e metodi, e le proteine (60 μ g/ campione) sono state valutate mediante Western Blotting impiegando anticorpi specifici per EGFR (O.N.268), pEGFR (Tyr 1173), pERK (E-4), FAK (C-20) e Bim (C34C5). I valori densitometrici sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La valutazione dell'actina è inclusa per dimostrare l'omogeneità delle prove.

Discussione

TRAIL è un potente induttore di apoptosi, di recente impiegato nei trials clinici per il trattamento di diverse forme tumorali, quali il carcinoma del polmone non a piccole cellule, il carcinoma del colon-retto e il linfoma non-Hodgkin's (Sallman et al, 2007). Diverse forme tumorali sono però resistenti all'azione di TRAIL. Alla base della resistenza delle cellule a TRAIL vi è la mancanza dei recettori di morte (DR4 e DR5) o la overespressione dei recettori decoys (DcR1 e DcR2) o di fattori antiapoptotici come c-FLIP o IAPs (). Le cellule MDA-MB231 sono una linea di adenocarcinoma mammario umano caratterizzate dall'assenza del recettore α per gli estrogeni (ER α) e da elevati livelli del recettore dell'EGF (EGFR) (). Dati presenti in letteratura indicano inoltre che tale linea cellulare risulta resistente al ricombinante TRAIL (). Presso i laboratori dove ho sviluppato la presente tesi, è stata dimostrata l'efficacia del SAHA, un inibitore delle deacetilasi istoniche, nel sensibilizzare cellule di epatocarcinoma umano HepG2 all'apoptosi indotta da TRAIL (). Sulla base di questi risultati, è stata avviata una ricerca per valutare se il SAHA fosse in grado di sensibilizzare anche la linea cellulare MDA-MB231 alla via di TRAIL. I risultati ottenuti mostrano che il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce il distacco delle cellule MDA-MB231 dal substrato. Tale evento si manifesta già dopo 8 h di trattamento e incrementa nel tempo, cosicché dopo 24 h più dell'80% di cellule ha perso adesione al substrato. Il distacco indotto dal trattamento combinato SAHA/TRAIL è contrastato dall'aggiunta dello z-IETD-fmk, un inibitore specifico della caspasi-8, suggerendo così che tale caspasi possa essere responsabile del distacco delle cellule dal substrato. All'evento di distacco segue poi il processo apoptotico, come dimostrato dalla positività all'Annessina V-FITC da parte della popolazione di cellule che ha perso adesione al substrato. Tale effetto si accompagna alla comparsa, nella stessa popolazione di cellule,

di un picco sub-G₀/G₁ del 43% e di cromatina condensata e frammentata. Le caratteristiche dell'evento apoptotico si manifestano solo in seguito al distacco delle cellule dal substrato, come dimostrato da analisi condotte a vari intervalli di tempo; infatti, dopo 8 h di trattamento, il 20% circa delle cellule perde adesione e non mostra segni di sofferenza, mentre segni apoptotici, quali condensazione e frammentazione della cromatina, si manifestano in tali cellule staccate solo dopo 12-14 h di trattamento. Queste analisi suggeriscono chiaramente che il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce distacco e morte cellulare, eventi tipici della morte per anoikis ().

Per comprendere il meccanismo mediante il quale il SAHA è in grado di sensibilizzare le cellule MDA-MB231 all'apoptosi indotta da TRAIL, è stato valutato l'effetto di tali composti sui recettori di morte di TRAIL, DR4 e DR5, e sul fattore antiapoptotico c-FLIP. I risultati ottenuti indicano che il SAHA, né da solo né in associazione, modifica i livelli di DR4 e DR5. Invece il SAHA, sia da solo che in combinazione con TRAIL, riduce i livelli di c-FLIP. Tale decremento potrebbe favorire quindi, in seguito all'interazione di TRAIL con i propri recettori di morte, la precoce attivazione della caspasi-8, che si osserva già dopo 8 h di trattamento. La caspasi -8, inoltre, potrebbe essere responsabile dell'attivazione della caspasi-3, evento che si osserva però dopo tempi più lunghi (14 h).

