



Efecte de la inhibició de les histona desacetilases i d'inductors de p53 en línies cel·lulars de neuroblastoma humà

Constanza Cortés Crignola

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Efecte de la inhibició de les histona desacetilases i d'inductors de p53 en línies cel·lulars de neuroblastoma humà

Memòria presentada per Constanza Cortés Crignola
per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Barcelona, Setembre de 2014

Doctoranda:

Constanza Cortés Crignola

Director:

Dr. Santiago Ambrosio

Director:

Dr. Albert Tauler

L'escriptura de la tesi ha estat un procés llarg i exigent, que no s'hauria pogut realitzar sense l'ajuda de nombroses persones. Voldria agrair a totes elles que m'hagin acompanyat en aquest viatge, sense vosaltres, aquest treball no seria una realitat.

La llista és molt llarga i, per no oblidar-me a ningú, no citaré noms: vosaltres sabeu qui sou. Us agraeixo moltíssim el suport incondicional que m'heu donat, les hores passades amb mi i la paciència que heu demostrat; sé que no ha estat fàcil. No ho oblidaré mai (tot i que, coneixent-me, sembla difícil) i estareu sempre entre els meus records més vívids.

Moltíssimes gràcies.

Índex de continguts

INTRODUCCIÓ	11
<u>EL NEUROBLASTOMA</u>	<u>13</u>
— El càncer en els nens	13
— Origen i desenvolupament del neuroblastoma	14
— Presentació clínica i comportament biològic	15
— Patogènesi molecular	17
— Classificació dels neuroblastomes	19
— Tractament	23
<u>INHIBIDORS DE LES HISTONA DESACETILASES</u>	<u>25</u>
— Acetilació i càncer	25
— La família de les histona desacetilases	26
— Substrats de les HDACs	28
— Mecanismes de desregulació de les HDACs	29
— HDACs en el neuroblastoma	30
— Inhibidors de les HDACs	31
— Classificació dels HDI	32
— Efectes biològics dels HDI	33
— SAHA	36
<u>L'ESTRÈS RIBOSÒMIC</u>	<u>37</u>
— Biogènesi dels ribosomes	37
— Punt de control de l'estrès ribosòmic	39
— La biogènesi ribosòmica en el desenvolupament del càncer	41
— Inhibidors de la biogènesi dels ribosomes	42

<u>LA VIA DE p53</u>	<u>43</u>
— p53: El guardià del genoma	43
— L'oncoproteïna MDM2	45
— Rol de MDM2 en el desenvolupament del neuroblastoma	46
— Inhibidors de MDM2: Nutlina-3	47

OBJECTIUS	49
------------------	-----------

RESULTATS	53
------------------	-----------

<u>1. CARACTERITZACIÓ DE LES LÍNIES CEL·LULARS UTILITZADES</u>	<u>55</u>
---	------------------

<u>2. EFECTE DEL SAHA EN LÍNIES DE NEUROBLASTOMA HUMÀ</u>	<u>57</u>
--	------------------

— El SAHA disminueix la viabilitat en cèl·lules de neuroblastoma	57
— El SAHA indueix apoptosi i autofàgia en línies cel·lulars de neuroblastoma	59
— L'apoptosi és la causa de la mort observada en resposta al SAHA	61
— L'activació de l'autofàgia induïda per SAHA no depèn de la via mTORC1	63
— L'autofàgia no és determinant en l'efecte sobre la viabilitat induït pel SAHA	64
— N-Myc determina una major sensibilitat al SAHA dependent de la línia cel·lular	65

<u>3. EFECTE DE L'ACTINOMICINA D EN LÍNIES DE NEUROBLASTOMA HUMÀ</u>	<u>70</u>
---	------------------

— L'actinomicina D disminueix la viabilitat en cèl·lules de neuroblastoma	70
— N-Myc sensibilitza les cèl·lules de neuroblastoma al tractament amb actinomicina D	72
— L'actinomicina D indueix la pèrdua de viabilitat mitjançant mecanismes dependents i independents a l'apoptosi	73
— L'actinomicina D indueix canvis en el cicle cel·lular en cèl·lules de neuroblastoma	75

<u>4. EFECTE DE LA NUTLINA-3 EN LÍNIES DE NEUROBLASTOMA HUMÀ</u>	<u>76</u>
---	------------------

— La nutlina-3 disminueix la viabilitat en cèl·lules de neuroblastoma	76
---	----

