



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina Clinica

Sezione di Farmacologia Clinica e Sperimentale

Dottorato di Ricerca in Farmacologia Clinica e Sperimentale XXVII ciclo

***RUOLO DEL PROCESSO AUTOFAGICO IN CELLULE TUMORALI
UMANE MANTENUTE IN DIFFERENTI CONDIZIONI DI
OSSIGENAZIONE A SEGUITO DEL TRATTAMENTO CHEMIOTERAPICO***

DOCENTE GUIDA:

Chiar.ma Prof.ssa Elena MONTI

CORDINATORE DEL DOTTORATO:

Dott.ssa Franca MARINO

DOTTORANDA:

Dott.ssa Elisa TAIANA

Matr. n° 703882

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

INDICE

RIASSUNTO	1
INTRODUZIONE	4
CARCINOMI COLORETTALI	5
<i>Epidemiologia, eziologia e prevenzione del cancro al colon retto</i>	5
<i>Strategie terapeutiche</i>	6
IPOSSIA E TUMORI	8
<i>Ruolo dell'ipossia nella progressione tumorale</i>	8
<i>Struttura di HIF-1</i>	9
<i>Processi cellulari regolati da HIF-1</i>	11
<i>Resistenza farmacologica e invasività tumorale</i>	13
<i>Inibizione di HIF-1 come terapia antitumorale</i>	15
AUTOFAGIA	16
<i>Caratterizzazione dei processi autofagici</i>	16
<i>Autofagia e cancro</i>	18
<i>Autofagia e ipossia</i>	19
<i>Inibizione dell'autofagia come terapia antitumorale</i>	19
APOPTOSI	21
CROSSTALK TRA APOPTOSI E AUTOFAGIA	23
CROSSTALK TRA DEGRADAZIONE VIA PROTEASOMA E AUTOFAGIA	26
5-FLUOROURACILE	27
<i>Inibizione della Timidilato Sintasi e errata incorporazione nel DNA</i>	28
<i>Errata incorporazione nell'RNA</i>	29
<i>Determinanti della risposta al 5-FU</i>	29
LUTEOLINA	32
<i>Attività antiossidante</i>	32
<i>Attività antitumorale</i>	33
<i>Attività pro-apoptotica</i>	33
<i>Attività anti-angiogenica</i>	33
OBATOCLAX	33
SCOPO DEL LAVORO	36
MATERIALI E METODI	39
LINEE CELLULARI UTILIZZATE E CONDIZIONI DI COLTURA	40
INDUZIONE DI IPOSSIA	40
VALUTAZIONE DELL'EFFETTO CITOTOSSICO DEI COMPOSTI	42
<i>Test della Sulforodamina B</i>	42
<i>Test dell' MTT</i>	43
<i>Test del Crystal Violetto</i>	43

CONTA DELLE CELLULE VITALI	44
PLASMIDI	45
TRASFEZIONE: LIPOFEZIONE CON LIPOFECTAMINA	47
VALUTAZIONE DEL POTENZIALE PRO-APOPTOTICO	47
VALUTAZIONE DEL POTENZIALE PRO-AUTOFAGICO	49
<i>Valutazione della presenza di AVOs</i>	49
<i>Localizzazione e distribuzione della proteina LC3-II</i>	49
<i>Livelli di espressione della proteina LC3-II</i>	50
<i>Lisati cellulari</i>	50
VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLA PROTEINA HIF-1α	51
<i>Estratti nucleari</i>	51
<i>Corsa elettroforetica e western blot</i>	52
VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ TRASCRIZIONALE DEL FATTORE HIF-1	53
VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI GENI IGF2 E HIF-1α	53
<i>Estrazione dell'RNA dalle cellule</i>	53
<i>Retrotrascrizione</i>	54
<i>Allestimento della reazione di real-time PCR</i>	55
<i>Analisi dei dati e quantificazione dell'espressione genica</i>	56
RISULTATI	57
EFFETTO DELLA STABILIZZAZIONE DI HIF-1α SULLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON 5-FLUOROURACILE, LUTEOLINA ED OBATOCLAX	58
INDUZIONE DEL PROCESSO AUTOFAGICO IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON 5-FLUOROURACILE, LUTEOLINA ED OBATOCLAX	60
VALUTAZIONE DEL RUOLO DEL PROCESSO AUTOFAGICO	63
EFFETTO DELLA COMBINAZIONE 5-FLUOROURACILE/LUTEOLINA E 5-FLUOROURACILE/OBATOCLAX	64
<i>Apoptosi</i>	64
<i>Autofagia</i>	65
VALUTAZIONE DEL RUOLO DEL PROCESSO AUTOFAGICO IN SEGUITO AL TRATTAMENTO COMBINATO CON 5-FLUOROURACILE/OBATOCLAX	67
VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON LUTEOLINA O OBATOCLAX SUI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLA PROTEINA HIF-1α E SULL'ATTIVITÀ DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE HIF-1	68
STUDIO DEL/I MECCANISMO/I DI DOWN-REGOLAZIONE DI HIF-1α DA PARTE DI OBATOCLAX	70
VALUTAZIONE DEL POSSIBILE EFFETTO CHEMIOSENSIBILIZZANTE DEL COMPOSTO OBX SULLA LINEA CELLULARE HCT8	73
DISCUSSIONE	74

RIASSUNTO

Il carcinoma del colon retto (CRC) rappresenta uno dei tumori maligni più comuni nei Paesi occidentali e presenta un tasso di incidenza in aumento in tutto il mondo. Come la maggior parte dei tumori solidi, anche i carcinomi del colon presentano spesso al loro interno regioni ipossiche in cui si assiste all'attivazione del fattore trascrizionale HIF-1, che svolge un ruolo chiave nell'insorgenza di fenomeni di chemioresistenza. Alla risposta adattativa attuata dalle cellule nei confronti dell'ipossia partecipa anche il processo autofagico, il cui ruolo nella risposta delle cellule tumorali al trattamento chemioterapico e nei fenomeni di farmacoresistenza indotta dall'ipossia risulta molto controverso. Cellule mantenute in condizioni ipossiche presentano in genere livelli di autofagia più elevati rispetto a cellule normossiche. Questo fenomeno potrebbe rappresentare una misura difensiva nei confronti dello stress ipossico, contribuendo alla resistenza terapeutica, tuttavia una attività autofagica particolarmente intensa e/o persistente sembrerebbe in grado di indurre morte cellulare.

Su queste premesse è stata formulata un'ipotesi di lavoro in base alla quale cellule trattate con 5-Fluorouracile (5-FU), in grado di indurre autofagia citoprotettiva, e sottoposte a condizioni di ipossia (in cui il processo autofagico dovrebbe essere iperattivo) potrebbero essere indotte ad attivare un programma di morte cellulare in seguito all'esposizione a composti in grado di aumentare ulteriormente la risposta autofagica. Tale ipotesi è stata testata in un modello sperimentale basato sull'uso della linea cellulare HCT116, derivata da adenocarcinoma del colon umano, esponendo le cellule a 5-FU in combinazione con Luteolina (LUT), un flavonoide di origine naturale dotato di un ampio spettro di azioni potenzialmente antiproliferative/citotossiche, o Obatoclox (OBX), composto dotato di attività BH3-mimetica grazie alla quale è in grado di attivare la fase mitocondriale del processo apoptotico. Per entrambi i composti è stata riportata una attività pro-autofagica.

I risultati ottenuti in una prima fase dello studio hanno evidenziato che LUT ed OBX potenziano l'effetto citotossico del 5-FU, in tutte le condizioni sperimentali adottate. Con entrambe le combinazioni si osserva in effetti un aumento dei livelli di autofagia; tuttavia l'osservazione che, a seguito dell'inibizione del processo autofagico, l'effetto citotossico sinergico risulta ulteriormente potenziato porta ad escludere che l'effetto chemiosensibilizzante di LUT e OBX possa essere dovuto all'induzione di autofagia letale.

Al fine di identificare uno fra i possibili meccanismi alla base dell'azione chemiosensibilizzante mediata da LUT ed OBX al 5-FU, è stata valutata la possibilità che i due composti fossero in grado di modulare negativamente i livelli di espressione della proteina HIF-1 α e/o l'attività trascrizionale del fattore HIF-1. I dati ottenuti hanno evidenziato che entrambi i composti sono in grado di inibire l'attività di HIF-1, ma verosimilmente in base a meccanismi diversi. Infatti, mentre nel caso della LUT a fronte di una ridotta attività trascrizionale si assiste ad un aumento dei livelli proteici di HIF-1 α apparentemente paradossale, nel caso di OBX la downregolazione dell'attività di HIF-1 si

accompagna, ed è verosimilmente dovuta, a una diminuzione dei livelli di espressione della subunità inducibile.

Esperimenti volti a chiarire se OBX fosse in grado di modulare i livelli di HIF-1 α agendo sul trascritto, sulla sintesi della proteina o sulla sua degradazione suggeriscono che il meccanismo principale sia rappresentato da una ridotta stabilità della proteina, la cui degradazione da parte del proteasoma risulta facilitata, indipendentemente dalla via "canonica", attiva in normossia, che prevede l'idrossilazione O₂-dipendente di residui critici di prolina e l'interazione con il complesso ubiquitina-ligasico coordinato dalla proteina di von Hippel-Lindau.

In base ai dati ottenuti possiamo concludere che, contrariamente all'ipotesi inizialmente formulata, l'esacerbazione dello stimolo pro-autofagico da parte dei trattamenti utilizzati per questo studio, non è stata tale da permettere il superamento di un livello soglia, oltrepassato il quale l'induzione di autofagia perde il suo ruolo citoprotettivo per trasformarsi in un evento letale. Nelle nostre condizioni sperimentali, quindi, non solo il fenomeno non rende ragione dell'effetto sinergico delle combinazioni utilizzate, ma potrebbe anzi contribuire alla resistenza terapeutica.

Tuttavia, i dati ottenuti fino a questo momento chiariscono, almeno parzialmente, il meccanismo alla base dell'azione chemiosensibilizzante di LUT ed OBX nelle condizioni in cui HIF-1 risulta attivato, permettendoci di ipotizzare un loro utilizzo in combinazioni polichemioterapiche per il controllo farmacologico della crescita e della progressione di carcinomi coloretali e di altri tumori solidi in cui spesso si assiste all'insorgenza di fenomeni di chemioresistenza indotta da ipossia.

INTRODUZIONE

CARCINOMI COLORETTALI

EPIDEMIOLOGIA, EZIOLOGIA E PREVENZIONE DEL CANCRO AL COLON RETTO

Il carcinoma del colon retto (CRC) è considerato uno dei tumori maligni più comuni nei Paesi occidentali [Robbins and Cotran, 2008]; è attualmente il terzo tumore più diffuso negli uomini e il secondo nelle donne. In Europa è la seconda causa di morte fra tutti i tipi di cancro sia negli uomini che nelle donne e nel 2012 ha causato 215000 morti su 447000 casi stimati [Ferlay J et al., 2013] [Tarranga Lopez PJ et al., 2014]. Il suo tasso di incidenza, in aumento in tutto il mondo, è leggermente superiore negli uomini rispetto che nelle donne [Ferlay et J al., 2013]. Il picco di incidenza è compreso fra i 60 e 79 anni [Robbins and Cotran, 2008].

In Italia, il CRC è in assoluto il tumore a maggiore insorgenza, con quasi 55000 diagnosi e 20000 decessi stimati per il 2013. La diffusione dei fattori di rischio e l'aumento dell'età media della popolazione sono alla base del progressivo aumento dell'incidenza di questo tumore negli ultimi decenni. Nonostante ciò, il tasso di mortalità per tale patologia è in moderato calo in entrambi i sessi [AIRTUM e AIOM, 2013]. Questo calo è attribuibile principalmente al miglioramento nel trattamento della malattia e alla diagnosi precoce [Rosso T et al., 2012].

La maggior parte dei CRC ha natura sporadica, tuttavia patologie genetiche poliposiche adenomatose e anche malattie infiammatorie intestinali predispongono allo sviluppo del carcinoma coloretale [Tarranga Lopez PJ et al., 2014]. Inoltre, come dimostrato da studi prospettici di coorte, lo stile di vita e la dieta influenzano l'incidenza di questo tipo di tumore [Winkels MR et al., 2014].

La diagnosi di tale carcinoma è difficile in quanto può restare asintomatico per lungo tempo oppure mostrare una sintomatologia insidiosa. La prognosi è strettamente correlata allo stadio raggiunto dal tumore al momento della diagnosi [Robbins e Cotran, 2008]. Quest'ultima può essere migliorata dall'identificazione di biomarcatori idonei, che consentono di individuare i farmaci più appropriati per specifici pazienti e risparmiare loro trattamenti inefficaci e costosi [Jiang WQ et al., 2012].

La prevenzione del cancro al colon retto è possibile a tre differenti livelli:

- *Prevenzione primaria:* riguarda i soggetti sani e consiste nella riduzione dell'esposizione a fattori di rischio specifici noti; essa spesso richiede la modificazione delle abitudini alimentari del soggetto.
- *Prevenzione secondaria:* è rappresentata dall'insieme delle misure preventive volte a diagnosticare la malattia in fase precoce. I tre metodi di screening più usati includono la ricerca di sangue occulto nelle feci (FOBT), la sigmoidoscopia e la colonscopia [Pandey TS., 2014].
- *Prevenzione terziaria:* basata sugli interventi volti a prevenire le recidive e la crescita metastatica.

STRATEGIE TERAPEUTICHE

I tre approcci tradizionalmente utilizzati per la terapia dei carcinomi coloretali sono costituiti dall'intervento chirurgico, dalla radioterapia e dalla chemioterapia, spesso associati secondo varie modalità [Chawla AK et al., 2003].

Intervento chirurgico: la resezione chirurgica è, storicamente, la pietra miliare della gestione delle neoplasie al colon-retto e ancora oggi, quando praticabile, rimane il miglior trattamento per tale tumore [McKeown E et al., 2014].

Radioterapia: sfrutta l'azione di radiazioni ad alta energia (raggi X, raggi gamma o particelle cariche) per eliminare le cellule cancerose presenti a livello locale, mediante danno diretto e indiretto (da radicali liberi prodotti dalla radiazione), riducendo la massa tumorale e il rischio di recidive [Gnosa S et al., 2014] [Glimelius B., 2013].

Chemioterapia: svolge un ruolo fondamentale sia come trattamento "adiuvante", effettuato cioè dopo l'intervento chirurgico per diminuire il rischio di ricaduta, che come terapia "neoadiuvante", ricevuta dal paziente prima dell'intervento chirurgico con il fine di ridurre la dimensione del tumore e facilitare il compito del chirurgo. Ha inoltre un ruolo importante nella terapia palliativa nel caso in cui il tumore sia in uno stadio troppo avanzato e non operabile [www.airc.it].

Strategie classiche e di "targeting razionale" nella chemioterapia antitumorale

Nel corso degli ultimi 50 anni, il 5-Fluorouracile (5-FU), un antimetabolita appartenente alla classe delle fluoropirimidine, ha costituito la spina dorsale dei regimi chemioterapici nel carcinoma del colon-retto; studi clinici randomizzati hanno dimostrato che la sua somministrazione è in grado di determinare un aumento significativo della sopravvivenza nei pazienti con carcinoma metastatico. Per aumentarne l'effetto citotossico, è spesso utilizzato in associazione con la radioterapia o con altri agenti antitumorali, quali Leucovorin (un metabolita attivo dell'acido folico in grado di migliorare l'interazione del 5-FU con il suo enzima bersaglio timidilato sintetasi), Irinotecano ed Oxaliplatino, in formulazioni polichemioterapiche più efficaci [Mohelnikova-Duchonova B et al., 2014].

L'Irinotecano è una camptotecina chimicamente correlata al Topotecano, il cui meccanismo d'azione consiste nella formazione di rotture stabili a singolo filamento dovute all'inibizione della topoisomerasi I; il passaggio della forza replicativa attraverso tali rotture determina la formazione di rotture a doppio filamento, che causano apoptosi. Il meccanismo di azione dell'irinotecano è stato sfruttato per l'ideazione polichemioterapica più attiva che prevede l'utilizzo di tale farmaco in combinazione con 5-FU e Leucovorin (schema FOLFIRI).

L'Oxaliplatino (Eloxatin) è un analogo del Cisplatino che, come quest'ultimo, agisce formando legami crociati intra od inter-catenari a livello del DNA. I suoi addotti presentano un ingombro sterico maggiore ed un'idrofobicità più alta rispetto a quelli del Cisplatino e risultano più efficaci nell'indurre

danni al DNA. Tale farmaco risulta efficace in tumori ovarici e coloretali resistenti al Cisplatino, probabilmente in virtù di un diverso comportamento degli addotti nei confronti dei meccanismi di riparazione dipendenti dal MMR e da meccanismi quali l'inibizione dell'allungamento della catena del DNA e il bypass replicativo [Raymond E, Faivre S., 2002]. In studi clinici è stato osservato che l'associazione del 5-FU/LV con l'Oxaliplatino (schema FOLFOX), già impiegata nel trattamento di prima linea del carcinoma coloretale avanzato, è efficace e sicura anche nel trattamento adiuvante; nei pazienti in stadio II e III trattati con FOLFOX infatti, si osserva una riduzione del rischio di recidiva a 3 anni del 25% [De Gramont A et al., 2006].

Di recente introduzione per il trattamento del CRC è l'utilizzo della Capecitabina, un pro-farmaco del 5-FU somministrato per via orale, sviluppato per migliorare la tollerabilità e per ridurre la citotossicità non-tumorale. Una volta somministrato infatti, tale farmaco viene assorbito nell'intestino, metabolizzato dal fegato a 5'-desossi-5-fluorouridina (5'-DFUR) e successivamente convertito a 5-FU dall'enzima timidina fosforilasi, sia nei tessuti normali che tumorali. Poiché l'enzima timidina fosforilasi risulta presente in concentrazioni più elevate all'interno delle cellule tumorali, questa modalità di azione consente una maggiore specificità di targeting tumorale, che diminuisce di conseguenza l'esposizione sistemica al farmaco [Aguado C et al., 2014].

Uno dei principali limiti all'uso della chemioterapia antitumorale è infatti rappresentato dall'elevata tossicità che i farmaci presentano sulle cellule normali, dovuta alla scarsa selettività nei confronti delle cellule tumorali, dove spesso vengono identificate come bersagli terapeutici proteine implicate in pathway cellulari presenti anche nelle cellule sane. Ciò ha portato allo sviluppo di nuove strategie di "targeting razionale", basate sull'identificazione di bersagli alterati selettivamente nel tumore o le cui alterazioni rivestono un ruolo essenziale solo nel particolare contesto tumorale [Kaelin WG Jr, 2009]. In quest'ottica sono stati sviluppati farmaci costituiti da anticorpi in grado di riconoscere ed inibire bersagli espressi esclusivamente nella massa tumorale o sovraespressi a livello del tumore, anticorpi armati con radionuclidi o tossine, anticorpi bispecifici, immunoliposomi e strategie di pre-targeting mediato da anticorpi che consente l'attivazione di pro-farmaci somministrati per via sistemica solamente in prossimità del bersaglio [Schrama D et al., 2006]. Altre strategie di targeting razionale prevedono l'uso di piccole molecole peptido-mimetiche, in grado di indurre l'attivazione del processo apoptotico attraverso il meccanismo autocrino dipendente da TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) e/o l'attivazione della caspasi-8 e di quelle a valle [Lu J et al., 2011].

Dagli ultimi studi si è visto che il miglior trattamento per il cancro richiede frequentemente una combinazione di farmaci, i cui benefici riguardano: la capacità di attaccare contemporaneamente più bersagli diversi, colpendo le cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare; l'aumento dell'effetto citotossico massimale (avendo cura nei limiti del possibile, di non combinare farmaci i cui effetti

tossici riguardino lo stesso tessuto bersaglio); e la diminuzione della probabilità che si sviluppino cloni cellulari poliresistenti.

Più di recente, la ricerca di potenziali bersagli per una terapia razionale dei tumori solidi ha focalizzato l'attenzione su un particolare aspetto della loro biologia, rappresentato dall'instaurarsi di condizioni ipossiche in alcune regioni della massa neoplastica e dai complessi meccanismi adattativi che le cellule tumorali sono in grado di attivare in queste condizioni. Strategie terapeutiche in grado di colpire o sfruttare tali meccanismi potrebbero quindi presentare un effetto antitumorale selettivo e trovare impiego anche nel trattamento dei tumori coloretali [Semenza GL, 2009][Hu Y et al., 2013].

IPOSSIA E TUMORI

RUOLO DELL'IPOSSIA NELLA PROGRESSIONE TUMORALE

L'ipossia viene definita come una riduzione del normale livello tissutale di ossigeno e può essere dovuta ad ischemia localizzata o sistemica, ipossiemia, anemia, alterata diffusione dell'ossigeno o intossicazione [Höckel M, Vaupel P, 2001] [Harris AL, 2002]. Tale condizione, se persiste, porta alla compromissione dei normali processi biologici cellulari. Diversamente da quanto accade nei tessuti normali, interessati dall'ipossia solo nelle situazioni sopra citate ed in modo spesso transitorio, nella maggior parte dei tumori solidi di volume superiore al millimetro cubo sono normalmente presenti regioni ipossiche [Shannon AM et al., 2003], a causa sia dell'incapacità della vascolarizzazione locale di fornire sufficiente ossigeno al tumore in rapida crescita, sia delle gravi anomalie strutturali che caratterizzano il microcircolo tumorale [Strese S et al., 2013].

L'ipossia può essere vista come uno dei "bottlenecks" [Greaves M., 2002] che devono essere superati durante l'evoluzione clonale dei tumori [Nowell PC, 1976]; costituisce un fattore prognostico negativo per i pazienti [Vaupel P, Mayer A, 2007] [Mucaj V et al., 2012], dal momento che un microambiente ipossico induce nelle cellule tumorali un processo di adattamento che porta alla selezione di cellule caratterizzate da un fenotipo maggiormente aggressivo e maligno [Hanahan D, Weinberg RA, 2000] [Ruan K et al., 2009] [Cassavaugh J, Lounsbury KM, 2011]. L'ipossia, infatti, si è dimostrata un fattore critico per la formazione di metastasi tumorali [Majmundar A, et al., 2010] [Semenza GL, 2012] [Lu X, Kang Y, 2010], oltre ad ostacolare gli effetti della radio e della chemioterapia [Vaupel P, Mayer A, 2007] [Lin SC et al., 2014].

STRUTTURA DI HIF-1

Le risposte cellulari indotte dall'ipossia sono mediate dall'attivazione di diversi pathway, finemente regolati dal fattore di trascrizione HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*).

HIF-1 è un fattore di trascrizione eterodimerico, composto da una subunità costitutivamente espressa (HIF-1 β) e da una subunità inducibile (HIF-1 α) (**figura 1**).

La subunità HIF-1 β , nota anche come ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), presenta due diverse isoforme: una di 774 aminoacidi con un peso molecolare di 92 kDa, l'altra di 789 aminoacidi con un peso molecolare di 94 kDa; la proteina HIF-1 α invece è costituita da 826 aminoacidi e ha un peso molecolare di 120 kDa [Wang GL et al., 1995] [Jiang BH et al., 1996].

Entrambe le subunità di HIF-1 contengono un dominio basico elica-loop-elica (b-HLH) ed un dominio Per/Arnt/Sim (PAS). Il dominio b-HLH, presente in molti fattori trascrizionali, è necessario per la dimerizzazione e permette l'inserimento del fattore trascrizionale nel solco maggiore della doppia elica del DNA. I domini PAS, conservati nell'evoluzione, permettono ai domini basici di assumere la conformazione ideale per il legame al DNA [Jiang BH et al., 1996].

Oltre a questi due domini, HIF-1 α presenta due domini di transattivazione, indicati come N-TAD (dominio transattivante N-terminale, aa 531-575) e C-TAD (dominio transattivante C-terminale, aa 786-826). Il dominio C-TAD contiene una regione che permette l'interazione con i co-attivatori trascrizionali, come p300 e CBP; inoltre include un residuo di asparagina (Asn803) la cui idrossilazione da parte del fattore inibente HIF-1 (FIH-1) impedisce l'interazione con p300 e CBP, inibendo di fatto l'attività trascrizionale di HIF-1 [Lando D et al., 2002] [Kallio PJ et al., 1998]. La porzione C-terminale contiene inoltre il dominio di degradazione ossigeno-dipendente, ODD (aa 401-603). Tale dominio comprende a sua volta due motivi PEST [Rechsteiner M, Rogers SW, 1996], ossia sequenze ricche in prolina (P), acido glutammico (E), serina (S) e treonina (T), un motivo comune a molte proteine caratterizzate da una breve emivita.

In HIF-1 α sono infine presenti due regioni di localizzazione nucleare: N-NLS (aa 17-74), nella regione N-terminale, e C-NLS (aa 718-721), nella regione C-terminale; quest'ultima sembra rivestire un ruolo essenziale per la traslocazione della proteina nel nucleo, cui segue la formazione di un eterodimero con HIF-1 β e il legame alle sequenze consenso HREs (*Hypoxia Response Element*) presenti a livello del promotore o delle sequenze enhancer dei geni bersaglio [Jiang BH et al., 1996].

In condizioni normossiche, HIF-1 α è difficilmente rilevabile nella cellula poiché ha un'emivita di soli 10 minuti; i suoi livelli aumentano però in condizioni di ipossia o in caso di overespressione o di mutazioni attivanti alcuni oncogeni, in particolare i geni che codificano per i recettori dei fattori di crescita [Jiang BH et al., 1996]. Tali situazioni si verificano in molti tumori umani che acquistano un carattere fortemente aggressivo proprio in seguito all'aumento dell'attività di HIF-1.

Il livello di espressione di HIF-1 α risulta dal bilancio tra sintesi e degradazione, che sono a loro volta regolate da meccanismi ossigeno-dipendenti ed ossigeno-indipendenti; proprio poiché HIF-1 viene attivato, oltre che dall'ipossia, anche da tali meccanismi ossigeno-indipendenti o che includono l'attivazione di proto-oncogeni, la perdita di geni oncosoppressori e l'attivazione di vie di trasduzione del segnale dipendenti da fattori di crescita, colpire HIF-1 significa attuare un intervento a più ampio spettro d'azione, che non si limita ad antagonizzare gli effetti mediati dalla sola ipossia. Allo stesso modo tale intervento non sarebbe risolutivo verso tutti gli effetti indotti dall'ipossia, essendo essi in parte ascrivibili a meccanismi indipendenti da HIF-1.

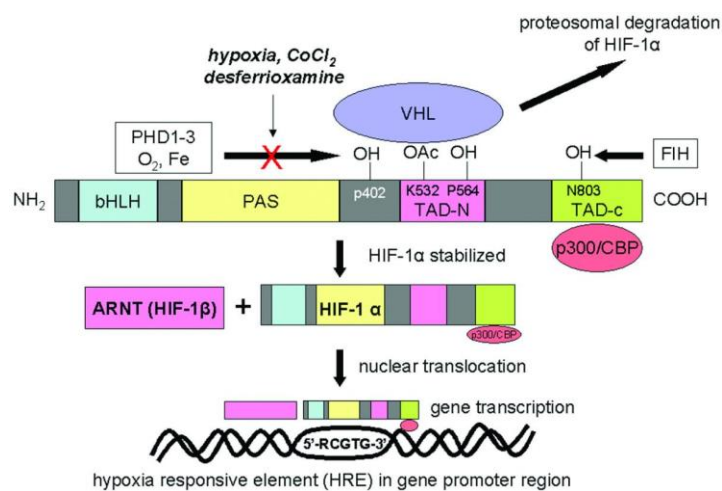


Figura 1. struttura di HIF-1 α e HIF-1 β [Hitchon CA, El-Gabalawy HS, 2004]

Regolazione ossigeno-dipendente di HIF-1 α

In condizioni di normossia, tre prolil-idrossilasi, note come *Prolyl-Hydroxylase-Domain Proteins* (PHD) 1-3, aggiungono un gruppo ossidrilico alle proline in posizione 402 e 564 di HIF-1 α [Bruick RK, McKnight SL, 2001]. Questi enzimi utilizzano molecole di ossigeno e di α -chetoglutarato come cofattori in una reazione che conduce all'idrossilazione di residui di prolina, con formazione di succinato come prodotto collaterale della reazione. Tali modificazioni post-traduzionali, insieme all'acetilazione della lisina 532 da parte dell'acetil-transferasi ARD1 [Jeong JW et al., 2002], permettono l'interazione tra il dominio ODD di HIF-1 α e la proteina oncosoppressiva VHL (von Hippel-Lindau) [Jaakkola P et al., 2001]. VHL è una componente di un complesso E3 ubiquitina ligasico che aggiunge molecole di ubiquitina a HIF-1 α , indirizzando tale proteina verso la via di degradazione "canonica" mediata dal proteasoma 26S [Ohh M et al., 2000].

La diminuzione della pressione parziale di ossigeno all'interno della cellula impedisce l'azione delle PHDs, bloccando la degradazione proteolitica di HIF-1 α , determinandone un aumento dei livelli di espressione con il conseguente aumento dell'attività trascrizionale del fattore HIF-1. Tale aumento è rilevabile già ad una pO₂ pari al 6% e raggiunge i massimi livelli tra 0,5 e 1% [Stroka DM et al., 2001].

Dal momento in cui viene stabilizzata, la subunità α può traslocare nel nucleo, dove avviene la formazione dell'eterodimero HIF-1 α/β . Il processo di traslocazione di HIF-1 α sembra però essere indipendente dall'ipossia e si pensa che la frazione nucleare di questa proteina sia semplicemente proporzionale alla quantità complessiva presente nella cellula [Hofer T et al., 2001].

Come già affermato, l'idrossilazione dell'asparagina 803 da parte di FIH-1 (fattore inibente HIF-1) inibisce l'attività trascrizionale di HIF-1 impedendone l'interazione con i co-attivatori p300 e CBP [Lando D et al., 2002]; questi ultimi, in condizioni di ipossia, interagiscono attraverso il loro dominio CH1 (ricco in cisteine e istidine) con il dominio di transattivazione di HIF-1 α e reclutano altri co-attivatori accessori, tra cui diverse iston-acetil transferasi (SRC-1, TIF-2) [Gu J et al., 2001] [Ema M et al., 1999]. Similmente ad altre modificazioni post-traduzionali (per esempio la fosforilazione), l'idrossilazione ha la funzione di regolare l'interazione proteina/proteina, ma a differenza di altre, è un processo regolato dall'ossigeno [Semenza GL, 2003].

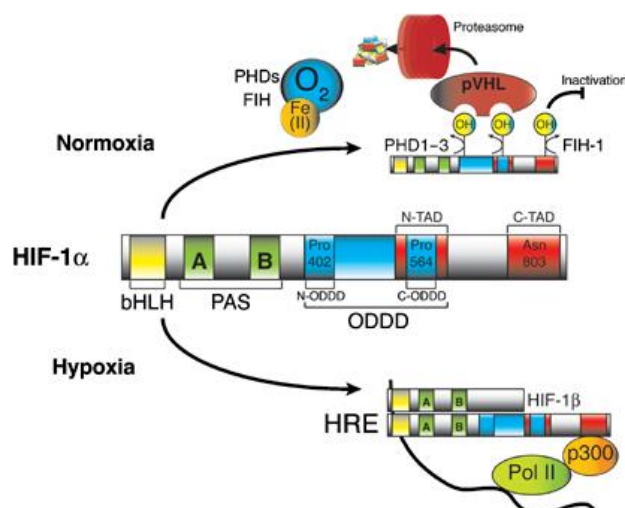


Figura 2. regolazione ossigeno-dipendente di HIF-1 α [Weidemann A, Johnson RS, 2008].

PROCESSI CELLULARI REGOLATI DA HIF-1

Il fattore di trascrizione HIF-1, attraverso l'attivazione trascrizionale di numerosissimi geni bersaglio, coinvolti in diverse funzioni cellulari [Tsai YP, Wu KJ, 2012], svolge un ruolo chiave nell'induzione di modificazioni adattative che la cellula mette in atto in risposta all'ipossia [Huang D et al., 2014].

Le principali vie effettrici attivate da HIF-1 sono implicate nel controllo di:

- **Proliferazione cellulare:** l'ipossia induce l'espressione di diversi fattori di crescita che stimolano la proliferazione cellulare [Durai R et al., 2005] [Harris AL, 2002][Jiang BH et al., 1996].
- **Metabolismo:** in condizioni ipossiche si assiste a uno switch del metabolismo dalla via ossigeno-dipendente del ciclo di Krebs e della fosforilazione ossidativa alla via glicolitica ossigeno-indipendente. In particolare, HIF-1 regola l'espressione di tutti gli enzimi coinvolti nella

glicolisi e dei trasportatori del glucosio GLUT1 e GLUT3, che ne mediano l'uptake [Harris A., 2002] [Marín-Hernández A et al., 2009].