Per chiarire come il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce distacco delle cellule MDA-MB231 dal substrato, sono stati oggetto di studio le subunità integriniche α_5 e β_1 , che risultano espresse ad elevati livelli in tale linea cellulare. Esse mediano l'interazione delle cellule con la matrice extracellulare e, attraverso il coinvolgimento della chinasi FAK localizzata nelle adesioni focali, trasducono nell'ambiente intracellulare segnali di proliferazione, sopravvivenza e migrazione cellulare (). I nostri risultati mostrano che il trattamento combinato SAHA/TRAIL non determina modifiche dei livelli di tali integrine,

anche se non è possibile escludere che tali composti inducono modifiche di altre molecole integriniche, la cui aberrante espressione è associata all'insorgenza e alla progressione del carcinoma mammario. Studi condotti sulla chinasi FAK, hanno però evidenziato che il trattamento combinato SAHA/TRAIL determina un notevole decremento dei livelli di tale proteina, solo nella popolazione di cellule che ha perso adesione al substrato. Tale decremento è evidente già dopo 8 h di trattamento ed è prevenuto dall'aggiunta dello z-IETD-fmk. Questa osservazione è in accordo con dati presenti in letteratura che indicano la proteina FAK come un target delle caspasi (). Poiché è stato dimostrato che l'inibizione dell'espressione di FAK con oligonucleotidi antisenso o forme dominanti-negative induce il distacco cellulare e l'anoikis () è possibile ipotizzare che la degradazione di FAK da parte della caspasi-8 possa indurre il disassemblaggio dei complessi delle adesioni focali favorendo così il distacco cellulare.

Diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di un cross-talk fra le integrine e il recettore per il fattore di crescita dell'epidermide (EGFR). Infatti, diverse chinasi attivate dal segnale integrinico sono in grado di fosforilare e attivare l'EGFR in modo ligando-indipendente. Il blocco di tali segnali è in grado di indurre anoikis in diversi tipi cellulari (). Alla luce di tali considerazioni, è stato quindi valutato l'effetto della combinazione SAHA/TRAIL sulla via dell'EGFR. I risultati ottenuti mostrano che il SAHA causa il decremento dei livelli di EGFR e della sua forma fosforilata. Questo risultato è in accordo con le osservazioni di Zhou, che dimostrano come in cellule di carcinoma mammario il SAHA decrementi i livelli di EGFR destabilizzando il suo mRNA (Zhou et al, 2009). Inoltre, il decremento indotto dal SAHA è potenziato dall'aggiunta del TRAIL. Ciò suggerisce che il decremento di EGFR potrebbe giocare un ruolo importante nell'induzione di apoptosi, sebbene il meccanismo mediante cui il cotrattamento può determinare questo effetto è sconosciuto al momento. È

possibile osservare inoltre come il trattamento combinato SAHA/TRAIL causi il decremento della forma fosforilata e attiva di ERK1/2 e contemporaneamente l'incremento della forma defosforilata e attiva di Bim_{EL}. Probabilmente, il decremento di EGFR potrebbe essere responsabile dell'accumulo della forma defosforilata di Bim_{EL}. Tale ipotesi è supportata dall'osservazione che l'AG1478, un inibitore specifico dell'attività tirosina chinasi dell'EGFR, causa un consistente decremento della forma fosforilata sia di EGFR che di ERK1/2, effetti accompagnati dall'incremento della forma defosforilata e attiva di Bim_{EL}. Inoltre, poiché è noto che la fosforilazione di ERK1/2 può dipendere anche da FAK, è possibile ipotizzare che il decremento della stessa proteina FAK, indotto dal trattamento combinato SAHA/TRAIL, possa contribuire all'attivazione di Bim_{EL}.

Alcuni studi hanno dimostrato che la forma fosforilata di Bim_{EL} esercita la sua funzione proapoptotica sia attraverso l'inibizione del fattore antiapoptotico Bcl-2 che attraverso l'attivazione di Bax; quest'ultimo può così traslocare a livello del mitocondrio formando pori sulla membrana (). Pertanto l'attivazione di Bim_{EL} potrebbe essere responsabile della perdita del potenziale di membrana mitocondriale osservato nella popolazione di cellule MDA-MB231 che ha perso adesione al substrato in seguito al trattamento combinato SAHA/TRAIL.