— N-Myc sensibilitza les cèl·lules de neuroblastoma al tractament amb nutlina-3	77
— La nutlina-3 indueix la mort cel·lular mitjançant l'activació de l'apoptosi	78
— La nutlina-3 indueix l'aturada del cicle cel·lular en cèl·lules de neuroblastoma amb la p53wt	80
<u>5. EFECTE DE LA COMBINACIÓ DE SAHA AMB ACTINOMICINA D I NUTLINA-3</u>	<u>81</u>
— La combinació de SAHA amb actinomicina D o nutlina-3 potencia l'efecte sobre la viabilitat cel·lular	81
— El SAHA actua sinèrgicament amb l'actinomicina D i la nutlina-3 en les cèl·lules de neuroblastoma	82
DISCUSSIÓ	85
CONCLUSIONS	99
MATERIAL I MÈTODES	103
BIBLIOGRAFIA	113

Índex de figures

INTRODUCCIÓ

— Figura 1. Estadístiques del Registre Nacional de Tumors Infants 2005 - 2012.	13
— Figura 2. Maduració del llineatge simpàticoadrenal i desenvolupament del neuroblastoma.	14
— Figura 3. Micrografies de diferents tipus de neuroblastoma.	16
— Figura 4. Modificacions epigenètiques de la cromatina.	28
— Figura 5. Estructura d'un àcid hidroxàmic lligat a un model de HDAC.	31
— Figura 6. Estructura química de les molècules de la família dels àcids hidroxàmics.	36
— Figura 7. Esquema de la biogènesi ribosòmica. El gen del rRNA 47S inclou el promotor, la regió transcrita i el terminador.	38
— Figura 8. Model de la regulació del complex L5-L11-5S.	39
— Figura 9. Esquema dels principals dominis funcionals de p53 i les seves modificacions post-transcripcionals.	44
— Figura 10. Proteïnes implicades en la regulació de la interacció entre p53 i MDM2.	45
— Figura 11. Estructura i modalitat d'unió de la nutlina-3 a MDM2.	47

RESULTATS

— Figura 1.1: Caracterització de les línies cel·lulars de Neuroblastoma.	55
— Figura 2.1: El SAHA disminueix la viabilitat cel·lular de les diferents línies del neuroblastoma.	57
— Figura 2.2: El SAHA disminueix la viabilitat cel·lular de les diferents línies del neuroblastoma en funció del temps.	58
— Figura 2.3: Efecte del SAHA sobre l'expressió de proteïnes i de mRNA.	59
— Figura 2.4: Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi modificats pel tractament amb SAHA.	60
— Figura 2.5: Efecte de la inhibició de les caspases en cèl·lules de neuroblastoma tractades amb SAHA.	62
— Figura 2.6: La via de mTORC1 no està implicada en l'activació de l'autofàgia en resposta al tractament amb SAHA.	63
— Figura 2.7: L'autofàgia no té un paper determinant en la resposta al SAHA.	64

— Figura 2.8: Efecte de la sobreexpressió de N-Myc en cèl·lules SK-N-AS tractades amb SAHA.....	65
— Figura 2.9: Efecte de la silenciació de N-Myc en cèl·lules LA1-55n tractades amb SAHA.....	66
— Figura 2.10: Efecte de la regulació transcripcional de N-Myc en cèl·lules SH-EP/Tet21N tractades amb SAHA.....	67
— Figura 2.11: Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi modificats pel tractament amb SAHA en cèl·lules amb o sense sobreexpressió de N-Myc.....	68
— Figura 3.1: L'actinomicina D disminueix la viabilitat cel·lular en el neuroblastoma.....	71
— Figura 3.2: N-Myc augmenta la sensibilitat al tractament amb actinomicina D.....	72
— Figura 3.3: L'Efecte de l'actinomicina D en diferents línies de neuroblastoma depèn de l'estat de p53.....	73
— Figura 3.4: Efecte de la inhibició de les caspases en cèl·lules de neuroblastoma tractades amb actinomicina D.....	74
— Figura 3.5: Efecte de l'actinomicina D sobre el cicle cel·lular de cèl·lules de neuroblastoma.....	75
— Figura 4.1: Efecte de la nutlina-3 sobre la viabilitat cel·lular de les diferents línies de neuroblastoma.....	76
— Figura 4.2: N-Myc augmenta la sensibilitat al tractament amb nutlina-3.....	77
— Figura 4.3: L'Efecte de la nutlina-3 en diferents línies de neuroblastoma depèn de l'estat de p53.....	78
— Figura 4.4: Efecte de la inhibició de les caspases en cèl·lules SK-N-JD i LA1-55n tractades amb nutlina-3.....	79
— Figura 4.5: Efecte de la nutlina-3 sobre el cicle cel·lular de cèl·lules de neuroblastoma.....	80
— Figura 5.1: L'actinomicina D potencia l'efecte del SAHA.....	81
— Figura 5.2: La nutlina-3 potencia l'efecte del SAHA.....	82
— Figura 5.3: El tractament combinat de SAHA amb actinomicina D o nutlina-3 té un efecte sinèrgic sobre les cèl·lules de neuroblastoma.....	83
— Figura 5.4: El sinergisme del tractament combinat de SAHA amb actinomicina D o nutlina-3 no depèn de p53.....	84

