



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO  
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di Ricerca  
in Biologia dei Sistemi

Ciclo XIV N.S. — Anno di discussione 2016

Coordinatore: Chiar.mo Prof. *Antonietta Leone*

***Nuove prospettive terapeutiche del glioma:  
N6-isopenteniladenosina  
ed  
SR141716***

settore scientifico disciplinare di afferenza: MED/04

**Dottorando**

Dott.  
*Antonio Christian  
Pagano Zottola*

**Tutore**

Chiar.mo Prof.  
*Antonietta Leone*

**Co-tutore**

Chiar.mo Prof.  
*Patrizia Gazzero*



**Abstract**

Abstract..... 1

**Sommario**

Sommario..... 2

**Capitolo I. Glioma**

1.1 Classificazione dei gliomi ..... 4  
1.2 Fattori di rischio ed alterazioni genetiche nel glioma..... 5  
    1.2.1 Alterazioni genetiche nel glioma: focus su STAT3..... 6  
1.3 Evoluzione clinica e diagnosi del glioma ..... 7  
1.4 Terapia del glioma ..... 8  
    1.4.1 Bone morphogenetic proteins: target terapeutico e biomarker nel glioma ..... 9  
1.5 Il ruolo del sistema immunitario nell' evoluzione del glioma ..... 12  
    1.5.1 Linfociti NK e glioma: possibili applicazioni terapeutiche ..... 13

**Capitolo II. N6-isopenteniladenosina**

2.1 N6-isopenteniladenosina ..... 17  
2.2 Funzioni e biosintesi dell' iPA nelle piante..... 18  
2.3 Effetti biologici dell' iPA: studi pre-clinici..... 19  
    2.3.1 Focus sul ruolo centrale di FPPS nelle patologie oncologiche ..... 22  
2.4 Effetti biologici dell' iPA: studi clinici ..... 24  
2.5 iPA e modulazione dell' espressione genica ..... 25  
2.6 Carcinoma del colon-retto ..... 26  
    2.6.1 Carcinoma del colon-retto: ruolo di BMP4 ..... 30  
    2.6.2 Attuali terapie farmacologiche per il carcinoma coloretale..... 30  
2.7 Carcinoma del colon-retto e regolazione epigenetica ..... 31  
    2.7.1 Modifiche istoniche e ruolo nella carcinogenesi..... 32  
    2.7.2 Ruolo dell' ubiquitinazione..... 35  
2.8 iPA e cancro del colon-retto ..... 38  
2.9 Materiali e Metodi .....  
    2.9.1 Composti ..... 40  
    2.9.2 Colture cellulari..... 40  
    2.9.3 Saggio di proliferazione cellulare ..... 41  
    2.9.4 Analisi del ciclo cellulare ..... 41

2.9.5 Analisi dell' apoptosi .....	41
2.9.6 Western blotting .....	42
2.9.7 Analisi statistica .....	42
2.10 Risultati .....	
2.10.1 Effetti dell' iPA sulla proliferazione di linee cellulari di CRC .....	43
2.10.2 Identificazione di potenziali target molecolari di iPA .....	47
2.10.2.1 Istone H2B, partner proteico di iPA .....	47
2.10.2.1.1 Analisi proteomica .....	47
2.10.2.1.2 Saggi in vitro .....	48
2.10.2.1.3 Effetti dell' iPA sul crosstalk H2B-H3 in modelli di CRC .....	50
2.10.2.2 BMP4: target molecolare di iPA .....	52
2.10.2.2.1 Analisi proteomica .....	52
2.10.2.2.2 Saggi in vitro .....	53
2.10.3 Effetti dell' iPA in modelli cellulari di glioma .....	54
2.10.3.1 Effetti dell' iPA sulla proliferazione di linee cellulari di glioma .....	54
2.10.3.2 Analisi degli effetti molecolari dell' iPA in modelli cellulari di glioma .....	55
2.11 Discussione.....	57

<b>Capitolo III. SR141716</b>
-------------------------------

3.1 Il sistema endocannabinoide: generalità .....	62
3.2 I recettori dei cannabinoidi .....	63
3.3 Il sistema endocannabinoide: tra fisiologia e patologia .....	65
3.3.1 Sistema endocannabinoide e cancro .....	65
3.3.2 Il ruolo di CB1 nei tumori cerebrali: da astrociti ad astrocitomi .....	66
3.4 Agonisti ed antagonisti sintetici dei recettori CB.....	68
3.5 SR141716, il primo antagonista sintetico per CB1 .....	70
3.5.1 SR141716: effetti anti-obesità .....	71
3.5.2 SR141716: effetti antiproliferativi .....	73
3.5.3 SR141716: effetti antitumorali .....	73
3.6 Materiali e Metodi.....	
3.6.1 Reagenti ed anticorpi.....	75
3.6.2 Colture cellulari .....	75
3.6.3 Analisi citofluorimetriche .....	76
3.6.4 Saggio di proliferazione cellulare .....	76
3.6.5 Analisi del ciclo cellulare.....	76
3.6.6 Analisi dell' apoptosi .....	77
3.6.7 Real-time PCR.....	77
3.6.8 Analisi citofluorimetrica della citotossicità di cellule NK .....	77
3.6.9 Valutazione dei livelli di IFN- $\gamma$ tramite test ELISA .....	78
3.6.10 Western blotting.....	78
3.6.11 Esperimenti in vivo .....	79
3.6.12 Immunistoichimica.....	79
3.6.13 Trasfezione .....	80
3.6.14 Analisi statistiche .....	80
3.7 Risultati .....	
3.7.1 Effetti di SR141716 sulla proliferazione di modelli cellulari di glioma .....	81
3.7.2 Effetti di SR141716 sul riconoscimento immunitario da parte di cellule NK .....	84

## **Indice**

---

3.7.3 Effetti di SR141716 in vivo .....	87
3.7.4 Effetti di SR141716 sul pathway di STAT3 .....	88
3.8 Discussione .....	90

### **Capitolo IV. Conclusioni**

Conclusioni .....	93
-------------------	----

### **Bibliografia**

Bibliografia.....	I-XXVI
-------------------	--------



**Abstract**

Glioma is a fatal disease characterized by uncontrolled cellular proliferation and it is the most common primary brain malignancy in adults. Despite years of research, malignant glioma remains one of the most aggressive cancer, with an average expectancy of life of 12-15 months after resection, radiotherapy and chemotherapy.

N6-isopentenyladenosine (iPA) is a modified nucleoside with a pentaatomic isopentenyl moiety, derived from mevalonate, that induces inhibition of cell proliferation in several tumor cell lines. It has been shown that iPA modulates the expression of several proteins involved in the promotion of tumor growth, but only recently, our studies suggested bone morphogenetic protein 4 (BMP4), part of the transforming growth factor beta superfamily, as potential iPA target. According to preliminary results, in fact, iPA, in several human colorectal cancer and glioma cell lines, is able to inhibit cell proliferation and to modulate, in a tumor specific way, the expression of BMP4, involved in the migration, invasion and differentiation of tumor cells.

SR141716 is an antagonist of cannabinoids receptor type 1 (CB1), involved in the regulation of cellular processes linked to survival, proliferation, invasion and angiogenesis in physiopathological conditions.

Our group showed that a majority of human glioma cell lines overexpresses CB1, compared to normal human astrocytes, and that, in this cancer model, SR141716 is able to induce apoptosis via G1 phase stasis. This study demonstrates also that SR141716 increases the functional and selective expression of MICA/B on the surface of malignant glioma cells through a mechanism that involves STAT3 inhibition. This makes SR141716 treated-glioma cells, a potent target for allogeneic NK cell-mediated recognition through a NKG2D restricted mechanism. Although further studies will be necessary to investigate the mechanism of action of these molecules, these results shed new light on the oncogenic networks in the complex biology of glioma.

## Sommario

Il glioma é il piú comune tra i tumori cerebrali di alto grado, caratterizzato da incontrollata proliferazione cellulare, diffusa infiltrazione, tendenza alla formazione di regioni necrotizzanti, significativa induzione di angiogenesi e resistenza all' apoptosi. Data l' urgente necessitá di piú efficaci terapie farmacologiche per il trattamento di questa devastante patologia, il nostro gruppo di ricerca ha analizzato, in modelli di glioma, gli effetti di due promettenti molecole: l' N6-isopenteniladenosina e SR141716.

Nella prima fase del progetto sono stati valutati gli effetti dell' N6-isopenteniladenosina (iPA), un derivato dell' adenosina (Faust & Dice 1991), mediante studi di proliferazione cellulare ed analisi proteomiche condotte in collaborazione con il Prof. Fabrizio Dal Piaz del Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Salerno.

Tali indagini hanno evidenziato la capacitá della molecola di inibire la proliferazione cellulare di modelli di carcinoma coloretale (CRC) e di glioma. L' iPA é risultata inoltre efficace nel modulare l' espressione di diverse proteine coinvolte nell' evoluzione delle neoplasie e, tra le altre, della *bone morphogenetic protein 4* (BMP4) in modo tumore-specifico: nel CRC, in cui alti livelli di BMP4 sono associati a fenotipi aggressivi (Deng et al. 2007), l' iPA ne riduce l' espressione; in modelli di glioma, laddove BMP4 ha attivitá antiproliferativa (Gomez et al. 2014), iPA ne induce un sensibile aumento.

SR141716, invece, é un antagonista del recettore per i cannabinoidi di tipo 1, recettore metabotropico associato a proteina G, coinvolto in diversi processi fisiopatologici a carico del sistema nervoso centrale. Lo studio condotto presso i nostri laboratori ha dimostrato l' effetto antiproliferativo della molecola in modelli di glioma oltre che la capacitá della stessa di attivarne il riconoscimento immunitario, attraverso un meccanismo STAT3 mediato.

Lo stato di attivazione di STAT3, infatti, non solo é responsabile dell' induzione di angiogenesi, metastatizzazione e proliferazione cellulare, ma é, inoltre, coinvolto nella regolazione di mediatori molecolari e cellulari responsabili dell' immunodepressione associata alle patologie oncologiche (Kim et al. 2014): la costitutiva attivazione di STAT3 induce riduzione dei livelli dei ligandi NKG2D espressi dalle cellule tumorali, quali le proteine MICA e MICB, necessarie al riconoscimento immunitario ad opera dei linfociti NK (Bedel et al. 2015). I nostri studi hanno dimostrato che in modelli cellulari di glioma, SR141716 aumenta l' espressione di MICA/B, inducendo parallelamente significativo incremento del *killing* linfocitario ad opera di cellule NK.

I risultati raccolti in questo lavoro di tesi ci hanno permesso di identificare nuovi *network* oncogenici e nuove possibili strategie terapeutiche, potenzialmente applicabili nella lotta al glioma.

.



# **I. Glioma**

## 1.1 Classificazione dei gliomi

I gliomi, tumori neuroectodermici di derivazione gliale, rappresentano il più frequente tipo di tumore intracranico primitivo (circa il 40% del totale), con un'incidenza di 6-7 individui ogni 100.000 abitanti/anno. Essi si localizzano prevalentemente a livello degli emisferi cerebrali, in particolare nella sostanza bianca e nei nuclei della base e talamici, più raramente nel tronco e nel cervelletto. Se ne distinguono tre diversi istotipi: astrocitomi, oligodendrogliomi ed ependimomi.

A causa del peculiare modello di crescita e di diffusione dei tumori cerebrali e diverso da qualunque altro tumore solido, essi non seguono la classica stadiazione TNM, ma una classificazione proposta dalla *World Health Organization* (WHO), che li suddivide in tumori da basso grado ad alto grado (I-IV), secondo caratteristiche citogenetiche (atipie nucleari, necrosi, presenza di mitosi e di proliferazione endoteliale), morfologiche e prognostiche (Louis et al. 2007):

- **WHO grado I:** comprende lesioni con basso potenziale proliferativo, buona possibilità di resezione chirurgica e cura;
- **WHO grado II:** lesioni generalmente con bassa attività mitotica, ma che infiltrano il parenchima circostante e possono recidivare, progredendo verso forme istologiche più aggressive;
- **WHO grado III:** lesioni indifferenziate, con elevata capacità infiltrativa e anaplasia;
- **WHO grado IV:** lesioni in attiva fase mitotica, con aree necrotico-emorragiche, associate a rapida evoluzione.

Tra i tumori di derivazione astrocitaria, che globalmente rappresentano il 75% di tutti i gliomi, è possibile riconoscere forme sia di basso che di alto grado. Gli astrocitomi di basso grado (I-II) sono neoplasie poco comuni, a istologia benigna e guaribili molto spesso con la sola chirurgia. Essi comprendono l'astrocitoma pilocitico, l'astrocitoma subependimale a cellule giganti e lo xantoastrocitoma pleomorfo ed insorgono per lo più in età pediatrica o nella seconda decade di vita del paziente. Nonostante il loro corso relativamente indolente, la maggior parte di questi astrocitomi evolve, però, verso lesioni più anaplastiche, che non sono normalmente guaribili con chirurgia e radioterapia. Astrocitomi di alto grado (III-IV) sono invece l'astrocitoma diffuso, l'astrocitoma anaplastico ed il glioblastoma (il più frequente tra i gliomi). Questi ultimi presentano crescita rapida, sia espansiva che infiltrante, colpiscono soprattutto gli adulti tra i 50 e i 70 anni, ma possono anche rappresentare la recidiva più aggressiva di un astrocitoma precedente; sono associati ad una prognosi infausta, con un'aspettativa di vita media di 12 mesi per le forme più aggressive.

Gli oligodendrogliomi rappresentano il 10-15 % di tutti i gliomi e colpiscono gli adulti tra i 40 e i 50 anni, interessando soprattutto la corteccia e la sostanza bianca. Anch'essi presentano forme ad alto e basso grado. Pur essendo neoplasie chemiosensibili presentano una mediana di sopravvivenza tra i 3 e i 5 anni.

Gli ependimomi sono tumori derivanti dalle cellule che rivestono i ventricoli e il canale midollare e presentano due picchi di incidenza caratteristici, da 0 a 10 anni e tra i 40 e i 50 anni. Nei bambini hanno una presentazione prevalentemente intracranica, a

livello del quarto ventricolo, negli adulti una localizzazione spinale. Pur esistendo sia forme di basso che di alto grado, più raramente degli astrocitomi recidivano progredendo verso una forma più aggressiva.

## 1.2 Fattori di rischio ed alterazioni genetiche nel glioma

Sebbene la rilevanza epidemiologica di una precedente irradiazione cranica, così come dell'esposizione a sostanze come pesticidi, fertilizzanti e cloruro di vinile attualmente presenti solo carattere speculativo, è ben noto che la genetica giochi un ruolo fondamentale nello sviluppo di sindromi familiari che predispongono al tumore. Ne sono esempio la neurofibromatosi tipo I (17q11), la neurofibromatosi tipo II (22q12), la malattia di von Hippel-Lindau (3p25-26), la sclerosi tuberosa (9q34, 16p13), la sindrome di Li-Fraumeni (17p13) e la sindrome di Turcot tipo I (3p11,7p22). Circa il 5% dei gliomi sembra, infatti, presentare una componente familiare, con un aumento dell'incidenza nei parenti di primo grado dei pazienti (Blumenthal et al. 2008). L'analisi dello stato mutazionale delle forme sporadiche di tumore ha evidenziato che gli oligodendrogliomi presentano, tra le alterazioni con maggiore incidenza, la perdita dell'eterozigosi a carico dei cromosomi 1p e 19q, in una percentuale vicina all'80% dei casi (Yip et al. 2008); negli ependimomi spinali risulta frequentemente mutato l'oncosoppressore NF2, mentre i tumori sovratentoriali mostrano tipiche mutazioni di geni localizzati sul cromosoma 9. Tra le alterazioni coinvolte nello sviluppo degli astrocitomi di basso grado sono evidenziabili le mutazioni a carico del gene p53 e l'iperespressione del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF-A) e del suo recettore, mentre la progressione verso forme più aggressive sembra essere mediata dall'inattivazione degli oncosoppressori Rb e p16/CDKNaA. I gliomi di alto grado presentano mutazioni o amplificazioni del gene che codifica per il recettore del fattore di crescita endoteliale (EGFR) (Rich et al. 2004; Mellinshoff et al. 2005; Inda et al. 2010; Taylor et al. 2012), con la conseguente produzione di forme alterate note come EGFR vIII, in grado di determinare un aumento dell'attività della tirosina-chinasi recettoriale e l'attivazione della via di Ras e della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K), con stimolazione della crescita e della sopravvivenza delle cellule neoplastiche (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008); sono state inoltre evidenziate alterazioni nel *pathway* del *target* molecolare della rapamicina (mTOR) (Hu et al. 2005; Fan et al. 2006), del recettore per il fattore di crescita vascolare (VEGFR) (Rubenstein et al. 2000; Batchelor et al. 2007), come anche mutazioni a carico dell'isocitrato deidrogenasi (IDH) 1 e 2, dell'oncosoppressore PTEN (Wu et al. 2013) e dell'enzima riparatore del DNA, MGMT (Kohsaka et al. 2012).

Il *profiling* molecolare di campioni di glioma ottenuti da paziente ha inoltre mostrato che la via di segnalazione di STAT3 è fortemente deregolata.

### 1.2.1 Alterazioni genetiche nel glioma: focus su STAT3

La proteina STAT3 è parte della famiglia dei fattori di trascrizione attivati da tirosin-chinasi e media le risposte infiammatorie ed i segnali di proliferazione cellulare (Zhong et al. 1994; Bromberg et al. 2000). Gli attivatori di STAT3 includono recettori per i fattori di crescita quali EGFR, PDGFR ed enzimi citoplasmatici come JAK e le chinasi Src (Turkson et al. 1998). Una volta fosforilato, STAT3 (pSTAT3) dimerizza mediante interazioni fosfotirosina-SH e trasloca nel nucleo, dove regola la trascrizione di specifici geni *target*; tale attività sembra essere massimizzata in seguito a fosforilazione dei residui di serina dei dimeri proteici ad opera di chinasi intranucleari (PSKs) (Takeda et al. 1999; Akira et al. 2000; Bowman et al. 2001; Levy et al. 2002). Il *signaling* di STAT3 è però soggetto ad un fine controllo: esistono molecole che ne inibiscono l'attività, defosforilando i dimeri di fattore di trascrizione (Yamamoto et al. 2002; Zhang et al. 2007); soppressori del *signaling* delle citochine (SOCS) che regolano negativamente l'interazione JAK/STAT3 (Yoshikawa et al. 2001); inibitori del *binding* del fattore di trascrizione al DNA, e quindi proteine capaci di legare STAT3 nel citoplasma impedendone la traslocazione nucleare (Collum et al. 2000). Tutti i potenziali mediatori che alterano la via di trasduzione del segnale di STAT3, schematizzati in **tabella 1**, rappresentano un importante *checkpoint* cellulare che ne impedisce una costitutiva attivazione, caratteristica tipica del 50-90% dei tumori umani (Buettner et al. 2002; Yu et al. 2004)

**Tabella 1** Siti di regolazione del segnale di STAT3 (Kim et al. 2014)

Site of disruption	Potential mediators of disruption
Cell surface receptor-ligand interaction	Ligand/receptor antagonists, <i>i.e.</i> , anti-EGF-R antibodies
Tyrosine or serine kinase activity	TRK, EGF-R, FBGF-R, JAK, Src, PSK inhibitors
Endogenous STAT3 activity or function	Biological protein inhibitors of STAT3 activity, <i>i.e.</i> , SOCS, PIAS3, StIP1 modulators
De-phosphorylation of phospho-STATs	Protein tyrosine or serine phosphatases
STAT3 dimerization	Small molecule inhibitors of dimerization
STAT3 nuclear translocation	Small molecule inhibitors of dimerization, inhibitors of nuclear endocytosis
STAT3 transcription activation	Antisense or STAT3 decoy oligonucleotide sequences, dominant negative mutants

STAT3 è, infatti, al centro dei più importanti *pathways* oncogenici in cui sono coinvolti EGFR, il recettore heregulin-2/neuregulin (Heu2/Neu), PDGFR, il recettore per l'interleuchina (IL)-6/gp130, la tirosin-chinasi c-Met, la *Abelson leukemia protein* (ABL), Src (Zhong et al. 1994; Yu et al. 1995; Hodge et al. 2005) e la costitutiva attivazione del fattore di trascrizione dovuta a mutazioni della proteina o ad alterazioni dei punti di controllo del *signaling* (**fig.1**). Nel 2006 Mizoguchi *et al.* hanno dimostrato lo stato di attivazione costitutiva di STAT3 in astrocitomi anaplastici e glioblastomi (rispettivamente nel 55.6% e 56.4% dei campioni esaminati) (Mizoguchi et al. 2006). Abou-Ghazal ha riportato risultati simili nel 2008, con il 50% degli astrocitomi ed il 54% dei glioblastomi positivi allo *staining* per pSTAT3 (Abou-Ghazal et al. 2008). Lo

*et al.* hanno infine proposto l'esistenza di una correlazione positiva tra il grado del glioma e l'attivazione di STAT3: la costitutiva attivazione del fattore di crescita è stata riscontrata nel 60% dei gliomi di alto grado, insieme ad iperattività delle chinasi JAK2, EGFR/EGFRVIII (Lo et al. 2008).

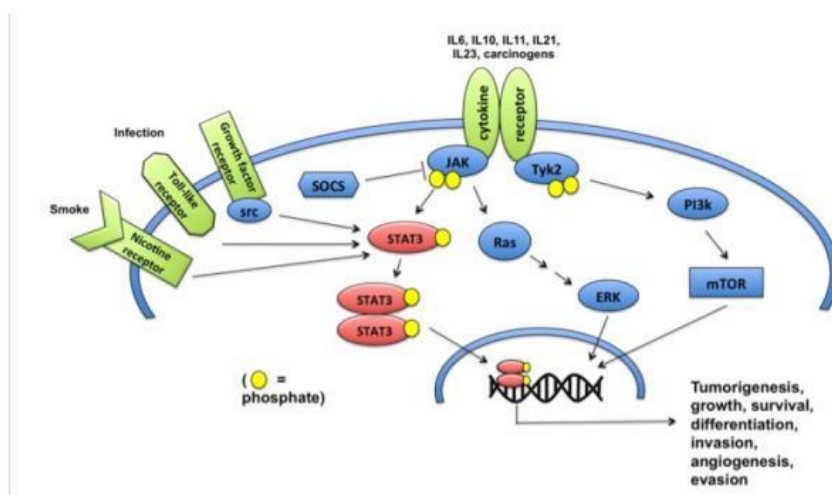


Figura 1 STAT3, punto di convergenza di pathway oncogenici (Kim et al. 2014)

Una volta attivato, STAT3 induce meccanismi pro-oncogenici responsabili della promozione della proliferazione cellulare, aumentata sopravvivenza, soppressione immunitaria, metastatizzazione ed angiogenesi. La costitutiva attivazione di STAT3 conferisce resistenza all'apoptosi e promuove la progressione del ciclo cellulare mediante l'interazione con gp130, coinvolta nella trasduzione del segnale dell'IL-6, (Hirano et al. 2000) e l'aumento dell'espressione di molecole anti-apoptotiche quali Bcl-XL, Mcl-1 e *survivin* (Catlett-Falcone et al. 1999; Chen et al. 2010; Aoki et al. 2003); al contrario, diversi studi *in vitro* ed *in vivo* suggeriscono che l'inibizione dell'attività di STAT3 può rappresentare un'interessante strategia terapeutica (Sherry et al. 2009). Sempre maggiori evidenze definiscono, quindi, un ruolo centrale di STAT3 nella tumorigenesi del glioma, suggerendone lo stato di fosforilazione della tirosina 705 come importante *marker* prognostico (Birner et al. 2010).

### 1.3 Evoluzione clinica e diagnosi del glioma

Da un punto di vista clinico i tumori cerebrali mostrano una diversa presentazione a seconda del grado di malignità e della localizzazione della neoplasia per via dei fenomeni compressivi sul parenchima circostante, risultato dell'effetto massa dovuto alla iperattività di crescita cellulare ed all'idrocefalo secondario.

Gli astrocitomi e gli oligodendrogliomi di basso grado mostrano evoluzione lenta e storia clinica generalmente lunga. All'esordio si rendono manifesti con episodi di

cefalea notturna (accompagnata da nausea e vomito), omolaterale alla lesione, e crisi convulsive focali o generalizzate, che possono ripresentarsi nel corso dei mesi successivi, con periodi interictali anche piuttosto lunghi. I disturbi psichici, come alterazioni della memoria ed apatia, sono anch'essi molto comuni e in alcuni pazienti, soprattutto anziani, possono essere gli unici sintomi all'esordio della patologia. Segni neurologici focali, come emianopsia, emiparesi e disfasia, sono secondari all'infiltrazione tumorale, meno spesso a fenomeni compressivi, e dipendono dalla localizzazione del tumore. Segni di ipertensione endocranica insorgono più tardivamente, a causa del carattere più infiltrante che espansivo di questi tumori.

I tumori di alto grado, soprattutto il glioblastoma, mostrano una rapida evoluzione, con la comparsa, in genere nell'arco di 3-5 settimane, di una sintomatologia focale e dei segni di ipertensione endocranica. Gli oligodendrogliomi si manifestano anch'essi con crisi convulsive e, a causa della prevalente localizzazione a carico del lobo frontale, con disturbi della personalità. Gli ependimomi si manifestano spesso con sintomi e segni di invasione del ponte e del bulbo con idrocefalo secondario all'ostruzione del sistema ventricolare, soprattutto a livello del quarto ventricolo.

Oltre alla sintomatologia clinica, fondamentale per la diagnosi è il quadro neuroradiologico del paziente: l'esame *gold standard* è rappresentato dalla Risonanza magnetica (RM) con gadolinio. Alla RM le lesioni di basso grado si presentano come scarsamente infiltranti e poco vascolarizzate, mentre quelle di alto grado mostrano crescita sia infiltrante che espansiva, diffusamente vascolarizzate ed ampie aree necrotiche (ad eccezione dell'astrocitoma pilocitico che, nonostante sia altamente vascolarizzato, è un tumore di basso grado, con buona prognosi, senza recidiva a seguito dell'enucleazione) (Wood et al. 1988). Nella fase preoperatoria la RM può essere integrata dall'angio-RM per lo studio della vascolarizzazione intralesionale e dalla RM a spettroscopia nucleare, una tecnica in grado di fornire dati multiparametrici registrando i differenti *patterns* di distribuzione nel tessuto cerebrale di N-acetilspartato e creatina (elevati nel tessuto sano) e di colina e lattato (elevati nei tessuti tumorali). Mediante tale tecnica è possibile visualizzare l'estensione del tessuto neoplastico e contemporaneamente quantificare la sua attività metabolica, elementi particolarmente utili nel valutare la risposta alla chemioterapia e per il riscontro delle eventuali recidive.

## 1.4 Terapia del glioma

La terapia dei gliomi giova in prima istanza della resezione chirurgica che deve sempre essere praticata qualora possibile. È stato dimostrato che un approccio radicale migliora i sintomi dovuti ai fenomeni compressivi e, riducendo il carico tumorale, l'aumentata ossigenazione del residuo potenzia la risposta alla radioterapia e riduce la comparsa di chemioresistenza (Laws et al. 2003). Inoltre, studi retrospettivi dimostrano come l'asportazione di almeno il 98% della lesione aumenti in maniera significativa la sopravvivenza dei pazienti, da una media di 8,8 fino a 13 mesi (Lacroix et al. 2001).

Tuttavia bisogna sottolineare i limiti della possibilità di ottenere una chirurgia radicale, soprattutto in aree critiche, a causa del carattere infiltrativo delle lesioni di alto grado: nell'80% dei casi si ha una recidiva, in genere in prossimità della lesione primitiva,

anche in assenza di residui radiologicamente evidenti. Nei pazienti affetti da glioma il controllo post chirurgico della malattia può essere effettuato con la radioterapia (50 Gy/25F), che è dimostrato prolunghi la sopravvivenza, nei pazienti con glioblastoma, fino a 12 mesi e fino a 3-5 anni nei pazienti con oligoastrocitoma e oligodendroglioma anaplastico, non alterando la qualità della vita, né la funzione neuropsicologica e cognitiva (Cairncross et al. 2006). Nei pazienti con glioblastoma, con meno di 70 anni, lo standard terapeutico prevede la somministrazione dell' analogo triazenoico della dacarbazina con attività antineoplastica, temozolomide (75 mg/m<sup>2</sup>/die), per tutta la durata della radioterapia per un massimo di 7 settimane, seguite da 6 cicli di temozolomide adiuvante (150-200 mg/m<sup>2</sup> per 5 giorni ogni 28 giorni): i pazienti così trattati hanno avuto un miglioramento del tempo di progressione (5 vs 6,9 mesi), della sopravvivenza mediana (12,1 vs 14,6 mesi) e della sopravvivenza a 2 anni (10,4 vs 26,5 mesi) (Stupp et al. 2005). Studi clinici di fase III sono attualmente in atto, per dimostrare l'efficacia e la sicurezza di alcuni farmaci, tra cui il bevacizumab, in aggiunta alla terapia standard, che ha dimostrato essere responsabile di un aumento della sopravvivenza libera da malattia, con un rallentamento del deterioramento cognitivo, ma non della sopravvivenza globale (Chinot et al. 2014).

Nei pazienti con gliomi di basso grado, la radioterapia adiuvante dovrebbe essere eseguita in caso di presenza di fattori di rischio clinici e radiologici (Pignatti et al. 2002). La chemioterapia adiuvante, al contrario, risulta efficace solo nei pazienti che presentano quadri particolarmente diffusi (gliomatosi cerebrali) o ancora sintomatici dopo radioterapia (Ruda et al. 2012).

Il *follow up* della malattia deve necessariamente tenere conto del grado istologico della stessa. Esso prevede un protocollo ogni 2 mesi nei pazienti con terapia in atto e ogni 3 nei pazienti che non presentano segni di malattia evidente, per il primo anno, e consiste nell'esame clinico, negli esami bioumorali e nella RM con gadolinio. I pazienti che presentano recidive, qualora il loro *performance status* lo consenta, sono trattati con ulteriori cicli di temozolomide, se l'intervallo libero da malattia è di diversi mesi, o in alternativa con fotemustina.

#### **1.4.1 Bone morphogenetic proteins: target terapeutico e biomarker nel glioma**

Tra i fattori prognostici che influiscono sulla sopravvivenza di pazienti affetti da glioma, l'età è uno dei più importanti. È noto che i pazienti più giovani, di età inferiore ai 50 anni, sopravvivono più a lungo di quelli più anziani e che, inoltre, *markers* genetici quali la metilazione del gene *MGMT* e mutazioni di *IDH1* hanno un'importante funzione predittiva della risposta al trattamento chemioterapico. Sempre maggiori evidenze propongono come indicatori prognostici lo stato di attivazione di STAT3, come già citato, la positività all'espressione della proteina anti-apoptotica *survivin* (Chakravati et al. 2002; Kajiwara et al. 2003) ed i livelli di espressione delle *Bone Morphogenetic Protein* (BMPs).

Le BMPs sono una famiglia di proteine originariamente identificate per la capacità di indurre la formazione dell'osso e della cartilagine *in vivo* (Hari Reddi 1992; Wozney 1989). Oggi sappiamo che le BMPs appartengono alla superfamiglia del *tumor growth factor-beta* (TGF-β) e sono coinvolte in molteplici processi fisiopatologici (Kim & Choe

2011). È stato dimostrato, infatti, che alcune BMPs sono implicate nello sviluppo di diversi tumori, talvolta con effetto antiproliferativo o, al contrario, promuovendone la crescita (Kallioniemi 2005).

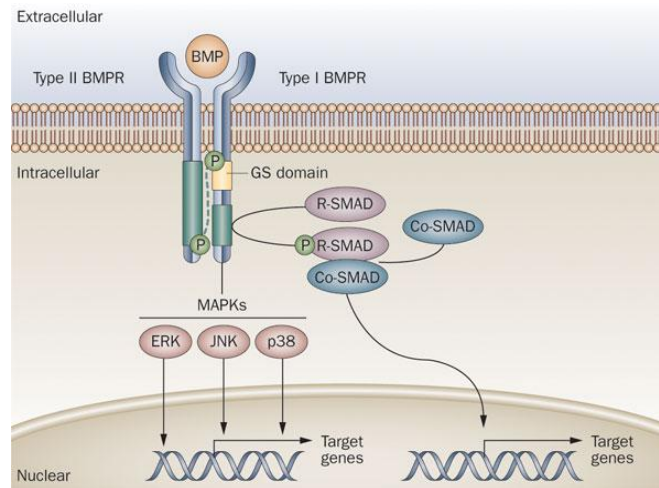


Figura 2 Pathway intracellulare delle BMPs (Shore & Kaplan 2010)

Tali proteine, sintetizzate nel citoplasma, subiscono maturazione proteolitica e, rilasciate nell'ambiente extracellulare, legano recettori con attività serina-treonina chinasi. I recettori per le BMPs (BMPRs) formano, a livello della membrana citoplasmatica, un complesso tetramerico composto da due recettori di tipo II (BMPRII) e due recettori di tipo I, BMPRIA e BMPRIB (Singh & Morris.2010). I recettori BMPRIA legano preferenzialmente le BMPs della sottoclasse dpp (BMP 2/4), mentre BMPRIB hanno maggiore affinità per i membri della sottoclasse 60A (BMP 5/6/7/8). Una volta che il ligando BMP si lega allo specifico recettore, BMPRII fosforila BMPRI di tipo 1 che attiva il *pathway* intracellulare, fosforilando le proteine R-smad 1/5/8; queste ultime, oligomerizzando con smad4 (co-smad), formano un complesso che trasloca nel nucleo e controlla la trascrizione genica (**Fig.2**). La regolazione trascrizionale operata da tali ligandi non è, però, imprescindibile dall'attività delle R-smad: è infatti possibile che i recettori attivino il *pathway* delle MAP chinasi (MAPK), effettuando un duplice controllo sull'espressione di specifici geni *target* (Singh & Morris 2010).

Come riassunto in **tabella 2**, il sistema delle BMPs rappresenta un nuovo *biomarker* con importanti implicazioni terapeutiche nel glioma. Nel 2013, Wu e Yao hanno valutato i livelli di espressione di BMP4 in 630 pazienti affetti da glioblastoma, dimostrando che i livelli di espressione della proteina sono significativamente più bassi nel tessuto tumorale rispetto alla controparte sana o a neoplasie di basso grado. Bassi livelli di BMP4 sono stati messi in correlazione con alti livelli di



espressione del *marker* del ciclo cellulare Ki67 e con un più alto grado di glioma ( $p < 0.001$ ), laddove alti livelli di BMP4 correlavano con una migliore prognosi ( $p < 0.001$ ). In questi studi BMP4 appare come un indicatore di aumentata sopravvivenza (Wu & Yao 2013). Ulteriori indagini immunohistochimiche ed analisi dell' mRNA di BMP4 in campioni di glioma umano, effettuate da gruppi di ricerca indipendenti, hanno confermato i risultati di tale scoperta (Gonzalez-Gomez et al. 2014).

**Tabella 2** Livelli di espressione dei membri del pathway delle BMPs nel glioma (Gonzalez-Gomez et al. 2014)

Molecule	Expression data in high grade gliomas	No patients	Methods	Clinical significance	Authors
BMP2	UP	98	IHQ	↓BMP2: ↑survival time (tumor grade independent)	Liu et al. 2009
BMP4	DOWN	630	RTqPCR/WB/IHQ	↓BMP4: ↓survival time (all grades together)	Wu and Yao 2013
	DOWN	220/77	Microarray/IHQ	↓BMP4: ↓survival time (grades III and IV)	Bao et al. 2013
BMPRII	DOWN	64	WB	n.d	Liu et al. 2009
P-Smad 1,5,8	DOWN	64	WB	↓p-Smad: ↓survival time (tumor grade independent)	Liu et al. 2009

Il maggiore ostacolo allo sviluppo di terapie per il trattamento del glioma risiede nell'eterogeneità delle popolazioni tumorali che lo compongono (Lathia et al. 2015). Tra queste, le cellule iniziatrici del glioma sono la componente responsabile dello sviluppo e della progressione tumorale, caratterizzate dalla capacità di auto-rinnovarsi e di indurre neoformazioni tumorali *in vivo* (Jordan et al. 2006; Ailles et al. 2007). Poiché tali cellule, con capacità *stem-like*, possono attivare i meccanismi di riparazione del DNA, l'espressione di canali di estrusione per i farmaci utilizzati in terapia e rappresentano una componente numericamente consistente del tumore (Mazzoleni et al. 2010; Chen et al. 2010), sono diventate un importante bersaglio terapeutico. Il gruppo di ricerca di Vescovi ha infatti dimostrato che diverse BMPs sono in grado di bloccare la proliferazione e promuovere il differenziamento delle cellule iniziatrici del glioma e, tra queste, BMP4 sembra esercitare l'effetto più significativo (Piccirillo et al. 2006). La proteina testata *in vitro* ha dimostrato effetti sinergici con le classiche terapie antitumorali, facendo registrare riduzione dei livelli della ciclina D1, Bcl-2 e Bcl-xL, aumento dell'espressione di Bax ed induzione dell'apoptosi nel modello cellulare di glioma U87 (Zhou et al. 2011). L'efficacia della molecola è stata confermata anche *in vivo*: topi a cui venivano iniettate per via intracranica cellule di glioma, morivano dopo 3-4 mesi, ma quasi il 100% degli animali trattati con BMP4 sopravviveva fino alla fine dell'esperimento (Piccirillo et al. 2006).

## 1.5 Il ruolo del sistema immunitario nell'evoluzione del glioma

L'ipotesi secondo cui il sistema nervoso centrale (SNC) fosse in uno stato privilegiato da un punto di vista immunitario era basato su studi che mostravano un migliore esito per i trapianti allogenici di strutture cerebrali, rispetto ad altre parti del corpo. La spiegazione per tale fenomeno, secondo quanto si credeva in precedenza, era il risultato dell'assenza di un sistema linfatico organizzato, della funzione protettiva della barriera ematoencefalica (BEE) e della scarsità di cellule presentanti l'antigene (APCs) nel parenchima neuronale (Lampson et al. 2003; Tambur et al. 2004; Khan-Farooqui et al. 2005).

Gli studi condotti negli ultimi dieci anni ed il rivoluzionario lavoro di Louveau *et al* (2015), infatti, hanno dimostrato non solo la presenza di cellule immunocompetenti deputate alla sorveglianza immunitaria nel parenchima cerebrale, ma anche la capacità dei linfociti T attivati di attraversare la BEE, sfruttando i vasi linfatici che rivestono i seni della dura madre e connettono le meningi ai linfonodi cervicali.

Sebbene ciò sia vero in condizioni fisiologiche, lo sviluppo di tumori intracerebrali altera i normali equilibri immunitari, impedendo il riconoscimento ed il *killing* delle cellule cancerose.

È il caso dei gliomi di alto grado, tumori astrocitari associati ad una condizione di immunosoppressione, locale e sistemica, mediata dalla produzione di TGF- $\beta$  e prostaglandina E2 (PGE2), responsabili della riduzione dell'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di tipo II e, conseguentemente, del processamento antigenico ad opera delle cellule dendritiche (DC) (Facoetti et al. 2005). Tali tumori, inoltre, producono VEGF che non solo favorisce l'angiogenesi, ma stimola la proliferazione di *myeloid derived suppressor cells*, con severe implicazioni immunosoppressive (Gabrilovich et al. 2004). VEGF, infatti, insieme ad IL-6, inibisce l'attività macrofagica, favorendo l'evoluzione della neoplasia (Lang et al. 2002; Brantley et al. 2008).

Una parte degli effetti citati sembrano essere mediati da un fattore di trascrizione, profondamente coinvolto nella tumorigenesi del glioma, STAT3. VEGF e TGF- $\beta$ , responsabili dell'inibizione dell'attività di varie classi di linfociti T e B, insieme ad IL-10, inibitore dell'attività dei linfociti T helper (Yu et al. 2004; Albesiano et al. 2010; Avril et al. 2010), sono stati infatti classificati tra i mediatori immunosoppressivi STAT3-associati ed aumentano in risposta all'aumento dei livelli di fosforilazione del fattore di trascrizione (Gabrilovich et al. 1996); parallelamente il complesso JAK2/STAT3 provoca anormale differenziazione delle DC e ridotta espressione di MHC II e di IL-12 (Wang et al. 2004).

Tra i mediatori dell'attività immunosoppressiva di STAT3 vi sono, però, anche popolazioni immunitarie "reclutate" dal tumore. L'attivazione di STAT3, infatti, promuove la proliferazione dei Linfociti T<sub>reg</sub> che sopprimono l'attività dei linfociti citotossici, mediante la produzione di TGF- $\beta$ , (Zou et al. 2005; Nishikawa et al. 2005; Cheng et al. 2003; Wei et al. 2010) esplicando controllo negativo sul sistema immunitario dell'ospite. Al contrario, la delezione di STAT3 in cellule ematopoietiche è stata associata a marcata diminuzione del numero di cellule T<sub>reg</sub> infiltranti il tumore, aumentata attività delle DC, linfociti natural killer (NK) e dei neutrofili (Kortylewski et al. 2005).

I gliomi, però, esprimono specifici antigeni associati al tumore, le TAAs, molti dei quali sono stati identificati negli ultimi anni (Zhang et al. 2008). Tali peptidi, espressi solo durante lo sviluppo fetale o in siti immunoprivilegiati, sono presenti ad alti livelli in tessuti tumorali e sono interessati da frequenti mutazioni e riarrangiamenti genetici.

Le cellule T, fisiologicamente deputate all'identificazione di peptidi *non self* derivati da proteine citosoliche e presentati sulla superficie cellulare dal complesso maggiore di istocompatibilità I (MHC I) (Ljunggren et al. 2007; Leen et al. 2007; Blattman et al. 2004), possono potenzialmente riconoscere antigeni associati al tumore, ma l'avverso microambiente tumorale impedisce tale processo. Alla classe dei linfociti appartengono anche le cellule NK, capaci di riconoscere modifiche della membrana di cellule trasformate, quali l'espressione di anomalie nelle catene dei carboidrati o bassi livelli di espressione di MHC di classe I. I linfociti NK, inoltre, sono in grado di produrre citochine quali interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor (TNF), ed il *granulocyte macrophage colony stimulating factor*, esplicando un'importante azione di prima difesa, riconoscendo ed eliminando le cellule di glioma (Okada et al. 2009; Johnson et al. 2009; Mitchell et al. 2009).