Nel complesso, i risultati presentati suggeriscono che il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce distacco e morte per anoikis delle cellule MDA-MB231. L'effetto indotto dall'associazione di tali composti risulta essere di notevole interesse, in particolare perché la linea cellulare MDA-MB231 è in grado di sopravvivere anche in assenza di adesione al substrato, mostrando così resistenza all'anoikis, diversamente dalle cellule normali che vanno incontro a morte per anoikis in seguito al distacco. Tale resistenza è spesso correlata all'attivazione di pathways di sopravvivenza. I risultati

ottenuti in questa tesi sono in accordo con questa conclusione; infatti abbiamo osservato che le cellule MDA-MB231 sopravvivono e proliferano in assenza di adesione al substrato quando coltivate in poly-Hema. Inoltre, tali cellule mantengono livelli elevati sia di FAK che di EGFR e bassi livelli di Bim_{EL}, che probabilmente sono responsabili della resistenza all'anoikis. Questa conclusione è in accordo con recenti osservazioni che mostrano che in cellule di carcinoma mammario sia FAK che EGFR sopprimono l'apoptosi. Infine i nostri risultati dimostrano che il trattamento combinato SAHA/TRAIL induce apoptosi in cellule MDA-MB 231 coltivate in poly-Hema, suggerendo che la combinazione di tali composti è in grado di ripristinare la sensibilità all'anoikis di questa linea cellulare. Questi effetti si accompagnano ad un marcato decremento dei livelli di FAK, EGFR, pEGFR, pERK1/2, e al contemporaneo incremento della forma fosforilata e attiva di Bim_{EL}. La combinazione SAHA/TRAIL potrebbe quindi rappresentare una nuova strategia farmacologica per il trattamento delle forme di carcinoma mammario negative al recettore per gli estrogeni.

BIBLIOGRAFIA

- Bennink HJTC, *Are all estrogens the same?*, *Maturitas*, 47, 269-275, 2004
- Marks PA, Xu WS, *Histone Deacetylase Inhibitors: Potential in Cancer Therapy*, *Journal of Cellular Biochemistry*, 107, 600-608, 2009.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA, *Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanism of action*, *Oncogene*, 26, 5541-5552, 2007.
- Karagiannis TC, El-Osta A, *Will broad-spectrum histone deacetylase inhibitors be superseded by more specific compounds?*, *Leukemia*, 21, 61-65, 2007.
- Lane AA, Chabner BA, *Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy*, *Journal of Clinical Oncology*, 27 (32), 5459-5468, 2009.
- Emanuele S, Lauricella M, Tesoriere G, *Histone deacetylase inhibitors: Apoptotic effects and clinical implications*, *International Journal of Oncology*, 33, 637-646, 2008.
- Codd R, Braich N, Liu J, Soe CZ, Pakchung AAH, *Zn (II)-dependent histone deacetylase inhibitors: Suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 736-739, 2009.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA, *Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives*, *Molecular Cancer Research*, 5 (10), 981-989, 2007.
- Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE, *Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors*, *Cancer Letters*, 280, 125-133, 2009.
- Oger F, Lecorgne A, Sala E, Naredese V, Demay F, Chevance S, Desravines DC, Aleksandrova N, Le Guevel R, Lorenzi S, Beccari AR, Barath P, Hart DJ, Bondon A, Carettoni D, Simonneaux G, Salbert G, *Biological and Biophysical Properties of the Histone Deacetylase Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid Are Affected by the Presence of Short Alkyl Groups on the Phenyl Ring*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 1937-1950, 2010.
- Siegel D, Hussein M, Belani C, Robert F, Galanis E, Richon VM, Garcia-Vargas J, Sanz-Rodriguez C, Rizvi S, *Vorinostat in solid and hematologic malignancies*, *Journal of Hematology & Oncology*, 2 (31), 1-11, 2009.
- Prince HM, Bishton MJ, Harrison SJ, *Clinical Studies of Histone Deacetylase Inhibitors*, *Clinical Cancer Research*, 15 (12), 3958-3969, 2009.
- Batty N, Malouf GG, Issa JPJ, *Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents*, *Cancer Letters* 280, 192-200, 2009. SAHA REVIEW 7
- Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H, *TRAIL signaling: Decisions between life and death*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 1462-1475, 2007.
- Richon VM, Vargas JG, Hardwick JS *Development of Vorinostat: Current applications and future perspectives for cancer therapy*, *Cancer Letters* 280, 201-210, 2009. SAHA REVIEW 8

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

Mark PA, Richon VM, Rifkind RA *Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells*, *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 15, 1210-1216, 2000. Saha REVIEW 19

Russo M, Mupo A, Spagnuolo C, Russo GL Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy, *Biochemical Pharmacology*, 80, 674-682, 2010.