MATERIAL I MÈTODES

— Figura 1. Isoblograma.....	109
------------------------------	-----

Introducció

El neuroblastoma

EL CÀNCER EN ELS NENS

Avui en dia el càncer és la principal malaltia causant de mortalitat infantil a Europa (Liu et al. 2012). A Espanya es registren aproximadament 900 casos anuals de càncers pediàtrics, entre els quals cal destacar els neuroblastomes (RNTI-SEHOP 2013). Aquesta neoplàsia és la quarta més diagnosticada en pacients infantils, presenta una mortalitat elevada respecte al nombre de casos diagnosticats, especialment en els tumors de risc elevat (RNTI-SEHOP 2013; Brodeur 2003) (figura 1). A causa de l'heterogeneïtat del seu decurs clínic, aquest tumor és avui en dia un repte complex per als oncòlegs i investigadors.

Els tumors pediàtrics són un grup heterogeni de neoplàsies de derivació multifactorial que afecten els individus de 0 a 14 anys. Tot i que representen el 2% de tots els casos de càncer als països occidentals, aquests difereixen dels tumors adults per diversos motius. En primer lloc, les classes de tumors més observades són diferents: mentre en els adults predominen els carcinomes, els nens presenten una prevalença de càncers hematològics i del sistema nerviós. Les neoplàsies pediàtriques també semblen necessitar menys defectes en els processos de regulació cel·lular per arribar a un estat cancerigen, possiblement perquè els teixits en desenvolupament es comporten de manera similar a les cèl·lules tumorals (Knudson 1992). Anàlisis de les mutacions i del patró d'edat d'incidència d'aquests tumors semblen indicar que són el resultat de defectes en l'embriogènesi i l'organogènesi, així com de canvis en el microambient on es troben, i no de la transformació oncogènica de les cèl·lules (Scotting et al. 2005). Per tant, podem considerar aquest grup de malalties com un desordre del programa de desenvolupament.