Sebbene, quindi, il glioma sia protetto dalla barriera ematoencefalica (De Vries et al. 2006), l'evasione immunitaria viene attuata mediante una serie di ben più complessi meccanismi e studi recenti hanno sottolineato il ruolo prominente delle cellule *stem-like* nella creazione dell'avverso microambiente tumorale (Wu et al. 2010; Wei et al. 2010; Di Tommaso et al. 2010). Riassumendo, il glioma può rilasciare citochine inibitorie, interferire con il *pathway* di presentazione dell'antigene, o mutare gli stessi, e far fallire l'attivazione della specifica risposta immunitaria diretta o indiretta mediante il controllo dell'attività della microglia e delle cellule T<sub>reg</sub> (Albesiano et al. 2010; Avril et al. 2010; Han et al. 2010; Humphries et al. 2010). Trovare il modo per superare questo intricato sistema di evasione immunitaria, attuato dal tumore, rappresenta la nuova sfida dell'immunoterapia.

### 1.5.1 Linfociti NK e glioma: possibili applicazioni terapeutiche

Il trasferimento di cellule leucocitarie è una delle strategie per aumentare la risposta immunitaria in gliomi di alto grado: l'uso di NK, linfociti T $\gamma\delta$ , cellule T antigene-specifiche, o modificate geneticamente, e linfociti infiltranti il tumore è stato oggetto degli studi pre-clinici e clinici sull'immunoterapia per il cancro degli ultimi 40 anni. L'osservazione secondo cui stimolando linfociti periferici per 3-4 giorni con IL-2 era possibile ottenere cellule con una significativa attività antitumorale, ha spinto numerosi gruppi di ricerca a valutare l'attività delle *LAK cells*, ovvero di linfociti CD3<sup>+</sup>, e NK stimolati, in immunoterapia (Grim et al. 1982), dimostrandone l'attività citolitica *in vivo* contro una vasta serie di tumori solidi. Più di 100 pazienti affetti da glioblastoma, infatti, sono stati trattati con iniezioni locali di *LAK cells* (Jacobs et al. 1986; Ishikawa et al. 2004) tra il 1980 ed i primi anni del 1990, nell'era pre-temozolomide, ma nonostante i risultati promettenti in termini di sopravvivenza, non c'è stato significativo avanzamento degli studi clinici.

Tutto ciò ha impedito un largo uso di *LAK cells* in terapia, specialmente poiché, per altri tumori, l'uso di linfociti stimolati con IL-2 non donava effetti superiori, in termini di sopravvivenza, rispetto a quanto ottenuto con semplici iniezioni di IL-2.

Negli ultimi anni, però, i recenti avanzamenti scientifici hanno riacceso l'interesse per le NK e diverse strategie sono state adoperate per aumentarne l'attività antitumorale: l'uso di APC esprimenti, a livello della membrana cellulare, IL-15 e 4-1BB, una glicoproteina appartenete alla famiglia dei TNF, ha permesso di generare una popolazione di NK altamente citotossiche con aumentata attività nei confronti di cellule trasformate (Fujisaki et al. 2009); la creazione di recettori chimerici capaci di riconoscere antigeni tumorali (CARs) ha mostrato, in studi preclinici, un effettivo aumento della funzione di tale popolazione linfocitaria. NK esprimenti specifici CARs per CD19, infatti, mostrano aumentata attività antileucemica (Milone et al. 2009; Imai et al. 2004) e questo approccio potrebbe essere adattato alla terapia per i gliomi poiché sono già disponibili CARs potenzialmente utilizzabili (Bullain et al. 2009; Kahlon et al. 2004; Ahmed et al. 2010).

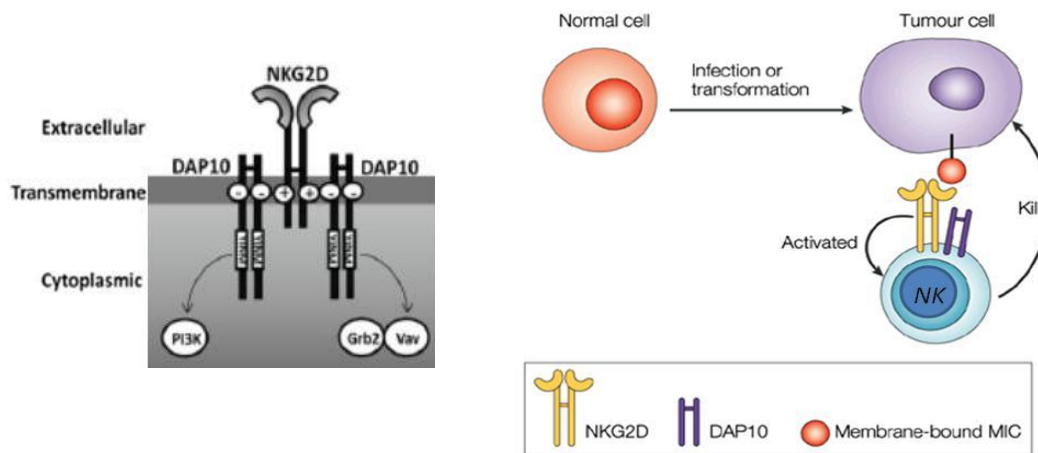


Figura 3 Struttura e pathway intracellulare dei recettore NKG2D (Spear et al 2013; Yokoyama et al. 2003)

Nuove ed interessanti strategie per migliorare l'efficacia delle terapie antitumorali potrebbero derivare dallo studio del ruolo dei "Natural killer group 2 member D receptor" (NKG2D), recettori presenti sulla membrana plasmatica di NK e linfociti T (Yabe et al. 1993; Houchins et al. 1991), aventi un ruolo chiave nell'inibizione dell'insorgenza e della progressione tumorale (Diefenbach et al. 2001; Guerra et al. 2008; Gasser et al. 2005). Il recettore NKG2D è una glicoproteina transmembranaria, appartenente alla famiglia dei *C-type lectin-like receptors*, che forma omodimeri capaci di associarsi con due omodimeri della molecola adattatrice DAP10. Quest'ultima media la trasduzione del segnale, interagendo con la subunità p58 della PI3K e la proteina *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2) (Wu et al. 1999; Upshaw et al. 2006), agendo come primo segnale di attivazione delle NK (Gilfillan et al. 2002; Diefenbach et al. 2002; Groh et al. 2001) (fig.3). Diversi fattori possono regolare i livelli di espressione dei recettori NKG2D: le citochine IL-2, IL-7, IL-12 ed IL-15 ed alti livelli di DAP10 ne provocano aumento (Dhanji et al. 2003; Maasho et al. 2005;

---

Zhang et al. 2008); IL-21 e TGF- $\beta$ , al contrario, li riducono. (Burgess et al. 2008; Takaki et al. 2005; Friese et al. 2004).

Nell'uomo sono note due famiglie di ligandi per i recettori NKG2D: *UL16 binding proteins* (ULBPs) ed *MHC class I chain-related protein A* e B (MICA/B).

Nel tessuto cerebrale sano, tali ligandi non sono presenti in quantità misurabili, al contrario di quanto si verifica nel glioma dove è evidenziabile l' aumento dell' espressione delle ULBPs e di MICA/B, ma un' inadeguata attività di sorveglianza immunitaria. Nel 2013 è stato dimostrato il coinvolgimento di STAT3, nella regolazione dell'espressione dei ligandi del recettore NKG2D: è stata evidenziata, infatti, una correlazione inversa tra l'attivazione del fattore di trascrizione e l'espressione di MICA, definendo, per la prima volta, il link esistente tra i due (Bedel et al. 2013) e corroborando il ruolo centrale di STAT3 nell'evoluzione del glioma.

## **II. N6-isopenteniladenosina**

## 2.1 N6-isopenteniladenosina

L'N6-isopenteniladenosina (iPA) (**fig.4**) è un nucleoside modificato con una catena isopentenilica legata all'atomo di azoto in posizione 6 della purina (Faust & Dice 1991). È l'unica citochinina nota presente in RNA transfer (tRNA) animale, legata al residuo 37 in prossimità dell'estremità 3' della molecola di tRNA che riconosce il codone con un'uridina iniziale (Persson et al. 1994). L' iPA è presente in molte cellule procariotiche ed eucariotiche (Burns et al. 1976) e fu isolata dal lievito attraverso l'idrolisi delle serine del suddetto acido nucleico. In forma libera è stata ritrovata in estratti cellulari di *Saccaromyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (Laten et al. 1985) ed è stato provato che i livelli della citochinina non decrescono pur in presenza di mutazioni che provocano la riduzione della quota di tRNA isopentenilato (Faust & Dice 1991), dimostrando che, contrariamente a quanto sostenuto in passato, l'iPA deriva da un *pathway* biosintetico indipendente dalla degradazione dell'isopentenil tRNA. L'adenosina, infatti, è generata dalla via biosintetica dei nucleotidi ed il gruppo isopentenilico deriva dal metabolismo del mevalonato.

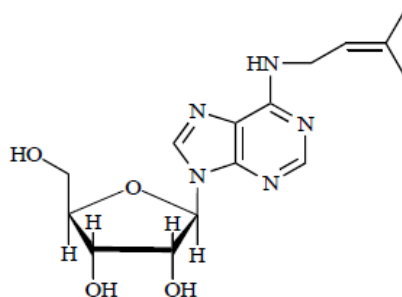


Figura 4 Struttura dell' N6-isopenteniladenosina (Bifulco et al. 2008).

Nelle cellule di mammifero l' iPA è stato ritrovato in tRNA di selenocisteina (Sec) che codifica il codone di stop UGA inserendo residui di Sec, laddove dovrebbe esserci un'interruzione della sequenza proteica (Spinola et al. 2005). Tale capacità del tRNA di Selenocisteina manca quando viene persa l'iPA in posizione 37, come dimostrato in *Xenopus* (Spinola et al. 2005). È noto che le modificazioni post-trascrizionali del tRNA sono essenziali per assicurare un'efficiente sintesi proteica (Dirheimer et al. 1995) e la perdita di nucleotidi modificati può produrre effetti pleiotropici sui processi di proliferazione e differenziamento cellulare (Smith et al. 1986).

I tRNA contenenti iPA, infatti, legano il ribosoma più efficacemente rispetto a quelli contenenti nucleosidi non modificati e assicurano una più efficace traduzione dell'RNA sia *in vitro* che *in vivo* (Warner et al. 2000). Affinché l' iPA possa legarsi all'RNA si richiede l'azione delle isopenteniltrasferasi (IPT), una famiglia di enzimi presenti in microrganismi e mammiferi, che ne catalizzano l'aggiunta al residuo 37, usando dimetil allil pirofosfato come donatore di gruppi isopentenilici (Golovko et al. 2000; Spinola et al. 2005). La proteina umana IPT-tRNA è codificata dal gene TRIT1, posto vicino al locus del proto-oncogene MYCL implicato nel controllo della progressione tumorale (Spinola et al. 2004), e analisi della sequenza amminoacidica ne hanno mostrato una forte omologia con quella codificata da *Saccharomyces cerevisiae* ed

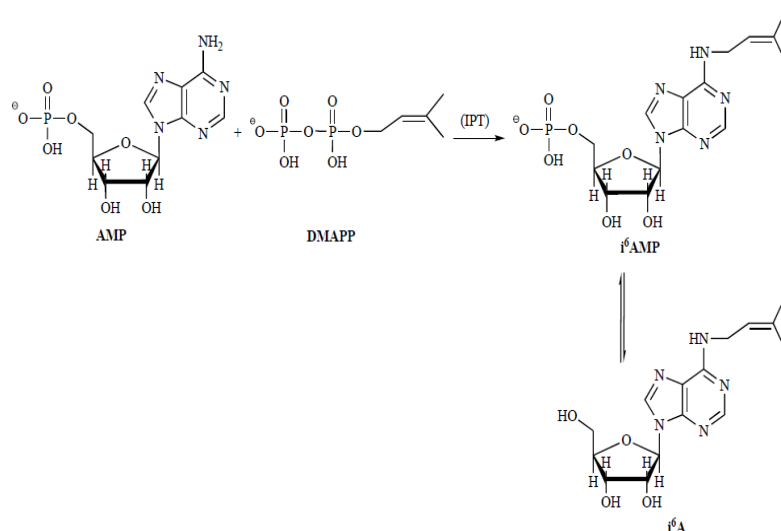
*Escherichia coli*. Il gene TRIT1, soggetto a *splicing* alternativo, è trascritto in una serie di mRNA di cui solo l'isoforma lunga permette la conservazione dell'attività *nonsense suppressor* dell' IPT-tRNA. Dall'analisi dell'espressione di TRIT1 in tessuto polmonare normale ed in cellule A549 di tumore del polmone, essa risulta ridotta di 3-7 volte nel tessuto tumorale, rispetto ai livelli rilevati nel tessuto normale e l'abbondanza relativa dell'isoforma lunga risulta ridotta del 50% in adenocarcinoma polmonare. Trasfettando il gene in cellule A549, l'espressione dell'isoforma lunga dell'mRNA provoca *in vitro* una ridotta formazione di colonie ed *in vivo* una ridotta tumorigenicità in topi nudi, suggerendo l'ipotesi secondo cui TRIT1 controlli l'attività nonsense suppressor del tRNA di selenocisteina, ed abbia un ruolo funzionale nel controllo negativo dello sviluppo del tumore (Spinola et al. 2005)

## 2.2 Funzioni e biosintesi dell' iPA nelle piante

L'iPA appartiene ad una classe di sostanze conosciute come citochinine, importanti regolatori della crescita delle piante grazie alla loro capacità di promuovere la divisione cellulare nei tessuti in presenza di auxina (Spinola et al. 2004). La scoperta dell'auxina, prima sostanza vegetale definita ormone, ha portato all' identificazione di altre sostanze chimiche che regolano la crescita dei vegetali poiché, come nel mondo animale, è improbabile che la crescita e lo sviluppo delle piante dipenda dal controllo di un unico ormone. Venne trovato un fattore di crescita derivato dalla degradazione del DNA che stimola la crescita dei tessuti vegetali *in vitro* (Skoog et al. 1965), questa sostanza venne chiamata chinina e la classe dei regolatori prese il nome di citochinine. Il termine generico "chinina", creato per descrivere prodotti chimici che promuovono la divisione cellulare, fu successivamente sostituito con "citochinina", che letteralmente significa stimolazione del movimento cellulare, per evitare confusione con il termine chinina del mondo zoologico (Oka, 2003). Le citochinine sono importanti derivati delle purine, per lo più analoghi dell'adenina (Shaw *et al.*, 1994), che fungono da ormoni nel controllo di numerosi processi nelle piante. Esse promuovono la divisione cellulare in colture di tabacco (Skoog et al. 1965), regolano la crescita della gemma, l'allungamento della foglia, il ritardo nella senescenza, la formazione dei cloroplasti (Mok et al. 1994) ed inducono la re-differenziazione del callo nella futura gemma (Tanimoto et Harada, 1982). I calli sono aggregati di cellule vegetali differenziate, immortali, che proliferano indefinitamente in maniera disorganizzata (Fajkus et al. 1998), proprio come le cellule cancerose. Per la somiglianza tra il fenotipo biologico delle cellule tumorali e dei calli, si è pensato che le citochinine potessero influenzare la differenziazione delle cellule tumorali umane attraverso meccanismi d'azione potenzialmente coinvolti negli eventi della trasduzione del segnale. Tutte le citochinine attualmente conosciute presentano un'adenina sostituita in posizione N6 con un isoprenoide o con un gruppo aromatico (Mok et al. 1994). Inizialmente si credeva che la degradazione dell'RNA fosse la principale risorsa di citochinine libere, inclusa iPA (Swaminathan & Bock, 1977), ma studi sul *turnover* dell'RNA hanno dimostrato che nelle piante esiste un *pathway* biosintetico *de novo* (Klämbt, 1992). Un ulteriore passo avanti è stata la scoperta di un enzima coinvolto nella biosintesi delle citochinine in *Dictyostelium discoideum* (Taya et al. 1978) poiché estratti cellulari di questo organismo possono convertire AMP e dimetil-allil-pirfosfato (DMAPP) nella citochinina isopenteniladenosina-5'-



monofosfato (i6AMP) e quindi nel corrispondente nucleoside N6-isopenteniladenosina. In **figura 5**, una rappresentazione del *pathway* biosintetico dell'iPA nelle piante (Astot *et al.*, 2000)



**Figura 5** Biosintesi dell' iPA nelle piante (Bifulco *et al.* 2008).

### 2.3 Effetti biologici dell' iPA: studi pre-clinici

Gallo ha dimostrato che l'iPA ha la capacità di promuovere o inibire la proliferazione cellulare (Gallo *et al.* 1969) dipendentemente dalla dose e dalla fase del ciclo cellulare, stimolando o inibendo la sintesi di DNA. I dati indicano che, a concentrazioni più basse di  $10^{-6}$  M, dopo 12 di trattamento con fitoemagglutina (PHA), produce effetti inibitori sulla crescita cellulare, ma nell' intervallo di concentrazioni  $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  M la stimola.

È stato altresì dimostrato che gli effetti a livello della sintesi del DNA sono preceduti dall'inibizione della sintesi di RNA e proteine, ipotizzando che ciò potrebbe essere il risultato della competizione dell'iPA con adenosina, adenosina-3-fosfato e 2'deossadenosina 5'-trifosfato, sebbene l'aggiunta di tali sostanze, anche a concentrazioni più alte di quella dell'iPA, non ne decresce l'effetto inibitorio esercitato sulla sintesi dell'acido ribonucleico.

Questa molecola, che si comporta come una citochinina nelle piante, è citotossica per la maggior parte delle cellule dei mammiferi come dimostrato da numerosi studi.

L' iPA inibisce la crescita di cellule di Sarcoma 180, alla concentrazione di 20 e 100 $\mu$ M, rispettivamente del 50% e 100%. Studi su estratti di queste cellule dimostrano che è un substrato per l'adenosina chinasi ed anche un debole inibitore di adenosina deaminasi, glucosio-6-fosfato-deidrogenasi e della metilasi di tRNA dei mammiferi. È stato inoltre osservato che in cellule di Sarcoma 180, agisce come

potente inibitore dell'*uptake* di nucleosidi purinici e pirimidinici. Gli autori suggeriscono che la citotossicità dell'iPA potrebbe essere dovuta alla sua conversione in 5'monofosfato che, ad alti livelli intracellulari, influenza l'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo delle purine (Divekar et al. 1974).

Il gruppo di ricerca di Ishii, invece, ha esaminato gli effetti di vari analoghi dell'adenina sulla crescita e differenziazione di cellule HL-60 di leucemia mieloide umana. Citochine come isopenteniladenina e benziladenina inibiscono la crescita e la vitalità di tale modello tumorale e provocano differenziamento delle cellule in granulociti maturi (Ishii et al. 2002), analogamente alle rispettive forme ribosidiche efficaci, inoltre, nel ridurre i contenuti intracellulari di ATP e l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (Ishii et al. 2005).

Laezza ha dimostrato che l'iPA, somministrato in associazione con TSH, a cellule quiescenti di tumore della tiroide FRTL-5, inibisce l'aumento di cAMP. Tale effetto è sovrapponibile a quello ottenuto con somministrazioni di adenosina e ciò suggerisce che entrambi i nucleosidi interagiscono con lo stesso recettore per l'adenosina di tipo A. Gli eventi indotti dal TSH e mediati da cAMP quali l'attivazione dell'*uptake* di I<sup>-</sup> e la sintesi di DNA, infatti, vengono inibiti in maniera simile da entrambe le sostanze. L'iPA però, alla concentrazione di  $10^{-4}$  M, mostra un effetto specifico sull'organizzazione del citoscheletro, prevenendo la disorganizzazione dei microfilamenti indotta dal TSH. I risultati, quindi, suggeriscono che gli effetti dell'iPA sono esercitati a due livelli: prima della sintesi del cAMP, con una decrescita dei livelli di cAMP e, quindi, conseguente inibizione dei processi ad esso correlati; dopo la sintesi del cAMP con effetti sulla struttura del citoscheletro probabilmente dovuti alla sostituzione dell'N in 6 della purina, come mostrato, seppur con minore efficacia, da analoghi N6 sostituiti (Laezza et al. 1997). La capacità dell'iPA di interferire con i processi di organizzazione del citoscheletro, alterando la morfologia cellulare, sono documentate anche in cellule di tumore della vescica T24, nelle quali la molecola induce arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>1</sub> ed apoptosi (Castiglioni et al. 2013). Il gruppo di ricerca del Prof. Bifulco ha analizzato, inoltre, l'effetto di iPA, in cellule tiroidee FRTL-5 *wild-type* e cellule di tiroide KiMol, queste ultime derivate dalle FRTL-5 trasformate con K-Ras mutato. I risultati, che appaiono più evidenti in cellule KiMol, mostrano che l'arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> e la diminuita percentuale di cellule in fase S sono attribuibili all'inibizione dell'enzima farnesil difosfato sintasi (FPPS) e quindi alle conseguenti alterazioni della via del mevalonato. Studi in *in vivo* in un modello di topo atimico, dove le cellule KiMol sono state impiantate nel sottocutaneo, hanno fatto registrare una drastica riduzione del volume del tumore in seguito a trattamento con iPA, confermando gli effetti antiproliferativi osservati *in vitro* (Laezza et al. 2006). Evidenze sperimentali recenti hanno confermato l'interazione strutturale tra la molecola e l'enzima, corroborando la teoria secondo cui l'inibizione dei FPPS sia uno dei meccanismi con cui l'iPA induce morte cellulare. (Scrima et al. 2014)

Più recentemente è stata descritta l'attività dell' iPA in tumori di cellule epiteliali, mostrando una inibizione dose-dipendente di proliferazione e clonigenicità che sembra riflettere il blocco della sintesi di DNA. In questo caso gli effetti non sembrano essere causati dalla downregolazione di FPPS né dall'induzione dell'apoptosi, ma da variazioni morfologiche cellulari e disorganizzazione delle fibre di actina nel citoplasma, che suggeriscono una condizione di stress (Spinola et al. 2007).

L'apoptosi indotta dall'iPA, invece, determina la morte di cellule di tumore della mammella MDA MB 231, riducendone la proliferazione dell'88%, alla dose di 20  $\mu$ M

dopo 24 ore di trattamento. I dati suggeriscono che l'iPA riduce la crescita cellulare inibendo il *pathway* di NF- $\kappa$ B e l'attivazione di Akt. L'attività del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B, infatti, risulta aumentata in cellule di cancro della mammella e si pensa che ciò possa essere la causa dell'inibizione dell'apoptosi in tale linea cellulare (Laezza et al. 2010). NF- $\kappa$ B è un eterodimero che rimane nel citoplasma se associato all'inibitore di  $\kappa$ B (I $\kappa$ B), ma se quest'ultimo viene fosforilato ad opera delle chinasi IKK, si dissocia da NF- $\kappa$ B che è libero di traslocare nel nucleo (Haefner, 2002).

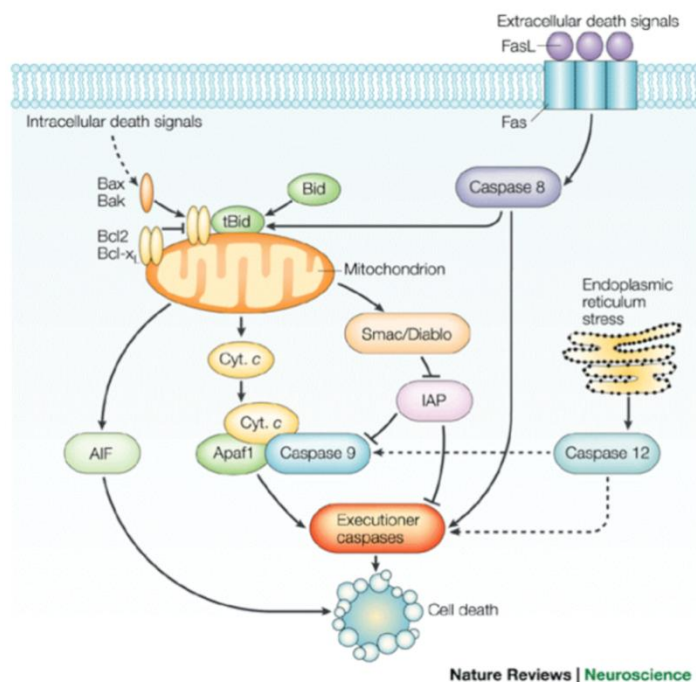


Figura 6 Via intrinseca ed estrinseca dell' apoptosi (Vila & Przedborski, 2003).

L'iPA in cellule MDA MB 231 inibisce la fosforilazione e l'espressione dei livelli di IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , le due subunità catalitiche di IKK, inibendo il passaggio nel nucleo del fattore di trascrizione (Laezza et al. 2010). È noto però che l'attivazione di IKK è mediata da diverse chinasi, tra cui Akt (Meng et al. 2002), un'oncoproteina attivata in diversi tumori maligni (Vivancol et al. 2002). L'iPA, abbassando l'espressione di Akt fosforilata, riduce la fosforilazione di IKK e quindi l'attivazione di NF- $\kappa$ B. L'adenosina modificata riduce l'espressione delle proteine antiapoptotiche di XIAP, Bcl-2, Bcl-xL, e della ciclina D1, che legandosi alle chinasi ciclina dipendente CDK 4/6 induce transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. Parallelamente, aumenta l'espressione del fattore proapoptotico Bax (Laezza et al. 2010) che, in seguito a stimoli di morte, trasloca nel mitocondrio causando il rilascio del fattore C. Quest'ultimo, legandosi al fattore di attivazione delle proteasi proapoptotiche (Apaf-1) forma un complesso con la caspasi 9 che avvia la cascata di attivazione delle altre caspasi (fig.6) (Oltvai et al. 1993; Brady & Gill-Gómez 1998). In cellule trattate con

iPA, infatti, è stato rilevato rilascio del citocromo C nel citoplasma e conseguente attivazione della caspasi 3 effettrice (Laezza et al. 2010).

L'iPA inoltre inibisce la crescita del carcinoma di Ehrlich e della leucemia L120 in topi Swiss HaICR, mentre non ha effetti antitumorali in cellule di adenocarcinoma 755 e carcinosarcoma di Walker 256, almeno nelle condizioni sperimentali utilizzate. Nel 2014 Pisanti *et al.* hanno dimostrato che l'analogo adenosinico inibisce efficacemente l'angiogenesi in cellule di cordone ombelicale umano (HUVEC). Tale studio ha dimostrato, per la prima volta, che l'iPA, nella cellula, viene monofosforilata in posizione 5', agendo da attivatore di AMP chinasi, interferendo con il processo angiogenico (Pisanti et al. 2014).

### 2.3.1 Focus sul ruolo centrale di FPPS nelle patologie oncologiche

La biosintesi degli isoprenoidi, in procarioti ed eucarioti, è fonte di metaboliti primari e secondari necessari alla formazione di componenti di membrana come nel caso dei prenili-lipidi degli archeobatteri; alla difesa di organismi vegetali da insulti esterni come mono- di- e sesquiterpeni o alla crescita della pianta. Negli animali, la sintesi degli isoprenoidi è necessaria per la produzione del colesterolo e delle proteine prenilate e segue la via del mevalonato (**fig.7**): due molecole di acetil-CoA condensano, in presenza di una tiolasi, formando acetoacetil-CoA che a sua volta reagisce con una terza molecola di acetil-CoA per generare 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) attraverso l'azione dell'enzima HMG-CoA sintasi, enzima *target* delle statine. Per opera dell'HMG-CoA reduttasi si forma il mevalonato (MVA) che viene poi fosforilato dalla mevalonato chinasi e dalla fosfomevalonato chinasi ottenendo il 5-difosfomevalonato. Quest'ultimo viene decarbossilato grazie all'azione della 5-difosfatodecarbossilasi ottenendo l'isopentenildifosfato (IPP) che viene trasformato dall'IPP isomerasi in dimetilallil difosfato (DMAPP). Le unità isopreniche attivate vengono poi condensate dall'azione di un gruppo di enzimi noti come isoprenil difosfato sintasi o prenilasi che differiscono tra loro per substrato utilizzato e stereochimica (E o Z) del doppio legame generato durante il processo di sintesi. Alla famiglia delle prenilasi appartiene la farnesil pirofosfato sintasi (FPPS), che catalizza l'addizione di DMAPP e geranil difosfato all'IPP per formare l'isomero E del farnesil pirofosfato (FPP). FPPS è un omodimero di 80-84 kDa che richiede ioni  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  per essere attivo, ma viene inibito da  $Zn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  (Manoj et al. 2012).

Studi su mammiferi hanno mostrato che lo *splicing* alternativo del gene FPPS genera due trascritti di cui il più lungo codifica per un'isoforma contenente un peptide che lo indirizza al mitocondrio, mentre il più corto per un'isoforma diretta al citosol ed ai perossisomi. Infatti, la localizzazione di FPPS in cellule HeLa (cellule di cancro della cervice) mostra che il 59% dell'enzima è localizzato nel citoplasma, il 26% nel mitocondrio e il 12% nei perossisomi (Marin et al. 2007). Ad oggi è noto che FPPS costituisce un enzima chiave nella regolazione del flusso di atomi di carbonio provenienti dal *pathway* del mevalonato responsabile, tra l'altro, della prenilazione di proteine coinvolte nella regolazione ciclo cellulare (Manoj et al. 2012).

È stato dimostrato che il *pathway* isoprenoide è profondamente alterato in cellule di tiroide FRTL-5 v-K-ras trasformate. La prenilazione proteica in cellule K-ras trasformate è infatti notevolmente ridotta in confronto alle cellule *wild-type* e tale fenomeno è accompagnato da un relativo aumento della farnesilazione

dell'oncogene p21<sup>ras</sup> e dalla decrescita della ratio tra geranylgeranoil- e farnesil-proteine. Studi su cellule FRTL-5, trasformate con un mutante temperatura sensibile dell'oncogene v-K-ras, indicano che queste variazioni sono indice dell'attivazione di K-ras; contrariamente, cellule trasformate con Havery-ras (H-ras) mostrano un profilo di prenilazione simile alle cellule non trasformate. I dati indicano che l'attivazione di K-ras provoca decrescita della quota di mevalonato incorporato nell'isopentenil-tRNA ed aumento della quantità non processata, senza però alterarne l'uptake. Gli effetti di v-K-ras sulla prenilazione proteica potrebbero essere mimati in cellule FRTL-5 abbassando la concentrazione di mevalonato, ma l'aumento di quest'ultimo non reverte le alterazioni registrate nelle cellule trasformate. E' stato quindi dedotto che l'espressione di K-ras riduce l'espressione della mevalonato chinasi, induce l'epressione di FPPS, in risposta alla riduzione dei livelli di dimetilallil pirofosfato ed aumenta l'attività della farnesil transferasi, ma non di geranylgeranyl transferasi I, per favorire la farnesilazione preferenziale di p21<sup>ras</sup> (Laezza et al. 1998). Ulteriori studi sull'effetto antiproliferativo dell'iPA in cellule FRTL-5 e KiMol (cellule FRTL-5 trasformate con il virus del sarcoma di Kirsten-Moloney) con K-ras mutato, ne hanno dimostrato la capacità di modulare l'attività di FPPS.

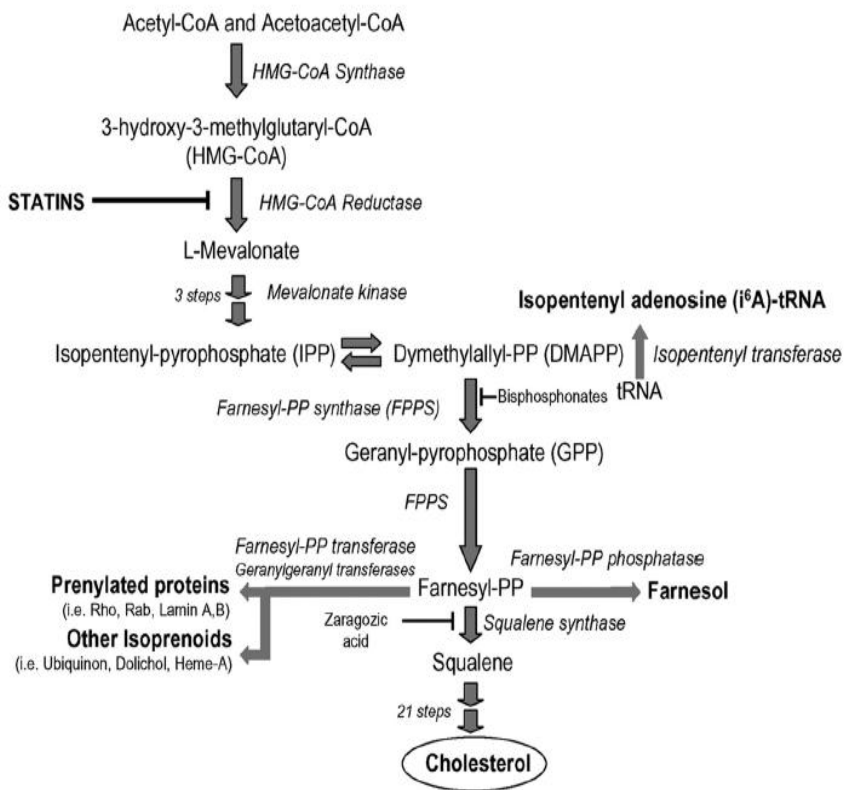


Figura 7 Pathway del mevalonato (Gazzerro et al. 2012)

L'iPA, dopo 24h di trattamento alla concentrazione 100 $\mu$ M riduce fortemente l'espressione di FPPS in entrambe le linee, ma ne inibisce l'attività più efficacemente in cellule KiMol piuttosto che in cellule FRTL-5 *wild-type*, senza la mediazione del recettore dell'adenosina e senza interagire con nessun altro enzima del *pathway* del mevalonato. Tra gli effetti della ridotta attività di FPPS vi è la mancata prenilazione della lamina B, proteina coinvolta nel mantenimento dell'integrità della membrana nucleare, e localizzazione della stessa nel citoplasma. Le evidenze sperimentali indicano quindi che l' iPA rimuove la lamina B dalla membrana nucleare, suggerendo che l'arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> sia indotto, probabilmente, dalla riduzione dei derivati isoprenoidi legati alla proteina di membrana nucleare (Laezza et al. 2006).

Studi *in vitro* ed *in vivo* indicano che l'inibizione del *pathway* del mevalonato mostra effetti sulla crescita e progressione del cancro della prostata (CP) (Roy et al. 2011). L'espressione di FPPS appare, infatti, aumentata in pazienti affetti da CP ed i bifosfonati contenenti azoto, inibitori di FPPS, rappresentano il trattamento di scelta per le metastasi ossee di tale carcinoma. Studi *in vitro* su cellule di CP hanno rilevato che i bifosfonati ne influenzano invasione tumorale ed angiogenesi, e che l'acido Zoledronico, farmaco appartenente a tale gruppo, inibisce sopravvivenza e proliferazione di cellule tumorali con effetti che sembrano essere il risultato di una mancata prenilazione di piccole GTPasi (Todenhofel et al. 2012). Le GTPasi, come Ras, sono tra le più frequenti oncoproteine mutate nei tumori umani e necessitano di essere prenilate e localizzate sulla superficie interna della membrana cellulare affinché possano essere attivati *pathway* cellulari di proliferazione come quelli di PI3K/Akt e Raf/Mak/ERK

Analizzando il ruolo di FPPS nel cancro del colon, è stata registrata riduzione di crescita tumorale dopo trattamento con il bifosfonato palmidronato (Notarnicola et al. 2004)

## 2.4 Effetti biologici dell' iPA: studi clinici

Mittelman descrive uno studio clinico sull'uso di iPA su venti pazienti con leucemia alcuni dei quali trattati con infusione endovenosa giornaliera ed altri con somministrazione orale. Sono state osservate tre remissioni oggettive in questo studio iniziale:

- Il primo caso riguarda una 12enne con leucemia promielocitica. Dopo tre settimane di trattamento con iPA (30mg/kg), si è evidenziata nella paziente una completa remissione clinica con un ritorno di appetito, un ripristino del peso corporeo ed un senso di benessere generalizzato, con un significativo cambiamento istologico del midollo. I promielociti si sono ridotti all'8%, i precursori dei globuli rossi sono invece aumentati notevolmente e c'è stato, inoltre, un aumento di granulociti maturi. La terapia è stata interrotta per quattro giorni con un repentino collasso del midollo osseo; è stata poi ripresa con un progressivo crollo percentuale di promielociti nel midollo ed un concomitante incremento dei precursori dei globuli rossi.

- In un secondo paziente con leucemia mieloide cronica in fase blastica è stato eseguito un trattamento con iPA. Si è avuta una riduzione di cellule bianche da 20000 a 6000 e di blasti e promielociti dal 25% all' 1% nel sangue periferico, con un

incremento nel midollo. La remissione si è prolungata per un mese, ma è stato notato un immediato collasso una settimana dopo la fine della terapia endovenosa.

- Un terzo paziente con leucemia linfatica cronica mostrava una riduzione di linfociti circolanti solo quattro giorni dopo l'inizio della terapia *i.v.* con iPA (30-40mg/kg/day). Durante la terapia sono stati visibili una riduzione dei linfociti totali circolanti ed un aumento nella percentuale di granulociti. Con la cessazione della terapia si è avuto, anche in questo caso, una repentina ripresa della malattia. Secondo gli Autori, l'iPA mostra una tossicità primaria di tipo epatico: tutte le anomalie evidenziate nella funzionalità epatica sono però regredite 48 ore dopo la cessazione della terapia (Mittelman et al. 1975).

I casi di remissione duratura della patologia sono quindi solo un numero molto ristretto e gli effetti del trattamento non sembrano mantenersi a lungo termine, indicando che gli incoraggianti risultati ottenuti *in vitro* non lo sono altrettanto *in vivo*, almeno per i protocolli di trattamento sinora impiegati.

## 2.5 iPA e modulazione dell' espressione genica

Studi condotti su cellule di carcinoma della mammella MCF-7, hanno mostrato l'effetto proapoptotico di iPA, sottolineato dalla presenza di alte percentuali di cellule in fase sub G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>. Per indagare il meccanismo molecolare con cui l'iPA induce danno al materiale genetico, è stato analizzato lo spettro di assorbimento del DNA, dimostrando che la citochinina si lega all'acido nucleico. (Rajabi et al. 2010).

L'analisi dell'espressione genica è stata oggetto di studio in cellule A549 ed MCF-7 trattate con iPA ed ha rivelato la modulazione di 111 geni dopo sole 6 ore di trattamento (**Tabella 3**). Classificando tali geni in categorie ontologiche (GO) è stato possibile avere un quadro complessivo del tipo e dell'entità dell'attività trascrizionale della molecola e, quindi giustificare le attività di iPA evidenziate nei vari studi. L'aumento dei termini della categoria "arresto del ciclo cellulare" è coerente con l'inibizione della proliferazione cellulare rilevata, mentre il coinvolgimento di geni presenti nella categoria ontologica "processo di modificazione proteica" potrebbe spiegare l'inibizione della prenilazione. L'iPA, *in vitro*, può indurre stress e morte cellulare tramite l'accumulo di proteine non ripiegate e ciò trova riscontro nella modulazione di geni della categoria "susceptibilità a proteine non ripiegate". L'analisi, inoltre, mostra un effetto precoce sulla modulazione di geni coinvolti nel processo trascrizionale, come confermato dall'inibizione della sintesi dell'RNA registrata.

Valutando l'espressione differenziale di cellule A549 ed MCF-7, trattate con iPA, è stato rilevato un marcato aumento dell'espressione dei geni: ERRF11 (*ERBB receptor feedback inhibitor 1*), che codifica per una proteina citoplasmatica la cui espressione aumenta con la crescita cellulare; RF44 (*ring finger protein 44*) che codifica per una proteina con motivo a dito di zinco; ATF3 (*activating transcription factor 3*), coinvolto nella risposta allo stress cellulare, che codifica per una proteina nucleare membro della famiglia ATF/CREB, costituita dai fattori attivatori della trascrizione (ATF) e da fattori di trascrizione che legano gli elementi responsivi al cAMP sul DNA (CREB); CRTC2 (*CREB regulated transcription coactivator 2*) coattivatore trascrizionale di CREB, che risponde a stimoli indotti da cAMP, recettori accoppiati a proteine G e AMPK; USP30 (*ubiquitin specific peptidasi 30*) enzima mitocondriale responsabile della deubiquitinazione. Al contrario di iPA, studi su analoghi biologicamente attivi

hanno mostrato che nessuno di essi modula l'espressione dei geni DDIT3 (*DNA damage inducible transcript 3*), DNAJB9 (*DnaJ Hsp40 homolog, subfamily B, member 9*), HBP1 (*HMG-box transcription factor*), PPP1R15A (*Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A*) e SESN2 (*sestrin 2*) (Colombo et al. 2009).

**Tabella 3** *Categorie ontologiche dei geni (p<0.001), differenze nei livelli di espressione tra controllo e cellule A549 e MCF7 trattate con iPA (Colombo et. al. 2009).*

Gene ontology term	GO ID	No. of genes	p	Genes
Cell cycle arrest	0007050	6	7.61E-05	ERN1, HBP1, SESN2, PPP1R15A, DDIT3, JMY
Protein modification process	0006464	21	6.65E-04	HERPUD1, TRAF6, USP30, CBLB, TRIB1, MTMR3, PIM2, ALG2, ERN1, DUSP16, FBXL12, EIF2AK3, MED8, TRIM11, SNRK, PTPN21, WSB1, RNF44, ARIH1, MGAT1, VPRBP
Negative regulation of progression through cell cycle	0045786	7	7.72E-04	ERN1, HBP1, AXIN1, SESN2, PPP1R15A, DDIT3, JMY
Cell death	0008219	13	1.18E-03	AXIN1, TRAF6, PPP1R15A, DDIT3, PIM2, CEBPG, SETX, ERN1, FEM1B, EIF2AK3, SNRK, JMY, CEBPB
Regulation of apoptosis	0042981	10	1.87E-03	ERN1, EIF2AK3, FEM1B, TRAF6, SNRK, DDIT3, JMY, CEBPB, PIM2, CEBPG
Regulation of programmed cell death	0043067	10	2.02E-03	ERN1, EIF2AK3, FEM1B, TRAF6, SNRK, DDIT3, JMY, CEBPB, PIM2, CEBPG
Apoptosis	0006915	12	2.35E-03	ERN1, EIF2AK3, FEM1B, AXIN1, TRAF6, SNRK, PPP1R15A, DDIT3, JMY, CEBPB, PIM2, CEBPG
Unfolded protein response	0030968	3	2.36E-03	ERN1, EIF2AK3, DDIT3
Regulation of transcription, DNA-dependent	0006355	23	4.94E-03	NFIL3, DDIT3, AKNA, MEF2A, BRD1, ZNF140, KLF11, CEBPG, KLF4, HSF2, ERN1, MED8, HBP1, JMY, TSC22D1, SIN3A, CEBPB, GTF2B, ATF3, NRBF2, E2F7, ATF2, C10orf137
Regulation of transcription	0045449	24	5.16E-03	NFIL3, DDIT3, AKNA, MEF2A, BRD1, ZNF140, KLF11, CEBPG, KLF4, HSF2, ERN1, MED8, HBP1, RGM, JMY, TSC22D1, SIN3A, CEBPB, GTF2B, ATF3, NRBF2, E2F7, ATF2, C10orf137
ER-nuclear signaling pathway	0006984	3	6.37E-03	ERN1, EIF2AK3, DDIT3
Transcription, DNA-dependent	0006351	23	6.50E-03	NFIL3, DDIT3, AKNA, MEF2A, BRD1, ZNF140, KLF11, CEBPG, KLF4, HSF2, ERN1, MED8, HBP1, JMY, TSC22D1, SIN3A, CEBPB, GTF2B, ATF3, NRBF2, E2F7, ATF2, C10orf137
RNA biosynthetic process	0032774	23	6.60E-03	NFIL3, DDIT3, AKNA, MEF2A, BRD1, ZNF140, KLF11, CEBPG, KLF4, HSF2, ERN1, MED8, HBP1, JMY, TSC22D1, SIN3A, CEBPB, GTF2B, ATF3, NRBF2, E2F7, ATF2, C10orf137
Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	0019219	24	6.89E-03	NFIL3, DDIT3, AKNA, MEF2A, BRD1, ZNF140, KLF11, CEBPG, KLF4, HSF2, ERN1, MED8, HBP1, RGM, JMY, TSC22D1, SIN3A, CEBPB, GTF2B, ATF3, NRBF2, E2F7, ATF2, C10orf137
Regulation of kinase activity	0043549	6	7.83E-03	ERN1, DUSP16, MBIP, TRAF6, TRIB1, CERK

## 2.6 Carcinoma del colon-retto

Il cancro coloretale (CRC) rappresenta il terzo cancro più diagnosticato in entrambi i sessi con una mortalità del 33%. Circa il 75% dei pazienti presenta una forma sporadica di tale patologia, mentre il 25% ha una storia familiare di CRC, suggerendo quindi un'azione concomitante di geni ed ambiente (Japerson et al. 2010).