- **Angiogenesi:** condizioni ipossiche determinano un'overespressione del fattore di crescita vascolare VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), coinvolto nella regolazione della proliferazione delle cellule endoteliali e nella formazione di nuovi vasi sanguigni; tale fattore è codificato da uno dei principali e più noti geni-bersaglio di HIF-1 [Guba M et al., 2004].
- **Instabilità genetica:** l'ipossia induce amplificazione genica e rotture del DNA in corrispondenza dei "siti fragili" [Harris AL, 2002] [Koshiji M et al., 2005]; inoltre la stabilizzazione del fattore di trascrizione media la soppressione dei meccanismi di riparazione del DNA quali MMR, HR e NER [Crosby ME et al., 2009] [Mihaylova VT et al., 2003] contribuendo ad aumentare tale instabilità.
- **Immortalizzazione:** in condizioni ipossiche aumenta l'attività dell'enzima telomerasi, ritenuto responsabile del mantenimento del potenziale proliferativo delle cellule tumorali. Il meccanismo attraverso cui viene attuato questo incremento dell'attività enzimatica è basato sul legame che si realizza, in condizioni di ipossia, tra il fattore di trascrizione HIF-1 e le due sequenze HRE (HRE1 e HRE2) presenti a livello del promotore del gene codificante per hTERT, la subunità catalitica dell'enzima telomerasi [Nishi H et al., 2004].
- **Regolazione del pH:** la riduzione del pH, dovuta alla produzione di acido lattico da parte della glicolisi anaerobica ed alla produzione di acido carbonico da parte delle anidrasi carboniche (processi entrambi regolati positivamente da HIF-1), può contribuire all'invasività tumorale, giacché molte proteasi vengono attivate in condizioni di pH acido. Le cellule tumorali, a differenza di quelle normali, riescono a adattarsi e sopravvivere anche in condizioni di pH ridotto [Harris AL., 2002].
- **Apoptosi:** in condizioni di ridotta concentrazione di ossigeno, le cellule accumulano p53 con un meccanismo dipendente da HIF-1 e vanno incontro a morte per apoptosi [Greijer AE, van der Wall E, 2004]; tuttavia, il processo indotto dall'ipossia promuove la sopravvivenza di cellule che presentano mutazioni in p53 e/o a livello di proteine implicate nel controllo dell'apoptosi; inoltre lo stesso HIF-1 è in grado di regolare negativamente l'espressione di geni pro-apoptotici [Hammond EM, Giaccia AJ, 2005] [Kwon HC et al., 2010] [Frontini M, Proietti-De-Santis L., 2009].
- **Autofagia:** è stato riportato che il fattore di trascrizione HIF-1 è in grado di indurre l'espressione della proteina BH3-only BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*), il cui ruolo, in condizioni di ridotta concentrazione di ossigeno, sarebbe quello di favorire la sopravvivenza della cellula attraverso l'attivazione del pathway autofagico [Mazure NM and Pouyssegur J., 2010].

RESISTENZA FARMACOLOGICA E INVASIVITÀ TUMORALE

Studi clinici e preclinici hanno stabilito che l'ipossia si associa ad una ridotta risposta sia alla radioterapia che alla chemioterapia [Vaupel P, Mayer A, 2007].

La prima risulta inefficace su cellule localizzate in aree ipossiche a causa del suo meccanismo citotossico mediato attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno [Semenza GL, 2004].

L'inefficacia degli agenti chemioterapici invece può essere dovuta in parte alla scarsa perfusione e/o alle caratteristiche aberranti del microcircolo tumorale, che impediscono la normale veicolazione del farmaco al bersaglio [Trédan O et al., 2007]; inoltre, l'acidificazione del pH intratumorale può ostacolare l'accesso di farmaci debolmente basici alle cellule tumorali [Gerweck LE et al., 2006].

Anche la capacità della cellula di attivare il pathway autofagico può contribuire alla resistenza al trattamento chemioterapico [Rzymiski T et al., 2009]. Infine, alla riduzione della concentrazione di ossigeno consegue una diminuzione della frazione di cellule proliferanti in funzione della distanza dai vasi sanguigni; un'importante conseguenza di questa ridotta proliferazione indotta dall'ipossia è la diminuzione dell'efficacia dei principali farmaci antitumorali, essenzialmente efficaci su cellule in rapida divisione, in funzione della distanza dai vasi sanguigni; poiché le cellule ipossiche sono quelle più lontane dalla rete vascolare, saranno esposte a concentrazioni inferiori di farmaco rispetto a quelle adiacenti ai vasi, soprattutto a causa del metabolismo a cui vanno incontro tali agenti chemioterapici attraverso i vari strati cellulari (**figura 3**) [Brown JM, Giaccia AJ, 1998].

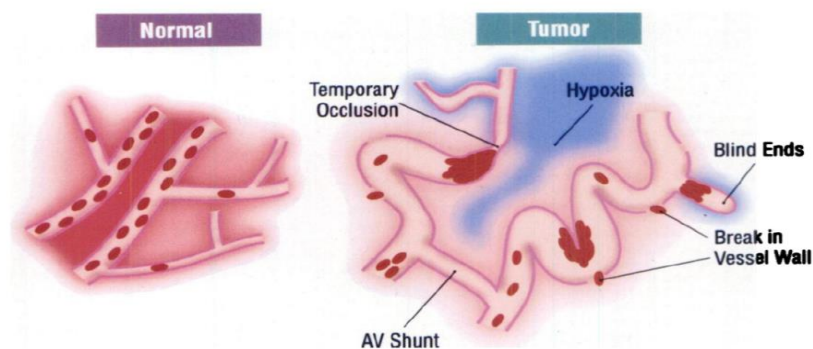


Figura 3. rappresentazione schematica delle principali differenze tra la rete vascolare in un tessuto normale e quella nel tumore [Brown JM, Giaccia AJ, 1998].

Tuttavia è stato visto come anche le alterazioni genomiche e proteomiche prodotte in condizioni di ipossia possano ridurre l'efficacia di vari farmaci, interferendo direttamente con il loro meccanismo d'azione [Wilson WR, Hay MP, 2011].

In particolare, è stato evidenziato che l'up-regolazione di HIF-1:

- induce l'espressione di trasportatori coinvolti nell'efflusso dei farmaci, come la glicoproteina P [Comerford KM et al., 2002] [Ding Z et al., 2010] [Wartenberg M et al., 2003];

- altera l'attività dei meccanismi di riparazione del DNA [Unruh A et al., 2003] [Koshiji M et al., 2005];
- sposta l'equilibrio tra fattori pro- e anti-apoptotici in favore della sopravvivenza cellulare [Erler JT et al., 2004], riducendo così l'efficacia di un gran numero di composti antitumorali attualmente in uso.

In generale, il fattore HIF-1 risulta overespresso nella maggior parte dei carcinomi umani [Zhong H et al., 1999], dove si associa alla mortalità dei pazienti e alla scarsa risposta ai trattamenti [Koukourakis MI et al., 2006] [DeClerck K, Elble RC., 2010]. In particolare, in studi condotti su carcinomi colorettali è stata osservata una significativa correlazione tra l'espressione di HIF-1 α e il potenziale angiogenico, invasivo e metastatico dei tumori [Xin Lu, Yibin Kang, 2010] e più a valle, con la mortalità dei pazienti [Krishnamachary B et al., 2003], costituendo quindi un utile indicatore prognostico per tale neoplasia. L'invasività dei carcinomi colorettali è stata correlata con la regolazione, da parte di HIF-1, dell'espressione di geni codificanti per metalloproteinasi di matrice, fibronectina-1, cheratine, vimentina, TGF- α e fattori di motilità (**figura 4**) [Krishnamachary B et al., 2003].

In biopsie umane di carcinomi colorettali è stata osservata la sovraespressione di HIF-1 α proprio in corrispondenza del margine invasivo del tumore [Zhong H et al., 1999]. Altri studi eseguiti sui carcinomi colorettali hanno mostrato che l'ipossia regola positivamente i livelli di espressione della proteina HIF-1 α , i quali risultano direttamente correlati con l'mRNA di VEGF, con l'invasività (**figura 4**), l'estensione del tumore e la neovascolarizzazione [Krishnamachary B et al., 2003], indicando chiaramente un effetto positivo di HIF-1 α sulla crescita tumorale e l'angiogenesi, evidentemente mediato da VEGF. Inoltre, l'overespressione di HIF-1 α influisce su molteplici aspetti del complesso meccanismo di invasività tumorale, favorendo i processi di trasformazione mesenchimale, di degradazione, di rimodellamento e di migrazione attraverso la matrice extracellulare (ECM).

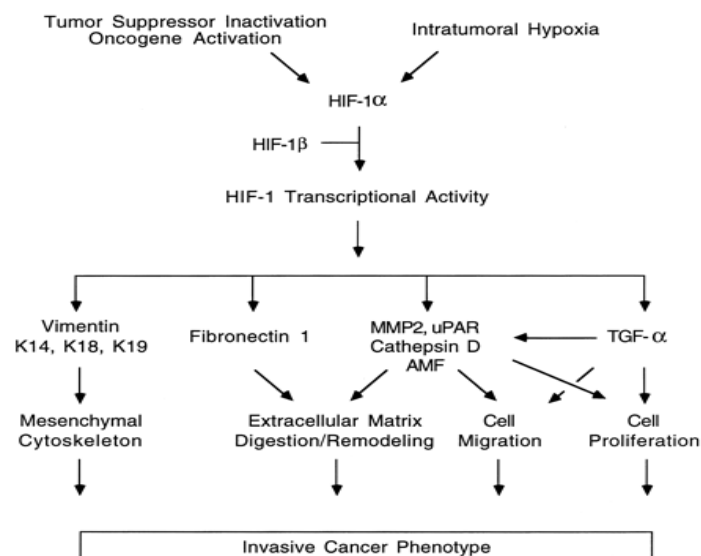


Figura 4. pathway attraverso cui il fattore HIF-1 promuove un fenotipo invasivo [Krishnamachary B et al., 2003]

INIBIZIONE DI HIF-1 COME TERAPIA ANTITUMORALE

Dal momento che molte delle alterazioni geniche selezionate durante la progressione tumorale, consistenti nell'attivazione o inattivazione di specifici oncogeni od oncosoppressori, hanno come effetto diretto quello di incrementare i livelli di HIF-1 α , quest'ultimo può essere considerato un target "secondario" della selezione clonale ipossia-indipendente e di conseguenza un possibile candidato come bersaglio di strategie terapeutiche mirate.

Numerosi dati suggeriscono che l'inibizione dell'espressione della proteina HIF-1 α e/o della stabilità del suo mRNA potrebbe risultare terapeutica [Melillo G, 2006] [Chen J et al., 2014]. Nel dettaglio, il knockdown di HIF-1 α attraverso un meccanismo di RNA interference condizionale doxyciclina-dipendente in animali da laboratorio, porta alla riduzione della crescita tumorale [Li L et al., 2005].

Le principali strategie per eliminare le cellule ipossiche finora individuate prevedono:

1. la somministrazione di pro-farmaci attivati in condizioni ipossiche, come la Tirapazamina, una benzotriazina attivata a radicale libero in condizioni di ipossia e capace di produrre uno specifico potenziamento dell'azione alchilante del Cisplatino [Shannon AM et al., 2003] [Gatineau M et al., 2005].
2. l'inibizione dell'espressione e/o dell'attività del fattore HIF-1 attraverso l'utilizzo di small interfering RNA (siRNA) [Dykhhoorn DM, Lieberman J, 2006] diretti contro la subunità inducibile HIF-1 α o di oligonucleotidi antisenso [Gleave ME, Monia BP, 2005] come EZN-2968, un ASO (*AntiSense Oligonucleotides*) complementare alla sequenza dell'mRNA di HIF-1 α , che una volta legato, con elevata affinità e stabilità tissutale, ne impedisce la traduzione; EZN-2968 è attualmente in fase I della sperimentazione clinica per tumori solidi avanzati e per linfomi [Greenberger LM et al., 2008] [<http://clinicaltrials.gov>];
3. l'impiego di composti a basso peso molecolare che riducano l'attività di HIF-1 α agendo su altri bersagli, come il Topotecano, che inibisce la topoisomerasi I [Rapisarda A et al., 2004], o il composto chinolico PMX290, che inibisce il sistema redox della tioredossina (Trx-1) [Jones DT et al., 2006] [Ravizza R et al., 2009];
4. l'utilizzo di piccole molecole in grado di agire sulla via di HIF-1 α , quali agenti che inibiscono il legame HIF-1/DNA o il reclutamento del coattivatore p300/CBP [Kung AL et al., 2004] o la traduzione di HIF-1 α [Koh MY et al., 2008]; tuttavia è importante sottolineare come queste molecole possano avere effetti collaterali;
5. l'inibizione dell'attività di alcune vie di trasduzione del segnale, come quelle controllate dai fattori di crescita e/o da mTOR [Bernardi R et al., 2006] [Zhong H et al., 2000], che risultano attivate in modo anomalo in molti tumori con la conseguenza di provocare un aumento della sintesi di HIF-1 α [Melillo G, 2006].

Nello sviluppo di inibitori del fattore trascrizionale HIF-1, risulta necessario considerare che la sola inibizione di HIF-1 può non essere sufficiente per arrestare l'angiogenesi e la crescita tumorale, dal momento che pathway indipendenti da HIF-1 possono superare la sua inibizione [Mizukami Y *et al.*, 2005]. Pertanto, la migliore strategia consiste nella combinazione tra inibitori di HIF-1 e terapie convenzionali; tale terapia combinata consente sia di inibire i molteplici pathway HIF-1-dipendenti e HIF-1-indipendenti, sia di contrastare il coinvolgimento di tale fattore nel mediare la resistenza a radio e chemioterapia [Brown LM *et al.*, 2005].

AUTOFAGIA

L'autofagia è un processo cellulare di degradazione catabolica in grado di provvedere al turnover e al riciclaggio dei componenti citoplasmatici, attraverso un pathway lisosoma-dipendente. È un processo altamente regolato, attivo in tutte le cellule eucariotiche e regolato da geni ATG (*AuTophagy-Related Genes*, originariamente identificati in lievito), necessario al mantenimento dell'omeostasi cellulare [Rosenfeldt MT, Ryan KM., 2011]. Poiché tale processo è responsabile della rimozione di aggregati proteici, organelli danneggiati e agenti patogeni e conferisce un aumento della stabilità genomica, la sua interruzione è associata all'insorgenza e/o alla progressione di diverse patologie, che comprendono disturbi neurodegenerativi, cancro, malattie cardiache e infettive [Eskelinen EL, Saftig P., 2009]. In determinate circostanze tuttavia, l'attivazione del processo autofagico può mediare la morte cellulare [Denton D *et al.*, 2014].

CARATTERIZZAZIONE DEI PROCESSI AUTOFAGICI

L'autofagia si classifica prevalentemente in tre processi, denominati microautofagia, autofagia chaperone-mediata e macroautofagia, a seconda della modalità di ingresso del materiale citoplasmatico nel lume lisosomiale. Salvo diversa indicazione, il termine "autofagia" normalmente denota la macroautofagia in quanto risulta essere la tipologia più diffusa.

- **Microautofagia.** È un processo di degradazione lisosomiale non selettivo (**figura 5**). I componenti citoplasmatici entrano direttamente nel lisosoma attraverso l'invaginazione della membrana: questa media sia l'invaginazione che la scissione della vescicola all'interno del lume, dove entrano in azione le idrolasi lisosomiali [Li WW *et al.*, 2012].

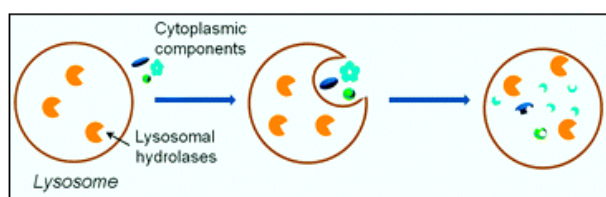


Figura 5. Rappresentazione schematica del processo microautofagico [Baek KH *et al.*, 2012]

- Autofagia chaperone-mediata.** E un processo selettivo, poiché le proteine citosoliche destinate ad essere trasportate all'interno del lume lisosomiale vengono riconosciute, attraverso il motivo pentapeptidico KFERQ, dal chaperone citosolico Hsc70, una proteina di 73 kDa (**figura 6**). Il legame di Hsc70 ai substrati proteici è regolato dalla presenza di ATP, e la conformazione legata all'ADP ha una più alta affinità di legame per le proteine che devono essere degradate [Li W *et al.*, 2011]. Hsc70 può trovarsi nel citosol o nel lume del lisosoma. Quando le proteine mal ripiegate vengono riconosciute e legate da Hsc70 citosolico, altri co-chaperoni associati ad esso partecipano alla denaturazione della proteina che, così denaturata, viene traslocata all'interno del lume lisosomiale, attraverso il legame con il recettore di membrana Lamp2A (*Lysosomal-associated membrane protein 2A*), dove viene degradata. Nel lisosoma si assiste anche alla presenza di Hsc70 lisosomiale, che facilita l'ingresso del substrato proteico nel lume [Baek KH *et al.*, 2012].

Da un recente studio, sembra che questa via partecipi alla degradazione di HIF-1 α [Hubbi ME *et al.*, 2013]. Si è visto infatti che l'overespressione di Hsc70 e Lamp2A diminuisce i livelli di proteina e l'attività di HIF-1 α , mentre il knock-down ha l'effetto opposto. Inoltre, bloccando la degradazione lisosomiale, utilizzando Bafilomicina A1 o Clorochina che inibiscono l'attività della pompa protonica V-ATPasi responsabile dell'acidificazione del lisosoma, si assiste ad un aumento sia dei livelli di HIF-1 α , sia dell'attività trascrizionale di HIF-1. Questo incremento è paragonabile in condizioni normossiche e ipossiche.

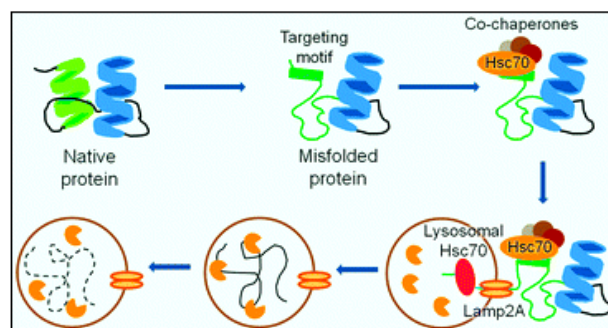


Figura 6. Rappresentazione schematica del processo autofagico chaperone-mediato [Baek KH *et al.*, 2012]

- Macroautofagia.** E' generalmente considerata un processo non selettivo [Yang Z, Klionsky DJ, 2010]. La macroautofagia (**figura 7**) è la principale via utilizzata dalla cellula per il turnover delle componenti citoplasmatiche [Ravikumar B *et al.*, 2010]. Il processo è suddiviso in tre fasi, che comprendono l'iniziazione, la formazione dell'autofagosoma e la maturazione e degradazione.

Iniziazione: nelle cellule di mammifero il segnale deriva dal sensore per i nutrienti mTOR, che non va più ad inibire un complesso serina/treonina chinasi contenente ULK 1/2, ATG13, FIP200 e ATG101. Tale complesso, così attivato, è responsabile della formazione di una membrana di isolamento, o fagoforo, che circonda parzialmente il materiale da degradare [Rosenfeldt MT, Ryan KM, 2009].

Formazione dell'autofagosoma: la nucleazione della vescicola che originerà l'autofagosoma dipende dall'attività della chinasi hVps34 (PI3K class III) e dalla sua associazione con le proteine Beclin 1 e p150/Vps35. A questa operazione segue la chiusura dell'autofagosoma operata da due sistemi di coniugazione simili all'ubiquitina (ATG5–ATG12 e LC3-II). Il primo è attivato da ATG7 e porta alla formazione di un complesso multimerico composto da ATG5–ATG12-ATG16, la cui azione è fondamentale per dirigere l'inserimento della proteina LC3 nella membrana dell'autofagosoma. LC3 è un marker autofagico molto utilizzato e viene inizialmente sintetizzato come precursore citosolico (proLC3), per essere poi successivamente processato a LC3-I da ATG4. La sua completa maturazione (LC3-II) si ottiene mediante la coniugazione a fosfatidiletanolamina (PE) e l'inserzione nella membrana dell'autofagosoma [Rosenfeldt MT, Ryan KM, 2009].

Maturazione e degradazione: il meccanismo molecolare alla base della maturazione richiede l'azione di proteine lisosomiali come LAMP1 e LAMP2, la GTPasi Rab7, la proteina UVRAG (*UltraViolet-Radiation-Resistance-Associated Gene*) e altre molecole [Eskelinen EL, 2005]. UVRAG indirizza le proteine chiamate "tethering proteins" alla membrana dell'autofagosoma e in questo modo attiva Rab7 per facilitare la fusione con il lisosoma. [Rosenfeldt MT, Ryan KM, 2009]. L'autolisosoma formato è una vescicola a pH acido contenente molti enzimi, tra cui le catepsine, che tramite un processo catabolico degradano peptidi e altri costituenti cellulari per rifornire la cellula di materiali ed energia sufficienti alla sopravvivenza.

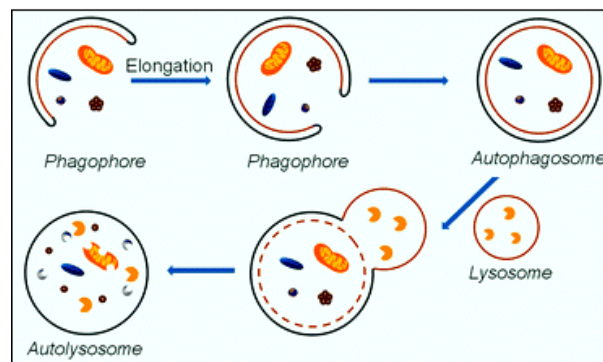


Figura 7 Rappresentazione schematica del processo macroautofagico [Baek KH et al., 2012].

AUTOFAGIA E CANCRO

L'autofagia svolge prevalentemente un ruolo protettivo nei confronti delle cellule non tumorali. Tuttavia, per quanto riguarda le neoplasie, tale processo sembrerebbe svolgere un duplice ruolo, prevenendone l'insorgenza negli stadi iniziali, ma favorendone la progressione negli stadi più avanzati [Eskelinen EL., 2011]. In realtà, i meccanismi molecolari attraverso i quali l'autofagia esercita un ruolo oncosoppressivo sono poco conosciuti. È probabile che il processo autofagico elimini gli organelli danneggiati che altrimenti diventerebbero una potenziale fonte di agenti dannosi per il

DNA, come specie reattive dell'ossigeno, che potrebbero causare instabilità genomica con la conseguente attivazione degli oncogeni e la progressione tumorale. Inoltre, l'attivazione dell'autofagia in condizioni di stress impedisce che le cellule vadano incontro a necrosi e disperdano il proprio contenuto nell'ambiente extracellulare, evitando l'instaurarsi di processi infiammatori e i conseguenti danni al tessuto circostante, instabilità genetica e, in conclusione, la transizione verso un fenotipo più maligno [Janku F et al., 2011].

Il ruolo dell'autofagia nell'impedire lo sviluppo della massa tumorale è stato inizialmente dimostrato utilizzando un modello murino, attraverso la delezione monoallelica del gene Beclin1 (Beclin1 +/-), essenziale per l'induzione dell'autofagia. I topi Beclin1 +/- , paragonati ai ceppi wt, hanno mostrato un'incidenza significativamente maggiore nello sviluppo di tumori spontanei, tra i quali troviamo linfomi, leucemie, carcinomi epatocellulari e adenocarcinomi al polmone.

Al contrario, una volta che la neoplasia si è instaurata, il processo autofagico può venire indotto anche come risposta adattativa delle cellule tumorali, alle quali sembra conferire un vantaggio in termini di sopravvivenza a condizioni di stress quale quello causato dall'instaurarsi di un microambiente ipossico, oppure quello generato da un trattamento chemio e/o radioterapico. Tale processo quindi può essere sfruttato dalle cellule tumorali per sostenere la riorganizzazione metabolica a cui vanno incontro in seguito alla trasformazione neoplastica [Lorin S et al., 2013].

In queste situazioni, l'inibizione dell'autofagia combinata con la somministrazione di induttori di stress metabolico o agenti chemioterapici, potrebbe essere utile nel trattamento del cancro.

AUTOFAGIA E IPOSSIA

Le cellule che nei tumori solidi si trovano localizzate lontano dai vasi sanguigni, soffrono per le condizioni di ipossia cronica e la mancanza di nutrienti, e tramite l'attività di HIF-1 sono in grado di indurre il pathway autofagico come risposta citoprotettiva [Mathew R, White E, 2011].

Recentemente, è stato suggerito che l'induzione di autofagia da parte di HIF-1 contribuisca alla resistenza al trattamento citotossico mediata dall'ipossia in vitro.

Per quanto riguarda la resistenza ai farmaci, il rapporto tra HIF-1 e l'autofagia attende ancora conferme in vivo. Tuttavia l'importanza funzionale di HIF-1 nel processo autofagico è complessa e probabilmente dipendente dal contesto e/o dal tipo cellulare [Rohwer N, Cramer T, 2011].

INIBIZIONE DELL'AUTOFAGIA COME TERAPIA ANTITUMORALE

Poiché le cellule tumorali potrebbero utilizzare l'autofagia come meccanismo di resistenza per favorire la sopravvivenza in presenza di radioterapia e chemioterapia, sono stati messi a punto diversi composti in grado di colpire diverse fasi del processo autofagico, migliorando così la citotossicità degli altri trattamenti e ostacolando maggiormente la progressione tumorale.

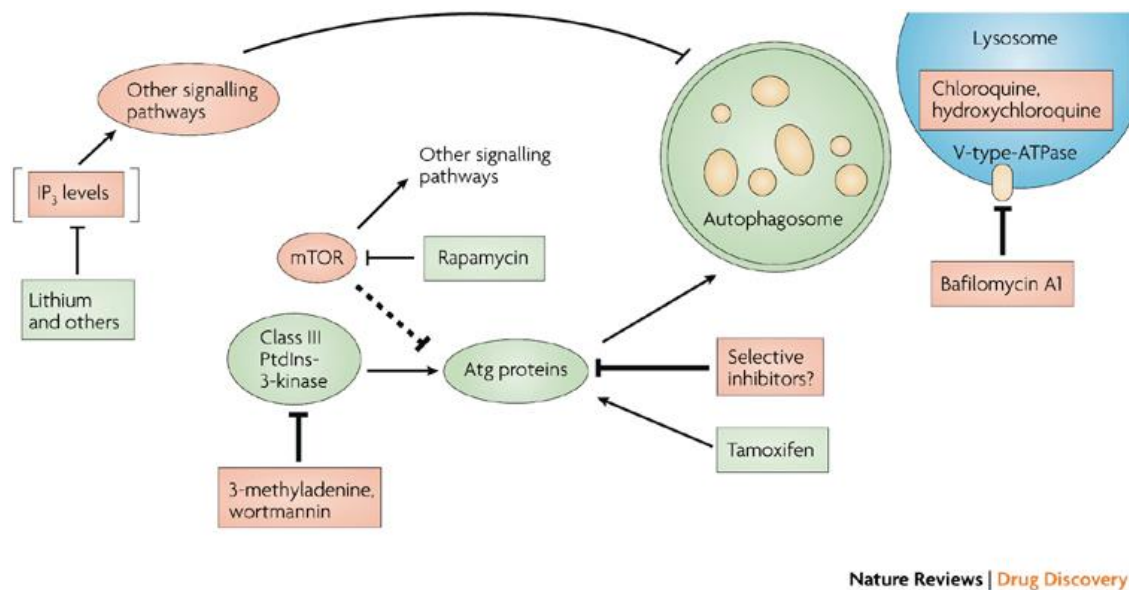


Figura 8. Inibitori del processo autofagico [Rubinsztein DC et al, 2007]

Gli inibitori maggiormente utilizzati sono la 3-metiladenina (3-MA), la bafilomicina A1 (BaA1) e la cloroquina (CQ), di cui solo l'ultimo è approvato per l'utilizzo in clinica. Il primo inibisce la PI3K di classe III (hVps34), coinvolta nella formazione del fosfatidilinositolo 3-fosfato, un componente essenziale per la creazione del fagoforo. La CQ è una base debole e può essere intrappolata nelle vescicole acide elevando il pH intralisosomiale e bloccando così la degradazione. La BaA1 invece, è un macrolide in grado di inibire la pompa protonica vacuolare (ATPasi), essenziale per l'acidificazione del lume lisosomiale e la successiva degradazione. In questo modo, la 3-MA e la BaA1 inibiscono rispettivamente le fasi precoci e tardive dell'autofagia (figura 8).

Anche se questi composti possono effettivamente sopprimere l'autofagia, nessuno è specifico per questo processo. Questi farmaci hanno diversi effetti off-target e modulano altre attività cellulari, come endocitosi, traffico intracellulare, biogenesi e funzione lisosomiale [Baek KH et al., 2012].

Inoltre, nello sviluppo di inibitori del processo autofagico, risulta di fondamentale importanza tenere in considerazione il duplice ruolo che il processo autofagico potrebbe svolgere durante lo sviluppo e la progressione della massa tumorale. Per questi motivi, strategie terapeutiche che prevedono l'utilizzo di chemioterapici in grado di determinare l'attivazione del processo autofagico con un sicuro fine citoprotettivo in combinazione con inibitori del pathway lisosomiale potrebbero essere promettenti per il trattamento della massa tumorale.

APOPTOSI

La morte cellulare, intesa come evento fisiologico, è definibile come un meccanismo di eliminazione cellulare altamente evoluto e conservato che risponde a stimoli omeostatici e morfogenetici. Le cellule possiedono un programma genetico di morte, chiamato apoptosi. Questo tipo di morte cellulare può essere indotto da una mancata stimolazione da parte di ormoni o fattori di crescita, o causato da radiazioni ionizzanti, che possono provocare ingenti danni ai componenti vitali della cellula come DNA e citoscheletro, batteri, virus ma anche farmaci [Ashkenazi A, 2008]. L'apoptosi coinvolge generalmente singole cellule e, anche quando porta alla rimozione di numerose cellule, non è in genere accompagnata da fenomeni infiammatori.

La cellula apoptotica, benché diminuisca le sue dimensioni a causa di una drastica diminuzione del volume citoplasmatico, mantiene la propria funzionalità fino al termine del processo, quando si frammenta in una serie di "corpi apoptotici", rivestiti ciascuno da membrana cellulare e contenenti citoplasma e organelli. La membrana cellulare rimane integra, perdendo però alcune specializzazioni; gli organuli non vengono danneggiati e a livello del nucleo si osserva una elevata condensazione (picnosi) e frammentazione della cromatina, che si addossa alla membrana nucleare interna che comincia ad invaginarsi. In stadi più avanzati si può assistere alla frammentazione nucleare.

Quando la cellula sta andando in apoptosi, un fosfolipide di membrana, la fosfatidilserina, viene esposto all'esterno, richiamando così macrofagi, che fagocitano la cellula degradandola all'interno dei fagosomi. In questo modo non si instaurano processi infiammatori e la vitalità delle cellule circostanti viene preservata.

Le vie responsabili dell'attivazione del processo apoptotico sono la via intrinseca e la via estrinseca. Entrambe le vie culminano nell'attivazione delle caspasi, ossia una famiglia di cisteinil-proteasi che agiscono specificamente in corrispondenza di residui di acido aspartico [Hassan M et al., 2014].

Via intrinseca. E' chiamata anche "via mediata dal mitocondrio" o "indotta da stress" e viene attivata in risposta a numerosi stimoli, tra cui danni al DNA, stress del reticolo endoplasmatico (ER), o privazione di citochine. Tutto questo porta alla permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale (MOMP), il che consente il rilascio di fattori pro-apoptotici dallo spazio intermembranario [Tischner D et al., 2010].

In condizioni normali, fattori di crescita e altri segnali di sopravvivenza stimolano l'espressione di proteine antiapoptotiche appartenenti alla famiglia di proteine Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e Bfl-1/A1) che, interagendo con le membrane mitocondriali, impediscono l'attività dei membri proapoptotici della famiglia Bax e Bak. L'attivazione della via intrinseca comporta quindi un'alterazione dell'equilibrio tra i membri pro-apoptotici e anti-apoptotici: è infatti necessario che le proteine pro-apoptotiche si liberino dall'azione inibitoria delle proteine anti-apoptotiche, ciò avviene

grazie all'intervento di un terzo gruppo di proteine che appartengono a questa famiglia, definite proteine "BH3-only" [Huang S et al., 2009]. Una volta liberi di agire, Bax e Bak, causano la permeabilizzazione della membrana esterna del mitocondrio con il conseguente rilascio nel citoplasma di fattori pro-apoptotici tra i quali il citocromo C. Tale pathway culmina con l'attivazione delle caspasi effettrici, le quali agiscono degradando le proteine citoscheletriche e quelle della matrice nucleare, portando alla frammentazione del nucleo e del suo contenuto di DNA.

Via estrinseca. La via estrinseca viene attivata da cellule immunitarie specializzate, come ad esempio le cellule natural killer (NK) o i linfociti T citotossici, per mezzo di specifici segnali. Queste cellule producono ligandi pro-apoptotici, presentati sulla loro superficie o rilasciati nello spazio extracellulare, che appartengono alla superfamiglia delle citochine, e comprendono il fattore di necrosi tumorale (TNF- α), Fas ligand (FasL o Apo1L) e TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), detto anche Apo2L. La loro azione è mediata da recettori detti "recettori di morte cellulare", quali FAS/CD95, TNF-R1, DR4 e DR5 [Ashkenazi A et al., 2008]. A seguito dell'interazione del recettore con proteine adattatrici, principalmente rappresentate da TRADD (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Death Domain*) e da FADD (*Fas-Associated Death Domain-containing protein*), avviene il reclutamento intracellulare della pro-caspasi 8. Numerose molecole di pro-caspasi 8, reclutate in uno spazio molto ravvicinato, vanno incontro a un taglio reciproco, passando alla forma attiva e determinando di conseguenza l'attivazione delle caspasi effettrici [Ashkenazi A et al., 2008] e quindi l'apoptosi.