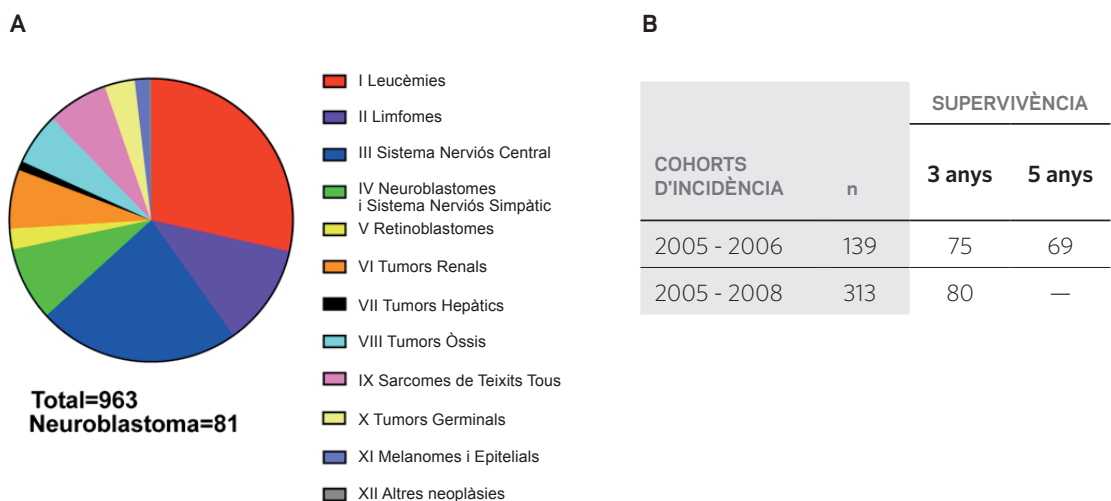


Figura 1. Estadístiques del Registre Nacional de Tumors Infantils 2005-2012. A) Nous casos de tumors infantils per grup diagnòstic registrats el 2012. B) Seguiment i supervivència a 3 i 5 anys del diagnòstic, per cohorts d'any d'incidència. Adaptat de RNTI-SEHOP 2013.

ORIGEN I DESENVOLUPAMENT DEL NEUROBLASTOMA

El neuroblastoma és un tumor sòlid de derivació embrional que sembla generar-se durant el període prenatal o a la primera infància (Maris 2010) a partir de cèl·lules de la cresta neural (De Preter et al. 2006). Aquesta és una estructura embrionària transitòria que es desenvolupa al mateix temps que el tub neural (figura 2), formada per cèl·lules multipotents que donaran origen als melanòcits, les cèl·lules de Schwann, l'esquelet cranifacial i al llinatge simpàtic-adrenal (Cheung & Dyer 2013).

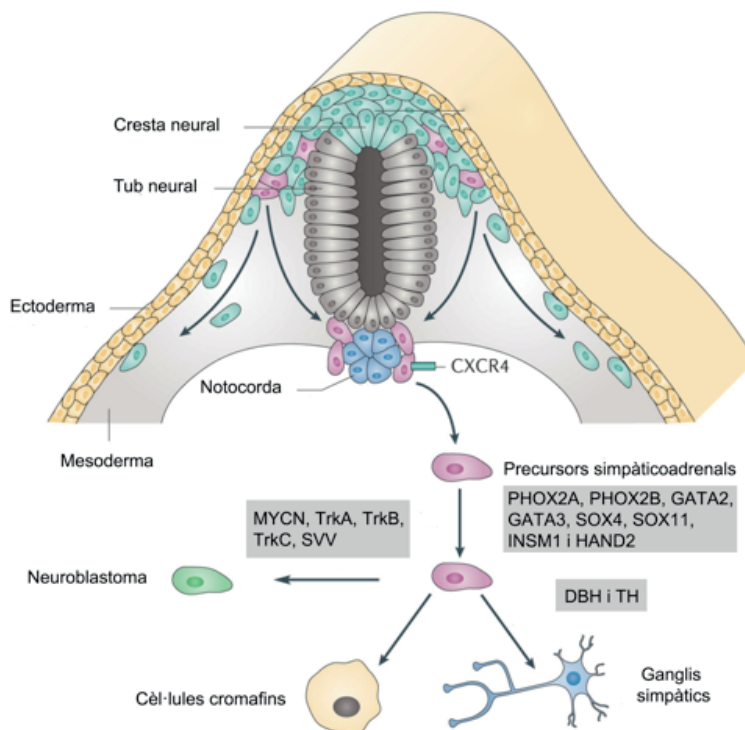


Figura 2. Maduració del llinatge simpàticoadrenal i desenvolupament del neuroblastoma. Adaptat de Cheung & Dyer 2013.

Es desconeix l'etiologia del neuroblastoma, però l'observació que els seus estadis clínics siguin un reflex de diferents estadis del desenvolupament del sistema nerviós autònom, fa pensar que la malaltia sigui deguda a errors en els mecanismes de control de la neurogènesi (Nakagawara & Ohira 2004). La incidència uniforme d'aquesta neoplàsia indica que els factors ambientals no juguen un rol important, sinó que el tumor podria originar-se per mutacions espontànies degudes a errors en la replicació del DNA (Brodeur 2003). Tot i que la major part dels tumors són esporàdics, un petit grup presenta una predisposició familiar que segueix un patró autosòmic-dominant associat a mutacions en els gens *PHOX2B*, *ALK* i en el locus 16p12-13 (Mosse et al. 2004; Mossé et al. 2008; Maris et al. 2002). Aquestes mutacions, així com altres associades al neuroblastoma, juguen un rol important en la manifestació clínica de la malaltia.