Stearns V, Zhou Q, Davidson N, *Epigenetic Regulation as a New Target for Breast Cancer Therapy*, *Cancer Investigation* 25, 659-665, 2007. SAHA REVIEW 22

Thorburn A, Behbakht K, Ford H, TRAIL Receptor-targeted therapeutics: Resistance mechanisms and strategies to avoid them, *Drug Resist Updat.*, 11 (1-2):17-24, 2008.

Le Blanc HN, Ashkenazi A, Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors, *Cell Death and Differentiation*, 10, 66-75, 2003.

Pennarun B, Meijer A, de Vries EGE, Kleibeuker JH, Kruijt F, de Jong S Playing the DISC: Turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1805, 123-140, 2010.

Griffith TS, Stokes B, Kucaba TA, Earel JK Jr, VanOosten RL, Brincks EL, Norian LA TRAIL gene therapy: From preclinical development to clinical application, *Current Gene Therapy*, 9 (1), 9-19, 2009.

Chen JQ, Russo J ER α -negative and triple negative breast cancer: Molecular features and potential therapeutic approaches, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1796, 162-175, 2009.

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

Perez EA, Moreno-Aspitia A, Aubrey Thompson E, Andorfer CA Adjuvant therapy of triple negative breast cancer, *Breast Cancer Research and Treatment*, 120, 285-291, 2010.

Valentijn AJ, Zouq N, Gilmore AP Anoikis, *Biochemical Society*, 32, 3, 421-425, 2004.

Gilmore AP, Anoikis, *Cell Death and Differentiation*, 12, 1473-1477, 2005.

Dekker FJ, Haisma HJ Histone acetyl transferases as emerging drug target, *Drug Discovery Today*, 14, 19/20, 942-948, 2009.

Khan SN, Khan AU Role of histone acetylation in cell physiology and diseases: An update, *Clinica Chimica Acta*, 411, 1401-1411, 2010.

Selvi BR, Kundu TK Reversible acetylation of chromatin: Implication in regulation of gene expression, disease and therapeutics, *Biotechnology Journal*, 4, 375-390, 2009.

Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP, Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors, *Nature*, 401, 188-193, 1999.

Bosch A, Eroles P, Zaragosa R, Vina JR, Lluch A Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research, *Cancer Treatment Reviews*, 36, 206-215, 2010.

Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA Estrogen signaling via estrogen receptor β The journal of biological chemistry, Epub ahead of print, 2010.

McDonnell D, Wardell SE The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications of new drug discovery in breast cancer, *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 1-9, 2010.

Mann S, Laucirica R, Carlson N, Younes PS, Ali N, Younes A, Li Y, Younes M Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer, *Human Pathology*, 32, 113-118, 2001.

Vannini A, Volpari C, Filocamo G, Casavola Caroli G, Brunetti M, Renzoni D, Chakravarty P, Paolini C, De Francesco R, Gallinari P, Steinkuhler C, Di Marco S Crystal structure of a eukariotic zin-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor, *PNAS*, 101, 42, 15064-15069, 2004.

Monneret C, Histone deacetylase inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 1-13, 2005.

Long X, Nephew KP Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor- α , *The journal of biological chemistry*, 281, 14, 9607-9615, 2006.

Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action, *British Journal of Cancer*, 90,1, S2-S6, 2004.

Filardo EJ Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPCR-30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 80, 231-238, 2002.

Marks PA, Jiang X Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy, *Cell Cycle*, 4, 4, 549-551, 2005. Saha 6

Marks PA Discovery and development of SAHA as an anticancer agent, *Oncogene*, 26, 1351-1356, 2007.saha review 13

Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents *Journal of Ematology & Oncology*, 3, 5, 1-13, 2010.

Richon VM, Sandhoff T, Rifkind RA, Marks PA Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene associated histone acetylation, *PNAS*, 97, 10014-10019, 2000.