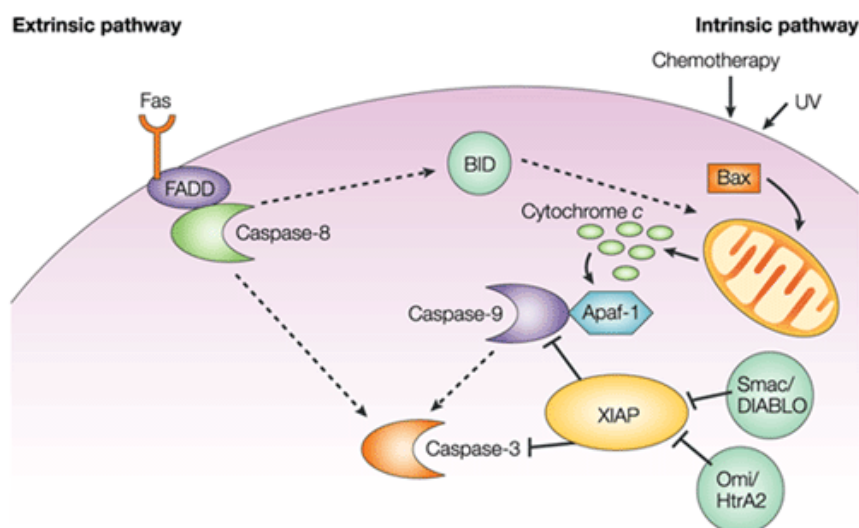


Figura 9. Pathway apoptotico [Salvesen GS, Duckett CS, 2002]

CROSSTALK TRA APOPTOSI E AUTOFAGIA

Sia l'autofagia che l'apoptosi sono processi biologici finemente controllati che giocano un ruolo essenziale nello sviluppo, nell'omeostasi tissutale e nelle patologie. Le interazioni tra le componenti dei due pathway rappresentano un complesso crosstalk [Nikoletopoulou V et al., 2013]. E' ormai ben noto che l'apoptosi costituisce la principale via di morte cellulare programmata, e i fattori molecolari coinvolti nella sua regolazione ed esecuzione sono stati ben caratterizzati. L'autofagia invece, è un processo non del tutto chiarito. Da un punto di vista evolutivo, l'autofagia precede l'apoptosi, ed è stata universalmente trovata negli eucarioti, dal lievito ai mammiferi, in cui svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e contribuisce alla sopravvivenza delle cellule durante i periodi di stress [Levine B, Kroemer G, 2008].

L'autofagia è stata spesso osservata in cellule morenti. In molti casi quindi, questo rappresenta un tentativo della cellula per attenuare lo stress prima di ricorrere alla soluzione definitiva ed irreversibile dell'apoptosi. In altri contesti invece, l'attivazione dell'autofagia potrebbe riflettere un crosstalk tra i due processi; l'autofagia infatti, indotta in risposta a molte situazioni di stress, che includono disfunzione degli organelli, stress metabolico e infezione da patogeni, può condurre le cellule verso due destini differenti: se lo stress è risolto, le cellule di solito ristabiliscono l'autofagia a livelli basali e ritornano al loro stato iniziale. Tuttavia, se lo stress persiste e l'autofagia non è più in grado di supportare la sopravvivenza cellulare, le cellule potrebbero rispondere attivando l'apoptosi al fine di garantire un'eliminazione controllata ed efficiente, senza innescare fenomeni di infiammazione locale [Rubinstein AD, Kimchi A, 2012].

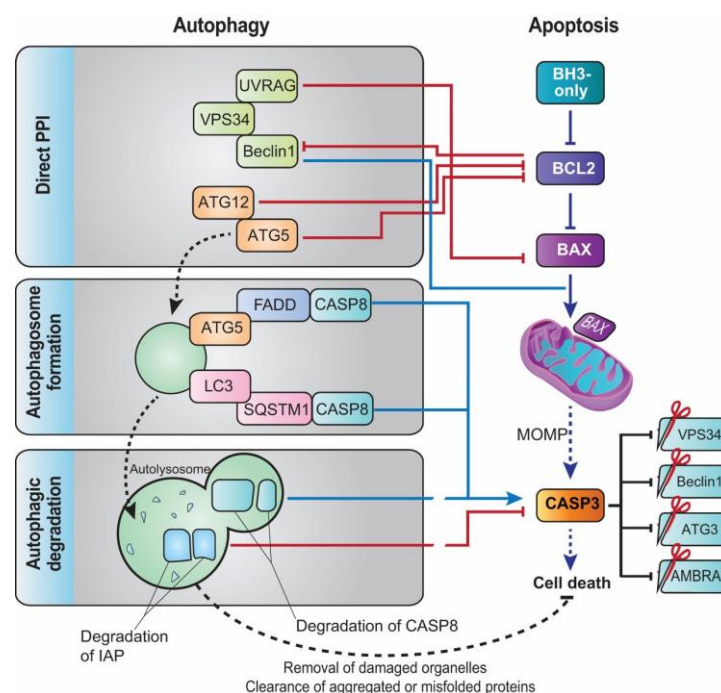


Figura 10. Meccanismo molecolare alla base del crosstalk tra apoptosi e autofagia [Rubinstein AD, Kimchi A, 2012]

Pertanto, si può pensare che un'interazione tra autofagia e apoptosi possa aver conferito un vantaggio evolutivo alle cellule, portando a una risposta controllata e precisa nei confronti di un determinato segnale di stress. Quindi, anche se autofagia e apoptosi rappresentano indubbiamente processi cellulari distinti con caratteristiche biochimiche e morfologiche differenti, i network proteici che controllano la loro regolazione ed esecuzione sono altamente interconnessi (**figura 10**).

Il crosstalk tra autofagia e apoptosi avviene a diversi livelli, classificati in modelli differenti sulla base di caratteristiche meccanicistiche.

L'apoptosi può essere regolata dall'autofagia attraverso tre modalità:

1. **Tramite la diretta modulazione del processo apoptotico ad opera di specifiche proteine autofagiche.** Un esempio è dato dalle proteine ATG12 e ATG5: queste, in forma coniugata, sono indispensabili per indurre l'autofagia in quanto fanno parte del "macchinario core" del processo autofagico. Oltre a questa funzione, esse sono in grado di dare inizio, in forma non coniugata, anche al pathway dell'apoptosi in risposta a diversi segnali di stress. Nelle cellule apoptotiche infatti, a seguito del taglio con calpaina, la porzione N-terminale di ATG5, trasloca nel mitocondrio dove media il rilascio del citocromo C interagendo con i membri "pro-survival" della famiglia di BCL2 (BclXL). Ugualmente, anche ATG12 mostra una funzione pro-apoptotica in quanto è in grado di legare e inibire sia BCL2 che MCL1, due membri anti-apoptotici della famiglia di BCL2.

Un'altra proteina è Beclin1, che induce l'attivazione della chinasi lipidica PI3KC3 (*fosfatidilinositolo-3-chinasi di classe III*, nota anche come Vps34), necessaria per il reclutamento delle proteine autofagiche. Nei mammiferi Beclin1, essendo una proteina "BH3 only", è in grado di legare BCL2 con la conseguente inibizione del processo autofagico, ma senza avere alcun effetto nel promuovere l'apoptosi, probabilmente a causa della composizione aminoacidica atipica del dominio BH3 che interagisce debolmente con BCL2 rispetto agli altri membri della famiglia. Ciononostante, Beclin1 in presenza di apoptosi è riconosciuta e tagliata da caspasi in siti specifici e, la porzione C-terminale è in grado di promuovere il rilascio del citocromo C da mitocondri isolati, dando così una possibile spiegazione del suo ruolo pro-apoptotico [Rubinstein AD, Kimchi A, 2012].

2. **Tramite utilizzo della membrana dell'autofagosoma come piattaforma per il reclutamento e l'attivazione delle caspasi.** Questo meccanismo è stato descritto per la caspasi-8, che può essere attivata dal complesso DISC (*death-inducing signalling complex*), il quale si assembla sulla membrana dell'autofagosoma. Il reclutamento della caspasi-8 può avvenire in due modi: attraverso il legame di questa a p62, che interagisce a sua volta con LC3 sull'autofagosoma, oppure attraverso l'interazione tra il FADD e ATG5. In entrambi i casi serve comunque una proteina autofagica adattatrice. L'eliminazione dei geni autofagici inibisce l'attivazione delle caspasi [Rubinstein AD, Kimchi A, 2012].

3. **Tramite uno sbilanciamento dell'equilibrio tra processi di autofagia e apoptosi.** Questo terzo modello prevede che le interferenze con la formazione dell'autofagosoma e con l'attività lisosomiale influenzino anche la risposta apoptotica cellulare. In assenza di nutrienti, l'autofagia ha un ruolo essenziale nella sopravvivenza cellulare; perciò in mancanza di essa la cinetica dell'apoptosi accelera fortemente. Allo stesso modo, nelle cellule tumorali l'inibizione dell'autofagia può portare alla sensibilizzazione di queste verso una grande varietà di farmaci. In sostanza quindi, l'omeostasi cellulare mantenuta da un processo dipendente dall'autofagia può indirettamente limitare o ritardare l'insorgenza dell'apoptosi. In altri casi, l'autofagia potrebbe facilitare certi eventi collegati alla morte cellulare per apoptosi [Rubinstein AD, Kimchi A, 2012].

Seguendo una logica simile, anche l'autofagia può essere regolata dall'apoptosi:

1. **Tramite la diretta modulazione del processo autofagico ad opera della proteina apoptotica BCL2.** Nelle cellule quiescenti BCL2 è costitutivamente legata alla proteina "BH3-only" Beclin1; in seguito all'induzione del processo autofagico queste proteine dissociano con il conseguente aumento dell'attività autofagica. La dissociazione di BCL2 da Beclin1 può anche essere causata dal fatto che altri membri della famiglia "BH3-only" competono con Beclin1 per il legame a BCL2. Perciò, le proteine "BH3-only", come BNIP3 regolato da HIF-1, possono agire come regolatori positivi del processo autofagico, sebbene BNIP3 venga classificato come elemento pro-apoptotico. Anche la fosforilazione di BCL2 può agire in questo senso in quanto riduce l'affinità di BCL2 nei confronti di Beclin1 [Maiuri MC et al., 2007].

Un'altra proteina come FLIP, anti-apoptotica, da recenti studi si è visto essere coinvolta anche nell'inibizione dell'autofagia: questo è possibile perché compete con LC3 per il legame ad ATG3. Di conseguenza, FLIP previene il processo di lipidazione di LC3, riducendo quindi i livelli di autofagia [Nikoletopoulou V et al., 2013].

2. **Tramite l'attivazione del pathway apoptotico con la conseguente attivazione delle caspasi.** Numerose proteine autofagiche sono state identificate come target di clivaggio mediato da caspasi, come Beclin1, ATG3, ATG4D e AMBRA1. Una spiegazione plausibile per questo fenomeno è che l'inibizione dell'autofagia è necessaria per prevenire l'attivazione simultanea di processi "pro-survival" e "pro-death" all'interno delle cellule. Per supportare quest'ipotesi, recentemente si è visto che forme mutanti della proteina autofagica AMBRA1 che non può essere tagliata dalle caspasi, conferisce una parziale protezione dall'apoptosi, che correla anche con livelli più alti di autofagia [Rubinstein AD, Kimchi A, 2012]. Inoltre, è stato dimostrato che la proteina pro-apoptotica Bax riduce l'autofagia promuovendo il taglio caspasi-mediato di Beclin 1 che forma un frammento C-terminale che localizza sui mitocondri e sensitizza le cellule all'apoptosi [Nikoletopoulou V et al., 2013].

Mentre l'apoptosi ha un ruolo univocamente oncosoppressivo, il ruolo dell'autofagia è molto più complesso. Come già accennato, le cellule tumorali spesso vanno incontro a diversi tipi di stress, tra cui va annoverata anche l'esposizione a un microambiente ipossico e/o a chemioterapici, che causano l'attivazione del processo autofagico come meccanismo di sopravvivenza. In questo modo l'inibizione dell'autofagia, in combinazione con altri agenti chemioterapici, potrebbe portare ad un miglioramento nella terapia in quanto viene compromessa l'abilità delle cellule di adattarsi alle condizioni di stress, e ciò porterebbe quindi ad un arresto del ciclo cellulare o a morte cellulare programmata. Al contrario, l'inibizione dell'autofagia in cellule tumorali mancanti dell'apoptosi potrebbe avere effetti dannosi. L'accumulo di danno cellulare, in questi casi, porterebbe ad un aumento dell'instabilità genomica o condurrebbe le cellule verso una morte necrotica infiammatoria, che di conseguenza faciliterebbe la progressione tumorale e la chemioresistenza.

Inoltre, un altro aspetto da non sottovalutare è che anche la stessa autofagia, in determinate circostanze, è in grado di provocare morte cellulare, in un processo conosciuto come "morte cellulare autofagica". Questo può essere particolarmente importante in cellule tumorali mancanti dell'apoptosi in cui l'autofagia diventa un meccanismo di morte alternativo. Queste cellule, infatti, potrebbero esibire un'eccessiva degradazione delle componenti cellulari che le condurrebbe alla morte. Apoptosi e autofagia quindi, sono regolate da un delicato equilibrio.

CROSSTALK TRA DEGRADAZIONE VIA PROTEASOMA E AUTOFAGIA

Il Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) e la macroautofagia sono due dei principali pathways intracellulari per la degradazione delle proteine. La degradazione di proteine con breve emivita attraverso l'UPS è iniziata dall'aggiunta di molecole di ubiquitina alle proteine bersaglio, catalizzata dagli enzimi E1, E2 ed E3. Le proteine poliubiquitinate sono riconosciute e processate dalla subunità 26S del proteasoma, un complesso proteasico multicatalitico. In contrasto, l'autofagia degrada le proteine con lunga emivita e gli organelli danneggiati. Si è a lungo pensato all'UPS e all'autofagia come due sistemi separati per la degradazione delle proteine, ma numerose recenti evidenze hanno dimostrato come i due processi risultino l'uno al servizio dell'altro in una maniera interdipendente nel mediare la degradazione di proteine poliubiquitinate e nella risoluzione dello stress del reticolo endoplasmico. Recenti studi hanno dimostrato che l'inibizione del proteasoma può indurre autofagia [Wu WK *et al.*, 2010] e che l'inibizione, tramite approccio farmacologico o di RNA interference, dell'autofagia può indurre l'attività proteasomale e l'espressione di subunità del proteasoma. È infatti riportato sia che i proteasomi vengono probabilmente degradati per via autofagica [Cuervo AM *et al.*, 1995], e che quindi sia possibile che l'inibizione del processo autofagico porti ad un accumulo di proteasomi con conseguente aumento dell'attività proteolitica, sia che l'autofagia sia in grado di

regolare l'attività proteasomale attraverso meccanismi trascrizionali e/o post-trascrizionali. È stato dimostrato che l'accumulo di p62 causato dall'inibizione del processo autofagico potrebbe compromettere la degradazione dei substrati della via ubiquitina-proteasoma ritardandone la consegna al proteasoma [Korolchuk VI et al., 2009] e quindi aumentare i livelli di proteine poliubiquitinate.

L'induzione dell'attività proteasomale attraverso l'inibizione del processo autofagico risulta avvalorata dalla rimozione dei substrati ubiquitina-indipendenti (es. CCND1, CDKN1A) e dal taglio proteolitico di NFκB, un'azione indipendente dall'ubiquitina. Queste osservazioni suggeriscono l'esistenza di un crosstalk tra autofagia e altre vie di trasduzione del segnale, attraverso l'interazione con il proteasoma sia in una maniera ubiquitina dipendente che indipendente.

5-FLUOROURACILE

Il 5-fluorouracile (5-FU) è un agente chemioterapico antitumorale appartenente alla famiglia degli antimetaboliti. Si tratta di un analogo dell'uracile con un atomo di fluoro al posto di un idrogeno in posizione C-5, in grado di inibire la sintesi del DNA principalmente interferendo con la biosintesi del timidilato.

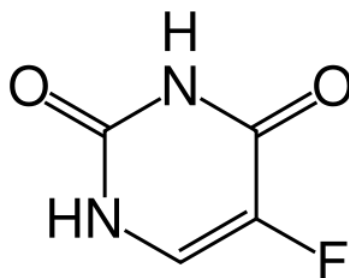


Figura 11. Struttura chimica del 5-Fluorouracile

Una volta entrato nella cellula, utilizzando lo stesso meccanismo di trasporto facilitato dell'uracile, il 5-FU è convertito a diversi metaboliti attivi come fluorodeossiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeossiuridina trifosfato (FdUTP) e fluorouridina trifosfato (FUTP), che possono essere facilmente incorporati nel DNA e nell'RNA. Inoltre, poiché il FdUMP inibisce l'azione della timidilato sintetasi (TS), depletando le riserve di timidilato nelle cellule normali, oltre che in quelle neoplastiche, questo farmaco ha un'elevata tossicità e deve essere utilizzato con cautela. L'enzima limitante nel catabolismo del 5-FU è la diidropirimidina deidrogenasi (DPD), che converte il 5-FU a diidrofluorouracile (DHFU), un derivato inattivo. Più dell'80% del 5-FU somministrato è normalmente catabolizzato primariamente nel fegato, dove la DPD è abbondantemente espressa.

INIBIZIONE DELLA TIMIDILATO SINTASI E ERRATA INCORPORAZIONE NEL DNA

La timidilato sintasi (TS) è un enzima che catalizza la metilazione riduttiva della deossiuridina monofosfato (dUMP) a deossitimidina monofosfato (dTMP), in cui il folato ridotto 5,10-metilenetetraidrofolato (CH₂THF) funge da donatore di gruppi metile. Questa reazione fornisce la sola fonte de novo di timidilato, indispensabile per la sintesi replicativa e riparativa del DNA. La proteina TS, con un peso molecolare di 36 kDa, funziona in forma dimerica e contiene un sito di legame per i nucleotidi ed un sito di legame per il CH₂THF. Il metabolita 5-FdUMP è in grado di legarsi al sito di legame per i nucleotidi, formando un complesso ternario stabile con l'enzima TS e il CH₂THF, bloccando di conseguenza il legame del normale substrato dUMP e inibendo la sintesi di dTMP (figura 12). La deplezione di dTMP porta alla conseguente riduzione dei livelli di deossitimidina trifosfato (dTTP), la quale induce perturbazioni dei livelli degli altri deossinucleotidi (dATP, dGTP e dCTP) mediante vari meccanismi di feedback. Sbilanciamenti nel pool di deossinucleotidi (in particolare, il rapporto dATP/dTTP) compromettono gravemente la sintesi e la riparazione del DNA, inducendo un danno letale nel DNA. Inoltre, l'inibizione della TS porta ad accumulo di dUMP, che può a sua volta portare a livelli aumentati di deossiuridina trifosfato (dUTP). Sia dUTP che il metabolita del 5-FU FdUTP possono essere incorporati nel DNA, generando un segnale di "errore".

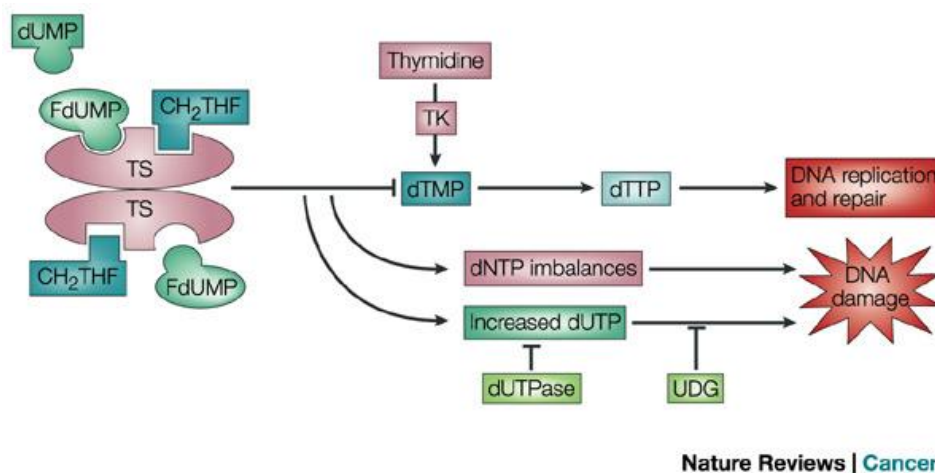


Figura 12. Meccanismo di inibizione della TS da parte del 5-FU [Longley DB et al., 2003]

La riparazione del DNA contenente uracile da parte del sistema di base excision repair è futile in presenza di alti rapporti (F)dUTP/dTTP e porta solamente ad ulteriore incorporazione di nucleotidi errati. Questi cicli di errata incorporazione, escisione e riparo causano alla fine rotture del filamento del DNA e morte cellulare. Il danno al DNA dovuto ad errata incorporazione di dUTP è altamente dipendente dai livelli della pirofosfato-dUTPasi, che limita l'accumulo intracellulare di dUTP. Il timidilato può essere recuperato dalla timidina mediante l'azione della timidina chinasi, alleviando di conseguenza gli effetti della mancanza di TS. Questa via di salvataggio rappresenta un potenziale meccanismo di resistenza al trattamento con 5-FU [Longley DB et al., 2003].

ERRATA INCORPORAZIONE NELL'RNA

In linee cellulari umane di tumore del colon e della mammella sono state identificate significative correlazioni tra l'errata incorporazione nell'RNA della fluorodesossipuridina trifosfato (FUTP), metabolita del 5-FU, e la perdita di potenziale clonogenico. Diversi studi dimostrano che l'errata incorporazione del 5-FU può portare tossicità all'RNA a diversi livelli. Essa infatti non solo inibisce il processing del pre-rRNA a rRNA maturo, ma compromette anche la modificazione post-trascrizionale dei tRNAs e l'assemblaggio e l'attività di complessi snRNA/proteina, inibendo di conseguenza lo splicing dei pre-mRNA [Longley DB et al., 2003]. Infine, la poliadenilazione dell'mRNA è inibita a concentrazioni relativamente basse di 5-FU.

DETERMINANTI DELLA RISPOSTA AL 5-FU

La comprensione del meccanismo d'azione del 5-FU ha portato allo sviluppo di numerose strategie finalizzate all'incremento dell'efficacia antitumorale di questo composto, attraverso la modulazione di una serie di determinanti biochimici e metabolici. In questo modo, si possono individuare i pazienti che beneficeranno maggiormente del trattamento con 5-FU e quelli invece che ne soffriranno a causa degli effetti tossici collaterali e che, pertanto, dovranno essere trattati con altri composti verso i quali mostrano una migliore risposta. A tale scopo sono stati identificati una serie di marcatori indipendenti e predittivi della risposta al 5-FU:

- ***Timidilato sintetasi (TS)***: diversi studi hanno mostrato una migliore risposta alla terapia basata sul 5-FU in pazienti con una bassa espressione della TS, dal momento che un'elevata espressione di questa proteina è associata ad una maggiore resistenza al trattamento chemioterapico [Metzger R et al., 1998]. Comunque, il trattamento con 5-FU è in grado di indurre in modo acuto l'espressione della TS sia in linee cellulari normali che tumorali [Chu E et al., 1993]. Questa induzione sembra essere dovuta all'inibizione di un meccanismo di feedback negativo, in base al quale la proteina TS in assenza del substrato lega l'mRNA della TS e ne inibisce la traduzione. Quando è legata stabilmente dal FdUMP, la TS non è più in grado di legare il suo mRNA e sopprimere la sua stessa traduzione, portando ad un aumento dell'espressione della proteina. Questo costituisce un potenziale meccanismo di resistenza, poiché l'aumento acuto dei livelli della proteina TS faciliterebbe il recupero dell'attività enzimatica.
- ***Timidina fosforilasi (TP)***: la TP è l'enzima che converte in modo reversibile il 5-FU a fluorodeossipuridina (FdUR), la quale può essere a sua volta convertita nel metabolita attivo FdUMP. La caratterizzazione del ruolo della TP nel modulare la responsività al 5-FU è risultata difficoltosa, a causa dell'esistenza di dati contraddittori pre-clinici e clinici. L'overespressione della TP inoltre, in modelli di colture cellulari e xenograft ha determinato un aumento della sensibilità

al 5-FU, presumibilmente per un aumento della produzione di FdUMP [Evrard A et al., 1999]. Al contrario, l'analisi d'espressione dell'mRNA della TP in 38 tumori coloretali indicava che i tumori con elevata espressione della TP rispondevano meno al 5-FU [Metzger R et al., 1998]. Questo risultato apparentemente contraddittorio può essere spiegato dal fatto che la TP costituisce anche un fattore di crescita angiogenico, dal momento che la sua sequenza è identica a quella del fattore di crescita endoteliale di derivazione piastrinica, giustificando la prognosi peggiore associata ad elevati livelli di espressione dell'enzima in carcinomi coloretali. È quindi plausibile che tale espressione costituisca un marker di un fenotipo tumorale più invasivo ed aggressivo, nonché meno responsivo alla chemioterapia.

- **Diidropirimidina deidrogenasi (DPD):** diversi studi hanno mostrato che pazienti portatori di varianti alleliche che determinano bassi livelli di espressione dell'enzima DPD sono soggetti a una profonda tossicità sistemica in risposta al trattamento con 5-FU [Johnson MR et al., 1999]. Studi in vitro hanno anche dimostrato che l'overespressione di DPD in linee cellulari tumorali conferisce resistenza al 5-FU [Takebe N et al., 2001]. Inoltre, alti livelli d'espressione dell'mRNA della DPD in tumori coloretali correlano con la resistenza al 5-FU. Queste scoperte riflettono presumibilmente la degradazione maggiore del 5-FU mediata da DPD.
- **p53:** l'oncosoppressore p53 mantiene l'integrità del DNA attivando la trascrizione di geni come CDKN1A e GADD45 α , i cui prodotti inducono l'arresto del ciclo cellulare in risposta al danno al DNA [Lane DP, 1992] [Zhan Q et al., 1998] [Dotto GP, 2000]. A seconda del contesto e della natura del danno al DNA, p53 può favorire l'eliminazione di cellule danneggiate promuovendo l'apoptosi mediante l'induzione di geni pro-apoptotici, come FAS (CD95/APO1) e BAX, e la down-regolazione dell'espressione di geni anti-apoptotici, come BCL2 [Miyashita T et al., 1994]. Studi in vitro poi, hanno mostrato che la perdita di funzione di p53 riduce la sensibilità cellulare al 5-FU.

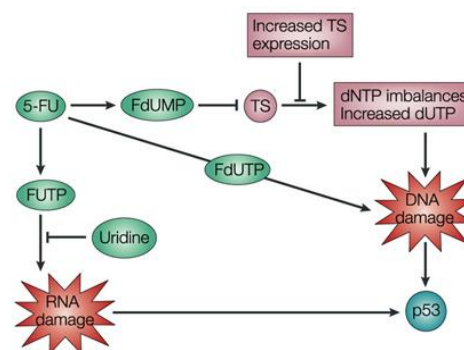


Figura 13. Attivazione di p53 da parte del 5-FU [Longley DB et al., 2003]

E' stato mostrato anche che l'eliminazione di entrambi gli alleli di TP53 o BAX in una linea cellulare di cancro coloretale ha reso le cellule particolarmente resistenti all'apoptosi indotta da 5-FU rispetto alla linea cellulare parentale. La stabilizzazione di p53 in risposta al 5-FU può essere

ridotta a seguito della co-incubazione con uridina, che compete con il 5-FU per l'incorporazione nell'RNA. Ciò indica che la stabilizzazione di p53 mediata dal 5-FU è principalmente dovuta agli effetti a carico dell'RNA (**figura 13**).

- **Instabilità dei microsatelliti (MSI):** è causata dall'incapacità del sistema del mismatch-repair (MMR) di correggere errori che si verificano durante la replicazione del DNA. Difetti nel MMR sono responsabili del 10-15% di tutti i tumori coloretali e di oltre il 90% dei casi di cancro al colon non-poliposico ereditario (HNPCC). Nei HNPCC, MSI è causata da mutazioni ereditate nei geni del MMR mentre molti tumori sporadici con MSI sono causati da silenziamento trascrizionale del gene MLH1 dovuto a metilazione del promotore. Meyers et al. [Meyers M et al., 2001] hanno mostrato che il ripristino dell'attività di MLH1 in una linea cellulare di cancro coloretale con difetti nel MMR aumentava la sensibilità al 5-FU, indicando che cellule con difetti nel MMR sono meno sensibili al 5-FU. Comunque, il fenotipo MSI è stato associato ad ottima sopravvivenza in pazienti che ricevono chemioterapia adiuvante basata sul 5-FU [Longley DB et al., 2003].
- **Apoptosi indotta da Fas:** un importante meccanismo d'azione del 5-FU è la morte per mancanza di timina, che nelle linee cellulari di cancro al colon sembra essere strettamente correlata all'apoptosi indotta da Fas. È stato ipotizzato che difetti nella segnalazione di Fas possano essere un nuovo meccanismo di resistenza alla morte per mancanza di timina [Houghton JA et al., 1997]. Fas è un membro della superfamiglia dei recettori del Tumor Necrosis Factor (TNF) e il legame con il suo ligando permette il reclutamento della caspasi-8 e l'inizio del processo apoptotico. La metalloproteinasi 7 della matrice (MMP7) secreta dalle cellule tumorali, oltre a degradare la matrice extracellulare, può tagliare il ligando di Fas, sottraendo le cellule tumorali dalla morte per apoptosi indotta da Fas [Wadsworth SJ et al., 2010]. È stato riportato che MMP7 è strettamente correlato all'acquisizione da parte delle cellule di carcinoma del colon di chemoresistenza a oxaliplatino e doxorubicina a causa del crosstalk con il sistema Fas/FasL [Strand S et al., 2004]. Un recente studio afferma che MMP7 ha un potenziale ruolo nel predire la suscettibilità al 5-FU in pazienti con carcinoma coloretale in stadio II e III sottoposti a chemioterapia dopo la resezione del tumore [Huang Y et al., 2014].
- **Ipossia:** un ulteriore fattore responsabile della diminuita risposta al trattamento con 5-FU è rappresentato dalla formazione di aree ipossiche all'interno della massa tumorale con conseguente stabilizzazione dell'eterodimero trascrizionalmente attivo HIF-1. È stato infatti provato da studi in vitro già presenti in letteratura come l'attivazione del fattore HIF-1 ottenuta coltivando le cellule in ambiente ipossico o inducendo l'espressione di una forma mutata e non degradabile della subunità HIF-1 α , sia direttamente correlata ad una netta diminuzione della risposta delle cellule tumorali al trattamento con 5-FU [Ravizza R et al., 2009].

LUTEOLINA

La luteolina, 3',4',5',7'-tetraidrossiflavone, appartiene al gruppo di composti naturali chiamati flavonoidi. I flavonoidi sono polifenoli che giocano un ruolo importante nella difesa delle piante contro microorganismi, insetti e radiazioni UV [Harborne JB, Williams CA, 2000]. Verdura e frutta come sedano, prezzemolo, broccoli, cipolle, carote, peperoni, cavoli sono ricchi in luteolina [Neuhouse ML, 2004] [Miean KH, Mohamed S, 2001] [Lin Y et al., 2008].

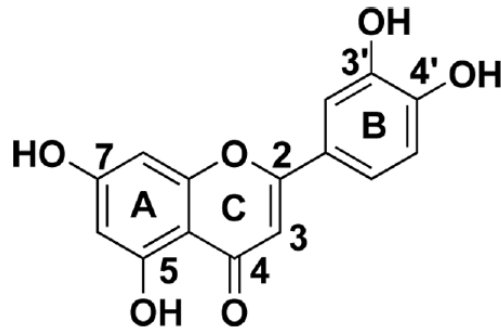


Figura 14. Struttura chimica della Luteolina

Numerosi studi hanno dimostrato che i flavonoidi hanno effetti importanti nella prevenzione del cancro e nella chemioterapia [Wang L et al., 2014]. Numerosi meccanismi di azione sono stati identificati e comprendono l'inattivazione di cancerogeni, meccanismi antiproliferativi, arresto del ciclo cellulare, induzione di apoptosi e autofagia, inibizione di angiogenesi, azione antiossidante e inversione di resistenza ai farmaci. Sembra infatti che la somministrazione di chemioterapici classici in associazione con flavonoidi sia in grado di aumentare l'efficacia terapeutica e di diminuire la tossicità a carico delle cellule sane [Birt DF et al., 2001] [Meiyanto E et al., 2012].

ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

La luteolina è nota per la sua capacità di inibire danni indotti dai ROS (Reactive Oxygen Species) ai lipidi, alle proteine e al DNA [Pandurangan AK, Esa NM., 2014]; infatti funge da scavenger dei ROS attraverso la sua stessa ossidazione data dalla presenza del doppio legame tra il carbonio 2 e il carbonio 3 e il gruppo carbonilico in posizione 4. Inoltre la luteolina sopprime la formazione di specie superossido inibendo l'attività della xantina ossidasi [Nagao A et al., 1999] e ha un effetto citoprotettivo aumentando la sintesi di antiossidanti endogeni come la glutatione-S-transferasi (GST), la glutatione reduttasi, la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi [Leung HW et al., 2006]. La luteolina come sostanza antiossidante può agire come agente chemopreventivo proteggendo le cellule da diverse forme di stress ossidativo e prevenendo così lo sviluppo tumorale [Matsuo M et al., 2005]. Tuttavia, la luteolina può avere anche un effetto pro-ossidante e questa proprietà può essere sfruttata per l'induzione dell'apoptosi nelle cellule tumorali [Schen SC et al., 2004].

ATTIVITÀ ANTITUMORALE

La luteolina interferisce con la maggior parte delle caratteristiche delle cellule maligne. Possiede proprietà di inibizione della proliferazione cellulare attraverso la regolazione del ciclo cellulare. In particolare la luteolina arresta il ciclo cellulare al checkpoint di fase G1/S o G2/M grazie all'attivazione dell'oncosoppressore p53 [Lin Y et al., 2008] [Aneknan P et al., 2014]. Inoltre può legarsi e sopprimere le DNA topoisomerasi I e II, enzimi essenziali per il riparo del DNA, e si intercala nel DNA causando rotture a doppio filamento [Zi X et al., 1998] [Helton ES, Chen X., 2007]. La luteolina è in grado di inibire l'attivazione del recettore per IGF1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) e di Akt riducendo l'espressione di ciclina D.

ATTIVITÀ PRO-APOPTOTICA

La luteolina è un potente attivatore sia della via estrinseca che della via intrinseca dell'apoptosi [Lin Y et al., 2008] [Pandurangan AK, Esa NM, 2014]. Determina infatti un'incremento dei livelli di espressione dell'mRNA codificante per il recettore di morte DR5 (*Death Receptor 5*) [Horinaka M et al., 2005] che è seguito dall'attivazione della caspasi 8, 10, 9 e 3 e dal clivaggio di BID. La via intrinseca è attivata attraverso la modulazione di BAD o p53, e ciò ha come risultato un aumento dell'espressione di Bax, che facilita l'apoptosi [Shi R et al., 2007]. Inoltre, la luteolina inibisce la sopravvivenza interferendo con vie di sopravvivenza cellulare come PI3K/Akt, NF-κB e MAPK.

ATTIVITÀ ANTI-ANGIOGENICA

La luteolina può anche sopprimere l'angiogenesi stabilizzando l'acido ialuronico, una barriera alla neovascolarizzazione. La luteolina è inoltre un importante inibitore delle metalloproteasi, down-regolando la loro espressione e quindi la loro attività [Ende C, Gebhardt R, 2004] [Lin Y et al., 2008].

E' stato infine recentemente riportato che l'associazione di luteolina e oxaliplatino ha una azione sinergica, probabilmente dovuta all'effetto inibitorio esercitato dal flavonoide naturale sul pathway cellulare mediato da Nrf2 e l'attivazione dei geni target [Chian S et al., 2014].

OBATOCLAX

L'obatoclastax (GX15-070, OBX) (**figura 13**) è un composto indolo-bipirrolico, sintetizzato da *GeminX Pharmaceutical* (Montreal, Canada) (assorbita da *Chepalon* nel Marzo 2011 che è stata successivamente acquisita da *Teva Pharmaceutical Industries*, attuale proprietaria dei diritti, nell'Ottobre del 2011), in grado di legare proteine della famiglia di Bcl-2 e antagonizzare la loro funzione anti-apoptotica.

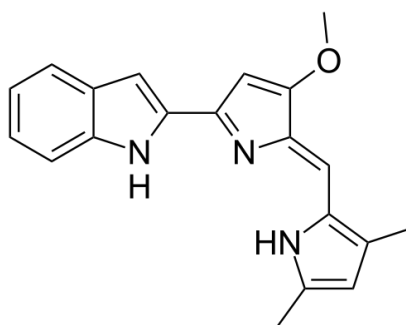


Figura 15. Struttura chimica dell'Obatoclax

I membri di questa famiglia sono caratterizzati dalla presenza di regioni omologhe, chiamate domini BH1-4, la cui sequenza è conservata nelle diverse proteine [Youle RJ, Strasser A, 2008], e vengono classificati in diverse sottofamiglie in base al numero di regioni BH che contengono. In particolare, le proteine Bcl-2 anti-apoptotiche, come Bcl-2 e Bcl-xL, presentano tutti e quattro i domini BH (**figura 16a**). Le proteine pro-apoptotiche, invece, possono suddividersi in base al numero di domini BH che possiedono [Nguyen M et al., 2007], distinguendo così le proteine effettrici propriamente dette Bax (*Bcl-2-associated X protein*) e Bak (*Bcl-2-antagonist/killer*), che contengono i domini BH1, BH2, BH3 e che sono in grado di inserirsi nella membrana mitocondriale esterna e di consentire il rilascio dei fattori proapoptotici già citati, e le proteine "BH3-only" quali Bim, Bid, Puma, Noxa, che agiscono da attivatori e da sensibilizzanti delle precedenti interferendo con il legame alle proteine antiapoptotiche (**figura 16b**).

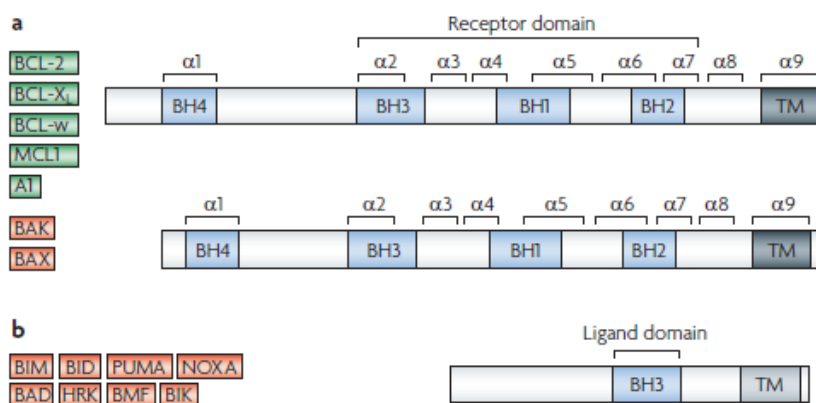


Figura 16. Struttura membri della famiglia Bcl-2. **a**) fattori anti-apoptotici e pro-apoptotici; **b**) proteine BH3-only [Lessene G et al., 2008]

L'OBX appartiene a una classe di farmaci in corso di sviluppo clinico, definiti come "BH3-mimetici", il cui meccanismo d'azione si basa sulla somiglianza della molecola con i gruppi presenti nel dominio BH3 responsabili dell'interazione tra membri diversi della famiglia Bcl-2. Grazie a questa somiglianza, i farmaci BH3-mimetici legano le proteine antiapoptotiche della famiglia Bcl2, impedendo loro di sequestrare Bax e Bak e permettendo a queste ultime di esercitare la loro azione pro-apoptotica a livello mitocondriale [Nguyen M et al., 2007] [Huang S et al., 2009]. Per quanto riguarda OBX, oltre a

questa azione, il composto è anche in grado di upregolare la proteina BH3-only Bim, il che contribuisce all'attivazione della fase mitocondriale del processo apoptotico [Trudel S et al., 2007]. Inoltre, rispetto ad altri BH3-mimetici, OBX sembra essere dotato di uno spettro di attività più ampio, dal momento che è in grado di legare non solo Bcl-2 e Bcl-XL, ma anche Mcl-1, a differenza, p.e. di ABT-737 [Konopleva M et al., 2008]. Quest'ultima osservazione è di particolare interesse alla luce di recenti studi che hanno dimostrato come l'espressione di Bcl-XL e Mcl-1 possa essere aumentata in condizioni di ipossia mediante un meccanismo dipendente dall'attivazione di HIF-1. Ciò può essere implicato nella ridotta risposta cellulare ai chemioterapici in presenza di condizioni ipossiche ed è quindi possibile ipotizzare che un composto come OBX, utilizzato come singolo agente o in combinazione con altri chemioterapici, sia utile per superare la resistenza indotta dall'ipossia.

Risulta inoltre di particolare interesse la recente osservazione che, oltre ad attivare il processo apoptotico, OBX è in grado di promuovere il fenomeno dell'autofagia in alcune linee cellulari, e che un'inibizione di tale meccanismo cellulare potenzia la citotossicità della molecola stessa [Pan J et al., 2010] [Yazbeck VY et al., 2014]. Il ruolo delle proteine della famiglia Bcl-2 non si limita infatti all'apoptosi, ma interviene anche nel processo autofagico. La proteina Beclin 1, indispensabile per l'autofagia, è stata originariamente scoperta come proteina legante i membri della famiglia Bcl-2 e la sua struttura altamente conservata è la prova dell'importanza di questo peptide nel controllo dell'attività autofagica. Il legame di Beclin 1 con Bcl-2/Bcl-XL/Mcl-1, presumibilmente a livello del reticolo endoplasmico, ha come risultato l'inibizione delle fasi iniziali del processo autofagico. Il legame di OBX a Bcl-2/Bcl-XL/Mcl-1 interferisce probabilmente anche con la formazione di questo complesso, consentendo lo svolgimento del processo autofagico.

Infine l'OBX possiede altri bersagli oltre alle proteine della famiglia Bcl-2 e alle proteine coinvolte nel processo autofagico; ad esempio, è stato riportato che questo composto è in grado di inibire la crescita delle cellule tumorali arrestando il ciclo cellulare in fase G1-S [Koehler BC et al., 2014] e in fase S-G2 indipendentemente dalla capacità di indurre apoptosi o autofagia [Konopleva M et al., 2008].

Trial clinici di fase I e II, nei quali l'OBX viene normalmente somministrato per via intravenosa, hanno evidenziato che OBX è ben tollerato ed ha un potenziale come monoterapia per diversi tumori ematologici e solidi. È stata dimostrata un'attività clinica dell'OBX anche in combinazione con farmaci antineoplastici classici. A tale proposito è stato recentemente riportato che l'associazione di OBX e rhTRAIL, forma ricombinante del ligando di morte endogeno, che attiva le caspasi in seguito al legame a specifici recettori di membrana, induce un aumento della morte per apoptosi [Kung AL et al., 2009]. Inoltre, su cellule di leucemia mieloide acuta (AML) OBX ha dimostrato un'azione sinergica in combinazione con Ara-C [Konopleva M et al., 2008].

SCOPO DEL LAVORO

Il ruolo svolto dal processo autofagico nella risposta delle cellule tumorali al trattamento chemioterapico è assai controverso, come pure è controverso il contributo di questo processo alla farmacoresistenza indotta dall'ipossia. Gli studi clinici attualmente in corso si basano sull'uso di inibitori autofagici in associazione alla chemioterapia, attribuendo all'autofagia un ruolo essenzialmente citoprotettivo; analogamente, l'autofagia sembra rappresentare una misura difensiva nei confronti dello stress ipossico. Tuttavia appare verosimile che le cellule non siano in grado di sopravvivere indefinitamente "digerendo" le proprie componenti, e questo trova riscontro nell'osservazione che uno stimolo pro-autofagico particolarmente intenso e/o persistente è in grado di indurre la morte cellulare. Questo progetto di dottorato si basa appunto sul presupposto che esista una "soglia autofagica", oltre la quale il ruolo citoprotettivo dell'autofagia si tramuta in un effetto letale, e ipotizza che cellule ipossiche e trattate con 5-fluorouracile, che già presentano un livello elevato di autofagia rispetto al normale, possano essere indotte selettivamente a oltrepassare questa soglia attraverso l'esposizione contemporanea ad agenti in grado di intensificare l'attivazione dell'autofagia, superando così la resistenza. A questo scopo sono stati utilizzati luteolina (LUT) e obatoclastina (OBX), due composti dotati di meccanismi d'azione assai diversi, ma accomunati dalla capacità di attivare il processo autofagico in diversi modelli sperimentali.

Il progetto si è articolato in diverse fasi. Una fase preliminare è stata dedicata alla verifica dei diversi assunti sperimentali nel modello prescelto, rappresentato dalla linea cellulare di adenocarcinoma del colon umano HCT116. Si è quindi valutato se 5-FU, LUT e OBX fossero effettivamente in grado di indurre autofagia in queste cellule e se i loro effetti (antiproliferativo, pro-apoptotico e pro-autofagico) fossero modificati in condizioni in cui HIF-1 risulta attivato attraverso la stabilizzazione ipossica o chimica della sua subunità inducibile α . Parallelamente è stata valutata la possibilità che l'intensità e la natura della risposta autofagica indotta dal trattamento potessero variare in relazione allo stato di attivazione di HIF-1.

Successivamente sono stati condotti esperimenti volti a valutare l'effetto citotossico e pro-autofagico derivante dall'utilizzo combinato di 5-FU/LUT o 5-FU/OBX, al fine di verificare l'esistenza di un eventuale effetto sinergico di tali combinazioni, in presenza e in assenza di condizioni in grado di attivare HIF-1. Per stabilire il ruolo svolto dal processo autofagico nell'eventuale sinergismo, gli effetti dei trattamenti combinati nelle diverse condizioni sperimentali sono stati valutati anche in presenza dell'inibitore lisosomiale bafilomicina A1, in grado di bloccare il processo autofagico ad un passaggio successivo alla formazione degli autofagolisosomi.

Nella seconda parte del progetto è stato invece esaminato in dettaglio un aspetto interessante emerso durante gli esperimenti condotti nella prima fase dello studio, e cioè la capacità di LUT ed OBX di modulare i livelli di HIF-1 α , nell'ipotesi che anche questo effetto potesse contribuire all'azione chemiosensibilizzante dei due composti. In particolare, è stato valutato se l'attività del fattore di

trascrizione risultasse modulata parallelamente ai livelli della sua subunità inducibile; successivamente ci si è dedicati a chiarire se, nel caso di OBX, tale effetto fosse dovuto a una modulazione a livello trascrizionale, o se fosse invece attribuibile a modifiche post-trascrizionali, a livello di sintesi e/o degradazione della proteina. Gli esperimenti effettuati a questo riguardo includono la valutazione dell'effetto di OBX sui livelli di trascritto di HIF-1 α in cellule sottoposte a ipossia chimica e sui livelli di proteina in cellule trasfettate con una forma di HIF-1 α non degradabile secondo la normale via di degradazione normossica. Il possibile ruolo di OBX sulla degradazione di HIF-1 α attraverso meccanismi indipendenti dalla via canonica è stato studiato, sempre in cellule sottoposte a ipossia chimica, bloccando la sintesi proteica con l'inibitore cicloesimide; analogamente, l'effetto di OBX sulla sintesi di HIF-1 α è stato esaminando bloccando le diverse via di degradazione della proteina, utilizzando l'inibitore del proteasoma MG132 e il già citato inibitore dell'acidificazione lisosomiale BaA1.

I risultati di questo studio potranno portare a evidenze importanti nella prospettiva di individuare potenziali combinazioni polichemioterapiche per il controllo farmacologico della crescita e della progressione di carcinomi coloretali e di altri tumori solidi in cui spesso si assiste all'insorgenza di fenomeni di chemioresistenza indotta da ipossia.

MATERIALI E METODI

LINEE CELLULARI UTILIZZATE E CONDIZIONI DI CULTURA

Il presente lavoro è stato condotto sulla linea cellulare di adenocarcinoma coloretale umano HCT116 (**figura 17**), isolata da un paziente adulto di sesso maschile. Tale linea cellulare è originariamente stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (ATCC) e recentemente tipizzata mediante il sistema *Promega PowerPlex® 1.2* e il software *Applied Biosystems Genotyper® 2.0* per l'analisi degli ampliconi. Le cellule sono state mantenute in terreno di coltura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma) completato con il 10% di siero fetale bovino (Sigma), 1% di una miscela di antibiotici costituita da penicillina e streptomicina (Sigma), 2% di L-glutamina (Sigma), 1% di Sodio Piruvato (Sigma) e 1% di amminoacidi non essenziali (Sigma), in incubazione alla temperatura costante di 37°C e in atmosfera umidificata con una pressione parziale di CO₂ del 5%. L'utilizzo del kit Molecular Biology Reagent Set *Mycoplasma species* (Euroclone, UK) ha permesso di escludere possibili contaminazioni cellulari da micoplasma.

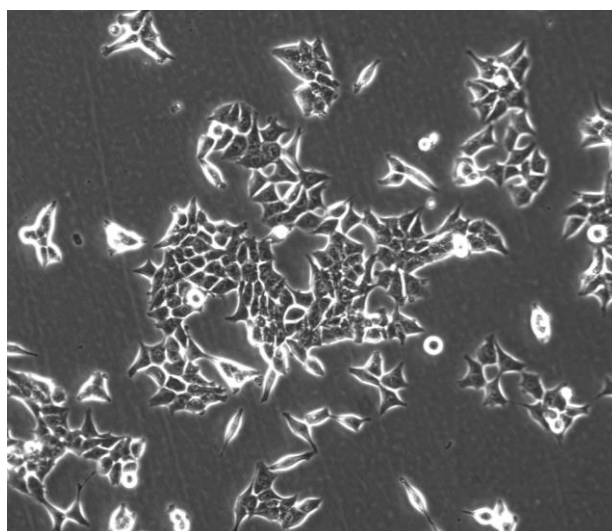


Figura 17. Linea cellulare HCT116 con ingrandimento 20X.

INDUZIONE DI IPOSSIA

In questo studio sono state usate tre differenti condizioni di incubazione:

- ☞ **Controllo:** temperatura di 37°C, con pressione parziale di O₂ del 21% per 48 ore;
- ☞ **Ipossia:** incubazione a 37 °C in atmosfera umidificata con pO₂ del 21% per 24 ore e successiva incubazione in una camera ipossica (*Modular Incubator Chamber e Flow Meter*, Billups-Rothenberg, **figura 18**) in seguito ad insufflazione di una miscela di gas composta da N₂ (94%), CO₂ (5%) e O₂ (1%);



Figura 18. Modular Incubator Chamber e Flow Meter, Billups-Rothenberg

☞ *"Ipoxia chimica" mediante trattamento con CoCl_2* : incubazione a 37 °C in atmosfera umidificata con pO_2 del 21% per 24 ore e successiva incubazione in presenza di una soluzione di cloruro di cobalto (CoCl_2 100 μM) per 24 ore. Il cloruro di cobalto determina la stabilizzazione della proteina HIF-1 α sostituendosi al Fe(II) che è fondamentale per l'attività enzimatica delle PHDs, di cui perciò inibisce l'azione. Inoltre, il cloruro di cobalto è anche in grado di legare i residui di prolina 564 idrossilata presenti in HIF-1 α , impedendo l'interazione della stessa subunità con la proteina pVHL e, di conseguenza, l'ubiquitinazione della proteina [Yuan Y et al. 2003]. L'effetto finale di entrambi i meccanismi consiste nella mancata degradazione di HIF-1 α mediante la canonica via proteasomale VHL dipendente, che, dunque, si accumula a livello intracellulare, aumentando l'attività del fattore di trascrizione HIF-1. In questo modo l'incubazione in presenza di CoCl_2 mima le condizioni ipossiche limitatamente agli aspetti che dipendono da un aumento dell'attività trascrizionale di HIF-1.

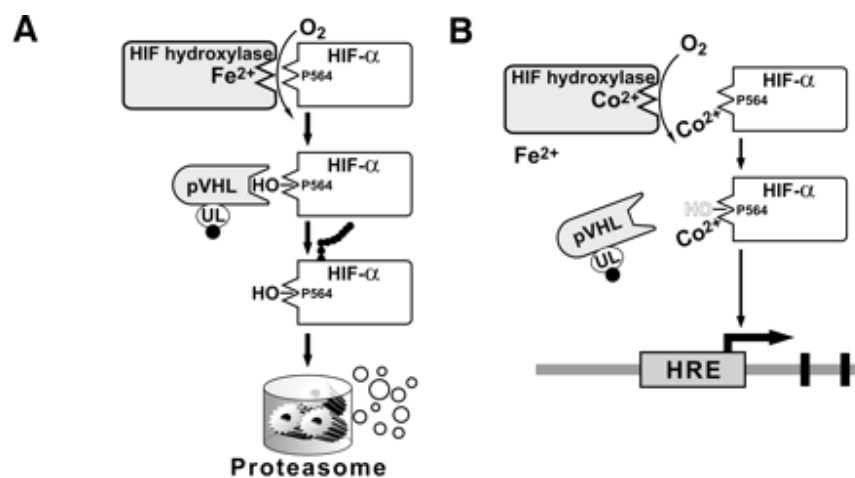


Figura 19. Meccanismo di azione del CoCl_2 [Yuan Y et al. 2003]

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO CITOTOSSICO DEI COMPOSTI

Per valutare l'effetto di 48 ore di trattamento delle cellule HCT116 con concentrazioni crescenti di 5-Fluorouracile (5-FU), Luteolina (LUT) e Obatoclast (OBX), nelle tre condizioni descritte, sono stati utilizzati i test dell'MTT (5-FU) e il test della Sulforodamina B (LUT e OBX). Al fine di valutare l'effetto citotossico della combinazione dei composti e il ruolo svolto dal processo autofagico nella risposta al trattamento è stato effettuato il test del Crystal Violetto in presenza/assenza dell'inibitore della degradazione lisosomiale BaA1.

Sono tutti e tre test colorimetrici che evidenziano il comportamento proliferativo delle cellule sottoposte all'azione delle sostanze che si vogliono testare, in grado di fornire risultati sovrapponibili, tramite la misura dell'assorbanza, direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti nei pozzetti, rilevata mediante lettura spettrofotometrica [Henriksson E et al., 2006].

TEST DELLA SULFORODAMINA B

La *Sulforodamina B* (SRB) è un colorante rosa brillante che presenta due gruppi SO_3 con carica negativa in grado di legarsi elettrostaticamente alle cariche positive (**figura 20**). In condizioni acide, l'SRB aumenta la sua affinità per le cariche positive delle molecole biologiche. In particolare, in cellule pre-fissate con acido tricloroacetico (TCA), questi siti di legame sono principalmente i gruppi amminici delle proteine.

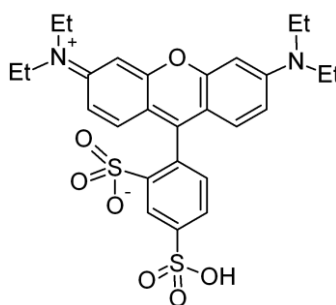


Figura 20. Struttura chimica dell' SRB

Al termine del periodo di trattamento, le cellule sono state fissate mediante l'aggiunta di TCA alla concentrazione finale del 10%. Le piastre sono state incubate per 1 ora a 4°C. Quindi il sovrantante è stato aspirato e le piastre sono state lavate 5 volte con 200 µl di H₂O, per rimuovere i residui di TCA, e fatte asciugare. A ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di soluzione SRB allo 0,4% in Acido Acetico all'1% e le piastre sono state poi lasciate a temperatura ambiente per 15 minuti. Il colorante non legato è stato eliminato mediante 5 lavaggi successivi con Acido Acetico all'1%, e le piastre sono state nuovamente fatte asciugare prima di sciogliere il colorante legato in 100 µl di una soluzione di Tris Base 10 mM (pH 10.5).

TEST DELL' MTT

Il 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) (**figura 21**), è un sale di tetrazolio di colore giallo che, una volta penetrato nell'ambiente intracellulare, viene ridotto ad opera della succinato deidrogenasi mitocondriale e forma un composto cromogeno azotato detto formazano. Il formazano precipita nelle cellule in forma di cristalli insolubili di colore violetto che non sono in grado di attraversare le membrane cellulari: è quindi permessa l'entrata della molecola nella cellula, ma non l'uscita del prodotto nel caso in cui questo sia stato correttamente metabolizzato (ovvero se la catena di trasporto degli elettroni sia attiva e funzionante). Quindi, la quantità di formazano prodotta risulta essere direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti.

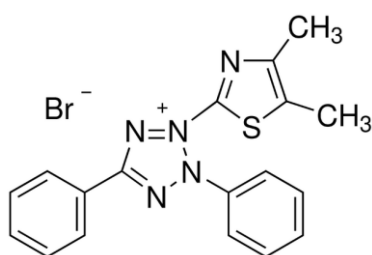


Figura 21. Struttura chimica dell' MTT

Al termine del periodo di trattamento ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 μL di MTT (2 mg/ml in PBS, concentrazione finale 0,4 mg/ml) e le piastre sono state poste in incubatore per 3 ore, trascorse le quali è stato eliminato il sovrantante e sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 120 μL di dimetilsolfossido (DMSO), in grado di sciogliere i cristalli di formazano.

TEST DEL CRYSTAL VIOLETTO

Il *Crystal Violetto* (CV) (**figura 22**) è un colorante trifenilmetanico, conosciuto anche come *Gentian Violet*, utilizzato principalmente nel settore microbiologico per differenziare i batteri attraverso la colorazione di Gram, ma impiegato anche per rilevare la vitalità cellulare, proliferazione o citotossicità causata dal trattamento farmacologico. Questa molecola è in grado di interagire con il DNA e l'assorbanza rilevata dalla lettura con lo spettrofotometro risulta essere direttamente proporzionale al numero di cellule presenti in ogni pozzetto.

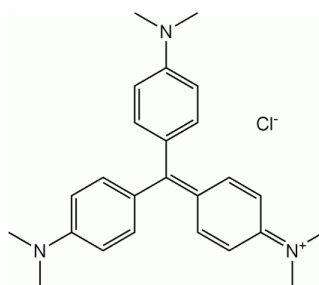


Figura 22. Struttura chimica dell' Crystal Violetto

Al termine del periodo di trattamento le cellule HCT116 sono state fissate per 15 minuti a temperatura ambiente, in 50 μ l di paraformaldeide (4%). Al termine di questo periodo, la paraformaldeide è stata rimossa e ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 μ l di Crystal Violetto ad una concentrazione dell'1% in EtOH al 10%. Le cellule sono state incubate per 20 minuti e successivamente, dopo aver rimosso il colorante e lavato i pozzetti con H₂O bidistillata, sono stati aggiunti 120 μ l di una soluzione di Na-Citrato 0.1 M (pH 4.2) in EtOH (2:1, pH 5.2).

Le piastre di tutti gli esperimenti sono state poste su un agitatore per 10 minuti al buio, al fine di garantire la completa solubilizzazione dei soluti. Infine i valori di densità ottica relativi ad ogni pozzetto sono stati determinati mediante un lettore spettrofotometrico di piastre (*EL800 Universal microplate reader, BioTek Instruments*) alla lunghezza d'onda di 570 nm. I risultati della lettura sono stati analizzati mediante il *software Kc4* da cui si ricavano per ogni campione trattato la frazione di sopravvivenza (Fu, frazione unaffected e la frazione di mortalità Fa, frazione affected).

Questi dati sono stati usati per costruire le relative curve dose-effetto e per effettuare un'analisi della regressione non lineare tramite il programma Calcsyn, che consente di ricavare il valore di IC₅₀ (la dose di farmaco in grado di ridurre del 50% il numero di cellule vitali) ed il coefficiente di regressione della curva dose-effetto.

Le differenze tra i valori di IC₅₀ ottenuti sperimentalmente sono state valutate mediante analisi della varianza ad un criterio di classificazione e test di Bonferroni ($p < 0.05$).

CONTA DELLE CELLULE VITALI

Per confermare i valori di IC₅₀ dei composti ottenuti mediante i metodi colorimetrici sopra descritti le cellule HCT116 sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di 1×10^5 cellule per pozzetto, trattate con dosi crescenti di 5-FU, LUT e OBX ed incubate per 48 ore secondo le tre diverse modalità già descritte. Le cellule sono state quindi staccate con tripsina, risospese in terreno di coltura contenente Trypan blue, un colorante in grado di penetrare esclusivamente nelle cellule con membrana danneggiata, e contate, considerando vitali quelle in cui il colorante era escluso. Dal numero di cellule vitali ottenuto nei campioni trattati con i diversi composti, in relazione a quelle presenti nei controlli è stato possibile risalire alla frazione di sopravvivenza e calcolare l'IC₅₀.

Una volta confermati i valori di IC₅₀ per i farmaci in esame, è stato possibile scegliere le concentrazioni di 5-FU, LUT ed OBX da utilizzare negli studi successivi.

PLASMIDI

Le cellule HCT116 sono state trasfettate in transiente con il plasmide pCDNA3, all'interno del quale è stato inserito un frammento di 3100 pb codificante per la forma wild type della subunità α di HIF-1 o per una forma mutata della stessa proteina. Le mutazioni sono localizzate a livello dei residui di prolina 402 e 564, presenti nel dominio ODD della regione di transattivazione C-TAD, che sono rimpiazzate rispettivamente da una alanina e da una arginina. Queste mutazioni impediscono l'idrossilazione ossigeno-dipendente da parte delle PHDs e, dunque, la canonica degradazione per via proteasomica di HIF-1 α [Masson N et al. 2001]. Il plasmide è stato gentilmente fornito dal Dr. Chris Paraskeva, Università di Bristol, UK. Come controllo è stato utilizzato il plasmide pCDNA3 vuoto.

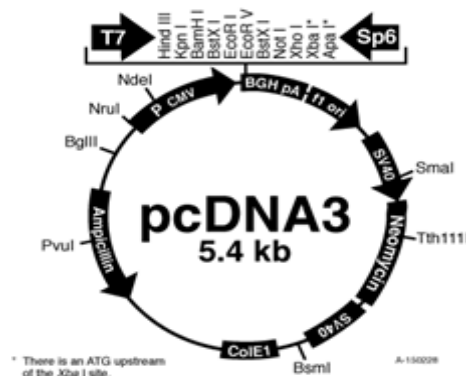


Figura 23: Struttura del plasmide pCDNA3

Il vettore pCDNA3 (**figura 23**) è costituito da 5,4 Kb, contiene un'origine di replicazione SV40 (Simian Virus 40) e due geni che inducono resistenza a due diversi antibiotici: G418 (geneticina), per le cellule eucariotiche e ampicillina, per i batteri.

Sono inoltre state utilizzate cellule HCT116 trasfettate transientemente con i plasmidi pEGFP-N1 e pEGFP-HRP (*HIF-Responsive Promoter*). Il vettore pEGFP-N1 consta di 4,7 Kb e codifica per una variante della proteina wild-type GFP (*Green Fluorescent Protein*) la quale è stata ottimizzata per ottenere una fluorescenza costitutiva più marcata e un maggior livello di espressione. La regione MCS (*multiple cloning site*) si trova tra il promotore per CMV (citomegalovirus) e le sequenze codificanti di EGFP. Il vettore pEGFP-N1 (**figura 24a**) contiene inoltre un gene per la resistenza alla neomicina (per gli eucarioti) e alla kanamicina (per i procarioti) e un'origine di replicazione SV40 (Simian Virus 40) vicino al gene per la resistenza.

Il plasmide pEGFP-HRP (**figura 24b**) è stato ottenuto inserendo all'interno della regione MCS del plasmide pEGFP-N1 un hypoxia-responsive promoter (HRP) artificiale che consiste di 5 copie di un elemento responsivo all'ipossia, derivato dal promotore del gene che codifica per il fattore di crescita vascolare VEGF, e di un promotore di citomegalovirus. Il plasmide ci è stato fornito dal Prof. Cao Yiting, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA.

TRASFEZIONE: LIPOFEZIONE CON LIPOFECTAMINA

La lipofectamina (*LIPOFECTAMINE 2000® INVITROGEN*) è una miscela di lipidi cationici, che formano liposomi con superficie carica positivamente, in grado di legare il DNA, carico negativamente per la presenza di gruppi fosfato. I complessi DNA-lipidi si fondono con le membrane cellulari e rilasciano spontaneamente il loro contenuto nelle cellule.

Per poter effettuare questo tipo di trasfezione, le cellule sono state seminate in piastre a 6 pozzetti ad una densità di $3,5 \times 10^5$ cellule per pozzetto e lasciate crescere nel loro terreno di coltura fino a raggiungere la confluenza consigliata (50%). Le cellule sono quindi state lavate con 1 ml di terreno OPTIMEM e incubate a temperatura ambiente per 15 minuti con 1 ml di una soluzione contenente terreno OPTIMEM e lipofectamina (6,25 µg/ml). Successivamente ad ogni pozzetto è stato aggiunto 1 ml di terreno OPTIMEM contenente il DNA di interesse (20 µg/ml) e le piastre sono state incubate a 37°C per 4 ore. Al termine di questo intervallo, le cellule sono state lavate per due volte con 1 ml di terreno OPTIMEM e lasciate crescere per 24 ore a 37 °C in 2 ml del loro terreno di coltura completo.

L'effettivo successo della trasfezione delle cellule HCT116/pCDNA3-HIF-1α WT e HCT116/pCDNA3-HIF-1α MUT è stato verificato valutando i livelli di espressione della proteina HIF-1α mediante analisi western blot di lisati cellulari totali. Il successo della trasfezione con i plasmidi pEGFP-N1 e pEGFP-HRP è invece stato valutato mediante analisi citofluorimetrica delle cellule trasfettate e trattate con una soluzione di CoCl₂, e confermato mediante osservazione delle cellule con microscopio a fluorescenza, sfruttando la presenza all'interno del plasmide inserito nelle cellule del gene che codifica per la proteina fluorescente EGFP.