Vi sono fattori di rischio generico dovuti all'età, all'alimentazione e ad altre patologie concomitanti come malattie infiammatorie intestinali che potrebbero agire in maniera



sinergica causando sia un effetto tossico diretto nei confronti della mucosa gastrointestinale, sia un'aumentata secrezione di sali biliari e lisolecitine potenzialmente cancerogene.

È noto, inoltre, che una storia familiare di cancro del colon retto aumenta il rischio di svilupparlo da 2 a 6 volte e che vi sono condizioni ereditarie che predispongono allo sviluppo di tale patologia:

- *Poliposi familiare (FAP)*, sindrome a trasmissione autosomica dominante, nella quale i pazienti sviluppano numerosi adenomi coloretali in età adolescenziale. Il 100% dei pazienti affetti da FAP non trattata sviluppa un adenocarcinoma coloretale, spesso prima dei 30 anni di età (Kumar et al. 2010). La forma attenuata di FAP (AFAP) è caratterizzata da un minor numero di adenomi e dalla probabilità del 69% di sviluppare un CRC oltre che dalla possibilità di presentare tumori in altre sedi (Migliore et al. 2011; Japerson et al. 2010). Un'altra variante di FAP è la sindrome di Gardner associata allo sviluppo di polipi intestinali, osteomi, tumori desmoidi e cisti epidermiche (Migliore et al. 2011)

Le tre forme descritte presentano come elemento comune la mutazione del gene *Adenomatous Polyposis coli (APC)* che codifica per una proteina essenziale nel controllo negativo del *pathway* di WNT (Benchabane et al. 2009)

- *Poliposi associata a MUTYH (MAP)*, sindrome autosomica recessiva caratterizzata da polipi adenomatosi coloretali ed un alto rischio di CRC. Le manifestazioni cliniche di MAP mimano quelle di AFAP e la causa di tale disturbo è una mutazione biallelica di MUTYH, gene che codifica per una proteina che ripara l'escissione di basi del DNA (Migliore et al. 2011)

- *Sindrome non poliposica del carcinoma coloretale ereditario o HNPCC o sindrome di Lynch*, condizione autosomica dominante causata da mutazioni in geni quali MSH2 e MLH1 che codificano per proteine responsabili dell'identificazione, escissione e riparazione degli errori che si verificano durante la replicazione del DNA. I soggetti con HNPCC ereditano un gene riparatore del DNA mutato ed un allele normale e quando la seconda copia dell'allele viene persa, attraverso mutazione o silenziamento epigenetico, la riparazione difettosa del *mismatch* porta all'accumulo di mutazioni, soprattutto in regioni contenenti sequenze brevi di DNA a ripetizione, dette DNA microsatellite (Kumar et al. 2010).

- *Poliposi Amartomatose*, di cui fanno parte:

- *Sindrome di Peutz-Jeghers*, rara sindrome a trasmissione autosomica dominante. Essa si presenta all'età media di 11 anni con polipi amartomatosi nel tratto gastrointestinale, cioè con formazioni simil-tumorali costituite da tessuti maturi ed iperpigmentazione mucocutanea. Tale sindrome è associata ad un aumento del rischio di sviluppare numerosi tumori, tra cui quello del colon e, in metà dei soggetti interessati, presenta mutazione dell'oncosoppressore STK11, che codifica per una serina treonina chinasi che regola la polarizzazione, la crescita ed il metabolismo cellulare (Kumar et al. 2010).

- *Poliposi giovanile*, una rara sindrome che si manifesta in bambini al di sotto dei 5 anni è caratterizzata dalla presenza di polipi amartomatosi lungo il tratto gastrointestinale. Il 15-20% dei pazienti affetti da questa sindrome è portatore di una mutazione autosomica dominante del gene SMAD4/DPC4, che codifica per un intermediario citoplasmatico nella via di segnalazione di TGF- $\beta$ . BMPR1A, chinasi membro della superfamiglia TGF- $\beta$ , può essere alterata nel 25-40% dei casi, mentre il resto delle poliposi giovanili sembra essere sporadico. Tale patologia è associata al 39% di rischio di sviluppare il CRC (Migliore et al. 2011)

-*Sindrome di Cowden*, una poliposi amartomatosa a trasmissione autosomica dominante associata a mutazioni con perdita di funzione di PTEN, un gene che codifica per una fosfatasi lipidica che inibisce la segnalazione attraverso la via PI3K/Akt. La sindrome che si presenta con polipi amartomatosi nel tratto gastrointestinale, sembra essere un debole fattore di rischio per il CRC.

-*Sindrome poliposica iperplastica (HPPS)*, una rara condizione caratterizzata dalla presenza di grandi o multipli polipi iperplastici a livello del colon. Essa predispone più del 50% dei pazienti allo sviluppo di un CRC. I polipi iperplastici sono comuni proliferazioni epiteliali, diagnosticati tra la sesta e la settima decade di vita, ma ancora poco si sa circa l'eziologia di tale forma (Migliore et al. 2011).

- *Sindrome poliposica ereditaria mista (HMPS)*, caratterizzata da polipi adenomatosi/iperplastici ereditati come caratteri autosomici dominanti e può portare al cancro colon-rettale. Tale patologia mostra caratteri fenotipici sovrapponibili alla poliposi giovanile e recenti studi hanno evidenziato la mutazione di BMPR1A in soggetti affetti da HMPS (Migliore et al. 2011).

Il carcinoma del colon sporadico, che come è stato detto, rappresenta più dei due terzi dei casi registrati, può essere considerato un disturbo in cui fattori endogeni ed esogeni interagiscono con il quadro genetico, provocando una modulazione del rischio di presentare la patologia. Poiché la combinazione di eventi molecolari che portano al CRC è molto varia e comprende anomalie genetiche ed epigenetiche, sono state descritte almeno due vie di oncogenesi distinte: la via APC/ $\beta$ -catenina, associata a WNT ed alla sequenza adenoma-carcinoma, e la via dell'instabilità dei microsatelliti, associata a difetti di riparazione dei *mismatch* di DNA.

La sequenza adenoma-carcinoma (**fig.8**) rappresenta fino all'80% dei tumori del colon sporadici e prevede la mutazione di APC come tappa di inizio del processo neoplastico. Entrambe le copie del gene APC devono essere disattivate dal punto di vista funzionale, tramite mutazione o eventi epigenetici, perché si sviluppino gli adenomi. APC è un regolatore negativo essenziale della  $\beta$ -catenina, un componente della via di segnalazione di Wnt. Normalmente la proteina APC si lega e promuove la degradazione della  $\beta$ -catenina. Con la perdita della funzione di APC, la  $\beta$ -catenina si accumula e trasloca nel nucleo, dove attiva la trascrizione di geni, ad esempio quelli che codificano myc e la ciclina D1, che promuovono la proliferazione. Questa fase è seguita dal verificarsi di ulteriori mutazioni in geni quali, ad esempio, K-ras. L'ipotesi secondo cui tale mutazione sia un evento tardivo del processo carcinogenico è sostenuta dai dati degli studi che riportano, mutazioni dell'oncogene, in meno del 10% degli adenomi di diametro inferiore a 1 cm e nel 50% degli adenocarcinomi invasivi. La progressione neoplastica è anche associata a mutazioni in altri geni oncosoppressori, quali quelli che codificano per Smad2 e Smad4, coinvolti nella via segnalazione di TGF- $\beta$ . L'oncosoppressore p53 risulta mutato nel 70-80% dei tumori del colon, mentre è raramente coinvolto negli adenomi, e questo suggerisce che le mutazioni di p53 si possano verificare anche in fase avanzata della progressione tumorale. La perdita di funzione di p53 e di altri geni oncosoppressori è spesso causata da delezioni cromosomiche, e questo sottolinea che l'instabilità cromosomica è una caratteristica della via APC/ $\beta$ -catenina. In alternativa i geni possono essere silenziati dalla metilazione in una zona ricca di CpG, o isola CpG, una regione localizzata al 5' di alcuni geni che spesso comprende il promotore ed il sito di inizio della trascrizione. Anche l'espressione della telomerasi aumenta parallelamente all'aumento delle lesioni.

Nei pazienti che hanno un deficit nella riparazione dei *mismatch* del DNA, si accumulano ripetizioni dei microsatelliti, una condizione detta instabilità dei microsatelliti. Sebbene queste mutazioni sono in genere silenti, poiché i microsatelliti si trovano in regioni tipicamente non codificanti, in alcuni casi si localizzano nella regione codificante o promotrice di geni coinvolti nella regolazione della crescita cellulare, ad esempio quelli che codificano per il recettore TGF- $\beta$  di tipo II e per la proteina proapoptotica Bax. Poiché TGF- $\beta$  inibisce la proliferazione delle cellule epiteliali del colon, i mutanti del recettore TGF- $\beta$  di tipo II, possono contribuire ad una crescita cellulare incontrollata, mentre la perdita di Bax può aumentare la sopravvivenza dei cloni geneticamente anormali. Mutazioni dell'oncogene BRAF ed il silenziamento di gruppi distinti di geni, dovuto all'ipermetilazione dell'isola CpG, sono anch'essi comuni nei tumori che si sviluppano a causa di difetti del sistema di riparazione dei *mismatch* del DNA. Al contrario, in genere K-ras e p53 non subiscono mutazioni. Di conseguenza, la combinazione di instabilità dei microsatelliti, mutazione di BRAF e metilazione di bersagli specifici, quali MLH1, costituisce un segno distintivo di questa patologia

Un terzo gruppo di tumori del colon presenta un aumento della metilazione dell'isola CpG in assenza di instabilità dei microsatelliti. Molti di questi tumori nascondono mutazioni di K-ras, mentre le mutazioni di p53 e BRAF sono piuttosto rare. Al contrario, le mutazioni di p53 sono comuni nei tumori del colon che non mostrano un fenotipo metilato dell'isola CpG. (Kumar *et al.* 2010).

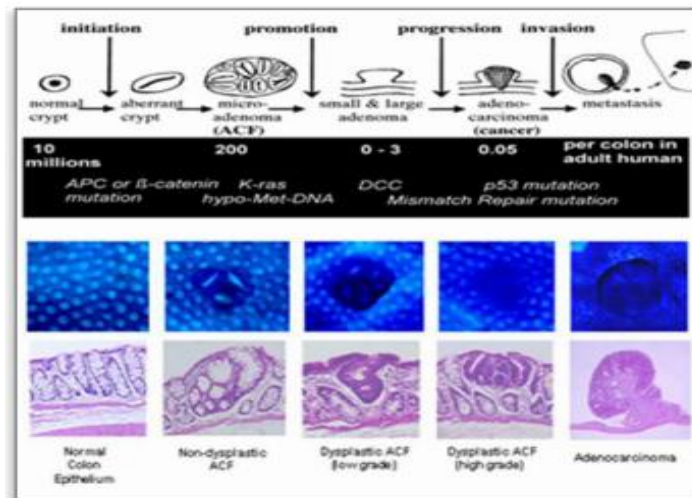


Figura 8 Sequenza adenoma-carcinoma.

### 2.6.1 Carcinoma del colon retto: ruolo di BMP4

Come già accennato, le BMPs sono molecole appartenenti alla superfamiglia di TGF- $\beta$ , note per le indispensabili funzioni regolatorie svolte durante lo sviluppo nei vertebrati e, nel caso specifico di BMP4, nella patogenesi del cancro. Studi su materiale genetico ottenuto da campioni tumorali di pazienti in fase precoce di CRC, o con predisposizione familiare, hanno permesso di identificare tre mutazioni a carico del gene BMP4; tre comuni varianti rs4444235, rs17563 ed rs1957636 al *locus* di BMP4 sono infatti associati ad un alto rischio di sviluppare il tumore (Houlston et al. 2008; Lubbe et al. 2011; Lubbe et al. 2012; Slattery et al. 2012; Tomlinson et al. 2011) e, di queste, rs444235 è associata all'aumento dell'espressione della proteina. Infatti, più alti livelli di espressione di BMP4, rispetto ai tessuti sani, sono stati riscontrati in carcinomi coloretali (Kim et al. 2011; Chiu et al. 2012; Deng et al. 2007) e diversi studi hanno dimostrato il *link* esistente tra il *signaling* di tale ligando ed il *pathway* di Wnt (Haramis et al. 2004; Lombardo et al. 2011; Nishanian et al. 2004; Dai et al. 2008): l'oncogene che codifica per la  $\beta$ -catenina può specificamente controllare l'espressione di BMP4, aumentandone la secrezione in cellule tumorali (Kim et al. 2002). Sebbene ne sia stata proposta la capacità di indurre differenziamento di cellule staminali tumorali (Zhao et al. 2008), studi *in vitro* ne hanno dimostrato l'azione anti-apoptotica in modelli cellulari di CRC sottoposti a trattamento termico e privazione di glucosio. In tali modelli, infatti, l'overespressione di BMP4 protegge le cellule di carcinoma dall' induzione di morte cellulare (Deng et al. 2007). Parallelamente è stato analizzato il ruolo di BMP4 nei fenomeni di migrazione cellulare oltre che nell' induzione della transizione epitelio-mesenchimale (EMT), un evento cruciale nel processo di metastatizzazione (Martin-Belmonte et al. 2011); i risultati dei *wound healing* e *boyden chamber assays* hanno dimostrato che l'overespressione della proteina, in vari modelli di carcinoma, induce un fenotipo cellulare altamente invasivo (Deng et al. 2007; Deng et al. 2009). Gli effetti della proteina sono stati ulteriormente studiati mediante l' analisi dei geni *target* di BMP4 in tessuti sani e tumorali. Nella linea di tumore del colon SW480, in cui era stata indotta overespressione di BMP4, *microarrays* hanno identificato 91 geni differenzialmente espressi (65 up-regolati e 26 down-regolati) (Deng et al. 2009) implicati in fenomeni metabolici, nell'organizzazione del citoscheletro, proliferazione cellulare, apoptosi e regolazione trascrizionale.

### 2.6.2 Attuali terapie farmacologiche per il carcinoma coloretale.

Nei casi in cui non è praticabile la terapia chirurgica o quando l'asportazione non risulta sufficiente all'eradicazione della malattia o, ancora, quando è necessaria la prevenzione di recidive locali, dopo chirurgia, bisogna ricorrere alla terapia farmacologica, tramite l'impiego di chemioterapici e/o di radioterapia.

Nella maggior parte dei casi, si preferisce usare schemi terapeutici che prevedono l'assunzione di combinazioni di farmaci con target diversi, che agiscono in modo sinergico.

I farmaci di elezione per il CRC sono: il 5-fluorouracile (5-FU), antimetabolita analogo della timidina che, fungendo da terminatore di catena, interrompe la duplicazione del DNA e va supplementato con acido folinico o leucovorina (sale di calcio dell'acido

folinico); la capecitabina, pro-farmaco del 5-FU; l'oxaliplatino, composto del platino, che funge da agente alchilante le basi azotate.

Vi sono, inoltre, altri farmaci, più recentemente introdotti in terapia come l'Irinotecan (inibitore dell'enzima topo isomerasi) e alcuni anticorpi monoclonali come Bevacizumab, diretto contro VEGFR e Cetuximab, diretto contro EGFR ed efficace in pazienti con K-Ras mutato.

La terapia standard di prima linea è costituita da oxaliplatino in combinazione con 5-fluorouracile e leucovorin (*FOLFOX*) oppure irinotecan in combinazione con 5-FU e leucovorin (*FOLFIRI*), da soli o insieme a bevacizumab. Il protocollo *FOLFOX*, in particolare, ha dimostrato una buona efficacia come chemioterapia adiuvante per i tumori del colon (Katzung et al 2011).

## 2.7 Carcinoma del colon-retto e regolazione epigenetica

Negli ultimi anni, numerose evidenze, indicano che alla base della sequenza adenoma-carcinoma attraverso cui si sviluppa il CRC, oltre all'accumulo sequenziale di mutazioni di geni oncosoppressori e oncogeni, giocano un ruolo importante le alterazioni epigenetiche.

Il termine epigenetica si riferisce ad una serie di modifiche ereditarie che, pur non alterando la sequenza di DNA, svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica (Migheli & Migliore, 2012) e dei processi cellulari in generale. Nel CRC, le aberrazioni epigenetiche che regolano l'inattivazione dei geni oncosoppressori, l'attivazione di oncogeni e l'instabilità cromosomica, sono coinvolte in tutte le vie e le fasi critiche della carcinogenesi, compresa l'iniziazione, e alcuni eventi sono spesso rilevabili prima della trasformazione neoplastica (Schnekenburger & Diederich, 2012).

Le modifiche epigenetiche comprendono: metilazione del DNA, perdita di *imprinting*, modifiche post traduzionali degli istoni, rimodellamento della cromatina e *small non-coding RNAs interference* (interferenza mediata da piccoli RNA non codificanti, come i miRNA) (Gargalionis et al. 2012).

Tra le modifiche citate, quella più ampiamente caratterizzata è la metilazione del DNA, che comprende sia l'ipometilazione del DNA globale (processo associato a prognosi infausta, che si verifica negli stadi iniziali dello sviluppo del CRC) sia l'ipermetilazione. La metilazione prevede l'aggiunta di un gruppo CH<sub>3</sub>, covalentemente legato ad una Citosina, e si verifica all'interno del dinucleotide CpG (citosina-guanina). Nel genoma, le regioni ricche di CpG sono spesso associate a zone di regolazione dell'espressione genica (ad esempio in prossimità dei promotori). L'ipometilazione a livello di promotori, è associata ad un aumento della trascrizione genica; viceversa, l'ipermetilazione è associata, in genere, alla repressione trascrizionale. Numerosi studi dimostrano che una elevata densità di citosine metilate in prossimità dei promotori di geni oncosoppressori, può portare alla completa repressione della loro trascrizione e molti tipi di cancro, compreso il CRC, utilizzano questo meccanismo (Migheli & Migliore, 2012).

Meno studiata, ma non di minore importanza è la modifica post-traduzionale degli istoni. Sebbene sia ancora da approfondire, una complessa e interessante interazione è emersa tra metilazione del DNA e modifiche istoniche. (Gargalionis et al. 2012).

### 2.7.1 Modifiche istoniche e ruolo nella carcinogenesi.

Nel CRC sono stati rilevati numerosi patterns di modificazioni aberranti a carico di istoni. Mutazioni, delezioni e alterazioni del profilo di espressione, sono alla base della variazione di funzione delle proteine coinvolte nella modifica di istoni. Questo supporta l'idea secondo cui le modifiche epigenetiche e gli effettori epigenetici giocano un ruolo importante nella tumorigenesi del CRC.

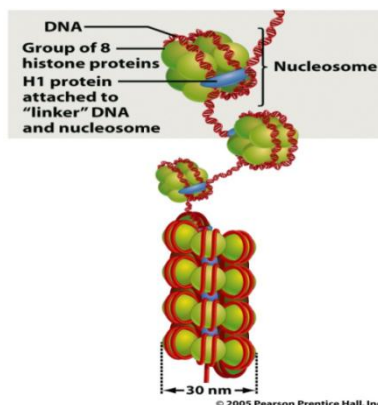


Figura 9 Avvolgimento del DNA al nucleosoma.

Questi eventi contribuiscono all'iniziazione ed alla progressione del cancro, alterando i livelli fisiologici di espressione genica, spesso attraverso l'inattivazione di geni oncosoppressori e attraverso l'induzione di instabilità genomica, grazie agli effetti sul rimodellamento della cromatina, sulla condensazione dei cromosomi e sulla disgiunzione mitotica. Il coinvolgimento di queste modifiche nelle prime fasi dell'oncogenesi, la loro natura reversibile e la capacità tecnica di rilevarle all'interno delle cellule, rendono questi cambiamenti epigenetici dei potenziali e innovativi strumenti di diagnosi e/o di trattamento del CRC (Gargalionis et al. 2012).

Il DNA, nel nucleo della cellula eucariotica, non è nudo, ma è organizzato in una struttura nota come nucleosoma. Quest'ultimo è composto da due copie di ogni proteina istonica: H2A, H2B, H3, H4, che formano l'ottamero istonico. Il DNA è avvolto all'ottamero, per una lunghezza di circa 146 bp (**fig.9**). Istoni linker, come l'istone H1 ed altre proteine non istoniche, possono interagire con il nucleosoma aiutando l'impacchettamento del DNA in strutture cromatiniche di ordine superiore.

Gli istoni sono proteine altamente conservate durante l'evoluzione. Ognuno di essi presenta delle code amino-terminali flessibili ed un ripiegamento caratteristico: un dominio globulare che media le interazioni con gli altri istoni dell'ottamero, per formare il nucleosoma. Le code N-terminali flessibili sporgono all'esterno del nucleosoma e possono influenzare l'interazione con gli altri nucleosomi e con diversi fattori di regolazione.

Sia le code N-terminali e C-terminali, che altre posizioni del dominio globulare, possono presentare diverse modifiche post- traduzionali, tra cui le più importanti e

meglio studiate sono: acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione, sumoilazione e ADP-ribosilazione (Bhaumik et al. 2007).

La **figura 10** riassume le principali modifiche post-traduzionali per ogni singolo istone ed i residui specifici su cui avvengono.

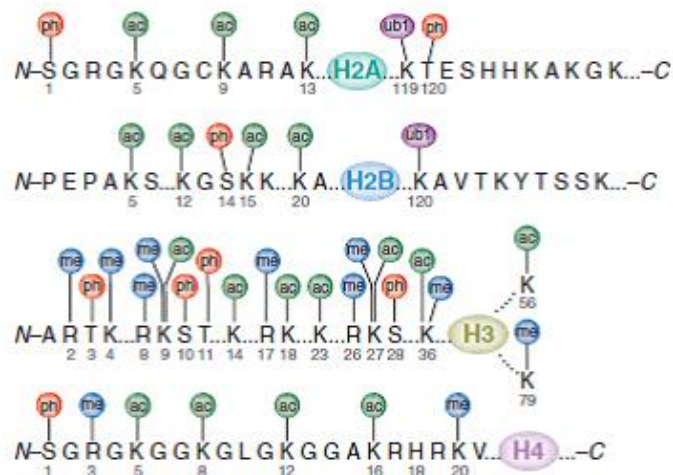


Figura 10 Principali modifiche istoniche e loro localizzazione (Bhaumik et al., 2007).

Grazie a diversi studi, è stato possibile, per ogni istone, associare una specifica modifica su un preciso residuo, ad uno specifico effetto. La **tabella 4** riporta alcuni esempi.

L'acetilazione e la metilazione (diversa dalla metilazione delle *CpG islands*, che avviene direttamente sul DNA), sono le due modifiche meglio conosciute e più studiate.

L'**acetilazione** è una modifica che avviene a carico delle Lisine (K) dei quattro principali istoni. Lo stato di acetilazione deriva dal bilancio dell'attività enzimatica di due gruppi di enzimi: le HATs (*Histone Acetyl-Transferases*), che catalizzano l'aggiunta di gruppi acetile sulle lisine e le HDACs (*Histone Deacetylases*) che li rimuovono. I livelli di acetilazione degli istoni H3 e H4, sono fondamentali per quanto riguarda lo *status* della cromatina e la regolazione genica, essendo generalmente associati con l'attivazione della trascrizione genica.

Dal punto di vista funzionale, un adeguato livello di acetilazione è necessario per neutralizzare le cariche degli istoni (dovute alla composizione aminoacidica), conferendo alla struttura della cromatina un aspetto meno condensato (meccanismo *cis*). Inoltre, le lisine acetilate, possono funzionare come sito di *binding* per il riconoscimento da parte di specifiche proteine (meccanismo *trans*), come ad esempio numerosi fattori di trascrizione, la cui funzione risulta facilitata dalla decondensazione della cromatina. Il fatto che esistano fattori di trascrizione in grado di riconoscere, in modo specifico, lisine acetilate, ha portato alla conclusione che molte HATs possono svolgere l'attività di co-fattori trascrizionali (Gargalionis et al. 2012).

Molti difetti nell'acetilazione istonica sono stati associati alla patogenesi del CRC. Uno dei primi segni, a livello epigenetico, legati al CRC ed a molti tipi di tumore maligno, è

la perdita di acetilazione della lisina<sup>16</sup> di istone H3 (H3K16), che provoca instabilità genomica (Gargalionis et al. 2012; Fraga et al. 2005). Analogamente, l'ipoacetilazione di H4K12 e H3K18 è stata documentata in adenocarcinomi colon-rettali scarsamente differenziati (Ashktorab et al. 2009). In contrasto, l'acetilazione di H3 e H4 risulta aumentata nei tumori ben differenziati. In alcuni casi, lo stato di acetilazione sullo stesso residuo può variare in modo tessuto-specifico o conferire caratteristiche diverse al tumore. Un esempio è costituito da H3K9: nello stato ipoacetilato, è correlato ad un istotipo di CRC che presenta metastasi epatiche metacrone. Lo stesso residuo, in linee cellulari di CRC, nello stato deacetilato è correlato all'inattivazione del gene oncosoppressore della E-Caderina.

**Tabella. 4** Alcuni effetti delle modifiche istoniche (He & Lehming, 2003).

Histone	Modification	Effect
H1	Phosphorylation	Chromatin condensation; gene-specific activation and repression
H2A	Ubiquitination	Transcriptional activation
	Acetylation	<i>Tetrahymena</i> survival
H2B	Ubiquitination	Elusive
	Ubiquitination	Prerequisite of H3 methylation
	Phosphorylation	Chromatin condensation
	Acetylation	Chromatin remodelling
H3	Methylation	Chromatin stabilisation
	ADP-ribosylation	Elusive
	Methylation (H3-K4, R17)	Transcriptional activation
	Methylation (H3-K9, K79)	Transcriptional repression
	Acetylation	Transcriptional activation
	Phosphorylation	Chromatin condensation; transcriptional activation
H4	Ubiquitination	Nucleosome loosening
	Acetylation	Transcriptional activation
	Methylation (H4-K20)	Transcriptional repression
	Methylation (H4-R3)	Transcriptional activation

La **metilazione** degli istoni può avvenire sui residui di lisina e/o di arginina. I residui di Lisina possono essere mono-, di- e trimetilati, mentre l'arginina può essere mono- e dimetilata. Gli enzimi che mediano questa modifica, si distinguono in lisina e arginina HMTs (*Histone Methyl-Transferases*) e lisina HDMs (*Histone Demethylases*). Diversamente dalle HATs, le HMTs possiedono specificità rispetto ai loro *target*. L'elevata complessità di questo tipo di modifica è probabilmente dovuta al ruolo sia nell'attivazione che nella repressione trascrizionale.

Un *marker* di metilazione distintivo del CCR è la perdita della trimetilazione della lisina 20, di istone H4 (H4K20me<sub>3</sub>). Questa caratteristica è associata a processi di silenziamento genico durante l'oncogenesi, essendo generalmente connessa ad uno stato di condensazione della cromatina. Altra modifica associata al CRC è la trimetilazione in H3K9, associata al silenziamento di geni oncosoppressori. Al contrario, la trimetilazione in H3K4 (H3K4me<sub>3</sub>), insieme alla perdita di H3K27me<sub>3</sub> e ad un'aumentata acetilazione di H3, sono associati ad un aumento di espressione di alcuni geni ed alla riattivazione di geni silenziati (Gargalionis et al. 2012). Da quanto detto, risulta chiaro che la metilazione istonica ha diversi ruoli nei processi biologici, a seconda del residuo e dell'istone su cui avviene la modifica.



La **fosforilazione** post-traduzionale è una modifica che può avvenire su tutte le proteine istoniche. Il suo ruolo biologico, tuttavia, è dipendente dal contesto in cui essa avviene. Per esempio: la fosforilazione della serina 1 di istone H4 (H4S1), ha un ruolo evolutivamente conservato, nella compattazione della cromatina durante la gametogenesi; la fosforilazione di H2BS14, invece, è connessa alla condensazione cromosomica durante la meiosi, ma scompare durante la divisione meiotica; la condensazione della cromatina durante l'apoptosi è legata alla fosforilazione di istone H2B; in seguito a danno al DNA, i residui Ser129 e Ser139 di istone H2A, risultano fosforilati e questa modifica risulta necessaria per una efficiente riparazione del DNA. La fosforilazione può avere un ruolo anche nella trascrizione. La presenza di Ser10 fosforilata su istone H3, indica, infatti, l' induzione della trascrizione di geni come Fos e Jun in risposta allo stress. Questa modifica, inoltre, è concomitante ad un aumento di acetilazione di H3 e ciò indica che potrebbe avere un ruolo importante nell' attivazione genica, inducendo l' attività delle HATs.

L' **ubiquitinazione** è una modifica a carico delle lisine all' estremità C-terminale di istone H2A e H2B, a cui vengono addizionate molecole di ubiquitina. Essa gioca un ruolo chiave nella regolazione dei processi di trascrizione, silenziamento e riparazione del DNA (Meake & Workman, 2008)

### 2.7.2 Ruolo dell' ubiquitinazione.

L' ubiquitina è una proteina di 76 aminoacidi, che viene coniugata al substrato attraverso una reazione che coinvolge tre reazioni enzimatiche differenti. Essa viene inizialmente attivata da una reazione ATP-dipendente che coinvolge un enzima attivante l'ubiquitina (E1); in seguito si verifica la sua coniugazione tramite un legame tioestere ad un residuo di cisteina, grazie ad un enzima ubiquitina-coniugato (E2). Infine, l' ubiquitina viene trasferita dall' enzima E2 ad un residuo di lisina della proteina substrato, grazie ad una ubiquitina- isopeptide ligasi (E3). Le ligasi E3, come il complesso formato da RNF20 (omologa di Bre1 in *S. Cerevisiae*) e RNF40, sono spesso caratterizzate dalla presenza di un *RING finger motif*, che lega un atomo di zinco ed è necessario per l' attività ubiquitina-ligasi. I substrati possono essere mono- o poliubiquitinati.

Numerosi studi (molti condotti in *S. Cerevisiae*) hanno contribuito a chiarire il ruolo dell'ubiquitinazione di istone H2B nell' attivazione della trascrizione e nel silenziamento. Un concetto interessante venuto fuori da questi studi, è il *crossstalk* tra l'ubiquitinazione e altre modifiche istoniche, tra cui la metilazione dell' istone H3 (Weake & Workman, 2008).

A differenza delle altre modifiche istoniche, l' ubiquitinazione avviene solo sugli istoni H2A e H2B. Rispetto alle altre modifiche, questa comporta un ingombro sterico maggiore (l' ubiquitina ha un peso di 8,5 KDa) e potrebbe quindi avere conseguenze importanti sulla struttura della cromatina. Studi di genomica hanno rivelato che H2B monoubiquitinato (H2Bub1) è associato specificamente a regioni del genoma in attiva trascrizione ed è interessante notare come l'attivazione trascrizionale da parte di molti dei recettori nucleari per gli ormoni sembra fare affidamento a questo meccanismo (Prenzel et al. 2011). Sia il recettore per gli estrogeni che il recettore per gli androgeni, ad esempio, richiedono, per la trascrizione dei geni bersaglio, l'attività di RNF20-RNF40 ed un corretto bilanciamento tra ubiquitinazione e deubiquitinazione

da parte di enzimi come USP22, una deubiquitinasi componente essenziale del complesso di rimodellamento della cromatina SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase*), che regola i cicli di attivazione/repressione trascrizionale. Il ruolo di questa modifica resta tuttavia contraddittorio e quindi da indagare ulteriormente. L'ubiquitinazione può infatti indurre anche repressione della trascrizione genica, dipendentemente dal contesto.

Il meccanismo attraverso cui H2Bub reprime la trascrizione potrebbe essere spiegato con l'ipotesi secondo cui una modifica così ingombrante impedisce il *binding* al DNA della RNA PolIII e dei fattori di allungamento necessari alla trascrizione, come il fattore TFSII. La capacità di attivare o reprimere la trascrizione potrebbe dipendere inoltre dalla localizzazione della modifica in prossimità gene *target* (Johnsen, 2012).

Chandrasekharan propone un modello di regolazione dell'espressione genica mediato da ubiquitinazione/deubiquitinazione di istone H2B, nell'uomo (**fig.11**). Nell'uomo, i geni inducibili, repressi dalla ligasi E3 RNF20, contengono elevati livelli di H2Bub1, immediatamente a valle del sito di inizio della trascrizione, e la RNA Pol-II pronta a trascriverli. Questi geni sono arricchiti da diversi *marker* di trascrizione, come l'acetilazione di H3K9/14 (cerchio giallo in figura) e la trimetilazione di H3K4 (rettangolo azzurro), ma il nucleosoma si trova in una condizione di stabilità e quindi la trascrizione è repressa. Ad opera di attivatori trascrizionali, viene reclutato sul promotore dei geni repressi da RNF20, il complesso hSAGA, deputato al rimodellamento della cromatina grazie alla sua attività acetil-transferasica. Di questo complesso fa parte la deubiquitinasi USP22 (*Ubiquitin specific peptidase 22*) che rimuove la molecola di ubiquitina legata alla Lys120 di H2B, destabilizzando il nucleosoma, decondensando la cromatina nella regione del gene che dovrà essere trascritta. La rimozione dell'impedimento sterico, permette così la progressione della RNA Pol-II.

Come discusso precedentemente, un aspetto interessante nella regolazione delle modifiche istoniche è dato dalla possibilità, per una modifica, di regolare un altro tipo di modifica all'interno dello stesso istone (*cis*) o su istoni diversi (*trans*), fenomeno noto come *histone crosstalk*. La regolazione da parte di H2Bub1 della metilazione di H3K4 e H3K79 è l'esempio di modifica *trans*-istonica meglio studiato (Chandrasekharan et al. 2011). Questo *crosstalk* sembra funzionare unidirezionalmente: mutazioni che interessano l'ubiquitinazione di H2B, riducono il livello di queste modifiche su H3. Tuttavia, l'inibizione dell'attività di una delle metiltransferasi responsabili della reazione, o mutazioni del sito di metilazione di H3, non hanno alcun effetto sull'ubiquitinazione di H2B (Briggs et al. 2002).

La funzione della metilazione istonica dipende dal sito in cui avviene. Per esempio, la metilazione di H3 sui residui K9 e K27 è associata, generalmente, a silenziamento del gene, mentre la metilazione di H3K4 e K79 è legata ad uno stato in cui i geni sono nella forma attiva (eucromatina) (Jenuwein & Allis 2001).

Nel lievito, la di/trimetilazione di H3K79 è catalizzata da Dot1 e per H3K4 da Set1, enzima che fa parte di un complesso chiamato COMPASS (MLL nell'uomo).

Il modello proposto per spiegare questo meccanismo prevede che l'ubiquitina faccia da ponte per il reclutamento diretto di enzimi ad attività metil-transferasica. Poiché Set1 e Dot1 sono associati alla cromatina anche in assenza di H2Bub1, il loro reclutamento non può essere il meccanismo di cui si serve H2Bub1. È probabile che venga reclutato, invece, un fattore (Swd2, componente del complesso COMPASS), che funga da ponte tra H2Bub1 e Set1, inducendo un cambio conformazionale che facilita la reazione di metilazione (Chandrasekharan et al. 2010).

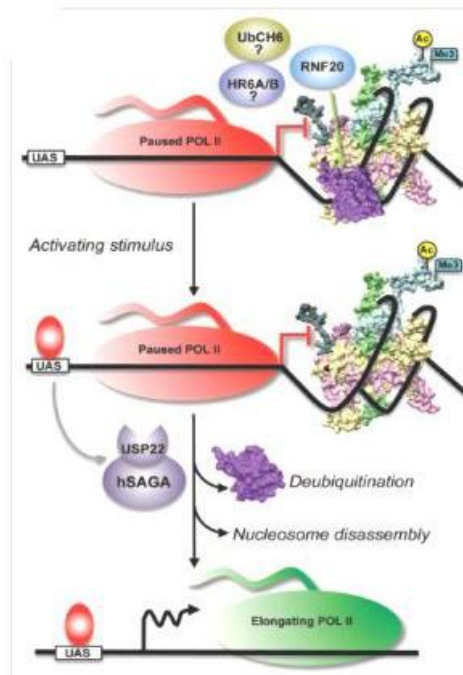


Figura 11 Modello della regolazione trascrizionale mediata da H2Bub1 (Chandrasekharan et al. 2010).

Mazón Peláez ed il suo gruppo, per comprendere come le modificazioni istoniche sono globalmente alterate dall'attivazione oncogenica, hanno studiato diverse modifiche istoniche in linee cellulari di adenocarcinoma del colon umano (CaCo2) stabilmente trasfettate con la forma oncogenica di H-Ras (CaCo-H), K-Ras (CaCo-K) e BRAF (CaCo-BR). Da questo studio è emerso che, sia in CaCo-H che in CaCo-K, vi è un lieve aumento dei livelli di H3S10P e H3K4me3 (associati a geni trascrizionalmente attivi), rispetto alla linea cellulare CaCo2, non trasformata. Allo stesso tempo, nelle CaCo-H, si è verificato una diminuzione nei livelli di H3K27me3, associata a repressione trascrizionale. Questo indica che esiste una inversa funzione regolatrice dei livelli globali di modifiche istoniche, in relazione all'espressione di H-ras e dello stadio di trasformazione cellulare.

Per analizzare in dettaglio le specifiche alterazioni delle modifiche degli istoni su promotori di geni coinvolti nell'evoluzione tumorale, sono stati presi in considerazione due geni inversamente regolati tra CaCo2 e CaCo-H: ciclina D1 ed E-caderina. La prima regola positivamente i passaggi attraverso le varie fasi del ciclo cellulare, la E-caderina, invece, è una molecola coinvolta nei meccanismi di adesione cellulare e sembra avere un ruolo protettivo nel cancro. Sul promotore della Ciclina D1, la cui espressione è aumentata in cellule Caco-H, i livelli di H3K27me3 e H3K9me2 (associati a repressione) apparivano significativamente inferiori, rispetto alle Caco-2. Queste modifiche associate a repressione, invece, sul promotore della E-Caderina (la cui espressione è praticamente abolita in CaCo-H), erano notevolmente aumentate in CaCo-H rispetto alle CaCo2. I livelli di metilazione associati ad attivazione trascrizionale, come nel caso di H3K4me3 (via H2Bub1), risultavano diminuiti sul promotore della E-caderina in cellule CaCo-H rispetto a CaCo2. Sorprendentemente,

nel caso del promotore della ciclina D1, in cellule CaCo-H, i livelli di H3K4me3 risultavano leggermente diminuiti. Ciò indica che alla base della regolazione trascrizionale deve esserci un meccanismo più complicato che coinvolge l'attività di altri enzimi, come ad esempio le HDAC (istone deacetilasi) (Mazón Peláez et al. 2010).

## 2.8 iPA e cancro del colon-retto

L' iPA è stato testato su cellule di adenocarcinoma del colon DLD1, mostrando la capacità di inibire la sintesi del DNA in maniera dose-dipendente. L'inibizione della proliferazione cellulare è evidente a 24 ore di trattamento a partire dalla concentrazione di 5 $\mu$ M e raggiunge l'80% alla concentrazione di 25 $\mu$ M. Le analisi citofluorimetriche mostrano diminuzione della percentuale di cellule in fase S ed un loro aumento in fase G<sub>0</sub>, coerentemente con i risultati del saggio dell'annessina che conferma l'induzione di apoptosi. Tali effetti sono stati osservati anche in altri modelli di carcinoma del colon quali cellule SW620 ed HT29. Sono stati analizzati, inoltre, gli effetti dell' iPA sull'espressione di proteine regolatore del ciclo cellulare, registrando la riduzione dei livelli di ciclina A, E, D e l'aumento dose-dipendente dei livelli degli inibitori delle chinasi ciclina dipendente p27<sup>kip1</sup> e p21<sup>waf</sup>.

La proteina del retinoblastoma, regolatore negativo della crescita cellulare appare ipofosforilata, e quindi in stato attivo, dopo 12 ore di trattamento con iPA 10 $\mu$ M oltre che ipoespressa rispetto ai controlli non trattati.

Per studiare i meccanismi biochimici associati alla morte cellulare, è stato analizzato il livello di espressione di proteine coinvolte nel processo di regolazione dell'apoptosi: in cellule trattate con dosi crescenti di iPA per 24 ore è stato rilevato l'aumento dose-dipendente dei livelli della proteina proapoptotica Bax e la diminuzione dei livelli della proteina antiapoptotica Bcl-xl; Dopo 24 ore di trattamento alle concentrazioni di 25 e 50 $\mu$ M, i livelli di procaspasi 3 risultano ridotti e parallelamente aumenta la quota di caspasi 3 che clivando il proprio substrato poly(ADP-ribosio) polimerasi (PARP), ne riduce la quantità; i livelli di citocromo C, rilevati nella frazione citoplasmatica, aumentano in maniera dose-dipendente.

Poiché molti stimoli e stress cellulari possono indurre apoptosi e modulazione del *pathway* MAPK, è stata analizzata l'attivazione di JNK e p38 e la fosforilazione di entrambe le chinasi è stata osservata a 6h di trattamento con iPA 25 $\mu$ M e rilevata fino a 24 ore. I co-trattamenti con inibitori delle due chinasi hanno mostrato, però, che l'attivazione di JNK, ma non di p38, è richiesta per spiegare l'apoptosi indotta dalla citochinina.