PRESENTACIÓ CLÍNICA I COMPORTAMENT BIOLÒGIC

Els neuroblastomes es diagnostiquen generalment quan un nen és portat al metge pels signes o símptomes que està tenint. Els símptomes primerencs de la malaltia són inespecífics, com diarrea, febre, hipertensió, taquicàrdia, enrogiment de la pell, sudació, malestar general o pèrdua de pes. Altres signes de la malaltia depenen principalment de la seu del tumor, i no apareixen fins que aquest no ha arribat a una mida crítica (American Cancer Society webpage). Tot i que es poden desenvolupar en qualsevol lloc del sistema nerviós simpàtic, en la major part dels casos de neuroblastoma, els tumors primaris es localitzen a la medul·la adrenal. Altres localitzacions comuns són el coll, la part superior del pit i l'espina (Maris 2010). Encara que existeix una superposició entre les diferents categories, podem dividir els neuroblastomes en tres escenaris clínics, segons el seu comportament:

NEUROBLASTOMA LOCOREGIONAL:

Al voltant del 40% dels pacients diagnosticats amb neuroblastoma presenten aquest tipus de tumor, l'aspecte del qual pot anar des d'una petita massa tumoral a un embalum gran i localment invasiu (Maris et al. 2007). Segons la seva localització, aquests tumors poden causar símptomes relacionats amb la compressió dels òrgans adjacents, encara que les síndromes paraneoplàsiques siguin poc freqüents. Entre els signes més característics relacionats amb aquest fenomen, es troben la síndrome de Horner pels tumors de la zona cervical i la debilitat motora juntament amb pèrdua de sensibilitat pels tumors propers a les arrels dels nervis de la medul·la espinal (Plantaz et al. 1996; De Bernardi B et al. 2001). Altres manifestacions clíniques comunes són la diarrea causada per la secreció del pèptid intestinal vasoactiu (Bourdeaut et al. 2009) i la síndrome mioclònica, caracteritzada per un moviment ràpid dels ulls, atàxia i falta de coordinació, probablement a causa d'un dany a nivell del cervellet (Matthay et al. 2005). Tot i que aquests tumors responen bé a la quimioteràpia i a l'eliminació quirúrgica del tumor, molts dels casos presenten dèficits neurològics com a seqüela.

MALALTIA METASTÀTICA:

Més de la meitat dels pacients presenten metàstasis a regions distants del tumor primari, com a la medul·la òssia, el fetge i els nòduls limfàtics. La invasió del sistema nerviós central no és comú, però pot succeir en un segon moment, degut a la progressió de la malaltia. Aquests nens presenten sovint una càrrega tumoral extensa que porta a la manifestació de múltiples símptomes fàcilment associables a la malaltia (Maris 2010). Entre els signes més comuns es troben les lesions subcutànies periorbitals (equimosi), degudes a l'alta freqüència de metàstasi a l'os de la conca ocular, i exoftàlmia o proptosi (Smith et al. 2010). Sovint, també es troben símptomes associats a la insuficiència medul·lar o hipertensió deguda a l'augment de la renina (Maris et al. 2007). Els tumors metastàtics solen ser els més agressius, a excepció del subgrup 4S.

Independentment de l'escenari clínic al qual pertanyen, els neuroblastomes presenten característiques biològiques úniques, principalment a causa de la seva derivació embrional. El comportament que més distingeix aquesta neoplàsia de les altres és la seva capacitat de

fer regressions espontàniament (Brodeur 2003). Aquest procés, àmpliament observat durant l'etapa embrionària, es caracteritza per la mort cel·lular massiva de les cèl·lules, abans que puguin finalitzar la seva diferenciació (Scotting et al. 2005). Tot i que aquesta característica va ser descrita per la primera vegada el 1971 (D'Angio et al. 1971), encara no es coneix el mecanisme biològic darrere d'aquest fenomen. La manca d'anomalies genètiques sembla ser un requisit previ per al seu acompliment (Scotting et al. 2005).