VALUTAZIONE DEL POTENZIALE PRO-APOPTOTICO

La percentuale di cellule HCT116 apoptotiche è stata valutata mediante citofluorimetria a flusso in seguito a colorazione con ioduro di propidio.

A tale scopo le cellule HCT116 sono state seminate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di $2,5 \times 10^5$ cellule per pozzetto in un volume di 2 ml; dopo 24 di incubazione in condizioni standard sono state trattate con 5-FU (5, 10, 25 µM), LUT (10, 25 µM) e OBX (25, 50 nM) singolarmente o in combinazione tra loro. Trascorse ulteriori 24 ore dal trattamento, le cellule sono state incubate nelle tre diverse condizioni sperimentali per 24 ore. Al termine del trattamento il terreno proveniente da ogni pozzetto è stato prelevato e conservato in ghiaccio con lo scopo di non perdere le eventuali cellule che si fossero già staccate dal monostrato. Le cellule adese sono state staccate con tripsina, risospese nei rispettivi terreni di coltura, contate mediante camera di Burker, lavate con PBS, e fissate in etanolo 70% ($1\text{ml}_{\text{EtOH}}/10^6_{\text{cellule}}$) a -20°C per 30 minuti. Il periodo di fissazione in etanolo ha lo scopo di permeabilizzare la membrana plasmatica consentendo l'accesso dello ioduro di propidio e la

sua interazione con gli acidi nucleici. Successivamente le cellule sono state centrifugate e risospese in una soluzione di PBS contenente ioduro di propidio (50 µg/ml) ed RNasi (20 µg/ml).

Lo ioduro di propidio (**figura 25**) è un fluorocromo con struttura fenantrenica, dotato di una larga banda di assorbimento nel visibile (con un massimo nel verde) e un'ulteriore banda nell'UV. La lunghezza d'onda di emissione, invece, localizza nel rosso, con un massimo intorno a 610 nm. La sua capacità di intercalarsi agli acidi nucleici non è specifica per il DNA; perciò, quando viene utilizzato per determinare il contenuto cellulare di DNA è necessaria la preventiva digestione dell'RNA, utilizzando una RNasi.

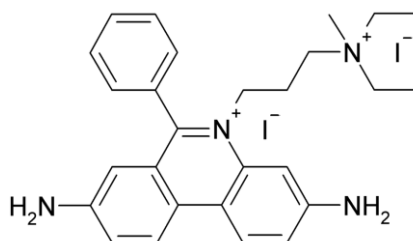


Figura 25. Struttura chimica dello ioduro di propidio

I campioni sono stati incubati al buio, a temperatura ambiente per 30 minuti e quindi analizzati mediante *FACScalibur Becton Dickinson* equipaggiato con un laser agli ioni di argon raffreddato ad aria (15mW, 488 nm), utilizzando il software *CellQuest* in seguito all'acquisizione di 10000 eventi per campione.

La **figura 26** mostra un esempio di istogramma ottenuto in seguito all'analisi citofluorimetrica volta a valutare la percentuale di cellule apoptotiche. Nell'istogramma è infatti possibile osservare la presenza di un picco, nella regione M1 (pre-G1), ad indicare la presenza di cellule con un contenuto di DNA inferiore al normale corredo diploide 2n che caratterizza le cellule nella fase G1 del ciclo cellulare, tipico delle cellule apoptotiche che possono perdere i frammenti di DNA più piccoli in seguito alla fissazione necessaria per la marcatura.

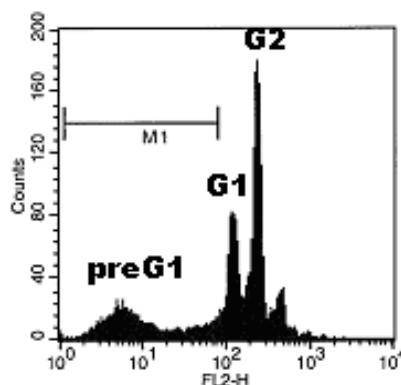


Figura 26. Iistogramma ottenuto dall'analisi citofluorimetrica per valutare la percentuale di cellule in apoptosi

VALUTAZIONE DEL POTENZIALE PRO-AUTOFAGICO

Il potenziale pro-autofagico di 5-FU (5, 10 μM), LUT (10, 25 μM) ed OBX (50 nM) nella linea cellulare HCT116 incubata nelle diverse condizioni sperimentali è stato valutato mediante utilizzo di microscopia a fluorescenza per la visualizzazione della presenza di AVOs e per la valutazione della localizzazione e della distribuzione della proteina LC3-II e tramite la valutazione dei livelli proteici di espressione di LC3-II.

Per gli esperimenti di microscopia a fluorescenza le cellule HCT116 sono state seminate ad una densità di 5×10^4 cellule/pozzetto in una piastra da 12 pozzetti, sul fondo dei quali è stato posizionato un apposito vetrino coprioggetto su cui le cellule possono aderire e crescere.

Per la valutazione dei livelli di espressione proteica invece le cellule sono state seminate in piastre Petri alla densità di $1,2 \times 10^6$. Dopo 24 ore di incubazione in condizioni standard di coltura, le cellule sono state trattate con 5-FU, LUT o OBX e con le combinazioni 5-FU/LUT o 5-FU/OBX. Trascorse 24 ore dal trattamento sono infine state suddivise nelle diverse condizioni sperimentali.

VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI AVOs

La presenza di AVOs (organelli acido vescicolari) è stata valutata in seguito all'incubazione dei campioni con il fluorocromo Arancio di Acridina (20 μM in PBS) (**figura 27**).

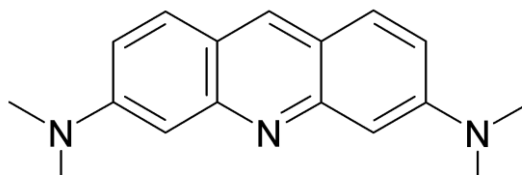


Figura 27. Struttura chimica dell' Arancio di Acridina

Le cellule sono state lavate in PBS, incubate al buio per 20 minuti con la soluzione colorante e i vetrini coprioggetto, su cui sono cresciute le cellule, sono stati prelevati e montati con PBS-glicerolo su vetrini standard per la visualizzazione al microscopio a fluorescenza ad un ingrandimento 20X.

LOCALIZZAZIONE E DISTRIBUZIONE DELLA PROTEINA LC3-II

Al fine di valutare la localizzazione e la distribuzione cellulare della proteina LC3-II al termine del periodo di trattamento le cellule sono state fissate in formaldeide (4% in PBS per 15 minuti), lavate con PBS e quindi permeabilizzate mediante l'aggiunta di metanolo al 100% e incubate per 10 minuti in ghiaccio. Al termine del processo di permeabilizzazione le cellule sono state lavate in PBS e incubate per un'ora in una soluzione di blocking (PBS 5%-BSA 0.3% Triton X-100) e mantenute overnight a 4°C in una soluzione di anticorpo primario [Rabbit Anti LC3-II (*Cell Signaling*) 1:1000 BSA 5%-TBS TW 0.1%]. Il giorno seguente la soluzione di anticorpo primario è stata rimossa, le cellule

sono state lavate in PBS ed incubate per due ore con una soluzione di anticorpo secondario coniugato alla molecola di fluoresceina isotiocianato (FITC) (**figura 28**) [Donkey Anti-Rabbit IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology) 1:200 BSA 0.4%-TBS TW 0.1%].

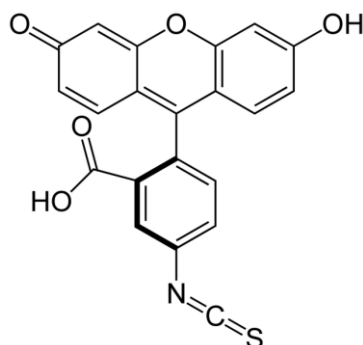


Figura 28. Struttura chimica della fluoresceina isotiocianato

Al termine del periodo di incubazione i vetrini coprioggetto sono stati prelevati e montati con PBS-glicerolo su vetrini standard per la visualizzazione al microscopio a fluorescenza ad un ingrandimento 40X.

LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLA PROTEINA LC3-II

Al termine del trattamento, i livelli d'espressione della proteina LC3-II e sono stati valutati mediante analisi Western Blot di lisati cellulari totali.

LISATI CELLULARI

Le cellule sono state staccate con tripsina, contate e centrifugate e i pellet così ottenuti sono stati lavati con 1 ml di PBS, centrifugati e risospesi ad una densità di 10^6 cellule/5 μ l in buffer di lisi completo, preparato a partire da una soluzione tampone, ovvero il RIPA buffer e così composto: TBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Tris Base 20 mM; pH 7.4), EDTA 5 mM, tetrasodio pirofosfato ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 25 mM, sodio fluoruro (NaF) 25 mM). Questa soluzione è stata completata con PAO (Oxophenilarsina) 1 mM, PMSF 2 mM, Na_3VO_4 (sodio ortovanadato) 1mM, Aprotinina 2 μ g/mL, Leupeptina 0,5 μ g/ml, Pepstatina 0,7 μ g/ml, inibitori delle proteasi 10 μ l/ml (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma). Allo scopo di rompere meccanicamente le cellule non lisate, la sospensione cellulare è stata sonicata in ghiaccio per 10 secondi e i lisati sono stati poi centrifugati a 12800 rpm , allo scopo di eliminare le membrane cellulari. Le proteine cellulari, contenute nel surnatante, sono state utilizzate per il dosaggio proteico mediante metodo colorimetrico basato sull'uso dell'acido bicinconinico (BCA, Pierce) e successivamente sottoposte a corsa elettroforetica.

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLA PROTEINA HIF-1 α

L'effetto del trattamento con LUT e OBX, singolo o combinato con 5-FU, sui livelli di espressione della proteina HIF-1 α è stato valutato mediante analisi western blot condotta su lisati cellulari totali di cellule HCT116 trattate e mantenute in condizioni di controllo e in seguito ad incubazione con CoCl₂. Tale metodica è inoltre stata eseguita su estratti nucleari di cellule HCT116 trattate con il solo composto BH3 mimetico e su lisati cellulari di cellule HCT116/pCDNA3-HIF-1 α WT e HCT116/pCDNA3-HIF-1 α MUT, trattate con OBX. Infine la tessa tecnica è stata utilizzata per valutare l'effetto di OBX sulla sintesi e sulla degradazione di HIF-1 α , in seguito all'incubazione con il BH3-mimetico in presenza o meno per le ultime 4 ore di trattamento dell'inibitore della sintesi cicloesimide (CHX, 100 μ M), dell'inibitore della degradazione proteasomale MG132 (10 μ M) e della degradazione lisosomiale bafilomicina A1 (BaA1, 1 nM).

Le cellule HCT116 destinate alla trasfezione sono state seminate in piastre a 6 pozzetti (3,5 x 10⁵ cellule/pozzetto), le altre in piastre Petri (1,2 x 10⁶ cellule/petri) e lasciate crescere in incubatore per 24 ore in condizioni standard di coltura.

Dopo 24 ore le piastre Petri sono state trattate per 48 ore, le ultime 24 delle quali nelle condizioni sperimentali descritte, secondo gli schemi di trattamento previsti.

Le cellule seminate nelle piastre a 6 pozzetti sono state incubate per 24 ore in condizioni standard di coltura e successivamente sono state trasfettate con i plasmidi pCDNA3-HIF-1 α WT e pCDNA3-HIF-1 α MUT come precedentemente indicato. Una volta trasfettate, le cellule sono state incubate per 24 ore in condizioni di coltura standard e successivamente trattate con OBX (50 nM) per 48 ore prima di procedere alla preparazione dei lisati cellulari o degli estratti nucleari.

ESTRATTI NUCLEARI

Al termine del trattamento, le cellule sono state staccate, risospese in terreno fresco, contate e centrifugate a 1300 rpm, alla temperatura di 4°C per 10 minuti. I pellet sono stati lavati con 1 ml di PBS e, dopo un'ulteriore centrifugazione, risospesi in 1 ml di Hypotonic Buffer (HEPES 10 mM pH 7.9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, PAO 0,1 mM, Na₃VO₄ 1 mM). Le sospensioni cellulari così ottenute, in seguito all'aggiunta di Nonidet P-40 (concentrazione finale 0,1%), sono state lasciate riposare in ghiaccio per 10 minuti; dopo una breve centrifugazione, i surnatanti, contenenti la frazione citoplasmatica, sono stati eliminati e i pellet nucleari sono stati risospesi in 50 μ l di Lysis Buffer (HEPES 20 mM pH 7.9, glycerol 25%, MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 0,42 M, EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, PAO 0,1 mM, Na₃VO₄ 1 mM). I pellet sono stati quindi incubati in ghiaccio per 15 minuti e, dopo un'ultima centrifugazione, i surnatanti contenenti gli estratti nucleari sono stati conservati e utilizzati per il dosaggio proteico mediante il metodo del BCA.

CORSA ELETTROFORETICA E WESTERN BLOT

Una volta effettuato il dosaggio proteico, l'espressione della proteina LC3-II è stata valutata mediante il caricamento del campione (15 µg) su un gel di poliacrilammide al 15% o, nel caso di HIF-1α, il campione (50 µg) è stato caricato su un gel di poliacrilammide al 7%. La corsa elettroforetica è stata eseguita in condizioni denaturanti, con corrente al massimo e voltaggio a 100 V.

Al termine della corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su una membrana di polivinilidene fluoruro (PVDF, *Immobilion-P*, *Millipore*) attraverso uno specifico apparecchio (*Transblot Semidry*, *Bio-Rad*) che prevede l'applicazione di una corrente di 113 mA per 30 minuti; tale membrana era stata preventivamente idratata con MetOH 100%, H₂O e Buffer Anodo II (Tris Base 25 mM e MetOH 10%, pH 10,4). Successivamente la membrana è stata incubata per 45 minuti in agitazione a temperatura ambiente in una soluzione di blocking, costituita da BSA 5% TBS-TW 0,1% per LC3-II, BSA 5% PBS-TW 0,1% per HIF-1α, con lo scopo di saturare tutti i siti di interazione idrofobici e di immobilizzare le proteine nei loro siti. Le membrane sono state poi incubate overnight a 4°C in presenza di un antisiero contenente il rispettivo anticorpo primario contro le proteine di interesse. Per verificare il corretto caricamento dei campioni e che le variazioni osservate nelle proteine di interesse non riflettano un'alterazione generalizzata della sintesi proteica, tutte le membrane sono state coincubate con un anticorpo anti-β-tubulina.

Gli anticorpi utilizzati sono quindi stati i seguenti:

- Anticorpo I° policlonale anti LC3-II diluito 1:1000 in BSA 5% TBS-TW 0,1%
- Anticorpo I° monoclonale anti HIF-1α diluito 1:300 in BSA 0,4% PBS-TW 0,1%
- Anticorpo I° monoclonale anti β-tubulina diluito 1:4000 in latte 5% PBS-TW 0,1%

Al termine dell'incubazione, le membrane sono state lavate in PBS-TW 0.1% o TBS-TW 0.1% in modo da rimuovere l'eccesso di anticorpo primario, incubate per 1 ora e 45 minuti a temperatura ambiente, con un anticorpo secondario (Anti-Rabbit, LC3-II, o Anti-Mouse, Hif-1α e β-tubulina) coniugato alla perossidasi di rafano (Roche) e lavate nuovamente con TBS-TW 0.1% / PBS-TW 0.1%. Le bande immunoreattive sono state visualizzate con l'ausilio del kit Super Signal Femto Maximum (Pierce), che si basa sulla reazione catalizzata dalla perossidasi di rafano, legata all'anticorpo secondario, la quale, in presenza di perossido di idrogeno (H₂O₂), ossida il luminolo con la concomitante produzione di un prodotto luminescente. La luce emessa può essere rilevata esponendo una lastra fotografica rigorosamente in camera oscura.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ TRASCRIZIONALE DEL FATTORE HIF-1

L'effetto di OBX e LUT sull'attività trascrizionale del fattore HIF-1 è stato valutato tramite metodiche di citofluorimetria a flusso, sfruttando la fluorescenza della proteina GFP, la cui espressione, nel plasmide pEGFP-HRP, è sotto il diretto controllo di HIF-1.

Le cellule sono state seminate in piastre a 6 pozzetti ad una densità di $3,5 \times 10^5$ cellule per pozzetto in un volume di 2 ml, incubate per 24 ore in condizioni standard di coltura. Successivamente due piastre sono state utilizzate per la trasfezione con i plasmidi pEGFP-N1 e pEGFP-HRP, mentre le cellule di una terza piastra sono state trattate solo con Lipofectamina 2000 (MOCK), e incubate nuovamente per 24 ore a 37°C prima del trattamento con OBX (25, 50 nM) o LUT (10, 25 μ M). Trascorse 24 ore di trattamento le cellule sono state incubate in presenza o assenza di una soluzione di CoCl_2 (100 μ M) per altre 24 ore. Al termine del trattamento le cellule sono state staccate, risospese in PBS e analizzate mediante *FACScalibur Becton Dickinson* per valutare i livelli di fluorescenza della GFP e l'effetto del trattamento.

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI GENI IGF2 E HIF-1 α

I livelli d'espressione dei geni codificanti per IGF2 e HIF-1 α sono stati valutati in cellule HCT116, in seguito a trattamento con OBX (50 nM) in condizioni di controllo e in seguito a trattamento con una soluzione di CoCl_2 mediante metodica di Real Time PCR.

A tale scopo le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di $2,5 \times 10^5$ cellule per pozzetto in un volume di 2 ml; dopo 24 di incubazione in condizioni standard sono state trattate con OBX (50 nM) e dopo 24 ore sono state incubate in presenza o assenza di una soluzione di CoCl_2 .

Al termine del periodo di trattamento si è proceduto con la preparazione dei campioni per gli esperimenti di RT-PCR.

ESTRAZIONE DELL'RNA DALLE CELLULE

Per la purificazione dell'RNA totale dalle cellule è stato utilizzato il kit NucleoSpin TriPrep (*Macherey-Nagel*). L'estrazione è stata ottenuta mediante colonnine contenenti un filtro di silice. Per isolare l'RNA, è necessario lisare le cellule, denaturare i complessi nucleoproteici, inattivare le ribonucleoproteasi endogene e rimuovere il DNA e le proteine. Il kit utilizzato permette di isolare DNA, RNA e proteine da cellule in coltura, tessuti o altri campioni biologici.

Il metodo NucleoSpin TriPrep sfrutta le proprietà lisanti e protettive della guanidina tiocianato e del β -mercaptoetanololo, contenuti nel buffer di lisi RP1, che rompe le cellule e inattiva tutti gli enzimi (DNasi, RNasi, proteasi e fosfatasi), presenti in quasi tutti i campioni biologici. Il buffer scioglie anche

proteine difficilmente solubili e crea condizioni appropriate di binding che favoriscono l'adsorbimento di DNA e RNA alla membrana di silice, contenuta in una colonnina per la centrifugazione, permettendo il passaggio solo delle proteine mediante centrifugazione a 11.000 x g. Il DNA viene eluito, mediante centrifugazione a 11.000 x g, in seguito a due lavaggi con un tampone a bassa concentrazione salina (DNA Elute), che eluisce selettivamente solo il DNA, mentre l'RNA resta legato in colonna. Il DNA così purificato può essere utilizzato per applicazioni successive e non necessita di ulteriori purificazioni. Eventuali quantità residue di DNA in colonna sono state rimosse utilizzando una soluzione di rDNasi RNase-free. Infine è stato purificato l'RNA attraverso centrifugazione a 11.000 x g per un minuto, dopo tre lavaggi con due differenti buffer (RP2 e RP3), contenenti guanidina tiocianato ed etanolo, che consentono la rimozione di sali, metaboliti e componenti macromolecolari contaminanti. L'RNA puro legato alla colonnina può essere quindi eluito con acqua RNase-Free. L'RNA estratto è stato quantificato mediante metodo spettroscopico con lettura a 260 nm e viene conservato a -80°C.

RETROTRASCRIZIONE

La retrotrascrizione è definita come la capacità da parte di particolari enzimi, le retrotrascrittasi o trascrittasi inverse, di sintetizzare molecole di DNA a partire da RNA, compiendo il passaggio inverso rispetto agli enzimi responsabili della trascrizione. La retrotrascrizione è utilizzata in biologia molecolare in esperimenti di ingegneria genetica a partire da mRNA purificato e porta alla sintesi di DNA complementare (cDNA) normalmente privo di introni.

Per la retrotrascrizione è stato utilizzato il kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), che impiega come innesco oligonucleotidi esamerici random. Questi ultimi consentono la retrotrascrizione completa dell'RNA presente nel campione. I reagenti contenuti nel kit, quando combinati, formano una Master Mix di retrotrascrizione 2X, alla quale deve essere aggiunto un uguale volume di RNA. Per evitare contaminazioni da RNasi, tutti i reagenti necessari sono RNase-free. La miscela di reazione è stata preparata secondo il seguente protocollo:

RT Buffer 10X	2.0 µl
dNTPs Mix 25X (100mM)	0.8 µl
RT Random Primers 10X:	
Primer IGF2: Hs01005963_m1	2.0 µl
Primer HIF-1α: Hs00153153_m1	
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (trascrittasi inversa) 50 U/µl	1.0 µl
Inibitore dell'RNasi (20 U/µl)	1.0 µl
Nuclease-free H₂O	3.2 µl
RNA	10.0 µl
Totale	20.0 µl

In seguito, si è avviata l'incubazione in un termociclatore, secondo il seguente protocollo termico:

	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperatura	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Tempo	10 min	120 min	5 min	∞

Al termine della retrotrascrizione, i cDNA sono stati suddivisi in piccole aliquote d'uso, al fine di ridurre i possibili deterioramenti causati da successivi scongelamenti per l'allestimento delle piastre e conservati a -20°C.

ALLESTIMENTO DELLA REAZIONE DI REAL-TIME PCR

Le reazioni di real-time PCR sono state allestite in piastre da 96 pozzetti e sono state effettuate tramite l'impiego dello strumento *Chromo 4TM Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD), con il supporto del relativo software per la raccolta e l'analisi dei dati. Ciascun campione è stato valutato in tre repliche sperimentali identiche, allo scopo di evidenziare la presenza di eventuali errori nella fase di allestimento della piastra. In ogni piastra è stato inserito un controllo negativo privo di cDNA per escludere la presenza di prodotti di amplificazione aspecifici. In ogni pozzetto è stato aliquotato un volume totale di 20 µL di miscela di reazione secondo il seguente protocollo di amplificazione:

Universal Master MIX (5x)	4,0 µl
Primer/Probe (20X)	1,00 µl
H₂O MilliQ	10,0 µl
cDNA	5,00 µl
Volume Finale	20,00 µl

Nella miscela commerciale *Universal Master Mix* (Applied Biosystem) risulta contenuto oltre al tampone di reazione, ai dNTPs (200 µM) e alla Taq Polimerasi, un normalizzatore di fluorescenza passivo (ROX), cioè un fluorocromo utilizzato con la funzione di minimizzare le eventuali fluttuazioni nella fluorescenza emessa dai repoter dovuta a cause non correlate con la PCR (alterazioni ottiche dello strumento, volumi erroneamente distribuiti nei pozzetti).

Il protocollo termico utilizzato è stato il seguente:

Temperatura	Tempo	n° cicli
95 °C	10 min	1
95 °C	15 min	45
60 °C	1 min	45

ANALISI DEI DATI E QUANTIFICAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

Il metodo di quantificazione relativa utilizzato in questo studio si avvale di un approccio matematico. La formula applicata nei calcoli trova il proprio fondamento nella crescita esponenziale dei prodotti di PCR, descritta dall'equazione:

$$N_f = N_0 (1 + y)^n \text{ EQUAZIONE 1}$$

Dove N_f è il numero di copie della sequenza amplificata dopo n cicli di amplificazione, N_0 è il numero iniziale di copie di DNA/RNA template e y è l'efficienza di amplificazione. Assumendo che per amplificati inferiori alle 150 bp e in condizioni di PCR ottimizzate, y è pari a 1, la formula che si ottiene dall'EQUAZIONE 1 per il calcolo dell'espressione relativa del gene target rispetto all'espressione del calibratore, dopo normalizzazione rispetto al gene di riferimento, è la seguente [Livak KJ, Schmittgen TD, 2001]:

$$\text{Espressione relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

dove:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ campione} - \Delta C_T \text{ calibratore}$$

In questo studio, come controllo, sono stati analizzati geni housekeeping, quali GUS β (β -glucuronidasi) e β -2-microglobulina, in quanto presentano la minore variabilità di espressione nelle linee cellulari prese in considerazione.

Il parametro fondamentale da valutare per l'analisi dei dati è quindi rappresentato dal ciclo soglia (CT) di ogni saggio, definito come il ciclo di PCR in cui il segnale di fluorescenza supera il livello soglia (threshold). L'analisi dei CT è stata effettuata mediante l'utilizzo del software *Opticon Monitor 3* (Bio-Rad).

RISULTATI

EFFETTO DELLA STABILIZZAZIONE DI HIF-1 α SULLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON 5-FLUOROURACILE, LUTEOLINA ED OBATOCLAX

CITOTOSSICITÀ ED APOPTOSI

5-Fluorouracile

La **figura 29a** mostra i valori di IC₅₀ ottenuti mediante test dell'MTT e confermati tramite conta delle cellule vitali in seguito al trattamento della linea cellulare HCT116 con 5-FU per 48 ore (di cui le ultime 24 nelle differenti condizioni sperimentali descritte nei metodi).

I risultati riportati mostrano, nelle condizioni in cui la proteina HIF-1 α risulta stabilizzata, un aumento significativo dei valori di IC₅₀, indice di una minor risposta delle cellule al trattamento e quindi del fatto che HIF-1 fornisce un contributo fondamentale alla modulazione della risposta cellulare al 5-FU. Tale osservazione è confermata dalla diminuzione significativa della percentuale di cellule apoptotiche osservata in seguito al trattamento con 5-FU (5, 10 e 25 μ M) nelle condizioni in cui HIF-1 risulta essere attivato (**figura 29b**).

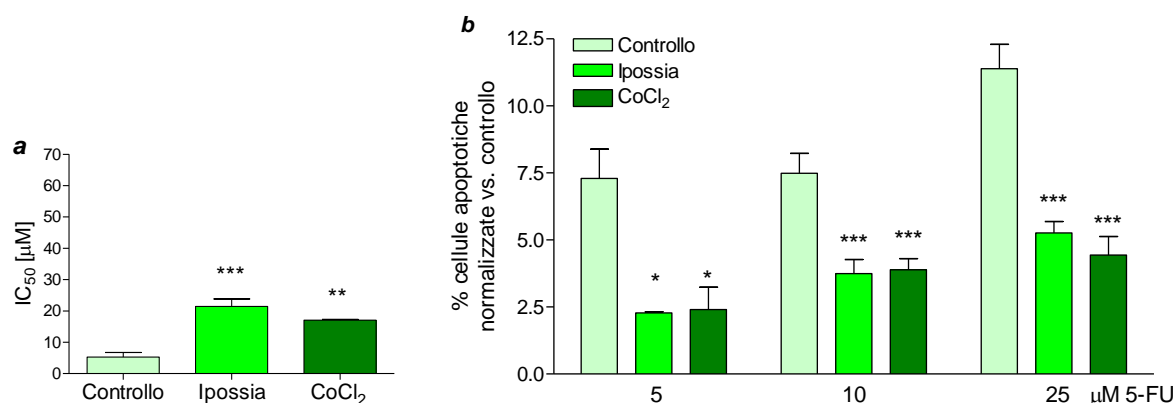


Figura 29. Valori di IC₅₀ (**a**) e percentuale di cellule apoptotiche (**b**) determinati nella linea cellulare HCT116 in seguito al trattamento con 5-FU (48 ore) e incubazione in condizioni di controllo, di ipossia e in presenza di una soluzione di CoCl₂ 100 μ M (ultime 24 ore). Media \pm SE di 7 determinazioni.

(a) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. controllo

(b) * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. le stesse concentrazioni in condizione di controllo.

Luteolina ed Obatoclax

Le **figure 30** e **31** mostrano rispettivamente i valori di IC_{50} , valutati mediante test dell'SRB e confermati tramite conta delle cellule vitali, e la percentuale di cellule apoptotiche ottenuti in seguito al trattamento di 48 ore della linea cellulare HCT116 con LUT (10, 25 μ M) (a) o OBX (25, 50 nM) (b) e incubazione nelle tre differenti condizioni sperimentali descritte. A differenza di quanto osservato con il 5-FU, la risposta delle cellule al trattamento con i due composti, sia in termini di effetto citotossico che di effetto pro-apoptotico, non sembra risentire della stabilizzazione della proteina HIF-1 α .

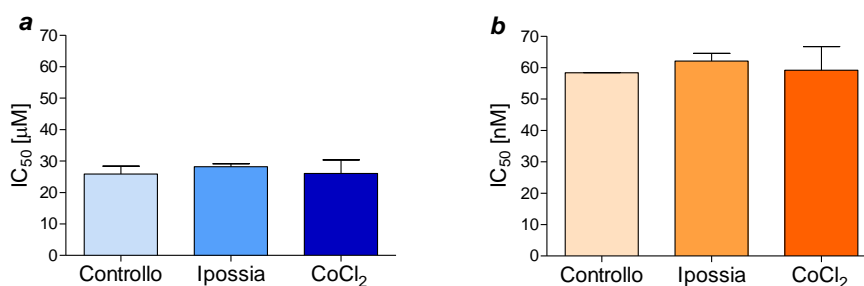


Figura 30. Valori di IC_{50} determinati nella linea cellulare HCT116 in seguito al trattamento con LUT (a) o OBX (b) per 48 ore e incubazione in condizioni di controllo, di ipossia e in presenza di una soluzione di $CoCl_2$ 100 μ M (ultime 24 ore). Media \pm SE di 4 determinazioni.

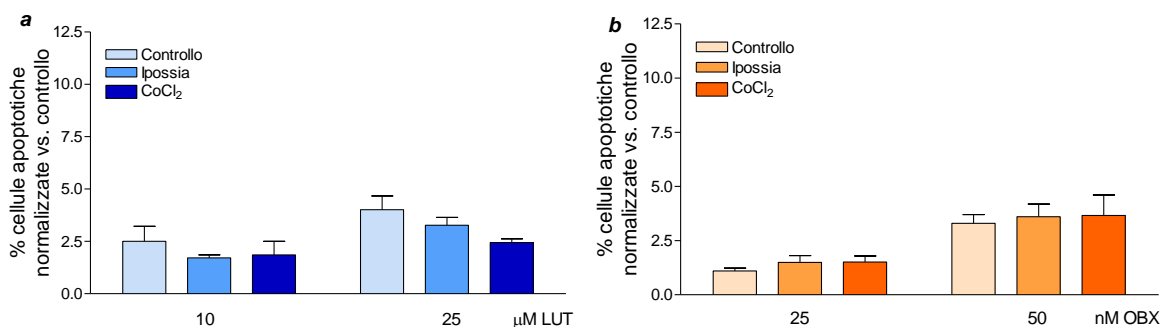


Figura 31. Percentuale di cellule HCT116 apoptotiche (normalizzati rispetto al valore ottenuto nelle cellule di controllo mantenute nelle medesime condizioni) in seguito al trattamento con LUT (10, 25 μ M) (a) o OBX (25, 50 nM) (b) per 48 ore e incubazione in condizioni di controllo, di ipossia e in presenza di una soluzione di $CoCl_2$ 100 μ M (ultime 24 ore). Media \pm SE di 8 determinazioni.

INDUZIONE DEL PROCESSO AUTOFAGICO IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON 5-FLUOROURACILE, LUTEOLINA ED OBATOCLAX

Un primo suggerimento circa la possibilità che il trattamento con 5-FU (5, 10 μ M), LUT (10, 25 μ M) ed OBX (50 nM) fosse in grado di indurre autofagia è venuto dall'osservazione di un sostanziale aumento, sia in termini di dimensioni che di numero, degli organelli acidi vescicolari (AVOs) in seguito al trattamento con i tre composti, indice dell'incremento di acidità cellulare che caratterizza il processo autofagico, valutato mediante microscopia a fluorescenza sfruttando la proprietà del fluorocromo arancio di acridina di accumularsi negli AVOs emettendo fluorescenza nell'arancione. In particolare, nella **figura 32** si nota che l'aumento degli AVOs indotto dai tre composti non sembra risentire delle condizioni sperimentali adottate; inoltre i livelli di fluorescenza nell'arancione risultano più elevati in seguito al trattamento con OBX.