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 proteasome inhibitor Bortezomib, *Apoptosis*, 12, 1327-1338, 2007.

Bali P, Pranpat M, Swaby R, Fiskus W, Yamaguchi H, Balasis M, Rocha K, Wang HG, Richon V, Bhalla K Activity of suberoylanilide hydroxamic Acid against human breast cancer cells with amplification of her-2, *Clinical Cancer Research*, 11, 17, 6382-6389, 2005.

Mitsiades CS, Poulaki V, McMullan C, Negri J, Fanourakis G, Goudopoulou A, Richon VM, Marks PA, Mitsiades N, Novel histone deacetylase inhibitors in the treatment of thyroid cancer, *Clinical Cancer Research*, 11, 10, 3958-3965, 2005. .

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

Zhang XH, Rao M, Loprieto JA, Hong JA, Zhao M, Chen GZ, Humphries AE, Nguyen DM, Trepel JB, Yu X, Schrupp DS, Aurora A, Aurora B and survivin are novel targets of transcriptional regulation by histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer, *Cancer Biology & Therapy*, 7, 9, 1388-1397, 2008.

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

Portanova P, Russo T, Pellerito O, Calvaruso G, Giuliano M, Vento R, Tesoriere G The role of oxidative stress in apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in human colon adenocarcinoma HT-29 cells, *International Journal of Oncology*, 33,325-331, 2008.

Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin, *PNAS*, 99, 18, 11700-11705, 2002.

Mühlenberg T, Zhang Y, Wagner AJ, Grabellus F, Bradner J, Taeger G, Lang H, Taguchi T, Schuler M, Fletcher JA, Bauer S Inhibitors of Deacetylases Suppress Oncogenic KIT Signaling, Acetylate HSP90, and Induce Apoptosis in Gastrointestinal Stromal Tumors, *Cancer Research*, 69, 17, 6941-6950, 2009.

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

Huang L, Pardee AB Suberoylanilide Hydroxamic Acid as a Potential Therapeutic Agent for Human Breast Cancer Treatment, *Molecular Medicine*, 6, 10, 849-866, 2000.

Hrzenjak A, Kremser ML, Strohmeier B, Moinfar F, Zatloukal K, Denk H SAHA induces caspase-independent, autophagic cell death of endometrial stromal sarcoma cells by influencing the mTOR pathway, *J Pathol.*, 216, 4, 495-504, 2008.

Yamamoto S, Tanaka K, Sakimura R, Okada T, Nakamura T, Li Y, Takasaki M, Nakabeppu Y, Iwamoto Y, Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces apoptosis or autophagy-associated cell death in chondrosarcoma cell lines, *Anticancer Research*, 28, 3A, 1585-1591, 2008.

Desgrosellier JS, Cheres DA Integrin in cancer: biological implications and therapeutic opportunities, *Nature review cancer*, 10, 9-20, 2010.

Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D Integrin, *Cell Tissue Research*, 339, 269-280, 2010.

Grashoff C, Thievensen I, Lorenz K, Ussar S, Fässler R, Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner, *Current Opinion in Cell Biology*, 2004, 16:565-571.

Fukazawa H, Noguchi K, Masumi A, Murakami Y, Uehara Y BimEL is an important determinant for induction of anoikis by mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitors, *Molecular Cancer Therapeutics*, 3, 10, 1281-1288, 2004.

Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD Anoikis resistance and tumor metastasis, *Cancer Letters*, 272, 177-185, 2008.

Harada H, Quearry B, Ruiz-Vela A, Korsmeyer SJ Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with Bax and proapoptotic activity PNAS, 101, 43, 15313-15317, 2004.

Ley R, Ewings KE, Hadfield K, Cook SJ Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK, *Cell Death and Differentiation*, 12, 1008-1014, 2005.

Costa DB, Halmos B, Kumar A, Schumer ST, Huberman MS, Boggon TJ, Tenen DG, Kobayashi S, BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations, *Plos Medicine*, 4, 10, 1669-1680, 2007

Uehara N, Matsuoka Y, Tsubura A Mesothelin promotes anchorage-independent growth and prevents anoikis via extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human breast cancer cells, *Molecular Cancer Research*, 6, 2, 186-193, 2008.