I dati suggeriscono quindi che l'iPA induce apoptosi anche, attraverso una via caspasi-indipendente, attivando segnali di stress come il *pathway* di JNK, che provoca il rilascio del citocromo C dalla membrana mitocondriale e successivamente la frammentazione del DNA (Laezza et al. 2009).

Poiché è noto che il carcinoma colon-rettale esprime alti livelli di FPPS (Caruso et al., 2003; Notarnicola et al., 2004), ne è stata analizzata l'attività in cellule DLD1 trattate con iPA, registrandone una forte inibizione parallelamente alla riduzione della crescita tumorale. L'effetto antiproliferativo rilevato appare revertito da somministrazioni di FPP, dimostrando l'interconnessione tra i due fenomeni (Laezza et al. 2009).

Ulteriori studi hanno dimostrato che iPA inibisce la proliferazione di cellule HCT-15, altra linea di cancro del colon, in maniera dose-dipendente con una  $IC_{50}$  di  $2.5\mu\text{M}$  a 72 ore di trattamento. L'analisi citofluorimetrica rivela un aumento della percentuale di cellule in fase sub  $G_0/G_1$  e  $G_2/M$ , indicando quindi induzione di apoptosi (Rajabi et al. 2011).

## 2.9 Materiali e metodi

### 2.9.1 Composti

L' iPA (Sigma-Aldrich) è stata solubilizzata in DMSO ed utilizzata alle concentrazioni indicate nei singoli esperimenti. Il DMSO (concentrazione finale in coltura pari allo 0.1%) è stato utilizzato come veicolo di controllo.

### 2.9.2 Colture cellulari.

Sono state utilizzate le linee cellulari umane di adenocarcinoma coloretale DLD1, SW620 ed HCT116 (ICLC-Interlab Cell Line Collection) caratterizzate da diverso grado di malignità. Le linee cellulari DLD1, SW620 ed HCT116 sono state mantenute rispettivamente in RPMI-1640, DMEM e McCoy's. I mezzi di coltura sono stati addizionati con siero fetale bovino al 10%, L-glutamina 2mM, penicillina 100 U/mL e streptomina 100 µg/mL (Euroclone).

Le linee cellulari di glioma umano U343MGa (U343), U251MGa (U251) e T98G (T98) sono state acquistate presso CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Germania) o gentilmente fornite dalla Dr. Daniela Parolaro (Università dell'Insubria, Italia). Tali linee cellulari sono state mantenute in coltura in EMEM (Lonza) addizionato con siero fetale bovino al 10% deplementato, 1% L-glutamina, 1% penicillina/streptomina, 1% di sodio piruvato, 1% di aminoacidi non-essenziali (Euroclone)

Le cellule sono state coltivate in monostrato a 37° C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO<sub>2</sub>.

Al raggiungimento della confluenza il terreno è stato eliminato, le cellule sono state lavate con un opportuno volume di PBS 1X (Phosphate Buffer Saline) e staccate mediante una soluzione di Tripsina (0.05%) e di EDTA (0.02%); la Tripsina è stata poi neutralizzata con un egual volume di terreno con siero ed infine si è proceduto alla semina delle cellule in diluizioni opportune.

Per le colture primarie di glioma, piccole porzioni di tessuto cerebrale interessato dal tumore sono state raccolte al momento stesso della craniotomia, effettuata presso il servizio di neurochirurgia dell'ospedale "G. Rummo" (Benevento, Italia), per la resezione del tumore. Il tessuto cerebrale raccolto è stato suddiviso in diverse parti, una delle quali è stata immediatamente processata per generare linee primarie, mentre la porzione restante è stata conservata a -80°C per la caratterizzazione molecolare (RNA, DNA, estrazione di proteine). Un secondo campione è stato inoltre prelevato da ogni paziente per la diagnosi clinica, eseguita da esperti di neuropatologia in conformità alla Classificazione Internazionale dei tumori del sistema nervoso centrale redatta con il patrocinio della World Health Organization (WHO). I tumori sono stati diagnosticati come astrocitomi (WHO grado I-III), glioma (WHO grado II), o glioblastoma multiforme (WHO grado IV). Tutti i tessuti sono stati raccolti rispettando gli standard etici del Comitato Istituzionale. I pazienti sono stati informati sulla creazione di modelli cellulari a partire dalle loro stesse cellule tumorali e hanno fornito un consenso informato scritto. La preparazione di linee primarie in adesione (designate come GBMn) è stata condotta attraverso la dissociazione gentleMACS di campioni di tumore di cervello, utilizzando BTDK Brain Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec.) e sono state mantenute in coltura in DMEM F12 addizionato con

15% di siero fetale bovino deplementato, 2% di L-glutammina, 1% penicillina/streptomina, 1% di sodio piruvato, 1% di aminoacidi non-essenziali (Euroclone).

### 2.9.3 Saggio di proliferazione cellulare

Il saggio di incorporazione della bromodeossiridina (BrdU) è stato eseguito seminando le linee cellulari DLD1, SW620, HCT116, U343, U251 e T98 ( $1 \times 10^4$  cellule per ciascun pozzetto), in triplicato, in piastre a 96 pozzetti in un volume finale di 200  $\mu$ l/well di opportuno terreno di crescita e coltivate per 24 ore a 37°C in atmosfera umidificata contenente CO<sub>2</sub> al 5%. Le cellule sono state trattate con iPA, o con il solo veicolo, alle concentrazioni indicate per 24 e 48 ore. La soluzione contenente BrdU è stata aggiunta a tutti i pozzetti, di controllo e trattamento, nelle ultime 4 ore di incubazione. Al termine dei tempi indicati il mezzo è stato rimosso e sostituito con una soluzione fissante e denaturante seguita da incubazione con anticorpo anti-BrdU coniugato a perossidasi (HRP). La reazione colorimetrica sviluppata è stata misurata mediante lettura dell'assorbanza a 450 nm utilizzando un lettore di micro piastre Multiskan Spectrum (Thermo Scientific, ThermoElectron Corp). I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti ciascuno eseguito in triplicato. Per ciascun trattamento i valori ottenuti sono stati espressi come percentuale rispetto al valore ottenuto per i controlli trattati con il solo veicolo.

### 2.9.4 Analisi del ciclo cellulare

Le linee cellulari DLD1 ed SW620 sono state messe in coltura in piastre da 100 mm. Per sincronizzare le cellule all'interfase G1/S, si è proceduto all'incubazione per 18 ore in terreno di crescita allo 0.5% di siero ed in seguito è stato effettuato il trattamento con iPA 10 $\mu$ M o con il solo veicolo. Dopo 24 o 48 ore, le cellule sono state raccolte, fissate col 70% di etanolo, e conservate a -20°C overnight. In seguito, alle cellule è stato aggiunto ioduro di propidio (PI; 50 $\mu$ g/ml) in PBS contenente 100 U/ml DNase-free Rnase, per 15 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono poi state processate mediante un FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) ed i dati sono stati analizzati tramite l'uso di ModFit LT v3.2 (Verity Software House, Inc.); sono stati raccolti 10.000 eventi, corretti per detriti cellulari e popolazioni aggregate.

### 2.9.5 Analisi dell' apoptosi

L'apoptosi per le linee cellulari DLD1 ed SW620 è stata analizzata mediante anti-human Annexin V (BioLegend) e PI. In breve, le cellule sono state messe in coltura in piastre da 100 mm e, 24 ore dopo, trattate con iPA 10 $\mu$ M, o con il solo veicolo, per 24 o 48 ore in in opportuno terreno di crescita al 2% di FBS, staccate con tripsina e lavate in PBS. Il pellet cellulare è stato risospeso in Annexin V binding buffer (10mM HEPES/NaOH, pH 7; 140 mM NaCl; and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>), incubato con Annexin V-FITC per 20 minuti a temperatura ambiente e successivamente con PI, sempre a temperatura ambiente, per ulteriori 15 minuti al buio. Le cellule sono state poi sottoposte ad analisi citofluorimetrica ed almeno 10.000 eventi sono stati registrati. I

dati sono stati analizzati con il software Cell- Quest Pro (Becton Dickinson) e sono stati espressi come valori logaritmici dell'intensità di fluorescenza.

### **2.9.6 Western blotting.**

Le cellule sono state seminate in dischi per colture cellulari del diametro di 100 mm e dopo 24 ore di incubazione, sono state trattate con iPA 10 $\mu$ M o con il solo veicolo. I tempi di trattamento utilizzati sono riportati nelle rispettive figure. Al termine delle incubazioni, le cellule sono state trattate con tripsina-EDTA, raccolte per centrifugazione e lavate con PBS 1X. La lisi cellulare è stata ottenuta risospesando in RIPA buffer (NaCl 150 mM, 1% triton X-100 pH 8.0, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 Mm Tris, pH 8.0) a 4°C e centrifugando i lisati a 15000 rpm per 10 min. Il sopranatante è stato raccolto ed è stata misurata la concentrazione proteica mediante saggio Bio-Rad. Per ciascun punto di controllo e di trattamento, eguali quantità di estratti proteici (25  $\mu$ g) sono state diluite in buffer Laemmli, incubate a 100°C per 5 minuti, sottoposte ad elettroforesi in SDS-PAGE al 10-12,5% e trasferite su membrana di nitrocellulosa (Amersham, GE Healthcare). Le membrane sono state bloccate con TBS-Tween (50 mM Tris, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.1% Tween-20) contenente il 5% di albumina di siero bovino (BSA) o non fat dry milk (MILK), lavate con TBS-Tween ed incubate con gli anticorpi primari. Sono stati utilizzati anticorpi primari specifici verso actina, tubulina, BMP-4, H3K4me2, H3K4me3, (Abcam), istone H2B ed istone H2B ubiquitinato sul residuo di lisina 120 (UbH2B) (Cell Signaling Technology). Le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari HRP-coniugati anti-mouse o anti-rabbit (Cell Signaling Technology). Le bande specifiche sono state evidenziate usando il sistema di chemiluminescenza (ECL-Amersham Biosciences) e successiva esposizione a X-ray film (Kodak). La densità relative delle bande è stata determinata utilizzando il software di analisi densitometrica Image Lab 4.0 (Bio Rad Laboratories).

### **2.9.7 Analisi statistica.**

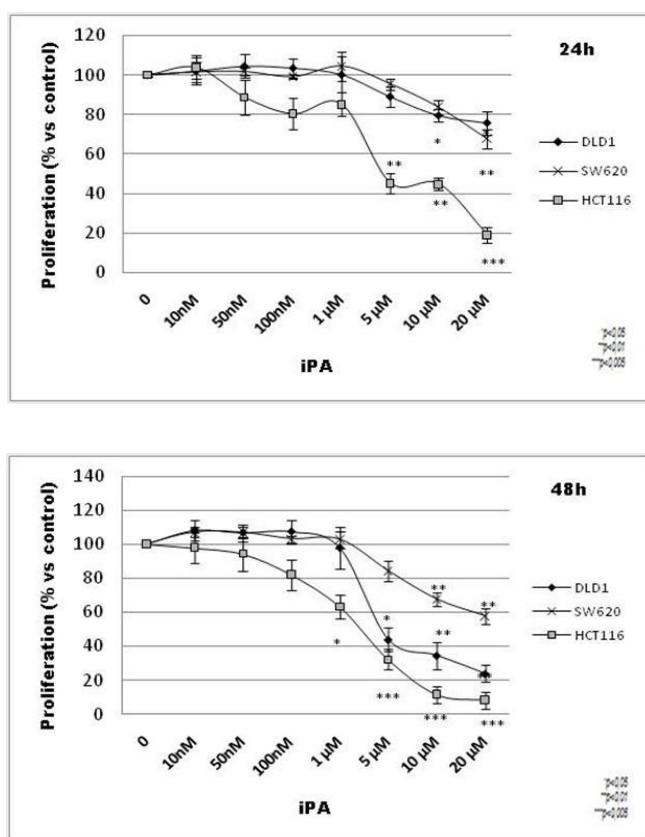
I dati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard (SD) dei risultati ottenuti in almeno due esperimenti indipendenti, condotti in triplicato. Il test t-Student ed analisi della varianza (ANOVA) sono stati utilizzati per valutare la significatività del trattamenti rispetto ai controlli. Per tutti gli esperimenti, è stato considerato statisticamente significativo un valore di *p* minore o uguale a 0.05.



## 2.10 Risultati

### 2.10.1 Effetti dell' iPA sulla proliferazione di linee cellulari di CRC

Allo scopo di valutare gli effetti dell' N6-isopenteniladenosina in cellule tumorali, ne abbiamo testato l'efficacia sulla proliferazione di linee di carcinoma coloretta umano. Nello specifico, cellule DLD1, HCT116 e SW620 sono state trattate con concentrazioni crescenti (da 10nM a 20µM) del composto, o con il solo veicolo, e la proliferazione cellulare è stata valutata dopo 24 e 48 ore di trattamento mediante il test di incorporazione della BrdU. I risultati ottenuti, riportati in **figura 12**, hanno dimostrato che l' iPA è in grado di inibire significativamente la proliferazione a partire dalla concentrazione di 10µM, nelle linee cellulari DLD1 ed SW620 dopo 24 ore di trattamento, con effetti evidenziabili per la linea cellulare HCT116 già a partire da 5 µM.

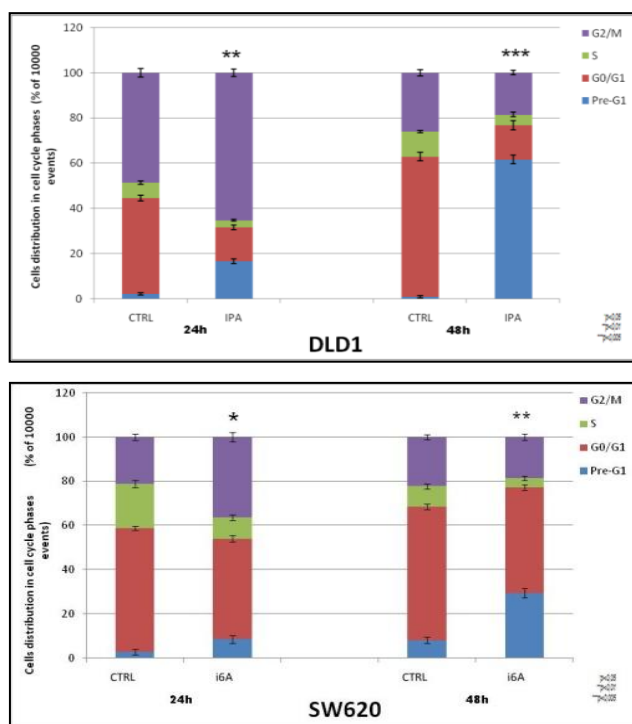


**Figura 12** Proliferazione cellulare valutata dopo 24 e 48 ore di trattamento, mediante test di incorporazione della BrdU, in cellule DLD1, SW620 ed HCT116 trattate con concentrazioni crescenti di iPA (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005)

Gli effetti a 48 ore, sebbene più evidenti, si registrano alle medesime concentrazioni risultate attive nel tempo più precoce per la linea SW620 ed a partire da 5µM per cellule DLD1. La linea cellulare HCT116, ancora una volta, sembra essere la più responsiva al trattamento, con un effetto di inibizione della proliferazione cellulare del 40%, rispetto ai valori del controllo, già alla dose di 1µM.

Al fine di analizzarne ulteriormente l'effetto cellulare, sono stati condotti saggi di citofluorimetria a flusso per 24 e 48 ore di trattamento con iPA 10µM, risultata efficace nell'inibire la proliferazione di tutti i modelli di CRC presi in esame. L'analisi del ciclo cellulare, effettuata mediante *PI-staining*, mostra un significativo accumulo in fase Pre-G1, per cellule DLD1 ed SW620 trattate con iPA, rispetto al controllo, già a partire da 24 ore di trattamento (**fig.13**).

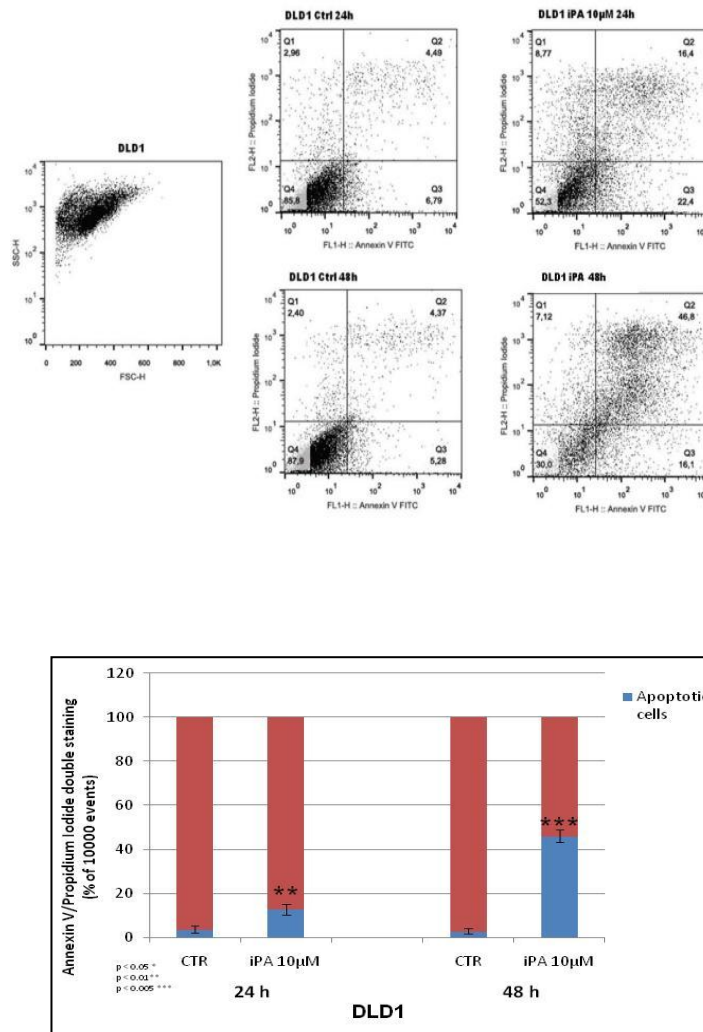
Quando il trattamento viene prolungato per 48 ore, l'aumento della quota di cellule in fase Pre-G1 rappresenta più del 20% degli eventi analizzati per la linea cellulare SW620, raggiungendo il 60% in cellule DLD1, con effetti trascurabili nei controlli trattati con il solo DMSO.



**Figura 13.** Analisi del ciclo cellulare in cellule DLD1 ed SW620 dopo 24 e 48 ore di trattamento con iPA 10µM, valutato mediante *PI-staining* (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ ).

Il doppio staining *Annexin V/PI*, per cellule DLD1 ed SW620, analogamente trattate con iPA 10µM, ha infine confermato che l'inibizione della proliferazione ed il blocco del ciclo cellulare a partire da 24 ore di trattamento, sono associati all' induzione del

fenomeno apoptotico, secondo quanto emerge dai livelli di cellule positive sia per *Annexin V* che *PI* (fig.14).



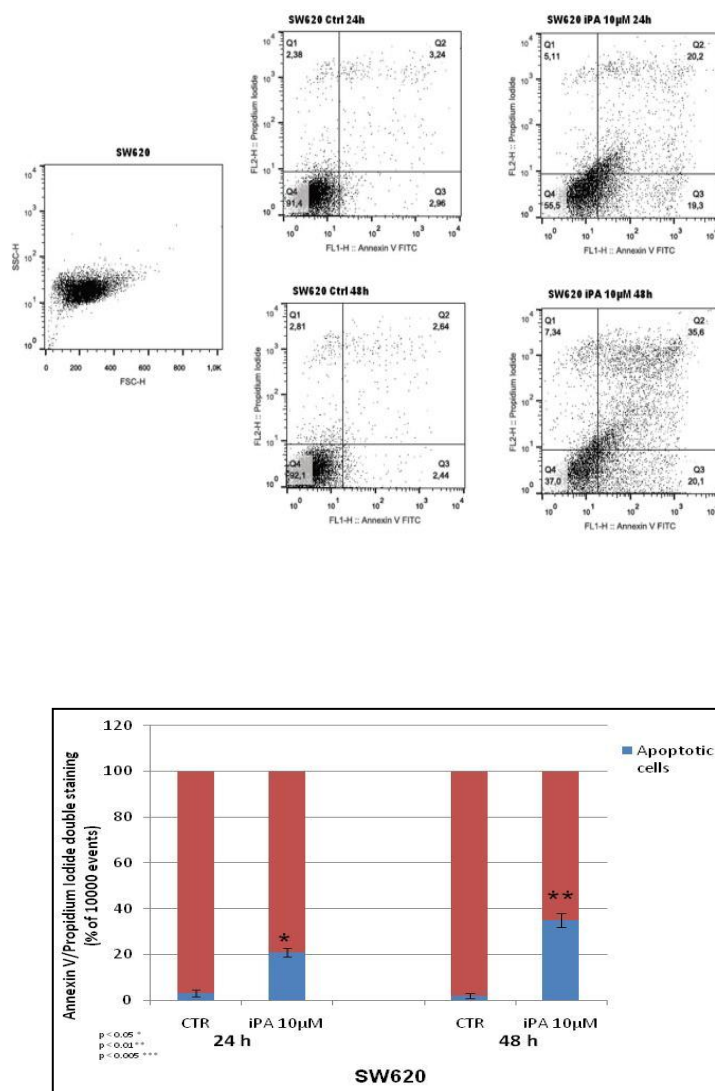


Figura 14 Valutazione dei livelli di apoptosi, mediante Annexin V/PI double staining, in cellule DLD1 ed SW620 trattate con iPA 10µM: istogrammi dei profili citofluorimetrici e rappresentazione grafica della percentuale di cellule in apoptosi (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005).

## 2.10.2 Identificazione di potenziali target molecolari di iPA

### 2.10.2.1 Istone H2B, partner proteico di iPA

#### 2.10.2.1.1 Analisi proteomica

In collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Fabrizio Dal Piaz del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell' Università degli Studi di Salerno, abbiamo condotto uno studio volto ad identificare i possibili *partners* proteici dell' iPA. L'identificazione di potenziali interattori fisici dell' analogo adenosinico ha lo scopo di chiarirne nel dettaglio il meccanismo molecolare alla base degli effetti biologici osservati. Tale obiettivo è stato perseguito mediante l' utilizzo della tecnica proteomica di *fishing for partners*. Cellule DLD1 ed SW620 sono state trattate con il solo veicolo o con iPA 10 $\mu$ M per 2 ore, gli estratti proteici totali sono stati suddivisi in frazione citosolica e nucleare ed entrambe sono state utilizzate per il saggio proteomico. Mediante studi di *binding* ad iPA-biotinilata, purificazione degli interattori, successivo sequenziamento ed analisi di banche dati, sono state identificate alcune proteine potenzialmente in grado di legarsi alla molecola in esame. I risultati per la linea DLD1 sono presentati in **tabella 5**

**Tabella 5** Lista di proteine identificate in estratti nucleari (A) e citosolici (B) di cellule DLD1 trattate con iPA 10 $\mu$ M per 2 ore.

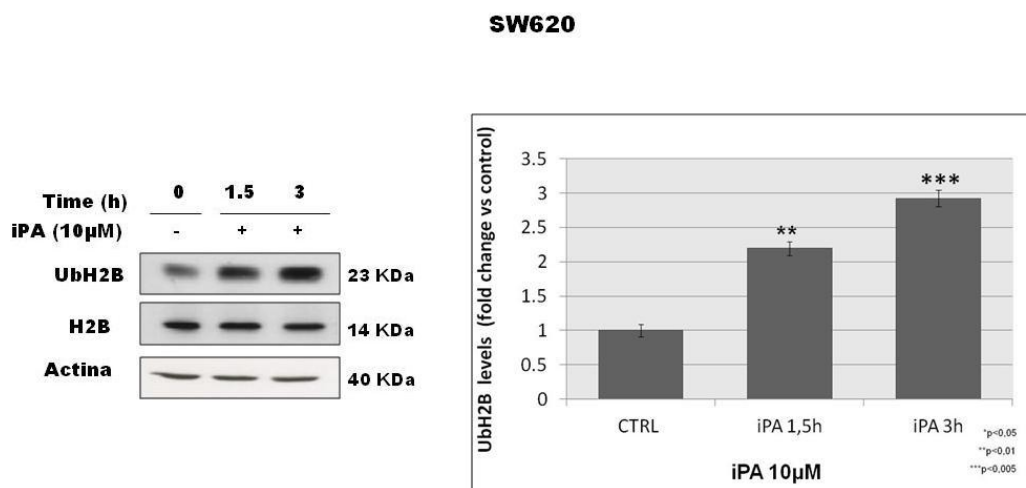
<b>A</b>	Swiss Prot code	Identified protein	Peptides
	H2B1B_HUMAN	Histone H2B type I-B	5
	ACTA_HUMAN	Actin, aortic smooth muscle	2
	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	3
	G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase	1
<b>B</b>	Swiss Prot code	Identified protein	Peptides
	H2B1B_HUMAN	Histone H2B type I-B	6
	H12_HUMAN	Histone H1.2	11
	NPM_HUMAN	Nucleophosmin	2
	THOC4_HUMAN	THO complex subunit 4	1
	HNRPR_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	3

Tra le proteine identificate, il nostro interesse si è focalizzato su istone H2B per svariati motivi: istone H2B è stata l' unica proteina identificata sia negli estratti citosolici che in quelli nucleari; inoltre alcune delle altre proteine identificate (tra le quali nucleofosmina e istone H1.2) sono *partners* diretti di H2B.

### 2.10.2.1.2 Saggi in vitro

Abbiamo ipotizzato che alcune delle attività biologiche di iPA potessero essere connesse con alterazioni e/o con meccanismi di regolazione mediati da istone H2B. Per verificare tale ipotesi, abbiamo valutato se *in vitro*, nei nostri modelli cellulari di CRC, il trattamento con iPA potesse indurre modificazioni a carico dell' istone H2B. Cellule DLD1, SW620 ed HCT116 sono state trattate con iPA e gli estratti totali sono stati utilizzati per analisi *western blot*.

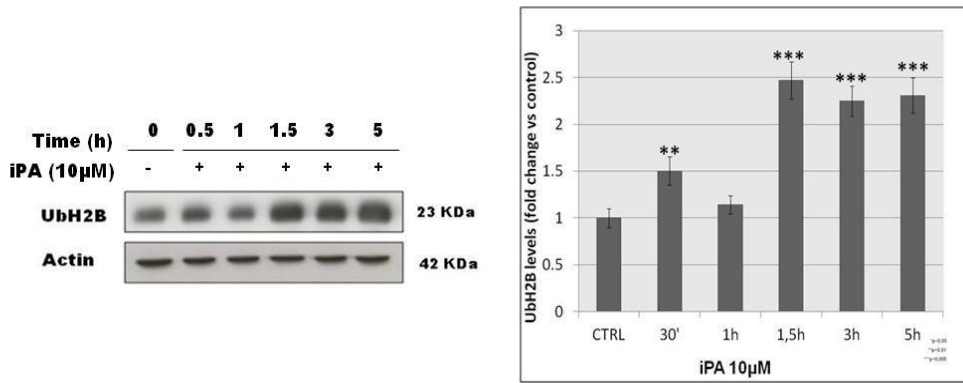
I risultati ottenuti hanno dimostrato che in cellule SW620, trattate con iPA alla concentrazione di 10 $\mu$ M per 1,5 e 3 ore, la monoubiquitinazione dell' istone, a livello della lisina 120, aumenta progressivamente rispetto al controllo, mentre l'espressione dell'istone H2B rimane costante nel tempo. (fig.15)



**Figura 15** Western Blot eseguito in cellule SW620 trattate per i tempi indicati con iPA 10 $\mu$ M e rappresentazione in grafico della modulazione dell'ubiquitinazione (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ ).

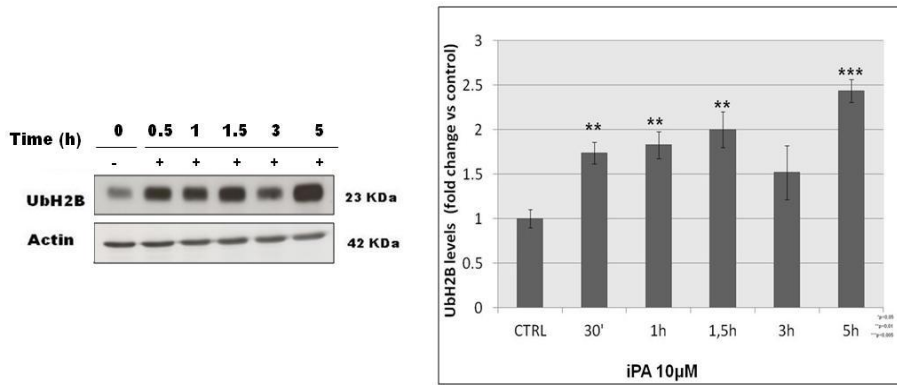
Cellule DLD1 ed HCT116 trattate con il solo veicolo o con iPA alla concentrazione di 10 $\mu$ M per tempi crescenti da 0,5 a 5 ore, mostrano aumento, seppur non costante, della quota di istone ubiquitinato. Gli *immunoblot* e le rispettive densitometrie relative agli effetti di iPA sulla modulazione del segnale di monoubiquitinazione della lisina 120 di H2B, per le linee cellulari DLD1 ed HCT116 sono mostrate in **figura 16** e **17**

**DLD1**



**Figura 16** Western blot eseguito in cellule DLD1 trattate per i tempi indicati con iPA 10 μM e rappresentazione in grafico della modulazione dell' ubiquitinazione di H2B (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005).

**HCT116**



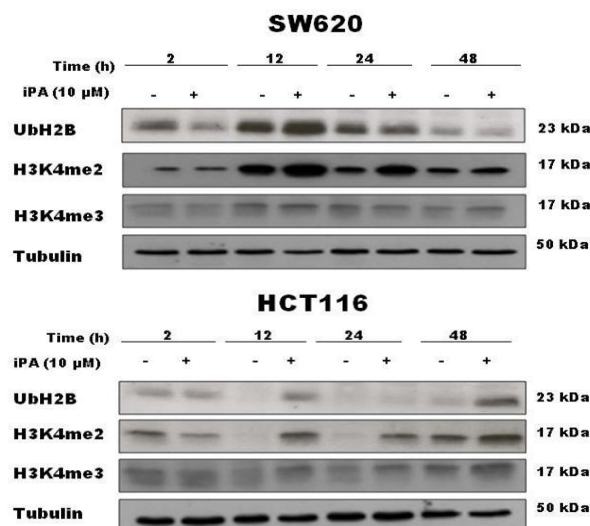
**Figura. 17** Western blot eseguito in cellule HCT116 trattate per i tempi indicati con iPA 10 μM e rappresentazione in grafico della modulazione dell' ubiquitinazione di H2B (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005).

### 2.10.2.1.3 Effetti dell' iPA sul crosstalk H2B-H3 in modelli di CRC

Diversi studi hanno dimostrato che la monoubiquitinazione di H2B é un prerequisito per la metilazione dei residui di lisina 4 (K4) e 79 (K79) presenti sull'istone H3 (Weake and Workman, 2008), condizione associata ad attivazione trascrizionale (Minsky et al. 2008)

Per valutare se l' aumento dei livelli di ubiquitinazione, osservato in seguito a trattamento con iPA, poteva influenzare lo stato di metilazione di istone H3, sono state condotte ulteriori analisi *western blot* a partire da lisati totali di cellule DLD1, SW620 ed HCT116 trattate con iPA 10 $\mu$ M, o con il solo veicolo, per tempi crescenti da 2 fino a 48 ore.

Indagando i livelli di di- e trimetilazione del residuo di lisina4, per le linee cellulari DLD1, SW620 ed HCT116, é emerso che iPA non solo modula i livelli di ubiquitinazione di H2B, ma similmente regola lo stato di metilazione di istone H3, come mostrato in **figura 18** in cui sono riportati gli *immunoblot* per le linee cellulari SW620 ed HCT116. Senza alterare i livelli di espressione totale delle proteine istoniche (dati non mostrati), iPA controlla efficacemente le modifiche post-traduzionali a carico delle proteine istoniche.

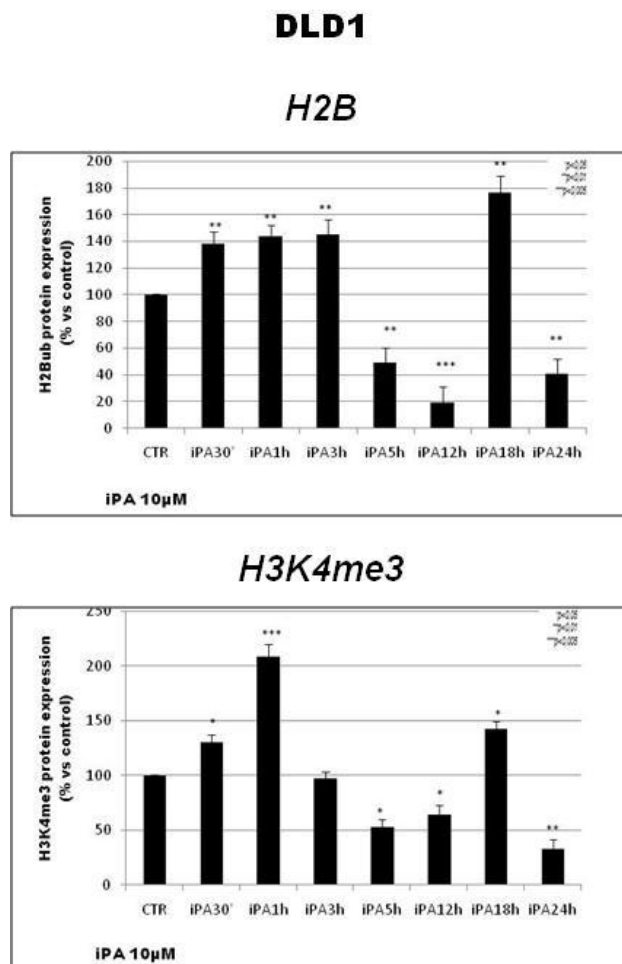


**Figura. 18** Analisi dei livelli di ubiquitinazione di H2B e di di- e trimetilazione di H3, valutati mediante *western blot* eseguiti in cellule SW620 ed HCT116 trattate per i tempi indicati con iPA 10 $\mu$ M.

Un risultato interessante é stato ottenuto analizzando i livelli di ubiquitinazione per la linea cellulare DLD1, trattata con iPA 10 $\mu$ M a partire da 30 minuti fino a 24 ore. La modulazione della quota di istone ubiquitinato appare in sintonia con l'attivazione del processo di trimetilazione della Lisina 4 dell'istone H3: i livelli delle due modifiche, infatti, aumentano sensibilmente per tempi brevi di trattamento, riducendosi drasticamente dopo 5 ore. Sebbene per 18 ore di trattamento si registra un aumento dello stato di ubiquitinazione di H2B e di trimetilazione di H3, i livelli dei *markers* di



attivazione trascrizionale risultano più bassi rispetto a quelli registrati nel controllo, raggiunte le 24 ore di incubazione con iPA (fig 19).



**Figura 19** Rappresentazione grafica dei livelli di ubiquitinazione di H2B e di trimetilazione della Lisina 4 di istone H3 in cellule DLD1 trattate per i tempi indicati con iPA 10µM, valutati mediante western blot (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ ).

## 2.10.2.2 BMP4: target molecolare di iPA

### 2.10.2.2.1 Analisi proteomica

Gli effetti modulatori di iPA sui livelli di ubiquitinazione di H2B e quindi sullo stato di metilazione di H3, in accordo con quanto pubblicato da Laezza *et al.* nel 2006 e da Colombo *et al.* nel 2009, suggeriscono un potenziale effetto regolatorio della molecola sui fenomeni trascrizionali. Al fine di identificare nuovi *target* proteici, modulati nell'espressione e coinvolti nel meccanismo d'azione dell'iPA, sono stati condotti ulteriori studi di proteomica in collaborazione con il Prof. Fabrizio dal Piaz dell'Università degli Studi di Salerno.

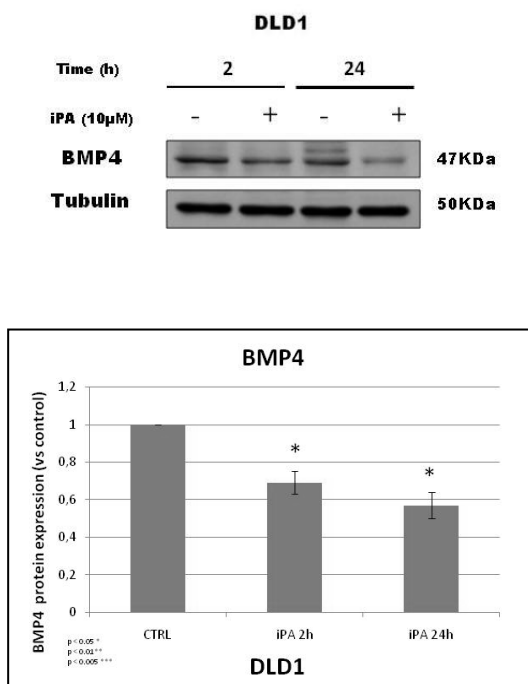
I risultati ottenuti a partire da lisati di cellule DLD1 trattate con iPA 10 $\mu$ M, o con il solo veicolo, sono schematizzati in **tabella 6**, in cui sono riportati i valori di *fold change* ottenuti dal rapporto tra le concentrazioni proteiche relative in cellule trattate vs valori stimati nei controlli.

**Tabella 6** Lista delle proteine identificate in lisati totali, ottenuti a partire da cellule DLD1, e modulate nell'espressione in seguito a trattamento di 2 ore con iPA 10 $\mu$ M.

Protein	Fold Change (IPA/CTRL)
Thymidylate synthase	2.68
26S protease regulatory subunit 10B	2.68
Cofilin-1	2.34
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 O	1.99
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	1.91
Poly(rC)-binding protein 1	1.85
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.75
Axin interactor, dorsalization-associated protein	1.74
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	1.64
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	-1.60
Bone morphogenetic protein 4	-2.24
Ankyrin repeat and SOCS box protein 2	-1.97
RNA-binding protein 4	-1.96
Follistatin-related protein 5	-1.95

2.10.2.2.2 Saggi in vitro

Tra i *taget* identificati, il più interessante é risultato la proteina *Bone morphogenetic Protein 4* (BMP4) (iPA/CTRL  $Fold\ change = -2.24$ ). Il membro della famiglia delle BMPs é infatti overespresso nell' adenocarcinoma del colon e coinvolto nei processi di transizione epitelio-mesenchimale e metastatizzazione (Deng et al. 2007; Kim et al. 2011; Chiu et al. 2012). Per valutare gli effetti di iPA sull' espressione di tale proteina, sono state condotte analisi *western blot* su lisati di cellule DLD1 trattate per 2 e 24 ore con l'adenosina modificata o con il solo veicolo. I risultati ottenuti confermano quanto suggerito dalle analisi proteomiche: iPA riduce i livelli di BMP4 per due ore di trattamento alla dose di 10µM. Dalle analisi emerge inoltre che tale effetto resta significativo per tempi lunghi di trattamento, con una riduzione dell'espressione di BMP4 di più del 40%, rispetto ai livelli del controllo, a 24 ore (**fig.20**).



**Figura. 20** Western blot eseguito in cellule DLD1 trattate per i tempi indicati con iPA 10µM e rappresentazione in grafico dei livelli di espressione di BMP4 (\* $p < 0.05$ )

### 2.10.3 Effetti dell' iPA in modelli cellulari di glioma

#### 2.10.3.1 Effetti dell' iPA sulla proliferazione di linee cellulari di glioma

Dimostrate le capacità antiproliferative dell' iPA in modelli di CRC, ne abbiamo valutato gli effetti in modelli di glioma.

Le linee cellulari di glioma U343, U251 e T98 sono state trattate con iPA alla dose di 10 $\mu$ M per 48 e 96 ore e gli effetti della molecola sono stati valutati mediante saggio di incorporazione della BrdU. I risultati hanno dimostrato che l' iPA, alla concentrazione di 10 $\mu$ M già a 48 ore, riduce dal 20%, nella linea T98, all'80%, nella linea U343, la proliferazione dei modelli tumorali analizzati. Per 96 ore di trattamento con l'analogo adenosinico, la percentuale di cellule di glioma in attiva proliferazione risulta essere tra il 40 ed il 50% dei livelli rilevati nel controllo (fig. 21).

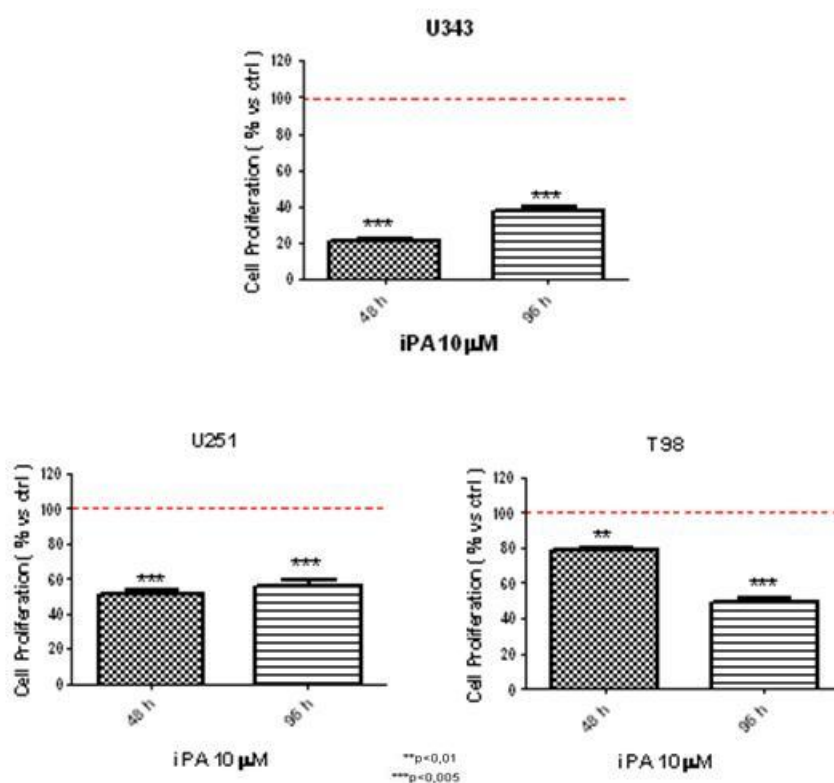
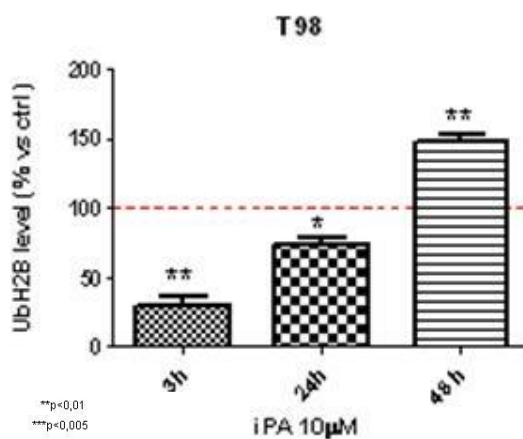


Figura 21 Proliferazione cellulare valutata dopo 48 e 96 ore di trattamento, mediante test di incorporazione della BrdU, in cellule U343, U251 e T98 trattate con iPA 10 $\mu$ M (\*\*p>0.01, \*\*\*p<0.005).