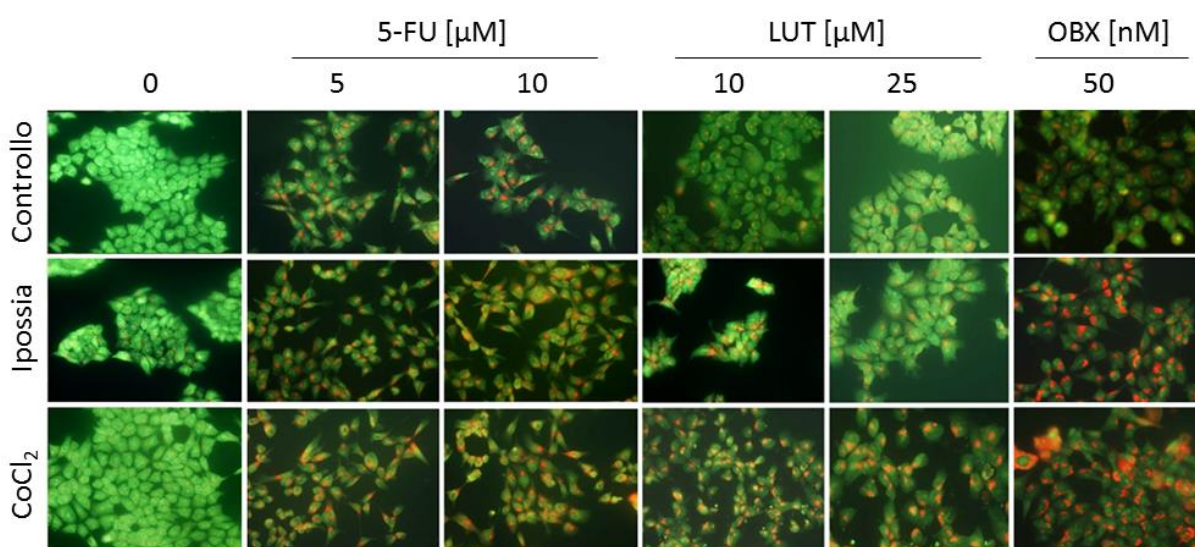


Figura 32. Visualizzazione mediante microscopia a fluorescenza (ingrandimento 20X), in seguito a marcatura con arancio di acridina, di cellule HCT116 trattate con 5-FU (5, 10 μ M), LUT (10, 25 μ M) e OBX (50 nM) per 48 ore e incubate in condizione di controllo, di ipossia e di ipossia chimica (ultime 24 ore).

Analisi western blot per il marker pro-autofagico LC3-II hanno permesso di affermare che l'aumento dell'acidità cellulare osservato correla con l'attivazione del processo autofagico, come risulta evidente dalle bande immunoreattive riportate in **figura 33**; inoltre, i risultati riportati confermano dati di letteratura secondo cui la stabilizzazione della proteina HIF-1 α è di per sé in grado di promuovere l'attivazione del processo autofagico.

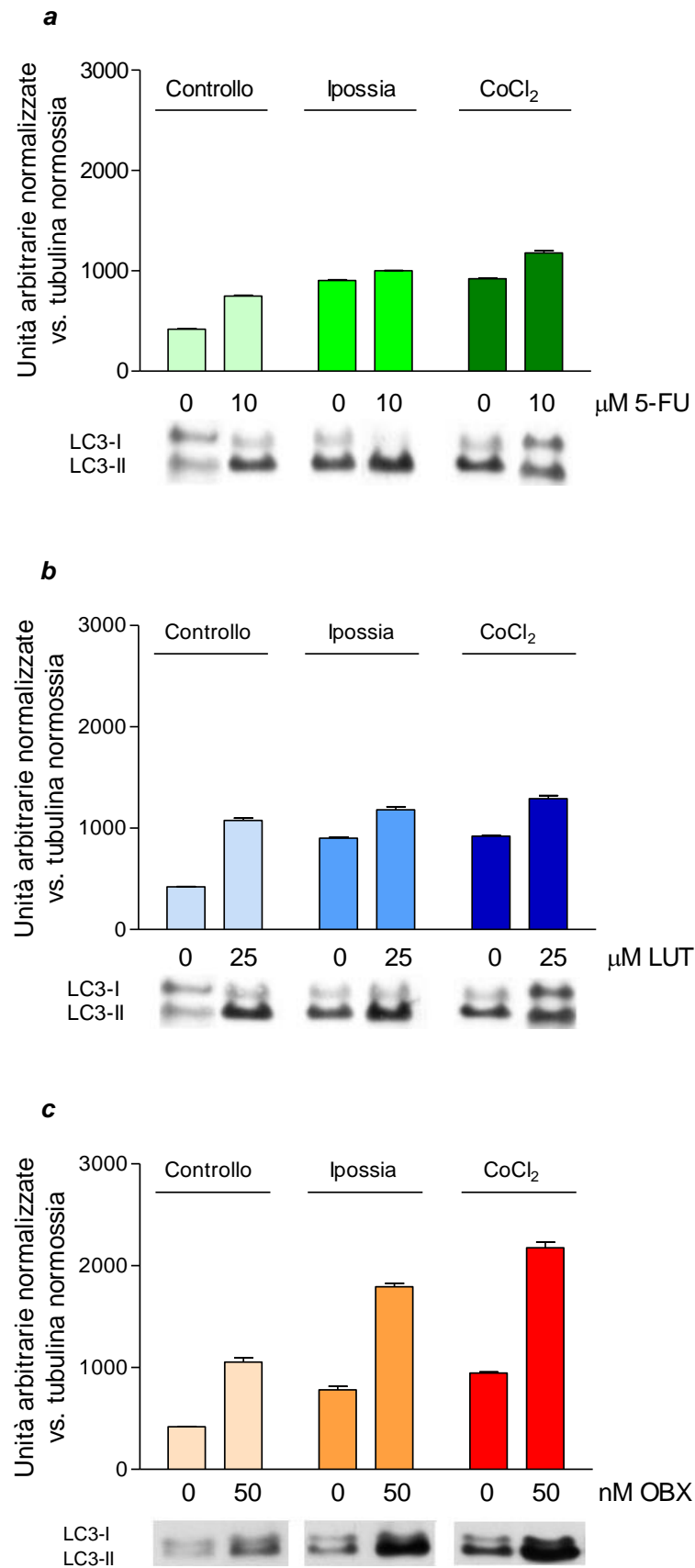


Figura 33. Livelli di espressione della proteina LC3-II nella linea cellulare HCT116 in presenza o assenza del trattamento per 48 ore con 5-FU (10 μ M) (a), LUT (25 μ M) (b) e OBX (50 nM) (c) in seguito all'incubazione nelle tre condizioni sperimentali adottate nello studio (ultime 24 ore) e densitometria della media \pm SE di 3 determinazioni.

Infine, esperimenti di immunofluorescenza (**figura 34**) hanno permesso di studiare le variazioni nella distribuzione subcellulare della proteina LC3-II indotte dal trattamento con 5-FU e OBX che, come atteso, passa da una distribuzione più diffusa osservabile nei controlli, ad una distribuzione a “spot” dopo trattamento con 5-FU (5, 10 μ M) e OBX (50 nM), a conferma di una maggior attivazione delle strutture lisosomiali tipica del processo autofagico.

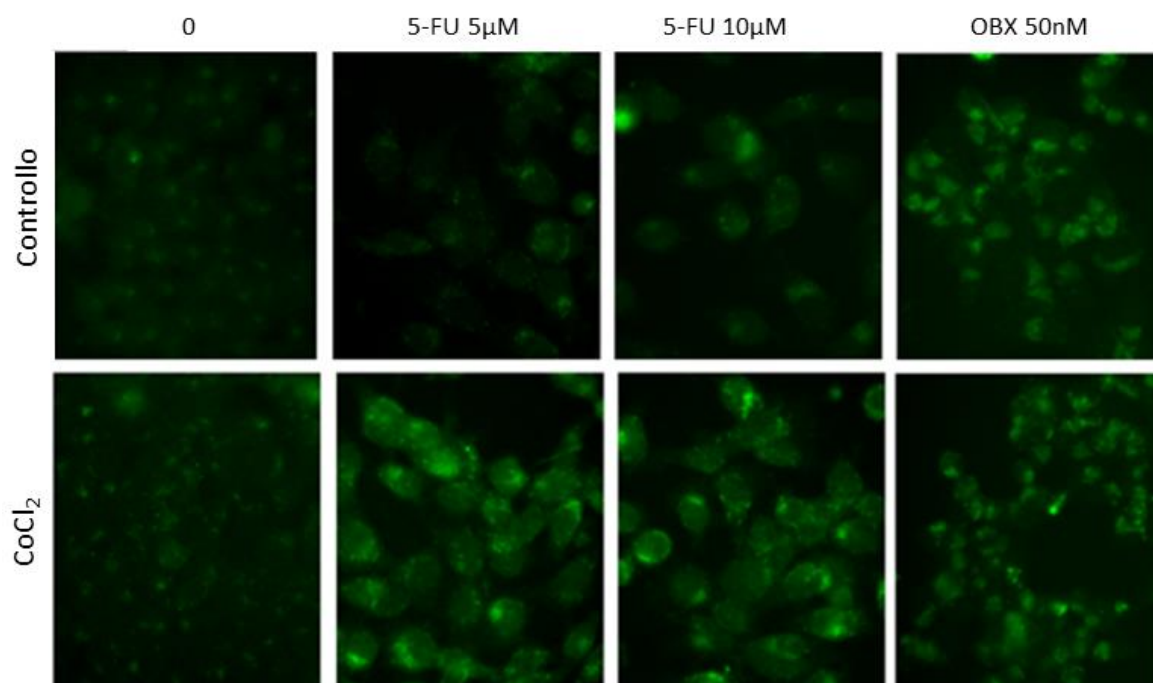


Figura 34. Visualizzazione attraverso microscopia a fluorescenza (ingrandimento 40x) della proteina LC3-II, in cellule HCT116 trattate con 5-FU (5 e 10 μ M) e OBX (50 nM) per 48 ore, di cui le ultime 24 ore in presenza o assenza di una soluzione di CoCl₂ 100 μ M.

VALUTAZIONE DEL RUOLO DEL PROCESSO AUTOFAGICO

Al fine di valutare il ruolo del processo autofagico indotto dal trattamento sono stati condotti esperimenti di vitalità cellulare, nella linea cellulare HCT116, in presenza o assenza dell'inibitore della pompa protonica vacuolare Bafilomicina A1 in combinazione con i composti oggetto dello studio.

Come è possibile osservare in **figura 35a** l'utilizzo dell'inibitore autofagico BaA1 non induce alcuna alterazione in termini di sopravvivenza cellulare al trattamento con LUT (25, 50 μ M), indipendentemente dallo stato di attivazione di HIF-1, suggerendo che l'attuazione del processo autofagico non sia in grado né di contribuire, né di interferire con il meccanismo d'azione di LUT.

L'utilizzo di BaA1 in combinazione con OBX (50 nM) (**figura 35b**) determina, in entrambe le condizioni sperimentali, una significativa riduzione della frazione di sopravvivenza permettendoci di affermare che il processo autofagico non è alla base di uno dei possibili meccanismi di azione di OBX e che, al contrario, potrebbe ricoprire un ruolo citoprotettivo in seguito al trattamento.

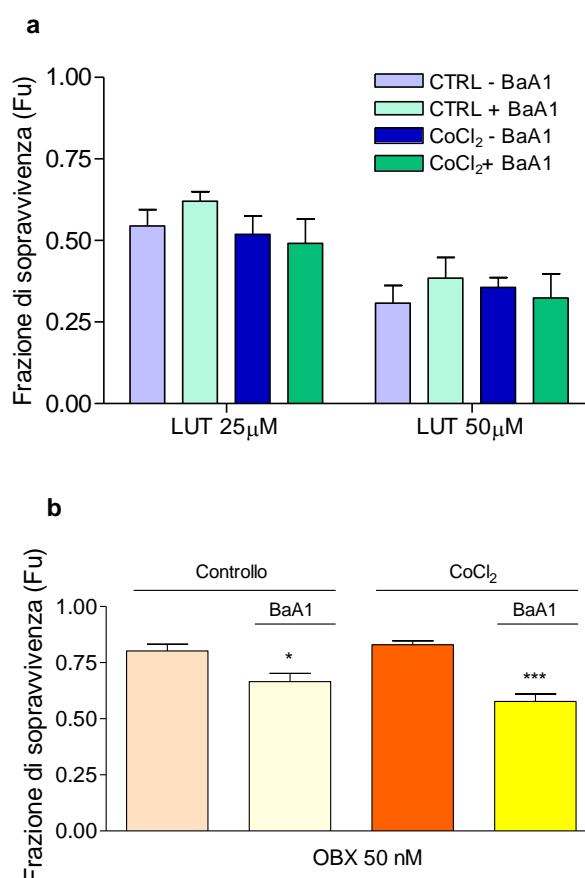


Figura 35. Frazione di sopravvivenza di cellule HCT116, valutata mediante test del Crystal Violetto, in seguito al trattamento con LUT (25, 50 μ M) (**a**) e OBX (50 nM) (**b**) per 48 ore, in presenza/assenza di una soluzione di CoCl₂ 100 μ M e/o di BaA1 (1 nM) per le ultime 24 ore. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. la medesima condizione in assenza di BaA1.

EFFETTO DELLA COMBINAZIONE 5-FLUOROURACILE/LUTEOLINA E 5-FLUOROURACILE/OBATOCLAX

APOPTOSI

Allo scopo di valutare la possibilità di contrastare, almeno in parte, l'insorgenza di resistenza al trattamento con 5-FU determinata dall'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1, è stata valutata, mediante tecniche di citofluorimetria a flusso, la variazione della percentuale di cellule apoptotiche in seguito all'utilizzo delle combinazioni 5-FU/LUT e 5-FU/OBX rispetto al trattamento in singolo.

Come è evidente dalla **figura 36**, sia il trattamento con LUT (25 μ M) (a) sia quello con OBX (50 nM) (b) sono in grado di migliorare significativamente l'effetto pro-apoptotico del 5-FU, in entrambe le condizioni sperimentali adottate. Nel dettaglio, i dati ottenuti, permettono di affermare che la combinazione 5-FU/OBX ha un effetto pro-apoptotico significativo che si manifesta ad entrambe le concentrazioni di 5-FU utilizzate, a differenza della combinazione 5-FU/LUT, suggerendo un maggior effetto chemiosensibilizzante (alla concentrazione utilizzata) del BH3 mimetico OBX rispetto a LUT.

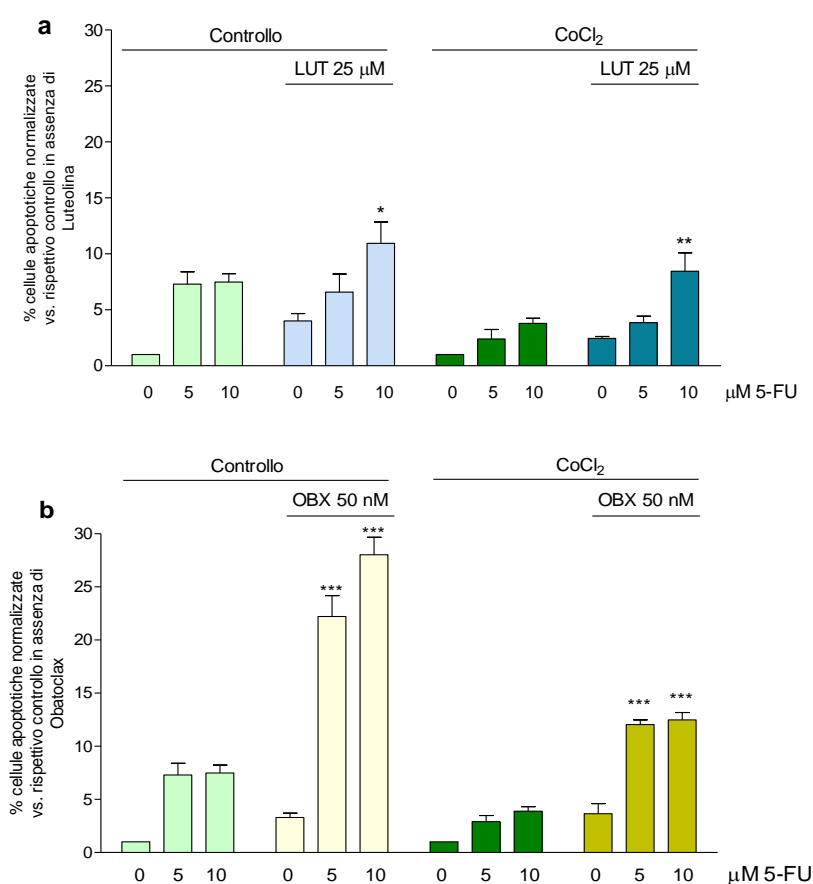


Figura 36. Istogrammi relativi al rapporto (T/C) tra la percentuale di cellule apoptotiche osservata in seguito a trattamento combinato di 48 ore con 5-FU (5, 10 μ M) in combinazione con LUT (25 μ M) (a) o OBX (50 nM) (b) e quella riscontrata nelle relative cellule di controllo per la linea cellulare HCT116 mantenuta per le ultime 24 ore in presenza e/o assenza di una soluzione di CoCl₂. Media \pm SE di 4 determinazioni indipendenti. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. la stessa concentrazione in assenza di Luteolina/Obatoclax, nella medesima condizione sperimentale.

AUTOFAGIA

L'incremento del numero e delle dimensioni di organelli acido vescicolari in seguito al trattamento combinato è maggiore rispetto a quello indotto dai composti utilizzati singolarmente e, nel dettaglio, la combinazione 5-FU (5, 10 μ M)/OBX (50 nM) determina una maggiore fluorescenza rispetto a quella visualizzabile con l'utilizzo di 5-FU (5, 10 μ M)/LUT (25 μ M) in entrambe le condizioni sperimentali (**figura 37**).

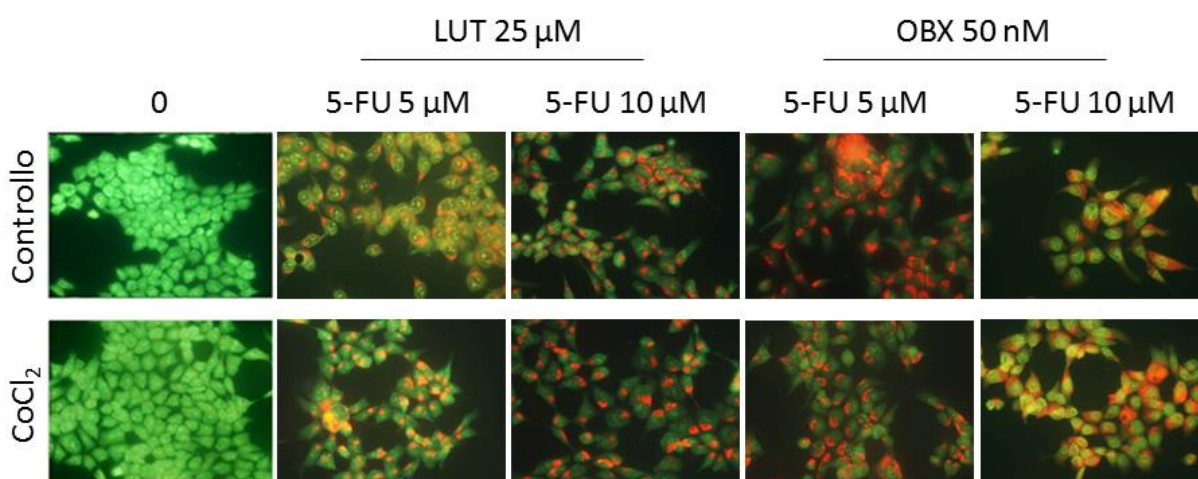


Figura 37. Visualizzazione degli AVOs mediante microscopia a fluorescenza (ingrandimento 20X), in seguito a marcatura con arancio di scridina, di cellule HCT116 trattate con le combinazioni 5-FU/LUT o 5-FU/OBX per 48 ore e incubate in condizione di controllo e in presenza di una soluzione di CoCl_2 100 μ M (ultime 24 ore).

Come riportato per i trattamenti singoli, l'analisi western blot per il marker pro-autofagico LC3-II in seguito a trattamento con le combinazioni dei composti, ha permesso di affermare che l'aumento dell'acidità cellulare correla con l'attivazione del processo autofagico (**figura 38**) e, nel dettaglio, l'espressione di tale marker risulta maggiore nei campioni trattati con la combinazione 5-FU (10 μ M)/OBX (50 nM) (**figura 38b**).

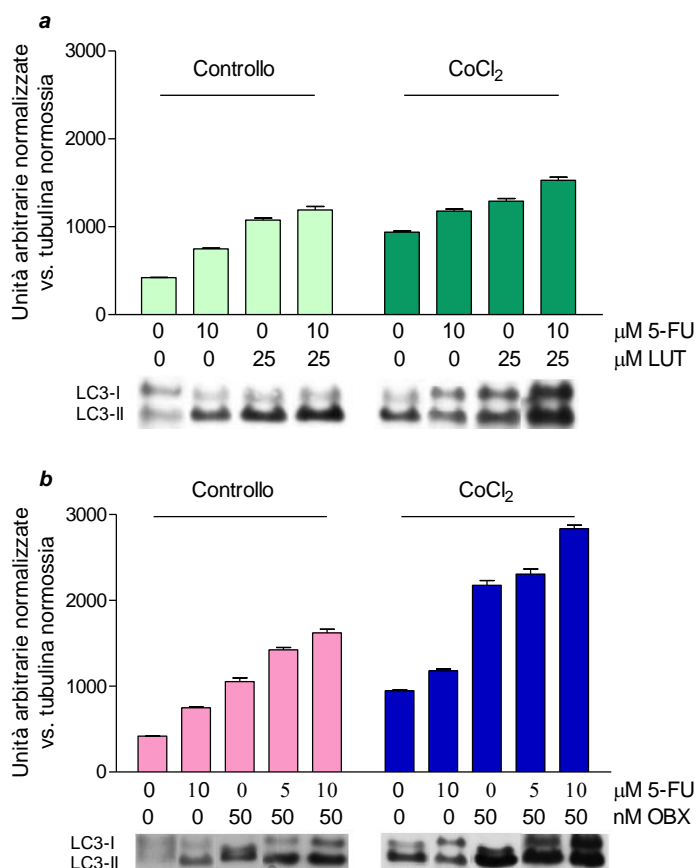


Figura 38. Livelli di espressione della proteina LC3-II nella linea cellulare HCT116 in presenza o assenza del trattamento con 5-FU/LUT (a) o 5-FU/OBX (b) in seguito all'incubazione nella condizione di controllo e in presenza di una soluzione di CoCl₂ 100 μM (ultime 24 ore) e densitometria della media ± SE di 3 determinazioni.

Infine è possibile osservare una intensificazione della fluorescenza e una ulteriore variazione della distribuzione subcellulare della proteina LC3-II in seguito al trattamento combinato 5-FU (5, 10 μM)/OBX (50 nM) (figura 39) a conferma di una maggiore induzione, ad opera dei due composti in combinazione, del processo autofagico.

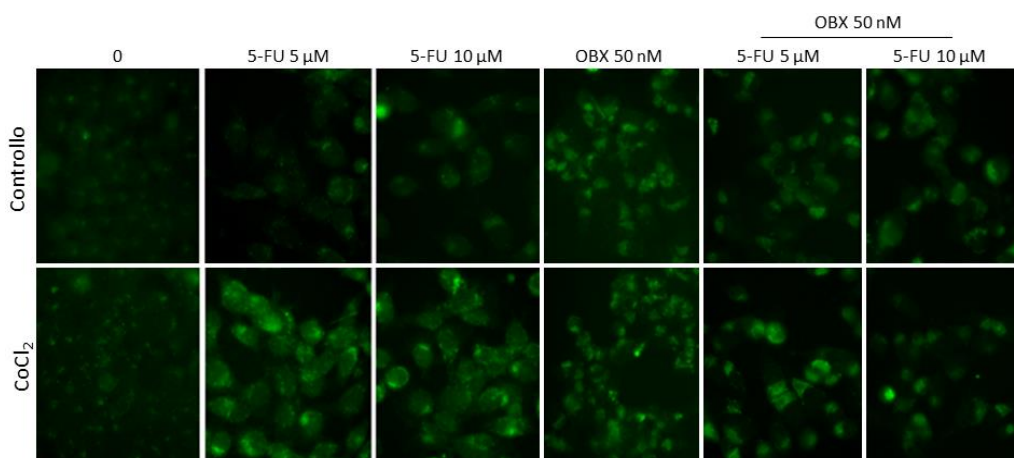


Figura 39. Visualizzazione attraverso microscopia a fluorescenza (ingrandimento 40x) della proteina LC3-II, in cellule HCT116 trattate per 48 ore con 5-FU (5 e 10 μM) e OBX 50 nM in singolo e/o in combinazione e incubate per le ultime 24 ore in presenza o assenza di una soluzione di CoCl₂ 100 μM.

VALUTAZIONE DEL RUOLO DEL PROCESSO AUTOFAGICO IN SEGUITO AL TRATTAMENTO COMBINATO CON 5- FLUOROURACILE/OBATOCLAX

Come già osservato nel caso del trattamento in singolo con il composto BH3 mimetico OBX, l'inibizione dell'autofagia non riduce l'effetto citotossico indotto dall'utilizzo della combinazione 5-FU (5, 10 μ M)/OBX (50 nM), ma anzi determina un'ulteriore significativa riduzione della sopravvivenza in entrambe le condizioni sperimentali (**figura 40**), permettendo quindi di escludere che l'effetto sinergico di tale combinazione dipenda da un'iperattivazione del macchinario autofagico.

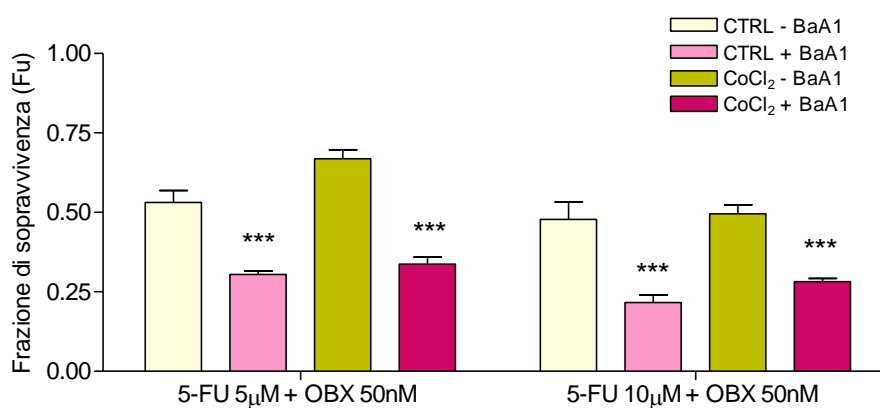


Figura 40. Frazione di sopravvivenza, valutata mediante test del Crystal Violetto, di cellule HCT116 in seguito al trattamento con 5-FU (5, 10 μ M) e OBX (50 nM) per 48 ore, in presenza/assenza di una soluzione di CoCl₂ 100 μ M e/o di BaA1 (1 nM) per le ultime 24 ore. ***p<0.001 verso la medesima condizione in assenza di BaA1.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON LUTEOLINA O OBATOCCLAX SUI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLA PROTEINA HIF-1 α E SULL'ATTIVITÀ DEL FATTORE DI TRASCRIZIONE HIF-1

Analisi western blot condotte su lisati cellulari di cellule trattate con LUT (10, 25 μ M) od OBX (25, 50 nM), mantenute nelle tre differenti condizioni sperimentali hanno evidenziato come i due composti abbiano un differente effetto sulla modulazione dei livelli di espressione della proteina HIF-1 α nella linea cellulare HCT116. Infatti, mentre il trattamento con LUT determina un incremento dei livelli di espressione di tale proteina (**figura 41a**), di tipo concentrazione-dipendente, il composto OBX ne induce la diminuzione (**figura 41b**). Inoltre, come atteso, è evidenziabile come i livelli di espressione basali della subunità α del fattore di trascrizione HIF-1 aumentino sia in ipossia, sia in seguito all'incubazione con una soluzione di CoCl₂, rispetto a quanto osservato nella condizione di controllo.

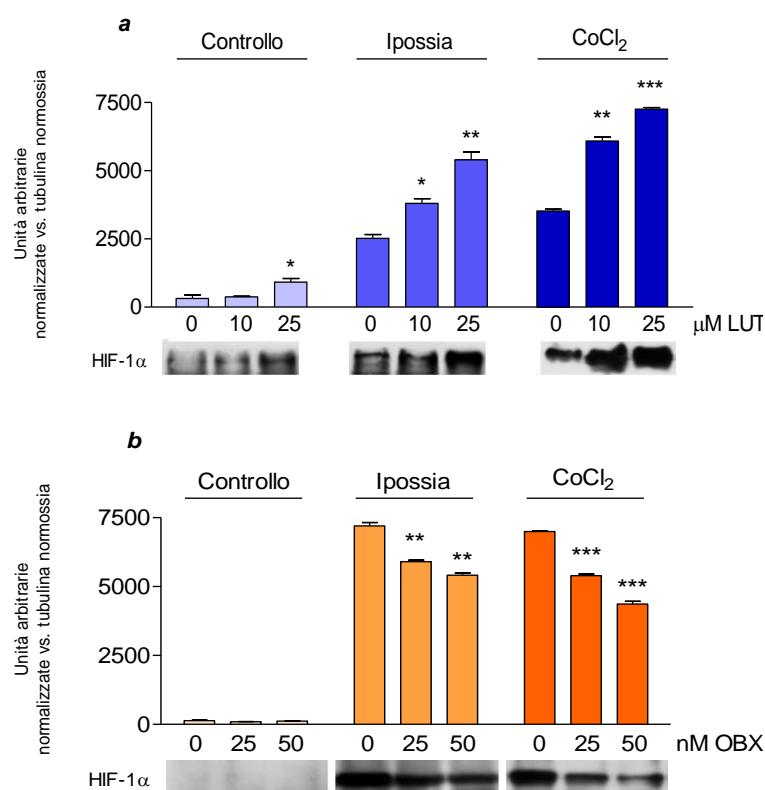


Figura 41. Livelli di espressione della proteina HIF-1 α nella linea cellulare HCT116 in seguito al trattamento per 48 ore con LUT (10, 25 μ M) (**a**) o OBX (25, 50 nM) (**b**) e incubazione nelle condizioni sperimentali di controllo, di ipossia e di ipossia chimica per le ultime 24 ore e analisi densitometrica della media \pm SE di 3 determinazioni.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. controllo nella medesima condizione sperimentale

In evidente contrasto con l'effetto osservato sui livelli proteici di HIF-1 α , il trattamento della linea cellulare HCT116/pEGFP HRP con LUT (10, 25 μ M) (**figura 42a**) induce, alla concentrazione più alta utilizzata, una significativa diminuzione dell'attività trascrizionale di HIF-1. L'effetto sull'attività

trascrizionale di HIF-1 a cui si assiste in seguito a trattamento con OBX (25, 50 nM) (**figura 42b**) è invece in accordo con la riduzione dei livelli di espressione di HIF-1 α indotta dal composto.

Tali osservazioni permettono di affermare che, verosimilmente, i due composti interferiscono con l'attività trascrizionale di HIF-1 attraverso meccanismi differenti.

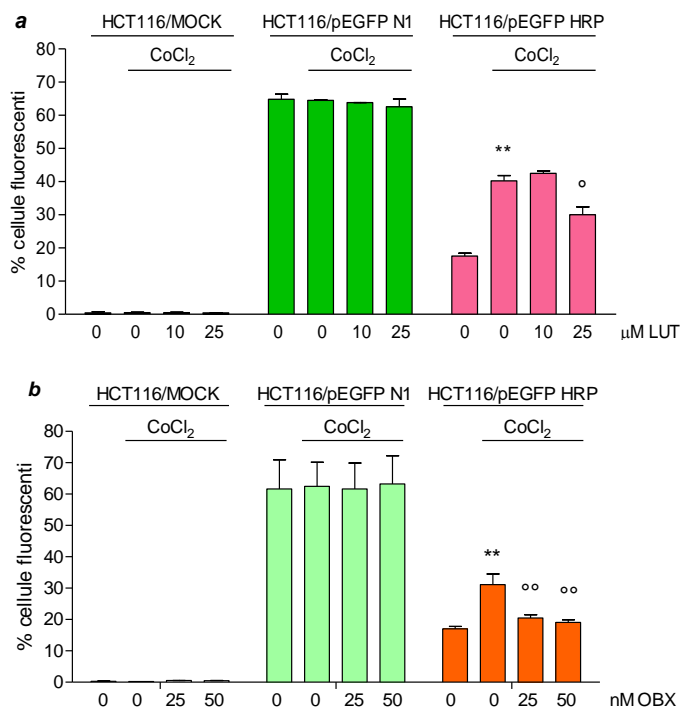


Figura 42. Percentuale di cellule HCT116 che esprimono GFP, in seguito alla trasfezione con MOCK, pEGFP N1 e pEGFP HRP e al trattamento con LUT (10, 25 μ M) (**a**) o OBX (25, 50 nM) (**b**), in presenza o meno di una soluzione di CoCl₂ 100 μ M, analizzati tramite citofluorimetria a flusso. Ogni punto è la media \pm SE di 3 esperimenti. ** $p < 0.01$ vs controllo vs HCT116/pEGFP HRP in assenza di CoCl₂, ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$ vs controllo HCT116/pEGFP HRP in presenza di CoCl₂.

Una ulteriore conferma della capacità di OBX di modulare negativamente l'attività trascrizionale di HIF-1 deriva dalla significativa diminuzione nei livelli di trascritto del gene codificante per IGF2, noto target del fattore di trascrizione HIF-1 [Xin Lu, Yibin Kang, 2010], a cui si assiste in seguito a trattamento con il composto (**figura 43**). Come atteso, a fronte della stabilizzazione della proteina HIF-1 α è osservabile un incremento dei livelli di trascritto del gene codificante per IGF2, rispetto alla condizione di controllo.