Marconi A, Atzei P, Panza C, Fila C, Tiberio R, Truzzi F, Wachter T, Leverkus M, Pincelli C, FLICE/caspase-8 activation triggers anoikis induced by β 1-integrin blockade in human keratinocytes, *Journal of Cell Science*, 117, 24, 5815-5823.

Park SJ, Kim MJ, Kim HB, Sohn HY, Bae JH, Kang CD, Kim SH Tricostatin A sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by down-regulation of c-FLIP_L via inhibition of EGFR pathway, *Biochemical Pharmacology*, 77, 1328-1336, 2009.

Cai B, Chang SH, Becker EBE, Bonni A, Xia Z p38 MAP kinase mediated apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65, *The journal of biological chemistry*, 281, 35, 25215-25222, 2006.

- Aoudjit F, Vouri K Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-FLIP and implications for anoikis, *The Journal of Cell Biology* 152, 3, 633-643, 2001
- Giannoni E, Buricchi F, Grimaldi G, Parri M, Cialdai F, Taddei ML, Raugei G, Ramponi G, Chiarugi P, Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival, *Cell death and differentiation*, 15, 867-878, 2008.
- Chiarugi P, Giannoni E, Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells, *Biochemical Pharmacology*, 76, 1352-1364, 2008.
- Sallman DA, Chen X, Zhong B, Gilvary DL, Zhou J, Wei S, Djeu JY, *Clusterin mediates TRAIL resistance in prostate tumor cells*, *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 11, 2938-2947.
- Evdokiou A, Labrinidis A, Bouralexis S, Hay S, Findlay DM, *Induction of cell death of human osteogenic sarcoma cells by zoledronic acid resembles anoikis*, *Bone*, 33, 216-228, 2003.
- Golubovskaya V, Beviglia L, Xu LH, Earp HS, Craven R, Cance W, *Dual Inhibition of Focal Adhesion Kinase and Epidermal Growth Factor Receptor Pathways Cooperatively Induces Death Receptor mediated Apoptosis in Human Breast Cancer Cells*, *J. Biol. Chem.* 277, 38978-38987, 2002.
- Wen LP, Fahrni JA, Troie S, Guan JL, Orth K, Rosen GD, *Cleavage of Focal Adhesion Kinase by Caspases during Apoptosis*, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 42, 26056-26061, 1997.
- Xu LH, Yang X, Bradham CA, Brenner DA, Baldwin AS, Craven RJ, Cance WG, *The Focal Adhesion Kinase Suppresses Transformation-associated, Anchorage-independent Apoptosis in Human Breast Cancer Cells*, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 39, 30597-30604, 2000.
- Gong Y, Somwar R, Politi K, Balak M, Chmielecki J, Jiang X, Pao W, *Induction of Bim is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas*, *Plos Medicine*, 4, 10, 1655-1668, 2007.
- Gragg MS, Kuroda J, Puthalakath H, Huang DCS, Strasser A, *Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics*, *Plos Medicine*, 4, 10, 1681-1690, 2007.
- Zhou Q, Shaw PG, Davidson NE, *Inhibition of histone deacetylase suppresses EGF signaling pathways by destabilizing EGFR mRNA in ER-negative human breast cancer cells*, *Breast Cancer Res. Treat.* 117, 443-451, 2009.

Kim JB, Yu JH, Ko E, Lee KW, Song AK, Park SY, Shin I, Han W, Noh DY, The alkaloid Berberine inhibits the growth of Anoikis-resistant MCF-7 and MDA-MB231 breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest, *Phytomedicine*,

Zhang G, Liu X, Farkas AM, Parwani AV, Lathrop KL, Lenzer D, Land SR, Srinivas H, *Estrogen receptor beta functions through nongenomic mechanisms in lung cancer cells*, *Molecular Endocrinology*, 23, 2, 146-156, 2009.

Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7, *The journal of biological chemistry*, 284, 9, 5731-5741, 2009.

Holland PM, Targeting Apo2L/TRAIL receptors by soluble Apo2L/TRAIL, *Cancer Letters*, in press, 2011.

Merino D, Lalaoui N, Morizot A, Schneider P, Solary E, Micheau O, Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptor 1 and 2, *Molecular and cellular biology*, 26, 19, 7046-7055, 2006.