### 2.10.3.2 Analisi degli effetti molecolari dell' iPA in modelli cellulari di glioma

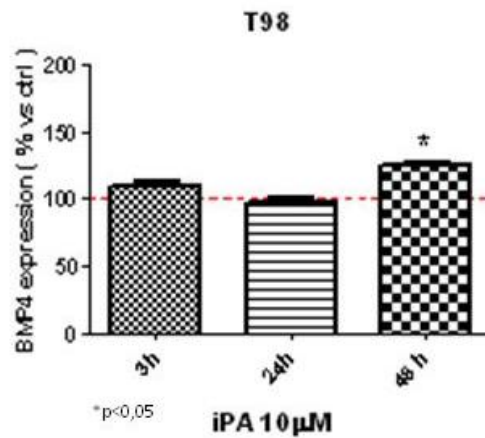
Dimostrata l'attività antiproliferativa dell'analogo adenosinico in modelli di glioma, abbiamo indagato i meccanismi molecolari di tale fenomeno. Poiché gli studi proteomici in modelli di CRC, confermati da saggi *in vitro*, avevano delineato un nuovo possibile meccanismo d'azione per iPA, nel quale è coinvolto l'istone H2B, ne abbiamo valutato lo stato di ubiquitinazione anche in questo modello tumorale.

A tal scopo sono state condotte analisi *western blot* a partire da lisati proteici totali di cellule T98 valutandone lo stato di ubiquitinazione di H2B in seguito a trattamento con iPA alla dose di 10 $\mu$ M per 3, 24 e 48 ore. I risultati ottenuti indicano che la molecola è efficace nel modulare la quota di istone H2B ubiquitinato già per tempi brevi di trattamento inducendone, dopo 48 ore, un sensibile aumento rispetto ai livelli di controllo (**fig. 22**).



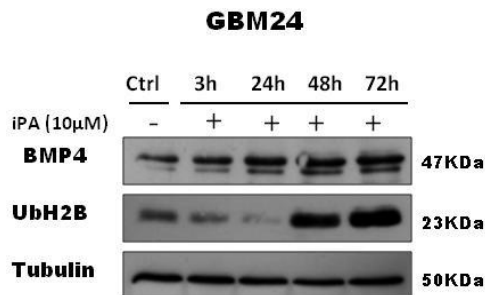
**Figura 22** Rappresentazione grafica dei livelli di ubiquitinazione di H2B in cellule T98 trattate per i tempi indicati con iPA 10 $\mu$ M, valutati mediante *western blot* (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

La modulazione del segnale di ubiquitinazione ci ha suggerito di indagare un altro *target* di iPA, la proteina BMP4. Diversi studi hanno infatti evidenziato che BMP4 nel glioma, contrariamente a quanto accade nel CRC, induce differenziamento delle cellule iniziatrici del tumore, provocando arresto della crescita e dell'invasione tumorale *in vivo* (Gonzalez-Gomez et al. 2014). Alla luce di tali evidenze, abbiamo valutato, mediante *immunoblot*, i livelli di espressione della proteina ed i risultati sono riportati in **figura 23**. Ancora una volta, sono stati esaminati i lisati totali di cellule trattate con iPA alla concentrazione di 10 $\mu$ M, o con il solo veicolo, per 3, 24 e 48 ore e sebbene la molecola non modifichi significativamente i livelli di espressione di BMP4 per tempi brevi di trattamento, ne è evidenziabile l'aumento dopo 48 ore.



**Figura 23** Rappresentazione grafica dei livelli di espressione di BMP4 in cellule T98 trattate ai tempi indicati con iPA 10µM valutati mediante Western Blot (\*p< 0.05)

Analizzati gli effetti nella linea cellulare T98, siamo passati ad un primo *screening* dell'attività di iPA in linee primarie di glioma. Piccoli pezzi di tessuto cerebrale umano contenenti il tumore sono stati processati, come riportato nella sezione Materiali e Metodi, per ottenere linee primarie classificate in base al grado della patologia, valutato secondo le linee guida del *World Health Organisation* al momento della diagnosi. Le due linee utilizzate in questo studio (GBM17 e GBM24) sono state ottenute da pazienti ai quali era stato diagnosticato un glioblastoma mutiforme di IV grado. Le colture sono state trattate con iPA alla dose di 10µM per tempi crescenti a partire da 3 fino a 72 ore ed i risultati degli *immunoblot* hanno suggerito, ancora una volta, la capacità della molecola di indurre modulazione dei livelli di ubiquitinazione di H2B ed aumento dei livelli di espressione di BMP4, a partire da tempi brevi di trattamento, rispetto al controllo (**fig. 24**).



**Figura 24** Valutazione dell' ubiquitinazione di H2B e dei livelli di espressione di BMP4, eseguita mediante western blot, in una linea primaria di GBM IV grado trattata ai tempi indicati con iPA 10µM.

## 2.11 Discussione

Numerosi dati sperimentali dimostrano l' effetto della N6-isopenteniladenosina sul controllo della proliferazione cellulare e della progressione neoplastica, sebbene i meccanismi molecolari di tale fenomeno siano solo parzialmente noti.

In questo capitolo, abbiamo valutato gli effetti dell' iPA in diverse linee cellulari di carcinoma del colon e di glioma di alto grado ed i risultati ne hanno dimostrato un significativo effetto antiproliferativo.

In una prima fase, le analisi sono state condotte in modelli di CRC, laddove iPA, a partire dalla concentrazione di 5 $\mu$ M, arresta la proliferazione di cellule HCT116 e, per concentrazioni uguali o maggiori di 10 $\mu$ M, si è mostrata efficace nell' inibire la crescita dei modelli cellulari DLD1 ed SW620, inducendone deregolazione del ciclo cellulare ed apoptosi già a partire da 24 ore di trattamento. Nell' ambito di uno studio condotto in collaborazione con il Prof. Fabrizio Dal Piaz, dell' Università degli Studi di Salerno, abbiamo dimostrato che l' iPA è in grado di legare selettivamente l' istone H2B e tale dato, ottenuto mediante studi proteomici, è stato poi corroborato valutando gli effetti della molecola sulle modifiche istoniche post-traduzionali in modelli tumorali. I risultati degli studi *in vitro* hanno infatti dimostrato che, in modelli di CRC, l' iPA è in grado di modulare la quota di H2B ubiquitinato a partire da 30-60 minuti di trattamento, ma che i processi molecolari attivati dall' analogo adenosinico, possono essere differenti a seconda del tipo cellulare esaminato.

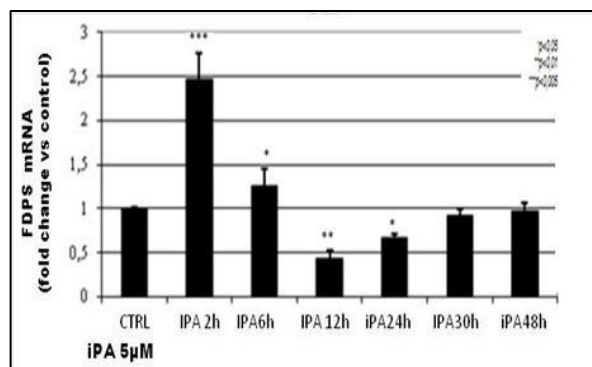
È stato proposto che l' iPA possa svolgere un' attività simile a quella propria degli inibitori della farnesil-transferasi e della lovastatina e che agisca, inoltre, modulando l' espressione dell' enzima FPPS (Laezza et al. 2006; Laezza et al. 2009). In studi successivi, condotti dal gruppo del Prof. Bifulco, è stato confermato che 24 ore di trattamento con iPA riducono significativamente i livelli di FPPS, la cui espressione tende a ritornare ad essere stabile dopo 48 ore in diverse linee cellulari di CRC. Tuttavia tempi brevi di trattamento innescano un fugace ma significativo incremento dell' espressione dell' enzima, peraltro confermato per tutti i tempi analizzati nella linea cellulare di CRC, HT29, di per sé insensibile all' effetto antiproliferativo dell' iPA. Inoltre, analoghi di sintesi del composto, indipendentemente dall' effetto di regolazione della proliferazione di CRC, aumentano significativamente l' espressione dell' mRNA e della proteina FPPS fino a 24 ore di trattamento (dati non mostrati).

Tali evidenze sperimentali ci portano ad ipotizzare che gli effetti dell' iPA non siano esclusivamente mediati dalla modulazione dell' attività di FPPS, ma piuttosto dalla capacità di tale composto di svolgere regolazione trascrizionale, probabilmente mediante modificazioni epigenetiche a livello di specifici geni *target*.

In tale ipotesi H2B potrebbe essere un intermediario importante. La monoubiquitinazione di H2B, a livello della lisina 120, è comunemente riconosciuta come *marker* di regolazione trascrizionale ed è stato dimostrato che tale modifica post-traduzionale è connessa all' aumento dei livelli di metilazione dei residui di lisina di istone H3 (Weake VM & Workman 2008). L' esistenza di un *crossstalk* trans-istonico, necessario a regolare lo stato di condensazione della cromatina, è infatti confermato dagli alti livelli di ubiquitinazione di H2B evidenziabili in prossimità di geni altamente espressi (Minsky et al. 2008): nel caso specifico, l' ubiquitinazione di H2B controlla lo stato di di- e trimetilazione di lisina 4 e 79, condizione associata ad attivazione trascrizionale.

I nostri studi dimostrano che, in seguito trattamento con iPA, l' istone H2B viene ubiquitinato e che tale modifica, parallelamente alla modulazione dei livelli di di e tri-

metilazione della lisina 4 di istone H3, sembra essere un meccanismo costantemente presente nelle diverse linee cellulari di CRC esaminate. Appare inoltre interessante la perfetta sincronia dell' ubiquitinazione di H2B, evidenziata nelle cellule DLD1 trattate in *time course* con iPA, con la modulazione dei livelli di trimetilazione del residuo di lisina 4 dell'istone H3 ed i livelli di espressione di FPPS, sia come RNA messaggero (fig.25 cfr fig19) che come proteina.



**Figura 25.** Rappresentazione grafica dei livelli di mRNA di FPPS in cellule DLD1 trattate per i tempi indicati con iPA 10μM (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ ).

Sebbene ad oggi non sia ancora chiaro mediante quale meccanismo iPA regoli l'espressione di FPPS, è possibile ipotizzare il coinvolgimento dell'istone H2B, nei fenomeni di regolazione dell'espressione di questo e degli altri *target* identificati dalle analisi proteomiche e potenzialmente implicati nell' inibizione della proliferazione cellulare esercitata dalla molecola. Nel corso di questo studio è emerso che iPA modula efficacemente l' espressione di molteplici proteine aventi un ruolo chiave nella progressione e metastatizzazione tumorale. Dato interessante è risultata la capacità della molecola di modulare i livelli di espressione della *bone morphogenetic protein 4* (BMP4) già a partire da 2 ore di trattamento. È noto che le BMPs sono intimamente coinvolte sia nei meccanismi di inibizione che di promozione della crescita tumorale e che, nello specifico, alti livelli di BMP4 sono evidenziabili in fasi precoci ed avanzate del CRC (Deng et al. 2007; Kim et al. 2011; Chiu et al. 2012).

Gli studi *in vitro* hanno confermato che la riduzione dell'espressione di BMP4, evidenziabile in cellule DLD1, già per tempi precoci di trattamento, rimane significativa fino a 24 ore ed ulteriori analisi sulla via di trasduzione del segnale del ligando proteico permetteranno di chiarire l'esatto significato biologico di tale interessante fenomeno. BMP4, infatti, inizialmente sintetizzato come proteina inattiva, in seguito a clivaggio proteolitico ad opera delle *subtilisin-like proprotein convertase*, viene rilasciata nell' ambiente extracellulare, attivando il recettore per le BMPs e stimolando la proliferazione del carcinoma (Constam & Robertson 1999); in tal modo controlla l' attività dell' enzima *LimK1*, che può inattivare, per fosforilazione, un altro *target* di iPA suggerito dall' analisi proteomica, *cofilin*, una *actin-binding protein*. Dati preliminari, che necessitano di ulteriori approfondimenti, suggeriscono che la quota di



proteina, clivata ed escreta nell' ambiente extracellulare, si riduca sensibilmente in seguito a trattamento di cellule DLD1 con iPA alla concentrazione di 10 $\mu$ M. Ciò provoca una marcata riduzione, per tempi lunghi di trattamento (24 ore), dei livelli di fosforilazione di *cofilin*. L'analisi degli effetti dell' iPA su *cofilin*, proteina chiave nei processi di organizzazione del citoscheletro e nei fenomeni di transizione epitelio-mesenchimale (Bravo-Cordero et al. 2013) é, al momento, uno degli obiettivi delle nostre ricerche.

I promettenti risultati ottenuti in modelli di CRC ci hanno indotto ad analizzare gli effetti di iPA in un altro modello tumorale, il glioma, una patologia cerebrale di difficile eradicazione a causa della preponderante componente staminale (Altaner et al. 2008). Anche in questo caso, iPA, alla concentrazione di 10 $\mu$ M, si é mostrata efficace nell' inibire la proliferazione delle linee tumorali U343, U251 e T98, con effetti significativi a partire da 48 ore di trattamento ed una riduzione della quota di cellule in attiva proliferazione, dopo 96 ore, di circa il 50%. La valutazione degli effetti della molecola sulle modifiche istoniche, anche nel glioma, ha dimostrato la capacità dell' iPA di interferire con i fenomeni di rimodellamento della cromatina, come si evince dalla modulazione dei livelli di ubiquitinazione di H2B in seguito al trattamento. Sorprendentemente, però, iPA in tale modello, induce l'espressione di BMP4, laddove in linee cellulari di CRC ne riduce i livelli. Esperimenti condotti in linee primarie di glioblastoma umano hanno fornito risultati analoghi, facendo registrare aumento della quota della proteina in cellule trattate con iPA, rispetto al controllo.

La proteina BMP4, nelle forme più aggressive di glioma, ha un effetto perfettamente speculare rispetto a quanto riportato per il CRC: recentemente ne é stato dimostrato il ruolo chiave nell' inibizione della proliferazione tumorale, evidenziandone inoltre la capacità di revertire i meccanismi di *Multi Drug Resistance (MDR)* (Liu et al. 2013); studi *in vitro* ed *in vivo* ne hanno riportato la capacità di ridurre l' infiltrazione tumorale in seguito del trattamento con Bevacizumab, anticorpo monoclonale efficace nell' arrestare l' evoluzione del glioma, ma, per trattamenti prolungati, causa di insorgenza di fenomeni di resistenza farmacologica e metastatizzazione (Rahman et al. 2013; Chinot et al. 2014, Gilbert et al. 2014). L'aspetto più interessante della comprovata attività antiglioma di BMP4, resta però, la sua capacità di promuovere la differenziazione della componente staminale tumorale. Tale proteina, infatti, inibisce la proliferazione delle cellule iniziatrici del glioma, downregolandone i livelli di ciclina D1 e promuovendone l'apoptosi mediante l' induzione dell' espressione di Bax e la riduzione dei livelli di Bcl-2 e Bcl-xL (Zhou et al. 2011).

Nonostante la mancanza di una sostanziosa casistica e la natura preliminare dello studio, é possibile ipotizzare che la modulazione dei livelli di BMP4 sia uno dei meccanismi con cui l' iPA inibisce la proliferazione cellulare e che il duplice effetto della molecola sui livelli di espressione di tale proteina, nei modelli tumorali presi in esame, possa essere spiegato alla luce del complesso meccanismo di controllo trascrizionale delle BMPs, oggetto, tra l'altro, di studi in diverse condizioni patologiche. Gli esempi forniti dagli effetti inibitori di TNF- $\alpha$  sulla trascrizione di BMP4 nella degenerazione maculare (Xu et al. 2011) e quelli stimolatori mediati dal fattore Ets-1 in modelli cellulari di epatocarcinoma (Maegdefrau et al., 2009), oltre alla presenza di numerose regioni cis-regolatorie capaci di controllare l'espressione del gene in modo tempo e tessuto dipendente (Chandler et al. 2009), fanno infatti supporre che gli effetti dell' iPA, ancora una volta, siano il risultato di un fine processo

di regolazione dell' espressione o dell' attività di uno o più fattori implicati nel controllo della trascrizione del gene BMP4.

Diversi autori sostengono gli effetti benefici del trattamento con BMP4 nel glioma, ma la presenza della BEE ne rende impossibile un utilizzo in terapia. Duggal *et al.* nel 2013 hanno sviluppato un vaccino virale oncolitico per overesprimere la proteina che, per iniezioni intracraniche, risultava efficace nell'indurre una significativa regressione della massa tumorale in modelli xenograft di glioblastoma; il gruppo di Garcia-Fuentes ha disegnato microparticelle in matrice di poliestere biodegradabile capaci di rilasciare BMPs, in modo controllato; nonostante i promettenti risultati degli studi preliminari resta però ancora complessa, ed altamente invasiva, la possibile applicazione clinica di questo peptide, tra l'altro, privo di citotossicità in tessuti sani (Reguera-Nunez et al. 2014). Una valida alternativa alla somministrazione esogena potrebbe essere l'aumento dell' espressione di BMP4 nelle cellule tumorali e i dati raccolti suggeriscono che l' iPA é efficace nel modularne i livelli. La più completa caratterizzazione del *pathway* molecolare di BMP4 e studi *in vivo*, in modelli stereotassici di glioma, saranno i prossimi obiettivi nell' analisi degli effetti di questa piccola molecola dai molteplici meccanismi d' azione e dalle enormi ed ancora inesplorate potenzialità.

### **III. SR141716**

### 3.1 Il sistema endocannabinoide: generalità



Figura 26 Endocannabinoidi: Anandamide e 2-arachidonylglycerol.

Sin dai tempi antichi é riportato un uso medico e religioso della *Cannabis Sativa*, di cui erano note le attività anestetiche, broncodilatatorie, anti-ipertensive ed emetiche (Attila Kofavi 2010), sebbene non si conoscesse il meccanismo molecolare dei principi attivi. I primi studi scientifici furono effettuati nel 1964, quando Gaoni e Mechoulam, per primi, isolarono e descrissero la struttura chimica del terpenoide  $\Delta^9$ -THC (Gaoni et al. 1964), il principale componente psicoattivo della marijuana. Come dimostrato dai successivi test su modelli animali e sull'uomo, tale molecola induceva disturbi motori, catalessi, euforia, disforia, ansia, alterate percezioni audiovisive, attacchi di panico e disturbi della memoria (Howlett et al. 2004). In un primo momento si pensò che tali effetti fossero dovuti a meccanismi aspecifici, risultato dell'interazione tra la molecola lipofila,  $\Delta^9$ -THC, e le membrane cellulari, di cui ne causava variazioni di struttura e fluidità (Attila Kofavi 2010). Tale visione fu superata nel 1990 con il lavoro di Matsuda che clonò, per la prima volta, il recettore per i cannabinoidi di tipo 1 (CB1), la cui attivazione provocava gli effetti biologici del  $\Delta^9$ -THC (Matsuda et al. 1990). Tre anni dopo fu identificato un altro recettore per i cannabinoidi che mostrava il 48% di omologia con CB1, il recettore CB2 (Munro et al, 1993). La presenza di specifici recettori per i cannabinoidi suggeriva l' esistenza di ligandi endogeni: nel 1992 Devane *et al.*, mediante analisi di spettrometria di massa, descrissero la struttura chimica della molecola lipidica *N-arachidonyl ethanolamine*, altrimenti nota con il nome di anandamide (AEA), il primo endocannabinoide isolato dal cervello; nel 1995 fu identificato il *2-arachidonyl glycerol* (2AG), un altro ligando endogeno per i recettori CB isolato in tessuto intestinale (Mechoulam et al. 1995). I cannabinoidi di origine endogena, definiti endocannabinoidi (ECs), sono acidi grassi polinsaturi derivati dall'acido arachidonico e, a causa della natura lipidica, non possono essere stoccati nella cellula, ma prodotti *on demand*. Ad oggi sono stati identificati cinque ECs, ma solo AEA e 2AG (**Fig.26**). sono presenti in quantità apprezzabili nell' organismo in condizioni fisiologiche oltre ad essere caratterizzati da una buona affinità per CB1. In **figura 27** viene presentata una *time-line* che presenta in breve le tappe fondamentali di questa scoperta.

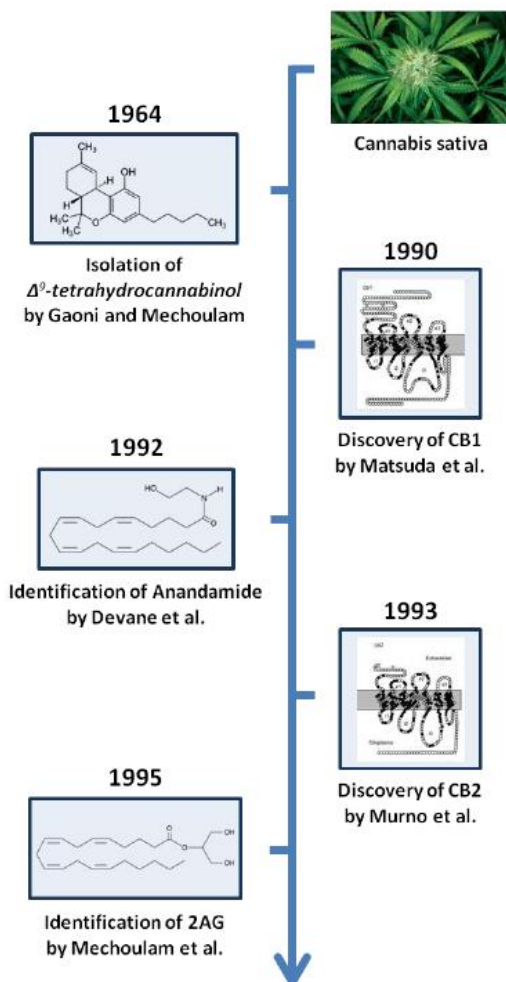
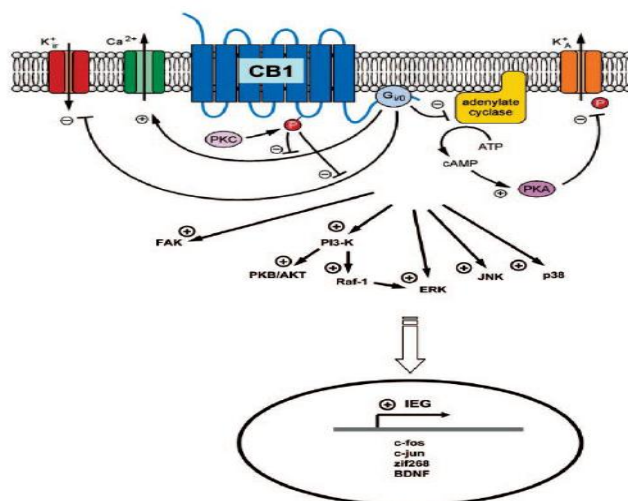


Figura 27 Sistema endocannabinoide: Time-line con le principali scoperte.

### 3.2 I recettori dei cannabinoidi

I recettori CB1 e CB2 sono recettori tipicamente associati a proteina  $G_{i/o}$  inibitoria. Essi sono costituiti da sette domini transmembrana connessi da tre *loops* extracellulari, tre intracellulari e due code idrofobiche: una coda extracellulare N-terminale (più corta nel tipo 2) ed una intracellulare che interagisce con la proteina G (Pacher et al. 2006). L'attivazione recettoriale provoca il reclutamento della proteina  $G_{i/o}$  e l'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclastasi con conseguente riduzione dei livelli citosolici del secondo messaggero *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP). Nel sistema nervoso centrale l'attivazione di tali recettori provoca: inibizione della

conduttanza ionica di membrana, mediante l'apertura dei canali per il potassio  $K^+$  e l'inibizione dei canali del  $Ca^{2+}$  di tipo N e P/Q; oltre che stimolazione di chinasi intracellulari come la *focal adhesion kinase* (FAK), PI3K, ERK e p38. L'attivazione delle chinasi media inoltre l'espressione di *immediate early genes* (IEG), come i fattori di trascrizione c-fos, c-jun, zif268 ed il *brain derived neurotrophic factor* (Pagotto et al. 2006). Tali *pathway* sono schematizzati in **figura 28**.



**Figura 28** Pathway intracellulari di CB1 (adattata da Pagotto et al. 2006).

La distribuzione dei recettori dei cannabinoidi è stata studiata mediante differenti approcci quali autoradiografia di sezioni di cervello (Herkenham et al. 1990), *in situ hybridization* (Marsicano et al. 1999) oltre che tecniche di immunocistochemica (Tsou et al. 1998) e, secondo tali studi, il recettore CB1 rappresenta il recettore associato a proteina G (GPCR) più abbondante nel cervello di mammiferi: altamente espresso in ippocampo, neocortex, amigdala, in alcune aree dei gangli della base, nei nuclei talamici ed ipotalamici oltre che nel bulbo olfattivo (Pagotto et al. 2006). Inoltre nel 2012 Benard *et al.* ne hanno identificato la presenza a livello mitocondriale in neuroni murini, evidenziandone il diretto coinvolgimento nei fenomeni di respirazione cellulare e produzione di energia (Benard et al. 2012).

Originariamente CB1 è stato definito "*brain type receptor*" a causa degli alti livelli di espressione nel SNC, ma successivi studi ne hanno confermato la presenza in diversi organi periferici come la tiroide, le ghiandole surrenali ed i testicoli. Interessante è anche l'espressione di CB1 in tessuti coinvolti nel metabolismo energetico: più di dieci anni fa ne è stata ritrovata la presenza in adipociti umani (Cota et al. 2003) e successivamente in fegato (Osei-Hylman et al. 2005), pancreas (Juan Pico et al. 2006) e muscolo scheletrico (Pagotto et al. 2006). CB1 è espresso anche in vari distretti, oltre che nelle terminazioni nervose vagali, del sistema gastro-enterico con effetti modulatori sul *food intake*, svuotamento gastrico e secrezione intestinale (Gomez et al. 2002; Izzo et al. 2008).

I recettori CB2 sono espressi in tonsille, timo, milza, pancreas, nelle terminazioni nervose periferiche ed in vari tipi di cellule del sistema immunitario. Sebbene questi recettori non sembrano essere presenti nella maggior parte dei neuroni del SNC, sono però espressi nelle cellule microgliali, in particolare durante la neuro-infiammazione, attivati dal 2-AG e, con minore efficacia dall'AEA (Howlett et al. 2002).

### 3.3 Il sistema endocannabinoide: tra fisiologia e patologia

I recettori per i cannabinoidi, gli agonisti endogeni ed i complessi enzimatici deputati alla sintesi e degradazione di tali molecole, costituiscono il sistema endocannabinoide. In questi ultimi 20 anni, la valutazione dei livelli dei derivati lipidici e dei recettori coinvolti in tale sistema, in tessuti e liquidi biologici, ha permesso di comprenderne il ruolo ed, in parte, le funzioni regolatorie in condizioni fisiopatologiche (Di Marzo et al. 2004). In particolare, una deregolata attività del sistema endocannabinoide è implicata in disordini quali ansia (Hill&Gorzalka 2005; Garcia-Gutierrez & Manzanare 2010), psicosi (Leweke et al. 2012), fenomeni di neuroprotezione (Sinor et al. 2000), in patologie neurodegenerative quali la sclerosi multipla (Baker et al. 2001), nella malattia di Parkinson (Di Marzo et al. 2000), Alzheimer (Pazos et al. 2004; Karl et al. 2012), Huntington (Van et al. 2010), oltre che in patologie cardiovascolari (Montecucco & Di Marzo 2012), aterosclerosi (Mach et al. 2008) ed attacchi cardiaci (Wagner et al. 2003). In tutte le patologie citate, infatti, l'aumento del tono degli endocannabinoidi potrebbe causare una riduzione nella severità dei sintomi e rallentare l'evoluzione.

Il sistema endocannabinoide, come anticipato, gioca inoltre un ruolo cruciale nel metabolismo energetico, regolando l'apporto calorico (Christopoulou & Kiortsis 2011) e l'omeostasi del glucosio. In tal caso però l'attivazione, nello specifico del recettore CB1 periferico, promuove il senso di fame, il *food intake* e quindi patologie associate all'obesità quali diabete di tipo 2, ipertensione e dislipidemia (Engeli 2008; Okamoto et al. 2006). Un'ulteriore funzione di questo intricato sistema concerne la capacità di regolare le funzioni riproduttive (Taylor et al. 2007) ed il metabolismo osseo (Idris et al. 2012).

#### 3.3.1 Sistema endocannabinoide e cancro

Il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nelle attività regolatorie di proteine e fattori nucleari coinvolti nella differenziazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare, ha indotto diversi gruppi di ricerca ad analizzarne le potenziali alterazioni nel cancro. Alti livelli di AEA e 2-AG sono infatti riportati in diversi tumori, se confrontati con i tessuti sani (Schmid et al. 2002), come nel caso di adenomi pituitari (Pagotto et al. 2001), carcinoma della prostata, (Nithipatikom et al. 2004) sarcoma endometriale (Schmid et al. 2002), glioblastoma e meningioma (Petersen et al. 2005). Nel caso di tumori cerebrali quali glioblastomi, infatti, sono stati evidenziati alti livelli di AEA e ridotta attività dell'enzima FAAH, idrolasi deputata alla degradazione del lipide

endogeno; nel meningioma, invece, un significativo aumento dei livelli di 2-AG rispetto ai tessuti sani (Petersen et al. 2005).

**Tabella 7.** Livelli di endocannabinoidi e recettori CB in modelli tumorali vs cellule normali (Malfitano et al. 2011).

Levels of CB receptors	Tumor type	Levels of endocannabinoids
↑ CB1 and CB2 receptors	Mantle cell lymphoma	↑ AEA
	Acute myeloid leukemia	↑ AEA
	Well-differentiated hepatocellular carcinoma	↑ AEA
	Prostate carcinoma	↑ 2-AG; ↓ AEA
	Malignant astrocytoma	↑ AEA
	Pancreatic carcinoma	= AEA and 2-AG
↓ CB1 and CB2 receptors	Poorly differentiated hepatocellular carcinoma	↑ AEA
	Kaposi's sarcoma	
CB1 and CB2 receptors similar to control levels	Non-melanoma skin cancer	
	Astroglial carcinoma	↑ AEA
	Pituitary adenoma	↑ AEA and 2-AG
↑ CB2 receptors	Glioblastoma	↑ AEA
	Meningioma	↑ 2-AG
	Estrogen receptor-negative primary breast carcinoma	↑ AEA
	Endometrial carcinoma	↑ 2-AG
	Colon carcinoma	↑ AEA and 2-AG
↑ CB1 receptors	Rhabdomyosarcoma	
	Gastrocarcinoma	↓ AEA
↓ CB1 receptors	Primary breast carcinoma	↑ AEA
↑ TRPV1 receptors	Prostate carcinoma	↑ 2-AG; ↓ AEA
	Squamous cell carcinoma of the human tongue	

2-AG: 2-Arachidonoylglycerol; AEA: Anandamide; CB: Cannabinoid.

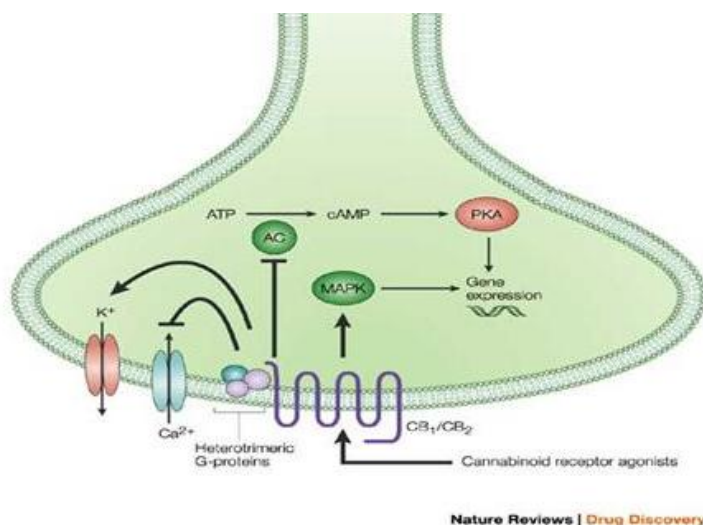
Diverse evidenze suggeriscono che anche l'espressione dei recettori per i cannabinoidi sia alterata nei processi di carcinogenesi (Malfitano et al. 2011) e che questi, insieme ad altri *markers* prognostici riconosciuti (Caffarel et al. 2006), correlino con il grado di malignità del tumore (Marincsak et al. 2009). Alterati livelli di endocannabinoidi e di recettori CB, in vari tipi di cancro, sono riassunti nella **Tabella 7**.

### 3.3.2. Il ruolo di CB1 nei tumori cerebrali: da astrociti ad astrocitomi

Nel cervello i recettori CB1 sono presenti a livello di terminazioni pre-sinaptiche, principalmente in interneuroni GABAergici, ma, in minore quantità, anche in popolazioni neuronali glutammatergiche, serotoninergiche e colinergiche (Marsicano & Kuner 2006). Sebbene sia stato a lungo dibattuto, studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato non solo che anche gli astrociti esprimono CB1, ma anche il suo coinvolgimento nelle basilari funzioni cerebrali (Navarrete and Araque 2008/2010; Han et al. 2012; Bosier et al. 2013). Negli astrociti, la produzione di ECs é mediata da



*pathway*  $\text{Ca}^{2+}$  ed ATP dipendenti (Stella 2010) e l'attivazione di CB1 è principalmente paracrina (Piomelli et al. 2003), sebbene sia stato descritto anche un meccanismo autocrino (Bacci et al. 2004). L'aspetto più interessante del CB1 presente negli astrociti è dato dai meccanismi intracellulari di trasduzione del segnale. Classicamente CB1 è associato a proteina  $G_{i/o}$  e l'attivazione, ad esempio a livello neuronale, induce inibizione della funzione dell'adenilato ciclasi con conseguente riduzione dei livelli di produzione di cAMP ed inibizione della fosfochinasi A (PKA), dei canali per il  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio dipendenti (VGCC) e la stimolazione dei canali del  $\text{K}^+$  (Howlett et al. 2010). Tali effetti inducono iperpolarizzazione delle terminazioni pre-sinaptiche e conseguente riduzione del rilascio dei neurotrasmettitori (Kano et al 2009; Castillo et al. 2012) (**fig.29**).



**Figura 29** Pathway intracellulari di CB1 in neuroni pre-sinaptici (Di Marzo et al. 2004).

Negli astrociti, però, la stimolazione di CB1 induce effetti che appaiono mediati da proteine  $G_q$  con conseguente aumento dei livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare (Navarrete et Araque 2008; Perea et al. 2014). Studi funzionali *in vivo* ed *in vitro* hanno dimostrato che l'attivazione del recettore CB1 astrocitario provoca aumento dei livelli di ossidazione del glucosio e di chetogenesi, due meccanismi coinvolti nei processi di bilanciamento energetico del cervello, e riduce la capacità degli astrociti di produrre mediatori infiammatori quali NO, indotta da liposaccaridi ed IL 1 $\beta$  (Blazquez et al. 1999; Molina-Holgado et al. 2002; Sanchez et al 1998; Sheng et al. 2005), regolando inoltre la trasmissione sinaptica ed i fenomeni di plasticità neuronale (Oliveira da Cruz et al. 2015)

Nel 1990, i ricercatori della compagnia farmaceutica Sanofi-Aventis hanno dimostrato la presenza di CB1 in diverse linee cellulari e campioni tissutali di glioma umano e che la stimolazione farmacologica di tale recettore induceva attivazione di ERK e del fattore di trascrizione krox-24 (Bouaboula et al. 1995; Bouaboula et al. 1996). Successivamente, il gruppo di Manuel Guzman ha pubblicato una serie di studi per testare l'ipotesi secondo cui i cannabinoidi potessero essere utilizzati come agenti

antitumorali nel trattamento dell' astrocitoma. Un sub-clone della linea di glioma di ratto C6, C6.9, risultava infatti sensibile alla somministrazione di THC e gli studi *in vivo* misero ben presto in evidenza la straordinaria capacità della molecola di inibirne la proliferazione cellulare. In modelli stereotassici di glioma, somministrazioni di THC rallentavano la progressione tumorale, aumentando la sopravvivenza degli animali (Galve-Roperh et al. 2000) Nel 25% degli animali trattati con cannabinoidi, il glioma appariva completamente eradicato ed i cannabinoidi non inducevano danni ai tessuti sani circostanti. Per spiegare l' attività antitumorale esercitata dalla stimolazione di CB1 sono stati proposti diversi meccanismi d'azione: il coinvolgimento della proteina p8, un regolatore stress-mediato della sopravvivenza cellulare; di Bad appartenente alla famiglia di Bcl-2 (Ellert-Miklaszewska et al. 2005); l' induzione del processo autofagico (Carracedo et al. 2006; Salazar et al. 2009) e, l' ipotesi più accreditata, la modulazione del *pathway* della ceramide, precursore di tutti gli sfingolipidi e regolatore del destino cellulare in condizioni fisiopatologiche. In seguito a stimolazione con THC, infatti, CB1 induce apoptosi mediante la generazione del lipide pro-apoptotico ceramide e l' attivazione delle cascate di Raf1/MEK/ERK (Galve-Roperh et al. 2000).

Il lavoro di Rammer *et al.* (2003) ha poi dimostrato che i cannabinoidi inducono l' espressione della ciclossigenasi 2 (COX-2), in neurogliomi umani, attraverso un meccanismo indipendente dall' attivazione del recettore per i cannabinoidi, ma probabilmente connesso ai microdomini dei *lipid draft* di membrana (Hinz et al. 2004). Poiché la COX-2 può inibire l'apoptosi (Tsuji & Dubois 1995; Corasanti et al. 2000; Na & Surh 2002), gli effetti registrati nel glioma umano, potrebbero, in effetti, non essere totalmente ascrivibili alla stimolazione di CB1. Secondo alcuni Autori, il recettore per i cannabinoidi potrebbe avere un ruolo ambivalente ed in alcune condizioni "protettivo" nei confronti dell'apoptosi, come riportato per le linee di glioblastoma umano e le cellule C6, dove AEA induce morte cellulare mediante stimolazione dei recettori vanilloidi, provocando aumento del calcio intracellulare ed attivando le COX (Maccarrone et al. 2000). Il meccanismo attraverso cui AEA induce la proliferazione in cellule che esprimono sia il recettore per i cannabinoidi che quello per i vanilloidi resta, però, ancora poco chiaro. Jacobson *et al.* (2001) hanno mostrato, infine, che, in linee cellulari di glioma murino, gli effetti antiproliferativi dell' anandamide sono associati all'attivazione sia di recettori per i cannabinoidi che per i vanilloidi, rendendo complessa l'interpretazione molecolare degli effetti biologici osservati.

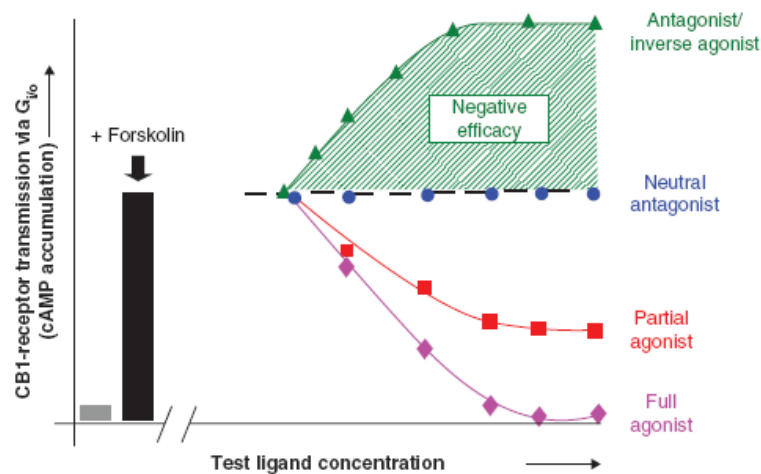
### 3.4 Agonisti ed antagonisti sintetici dei recettori CB

Il coinvolgimento dei recettori per i cannabinoidi in molteplici condizioni patologiche, come il cancro, ha reso tale sistema un interessante *target* farmacologico. Per studiarne le caratteristiche funzionali, prima, e per trovare nuove soluzioni per patologie fortemente invalidanti, poi, sono stati disegnati diversi agonisti ed antagonisti sia per CB1 per CB2. È possibile suddividere gli agonisti in quattro gruppi, per ognuno dei quali sono riportate le molecole più rappresentative:

1. *cannabinoidi classici* ((+)-HU-210)
2. *cannabinoidi non classici* (CP55940)
3. *cannabinoidi Aminoalckylindole* (R-(+)-WIN5521-2)
4. *analoghi dell'AEA* (R-(+)methanandamide, ACPA, O-1812).

Gli agonisti appartenenti alle prime due classi hanno una buona affinità sia per il CB1 che per il CB2, mentre il WIN5521-2 ed i derivati dell'anandamide mostrano maggiore affinità per il recettore del tipo 1. Tra gli antagonisti sintetici ricordiamo AM251 e AM281, selettivi per CB1, ma soprattutto le molecole SR141716 e SR144528 che esercitano la loro azione rispettivamente sui recettori CB1 e CB2 (Piomelli et al. 2000; Porter & Felder 2001).

Tradizionalmente è possibile classificare i ligandi dei recettori in due classi: agonisti ed antagonisti. Gli agonisti attivano il recettore, mentre gli antagonisti "neutri" bloccano tale processo, senza esercitare una risposta biologica. È noto che molte GPCRs sono caratterizzate da attività costitutiva o tonica indipendente dall'azione degli agonisti (Greasley et al. 2006; Bond et al. 2006; Canals et al. 2008; Leterrier et al. 2006) e, in tale sistema, ligandi originariamente classificati come antagonisti neutri hanno dimostrato effetti "negativi" sull'attività basale del *G-protein signaling*, evidenziando proprietà di agonisti inversi.