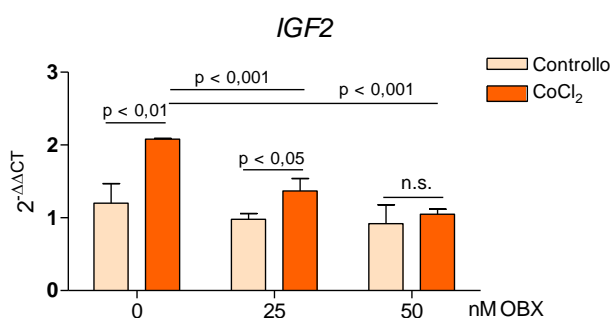


Figura 43. Effetto di OBX (50 nM) sui livelli di espressione del gene codificante per IGF2 in cellule HCT116 mantenute in condizione di controllo e di ipossia chimica. Media \pm SD di 3 esperimenti.

STUDIO DEL/ I MECCANISMO/ I DI DOWN-REGOLAZIONE DI HIF-1 α DA PARTE DI OBATOCLAX

La **figura 44** mostra che la significativa riduzione dei livelli di espressione di HIF-1 α riscontrata su lisati cellulari totali di cellule HCT116 in seguito al trattamento con OBX (25, 50 nM) si ripercuote anche sui livelli nucleari della proteina, con una conseguente diminuzione della quantità di fattore di trascrizione HIF-1 in grado di interagire con il DNA.

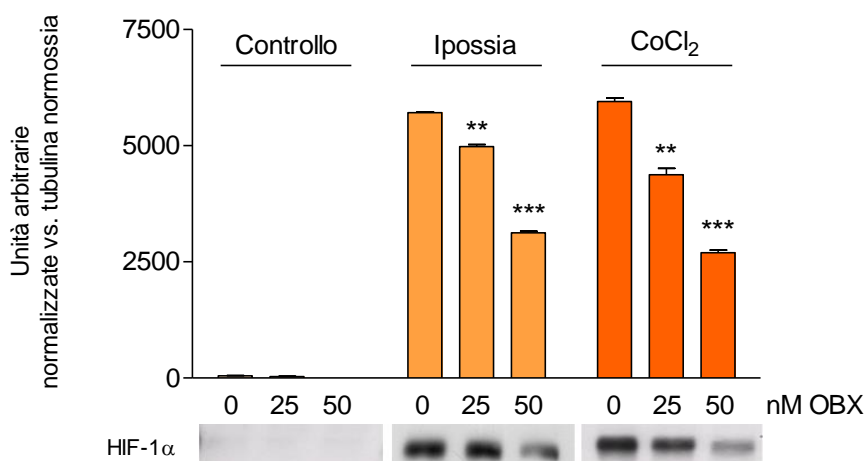


Figura 44. Livelli di espressione nucleare della proteina HIF-1 α nella linea cellulare HCT116 in seguito al trattamento per 48 ore (25, 50 nM) e incubazione nelle condizioni sperimentali di controllo, ipossia e ipossia chimica per le ultime 24 ore e analisi densitometrica della media \pm SE di 3 determinazioni.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. controllo nella medesima condizione sperimentale.

La diminuzione dei livelli proteici di HIF-1 α e dell'attività del fattore di trascrizione HIF-1 indotta dal trattamento con OBX (50 nM) non sembrano correlare con i livelli di espressione genica di HIF-1 α , valutati mediante RT-PCR (**figura 45**), permettendoci di escludere che il BH3 mimetico espliciti la sua azione a livello della sintesi e/o della stabilità del trascritto.

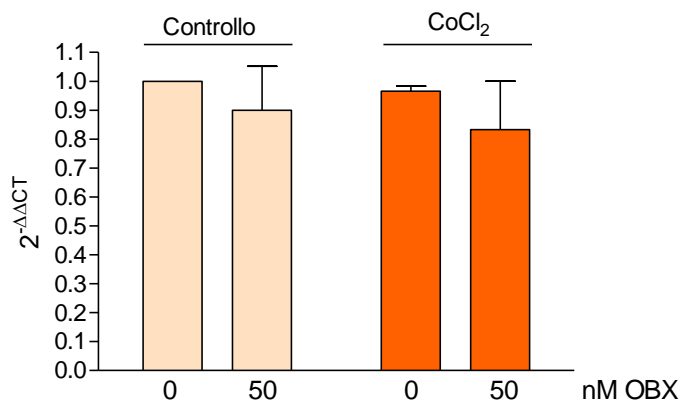


Figura 45. Livelli del trascritto del gene che codifica per HIF-1 α nella linea cellulare HCT116 valutata mediante real-time PCR, in seguito a trattamento con OBX 50 nM in presenza o assenza di una soluzione di CoCl₂ 100 μ M per le ultime 24 ore. Media \pm SE di 3 determinazioni.

Escluso un meccanismo di azione da parte di OBX a livello trascrizionale sono stati condotti esperimenti al fine di chiarire un suo possibile effetto a livello dei processi di sintesi e/o di degradazione della proteina HIF-1 α .

I risultati mostrati in **figura 46** mostrano come il trattamento con OBX (50 nM) sulla linea cellulare HCT116/pCDNA3-HIF-1 α MUT, che esprime una forma di HIF-1 α mutata, resistente all'idrossilazione da parte delle PHD, determini una riduzione significativa dei livelli di espressione della proteina HIF-1 α rispetto al relativo controllo, permettendoci così di escludere che il composto agisca facilitandone la degradazione attraverso la via "canonica", che dipende dall'idrossilazione di residui di prolina e dalla successiva interazione con il complesso ubiquitina-ligasico VHL-dipendente.

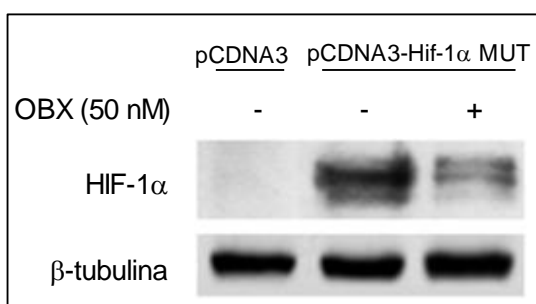


Figura 46. Livelli di espressione della subunità HIF-1 α in cellule HCT116 trasfettate con i costrutti pCDNA3 e pCND3-HIF-1 α MUT, in presenza e in assenza di OBX 50 nM (48 ore). L'omogeneità del caricamento dei diversi campioni è dimostrata dall'espressione costante della β -tubulina.

Questa osservazione non esclude però che la degradazione di HIF-1 α possa avvenire attraverso vie differenti da quella canonica, come peraltro suggerito dai risultati di diversi studi recenti. A questo proposito abbiamo quindi effettuato un esperimento volto a seguire il time course della degradazione "non canonica" di HIF-1 α , bloccando la sintesi della proteina mediante l'utilizzo dell'inibitore della sintesi proteica cicloesimide (CHX) a seguito del blocco della via canonica di degradazione mediato dal trattamento con una soluzione di CoCl₂, in assenza e in presenza di OBX. I risultati ottenuti, mostrati in **figura 47**, indicano che durante le 4 ore di osservazione si ha una significativa diminuzione di HIF-1 α e che, a partire dai 30 minuti, i livelli di espressione di tale proteina sono significativamente più bassi in presenza rispetto all'assenza di OBX. I valori dell'emivita di HIF-1 α , ottenuti applicando un modello di regressione non lineare, sono di circa 60 e 230 minuti, rispettivamente in presenza e in assenza di OBX. Tali risultati confermano dati già presenti in letteratura circa l'esistenza di una o più ulteriori vie di degradazione della proteina HIF-1 α indipendenti da VHL ed inoltre suggeriscono che OBX possa agire come modulatore positivo di tali vie degradative.

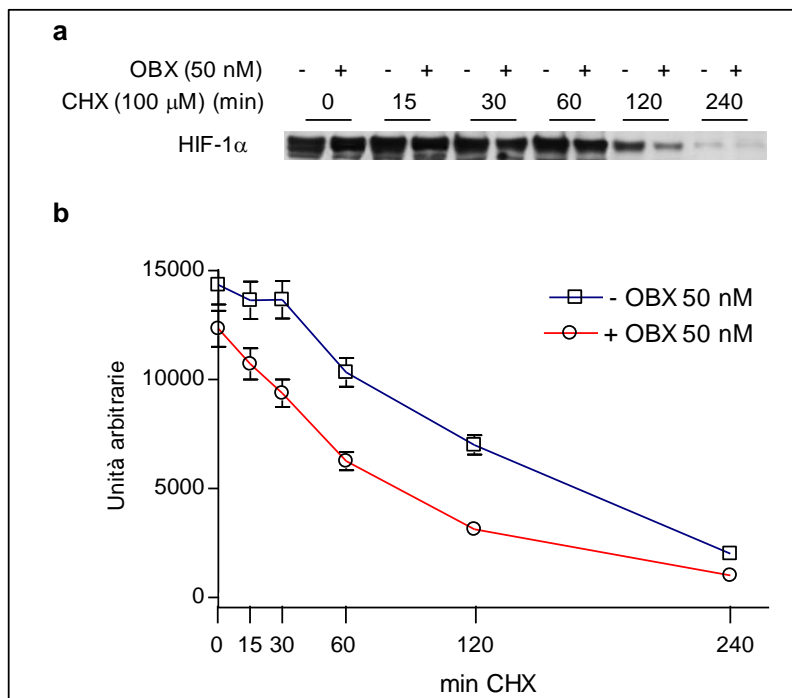


Figura 47. Livelli di espressione di HIF-1 α in cellule HCT116 trattate con OBX (50 nM) per 48 ore in presenza di una soluzione di CoCl₂ 100 μ M (ultime 24 ore) in seguito a time course con cicloesimide (0-240 minuti) (a) e relativo andamento temporale della degradazione della proteina HIF-1 α (b).

Infine, per esaminare l'effetto di OBX sulla sintesi di HIF-1 α , le cellule sono state esposte, oltre che a una soluzione di CoCl₂ per 24 ore, anche all'inibitore del proteasoma MG132 e all'inibitore della degradazione lisosomiale BaA1 per le ultime 4 ore di trattamento, bloccando in questo modo tutte le possibili vie di degradazione di HIF-1 α (figura 48).

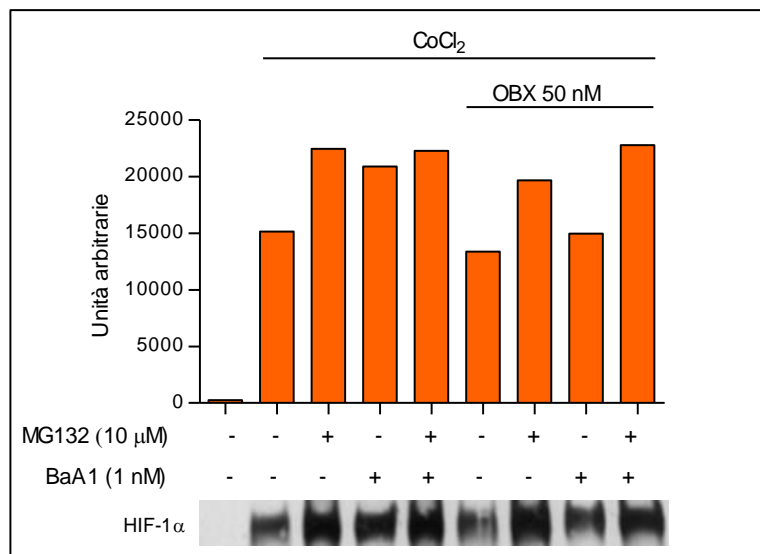


Figura 48. Livelli di espressione di HIF-1 α in cellule HCT116 trattate con OBX (50 nM) per 48 ore, MG132 (10 μ M per 4 ore) e BaA1 (1 nM per 4 ore) in presenza di CoCl₂ 100 μ M (ultime 24 ore) e relativa densitometria.

I risultati mostrano come in queste condizioni OBX non risulti più in grado di ridurre i livelli di espressione della proteina, indicando come improbabile un effetto del composto a livello della sintesi proteica.

Inoltre, il trattamento con MG132 in presenza di OBX, determina un aumento dei livelli di HIF-1 α , suggerendo che l'effetto del BH3-mimetico dipenda in larga misura dall'azione proteolitica del proteasoma, mentre il contributo della degradazione lisosomiale sembra essere più marginale.

VALUTAZIONE DEL POSSIBILE EFFETTO CHEMIOSENSIBILIZZANTE DEL COMPOSTO OBX SULLA LINEA CELLULARE HCT8

Al fine di valutare se le osservazioni ottenute sulla linea cellulare HCT116 possano avere un valore più generale, lo studio dell'effetto chemiosensibilizzante di OBX è stato esteso a una seconda linea di adenocarcinoma del colon, HCT8. I dati riportati in **figura 49** mostrano che anche in questa linea cellulare OBX migliora significativamente l'effetto citotossico del 5-FU, in particolare in seguito alla stabilizzazione di HIF-1 α con CoCl₂.

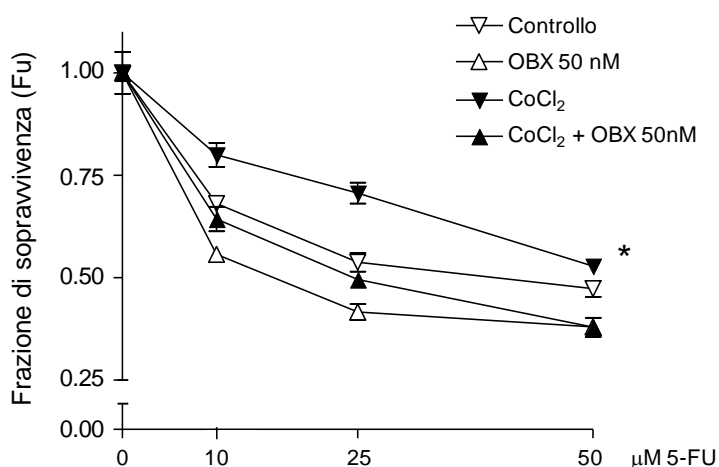


Figura 49. Effetto del trattamento con OBX (50 nM) per 48 ore sulla citotossicità del 5-FU (10-50 μM) sulla linea cellulare HCT8, in presenza o assenza di una soluzione di CoCl₂ (100 μM) durante le ultime 24 ore. Media \pm SD di tre esperimenti. * $p < 0.01$ vs tutte le altre curve

Questo esperimento preliminare conferma l'efficacia chemiosensibilizzante di OBX e permette di ipotizzare un possibile vantaggio dall'utilizzo del BH3 mimetico in associazione al farmaco 5-FU per il superamento della resistenza mediata dall'ipossia.

DISCUSSIONE

Nei carcinomi coloretali spesso si assiste alla formazione di aree ipossiche con la conseguente attivazione di HIF-1, fattore trascrizionale chiave per l'insorgenza di fenomeni di chemioresistenza [Ke Q, Costa M, 2006] per via della sua capacità di modulare una serie di processi cellulari, tra cui l'angiogenesi, l'apoptosi e l'autofagia. In realtà, il ruolo di quest'ultimo processo nella risposta dei tumori ai trattamenti chemioterapici è assai controverso e dibattuto: da un lato, diversi studi attribuiscono all'attivazione dell'autofagia in risposta al trattamento con alcuni agenti citotossici, tra cui il 5-Fluorouracile, e/o farmaci bersaglio-specifici, un ruolo determinante nel fallimento della terapia [Swampillai AL et al., 2012] [Zhou H et al., 2014]; dall'altro, strategie che inducono l'attivazione di tale processo si sono rivelate promettenti come mezzo per determinare la morte di alcuni tipi di cellule tumorali [Gozuacik D, Kimchi A, 2007] [Cao B et al., 2014], soprattutto nei casi in cui le cellule della massa tumorale si trovino in condizioni di stress estremamente intenso e/o persistente, quali lo stress ipossico [Yang ZJ et al., 2011] [Sharma K et al., 2014]. Cellule ipossiche presentano in genere livelli di autofagia più elevati rispetto a quelle normossiche, ma non è chiaro se questo contribuisca alla resistenza indotta dall'ipossia, o se non possa invece rappresentare un possibile punto debole del tumore, su cui agire per potenziare l'azione dei chemioterapici [Hu YL et al., 2012] [Rohwer N, Cramer T, 2011]. Scopo principale del presente lavoro di dottorato è stato quindi cercare di stabilire se aumentando ulteriormente i livelli di autofagia in cellule ipossiche (in cui il processo autofagico è già iperattivo), trattate con 5-FU (a sua volta in grado di indurre autofagia citoprotettiva), non fosse possibile superare un ipotetico "valore soglia", oltre il quale il processo di degradazione di componenti intracellulari non risulti più compatibile con la sopravvivenza cellulare.

I composti scelti per aumentare l'attività del processo sono rappresentati da due sostanze molto diverse tra loro con elevata attività pro-autofagica: Luteolina (LUT), un flavonoide naturale dotato di un meccanismo d'azione ad ampio spettro [Lin Y et al., 2008] [Huang HC et al., 2010] [Park SH et al., 2013] e Obatoclastin (OBX), un composto di sintesi con azione BH3-mimetica [Pan J et al., 2010] [Billard C, 2013]. La prima fase del progetto, dedicata a verificare la risposta delle cellule di adenocarcinoma del colon scelte come modello sperimentale ai diversi composti utilizzati e alle condizioni adottate, ha permesso di confermare dati di letteratura relativi alla capacità di HIF-1 di determinare insorgenza di resistenza al trattamento con 5-FU nella linea tumorale di carcinoma del colon HCT116 [Ravizza R et al., 2009] [Kim M et al., 2004] (**figura 29**) e di verificare come LUT ed OBX abbiano invece un inalterato effetto citotossico e pro-apoptotico in condizioni di controllo e in condizioni in cui HIF-1 risulta essere attivato (**figure 30 e 31**). Questa osservazione ha ulteriormente permesso di ipotizzare che LUT ed OBX possano essere due candidati ideali per la formulazione di combinazioni polichemioterapiche volte al superamento della chemioresistenza indotta da ipossia.

Dati ottenuti a conferma di quanto già riportato in letteratura circa l'attività pro-autofagica dei tre composti hanno evidenziato un aumento degli organelli acidi vescicolari (AVOs) (**figura 32**) che

correla con un significativo aumento dei livelli di espressione del marker autofagico LC3-II, soprattutto al termine del trattamento con il composto BH3 mimetico OBX (**figura 33**). Diversi studi hanno dimostrato che la proteina LC3 è costitutivamente espressa a bassi livelli nella maggior parte delle cellule [Mizushima N, Yoshimori T, 2007] e, nei periodi in cui la cellula si trova in condizioni di stress, la percentuale di LC3-I diminuisce mentre quella di LC3-II aumenta. In seguito a queste osservazioni, nonostante l'aumento degli AVOs non sia di per sé un indice diretto della presenza di autofagia, l'incremento dell'acidità osservato nelle cellule trattate e il parallelo aumento dei livelli del marker autofagico LC3-II osservato indicano comunque un'intensificazione di tale processo. A ulteriore conferma di questa conclusione, i risultati mostrati in **figura 34** hanno consentito di evidenziare una distribuzione "a spot" della proteina endogena LC3-II, tipica del processo autofagico, che risulta più evidente nelle cellule trattate con OBX.

Diversamente da quanto atteso, la stabilizzazione della subunità inducibile del fattore di trascrizione HIF-1 non è risultata determinante nell'incrementare significativamente i livelli di attivazione del processo autofagico rispetto ad una condizione di controllo.

L'inibizione dell'attività della pompa protonica vacuolare (ATPasi), essenziale per l'acidificazione del lume lisosomiale, attuata al fine di indagare il possibile ruolo citoprotettivo o citotossico svolto dal processo autofagico indotto dal trattamento con il composto BH3 mimetico OBX ha evidenziato una riduzione significativa della frazione di sopravvivenza in entrambe le condizioni sperimentali utilizzate, come mostrato in **figura 35**, suggerendo che l'autofagia indotta da tale trattamento svolga un ruolo citoprotettivo. E' probabile peraltro che questa riduzione significativa della frazione di sopravvivenza evidenziata in seguito a trattamento con l'inibitore sia causata dall'induzione di apoptosi, come altri autori hanno evidenziato in un lavoro analogo condotto su cellule HCT116 e HT29 trattate con BaA1 [Wu YC et al., 2009]. Per quanto riguarda LUT invece, il mancato effetto in seguito all'utilizzo dell'inibitore autofagico sulla sopravvivenza cellulare fa supporre che l'induzione di tale processo ad opera del trattamento con il flavonoide non sia determinante ai fini del meccanismo di azione del composto.

Come precedentemente ipotizzato, gli esperimenti condotti in seguito al trattamento combinato con 5-FU/LUT o 5-FU/OBX hanno mostrato come l'associazione del 5-FU con l'uno o l'altro di questi composti abbia portato a un miglioramento significativo dell'effetto citotossico, pro-apoptotico e pro-autofagico, sia in cellule di controllo, sia soprattutto, in cellule esposte a CoCl₂ (**figure 36 - 39**) e come tale effetto sia risultato più marcato nella combinazione 5-FU/OBX.

Poiché i precedenti esperimenti condotti con l'inibitore della pompa protonica vacuolare BaA1 hanno mostrato come l'induzione del processo autofagico da parte del composto LUT non sia rilevante ai fini dell'effetto citotossico, è stato deciso di concentrare lo studio del suo potenziale meccanismo di azione su altri aspetti indipendenti dalla capacità di indurre autofagia.

Al contrario, valutata l'entità del processo autofagico indotto dal trattamento con solo OBX e considerate le premesse inizialmente fatte, è stato di fondamentale interesse valutare se l'effetto derivante dall'intensificazione di tale processo, mediante utilizzo combinato di 5-FU/OBX in condizioni di controllo ed ipossia chimica, fosse in grado di spingere l'attivazione del processo autofagico oltre l'ipotetico "valore soglia", nonostante l'attivazione di HIF-1 non rappresenti un determinante per l'attivazione dell'autofagia nel modello sperimentale da noi adottato. I risultati della **figura 40** hanno tuttavia permesso di affermare che l'autofagia indotta dal trattamento combinato 5-FU/OBX mantiene il ruolo citoprotettivo anche nelle condizioni in cui HIF-1 risulta attivato permettendoci quindi di escludere che l'effetto chemiosensibilizzante di OBX al 5-FU derivi dal suo potenziale pro-autofagico.

Recenti dati ottenuti dal gruppo di *Wang G.* su sei differenti linee cellulari tumorali di pancreas vengono a conferma di quanto da noi ipotizzato circa un ruolo citoprotettivo del processo autofagico indotto dal trattamento con OBX da noi evidenziato [*Wang G et al., 2014*].

In seguito all'osservazione che nella linea cellulare HCT116, il potenziale citotossico e pro-apoptotico di LUT ed OBX non risulta alterato nella condizione di controllo rispetto alla condizione in cui HIF-1 risulta attivo, in cui avevamo osservato una minor risposta al 5-FU, si è cercato, in una seconda parte di questo lavoro di dottorato, di chiarire se l'effetto chemiosensibilizzante di LUT ed OBX da noi osservato nei confronti del trattamento con 5-FU potesse, almeno in parte, essere spiegato dalla capacità dei due composti di modulare negativamente i livelli di espressione della proteina HIF-1 α e/o l'attività trascrizionale del fattore HIF-1. In effetti entrambi i composti sono risultati in grado di inibire l'attività di HIF-1, ma verosimilmente in base a meccanismi diversi. Infatti, relativamente al trattamento con LUT, abbiamo variazioni di segno opposto per quanto riguarda i livelli di espressione della proteina HIF-1 α e l'attività trascrizionale del fattore HIF-1 (**figure 41a e 42a**). Tale comportamento, apparentemente paradossale, trova conferma in alcuni dati presenti in letteratura, secondo cui la quercetina e altri flavonoidi sono in grado di indurre un accumulo di HIF-1 α in alcuni modelli sperimentali [*Triantafyllou A et al., 2008*] [*Park SS et al., 2008*], anche in assenza di condizioni tali da indurre la stabilizzazione. Questo effetto è stato attribuito al fatto che i flavonoidi sono in grado di chelare gli ioni ferro bivalenti (Fe²⁺), causandone quindi una drastica deplezione a livello intracellulare [*Triantafyllou A et al., 2007*] e interferendo significativamente con la funzione delle prolil idrossilasi implicate nella degradazione di HIF-1 α in condizioni di controllo, che utilizzano il Fe²⁺ come cofattore [*Park SS et al., 2008*]. L'osservazione che l'accumulo della proteina non si traduce in un aumento corrispondente dell'attività trascrizionale di HIF-1 è stata spiegata con l'inibizione da parte di LUT dell'attività MAP chinasi e con essa di un evento fosforilativo importante ai fini dell'accumulo nucleare di HIF-1 α e della sua interazione con il DNA [*Triantafyllou A et al., 2008*].

E' chiaro che, sebbene siano necessari ulteriori studi per cercare di chiarire meglio i meccanismi molecolari alla base dell'azione di LUT, i risultati ottenuti in questo studio sembrano suggerirne un potenziale utilizzo come agente citotossico, in associazione a chemioterapici standard, per il trattamento di quei tumori solidi che presentano aree ipossiche, spesso resistenti al trattamento con chemioterapici convenzionali.

I risultati ottenuti sulla linea cellulare HCT116 in seguito a trattamento con OBX invece permettono di affermare che il composto BH3 mimetico è in grado di ridurre in maniera concentrazione dipendente l'accumulo di HIF-1 α , sia nel citosol, sia a livello nucleare (**figura 41b e 44**), riducendo parallelamente anche l'attività trascrizionale del fattore HIF-1. Infatti, in cellule HCT116 trasfettate con il plasmide reporter pEGFP-HRP, l'aumento della percentuale di cellule GFP-positive indotto dal CoCl₂ viene abolito in seguito al trattamento con OBX (**figura 42b**). Inoltre, esperimenti di Real Time PCR volti alla valutazione dei livelli di espressione del gene codificante per IGF2, noto target di HIF-1 [Xin Lu, Yibin Kang, 2010], hanno permesso di evidenziare che il trattamento con OBX inibisce l'aumento del trascritto indotto da CoCl₂ (**figura 43**).

Data l'importanza sperimentale delle terapie aventi come bersaglio il fattore trascrizionale HIF-1, nella seconda parte del lavoro si è cercato di identificare secondo quale/i meccanismo/i di azione OBX espliciti la sua azione modulatrice negativa nei confronti della proteina HIF-1 α .

Tale diminuzione non può essere spiegata attribuendo al composto BH3 mimetico la capacità di modulare positivamente il canonico pathway degradativo proteasomale VHL-mediato della proteina HIF-1 α , poiché tutti gli esperimenti sono stati condotti in condizioni tali da inibire questa via, da un lato attraverso l'incubazione dei campioni in condizioni di ridotta pO₂ e dall'altro mediante il blocco diretto dell'attività delle PHD mediante trattamento con una soluzione di CoCl₂. Peraltro, anche i risultati ottenuti nelle cellule HCT116 trasfettate con il plasmide pCDNA3-HIF-1 α MUT, che rende la subunità α di HIF-1 non degradabile tramite la via proteasomale VHL-dipendente [Masson N et al., 2001], e trattate con OBX confermano la capacità di OBX di agire indipendentemente dal blocco della canonica via degradativa (**figura 46**).

In un iniziale tentativo di spiegare il/i meccanismo/i di azione attraverso cui il composto BH3 mimetico esercita la sua azione down regolatrice sui livelli di espressione della proteina HIF-1 α sono stati condotti ulteriori esperimenti di Real Time PCR, al fine di valutare la possibilità che tale regolazione si esercitasse a livello del trascritto. Gli esperimenti condotti sembrano escludere che OBX sia in grado di modificare la trascrizione del gene codificante per HIF1 α e/o la stabilità del messaggero, in quanto questo non subisce alterazioni significative in presenza/assenza del trattamento, nelle due condizioni sperimentali utilizzate (**figura 45**). Tali evidenze hanno quindi fatto ipotizzare che l'effetto di OBX si esplicasse a un livello post-trascrizionale, attraverso la modulazione della sintesi e/o della degradazione della proteina.

L'aver escluso un possibile coinvolgimento della via di degradazione "canonica" VHL-dipendente della proteina non esclude infatti che OBX possa agire promuovendo altre vie di degradazione di HIF-1 α , dipendenti o meno dal proteasoma. A questo proposito, dati di letteratura affermano l'esistenza di una via di degradazione proteasomica VHL-indipendente di HIF-1 α , che sembra coinvolgere le *heat shock proteins* HSP70 e HSP90 nella stabilizzazione di HIF-1 α . Kong X et al. mostrano infatti che il trattamento con inibitori di HSP70 e HSP90 produce una marcata riduzione dei livelli di espressione di HIF-1 α inducendone la degradazione e che l'utilizzo di inibitori delle istone deacetilasi (HDACI) porta all'inibizione di HDAC-6, che risulta nella ipermetilazione di HSP90, con conseguente accumulo del complesso immaturo HIF-1 α /HSP70 e degradazione di HIF-1 α da parte del proteasoma in un processo ubiquitina- e VHL-indipendente [Kong X et al., 2006].

Esperimenti effettuati seguendo nel tempo l'andamento dei livelli di HIF-1 α in presenza dell'inibitore della sintesi proteica CHX hanno permesso di confermare che HIF-1 α viene comunque degradato, seppure più lentamente, a dispetto del blocco dell'attività prolil-idrossilasica che caratterizza il nostro modello sperimentale (**figura 47**). Il medesimo esperimento condotto in presenza di OBX ha permesso di evidenziare che l'emivita della proteina in esame risulta significativamente diminuita dal trattamento, ad indicare come OBX possa favorirne la degradazione attraverso una o più vie "non canoniche".

Infine, esperimenti condotti al fine di indagare un potenziale effetto di OBX sulla sintesi di HIF-1 α , evidenziabile mediante il blocco di tutte le possibili vie di degradazione della proteina, proteasoma-dipendenti (mediante MG132) e non (mediante il già citato inibitore lisosomiale BaA1), non hanno mostrato riduzioni significative nell'accumulo della proteina, permettendo di escludere che questo meccanismo fornisca un contributo significativo all'effetto di OBX (**figura 48**). Peraltro, l'osservazione, dalla medesima figura, che in presenza di un blocco dell'attività del proteasoma l'effetto di OBX sia quasi completamente abolito suggerisce che la diminuzione dei livelli di HIF-1 α possa essere in gran parte spiegata da un aumento della sua degradazione attraverso vie proteasoma-dipendenti. Al contrario, l'aggiunta di BaA1 modifica solo lievemente l'accumulo di HIF-1 α rispetto al trattamento con il solo OBX e non sembrerebbe influire in modo apprezzabile sull'accumulo indotto dal blocco del proteasoma quando, oltre a OBX, è presente anche MG132, suggerendo che la degradazione lisosomiale svolga un ruolo marginale nell'azione di OBX. E' tuttavia interessante notare che i nostri risultati ottenuti in assenza di OBX sono in accordo con dati di letteratura che suggeriscono un contributo della via degradativa lisosomiale all'omeostasi dei livelli di HIF-1 α in condizioni in cui la via canonica è inattiva [Hubbi ME et al., 2013].

In base ai risultati mostrati e discussi, OBX affianca quindi la già nota azione BH3-mimetica alla capacità di ridurre i livelli di espressione di HIF-1 α e inibire i processi regolati da HIF-1, il che giustifica

la sua capacità di contrastare la resistenza HIF-1-dipendente osservata nelle cellule HCT116 trattate con 5-FU. La possibilità che tale azione chemiosensibilizzante non sia limitata a questa linea cellulare, come suggerito dai risultati ottenuti sulla linea HCT8 mostrati in **figura 49**, fa di OBX un candidato interessante per lo sviluppo clinico nell'ambito di combinazioni polichemioterapiche, sia per la sua capacità di promuovere l'induzione del processo apoptotico, sia per la sua azione su uno dei principali responsabili della progressione tumorale verso un fenotipo sempre più maligno e refrattario alle terapie.