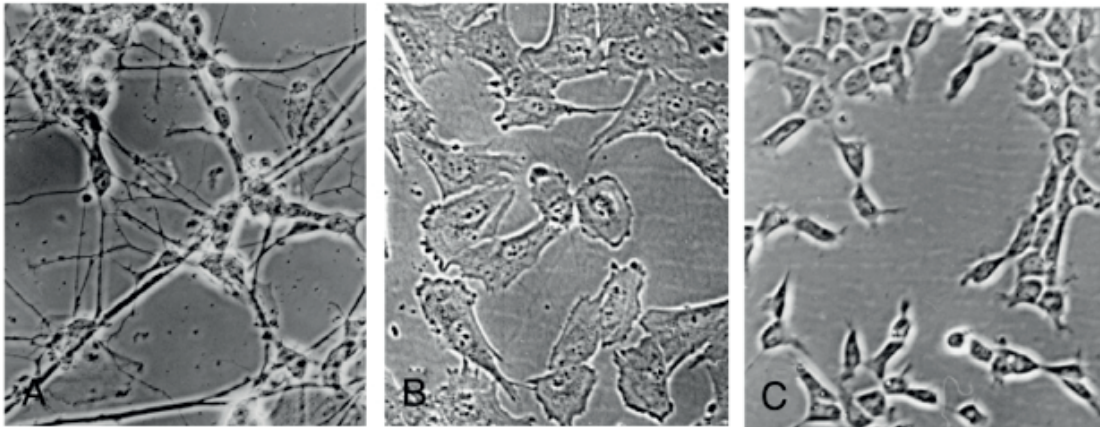


Figura 3. Micrografies de diferents tipus de neuroblastoma magnificades (135x). A) Línia SK-N-CH de tipus N. B) Línia SH-EPI de tipus S. C) Línia SK-N-JD de tipus I. Adaptat de Walton et al. 2004.

Un altre fenomen àmpliament documentat és la maduració del tumor en cèl·lules diferenciades (Shimada et al. 1984). Histològicament, els neuroblastomes estan formats per dues poblacions de cèl·lules: les primeres de derivació neuronal i les altres de llinatge glial (Shimada et al. 2001). Aquesta variabilitat es reproduïx *in vitro*, on es poden trobar 3 tipus cel·lulars diferents en cultiu: les cèl·lules de tipus N (neuroblàstic), amb aparença de neuroblasts immadurs; les de tipus S (adherents al substrat), que s'assemblen als precursors de les cèl·lules de Schwann i dels melanòcits; i les cèl·lules de tipus I, que mostren característiques intermèdies entre les N i les S (Walton et al. 2004) (figura 3). Recentment s'ha suggerit que el nivell de diferenciació en els neuroblastomes depèn del seu contingut de microRNAs: miR-124 i miR-506 estan sobreexpressats en les cèl·lules diferenciades de neuroblastoma, mentre l'expressió de miR-375, probablement induïda per N-Myc, inhibeix la diferenciació cap a un fenotip neuronal (Samaraweera et al. 2014; Zhao et al. 2014).

Les característiques fenotípiques del neuroblastoma poden ser associades a diferències a nivell molecular entre el neuroblastoma i els teixits sans en desenvolupament. És per tant fonamental conèixer els diferents factors moleculars que poden influir en el decurs de la malaltia.

PATOGÈNESI MOLECULAR

L'estudi dels mecanismes moleculars lligats al sistema nerviós ha conduït al descobriment d'anomalies en les vies encarregades de regular el seu desenvolupament. Molts d'aquests errors, que poden manifestar-se a nivell genètic, epigenètic o transcripcional, també estan relacionats amb els processos d'iniciació i manteniment del neuroblastoma (Cheung & Dyer 2013).

L'amplificació del gen *MYCN* és l'aberració genètica més comunament associada a una prognosi negativa, trobant-se en el 20% dels casos de neuroblastoma (Schwab et al. 1985; Maris 2010; Brodeur et al. 1984). El gen es localitza al cromosoma 2p24, tot i que l'amplificació ha sigut detectada per primera vegada en cossos extracromosòmics presents en les formes més agressives del neuroblastoma (Schwab et al. 1984). *MYCN* codifica per la proteïna N-Myc, que pertany a la família dels factors de transcripció Myc. Aquests activadors transcripcionals poden portar al creixement i a la proliferació cel·lular incontrolada si els seus gens es troben amplificats (Schwab et al. 1983). Com tots els membres d'aquesta família, N-Myc forma heterodimers amb la proteïna Max, activant la transcripció i promovent la supervivència i la proliferació cel·lular durant la formació del sistema nerviós (Wenzel et al. 1991; Cheung & Dyer 2013). El sentit de l'associació de l'amplificació del gen *MYCN* amb el fenotip agressiu de la malaltia no és ben conegut, però el seu rol d'inductor de la progressió del cicle cel·lular sembla ser-ne la causa (Schwab & Bishop 1988; Schweigerer et al. 1990).