**Figura 30** Rappresentazione degli effetti di agonisti/agonisti inversi/antagonisti di CB1 sui livelli di cAMP, (Janero & Makriyannis 2009)

Questi, secondo quanto emerge dai più moderni studi, destabilizzano la conformazione recettoriale che preferenzialmente resta accoppiata alla proteina G sia in presenza che in assenza di agonisti endogeni. SR141716, caratterizzato da una selettività per CB1 cento volte più alta rispetto a quella dimostrata per CB2, rappresenta il classico esempio di un antagonista/agonista inverso, con la capacità di modulare il *pathway* intracellulare del sistema endocannabinoide, inducendo una risposta biologica opposta a quella dei normali agonisti. In **figura 30** sono rappresentati schematicamente gli effetti molecolari delle varie categorie di ligandi CB1.

### 3.5 SR141716, Il primo antagonista sintetico per CB1

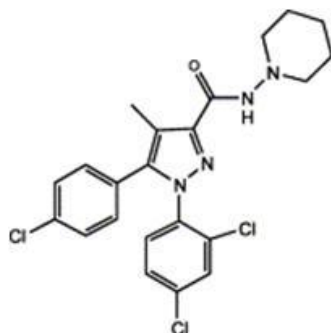


Figura 31 Struttura di SR141716 (Bifulco et al. 2007)

SR141716 (**fig.31**) è stato il primo antagonista selettivo di CB1. Studi di *binding* hanno dimostrato che tale molecola è un potente ( $pK_i = 8.4$ ) e selettivo ligando per CB1 caratterizzato, inoltre, da alta affinità di legame per il recettore ( $K_i=5.6$  nM) (Rinaldi-Carmona et al. 1994; Compton et al. 1996; Shire et al. 1996). Studi funzionali ne hanno confermato l'attività di potente e selettivo antagonista ( $pA_2$  7.98-8.85) dimostrandone la capacità di spiazzare CP55.940, agonista di CB1, dal sito recettoriale ( $K_i=1.98$ nM). La potenza di SR141716, come antagonista, è stata mostrata confrontandone la capacità di attenuare l'inibizione delle contrazioni, evocate elettricamente, in *ductus deferens* murini isolati, con gli agonisti CB1/2 WIN56,098, bromopavodiline e iodopavolidine, oltre che, *in vivo*, laddove si è mostrato efficace nel sopprimere ipotermia ed effetti psicomotori in topi e ratti pretrattati con WIN55212-2, agonista CB1 (Perio et al. 1996). Gli studi su SR141716 radiomarcato hanno confermato i valori di affinità e specificità di interazione della molecola con il recettore dei cannabinoidi di tipo1, evidenziandone inoltre interazioni competitive con CP55,940, WIN55212-2,  $\Delta^9$ -THC, ma non competitive con AEA, poiché quest'ultimo ne diminuisce sia la costante di affinità che la massima quota di molecola che si lega specificamente al recettore ( $B_{max}$ ) (Rinaldi-Carmona et al. 1994; Petit et al. 1996). Shire et al. (1996) hanno condotto esperimenti per identificare i domini di CB1 deputati al riconoscimento ed al legame ad SR141716, trasfettando cellule COS-3 con un plasmide codificante CB1 mutato o con una serie di recettori CB1/2 chimerici. I risultati ottenuti suggeriscono che il quarto ed il quinto dominio transmembrana sono essenziali per il legame ad alta affinità della molecola, laddove mutazioni a carico dei *loops* extracellulari non ne modificano sensibilmente il *binding* recettoriale.

Evidenze sperimentali mostravano che SR141716 induceva effetti opposti a quelli ottenuti in seguito a trattamento con agonisti, aumentando l'attività locomotoria in topi (Compton et al. 1996), migliorando la memoria a breve termine ed il comportamento sociale in topi e ratti (Terranova et al. 1996), incrementando la produzione di cAMP in cellule in cui veniva indotta l'espressione di CB1 (Felder et al. 1995), l'entità delle contrazioni evocate elettricamente in vari tessuti isolati (Pertwee

et al. 1996) ed inducendo il rilascio di acetilcolina in *slices* ippocampali di ratto e muscoli longitudinali mienterici di porcellino di guinea (Gifford & Ashby 1996). Ben presto emerse che SR141716 poteva agire anche da agonista inverso: Bouaboula *et al.* (1997) hanno dimostrato che in cellule ovariche di *chinese hamster*, overesprimenti CB1, erano evidenziabili alti livelli costitutivi dell' attività di MAPK ed adenilato ciclasi e questo aumento era inibito da SR141716. Essi inoltre osservarono che la guanosina 5'-O-(3-[35S]thio)trifosfato aumentava il *binding* del composto al recettore, condizione tipicamente associata agli agonisti inversi (Pertwee 2005). Il profilo farmacocinetico (**tab.8**) di SR141716 ne indica una diffusa distribuzione in tessuto adiposo bruno, il che, in accordo con il ruolo cruciale di CB1 nel metabolismo energetico, sembra inoltre spiegare gli effetti della molecola sul *food intake* e sul controllo del peso corporeo evidenziati da studi in fase pre-clinica e clinica.

**Tabella 8** Caratteristiche farmacocinetiche di SR141716(adattato da Bifulco et al. 2007).

	Preclinical Studies	Clinical Studies
Pharmacokinetics:		
Adsorption	Oral bioavailability low to moderate (12% male rats, 40% female rats, 19% male macaques) Extensive first pass metabolism peak concentration after 1-3 h steady state pharmacokinetic: 1 week once-daily dosing.	Rapidly absorbed upon oral administration. Decreased absorption with increased dose; C <sub>max</sub> reached 2 h after 20-mg dose; low solubility and high permeability Steady state: 15 days in normal-weight volunteers, 39 days in obese patients
Distribution	Volume of distribution > total body water (11.5 l/kg rats, 24.4 l/kg macaques) Tissues with greatest uptake: liver, adrenals, brown fat, kidneys, lymph nodes; High binding (up to 100%) to plasma proteins.	Never administered i.v. Extensive distribution Very high binding to plasma proteins, mainly albumin (mean-99.9%)
Metabolism	Amidohydrolysis, oxidative metabolism on the piperidine moiety, glucuronidation of the acid, hydroxy phase 1 metabolism.	Metabolized by CYP3A4 and hepatic amidohydrolase Metabolites inactive against human cloned CB1 receptors
Excretion	Long terminal half-life in rats (7.5 h) and macaques (20 h) and medium clearance (~1 l/h/kg) Excretion via bile in the feces (>70%), small amount in urine. Excreted in milk (rats).	Mean terminal half-life: 10 days, in normal-weight volunteers, 16 days, in obese patients. Clearance, 5 l/h. After a 20 mg/kg dose: 32% excretion as unchanged in feces; 3% in urine and 61% in feces over 312 h. Biliary excretion of metabolites

### 3.5.1 SR141716: effetti anti-obesità

Studi pre-clinici e clinici hanno dimostrato che sia i cannabinoidi endogeni che quelli esogeni agiscono sui recettori CB1 ipotalamici stimolando l' appetito e la preferenza per cibi ricchi di grassi e carboidrati. È noto, infatti, che a livello post-sinaptico l'acido ammino-γ-buttirrico (GABA) garantisce il senso di sazietà ma che l'attivazione del recettore endocannabinoide, a livello pre-sinaptico, ne inibisce il rilascio attenuandone gli effetti, stimolando di conseguenza la tendenza alla ripresa dell' alimentazione. Questo spiega, in termini fisiologici, le azioni oressizzanti attribuite alla stimolazione del sistema endocannabinoide che, insieme al sistema oppioide ed al sistema serotoninergico, regola il comportamento alimentare (Pagotto et al. 2006). Nell' ambito della ricerca per il trattamento a lungo termine dell'obesità, il primo promettente candidato alla fase clinica è stato SR141716, più noto come Rimonabant (Hampp et al. 2008), commercializzato in Europa nel 2006 con il nome di Acomplia ed approvato per il trattamento di pazienti in sovrappeso con sindromi metaboliche.

Numerosi studi, mediante l'utilizzo di diversi paradigmi sperimentali, hanno dimostrato che nei modelli animali Zucker *fa/fa* ed in topi *db/db*, caratterizzati da mutazioni per il recettore della leptina, ormone chiave nei processi di regolazione del bilancio energetico, la somministrazione acuta di SR141716 riduce il *food intake* e che un trattamento cronico con il composto è in grado di ridurre il peso corporeo (Bensaid et al. 2003; Di Marzo et al. 2001; Vickers et al 2003). Attraverso questi modelli sono stati compresi i principali meccanismi mediante i quali SR141716 esplica la sua efficacia. È noto infatti che, a livello centrale, la molecola inibisce la trasmissione, mediata dai recettori CB1, del sistema mesolimbico e della melanocortina, potenziando i segnali vagali di sazietà nel tronco encefalico; a livello periferico, inibisce la lipogenesi nel tessuto adiposo ed in quello epatico, migliorando l'ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico ed aumentando i livelli di adiponectina con effetti pleiotropici sull'infiammazione e sulla protezione da aterosclerosi (Di Marzo et al. 2001; Matias et al. 2007). Diversi *trials* clinici a cui hanno partecipato pazienti sovrappeso in buona salute o affetti da patologie quali diabete, dislipidemia ed ipertensione hanno confermato gli effetti di riduzione di peso corporeo ottenuti in fase pre-clinica utilizzando la molecola alla dose di 20mg/die. I programmi RIO (Rimonabant in Obesity) hanno dimostrato che, dopo due anni, l'assunzione del farmaco induceva una perdita di peso dal 5 al 20%, riducendo oltre all' *intake* calorico, il senso di fame dei pazienti trattati rispetto al gruppo di controllo con un meccanismo d' azione che sembrava coinvolgere CB1 a livello centrale e periferico (Scheen et al. 2008; Kunos et al 2008; Wright et al. 2008; Kintscher et al 2008; Patel et al. 2007; Desperes et al. 2005). Sebbene la fase III dello studio "RIO-lipids" e "RIO-Europe" (Van Gaal et al. 2005; Van Gaal et al. 2008) ne avesse evidenziato l' aumento dei fattori di rischio cardiaco, il *trial* SERENADE (Study Evaluating Rimonabant Efficacy in Drug Naive Diabetic Patients) mostrava che la molecola non solo riduceva i rischi cardiometabolici, ma che, inoltre, migliorava il controllo glicemico in pazienti affetti da diabete di tipo 2. I *trials* ADAGIO (An International Study on Rimonabant in Dyslipidemia with Arthero-Genetic Risk in Abdominally Obese Patients) e STRADIVARIUS (Strategy to Reduce Atherosclerosis Development Involving Administration of Rimonabant-The Intravascular Ultrasound Study) hanno infine suggerito che i pazienti con marcata obesità intra-addominale beneficiavano del trattamento cronico con SR141716 (Despres et al. 2008; Nissen et al. 2008). L' efficacia clinica del farmaco sembrava essere basata su un effetto metabolico a lungo termine mediato dalla soppressione della lipogenesi epatica e l' aumentata ossidazione lipidica (Hennes et al. 2006; Patel et al. 2007). Tali studi hanno permesso che SR141716 fosse il primo antagonista/agonista inverso approvato per il trattamento di pazienti obesi o in sovrappeso in presenza di fattori di rischio quali diabete e dislipidemia, commercializzato dalla Sanofi-Aventis con il nome di Acomplia, disponibile nel 2008 in 56 paesi.

Il 23 ottobre di quell' anno, però, il comitato scientifico dell'EMEA ha adottato il provvedimento di sospensione dopo una rivalutazione di tutti i dati disponibili, confermando che per pazienti che assumevano tale farmaco vi fosse il rischio di gravi effetti indesiderati di tipo psichiatrico, inclusi i disturbi depressivi ed eventi correlabili al rischio di suicidio (EMEA 2008).

### 3.5.2 SR141716: effetti antiproliferativi

Poiché l'iperplasia del tessuto adiposo è un evento cruciale per lo sviluppo dell'obesità, sono stati analizzati gli effetti antiproliferativi di SR141716 in preadipociti murini. In tale sistema, il trattamento con l'antagonista CB1 provocava ridotta proliferazione, oltre che una più tardiva maturazione dei precursori degli adipociti, insieme ad un ridotto accumulo lipidico intracellulare. Il meccanismo molecolare proposto per SR141716 è stato l'inibizione del *pathway* della MAPK, ERK (Gary-Bobo et al. 2006), fortemente attivato nel tessuto adiposo in diete ad alto indice lipidico (Bost et al. 2005; Bouaboula et al. 1997; Landsman et al. 1997). Gli effetti antiproliferativi sono stati, poi, evidenziati anche in modelli di fibrosi epatica (Mallat & Lotersztajn, 2006). Il recettore CB1 è infatti overespresso in campioni di fegato cirrotico e in cellule fibrogeniche epatiche e la somministrazione SR141716, riduce l'accumulo di miofibroblasti epatici ed i livelli della citochina profibrogenica TGF- $\beta$ . L'effetto finale di inibizione della proliferazione è dipendente dal *signaling* del recettore per i cannabinoidi, poiché assente in miofibroblasti epatici di topi CB1 *Knock-out*.

### 3.5.3 SR141716: effetti antitumorali

Nell'ambito dell'analisi degli effetti antiproliferativi, ed in virtù del coinvolgimento del recettore CB1 nel controllo della crescita tumorale, sono stati valutati gli effetti di SR141716 in diversi modelli di neoplasia.

Dai primi studi emerse che l'antagonista CB1, SR141716, attenuava l'attività antitumorale di agonisti CB1 e di molecole anandamide-simili in tumori di tiroide, mammella e prostata (Bifulco et al. 2001; Portella et al. 2003; Sarfaaz et al. 2005; Grimaldi et al. 2006). In altri tumori, come nel glioma, invece, non sembrava efficace nel revertire l'attività antiproliferativa degli agonisti di CB1, laddove selettivi antagonisti di CB2 o la combinazione di antagonisti CB1/CB2 potevano parzialmente attenuarne gli effetti. Tali dati insieme all'evidenza secondo la quale una preincubazione di 48 ore con antagonisti CB1/2 sembrava aumentare l'induzione di morte AEA-mediata in cellule di glioma, suggeriva un più complesso meccanismo d'azione per questa classe di molecole e nello specifico per SR141716 (Maccarrone et al. 2000). Considerando le attività antitumorali degli agonisti dei recettori dei cannabinoidi, ne è un esempio il THC, ci si potrebbe aspettare che gli antagonisti dei recettori CB, se usati da soli, inducano aumento della proliferazione di cellule normali o trasformate, ma i risultati di diversi studi escludono tale possibilità, indicando che non solo gli agonisti, ma anche gli antagonisti hanno la capacità di inibire la crescita tumorale (Bifulco et al. 2004) e di indurre apoptosi (Derocq et al. 1998; Powles et al. 2005).

Il nostro gruppo di ricerca ha osservato per la prima volta il potenziale antitumorale di SR141716 in cellule di carcinoma tiroideo di ratto (KiMol) *in vitro* ed in modelli xenograft *in vivo*. In queste condizioni sperimentali SR141716 attenuava l'attività antitumorale degli inibitori della degradazione degli endocannabinoidi e degli analoghi stabili dell'anandamide (2-methylarachidonyl-2'-fluoro-ethylamide), ma usato da solo non favoriva la proliferazione cellulare, esercitando, al contrario, un piccolo ma significativo effetto inibitorio sulla crescita della neoplasia (Bifulco et al. 2004).

E' degno di nota che concentrazioni micromolari di SR141716 si sono mostrate efficaci nel ridurre la vitalità di linee primarie di linfoma mantellare (Flygare et al.

2005). Gli studi di Gallotta hanno riconfermato il potenziale antitumorale di SR141716 in modelli di leucemia, testando la molecola in un *range* di dosi a partire da 1 fino a 20 $\mu$ M e constatandone, parallelamente all' induzione di apoptosi nel modello tumorale, la bassa tossicità in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). L'effetto antiproliferativo era dovuto ad induzione di apoptosi attraverso un classico meccanismo caspasi-dipendente, nella linea cellulare Jukart, e in modo caspasi-indipendente, modulando il *pathway* PI3K/Akt, per la linea U937. In entrambi i modelli, però, SR141716 provocava significativa depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale (Gallotta et al. 2010). Gli effetti citotossici del composto apparivano quindi selettivi per le cellule trasformate, senza alterare i *subset* linfocitari, in accordo con quanto proposto dal gruppo di ricerca di Sander che inoltre ne ha dimostrato la capacità di regolare l'espressione di geni associati all' immunità innata, apoptosi e metabolismo (Almestrand et al. 2015).

L'attività antitumorale di SR141716 su tumori alla mammella *in vivo* ed *in vivo* è stata, indagata da Sarnataro che nel 2006 ne ha dimostrato la maggiore efficacia, a concentrazioni nanomolari, in modelli caratterizzati da fenotipi altamente metastatizzanti, come nel caso della linea MDA-MD-231, rispetto alle linee cellulari meno invasive T47D e MCF-7 (Sarnataro et al. 2006). L'analisi dei meccanismi molecolari ha dimostrato che SR141716 induceva arresto del ciclo cellulare in fase G1/S, senza induzione di apoptosi ed i risultati ottenuti *in vitro*, furono poi confermati *in vivo*: dopo 2 settimane di trattamento, la molecola riduceva il volume tumorale in modelli xenograft inoculati con cellule MDA-MB-231. Nel 2009 il nostro gruppo ha studiato gli effetti dell' antagonista CB1 in linee cellulari di carcinoma coloretale umano, dimostrandone la capacità di inibirne la proliferazione cellulare, causando arresto del ciclo in fase G2/M per la linea cellulare DLD1, senza induzione di apoptosi o necrosi, ma mediante catastrofe mitotica, come indicato dai livelli di ciclina B1, PARP-1, AURORA B e dallo stato di fosforilazione di p38/MAPK e Chk1 (Santoro et al. 2009). Successivamente, abbiamo confrontato, nello stesso modello di CRC l'attività antiproliferativa dell'antagonista CB1 con quella dell'oxaliplatino, uno dei farmaci correntemente usati nel trattamento di tale patologia. I dati raccolti indicavano che l'effetto ottenuto in seguito a trattamento con SR141716 era comparabile con quello ottenuto trattando la linea cellulare con oxaliplatino ed, inoltre, che l'antagonista di CB1 potenziava efficacemente gli effetti citotossici del chemioterapico, evidenziando quindi un forte effetto sinergico sull'inibizione della proliferazione cellulare (Gazzerro et al. 2010). Recenti studi hanno documentato un nuovo ed interessante meccanismo d'azione per SR141716 in un modello di fibrosarcoma indotto da *methylcholanthrene*. In tale modello tumorale, il composto induce apoptosi e controlla la progressione del ciclo cellulare mediante modulazione dei livelli di p21<sup>waf</sup>, ciclina E, ciclina D1, NF-kB e COX-2, agendo, inoltre, sul *pathway* AKT/pFoxO1, riducendo le dimensioni del tumore *in vivo* (Malfitano et al. 2012).

In conclusione, sebbene evidenze sperimentali dimostrano l'indiscutibile effetto antitumorale di SR141716, non è ancora chiaro come sia agonisti che antagonisti CB1 possano esplicare un effetto antiproliferativo nel cancro. Per provare a fare chiarezza su questa intricata questione e per spiegare l'effetto biologico di SR141716 sono state proposte due ipotesi: l'effetto antitumorale di SR141716 potrebbe essere ascrivibile ad un' azione antiproliferativa mediata dal tono locale degli endocannabinoidi attraverso un meccanismo CB1-indipendente, in presenza dell'antagonista per il recettore; oppure, gli effetti biologici sono connessi alle proprietà di agonista inverso della molecola.(Bifulco et al. 2004 e Flygare et al 2005).



## 3.6 Materiali e metodi

### 3.6.1 Reagenti ed anticorpi

SR141716 è stato gentilmente donato dalla casa farmaceutica Sanofi-Aventis. Il composto è stato dissolto in DMSO ed aggiunto alle colture cellulari alle concentrazioni indicate. Z-VAD-fmk (Z-VAD) (R&D systems) è stato dissolto in DMSO.

Gli anticorpi primari per gli immunostaining (o di controllo) utilizzati sono stati: anti-MICA/B/PE, anti-CD56/PerCP/Cy5.5, anti-CD69 PE, LEAF™ purified anti-human MICA/MICB (6D4), LEAF™ purified Mouse IgG2a  $\kappa$  Isotype Ctrl, anti-AnnexinV/FITC (BioLegend); anti-A2B5/PE, CD15/APC, Ep-CAM/APC, CD133/PE (Miltenyi Biotec); MHC-I/FITC (SantaCruz); anti-CD3/FITC (BD Pharmingen); Anti-ULBP1/PE, anti-ULBP2/ULBP6/APC, anti-ULBP3/PE, anti-RAET1E/ULBP4/PerCP, anti-MICA/PE, anti-MICB/APC, goat IgG/PerCP, IgG1/PE, mouse IgG2A/APC isotype control (R&D Systems).

Per i saggi western blot sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-beta catenin, anti-cannabinoid receptor I, anti-cannabinoid Receptor II, anti-MICA, anti- $\beta$ -actin (Abcam); anti-Cyclin D1, anti-p27 (BD Pharmingen); anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich Inc.); anti-phospho-GSK-3 $\beta$  (p-GSK-3 $\beta$ ; Ser9), anti-cleaved caspase-3, anti-caspase-3, anti-phospho-STAT3 (p-STAT3; Tyr705), anti-STAT3 (Cell Signaling Technology).

### 3.6.2 Colture cellulari

Normal Human Astrocytes (NHA) sono una linea di astrociti umani mantenute in coltura in AGM™ BulletKit™ (Lonza). Le linee cellulari di glioma umano U343MGa (U343), U87MG (U87), U251MGa (U251) e T98G (T98) sono state acquistate presso CLS Cell Lines Service Gmb o gentilmente fornite dalla Dr. Daniela Parolaro (Università dell'Insubria, Italia). Le linee cellulari umane di glioma sono state mantenute in coltura in EMEM (Lonza) addizionato con 10% siero bovino fetale depleto, 1% L-glutamina, 1% di una miscela di penicillina/streptomina, 1% di sodio piruvato, 1% di aminoacidi non-essenziali (Euroclone). Cellule Natural Killer primarie umane (NK) sono state negativamente selezionate da cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) di donatori sani, utilizzando un metodo immunomagnetico (NK-cell isolation kit, Miltenyi Biotec). Tutti i donatori hanno fornito un consenso informato scritto, conforme alla Dichiarazione di Helsinki per l'uso di campioni biologici per scopi di ricerca. Cellule mononucleate da sangue periferico (PBMCs) sono state isolate utilizzando un gradiente Ficoll-Hypaque (lymphocyte separation medium; MP Biomedicals). In base ai dati raccolti, la purezza delle cellule NK è del 98%. Le cellule NK sono state seminate in piastre da 96 pozzetti con fondo ad U alla concentrazione di  $4 \times 10^5$  cellule per pozzetto. Le cellule sono state messe in coltura a diversi intervalli di tempo in RPMI 1640 (Invitrogen) addizionato con L-glutamina (2 mM), streptomina (50 ng/ml), penicillina (50 unità/ml) ed il 10% di siero fetale bovino depleto (Hyclone Laboratories) in presenza di IL-2 a 100 U/ml (Roche Applied Science). Tutte le colture cellulari sono state mantenute a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>.

### 3.6.3 Analisi citofluorimetriche

Le analisi citofluorimetriche dei markers neuronali (A2B5, CD15, Ep-CAM, MHC I, CD133, Miltenyi Biotec/Santacruz) sono state effettuate in tutte le linee cellulari utilizzate, per confermare la presenza di caratteristiche tipiche del glioma umano. La purezza ed il fenotipo delle cellule NK sono stati valutati attraverso lo staining con anticorpi monoclonali che riconoscono CD56, CD3, CD69 ed il corrispondente isotipo dell' immunoglobulina di controllo (BioLegend). Per quanto riguarda la valutazione dell' espressione di MICA/B, cellule U251 sono state seminate in piastre p60 con una densità di  $20 \times 10^3$  cellule/cm<sup>2</sup> e tenute in coltura per 24 ore. Successivamente, le cellule sono state lavate con PBS e trattate con veicolo o con SR141716 20µM. Dopo 24 ore è stato effettuato lo staining. In breve, lo staining è stato realizzato su  $2 \times 10^5$  cellule tumorali con anticorpi anti- MICA, MICB, MICA/B , con anticorpi specifici per MHC di classe I o ULBP1-4 o ancora con i rispettivi isotipi di controllo IgG2A (R&D System). La fluorescenza di ogni campione è stata misurata con l'utilizzo dell' apparato Fluorescence-Activated Cell Sorter FACScalibur (Becton Dickinson) e i dati sono stati analizzati con il software Cell-Quest Pro (Becton Dickinson). I dati sono espressi come valore logaritmico dell' intensità di fluorescenza.

### 3.6.4 Saggio di proliferazione cellulare

Le linee cellulari di glioma e gli astrociti umani sono stati seminati alla densità di  $4 \times 10^3$  cellule/well e, dopo 24 ore, trattati con dosi crescenti di SR141716, o con il solo veicolo, per ulteriori 72 ore. La soluzione contenente BrdU è stata aggiunta a tutti i pozzetti, di controllo e di trattamento, per le ultime 4 ore di incubazione. Al termine dei tempi indicati il mezzo è stato rimosso e sostituito con una soluzione fissante e denaturante seguita da una incubazione con anticorpo anti-BrdU coniugato a perossidasi (HRP). La reazione colorimetrica sviluppata è stata misurata mediante lettura dell'assorbanza a 450 nm utilizzando un lettore di micro piastre Multiskan Spectrum (Thermo Scientific, ThermoElectron Corp). I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti, ciascuno eseguito in triplicato. Per ciascun trattamento i valori ottenuti sono stati espressi come percentuale rispetto al valore ottenuto per i controlli trattati con il solo veicolo.

### 3.6.5 Analisi del ciclo cellulare

Inizialmente, la linea cellulare di glioma U251 è stata seminata in piastre da 100 mm ed incubata a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore. Per sincronizzare le cellule all' interfase G1/S, queste ultime sono state coltivate in terreno di crescita allo 0.5% di siero per 18 ore ed in seguito trattate con SR141716, o con il solo veicolo, alle concentrazioni e per i tempi indicati. Dopo 72 ore, le cellule sono state raccolte, fissate col 70% di etanolo, e conservate a -20°C overnight. In seguito, alle cellule è stato aggiunto ioduro di propidio (PI; 50µg/ml) in PBS contenente 100 U/ml DNase-free RNase per 15 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono poi state analizzate mediante FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences) ed i risultati ottenuti elaborati tramite l'uso di ModFit LT v3.2 (Verity Software House, Inc); sono stati raccolti 10.000 eventi, corretti per detriti e popolazioni aggregate.

### 3.6.6 Analisi dell' apoptosi

La valutazione dell' apoptosi nella linea cellulare U251 é stata effettuata mediante doppio staining, adoperando un anticorpo anti-Annexin V (BioLegend) e PI. In breve, le cellule sono state seminate in piastre da 100 mm e, dopo 24 ore, trattate con SR141716, o con il solo veicolo, alle concentrazioni indicate per 72 ore in EMEM al 2% di FBS. Successivamente le cellule sono state staccate con tripsina e lavate in PBS. Sono state poi risospese in Annexin V binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7; 140 mM NaCl; and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>), incubate con Annexin V-FITC per 20 minuti a temperatura ambiente e poi con PI, sempre a temperatura ambiente, per ulteriori 15 minuti al buio. Le cellule sono state poi processate al citofluorimetro a flusso nell'ora successiva allo staining. Almeno 10.000 eventi sono stati raccolti, e i dati sono stati analizzati con il software Cell-Quest Pro (Becton Dickinson). I dati sono espressi come valori logaritmici dell'intensità di fluorescenza.

### 3.6.7 Real-time PCR

L'RNA totale è stato isolato da  $5 \times 10^6$  cellule utilizzando il reagente TRIzol (Invitrogen), seguendo le istruzioni della casa produttrice. DNA complementare (cDNA) è stato trascritto utilizzando la trascrittasi inversa SuperScript II Reverse (Invitrogen) partendo da  $1 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  di RNA ad alta purezza e i campioni sono stati testati in triplicato utilizzando i reagenti SsoFast EvaGreen (Bio-Rad).

I primers utilizzati sono stati i seguenti:

MICAFw-GACTTGACAGGGAACGGAAA;  
MICARev-CAGGTTTTGGGAGAGGAAGA;  
MICBfw-CAGCTACTGGGTCCACTGGT,  
MICBRev-GTTGGTCATGATCCCTTTC;  
ULBP1Fw-CGGTGCTAATGGATGGAAC  
ULBP1Rev-TGGTCAGTGCATCAAAAGGA  
ULBP2Fw-TCAAACCTGCCCTTCTGTCT,  
ULBP2Rev-GTGCAGGAATTCCATCAGGT  
ULBP3Fw-CTGGGGAAAACAACCTGGAAA  
ULBP3Rev-ATCGAAGCTGAACTGCCAAG  
ULBP4Fw-CCCTGACTTCTAGCCCTGTG  
ULBP4Rev-AGAAGACCTGCGCTTCACAC  
GAPDHfw-CGCTCTCTGCTCCTCCTGTTC  
GAPDHRev-TTGACTCCGACCTTCACCTTCC

Il protocollo per la qRT-PCR è stato il seguente: step di pre-heating per 3 minuti a 95°C, 40 cicli a 95°C per 10 secondi, 60°C per 30 secondi e un ultimo step finale a 65°C per 10 secondi. Alla fine, i risultati sono stati analizzati con il metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

### 3.6.8 Analisi citofluorimetrica della citotossicità di cellule NK

I test di citotossicità sono stati effettuati utilizzando il carboxy-Fluorescein Diacetate (c'FDA) NK assay nel quale la lisi cellulare é stata analizzata mediante tecniche citofluorimetriche, utilizzando un protocollo descritto in Ciaglia et al. 2013. Brevemente, cellule U251, stimulate come indicato nel testo, sono state marcate

tramite un'incubazione a  $1 \times 10^6$ /ml in PBS con c'FDA  $3 \mu\text{M}$  (Molecular Probes-Invitrogen). NK attivati con IL-2 sono state poi incubate con cellule U251 per 4 ore a  $37^\circ\text{C}$  in atmosfera al 5% di  $\text{CO}_2$ .

Negli esperimenti di blocking, LEAF™ purified anti-MICA/MICB (6D4) e LEAF™ purified Mouse IgG2a (BioLegend), come isotipi di controllo, sono stati aggiunti alla concentrazione di  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  2 ore prima dell'inizio dell'incubazione effettore:target e tenute in coltura per ulteriori 4 ore fino alla fine dell'esperimento.

Tutte le determinazioni sono state effettuate in triplicato, ed il range del rapporto E:T è stato tra 6:1 a 1:1.

### 3.6.9 Valutazione dei livelli di IFN- $\gamma$ tramite test ELISA

Per la misurazione della secrezione di IFN- $\gamma$ , NK umane purificate sono state stimolate con IL-2 ( $100 \text{IU}/\text{ml}$ ). Dopo 72 ore, le cellule NK attivate sono state lavate due volte e coltivate con cellule target di glioma non trattate o trattate con SR141716 in  $200 \mu\text{l}$  di mezzo di coltura completo. Le cellule sono poi state incubate per il tempo indicato. In seguito, i supernatanti sono stati raccolti e conservati a  $-20^\circ\text{C}$  in attesa della quantificazione. La concentrazione di IFN- $\gamma$  è stata poi misurata tramite test ELISA seguendo le indicazioni fornite della casa produttrice (R&D Systems).

### 3.6.10 Western blotting

Le cellule sono state seminate in dischi per colture cellulari del diametro di 100 mm e, dopo 24 ore di incubazione, sono state trattate con SR141716, o con il solo veicolo, alle concentrazioni e per i tempi indicati. Al termine delle incubazioni, le cellule sono state trattate con tripsina-EDTA, raccolte per centrifugazione e lavate con PBS 1X. La lisi è stata ottenuta risospendendo il pellet cellulare in RIPA buffer ( $\text{NaCl}$  150 mM, 1% triton X-100 pH 8.0, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 Mm Tris, pH 8.0) a  $4^\circ\text{C}$  e centrifugando i lisati a 15000 rpm per 10 min. Il soprannatante è stato raccolto ed è stata misurata la concentrazione proteica mediante saggio Bio-Rad. Per ciascun punto di controllo e di trattamento, eguali quantità di estratti proteici ( $25 \mu\text{g}$ ) sono state diluite in buffer Laemmli, incubate a  $100^\circ\text{C}$  per 5 minuti, sottoposte ad elettroforesi in SDS-PAGE al 10-12,5% e trasferite su membrana di nitrocellulosa (Amersham, GE Healthcare). Le membrane sono state bloccate con TBS-Tween (50 mM Tris, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.1% Tween-20) contenente il 5% non fat dry milk o BSA, lavate con TBS-Tween ed incubate con gli anticorpi primari.

Le membrane sono state poi incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari HRP-coniugati anti-mouse o anti-rabbit (Cell Signaling Technology). Le bande specifiche sono state evidenziate usando il sistema di chemiluminescenza (ECL-Amersham Biosciences) e successiva esposizione a X-ray film (Kodak). La densità delle bande relative è stata determinata utilizzando il software di analisi densitometrica Image Lab 4.0. (Bio Rad Laboratories). I risultati ottenuti sono stati normalizzati sui valori di actina o tubulina.

### 3.6.11 Esperimenti in vivo

Per ottenere modelli tumorali xenograft di glioma è stata adoperata la linea cellulare U87. I topi nudi CD1-deficient sono stati forniti dalla ditta Charles River Laboratories. Topi femmine di 6-8 settimane sono stati utilizzati per tutti gli esperimenti. Gli esperimenti sono stati condotti seguendo le linee guida NIH, Guide for the care and Use of laboratory Animals.

Le cellule di glioma U87 esprimenti luciferasi (luc-U87) sono state fornite da Biogen scarl, Istituto per la Ricerca Genetica "Gaetano Salvatore" di Ariano Irpino (Avellino, Italia).

Prima dell'impianto sono state valutate eventuali contaminazioni e vitalità delle cellule U87 contaminate e risospese in terreno di coltura M199. Le cellule sono state inoculate per via sottocutanea (s.c.) sul fianco destro ad una concentrazione di  $5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ /topo. I trattamenti sono cominciati 9 giorni dopo l'iniezione. Il giorno antecedente la prima somministrazione (giorno -1) i topi sono stati suddivisi in base al volume del tumore (TV) e al gruppo di trattamento (N=10-12 ciascuno) nei seguenti gruppi sperimentali: gruppo controllo (iniezione del veicolo peritumorale, due volte a settimana per 4 settimane) e SR141716 (somministrazione peritumorale di 1 mg/kg di SR141716, due volte a settimana per 4 settimane). Sintomi clinici e mortalità degli animali sono stati monitorati quotidianamente, mentre il peso corporeo è stato registrato ogni due settimane. La crescita tumorale è stata rilevata ogni due settimane mediante calibro Mitutoyo. La formula utilizzata per calcolare la crescita tumorale è la seguente:  $TV (\text{mm}^3) = [\text{lunghezza} (\text{mm}) \times \text{larghezza} (\text{mm})^2] / 2$ , dove la larghezza e la lunghezza sono e il diametro più corto ed il più lungo di ciascuna massa tumorale, rispettivamente. L'esperimento è stato concluso sei settimane dopo la prima inoculazione di cellule tumorali. 35 e 41 giorni dopo il trattamento, 4 animali sono stati sacrificati per dislocazione cervicale. Le masse tumorali espianate sono state pesate e fissate in formalina al 10% per l'analisi immunohistologica.

### 3.6.12 Immunoistochimica

Al giorno 35 e 41 sono state preparate criosezioni (0.7 mm) delle masse espianate di luc-U87, fissate in acetone e sottoposte a blocking con normal rabbit serum al 2% e BSA al 2%. Le sezioni di tessuto sono state ibridate con l' anticorpo primario anti-MICA (1:50) (Becton Dickinson). All' anticorpo secondario anti-rat biotinilato (Zymed) alla concentrazione di 1:150, è stato aggiunto il complesso avidina-biotina e lo staining è stato realizzato con diaminobenzidina. Per valutare l' intensità dello staining di MICA, oltre che la relativa distribuzione, è stata definita una scala composta dai valori: zero (no staining), 1 (predominantly unstained with smaller stained areas), 2 (stained and unstained areas are about equally large), 3 (predominantly stained tissue with smaller unstained areas), 4 (all xenografted cells are moderately stained) e 5 (all xenografted cells are strongly stained). La media dei valori ottenuti dall'analisi di 5-8 campioni di ogni gruppo, valutati da due esperti, è stata poi rappresentata in grafico.

### 3.6.13 Trasfezione

Cellule U251 sono state trasfettate con siRNA di controllo (100nM) o con siRNA per CB1 (100nM), mediante Lipofectamine 2000 Transfection reagent (Invitrogen) secondo il protocollo indicato dalla casa produttrice. siRNA-CB1 (21-nucleotide small interfering RNA duplex-Dharmacon Research) copre la sequenza 5'-CCCAAGUGACGAAAACAUU-dTdT-3'.

### 3.6.14 Analisi statistiche

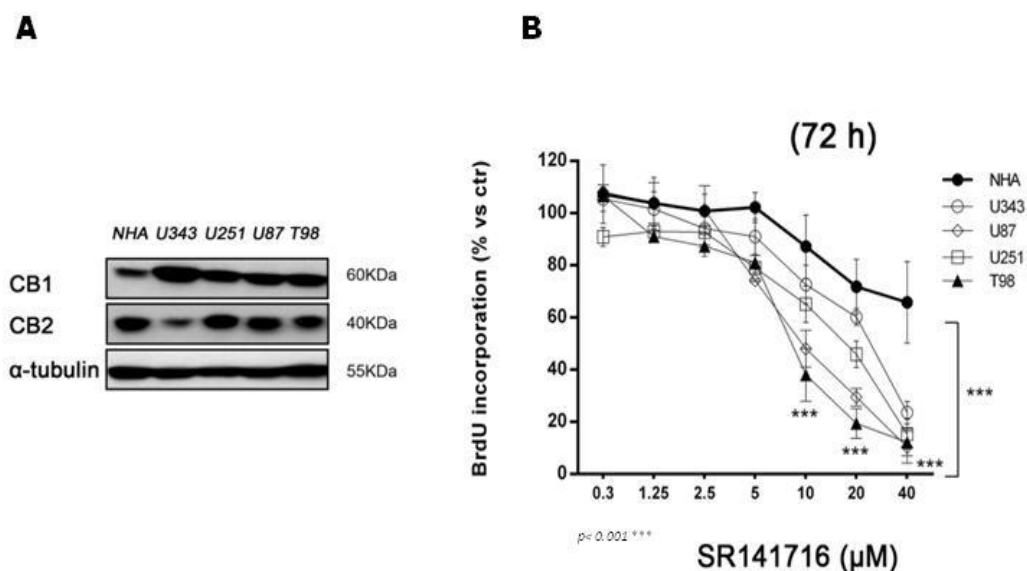
Le analisi statistiche sono state svolte tramite il software GraphPad prism 6.0 per Windows (GraphPad software). I dati ottenuti per ogni serie di esperimenti sono stati calcolati come media  $\pm$  deviazione standard e la significatività statistica è stata calcolata usando lo Student t-test a due code, per gruppi indipendenti, o ANOVA con correzione di Bonferroni. Sono stati considerati significativi i valori di p inferiori a 0.05.

### 3.7 Risultati

#### 3.7.1 Effetti di SR141716 sulla proliferazione di modelli cellulari di glioma

Nella prima fase dello studio abbiamo analizzato i livelli proteici dei recettori CB1 e CB2 in quattro differenti linee cellulari di glioma (U343, U251, U87, T98) ed in astrociti umani (NHA) come controparte normale.

I risultati degli *immunoblot*, ottenuti a partire da lisati cellulari totali, hanno evidenziato, per CB1, un' aumentata espressione proteica in modelli tumorali rispetto alla controparte non tumorale, mentre i livelli di CB2 non sembrano seguire un *trend* specifico (**fig.32 A**). Tale dato ci ha spinto ad analizzare, nei modelli cellulari citati, gli effetti di SR141716, antagonista selettivo del recettore CB1, mediante saggio di incorporazione della BrdU (**fig.32 B**).

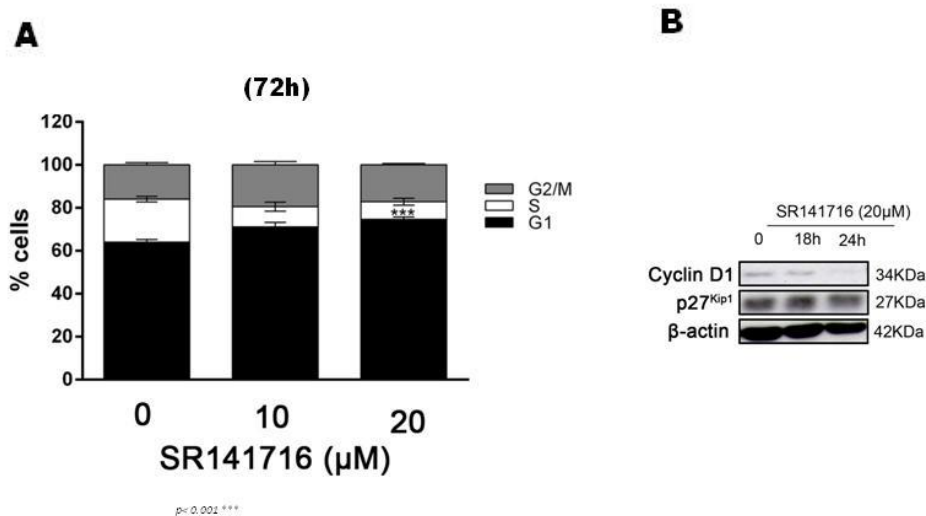


**Figura 32 A.** Espressione basale di CB1 e CB2 nella linea di astrociti NHA e nelle linee di glioma U343, U251, U87, T98, valutata mediante western blot: **B.** Effetto di SR141716 sulla proliferazione della linea cellulare astrocitaria NHA e sulle linee di glioma U343, U251, U87 e T98 alle concentrazioni indicate per 72 ore di trattamento, valutata mediante saggio di incorporazione della BrdU (\*\* $p < 0.001$ )

Tutte le linee cellulari sono state incubate con crescenti dosi di SR141716 (0-40 $\mu$ M) in *time course* ed è emerso che, dopo 72 ore di trattamento, la molecola inibisce efficacemente, in modo dose-dipendente rispetto ai controlli, la proliferazione dei modelli tumorali (**fig.32 B**).

Nello specifico, il saggio mostra una marcata riduzione del *rate* proliferativo per le concentrazioni di 10 e 20 $\mu$ M, laddove per le cellule NHA non sono evidenziabili effetti significativi.