BIBLIOGRAFIA

- Aguado C, García-Paredes B, Sotelo MJ, Sastre J, Díaz-Rubio E, “Should capecitabine replace 5-fluorouracil in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer?” *World J Gastroenterol*. 2014 May 28;20(20):6092-101.
- AIRTUM e AIOM “I numeri del cancro in Italia” 2013.
- Aneknan P, Kukongviriyapan V, Prawan A, Kongpetch S, Sripa B, Senggunprai L., “Luteolin arrests cell cycling, induces apoptosis and inhibits the JAK/STAT3 pathway in human colangiocarcinoma cells.”, *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(12):5071-6.
- Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG, “Ligand-Based Targeting of Apoptosis in Cancer: The Potential of Recombinant Human Apoptosis Ligand 2/Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (rhApo2L/TRAIL).”, *J Clin Oncol*. 2008; 26(21):3621-30.
- Baek KH, Park J, Shin I, “Autophagy-regulating small molecules and their therapeutic applications.”, *Chem Soc Rev*. 2012; 41(8):3245-63.
- Bernardi R, Guernah I, Jin D, Grisendi S, Alimonti A, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Simon MC, Rafii S, Pandolfi PP, “PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR.”, *Nature*. 2006; 442(7104):779-85.
- Billard C., “BH3 mimetics: status of the field and new developments.”, *Mol Cancer Ther*. 2013 Sep;12(9):1691-700. Epub 2013 Aug 23.
- Birt DF, Hendrich S, Wang W., “Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids.”, *Pharmacol Ther*. 2001 May-Jun;90(2-3):157-77.
- Brown JM, Giaccia AJ., “The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy.”, *Cancer Res*. 1998 Apr 1; 58(7):1408-16.
- Brown LM, Cowen RL, Debray C, Eustace A, Eler JT, Sheppard FC, Parker CA, Stratford IJ, Williams KJ., “Reversing hypoxic cell chemoresistance in vitro using genetic and small molecule approaches targeting hypoxia-inducible factor-1.”, *Mol Pharmacol*. 2006 Feb;69(2):411-8. Epub 2005 Oct 27.
- Bruick RK, McKnight SL., “A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF.”, *Science* 2001 Nov 9; 294(5545):1337-40.
- Cao B, Li J, Zhou X, Juan J, Han K, Zhang Z, Kong Y, Wang J, Mao X., “Clioquinol induces pro-death autophagy in leukemia and myeloma cells by disrupting the mTOR signaling pathway.”, *Sci Rep*. 2014 Jul 18;4:5749.
- Cassavaugh J, Lounsbury KM., “Hypoxia-mediated biological control.”, *J Cell Biochem*. 2011 Mar; 112(3):735-44.
- Chawla AK, Kachnic LA, Clark JW, Willett CG., “Combined modality therapy for rectal and colon cancer.”, *Semin Oncol*. 2003 Aug;30(4 Suppl 9):101-12.

- Chen J, Ding Z, Peng Y, Pan F, Li J, Zou L, Zhang Y, Liang H., “*HIF-1 α inhibition reverses multidrug resistance in colon cancer cells via downregulation of MDR1/P-glycoprotein.*”, PLoS One. 2014 Jun 5;9(6):e98882. doi: 10.1371/journal.pone.0098882. eCollection 2014.
- Chian S, Li YY, Wang XJ, Tang XW., “*Luteolin sensitizes two oxaliplatin-resistant colorectal cancer cell lines to chemotherapeutic drugs via inhibition of the Nrf2 pathway.*”, Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(6):2911-6.
- Chu E, Koeller DM, Johnston PG, Zinn S, Allegra CJ, “*Regulation of thymidylate synthase in human colon cancer cells treated with 5-fluorouracil and interferon-gamma.*”, Mol Pharmacol. 1993; 43(4):527-33.
- Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP., “*Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene.*”, Cancer Res. 2002 Jun 15;62(12):3387-94.
- Crosby Me, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM., “*MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress.*”, Cancer Res. 2009 Feb 1;69(3):1221-9. Epub 2009 Jan 13.
- Cuervo AM, Palmer A, Rivett AJ, Knecht E, “*Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver.*”, Eur J Biochem 1995; 227:792-800.
- De Gramont A, Andre T, Tournigand C, et al., “*Adjuvant treatment of colon cancer MOSAIC study’s main results.*”, Bull Cancer. 2006 Feb 1;93 Suppl 1:S5-9.
- DeClerck K, Elble RC., “*The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy.*”, Front Biosci (Landmark Ed). 2010 Jan 1;15:213-25.
- Denton D, Xu T, Kumar S., “*Autophagy as a pro-death pathway.*”, Immunol Cell Biol. 2014 Oct 21. doi: 10.1038/icb.2014.85.
- Ding Z, Yang L, Xie X, Xie F, Pan F, Li J, He J, Liang H., “*Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells.*”, J Cancer Res Clin Oncol. 2010 Nov;136(11):1697-707.
- Dotto GP, “*p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?*”, Biochim Biophys Acta. 2000; 1471(1):M43-56.
- Durai R, Yang W, Gupta S, Seifalian AM, Winslet MC., “*The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge.*”, Int J Colorectal Dis. 2005 May; 20(3):203-20.
- Dykxhoorn DM, Lieberman J., “*Knocking down disease with siRNAs.*”, Cell. 2006 Jul 28;126(2):231-5.
- Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y., “*Molecular mechanism of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to*

- hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300.*, EMBO J. 1999 Apr 1; 18(7):1905-14.
- Ende C, Gebhardt R., *"Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids."*, Planta Med. 2004 Oct;70(10):1006-8.
 - Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ, Dive C., *"Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance."*, Mol Cell Biol. 2004 Apr;24(7):2875-89.
 - Eskelinen EL, *"Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells."*, Autophagy. 2005; 1(1):1-10.
 - Eskelinen EL, Saftig P., *"Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease."*, Biochim Biophys Acta. 2009 Apr;1793(4):664-73. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.07.014. Epub 2008 Jul 28.
 - Eskelinen EL., *"The dual role of autophagy in cancer."*, Curr Opin Pharmacol. 2011 Aug;11(4):294-300. doi: 10.1016/j.coph.2011.03.009. Epub 2011 Apr 15.
 - Evrard A, Cuq P, Ciccolini J, Vian L, Cano JP, *"Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase."*, Br J Cancer. 1999; 80(11):1726-33.
 - Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F, *"Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012."*, Eur J Cancer 2013 Apr;49(6):1374-403. Epub 2013 Feb 26.
 - Frontini M, Proietti-De-Santis L., *"Cockayne syndrome B protein (CSB): linking p53, HIF-1 and p300 to robustness, lifespan, cancer and cell fate decisions."*, Cell Cycle. 2009 Mar 1;8(5):693-6. Epub 2009 Mar 2.
 - Gatlneau M, Rixe O, Chevalier TL, *"Tirapazamine with cisplatin and vinorelbine in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a phase I/II study."*, Clin Lung Cancer. 2005; 6(5):293-98.
 - Gerweck LE, Vijayappa S, Kozin S., *"Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics."*, Mol Cancer Ther. 2006 May;5(5):1275-9.
 - Gleave ME, Monia BP., *"Antisense therapy for cancer."*, Nat Rev Cancer. 2005 Jun; 5(6):468-79.
 - Glimelius B., *"Neo-adjuvant radiotherapy in rectal cancer."*, World J Gastroenterol. Dec 14, 2013; 19(46): 8489–8501. Published online Dec 14, 2013.
 - Gnosa S, Zhang H, Brodin VP, Carstensen J, Adell G, Sun XF, *"AEG-1 expression is an independent prognostic factor in rectal cancer patients with preoperative radiotherapy: a study in a Swedish clinical trial."*, Br J Cancer. 2014 Jul 8;111(1):166-73. Epub 2014 May 29.
 - Gozuacik D, Kimchi A, *"Autophagy and cell death."*, Curr Top Dev Biol. 2007;78:217-45.

- Greaves M., "Cancer causation: the Darwinian downside of past success?", *Lancet Oncol.* 2002 Apr;3(4):244-51.
- Greenberger LM, Horak ID, Filpula D, Sapra P, Westergaard M, Frydenlund HF, Albaek C, Schrøder H, Ørum H., "A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1alpha, EZN-2968, inhibits tumor cell growth.", *Mol Cancer Ther.* 2008 Nov; 7(11):3598-608. Epub 2008 Oct 30.
- Greijer AE, van der Wall E., "The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis.", *J Clin Pathol.* 2004 Oct;57(10):1009-14.
- Gu J, Milligan J, Huang LE., « *Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1alpha-p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine.*», *J Biol Chem.* 2001 Feb 2; 276(5):3550-4.
- Guba M, Seeliger H, Kleespies A, Jauch KW, Bruns C., "Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer.", *Int J Colorectal Dis.* 2004 Nov;19(6):510-7.
- Hammond EM, Giaccia AJ., "The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis.", *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 10;331(3):718-25.
- Hanahan D, Weinberg RA., "The hallmarks of cancer.", *Cell.* 2000 Jan 7; 100(1):57-70.
- Harborne JB, Williams CA., "Advances in flavonoid research since 1992.", *Phytochemistry.* 2000 Nov;55(6):481-504.
- Harris AL., "Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth.", *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):38-47.
- Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N , "Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer.", *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 150845. Published online Jun 12, 2014.
- Helton ES, Chen X., "p53 modulation of the DNA damage response.", *J Cell Biochem.* 2007 Mar 1;100(4):883-96.
- Henriksson E, Kjellén E, Wahlberg P, Wennerberg J, Kjellström JH., "Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays.", *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2006 Nov-Dec;42(10):320-3.
- Hitchon CA, El-Gabalawy HS, "Oxidation in rheumatoid arthritis.", *Arthritis Res Ther.* 2004; 6:265-278.
- Höckel M, Vaupel P., "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects.", *J Natl Cancer Inst.* 2001 Feb 21;93(4):266-76.
- Hofer T, Desbaillets I, Höpfl G, Gassmann M, Wenger RH., « *Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy.*», *FASEB J.* 2001 Dec;15(14):2715-7.

- Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Wakada M, Nakanishi R, Nishino H, Matsui H, Sakai T., "*Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells.*", *Oncogene*. 2005 Nov 3;24(48):7180-9.
- Houghton JA, Harwood FG, Tillman DM, "*Thymineless death in colon carcinoma cells is mediated via fas signaling.*"; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(15):8144-9.
- <http://clinicaltrials.gov>
- Hu Y, Liu J, Huang H., "*Recent agents targeting HIF-1 α for cancer therapy.*", *J Cell Biochem*. 2013 Mar;114(3):498-509. doi: 10.1002/jcb.24390.
- Hu YL, Jahangiri A, Delay M, Aghi MK, "*Tumor cell autophagy as an adaptive response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy.*", *Cancer Res*. 2012; 72(17):4294-9.
- Huang D, Li C, Zhang H., "*Hypoxia and cancer cell metabolism.*", *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014 Mar;46(3):214-9.
- Huang HC, Syu KY, Lin JK., "*Chemical composition of Solanum nigrum linn extract and induction of autophagy by leaf water extract and its major flavonoids in AU565 breast cancer cells.*", *J Agric Food Chem*. 2010 Aug 11;58(15):8699-708.
- Huang S, Okumura K, Sinicrope FA, "*BH3 mimetic obatoclox enhances TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells.*", *Clin Cancer Res*. 2009; 15(1):150-9.
- Huang Y, Yu H, Lei H, Xie C, Zhong Y, "*Matrix metalloproteinase 7 is a useful marker for 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in stage II and stage III colorectal cancer patients.*", *Med Oncol*. 2014; 31:824.
- Hubbi ME, Hu H, Kshitiz, Ahmed I, Levchenko A, Semenza GL, "*Chaperone-mediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) for lysosomal degradation.*", *J Biol Chem*. 2013 Apr 12;288(15):10703-14.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ., « *Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation.*», *Science*. 2001 Apr 20; 292(5516):468-72.
- Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R, "*Autophagy as a target for anticancer therapy.*", *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8(9):528-39.
- Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, Yoo MA, Song EJ, Lee KJ, Kim KW., « *Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation.*», *Cell*. 2002 Nov 27; 111(5):709-20.

- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL., "Dimerization, DNA binding and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1.", J Biol Chem. 1996 Jul 26; 271(30):17771-8.
- Jiang WQ, Fu FF, Li YX, Wang WB, Wang HH, Jiang HP, Teng LS, "Molecular biomarkers of colorectal cancer: prognostic and predictive tools for clinical practice.", J Zhejiang Univ Sci B. 2012 Sep;13(9):663-75.
- Johnson MR, Hageboutros A, Wang K, High L, Smith JB, Diasio RB, "Life-threatening toxicity in a dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patient after treatment with topical 5-fluorouracil.", Clin Cancer Res. 1999; 5(8):2006.
- Jones DT, Pugh CW, Wigfield S, Stevens MF, Harris AL., "Novel thioredoxin inhibitors paradoxically increase hypoxia-inducible factor-alpha expression but decrease functional transcriptional activity, DNA binding and degradation.", Clin Cancer Res. 2006; 12:5384-94.
- Kaelin WG Jr., "Synthetic lethality: a framework for the development of wiser cancer therapeutics.", Genome Med. 2009 Oct 27;1(10):99.
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L., "Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha.", EMBO J. 1998 Nov 16; 17(22):6573-86.
- Ke Q, Costa M., "Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).", Mol Pharmacol. 2006 Nov;70(5):1469-80. Epub 2006 Aug 3.
- Kim M, Park SY, Pai HS, Kim TH, Billiar TR, Seol DW, "Hypoxia inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by blocking Bax translocation.", Cancer Res. 2004; 64(12):4078-81.
- Ko CH, Shen SC, Chen YC., "Hydroxylation at C4' or C6 is essential for apoptosis-inducing activity of flavanone through activation of the caspase-3 cascade and production of reactive oxygen species.", Free Radic Biol Med. 2004 Apr 1;36(7):897-910.
- Koehler BC, Scherr AL, Lorenz S, Elssner C, Kautz N, Welte S, Jaeger D, Urbanik T, Schulze-Bergkamen H., "Pan-Bcl-2 inhibitor obatoclox delays cell cycle progression and blocks migration of colorectal cancer cells.", PLoS One. 2014 Sep 5;9(9):e106571. doi: 10.1371/journal.pone.0106571. eCollection 2014.
- Koh MY, Spivak-Kroizman T, Venturini S, Welsh S, Williams RR, Kirkpatrick DL, Powis G., "Molecular mechanisms for the activity of PX-478, an antitumor inhibitor of the hypoxia-inducible factor-1alpha.", Mol Cancer Ther. 2008 Jan;7(1):90-100.
- Kong X, Lin Z, Liang D, Fath D, Sang N, Caro J, "Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha.", Mol Cell Biol. 2006; 26(6):2019-28.

- Konopleva M, Watt J, Contractor R, Tsao T, Harris D, Estrov Z, Bornmann W, Kantarjian H, Viallet J, Samudio I, Andreeff M, "Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax).", *Cancer Res.* 2008; 68(9):3413-20.
- Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC, "Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates.", *Mol Cell* 2009; 33:517-27.
- Koshiji M, To KK, Hammer S, Kumamoto K, Harris AL, Modrich P, Huang LE., "HIF-1 α induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS α expression.", *Mol Cell.* 2005 Mar 18;17:793-803.
- Koukourakis MI, Bentzen SM, Giatromanolaki A, Wilson GD, Daley FM, Saunders MI, Dische S, Sivridis E, Harris AL., "Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial.", *J Clin Oncol.* 2006 Feb; 24:727-35.
- Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL., "Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1.", *Cancer Res.* 2003 Mar 1;63(5):1138-43.
- Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, Cornell-Kennon S, Lee J, Wang B, Wang J, Memmert K, Naegeli HU, Petersen F, Eck MJ, Bair KW, Wood AW, Livingston DM., "Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway.", *Cancer Cell.* 2004 Jul;6(1):33-43.
- Kung AL, Zabludoff SD, France DS, Freedman SJ, Tanner EA, Vieira A, Cornell-Kennon S, Lee J, Wang B, Wang J, Memmert K, Naegeli HU, Petersen F, Eck MJ, Kuroda J, Taniwaki M., "Involvement of BH3-only proteins in hematologic malignancies.", *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009; 71(2):89-101.
- Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee S, Kwon KA, Choi HJ, Park KJ, Kim HJ, Roh MS, "Clinicopathological significance of p53, hypoxia-inducible factor 1 α , and vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer.", *Anticancer Res.* 2010;30(10):4163-8.
- Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK., "FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor.", *Genes Dev.* 2002 Jun 15; 16(12):1466-71.
- Lane DP, "Cancer p53, guardian of the genome.", *Nature.* 1992; 358(6381):15-6.
- Lessene G, Czabotar PE, Colman PM, "BCL-2 family antagonists for cancer therapy.", *Nat Rev Drug Discovery.* 2008; 7(12):989-1000.

- Leung HW, Kuo CL, Yang WH, Lin CH, Lee HZ., "Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis.", *Eur J Pharmacol.* 2006 Mar 18;534(1-3):12-8. Epub 2006 Feb 15.
- Levine B, Kroemer G, "Autophagy in the pathogenesis of disease.", *Cell.* 2008; 132(1):27-42.
- Li L, Lin X, Staver M, Shoemaker A, Semizarov D, Fesik SW, Shen Y. "Evaluating hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapeutic target via inducible RNA interference in vivo.", *Cancer Res.* 2005 Aug 15; 65(16):7249-58.
- Li W, Yang Q, Mao Z, "Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences.", *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(5):749-63.
- Li WW, Li J, Bao JK., "Microautophagy: lesser-known self-eating.", *Cell Mol Life Sci.* 2012 Apr;69(7):1125-36.
- Lin SC, Liao WL, Lee JC, Tsai SJ., "Hypoxia-regulated gene network in drug resistance and cancer progression.", *Exp Biol Med (Maywood).* 2014 May 8;239(7):779-792.
- Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM., "Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy.", *Curr Cancer Drug Targets.* 2008 November ; 8(7): 634–646.
- Livak KJ, Schmittgen TD., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T).) Method.* *Methods.* 2001 Dec; 25(4):402-8.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG, "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies.", *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(5):330-8.
- Lorin S, Hamai A, Mehrpour M, Codogno P, "Autophagy regulation and its role in cancer.", *Seminars in Cancer Biology* 23 2013; 361– 379.
- Lu J, McEachern D, Sun H, Bai L, Peng Y, Qiu S, Miller R, Liao J, Yi H, Liu M, Bellail A, Hao C, Sun SY, Ting AT, Wang S, "Therapeutic potential and molecular mechanism of a novel, potent, non-peptide, Smac mimetic SM-164 in combination with TRAIL for cancer treatment.", *Mol Cancer Ther.* 2011 May;10(5):902-14. Epub 2011 Mar 3.
- Lu X, Kang Y., "Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis.", *Clin Cancer Res.* 2010 Dec 15;16(24):5928-35.
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G., "Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1.", *EMBO J.* 2007 May 16;26(10):2527-39. Epub 2007 Apr 19.
- Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC., "Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress.", *Mol Cell.* 2010 Oct 22;40(2):294–309.

- Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R, “HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms.”, *Mini Rev Med Chem*. 2009; 9(9):1084-101.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. “Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation.”, *EMBO J*. 2001;20:5197-206.
- Mathew R, White E, “Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night.”, *Curr Opin Genet Dev*. 2011; 21(1):113-9.
- Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T., “Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells.”, *Biol Pharm Bull*. 2005 Feb;28(2):253-9.
- Mazure NM and Pouyssegur J., “Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival?”, *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 22, Issue 2, April 2010, Pages 177–180.
- McKeown E, Nelson DW, Johnson EK, Maykel JA, Stojadinovic A, Nissan A, Avital I, Brücher BL, Steele SR, “Current Approaches and Challenges for Monitoring Treatment Response in Colon and Rectal Cancer.”, *J Cancer*. 2014 Jan 1;5(1):31-43.
- Meiyanto E, Hermawan A, Anindyajati, “Natural products for cancer-targeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents.”, *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(2):427-36.
- Melillo G, “Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy.”, *Mol Cancer Res*. 2006; 4(9):601-5.
- Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S, Lenz HJ, Groshen S, Leichman L, Danenberg PV, “High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil.”, *Clin Cancer Res*. 1998; 4(10):2371-6.
- Meyers M, Wagner MW, Hwang HS, Kinsella TJ, Boothman DA, “Role of the hMLH1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses.”, *Cancer Res*. 2001; 61(13):5193-201.
- Miesan KH, Mohamed S., “Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants.”, *J Agric Food Chem*. 2001 Jun;49(6):3106-12.
- Mihaylova VT, Bindra RS, Yuan J, Campisi D, Narayanan L, Jensen R, Giordano F, Johnson RS, Rockwell S, Glazer PM., “Decreased expression of the DNA mismatch repair gene Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells.”, *Mol Cell Biol*. 2003 May;23(9):3265-73.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC, “Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax gene expression in vitro and in vivo.”, *Oncogene*. 1994; 9(6):1799-805.

- Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Zukerberg LR, Kohgo Y, Lynch MP, Rueda BR, Chung DC., "Induction of interleukin- 8 preserves the angiogenic response in HIF-1 α -deficient colon cancer cells.", Nat Med. 2005 Sep;11(9):992-7. Epub 2005 Aug 28.
- Mizushima N, Yoshimori T, "How to interpret LC3 immunoblotting.", Autophagy. 2007;3(6):542-5.
- Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P, "FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: The call for a personalized approach in colorectal cancer therapy.", World J Gastroenterol. 2014 Aug 14;20(30):10316-30.
- Mucaj V, Shay JE, Simon MC., "Effects of hypoxia and HIFs on cancer metabolism.", Int J Hematol. 2012 May;95(5):464-70.
- Nagao A, Seki M, Kobayashi H., "Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids.", Biosci Biotechnol Biochem. 1999 Oct;63(10):1787-90.
- Neuhaus ML., "Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies.", Nutr Cancer. 2004;50(1):1-7.
- Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A, Watson M, Serfass L, Murthy Madiraju SR, Goulet D, Viallet J, Bélec L, Billot X, Acoca S, Purisima E, Wiegmanns A, Cluse L, Johnstone RW, Beauparlant P, Shore GC, "Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis.", Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(49):19512-7.
- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N, "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy.", Biochimica et Biophysica Acta 1833. 2013; 3448–3459.
- Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW, Isaka K., "Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT).", Mol Cell Biol. 2004 Jul;24(13):6076-83.
- Nowell PC., "The clonal evolution of tumor cell populations.", Science. 1976 Oct 1;194(4260):23-8.
- Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG., "Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein.", Nat Cell Biol. 2000 Jul; 2(7):423-7.
- Pan J, Cheng C, Verstovsek S, Chen Q, Jin Y, Cao Q., "The BH3-mimetic GX15-070 induces autophagy, potentiates the cytotoxicity of carboplatin and 5-fluorouracil in esophageal carcinoma cells.", Cancer Lett. 2010 Jul 28;293(2):167-74. Epub 2010 Feb 13.
- Pandev TS, "Age appropriate screening for cancer: Evidence-based in the Unites States of America.", Postgrad Med 2014;60:318-21.

- Pandurangan AK, Esa NM., *"Luteolin, a bioflavonoid inhibits colorectal cancer through modulation of multiple signaling pathways: a review."*, Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(14):5501-8.
- Park SH, Park HS, Lee JH, Chi GY, Kim GY, Moon SK, Chang YC, Hyun JW, Kim WJ, Choi YH., *"Induction of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and non-canonical autophagy by Luteolin in NCI-H460 lung carcinoma cells."*, Food Chem Toxicol. 2013 Jun;56:100-9. Epub 2013 Feb 20.
- Park SS, Bae I, Lee YJ., *"Flavonoids-induced accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha/2alpha is mediated through chelation of iron."*, J Cell Biochem. 2008 Apr 15;103(6):1989-98.
- Rapisarda A, Zalek J, Hollingshead M, Braunschweig T, Uranchimeg B, Bonomi CA, Borgel SD, Carter JP, Hewitt SM, Shoemaker RH, Melillo G., *"Schedule-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1alpha protein accumulation, angiogenesis, and tumor growth by topotecan in U251-HRE glioblastoma xenografts."*, Cancer Res. 2004; 64:6845-48.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC, *"Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology."*, Physiol Rev. 2010; 90(4):1383-435.
- Ravizza R, Molteni R, Gariboldi MB, Marras E, Perletti G, Monti E., *"Effect of HIF-1 modulation on the response of two- and three-dimensional cultures of human colon cancer cells to 5-fluorouracil."*, Eur J Cancer. 2009 Mar;45(5):890-8. Epub 2009 Jan 24.
- Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E, *"Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin."*, Mol Cancer Ther. 2002 Jan;1(3):227-35.
- Rechsteiner M, Rogers SW., *"PEST sequences and regulation by proteolysis."*, Trends Biochem Sci. 1996 Jul; 21(7):267-71.
- Robbins SL and Cotran RS, *"Le basi patologiche delle malattie."*, 2008.
- Rohwer N, Cramer T, *"Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways."*, Drug Resist Updat. 2011 Jun;14(3):191-201.
- Rosenfeldt MT, Ryan KM, *"The role of autophagy in tumour development and cancer therapy."*, Expert Rev Mol Med. 2009; 11:e36.
- Rosenfeldt MT, Ryan KM., *"The multiple roles of autophagy in cancer."*, Carcinogenesis. 2011 Jul;32(7):955-63. doi: 10.1093/carcin/bgr031. Epub 2011 Feb 11.
- Rosso T, Malvezzi M, Bertuccio P, Negri E, La Vecchia C, Decarli A, *"Cancer mortality in Italy, 2008, and predictions for 2012."*, Tumori. 2012 Sep-Oct;98(5):559-67.

- Ruan K, Song G, Ouyang G., "Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer.", J Cell Biochem. 2009 Aug 15;107(6):1053-62.
- Rubinstein AD, Kimchi "A, Life in the balance – a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis.", J Cell Sci. 2012; 125(Pt 22):5259-68.
- Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ, "Potential therapeutic applications of autophagy.", Nature Reviews Drug Discovery 6. 2007; 304-312.
- Rzymiski T, Milani M, Singleton DC, Harris AL., "Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia.", Cell Cycle. 2009 Dec;8(23):3838-47. Epub 2009 Dec 15.
- Salvesen GS, Duckett CS, "IAP proteins: blocking the road to death's door.", Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3(6):401-410.
- Schrama D, Reisfeld RA, Becker JC, "Antibody targeted drugs as cancer therapeutics.", Nat Rev Drug Discov. 2006 Feb;5(2):147-59.
- Semenza GL, "Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1, ". Cancer Cell. 2004 May;5(5):405-6.
- Semenza GL., "HIF-1 inhibitors for cancer therapy: from gene expression to drug discovery.", Curr Pharm Des. 2009;15(33):3839-43.
- Semenza GL., "Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells.", Trends Mol Med. 2012 Sep;18(9):534-543.
- Semenza GL., "Targeting HIF-1 for cancer therapy.", Nat Rev Cancer. 2003 Oct;3(10):721-32.
- Shannon AM., Bouchier-Hayes DJ., Condron CM., Toomey D., "Tumor hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies.", Cancer Treatment Reviews. 2003 Aug;29(4):297-307.
- Sharma K, Le N, Alotaibi M, Gewirtz DA., "Cytotoxic autophagy in cancer therapy.", J Mol Sci. 2014 Jun 5;15(6):10034-51.
- Shi R, Huang Q, Zhu X, Ong YB, Zhao B, Lu J, Ong CN, Shen HM., "Luteolin sensitizes the anticancer effect of cisplatin via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated p53 phosphorylation and stabilization.", Mol Cancer Ther. 2007 Apr;6(4):1338-47.
- Strand S, Vollmer P, van den Abeelen L, Gottfried D, Alla V, Heid H, Kuball J, Theobald M, Galle PR, Strand D, "Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells.", Oncogene. 2004; 23(20):3732–6.
- Strese S, Fryknäs M, Larsson R, Gullbo J. "Effects of hypoxia on human cancer cell line chemosensitivity.", BMC Cancer. 2013; 13: 331. Published online Jul 5, 2013.

- Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D., "HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia.", *FASEB J* 2001 Nov; 15(13):2445-53.
- Swampillai AL, Salomoni P, Short SC, "The role of autophagy in clinical practice.", *Clin Oncol (R Coll Radiol)*., 2012; 24(6):387-95.
- Takebe N, Zhao SC, Ural AU, Johnson MR, Banerjee D, Diasio RB, Bertino JR, "Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells.", *Cancer Gene Ther.* 2001; 8(12):966-73.
- Tárraga López PJ, Albero JS, Rodríguez-Montes JA, "Primary and secondary prevention of colorectal cancer.", *Clin Med Insights Gastroenterol.* 2014 Jul 14;7:33-46.
- Tischner D, Woess C, Ottina E, Villunger A, "Bcl-2-regulated cell death signalling in the prevention of autoimmunity.", *Cell Death Dis.* 2010; 1:e48.
- Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF., "Drug resistance and the solid tumor microenvironment.", *J Natl Cancer Inst.* 2007 Oct 3;99(19):1441-54. Epub 2007 Sep.
- Triantafyllou A, Liakos P, Tsakalof A, Chachami G, Paraskeva E, Molyvdas PA, Georgatsou E, Simos G, Bonanou S., "The flavonoid quercetin induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and inhibits cell proliferation by depleting intracellular iron.", *Free Radic Res.* 2007 Mar;41(3):342-56.
- Triantafyllou A, Mylonis I, Simos G, Bonanou S, Tsakalof A., "Flavonoids induce HIF-1alpha but impair its nuclear accumulation and activity.", *Free Radic Biol Med.* 2008 Feb 15;44(4):657-70.
- Trudel S, Li ZH, Rauw J, Tiedemann RE, Wen XY, Stewart AK, "Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma.", *Blood.* 2007; 109(12):5430-8.
- Tsai YP, Wu KJ, "Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis.", *J Biomed Sci.* 2012; 19:102.
- Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH., "The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy.", *Oncogene.* 2003 May 22;22(21):3213-20.
- Vaupel P, Mayer A., "Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome.", *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Jun;26(2):225-39.
- Wadsworth SJ, Atsuta R, McIntyre JO, Hackett TL, Singhera GK, "Dorscheid DR, IL-13 and TH2 cytokine exposure triggers matrix metalloproteinase 7-mediated Fas ligand cleavage from bronchial epithelial cells.", *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 126(2):366–74, e361–68.

- Wang G, Chen S, Edwards H, Cui X, Cui L, Ge Y., “*Combination of chloroquine and GX15-070 (obatoclox) results in synergistic cytotoxicity against pancreatic cancer cells.*”, *Oncol Rep.* 2014 Dec;32(6):2789-94. Epub 2014 Oct 3.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. „*Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.*”, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6; 92(12):5510-4.
- Wang L, Wang J, Fang L, Zheng Z, Zhi D, Wang S, Li S, Ho CT, Zhao H., “*Anticancer Activities of Citrus Peel Polymethoxyflavones Related to Angiogenesis and Others.*”, *Biomed Res Int.* 2014;2014:453972. Epub 2014 Aug 28.
- Wartenberg M, Ling FC, Müschen M, Klein F, Acker H, Gassmann M, Petrat K, Pütz V, Hescheler J, Sauer H., “*Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species.*”, *FASEB J.* 2003 Mar;17(3):503-5.
- Weidemann A, Johnson RS., “*Biology of HIF-1alpha.*”, *Cell Death Differ.* 2008 Apr; 15(4):621-7.
- Wilson WR, Hay MP., “*Targeting hypoxia in cancer therapy.*”, *Nat Rev Cancer.* 2011 Jun;11(6):393-410.
- Winkels RM, Heine-Bröring RC, van Zutphen M, van Harten-Gerritsen S, Kok DE, van Duijnhoven FJ, Kampman E, “*The COLON study: Colorectal cancer: Longitudinal, Observational study on Nutritional and lifestyle factors that may influence colorectal tumour recurrence, survival and quality of life.*”, *BMC Cancer.* 2014 May 27;14:374.
- Wu WK, Sakamoto KM, Milani M, Aldana-Masangkay G, Fan D, Wu K, Lee CW, Cho CH, Yu J, Sung JJ, “*Macroautophagy modulates cellular response to proteasome inhibitors in cancer therapy.*”, *Drug Resist.* 2010; 13:87-92.
- Wu YC, Wu WK, Li Y, Yu L, Li ZJ, Wong CC, Li HT, Sung JJ, Cho CH., “*Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A1 lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells.*”, *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 May 1;382(2):451-6. Epub 2009 Mar 14.
- www.airc.it
- Xin Lu, Yibin Kang, “*Hypoxia and hypoxia-inducible factors (HIFs): master regulators of metastasis.*”, *Clin Cancer Res.* Dec 15, 2010; 16(24): 5928–5935.
- Yang Z, Klionsky DJ, “*Eaten alive: a history of macroautophagy.*”, *Nat Cell Biol.* 2010; 12(9):814-22.
- Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA, “*The role of autophagy in cancer: therapeutic implications.*”, *Mol Cancer Ther.* 2011;10(9):1533-41.
- Yazbeck VY, Li C, Grandis JR, Zang Y, Johnson DE., “*Single-agent obatoclox (GX15-070) potently induces apoptosis and pro-survival autophagy in head and neck squamous cell carcinoma*

- cells.”, *Oral Oncol.* 2014 Feb;50(2):120-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.10.013. Epub 2013 Nov 8.
- Youle RJ, Strasser A, “*The Bcl-2 protein family: opposite activities that mediate cell death.*”, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9:47-59.
 - Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE., “*Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha.*”, *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):15911-6. Epub 2003 Feb 26.
 - Zhan Q, Chen IT, Antinore MJ, Fornace AJ Jr, “*Tumor suppressor p53 can participate in transcriptional induction of the GADD45 promoter in the absence of direct DNA binding.*”, *Mol Cell Biol.* 1998; 18(5):2768-78.
 - Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL., “*Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics.*”, *Cancer Res.*2000 Mar 15;60(6):1541-5.
 - Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW., “*Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases.*”, *Cancer Res.* 1999 Nov 15;59(22):5830-5.
 - Zhou H, Shen T, Shang C, Luo Y, Liu L, Yan J, Li Y, Huang S., “*Ciclopirox induces autophagy through reactive oxygen species-mediated activation of JNK signaling pathway.*”, *Oncotarget.* 2014 Oct 4.
 - Zi X, Feyes DK, Agarwal R., “*Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins.*”, *Clin Cancer Res.* 1998 Apr;4(4):1055-64.