Per indagare ulteriormente i processi biologici modulati dalla molecola, la linea cellulare U251, caratterizzata da alti livelli di CB1 e fenotipo aggressivo, è stata selezionata per analisi FACS, mediante *PI-staining*. In seguito a trattamento con SR141716, alle concentrazioni di 10 e 20  $\mu$ M per 72 ore, è emerso che l' antagonista CB1 induce aumento della percentuale di cellule in fase G1, rispetto al controllo trattato con il solo veicolo, oltre che una marcata riduzione della quota di cellule in fase S che però appare significativa solo alla concentrazione 20 $\mu$ M. La quota di cellule in fase G2/M non sembra essere modificata dal trattamento (**fig.33 A**)

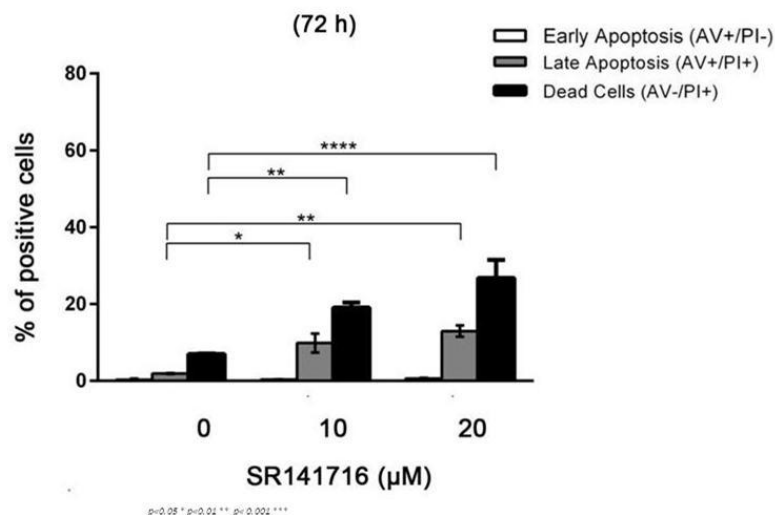


**Figura 33 A.** Effetto di SR141716 sul ciclo cellulare nella linea di glioma U251, trattata per 72 ore alle concentrazioni di 10 e 20 $\mu$ M, valutato mediante *PI staining* ed espresso come percentuale di cellule presenti in ogni fase del ciclo (\*\*\*) $p < 0.001$  **B.** Effetto di SR141716 20 $\mu$ M sui livelli di espressione di CyclinD1 e p27<sup>Kip1</sup>, valutati mediante immunoblot, per 18 e 24 ore di trattamento

Questi risultati suggeriscono che l' effetto antiproliferativo di SR141716, per la linea cellulare U251, sia imputabile all' inibizione della transizione G1/S. Infatti, i livelli proteici di ciclina D1, proteina necessaria alla progressione del ciclo cellulare attraverso la fase G1, appaiono selettivamente ridotti rispetto al controllo, in assenza della riduzione dell'espressione della chinasi ciclina-dipendente p27<sup>Kip1</sup> per 18 e 24 ore di trattamento, alla dose di 20 $\mu$ M. (**fig.33 B**)

Per indagare l'effetto di inibizione della proliferazione cellulare e se tale fenomeno fosse associato all'induzione di apoptosi, abbiamo effettuato saggi di citofluorimetria a flusso mediante doppia colorazione *AnnexinV/ PI*. I risultati dimostrano che alla dose di 20 $\mu$ M, per 72 ore di trattamento, SR141716 induce un leggero aumento della quota di cellule in apoptosi rispetto al controllo (**fig. 34**).



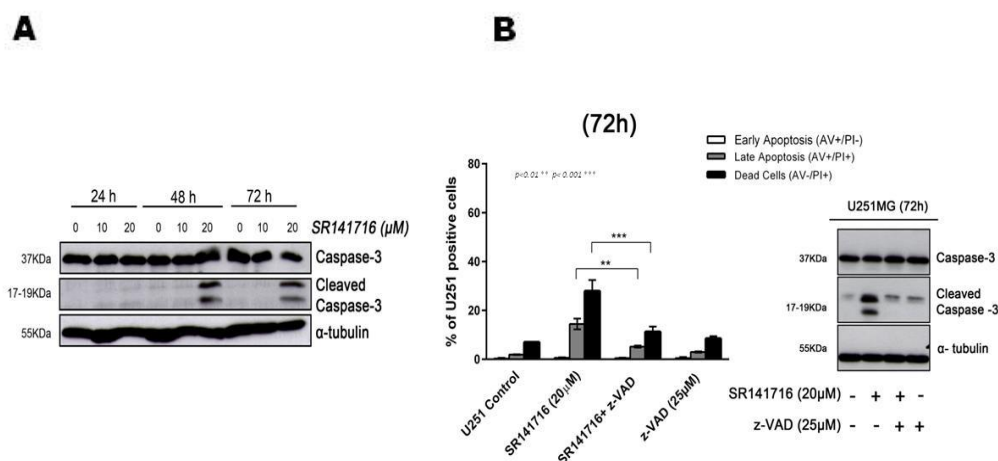


**figura. 34** Analisi dell' effetto di SR141716, alle concentrazioni di 10 e 20μM per 72 ore di trattamento, sull' induzione di apoptosi, valutato mediante staining AnnexinV/P ed espresso come percentuale di cellule in apoptosi precoce (cellule AnnexinV positive/PI negative), tardiva (cellule AnnexinV/PI positive), necrosi (cellule AnnexinV negative/PI positive) (\*p<0.05, \*\* p 0.01, \*\*\*p<0.001)

Mediante *immunoblot* abbiamo quindi valutato i livelli di caspasi 3 clivata in seguito a trattamento con l' antagonista CB1, per 24, 48 e 72 ore, alle due concentrazioni precedentemente testate. I dati raccolti, coerentemente con quanto é emerso dalle analisi citofluorimetriche, indicano che SR141716 alla concentrazione di 20μM, già a partire da 48 ore di trattamento, induce aumento dei i livelli di caspasi 3 clivata rispetto al controllo trattato con il solo veicolo; per la concentrazione 10μM, invece, non é evidenziabile alcuna modulazione dei livelli di p20 e p17, rispettivamente forma intermedia e subunità attiva della caspasi clivata, fino a 72 ore di trattamento (**fig35A**).

Come previsto, l' inibitore delle caspasi z-VAD, alla dose di 25μM, inibisce completamente l' induzione del fenomeno apoptotico indotta da SR141716, secondo quanto emerge dai saggi di citofluorimetria di doppia colorazione *AnnexinV/PI* (**Fig.35 B**).

In definitiva, é stato possibile dimostrare che SR141716, alla dose di 20μM, inibisce la proliferazione tumorale, arrestando la progressione del ciclo cellulare ed inducendo apoptosi.

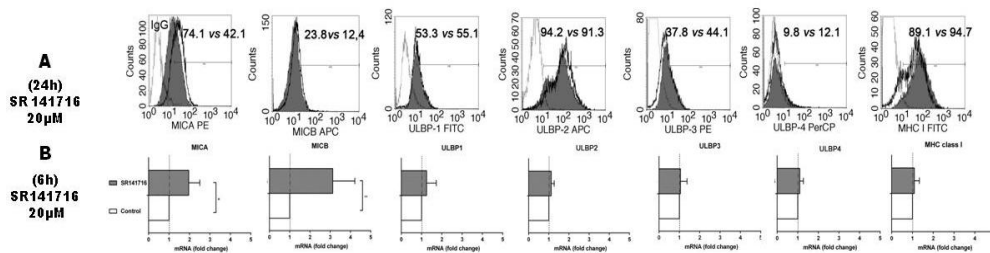


**Figura 35** **A.** Effetto di SR141716, in cellule U251, alla dose di 10 e 20μM, per 24, 48 e 72 ore di trattamento, sui livelli di caspasi-3 clivata, valutati mediante western blot **B.** Effetto del pretrattamento con z-VAD 25μM sulla capacità di SR141716, alla dose di 20μM per 72 ore, di indurre apoptosi, valutato mediante AnnexinV/PI staining, ed analisi dei livelli di caspasi 3 clivata mediante immunoblot (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

### 3.7.2 Effetti di SR141716 sul riconoscimento immunitario da parte di cellule NK

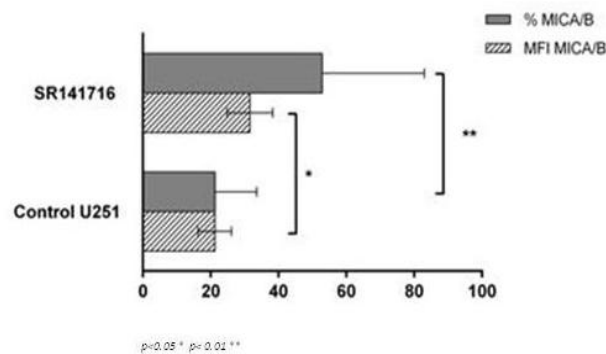
In accordo con quanto precedentemente pubblicato dal nostro gruppo (Bifulco M. 2007; Pisanti et al. 2011) sosteniamo che una potenziale attività antitumorale possa essere ascrivita ad SR141716 nel glioma. Numerose evidenze indicano che gli agenti chemioterapici promuovono la risposta immune antitumorale e contribuiscono all'efficacia clinica dei protocolli terapeutici. Per definire il ruolo di SR141716 nella regolazione dei meccanismi di sorveglianza immunitaria, abbiamo analizzato gli effetti della molecola sui livelli di espressione degli "NK-cell activating ligands" per la linea cellulare U251 e conseguentemente sul riconoscimento delle cellule tumorali ad opera delle cellule NK.

Inizialmente abbiamo analizzato, mediante citofluorimetria a flusso, i livelli di espressione dei ligandi NKGD2, MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 ed MHC di classe I per la linea cellulare U251 trattata con SR141716 per 24 ore, alla concentrazione di 20μM, confrontandone i livelli con i valori ottenuti per i controlli non trattati.



**Figura 36 A.** Analisi dei livelli di MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 ed MHC I, in cellule U251 trattate con SR141617 20µM per 24 ore (in grigio) vs controllo trattato con il solo veicolo (in bianco), valutati mediante citofluorimetria a flusso **B.** Valutazione dei livelli di mRNA per MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4 ed MHC I, in cellule U251 in seguito a 6 ore di trattamento con SR141617 20µM (in grigio) vs controllo trattato con il solo veicolo (in bianco), mediante RT-PCR (\*p<0.05).

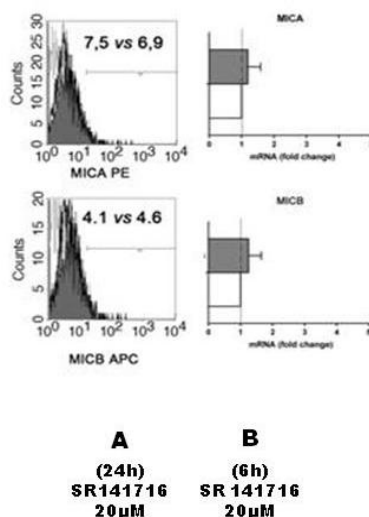
Come indicato in **figura 36 A**, in cui è riportata, in alto a destra, la percentuale di cellule positive per i marker testati, l'incubazione con SR141716 induce sostanziale e selettivo aumento dell'espressione di MICA (74.1<sub>SR141716</sub> vs 42.1<sub>ctrl</sub>) e MICB (23.8<sub>SR141716</sub> vs 12.4<sub>ctrl</sub>), senza però alterare i livelli di espressione delle proteine ULBP e di MHC I, dimostrando che tale fenomeno non è imputabile ad un effetto aspecifico del composto. Tale dato trova conferma sia nella valutazione della percentuale di cellule positive MICA/B, che nell'analisi del *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) (**fig. 37**).



**Figura 37** Analisi dei livelli di MICA/B in cellule U251, in seguito a trattamento con SR141617 20µM per 24 ore, mediante citofluorimetria a flusso: rappresentazione grafica dei livelli di mean fluorescent intensity (MFI) (griglio scuro) e della percentuale di cellule positive per MICA/B (griglio chiaro) (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

Agli assay citofluorimetrici sono seguite analisi dei livelli di mRNA dei ligandi NK. I risultati indicano che, in cellule U251, la trascrizione di MICA e MICB appare significativamente aumentata già a partire da 6 ore di incubazione con SR141716 20µM, contrariamente a quanto si verifica per gli ligandi NKGD2, che non sembrano modulati nell'espressione in seguito al trattamento farmacologico. I risultati delle RT-PCR sono stati normalizzati sui valori di GADPH ed espressi come *fold change unit* rispetto ai valori del controllo non trattato (**Fig.36 B**).

Nelle medesime condizioni sperimentali, sono stati indagati i livelli proteici e di mRNA di MICA e MICB nella linea astrocitaria NHA ed i risultati delle analisi non ne hanno evidenziato alcuna significativa alterazione. SR141716, quindi, induce efficacemente l'espressione di "segnali di pericolo" per le cellule NK, specificamente in modelli tumorali, ma non nella controparte sana (**Fig.38 A, B**).

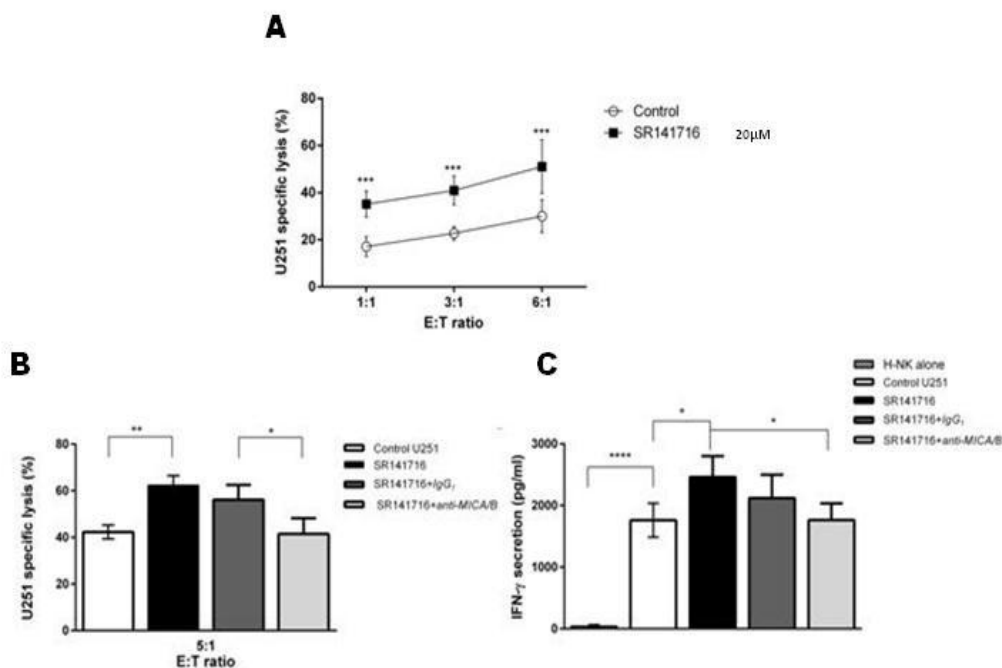


**Figura 38 A.** Analisi dei livelli di MICA e MICB in cellule NHA trattate con SR141617 20µM per 24 ore (in grigio) vs controllo trattato con il solo veicolo (in bianco), mediante citofluorimetria a flusso **B.** Valutazione dei livelli di mRNA per MICA e MICB, in cellule NHA, in seguito a 6 ore di trattamento con SR141617 20µM (in grigio) vs controllo trattato con il solo veicolo (in bianco), mediante RT-PCR.

Per verificare la funzionalità di tali proteine e quindi indagare se l'aumento dell'espressione di MICA/B SR-dipendente fosse effettivamente associato al riconoscimento ed al *killing* operato dalle NK, sono stati effettuati saggi di co-coltura, di linfociti NK con cellule U251.

Le cellule U251, marcate con carboxyl-fluorescein diacetato, sono state trattate per 24 ore con SR141716, alla dose di 20µM; successivamente le NK, attivate mediante IL-2, sono state incubate per 4 ore con le cellule di glioma. I surnatanti sono stati raccolti per la valutazione dei livelli di IFN-γ, mentre il saggio di citotossicità è stato effettuato mediante analisi FACS. Tests ELISA hanno evidenziato che la secrezione di citochine aumenta quando le cellule tumorali sono trattate con SR141716 e che tale fenomeno è connesso all'induzione dell'espressione di MICA/B sulla membrana delle cellule tumorali, ad opera dell'antagonista CB1. Anche la lisi specifica operata dalle cellule NK appare aumentata se confrontata con il controllo non trattato e l'utilizzo di anticorpi bloccanti anti-MICA/B ha dimostrato che tale effetto è connesso al riconoscimento delle proteine MIC, ad opera dei recettori per le NKG2D, espressi sulla superficie delle cellule NK. Gli anticorpi anti-MICA/B, infatti, inibiscono, sia la produzione di IFN-γ che il *killing* delle cellule tumorali, laddove gli isotipi di controllo non mostrano effetti significativi. Interessante è inoltre che l'utilizzo di anticorpi anti-MICA/B non influenza la lisi basale, suggerendo che, in assenza di stimolazione

farmacologica, la degranolazione delle NK in co-cultura con la linea di glioma U251, non coinvolge i ligandi NKG2D (fig 39 A-C)



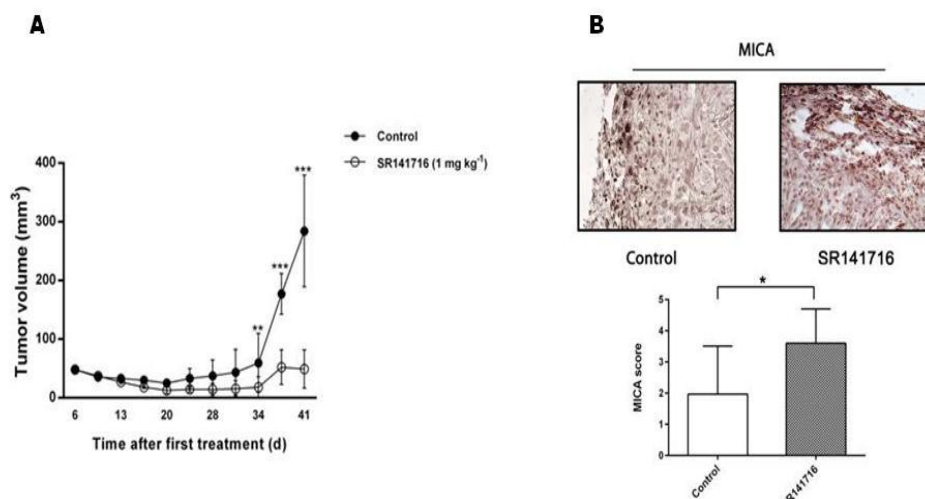
**Figura 39 A. e B.** Valutazione della citotossicità NK-mediata in co-culture di cellule U251 (trattate con SR141716 alla dose di 20µM per 24 ore) e linfociti NK attivati, secondo le ratio E:T indicate, mediante FACS assay. **C.** Analisi dei livelli di IFN-γ in summatnti di co-culture NK - cellule U251 (5:1), valutati mediante test ELISA. (\*p< 0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

### 3.7.3 Effetti di SR141716 in vivo

Per valutare l' efficacia di SR141716 *in vivo*, ne abbiamo testato gli effetti sulla crescita tumorale in un modello xenograft di glioma. Poiché le cellule U251 non hanno mostrato considerevole tumorigenicità in topi nudi, è stata selezionata la linea cellulare U87, largamente utilizzata per studi *in vivo*.

La sospensione cellulare è stata iniettata s.c. in topi nudi e, quando la taglia del tumore ha raggiunto approssimativamente 4-6mm di diametro, gli animali sono stati suddivisi in due gruppi: 12 topi hanno ricevuto iniezioni peritumorali di SR141716 1mg/Kg/dose, ed altri 12 iniezioni del solo veicolo (PBS). Le dimensioni tumorali, misurate a partire dal primo giorno di trattamento (day 1), sono state registrate ogni due settimane, mentre le iniezioni sono state ripetute due volte a settimana per 4settimane. I risultati mostrano che i topi appartenenti al gruppo di controllo hanno sviluppato neoplasie di circa 200 mm<sup>3</sup> in media al giorno 37, mentre i topi trattati con SR141716 hanno sviluppato masse tumorali di grandezze inferiori. Nello specifico, il

giorno 34, 37 e 41, gli animali trattati con SR141716 hanno sviluppato masse tumorali significativamente più piccole rispetto ai topi del gruppo di controllo (**fig.40 A**). Dopo 35 e 41 giorni dall'inizio del trattamento, 4 animali per ogni gruppo sono stati sacrificati per analisi immunohistologiche. L'analisi delle criosezioni di 0.7mm di animali trattati con SR141716, o con il solo PBS, ha rivelato che l'antagonista CB1 induce aumento dei livelli di espressione di MICA rispetto a quanto emerge dagli *staining* effettuati in topi trattati PBS (**fig.40 B**)



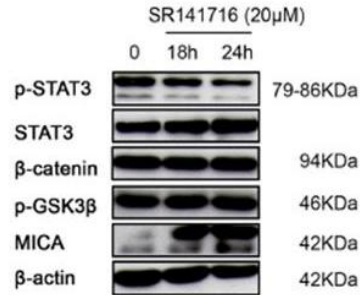
**Figura 40 A.** Effetto di SR141716 sulla crescita di tumori in vivo, ottenuti per inoculazione s.c. di cellule U87 **B.** Analisi dei livelli di espressione di MICA, valutati mediante IHC su criosezioni di massa tumorale, utilizzando uno score da 0 a 5 come indicato nella sezione Materiali e Metodi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3.7.4 Effetti di SR141716 sul pathway di STAT3

La parte finale del nostro studio è stata dedicata all'indagine dei meccanismi molecolari responsabili degli effetti di SR141716.

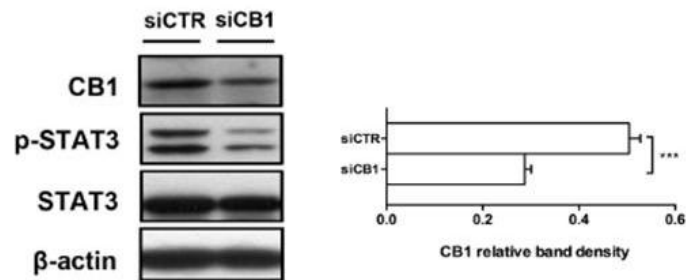
Poiché è noto che sia il *pathway* di *Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$*  (GSK3 $\beta$ )/ $\beta$ -catenina che STAT3 sono implicati nei fenomeni di sopravvivenza cellulare, oltre che nella regolazione dell'espressione delle proteine MIC, ne abbiamo analizzato lo stato di attivazione in seguito a trattamento con SR141716.

Lisati di cellule U251, trattati con SR141716 alla dose di 20 $\mu$ M per 18 e 24 ore, sono stati quindi utilizzati per *immunoblot* al fine di indagare gli effetti dell'antagonista CB1. I risultati dimostrano che l'inibizione farmacologica di CB1 induce aumento dell'espressione di MICA, già a partire da 18h di trattamento, per selettiva riduzione dello stato di fosforilazione del residuo Tyr705 di STAT3, senza modificare i livelli di fosforilazione di GSK3 $\beta$  e di espressione della  $\beta$ -catenina (**fig.41**)



**Figura 41** Effetti di SR141716 alla dose di 20µM, per i tempi indicati, sullo stato di attivazione di STAT3 e sul pathway GSK3β-βcatenin, valutati mediante western blot.

Tali dati indicano, quindi, che SR141716 può effettivamente avere una duplice azione sulla crescita e sull' immunogenicità tumorale attraverso un meccanismo STAT3 mediato. Presupponendo, quindi, che l' overespressione di CB1 corredi con una maggiore attività di STAT3, abbiamo provato a silenziare, nella linea cellulare U251, il recettore per i cannabinoidi con un siRNA. I risultati degli *immunoblot* mostrano che in seguito a silenziamento di CB1, i livelli di fosforilazione di STAT3 appaiono ridotti rispetto ai valori ottenuti trasfettando cellule U251 con una sequenza *scrambled* (fig. 42).



**Figura 42** Analisi dello stato di attivazione di STAT3 in cellule U251 trasfettate con siCB1 o con un siRNA di controllo e valutazione del silenziamento di CB1 mediante WB (\*\*\*P<0.001)

### 3.8 Discussione

I risultati presentati forniscono una nuova visione sulla fisiopatologia del sistema endocannabinoide ed in particolare sul ruolo di CB1 come modulatore positivo dei fenomeni di sopravvivenza cellulare ed *escape* immunologico.

Le funzioni pro-proliferative di tale recettore sono state documentate nei fisiologici processi di neurogenesi, che risultano essere fortemente deregolati in topi *CB1 Knock-out* ed in animali *wild-type* in seguito a trattamento farmacologico con antagonisti selettivi della specifica GPCR (Jin et al. 2004). In linea con tale dato, l' inibizione farmacologica di CB1 riduce sensibilmente la proliferazione cellulare, come evidenziato in carcinomi della mammella, tiroide, colon ed in linfomi mantellari (Bifulco et al. 2007; Malfitano et al. 2012; Gallotta et al. 2010; Santoro et al. 2009; Flygare et al. 2005).

In questo terzo capitolo, abbiamo presentato una nuova funzione per SR141716 nell' ambito di una combinata azione antitumorale: tale molecola, alla concentrazione di 20µM, infatti, è risultata efficace nell' inibire la proliferazione di diversi modelli di glioma, caratterizzati da alti livelli di espressione del recettore per i cannabinoidi di tipo 1. Ulteriori indagini sulla linea di glioma U251, parallelamente alla deregolazione del ciclo cellulare ed all' induzione di apoptosi, hanno evidenziato la capacità di SR141716 di migliorare il riconoscimento immunitario delle cellule tumorali, inducendo l'espressione dei ligandi NKG2D, MICA e MICB, sulla membrana plasmatica delle sole cellule neoplastiche senza alcun effetto sulla controparte normale. L' aumento immunovisibilità rende le cellule di glioma più suscettibili al *killing* specifico ad opera dei linfociti NK, come dimostrato dai saggi di co-cultura.

Gli effetti della molecola sono stati confermati *in vivo*, in modelli *xenograft* di glioma, corroborando il potenziale chemioterapeutico dell' antagonista CB1 e lasciando intravedere nuovi orizzonti sull' uso di questa classe di farmaci come efficaci agenti anticancro. E' infatti ben noto che il punto debole dell' attuale terapia antiglioma resta la mancata totale eradicazione del tumore e quindi la selezione di cellule cancerose resistenti. Agire su molteplici *pathway*, su più bersagli molecolari simultaneamente, potrebbe essere l'approccio più risolutivo e, in questo contesto, l'azione citotossica e l'effetto stimolatorio sulla sorveglianza immunitaria operato da SR141716 rappresenta un' interessante alternativa alla classica chemioterapia. La scoperta di STAT3 come *target* dell' attività di SR141716, nuova in ambito oncologico, ci ha permesso di identificarne il coinvolgimento nel duplice meccanismo molecolare: analisi dell' espressione proteica hanno dimostrato, infatti, che il composto controlla i livelli di MICA/B mediante specifica inibizione dell' attività di STAT3, fattore di trascrizione che regola funzioni oncogeniche ed immunosuppressive (Bromberg et al. 1999; Bedel et al. 2011; Alvarez et al. 2004).

Le recenti evidenze secondo cui la delezione di CB1 a livello astrogliale danneggia l' attivazione leptina-mediata di STAT3 (Bosier et al. 2013) ed i trattamenti di elettroagopuntura aumentano l'attività del fattore trascrizionale con un meccanismo CB1-mediato (Zhou et al. 2013), supportano i nostri dati riguardo l' esistenza di un asse CB1-STAT3, come *network* potenzialmente oncogenico. Abbiamo mostrato che esiste una correlazione direzionale tra CB1 e STAT3: alti livelli di STAT3 fosforilato sul residuo di tirosina 705 sono il risultato dell' overespressione di CB1 che, ancora un volta, si conferma come regolatore del destino cellulare nel tumore.



CB1 però non rappresenta un *unicum*, esistono infatti diversi esempi di GPCRs che se overesprese, sono associati a sviluppo di neoplasie, basti pensare all'oncogene MAS (Janssen et al. 1988) ed al recettore 1c per la serotonina (Julius et al. 1989) nelle linee cellulari di fibroblasti NIH 3T3 o al recettore CB2 nella leucemia mieloide acuta (Alberich Jordà et al. 2004).

In conclusione, i dati raccolti e la documentata capacità della molecola di attraversare la barriera ematoencefalica e penetrare nel SNC ci spingono a rinnovare il nostro interesse per SR141716 come agente chemioterapico capace di indurre un effetto antiglioma, sfruttando un duplice meccanismo d'azione. Poiché differenti aspetti del glioma sono stati separatamente trattati con successo limitato, potrebbe essere interessante trovare un nuovo composto capace di inibire la proliferazione cellulare e rendere il glioma immunovisibile, favorendo il *killing* specifico delle cellule trasformate ad opera del nostro sistema immunitario.

## **IV. Conclusioni**

Negli ultimi dieci anni, per la maggior parte delle neoplasie, la prognosi e la risposta terapeutica hanno fortemente risentito degli avanzamenti tecnologici raggiunti in biologia molecolare. Sebbene il tasso di sopravvivenza di pazienti affetti da tumori cerebrali sia notevolmente aumentato, i trattamenti farmacologici per il glioma appaiono, però, ancora inadeguati ad arginare l'evoluzione di una così devastante patologia. La diagnosi precoce, l'identificazione dei *biomarker* e l'esatta stadiazione della patologia restano gli strumenti fondamentali per fronteggiare il glioma, ma la ricerca di nuove terapie è assolutamente necessaria.

Lo studio delle cellule iniziatrici del glioma ha aperto nuove prospettive all'analisi di potenziali applicazioni terapeutiche innovative e la capacità di BMP4 di modulare la proliferazione tumorale ed il differenziamento della componente staminale, *in vitro* ed *in vivo*, è stata proposta come una promettente strategia antitumorale. In quest'ottica, la capacità dell' N6-isopenteniladenosina di inibire efficacemente la proliferazione cellulare e di controllarne i livelli di espressione, inducendone aumento in modelli di glioma, appare assolutamente interessante. I dati raccolti, ad oggi, sebbene preliminari, suggeriscono infatti la potenzialità antiglioma di una molecola, le cui piccole dimensioni potrebbero ovviare ai problemi di *drug delivery* associati alle patologie cerebrali.

Interessanti sono inoltre gli effetti di un altro composto, l'antagonista CB1, SR141716, che, in modelli di glioma, fanno intravedere un nuovo uso per un "vecchio farmaco". Per la prima volta, infatti, è stata ascrivita, per il noto modulatore negativo di CB1, un ruolo di potente induttore di morte cellulare ed inibitore della crescita tumorale oltre che la sinergica abilità nel rendere le cellule trasformate più suscettibili all'attacco da parte del nostro sistema immunitario e nello specifico ai linfociti NK.

L'analisi di questi nuovi affascinanti aspetti legati al ruolo del sistema endocannabinoidie nel glioma si è tradotta, nel 2015, in una pubblicazione sulla rivista scientifica internazionale *Oncotarget* dal titolo "*Cannabinoid receptor CB1 regulates STAT3 activity and its expression dictates the responsiveness to SR141716 treatment in human glioma patient's cells*" Ciaglia E, Torelli G, Pisanti S, Picardi P, D'Alessandro A, Laezza C, Malfitano AM, Fiore D, Pagano Zottola AC, Proto MC, Catapano G, Gazzo P, Bifulco M., permettendoci di dimostrare l'esistenza di un nuovo asse oncogenico CB1-STAT3.

Il recettore CB1 è un classico esempio di GPCR, una classe di recettori metabotropici espressi a livello della membrana plasmatica ed accoppiati a proteina G; questi rappresenta il recettore più densamente espresso nel SNC sebbene sia presente anche in numerosi distretti periferici, ricoprendo importanti funzioni regolatorie. Gli studi condotti nell'ultimo ventennio ne hanno evidenziato il coinvolgimento in molteplici processi fisiopatologici, con l'interessamento di numerosi *pathway* cellulari, ma, solo nel Marzo 2012, ne è stata dimostrata una nuova localizzazione subcellulare: la membrana mitocondriale.

Il team del Dott. Giovanni Marsicano ha identificato, nel sistema nervoso centrale, la presenza di CB1 anche a livello mitocondriale (mtCB1), descrivendone il suo ruolo di modulatore del metabolismo energetico cellulare. La stimolazione di mtCB1, induce infatti regolazione dell'attività OXPHOS di cellule neuronali, riducendone la respirazione attraverso un meccanismo mediato dal *Gi-protein signaling* mitocondriale.

Alterazioni mitocondriali e metabolismo energetico aberrante sono stati evidenziati nel glioma, ma lo studio di tali disfunzioni resta un ambito di ricerca ancora tutto da indagare. La recente correlazione tra metabolismo e cancro, nonché il coinvolgimento dei mitocondri nei processi di produzione di energia, apoptosi e regolazione dello

---

stato redox della cellula, potrebbe quindi suggerire un ruolo del recettore intracellulare a localizzazione mitocondriale nel processo oncogenico, rendendo tali organelli un interessante *target* terapeutico. Ad oggi non é possibile escludere che parte degli effetti riportati in questo studio, per un antagonista CB1 come SR141716, possano essere dovuti al coinvolgimento di mtCB1. Dimostrare quale delle due forme recettoriali, tra CB1 e mtCB1, sia coinvolta negli effetti biologici di agonisti ed antagonisti é però molto complesso e rappresenta la nuova sfida raccolta dal gruppo di Ricerca del Prof. Maurizio Bifulco e dal Team “Endocannabinoids and Neuroadaptation” diretto dal Dott. Giovanni Marsicano.

Presso i nostri laboratori, sono in corso analisi per caratterizzare l’ espressione di mtCB1 in modelli cellulari e linee primarie di glioma oltre che il disegno di nuovi strumenti per indagarne il coinvolgimento dapprima in modelli fisiologici e poi in condizioni patologiche. Sfruttando la tecnologia DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs), e quindi l’ utilizzo di GPCR ingegnerizzate, stiamo, infatti, creando nuovi prototipi molecolari per studiare l’ attività dei recettori accoppiati a proteina G a livello mitocondriale.

# **Bibliografia**

- Abou-Ghazal M, Yang DS, Qiao W et al. (2008) The incidence correlation with tumor-infiltrating inflammation and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas. *Clin Cancer Res*, 14 8228–8235
- Ahmed N, Salsman VS, Kew Y et al. (2010) HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clin Cancer Res*, 16(2)474–485
- Ailles LE and Weissman IL. (2007) Cancer stem cells in solid tumors. *Current Opinion in Biotechnology*, vol 18 no 5 pp 460–466 2007
- Akira S (2000) Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene*, 19 2607–2611
- Alberich Jordà M, Rayman N, Tas M et al. (2004) The peripheral cannabinoid receptor Cb2 frequently expressed on AML blasts either induces a neutrophilic differentiation block or confers abnormal migration properties in a ligand-dependent manner. *Blood*, 104526–34
- Albesiano E, Han JE and Lim M. (2010) Mechanisms of local immunoresistance in glioma. *Neurosurg Clin N Am*, 21(1)17–29
- Almestrand S, Wang X, Jeppsson-Ahlberg Å et al. (2015) Influence of rimonabant treatment on peripheral blood mononuclear cells flow cytometry analysis and gene expression profiling. *PeerJ*, 303e1056
- Altaner C. (2008) Glioblastoma and stem cells. *Neoplasma*, 55(5):369-74.
- Alvarez JV and Frank DA. (2004) Genome-wide analysis of STAT target genes elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis. *Cancer Biol Ther*, 31045–50
- Aoki Y, Feldman GM and Tosato G. (2003) Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood*, 101 1535–1542
- Ashktorab H, Belgrave K, Hosseinkhah F, Brim H, Nouraie M, Takkikto M et al. (2009) Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, 54 2109–17
- Astot C, Dolezal K, Nordstrom A, Wang Q, Kunkel T, Moritz T, Chua N, and Sandberg G. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 14778
- Avril T, Saikali S, Vauleon E et al. (2010) Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 23-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions. *J Neuroimmunol*, 225(1–2)22–33
- Bacci A, Huguenard JR, Prince DA. (2004) Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature*, 431312–316

- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 271–4
- Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E et al. AZD2171 a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*, 11 83–95
- Bedel R, Thiery-Vuillemin A, Grandclement C et al. (2011) Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells. *Cancer Res*, 711615–26
- Bénard G, Massa F, Puente N et al. (2012) Mitochondrial CB<sub>1</sub> receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat Neurosci*, 415558-64
- Benchabane H and Ahmed Y. (2009) The adenomatous polyposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. *Advanced in Experimental Medicine and Biology*, 656 75-84
- Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A et al. (2003) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acip30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol*, 63(4)908-14
- Bhaumik SR, Smith E, and Shilatifard A. (2007) Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nature structural & molecular biology*, 14 11
- Bifulco M, Grimaldi C, Gazzero P et al. (2007) Rimonabant: just an antiobesity drug? Current evidence on its pleiotropic effects. *Mol Pharmacol*, 711445–56
- Bifulco M, Laezza C, Portella G et al. (2001) Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene-dependent tumor growth. *FASEB J*, 152745–2747
- Bifulco M, Laezza C, Valenti M et al. (2004) A new strategy to block tumor growth by inhibiting endocannabinoid inactivation. *FASEB J*, 18 1606–1608
- Birner P, Toumangelova-Uzeir K, Natchev S et al. (2010) STAT3 tyrosine phosphorylation influences survival in glioblastoma. *J Neurooncol*, 100 339–343
- Bjornsti MA and Houghton PJ. (2004) Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer. *Cancer Cell*, 5 519-523
- Blattman JN and Greenberg PD. (2004) Cancer immunotherapy a treatment for the masses. *Science*, 305(5681)200-205
- Blázquez C, Sánchez C, Daza A, Galve-Roperh I, Guzmán M. (1999) The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *The Journal of Neurochemistry*, 721759–1768
- Blumenthal DT, Cannon-Albright LA. (2008) Familiarity in brain tumors. *Neurology*, 71(13)1015-20

- Bond RA, Ijzerman AP. (2006) Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonist and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, 27 92 -96
- Bosier B, Bellocchio L, Metna-Laurent M et al.(2013) Astroglial CB1 cannabinoid receptors regulate leptin signaling in mouse brain astrocytes. *Mol Metab*, 2393–404
- Bosier B, Bellocchio L, Metna-Laurent M, Soria-Gomez E, Matias I, Hebert-Chatelain E, Cannich A, Maitre M, Leste-Lasserre T, Cardinal P, Mendizabal-Zubiaga J, Canduela MJ, Reguero L, Hermans E, Grandes P, Cota D, Marsicano G. (2013) Astroglial CB1 cannabinoid receptors regulate leptin signaling in mouse brain astrocytes. *Mol Metab*, 2393–404
- Bouaboula M, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. (1995) Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 27013973–13980
- Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L et al. (1997) A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1 Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J Biol Chem*, 27222330–22339
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P. (1996) Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. *European Journal of Biochemistry*, 237704–11
- Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D et al. (2001) Stat3-mediated myc expression is required for src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 7319–7324
- Brandy HJM and Gill-Gomez G.(1998) Molecules in focus Bax The pro-apoptotic Bcl-2 family member Bax. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30 6 647-650
- Brantley EC and Benveniste EN. (2008) Signal transducer and activator of transcription-3 a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Molecular Cancer Research*, 6(5)675-84
- Bravo-Cordero JJ, Magalhaes MAO, Eddy RJ ,Hodgson L and Condeelis J(2013). Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 405–415
- Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol*, 60(1)155–63
- Briggs SD, Xiao T, Sun ZW, Caldwell JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD and Strahl BD. (2002) Gene silencing trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature*, 418 498
- Bromberg J and Darnell JE Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, 19 2468–2473



- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G et al. (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98295–303
- Buettner R, Mora LB and Jove R. (2002) Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular target for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 8 945–954
- Bullain SS, Sahin A, Szentirmai O et al. (2009) Genetically engineered T cells to target EGFRvIII expressing glioblastoma. *J Neurooncol*, 94(3)373-82
- Burns DM, Rodi CP and Agris PF. (1976) Natural occurrence of an inhibitor of mammalian cell growth in human and mouse cells of normal and tumor origin. *Cancer Biochem Biophys*, 1 269
- Caffarel MM, Andradas C, Mira E, Pérez-Gómez E, Cerutti C, Moreno-Bueno G, Flores JM, García-Real I, Palacios J, Mañes S, Guzmán M, Sánchez C. (2010) Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Molecular Cancer*, 9196
- Cairncross G, Berkey B, Show E, et al. (2006) Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy to compared to radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma : Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol*, 24(18)2707-14
- Canals M, Milligan G. (2008) Constitutive activity of the cannabinoid CB1 receptor regulates the function of co-expressed mu opioid receptors. *J Biol Chem*, 283 11424-34
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathway. *Nature* 4551061
- Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blazquez C, Garcia S, Giroux V, Malicet C, Villuendas R, Gironella M, Gonzalez-Feria L, et al. (2006) The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell*, 9(4)301–12
- Caruso MG, Notarnicola M, Bifulco M, Laezza C, Guerra V, Altomare DF, Memeo V, Lo Russo D, Demma I and Di Leo A. (2003) Increased Farnesyltransferase activity in human colorectal cancer Relationship with clinicopathological features K-ras mutation Scandinavian. *J Gastroenterol*, 38 80 5
- Castillo PE, Younts TJ, Chavez AE, Hashimoto Y. (2012) Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 7670–81
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM et al. (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10 105–115
- Chakravarti A, Noll E, Black PM et al. (2002) Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol*, 20 1063–1068

- Chandler KJ, Chandler RL and Mortlock DP. (2009) Identification of an ancient Bmp4 mesoderm enhancer located 46 kb from the promoter. *Dev Biol*, 327(2):590-602
- Chandrasekharan MB, Huang F and Zu-Wen Sun. (2010) Histone H2B ubiquitination and beyond. *Epigenetics*, 5 6 460-468
- Chandrasekharan MB, Huang F and Zu-Wen Sun. (2011) Decoding the trans-histone crosstalk Methods to analyze H2B ubiquitination H3 methylation and their regulatory factors. *Methods*, 54 304–314
- Chen F, Xu Y, Luo Y et al. (2010) Down-regulation of Stat3 decreases invasion activity and induces apoptosis of human glioma cells. *J Mol Neurosci*, 40 353–359
- Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM et al. (2010) A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*, vol 17 no 4 pp 362–375 2010
- Cheng F, Wang HW, Cuenca A et al. (2003) A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity*, 19 425-436
- Chinot OL, Wick W, Cloughesy T. (2014) Bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*, 70(21) 2049
- Chinot OL, Wick W, Mason W et al. (2014) Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, vol. 370, no. 8, pp. 709–722
- Chiu CY, Kuo KK, Kuo TL et al. (2012) The activation of MEK/ERK signaling pathway by bone morphogenetic protein 4 to increase hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. *Mol Cancer Res*, 10:415e427
- Christopoulou FD and Kiortsis DN. (2011) An overview of the metabolic effects of rimonabant in randomized controlled trials potential for other cannabinoid 1 receptor blockers in obesity. *J Clin Pharm Ther*, 3610–18
- Ciaglia E, Pisanti S, Picardi P et al. (2013) N6-isopentenyladenosine an endogenous isoprenoid end product directly affects cytotoxic and regulatory functions of human NK cells through FDPS modulation. *J Leukoc Biol*, 94(6)1207-19
- Collum RG, Brutsaert S, Lee G et al. (2000) A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 10120–10125
- Compton DR, Aceto MD, Lowe J et al. (1996) In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A) inhibition of Astetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 277586–594
- Constam DB and Robertson EJ. (1999) Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol*, 11;144(1):139-49
- Corasaniti MT, Strongoli MC, Piccorolli S, Nistico R, Costa A, Bilotta A, Turano P, Finazzi-Agro A and Bagetta G. (2000) Apoptosis induced by gp120 in the neocortex of rat involves enhanced expression of cyclooxygenase type 2 and is prevented by NMDA receptor antagonists and by the 21-aminosteroid U-74389G. *Biochem Biophys Res Commun*, 274 664–669

- Cota D, Marsicano G, Tschöp M et al. (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*, 112:423-31
- Dai J, Keller J, Zhang J et al. (2005) Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism *Cancer Res*, 65:8274e8285
- De Vries NA, Beijnen JH, Boogerd W et al. (2006) Blood–brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother*, 2006 6(8):1199–1209
- Deng H, Makizumi R, Ravikumar TS et al. (2007) Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells. *Exp Cell Res*, 313:1033e1044
- Deng H, Ravikumar TS and Yang WL (2009) Overexpression of bone morphogenetic protein 4 enhances the invasiveness of Smad4-deficient human colorectal cancer cells. *Cancer Lett*, 281:220e231
- Derocq JM, Bouaboula M, Marchand J et al. (1998) The endogenous cannabinoid anandamide is a lipid messenger activating cell growth via a cannabinoid receptor-independent pathway in hematopoietic cell lines. *FEBS Lett*, 425:419–425
- Despres JP, Golay A and Sjöström L (2005) Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*, 353 2121-34
- Despres JP, Ross R, Boka G et al. (2008) Rimonabant reduces both intra-abdominal adiposity and liver fat and improves cardiometabolic risk factors the ADAGIO-LIPIDS trial. The 77th European Atherosclerosis Society Congress Istanbul Turkey April 26 – 29 2008
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 182:581946-9
- Dhar KM, Koul A and Kaul S. (2012) Farnesyl pyrophosphate synthase a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development. *New Biotechnology*
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3:771-784
- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L et al. (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, 414:106830)8225
- Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR, Brotchie JM. (2000) Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J*, 14:1432–1438
- Di Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E et al. (2010) Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res*, 16(3):800–813

Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M et al. (2002) Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol*, 3 1142-1149

Dirheimer G, Baranowski W and Keith G. (1995) Variations in tRNA modifications, particularly of their queuine content in higher eukaryotes. Its relation to malignancy grading. *Biochimie*, 77 99

Divekar AY, Slocum HK and Hakala MT. (1974) N<sup>6</sup>-(delta<sup>2</sup>-isopentenyl)adenosine 5'-monophosphate: formation and effect on purine metabolism in cellular and enzymatic systems. *Mol Pharm*, 10 529

Duggal R, Geissinger U. Zhang Q et al. (2013) Vaccinia virus expressing bone morphogenetic protein-4 in novel glioblastoma orthotopic models facilitates enhanced tumor regression and long-term survival. *Journal of Translational Medicine*, vol. 11, no. 1, article 155

Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B, Konarska L. (2005) Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signalling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cell Signal*, 17(1)25–37

EMA. Press Release, London, 23 October 2008

Engeli S. (2008) Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *J Neuroendocrinol*, 20110–115

Facoetti A, Nano R, Zelini P et al. (2005) Human leukocyte antigen and antigen processing machinery component defects in astrocytic tumors. *S Clin Cancer Res*, 11(23)8304-11

Fajkus J, Fulneckova J, Hulanova M, Berkova K, Riha K and Matyasek R. (1998) Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere lengths. *Mol Gen Genet*, 260 470

Fan QW, Knight ZA, Goldenberg DD et al. (2006) A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell*, 9 341–349

Faust JR and Dice JF. (1991) Evidence for isopentenyladenine modification on a cell cycle-regulated protein. *J Biol Chem*, 266 9961

Feig LA and Buchsbaum RJ. (2002) Cell Signaling Life or Death Decisions of Ras Proteins. *Current Biology*, 12 R259–R261

Felder CC, Joyce KE, Briley EM et al. (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. *Mol Pharmacol*, 48443–450

Flygare J, Gustafsson K, Kimby E et al. (2005) Cannabinoid receptor ligands mediate growth inhibition and cell death in mantle cell lymphoma. *FEBS Lett*, 5796885–6889

- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G et al. (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, 37391–400
- Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N et al. (2009) Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*, 69(9)4010–4017
- Gabrilovich D (2004) Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology*, 4(12)941–952
- Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR et al. (1996) Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*, 2 1096–1103
- Gallo RC, Whang-Peng J and Perry S. (1969) Isopentenyladenosine stimulates and inhibits mitosis of human lymphocytes treated with phytohemagglutinin. *Science*, 165 400
- Gallotta D, Nigro P, Cotugno R et al. (2010) Rimonabant-induced apoptosis in leukemia cell lines activation of caspase-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol*, 180(3)370-80
- Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M. (2000) Anti-tumoral action of cannabinoids involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal regulated kinase activation. *Nature Medicine*, 6313–319
- Gaoni Y, Mechoulam R. (1964) Isolation Structure and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*, 1646–1647
- Garcia-Gutierrez MS and Manzanares J. (2010) The cannabinoid CB1 receptor is involved in the anxiolytic sedative and amnesic actions of benzodiazepines. *J Psychopharmacol*, 24 757–765
- Gargalionis AN, Piperi C, Adamopoulos C and Papavassiliou AG. (2012) Histone modifications as a pathogenic mechanism of colorectal tumorigenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44 1276-1289
- Gary-Bobo M, Elachouri G, Scatton B et al. (2006) The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits cell proliferation and increases markers of adipocyte maturation in cultured mouse 3T3 F442A preadipocytes. *Mol Pharmacol*, 69471–478
- Gasser S, Orsulic S, Brown EJ et al. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*, 436 1186-1190
- Gazzerro P, Malfitano AM, Proto MC et al. (2010) Synergistic inhibition of human colon cancer cell growth by the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant and oxaliplatin. *Oncol Rep*, 23(1)171-5.

- Gazzerro P, Proto MC, Gangemi G, Malfitano AM, Ciaglia E, Pisanti S, Santoro A, Laezza C and Bifulco M. (2012) Pharmacological Actions of Statins A critical Appraisal in the Management of Cancer. *Pharmacological Reviews*, 64 102-146
- Gifford AN and Ashby CR. (1996) Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist WIN 55212-2 and is potentiated by the cannabinoid antagonist SR 141716A. *J Pharmacol Exp Ther*, 277:1431-1436
- Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS et al. (2014) A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, vol. 370, no. 8, pp. 699-708
- Gilfillan S, Ho EL, Cella Met al. (2002) NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol*, 2002 3 1150-1155
- Golovko A, Hjalms G, Sitbon F and Nicander B. (2000) Cloning of a human tRNA isopentenyl transferase. *Gene*, 258 85
- Gómez R, Navarro M, Ferrer B et al. (2002) A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci*, 22:9612-7
- González-Gómez P, Anselmo NP and Mira H (2014) BMPs as Therapeutic Target and Biomarkers in Astrocytic Glioma. *Biomed Res Int* 2014;2014:549742.
- Greasley PJ, Clapham JC. (2006) Inverse agonism or neutral antagonism at G-protein coupled receptors a medicinal chemistry challenge worth pursuing? *Eur J Pharmacol*, 553 1-9
- Grimaldi C, Pisanti C, Laezza C et al. (2006) Anandamide inhibits adhesion and migration of breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 312:363-373
- Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ et al. (1982) Lymphokine-activated killer cell phenomenon Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*, 1982 155(6):1823-1841
- Guerra N, Tan YX, Joncker NT et al. (2008) NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*, 28 571-580
- Haefner B. (2002) NF- $\kappa$ B Arresting a major culprit in cancer. *Drug Discov Today*, 2 653-663
- Hampp C, Hartzema AG and Kauf TL. (2008) Cost-utility analysis of rimonabant in the treatment of obesity. *Value Health*, 11(3):389-99
- Han J, Kesner P, Metna-Laurent M, Duan T, Xu L, Georges F, Koehl M, Arous N, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Liu Q, Bai G, Wang W, Xiong L, Ren W, Han SJ,
- Haramis AP, Begthel H, van den Born M et al. (2004) De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine *Science*, 303:1684e1686

- Hari Reddi. (1992) Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Current Opinion in Cell Biology* vol 4 no 5 pp 850–855 1992
- He H and Lehming N. (2003) Global effects of histone modification. *Briefings in functional genomics and proteomics*, 2 3 234–243
- Heness S, Robinson DM and Lyseng-Williamson KA. (2006) Rimonabant. *Drugs*, 66 2109 -19
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD et al. (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 871932-6
- Hill MN and Gorzalka BB. (2005) Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur Neuropsychopharmacol*, 15593–599
- Hinz B, Ramer R, Eichele K, Weinzierl U, Brune K. (2004) R(+)-methanandamide-induced cyclooxygenase-2 expression in H4 human neuroglioma cells possible involvement of membrane lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun*, 324 621–626
- Hirano T, Ishihara K and Hibi M. (2000) Roles of STAT3 in mediating the cell growth differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene*, 19 2548–2556
- Hodge DR, Hurt EM and Farrar WL. (2005) The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer*, 41 2502–2512
- Houchins JP, Yabe T, McSherry C et al. (1991) DNA sequence analysis of NKG2 a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med*, 173 1017-1020
- Houlston RS, Webb E, Broderick P et al. (2008) Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet*, 40:1426e1435
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI et al. (2002) International Union of Pharmacology XXVII Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54161-202
- Howlett AC, Blume LC, Dalton GD. (2010) CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr Med Chem*, 171382–1393
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology 30 years of progress. *Neuropharmacology*, 345-58
- Hu X, Pandolfi PP, Li Y Koutcher et al. (2005) mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by pten/AKT signaling in glioblastoma. *Neoplasia*, 7 356–368
- Humphries W, Wei J, Sampson JH et al. (2010) The role of Tregs in glioma-mediated immunosuppression potential target for intervention. *Neurosurg Clin N Am*, 21(1)125–137

- Idris AI and Ralston SH. (2012) Role of cannabinoids in the regulation of bone remodeling. *Front Endocrinol*, 3136
- Imai C, Mihara K, Andreansky M et al. (2004) Chimeric receptors with 4–1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18(4)676–684
- Inda MM, Bonavia R, Mukasa A et al. (2010) Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev*, 24 1731–1745
- Ishii Y, Hori Y, Sakai S and Honma Y. (2002) Control of differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cells by cytokinins and cytokinin nucleosides, plant redifferentiation-inducing hormones. *Cell Growth Differ*, 13 19
- Ishii Y, Kasukabe T and Honma Y Br J (2005) Induction of CCAAT/enhancer binding protein-delta by cytokinins, but not by retinoic acid, during granulocytic differentiation of human myeloid leukaemia cells. *Haematol* 128540
- Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K et al. (2004) Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res*, 24(3b)1861–1871
- Izzo AA and Camilleri M. (2008) Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases basic and clinical aspects. *Gut*, 571140-55
- Jacobs SK, Wilson DJ, Kornblith PL et al. (1986) Interleukin-2 or autologous lymphokine activated killer cell treatment of malignant glioma Phase I trial. *Cancer Res*, 46(4 Pt 2) 2101–2104
- Jacobsson SO, Wallin T and Fowler CJ. (2001) Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids : Relative involvement of cannabinoid and vanilloid receptors. *JParmacol Exp Ther*, 299 951–959
- Janero DR and Makriyannis A. (2009) Cannabinoid receptor antagonists: pharmacological opportunities, clinical experience, and translational prognosis. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 14:1, 43-65
- Janssen JW, Steenvoorden AC, Schmidtberger M et al. (1988) Activation of the mas oncogene during transfection of monoblastic cell line DNA. *Leukemia*, 2318–320
- Japerson KW, Tuohy TM, Neklason DW and Burt RW. (2010) Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*, 138 6 2044-2058
- Jenuwein T and Allis CD. (2001) Translating the Histone. *Code Science*, 293
- Jin K, Xie L, Kim SH et al. (2004) Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*, 66204–8
- Johnsen SA. (2012) The enigmatic role of H2Bub1 in cancer. *FEBS Letters*, 586 1592–1601



- Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME et al. (2009) Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and target normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 114(3)535–546
- Jordan TML, Guzman and Noble M. (2006) Cancer stem cells. *The New England Journal of Medicine*, vol 355 no 12 pp 1253–1261
- Juan-Picó P, Fuentes E, Bermúdez-Silva FJ et al. (2006) Cannabinoid receptors regulate  $Ca^{2+}$  signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium*, 39:155-62
- Julius D, Livelli TJ, Jessell TM et al. (1989) Ectopic expression of the serotonin 1c receptor and the triggering of malignant transformation. *Science*, 244:1057–1062
- Kahlon KS, Brown C, Cooper LJ et al. (2004) Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13- $\zeta$  kine redirected cytolytic T cells. *Cancer Res*, 64(24):9160–9166
- Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S et al. (2003) Expression of survivin in astrocytic tumors: Correlation with malignant grade and prognosis. *Cancer*, 97: 1077–1083
- Kaleem A, Wahajat T, Ahmad I, Hoessli DC, Walker-Nasir E, Qazi WM, Shakoori AR and Nasir Ud Din. (2006) Regulation of Apoptosis by Histone H2B Modifications. *Pakistan J Zool*, 38 4 305-312
- Kallioniemi A. (2012) Bone morphogenetic protein 4-a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genetics*, vol 205 no 6 pp 267–277
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, 89:309–380
- Karl T, Cheng D, Garner B, Arnold JC. (2012) The therapeutic potential of the endocannabinoid system for Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Target*, 16(4):407-20
- Katzung BG, Masters SB and Trevor. (2011) *Farmacologia generale e clinica*. Piccin
- Kaur G, Yang I et al. (2010) Biologic principles of immunotherapy for malignant gliomas. *Neurosurg Clin N Am*, 21(1):1–16
- Khan-Farooqi HR, Prins RM and Liao LM. (2005) Tumor immunology immunomics and targeted immunotherapy for central nervous system malignancies. *Neurol Res*, 27(7) 692–702
- Kim JE, Patel M, Ruzevick J, Jackson CM and Lim M. (2014) STAT3 Activation in Glioblastoma: Biochemical and Therapeutic Implications. *Cancers*, 6, 376-395
- Kim JS, Crooks H, Dracheva T et al. (2002) Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res*, 62:2744e2748
- Kim M and Choe S (2011) BMPs and their clinical potentials. *BMB Reports*, vol 44 no 10 pp 619–634

- Kim SG, Park HR, Min SK et al. (2011) Expression of bone morphogenic protein-4 is inversely related to prevalence of lymph node metastasis in gastric adenocarcinoma. *Surg Today*,41:688e692
- Kintscher U. (2008) The cardiometabolic drug rimonabant after 2 years of RIO-Europe and Stradivarius. *Eur Heart J* 29 1709-10
- Köfalvi A (2010) Cannabinoids and the brain. Springer
- Kohsaka S, Wang L, Yachi K et al. (2012) STAT3 inhibition overcomes temozolomide resistance in glioblastoma by downregulating MGMT expression. *Mol Cancer Ther*, 11 1289–1299
- Kortylewski M, Kujawski M, Wang T et al. (2005) Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* 11 1314-1321
- Kortylewski M, Kujawski M, Wang T et al. (2005) Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, 11 1314–1321
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N et al. (2010) Robbins e Cotran - Le basi patologiche delle malattie. Elsevier
- Kunos G, Osei-Hyiaman D, Liu J et al. (2008) Endocannabinoids and the control of energy homeostasis. *J Biol Chem*, 283 33021-5
- Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR et al. (2001) A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme prognosis extent of resection and survival. *J Neurosurg*, 95190-8
- Laezza C, Caruso MG, Gentile T, Notarnicola M, Malfitano AM, Di Matola T, Messa C, Gazzero P and Bifulco M. (2009) N6-isopentenyladenosine inhibits cell proliferation and induces apoptosis in a human colon cancer cell line DLD1. *Int J Cancer*, 124 1322-1329
- Laezza C, Di Marzo V and Bifulco M. (1998) v-K-ras leads to preferential farnesylation of p21ras in FRTL-5 cells Multiple interference with the isoprenoid pathway. *Cell Biology*, 95 13646-13651
- Laezza C, Magliaro A, Cerbone R, Tedesco I, Santillo MR, Garbi C and Bifulco M. (1997) N6-isopentenyladenosine affects cAMP-dependent microfilament organization in FRTL-5 thyroid cells. *Experimental Cell Research*, 234 178-182
- Laezza C, Malfitano AM, Di Mantola T, Richhi P and Bifulco M. (2010) Involvement of Akt/NF-κB Pathway in N6-isopentenyladenosine-induced apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Molecular Carcinogenesis*, 48 892-901
- Laezza C, Notarnicola M, Caruso MG, Messa C, Macchia M, Bestini S, Minatolo F, Portella G, Fiorentino L, Stingo S and Bifulco M. (2006) N6-isopentenyladenosine arrest tumor cell proliferation by inhibiting farnesyl diphosphate synthase and protein prenylation. *FASEB J*, 20 412

- Lampson LA (2003) Brain tumor immunotherapy an immunologist's perspective. *J Neurooncol*, 64(1–2) 3–11
- Landsman RS, Burkey TH, Consroe P et al. (1997) SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol*, 334R1–R2
- Lang R, Patel D, Morris JJ et al. (2002) Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *Journal of Immunology*, 169(5)2253–2263
- Laten HM and Zahareas-Doktor S. (1985) Presence and source of free isopentenyladenosine in yeasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82 1113
- Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL and Rich JN. (2015) Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev*, 29(12): 1203–1217
- Lau ATY, Lee S, Xu Y, Zheng D, Cho Y, Zhu F, Kim H, Li S, Zhang Z, Bode AM and Dong Z. (2011) Phosphorylation of Histone H2B Serine 32 Is Linked to Cell Transformation. *J Biol Chem*, 286 30 26628–26637
- Laws ER, Parney IF, Huang W et al. (2003) Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma data from the Glioma Outcome Project. *J Neurosurg*, 99466-3
- Leen AM, Rooney CM and Foster AE. (2007) Improving T cell therapy for cancer. *Ann Rev Immunol*, 25243-265
- Leterrier C, Lainé J, Darmon M, et al. (2006) Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J Neurosci*, 26 3141 -53
- Levy DE and Darnell JE Jr. (2002) Stats Transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 651–662
- Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, Klosterkötter J, Hellmich M, Koethe D, (2012) Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 2e94
- Liu B, Chen Q, Tian D et al. (2013) BMP4 reverses multidrug resistance through modulation of BCL-2 and GDNF in glioblastoma. *Brain Research*, vol. 1507, pp. 115–124
- Ljunggren HG and Malmberg KJ. (2007) Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*, 7(5)329-339
- Lo HW, Cao X, Zhu H et al. (2008) Constitutively activated STAT3 frequently coexpresses with epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas and targeting STAT3 sensitizes them to irressa and alkylators. *Clin Cancer Res*, 14 6042–6054
- Lombardo Y, Scopelliti A, Cammareri P et al. (2011) Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice *Gastroenterology*;140:297e309

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. (2007) The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. *Acta Neurophatol*, 11497-109
- Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ et al. (2015) Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 16523(7560)337-41
- Lubbe SJ, Pittman AM, Matijssen C et al.(2011) Evaluation of germline BMP4 mutation as a cause of colorectal cancer. *Hum Mutat*, 32:E1928eE1938
- Lubbe SJ, Pittman AM, Olver B et al. (2012) The 14q222 colorectal cancer variant rs4444235 shows cis-acting regulation of BMP4. *Oncogene*.
- Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M et al. (2000) Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem*, 27531938–31945
- Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G and Finazzi-Agro A. (2000) Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors : Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *JBiol Chem*, 275 31938–31945
- Mach F, Montecucco F, Steffens S. (2008) Cannabinoid receptors in acute and chronic complications of atherosclerosis. *Br J Pharmacol*, 153290–298
- Maegdefrau U, Amann T, Winklmeier A, Braig S, Schubert T, Weiss TS, Schardt K, Warnecke C, Hellerbrand C and Bosserhoff AK. (2009) Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression. *J Pathol.*, 218(4):520-9
- Malfitano AM, Ciaglia E, Gangemi G, Gazerro P, Laezza C, Bifulco M. (2011) Update on the endocannabinoid system as an anticancer target. *Expert Opin Ther Target*, 15(3)297-308
- Malfitano AM, Laezza C, Galgani M et al. (2012) The CB1 receptor antagonist rimonabant controls cell viability and ascitic tumour growth in mice. *Pharmacol Res*, 65365–71
- Mallat A and Lotersztajn S. (2006) Endocannabinoids as novel mediators of liver diseases. *J Endocrinol Investig*, 2958–65
- Marincsák R, Tóth BI, Czifra G, Márton I, Réd P, Tar Tóth L, Kovács L, Bíró T. (2009) Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Oral Dis*, 15(5)328-35
- Marsicano G and Lutz B. (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*, 114213-25
- Marsicano G, Kuner R. (2008) Anatomical distribution of receptors ligands and enzymes in the brain and the spinal cord circuitries and neurochemistry. *Cannabinoids and the brain*, 161–202
- Marsicano G, Zhang X. (2012) Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*, 1481039–105

- Martin D et al. (2007) Mitochondrial targeting of farnesyl diphosphate synthase is a widespread phenomenon in eukaryotes. *Biochim Biophys Acta*, 1773 419-426
- Martin-Belmonte F and Perez-Moreno M.(2011) Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer*, 12:23e38
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P et al. (2006) Regulation function and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 913171-80
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 9346561-4
- Mazón Peláez I, Kalogeropoulou M, Ferraro A, Voulgaria A, Pankotaib T, Borosc I and Pintzasa A. (2010) Oncogenic RAS alters the global and gene-specific histone modification pattern during epithelial–mesenchymal transition in colorectal carcinoma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42 911–920
- Mazzoleni S, Politi LS, Pala M et al. (2010) Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer Research* vol 70 no 19 pp 7500–7513
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR et al. (1995) Identification of an endogenous 2- monoglyceride present in canine gut that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 295083-90
- Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I et al. (2005) Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*, 353 2012–2024
- Meng F, Liu L, Chin PC and D’Mello SR. (2002) Akt is a downstream target of NF-kappaB. *J Biol Chem*, 277 28674-29680
- Migheli F and Migliore L. (2012) Epigenetics of colorectal cancer. *Clin Genet*, 81312–318
- Migliore L, Migheli F, Spisni R, and Coppedè F. (2010) Genetics Cytogenetics and Epigenetics of Colorectal Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011 :792362
- Milone MC, Fish JD, Carpenito C et al. (2009) Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol Ther*, 17(8)1453–1464
- Minsky N, Shema E, Field Y, Schuster M, Segal E, Oren M. (2008) Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat Cell Biol*, 10(4):483-8
- Mitchell DA and Sampson JH. (2009) Toward effective immunotherapy for the treatment of malignant brain tumors. *Neurotherapeutics*, 6(3)527–538

- Mittelman A, Evans JT and Chheda GB (1975) Cytokinins as chemotherapeutic agents. *Ann NY Acad Sci*, 255 225
- Mizoguchi M, Betensky RA, Batchelor TT et al. (2006) Activation of STAT3 MAPK and AKT in malignant astrocytic gliomas Correlation with EGFR status tumor grade and survival. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 1181–1188
- Mok DWS, Mok MC. (1994) Cytokinins Chemistry Activity and Function. Ed CRC Press Boca Raton FL, 155-166
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martin A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. (2002) Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival involvement of cannabinoid receptor and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *The Journal of Neuroscience*, 22(22) 9742–9753
- Montecucco F and Di Marzo. (2012) At the heart of the matter the endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction. *Trends Pharmacol Sci*, 33(6)331-40
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 236561-5
- Na HK and Surh YJ. (2002) Induction of cyclooxygenase-2 in Ras-transformed human mammary epithelial cells undergoing apoptosis. *Ann NY Acad Sci*, 973 153–160
- Navarrete M and Araque A. (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, 57883–893
- Navarrete M and Araque A. (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*, 68113–126
- Nishanian TG Kim JS Foxworth A et al. (2004) Suppression of tumorigenesis and activation of Wnt signaling by bone morphogenetic protein 4 in human cancer cells *Cancer Biol Ther*, 3:667e675
- Nishikawa H, Kato T, Tawara I et al. (2005) IFN-gamma controls the generation/activation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in antitumor immune response. *J Immunol*, 175 4433-4440
- Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K et al. (2008) Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA*, 299 1547-60
- Nithipatikom K, Endsley MP, Isbell MA, Falck JR, Iwamoto Y, Hillard CJ, Campbell WB. (2004) 2-Arachidonoylglycerol a novel inhibitor of androgen-independent prostate cancer cell invasion. *Cancer Res*, 648826-30
- Notarnicola M, Messa C, Cavallini A, Bifulco M, Tecce MF, Eletto D, Di Leo A, Montemurro S, Laezza C and Caruso MG. (2004) Higher farnesyl diphosphate synthase activity in human colorectal cancer inhibition of cellular apoptosis. *Oncology*, 675-6 351-358

- Oka A. (2003) New insights into cytokinins. *J Plant Res*, 116 217
- Okada H, Low KL, Kohanbash G et al. (2008) Expression of glioma-associated antigens in pediatric brain stem and non-brain stem gliomas. *J Neurooncol*, 2008 88(3) 245-250
- Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P. (2006) Adiponectin a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci*, 110(3)267-78
- Oliveira da Cruz JF, Robin LM, Drago F, Marsicano G, Metna-Laurent M. (2015) Astroglial type-1 cannabinoid receptor (CB1): A new player in the tripartite synapse. *Neuroscience*.
- Oltvai ZN, Millian CL and Korsmeyer SJ. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homology Bax that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74 609-619
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P et al. (2005) Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 1151298-305
- Ottria R, Casati S, Baldoni E, Maiser JAM and Ciuffreda P. (2010) N6-Alkyladenosines Synthesis and evaluation of in vitro anticancer activity. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 18 8396-8402
- Ottria R, Casati S, Manzocchi A, Baldoli E, Mariotti M, Maiser JAM and Ciuffreda P. (2010) Synthesis and evaluation of in vitro anticancer activity of some novel isopentenyladenosine derivatives. *Bioorg Med Chem*, 18 4248-4254
- Pacher P, Batkai S, Kunos G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58(3)389-462
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D et al. (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*, 2773-100
- Pagotto U, Marsicano G, Fezza F, Theodoropoulou M, Grubler Y, Stalla J, Arzberger T, Milone A, Losa M, Di Marzo V, Lutz B, Stalla GK. (2001) Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. *J Clin Endocrinol Metab*, 862687-96
- Patel PN and Pathak R (2007) Rimonabant: a novel selective cannabinoid-1 receptor antagonist for treatment of obesity. *Am J Health Syst Pharm*, 64 481-89
- Pazos MR, Nunez E, Benito C, Tolon RM, Romero J. (2004) Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease new perspectives. *Life Sci*, 75(16)1907-15
- Perea G, Sur M, Araque A. (2014) Neuron-glia networks integral gear of brain function. *Front Cell Neurosci*, 8378
- Perio A, Rinaldi-Carmona M, Maruani J et al. (1996) Central mediation of the cannabinoid cue activity of a selective CB1 antagonist SR141716A. *Behav Pharmacol*, 765-71

- Persson BC, Esberg B, Olafsson O and Bjork GR. (1994) Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie*, 76 1152
- Pertwee RG (2005) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci*, 761307–1324
- Pertwee RG, Fernando SR, Nash JE et al.(1996) Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol*, 1182199–2205
- Petersen G, Moesgaard B, Schmid PC, Schmid HH, Broholm H, Kosteljanetz M, Hansen HS. (2005) Endocannabinoid metabolism in human glioblastomas and meningiomas compared to human non-tumour brain tissue. *J Neurochem*, 93299-309
- Petit F, Marin L and Doble A. (1996) Biochemical and pharmacological characterization of cannabinoid binding sites using [3H]SR141716A. *Neuroreport*, 7789–792
- Piccirillo SGM, Reynolds BA, Zanetti N et al. (2006) Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature*, vol 444 no 7120 pp 761–765
- Pignatti F, Van den Bent M, Curran D et al. (2002) Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol*, 202077-84
- Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A and Rodriguez De Fonseca F. (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci*, 21 218–224
- Piomelli D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci*, 4873–884
- Pisanti S, Picardi P, Prota L et al. (2011) Genetic and pharmacologic inactivation of cannabinoid CB1 receptor inhibits angiogenesis. *Blood*, 1175541–50
- Portella G, Laezza C, Laccetti P et al. (2003) Inhibitory effects of cannabinoid CB1 receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading actions on signals involved in angiogenesis and metastasis. *FASEB J*, 171771–1773
- Porter AC and Felder CC. (2001) The endocannabinoid nervous system unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther*, 90 45–60
- Powles T, Poole R, Shamash J et al. (2005) Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood*, 1051214–1221
- Prenzel T, Begus-Nahrmann Y, Kramer F, Hennion M, Hsu C, Gorsler T, Hintermair C, Eick D, Kremmer E, Simons M, Beissbarth T and Johnsen SA. (2011) Estrogen-Dependent Gene Transcription in Human Breast Cancer Cells Relies upon Proteasome-Dependent Monoubiquitination of Histone H2B. *Cancer Res*, 71 5739–5753



- Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O et al. (2002) Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene*, 21 8404–8413
- Rahman M, Azari H, Deleyrolle L, Millette S, Zeng H, and Reynolds BA. (2013) Controlling tumor invasion: bevacizumab and BMP4 for glioblastoma. *Future Oncology*, vol. 9, no. 9, pp. 1389–1396
- Rajabi M, Mehrzad J, Gorincioi E and Santaniello E. (2011) Antiproliferative Activity of N6-Isopentenyladenosine on HCT-15 Colon Carcinoma Cell Line. *Nucleic Acid Therapeutics*, 21 5
- Rajabi M, Signorelli P, Gorincioi E, Ghidoni R and Santaniello E. (2010) Antiproliferative Activity of N6-isopenteniladenosine on MCF-7 Breast Cancer Cells Cell Cycle Analysis and DNA-Binding Study. *Dna And Cell Biology*, 29 11 687-691
- Ramer R, Weinzierl U, Schwind B, Brune K, Hinz B. (2003) Ceramide is involved in r(+) methanandamide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells. *Mol Pharmacol*, 64 1189–1198
- Reguera-Nunez E, Roca C, Hardy E, de la Fuente M, Csaba N, and Garcia-Fuentes M. (2014) Implantable controlled release devices for BMP-7 delivery and suppression of glioblastoma initiating cells. *Biomaterials*, vol. 35, no. 9, pp. 2859–2867
- Rich JN, Reardon DA, Peery T Dowell et al. (2004) Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*, 22 133–142
- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M et al. (1994) SR141716A a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*, 350240–244
- Roy M, Kung HJ and Ghosh PM. (2011) Statin and prostate cancer role of cholesterol inhibition versus prevention of small GTP-binding proteins. *Am J Cancer Res*, 1 4 542-561
- Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T et al. Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia*, 2 306–134
- Ruda R, Bertero L, Trevisan E et al. (2012) Phase II trial of dose-dense temozolomide as initial treatment for progressive low-grade oligodendroglial tumors A multicentric study of Italian Association of Neuro-Oncology (AINO). *J Clin Oncolog*, 30 2037
- Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernandez-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vazquez P, Blazquez C, Torres S, Garcia S, et al. (2009) Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest*, 119(5)1359–72
- Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzmán M. (1998) Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS letters*, 4366–10
- Sanchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzman M. (1998) Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the  $\Delta^9$ -

- tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Molecular Pharmacology*, 54834–843
- Santoro A, Pisanti S, Grimaldi C et al. (2009) Rimonabant inhibits human colon cancer cell growth and reduces the formation of precancerous lesions in the mouse colon. *Int J Cancer*, 1125(5)996-1003
- Sarfaraaz S, Afaq F, Adhami VM et al. (2005) Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res*, 651635–1641
- Sarnataro D, Pisanti S, Santoro A et al. (2006) The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits human breast cancer cell proliferation through a lipid raft-mediated mechanism. *Pharmacol*,70(4)1298-306
- Scheen AJ (2008) CB1 receptor blockade and its impact on cardiometabolic risk factors overview of the RIO program with rimonabant. *J Neuroendocrinol*, 20(1)139 - 46
- Schmid PC, Wold LE, Krebsbach RJ, Berdyshev EV, Schmid HH. (2002) Anandamide and other N-acyl ethanolamines in human tumors. *Lipids*, 37907-12
- Schnekenburger M and Diederich M. (2012) Epigenetics Offer New Horizons for Colorectal Cancer Prevention. *Curr Colorectal Cancer Re*, 866–81
- Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK. (2005) Synthetic cannabinoid WIN55212–2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia*, 49(2)211–9
- Sherry MM, Reeves A, Wu JK et al. (2009) STAT3 is required for proliferation and maintenance of multipotency in glioblastoma stem cells. *Stem Cells*, 27 2383–2392
- Shire D, Calandra B, Delpech M et al. (1996) Structural features of the central cannabinoid CB receptor involved in the binding of the specific CB1 antagonist SR 141716A. *J Biol Chem*, 271 69414946
- Shore EM and Kaplan FS. (2010) Inherited human diseases of heterotopic bone formation. *Nature Reviews Rheumatology*, 6 518-527
- Singh A and J Morris R (2010) The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer Cytokine and Growth Factor. *Reviews*, vol 21 no 4 pp 299–313
- Sinor AD, Irvin SM, Greenberg DA, (2000) Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci Lett*, 278157–160
- Skoog F, Strong FM and Miller CO. (1965) Cytokinins. *Science*, 148 532
- Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS et al. (2012) Genetic variation in bone morphogenetic protein and colon and rectal cancer. *Int J Cancer*,130:653e664
- Smith DW and Hatfield DL. (1986) Effects of post-transcriptional base modifications on the site-specific function of transfer RNA in eukaryote translation. *J Mol Biol*, 189 663

- Spear P, Wu MR, Sentman ML and Sentman CL. (2013) NKG2D ligands as therapeutic target. *Cancer Immunity*, vol. 13, p. 8
- Spinola M, Colombo F, Favella FS and Dragani TA. (2007) N6-isopentenyladenosine: a potential therapeutic agent for a variety of epithelial cancers. *Int J Cancer*, 120 2774
- Spinola M, Galvan A, Pignatiello C, Conti C, Castorino U, Nicander B, Paroni R and Dragani TA. (2005) Identification and functional characterization of the candidate tumor suppressor gene TRT1 in human lung cancer. *Nature*, 24 5502-5509
- Spinola M, Pedotti P, Dragani TA and Taioli E. (2004) Meta-analysis suggests association of L-myc EcoRI polymorphism with cancer prognosis. *Clin Canc Res*, 10 4769
- Stella N. (2010) Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia astrocytes and astrocytomas. *Glia*, 581017–1030
- Stupp R, Mason VP, Van Den Bent MJ et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, 352987-96
- Swaminathan S and Bock RM. (1977) Subcellular localization of cytokinins in transfer ribonucleic Acid. *Biochemistry*, 16 1355
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T et al. (1999) Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10 39–49
- Tambur AR (2004) Transplantation immunology and the central nervous system. *Neurol Res*, 26(3) 243–255
- Tanimoto S and Harada H. (1982) Roles of Auxin and Cytokinin in Organogenesis in *Torenia* Stem Segments Cultured in vitro. *Plant Cell Physiol*, 23 1371
- Taya Y, Tanaka Y and Nishimura S. (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 271 545
- Taylor AH, Ang C, Bell SC, Konje JC. (2007) The role of the endocannabinoid system in gametogenesis implantation and early pregnancy. *Human Reproduction Update*, 13501–513
- Taylor TE, Furnari FB, Cavenee WK et al. (2012) Targeting EGFR for treatment of glioblastoma Molecular basis to overcome resistance. *Curr Cancer Drug Target*, 12 197–209
- Terranova JP, Storme JJ, Lafon N et al. (1996) Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716. *Psychopharmacology*, 126165–172
- Todenhofer T, Hennenlotter J, Kuhs U, Gerber V, Gakis G, Vogel U, Aufderklamm S, Merseburger A, Knapp J, Stenzl A and Shwenter C. (2012) Altered expression of farnesyl pyrophosphate synthase in prostate cancer evidence for a role of the mevalonate pathway in disease progression? *World J Urol*, 31(2):345-50

- Tomlinson IPM, Carvajal-Carmona LG, Dobbins SE et al. (2011) Multiple common susceptibility variants near BMP pathway loci GREM1, BMP4 and BMP2 explain part of the missing heritability of colorectal cancer. *PLoS Genet*, 7:e1002105
- Tsujii M and Dubois RN. (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83 493–501
- Turkson J, Bowman T, Garcia R et al. (1998) Stat3 activation by src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol*, 18 2545–2552
- Upshaw JL, Arneson LN, Schoon RA et al. (2006) NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol*, 2006 7 524-532
- Van Gaal L, Pi-Sunyer X, Despres JP et al. (2008) Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the rimonabant in obesity (RIO) program. *Diabetes Care*, 31 229-40
- Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ et al. (2005) Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*, 365 1389-97
- Van Laere K, Casteels C, Dhollander I, Goffin K, Grachev I, Bormans G, Vandenberghe W. (2010) Widespread decrease of type 1 cannabinoid receptor availability in Huntington disease in vivo. *J Nucl Med*, 51(9)1413-7
- Vickers SP, Webster LJ, Wyatt A et al. (2003) Preferential effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716 on food intake and body weight gain of obese (fa/fa) compared to lean Zucker rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 167(1)103-11
- Vila M and Przedborski S. (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nature reviews Neuroscience*, 4 365-367
- Vivanco I and Sawyers CL. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2 489-501
- Wagner JA, Hu K, Karcher J, Bauersachs J, Schäfer A, Laser M, Han H, Ertl G. (2003) CB(1) cannabinoid receptor antagonism promotes remodeling and cannabinoid treatment prevents endothelial dysfunction and hypotension in rats with myocardial infarction. *Br J Pharmacol*, 138:1251–1258
- Wang H, Wang H, Zhang W, Huang HJ, Liao WS and Fuller GN. (2004) Analysis of the activation status of akt, NFκB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest*, 84, 941–951
- Warner GJ, Berry MJ, Moustafa ME, Carlson BA, Hatfield DL and Faust JR. (2000) Inhibition of selenoprotein synthesis by selenocysteine tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> lacking isopentenyladenosine. *J Biol Chem*, 275 28110

- Weake VM and Workman JL. (2008) Histone Ubiquitination : Triggering Gene Activity. *Molecular Cell*, 29 6 653
- Wei J, Barr J, Kong LY et al. (2010) Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Mol Cancer Ther*, 9(1)67–78
- Wei J, Barr J, Kong LY et al. (2010) Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clin Cancer Res*, 16(2)461–473
- Wei J, Wu A, Kong LY et al. (2011) Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression. *PLoS One*, 6 e16195
- Wood JR, Green SB, Shapiro WR. (1988) The prognostic importance of tumor size in malignant gliomas a computed tomographic scan study by the Brain Tumors Co-operative Group. *J Clin Oncol*, 6338-43
- Wozney JM. (1989) Bone morphogenetic proteins *Progress in Growth Factor Research*, vol 1 no 4 pp 267–280
- Wright SM, Dikkers C, Aronne LJ et al. (2008) Rimonabant new data and emerging experience. *Curr Atheroscler Rep*, 10 71-8
- Wu A, Wei J, Kong LY et al. (2010) Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol*, 12(11)1113–1125
- Wu CY, Wang TN, Chen YT et al. (2013) Effects of constraint-induced therapy combined with eye patching on functional outcomes and movement kinematics in poststroke neglect. *Am J Occup Ther*, 67 236–245
- Wu J, Song Y, Bakker AB et al. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 1999 285 730-732
- Wu M, Wang PF, Lee JS, Martin-Brown S, Florens L, Washburn M, Shilatifard A. (2008) Molecular regulation of H3K4 trimethylation by Wdr82, a component of human Set1/COMPASS. *Mol Cell Biol*, 28:7337–7344
- Wu Q and Yao J (2013) BMP4 a new prognostic factor for glioma. *World Journal of Surgical Oncology*, vol 11 article 264
- Xu J, Zhu D, He S, Spee C, Ryan SJ and Hinton DR. (2011) Transcriptional regulation of bone morphogenetic protein 4 by tumor necrosis factor and its relationship with age-related macular degeneration. *FASEB J.*, 25(7):2221-33
- Yabe T, McSherry C, Bach FH et al. (1993) A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins, *Immunogenetics*, 37 455-460
- Yamamoto T, Sekine Y, Kashima K et al. (2002) The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 297 811–817

- Yip S, Iafrate JA and Louis DL. (2008) Molecular diagnostic testing in malignant gliomas a practical update on predictive markers. *J Neuropathol Exp Neurol*, vol 67, No. 1 pp. 1-15
- Yokoyama and Plougastel BFM. (2003) Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nature Reviews Immunology*, 3 304-316
- Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS et al. (2001) SOCS-1 a negative regulator of the JAK/STAT pathway is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet*, 28 29–35
- Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS et al. (1995) Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the src oncoprotein. *Science*, 269 81–83
- Yu H and Jove R. (2004) The STATs of cancer—New molecular target come of age. *Nat Rev Cancer*, 4 97–105
- Zhang JG, Kruse CA, Driggers L et al. (2008) Tumor antigen precursor protein profiles of adult and pediatric brain tumors identify potential target for immunotherapy. *J Neurooncol*, 88(1) 65-76
- Zhang X, Guo A, Yu J et al. (2007) Identification of STAT3 as a substrate of receptor protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 4060–4064
- Zhao H, Ayrault O, Zindy F et al. (2008) Post-transcriptional downregulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development *Genes Dev*, 22:722e727
- Zhong Z, Wen Z and Darnell JE Jr. (1994) Stat3 A STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6 *Science* 264 95–98
- Zhou H, Zhang Z, Wei H et al. (2013) Activation of STAT3 is involved in neuroprotection by electroacupuncture pretreatment via cannabinoid CB1 receptors in rats. *Brain Res*, 1529154–64
- Zhou Z, Sun L, Wang Y et al. (2011) Bone morphogenetic protein 4 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in glioma stem cells. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, vol 26 no 1 pp 77–83
- Zou W (2005) Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5 263–274