Una altra anomalia genètica associada al fenotip agressiu del neuroblastoma és l'amplificació del braç llarg del cromosoma 17 (Brodeur 2003). La regió es troba amplificada en més de la meitat dels neuroblastomes (Plantaz et al. 1997), donant un avantatge selectiu lligat al nombre de còpies adquirides. S'ha proposat que el gen que codifica la survivina (*BIRC5*), un membre de les proteïnes inhibidores de l'apoptosi, confereix aquest efecte (Islam et al. 2000; Guha & Altieri 2009). El guany de còpies addicionals de 17q sol anar acompanyat de la pèrdua de 1p o 11q (Caron 1995; Attiyeh et al. 2005), que es troben mutats en un 25% i 22% dels tumors primaris respectivament, i que denoten també una prognosi negativa (Maris et al. 2007).

En els pacients d'edat inferior a 2 anys, la ploïdia és un altre marcador cromosòmic amb capacitat prognòstica (Brodeur 2003). L'index de DNA es pot separar en dues categories: hiperploïd (sovint triploïds) o propers a la diploïdia. Models genètics suggereixen que els errors en l'aparell mitòtic dels tumors menys agressius portarien a adquirir cromosomes sencers, mentre que els neuroblastomes malignes presenten defectes en l'estabilitat cromosòmica, generant translocacions i reordenaments en els cromosomes, sense alterar el seu nombre (Kaneko & Knudson 2000).

El receptor Alk, una tirosina-quinasa que es troba associada a molts tipus diferents de tumors, també presenta una forta correlació amb el neuroblastoma (Mariño-Enríquez & Dal Cin 2013). Canvis en el gen *ALK*, ja sigui en el seu nombre de còpies o mutacions que porten a l'activació constitutiva d'aquesta cinasa, es troben en aproximadament un 15% dels tumors primaris (Maris 2010). La mutació d'aquest gen és una de les anomalies genètiques més freqüents en el neuroblastoma familiar, juntament amb la pèrdua de funció del factor de transcripció codificat pel gen *PHOX2B* (Mossé et al. 2008; Mosse et al. 2004).

És interessant que la pèrdua de *TP53*, una de les mutacions més associades a tumors agressius, no és freqüent en els neuroblastomes primaris (Brodeur 2003). No obstant això, la inactivació funcional d'aquest factor de transcripció es troba sovint (Maris et al. 2007). S'han hipotetitzat diferents mecanismes de silenciament funcional de p53, com el segrest cito-

plasmàtic o la repressió de p14ARF (Van Maerken et al. 2009). Tot i així, la sobreexpressió o l'hiperfuncionament de MDM2 sembla ser el mecanisme més utilitzat en aquests tumors per inhibir la p53 (Petroni et al. 2012).

No només les modificacions genètiques tenen un poder predictiu. Pel que fa a les modificacions epigenètiques, s'ha demostrat que molts gens oncosupressors es troben metilats, i per tant inactius transcripcionalment en el neuroblastoma (Hoebeeck et al. 2009). Estudis realitzats en grups de pacients amb neuroblastomes de risc elevat suggereixen que el nivell de metilació està correlacionat amb un pitjor pronòstic (Alaminos et al. 2004).

En el cas de les modificacions a nivell transcripcional, s'han observat patrons anormals d'expressió en diferents tirosina quinases amb valor predictiu. Nivells elevats d'expressió de la TrkA, un receptor de membrana per a NGF, es correlacionen amb una prognosi favorable, fins i tot en tumors amb amplificació de *MYCN* (Nakagawara et al. 1993). Tanmateix, la TrkB, un altre receptor de la mateixa família, sembla estar associat a una elevada angiogènesi i a la resistència als tractaments (Eggert et al. 2000; Ho et al. 2002).

Les diferències en el patró d'expressió d'aquestes anomalies, així com d'altres factors prognòstics, han portat a la comunitat mèdica internacional a crear diferents sistemes de classificació per individualitzar la severitat de la malaltia i decidir l'enfocament de la teràpia.

CLASSIFICACIÓ DELS NEUROBLASTOMES

L'avaluació del perill que comporta el neuroblastoma depèn de diverses característiques clíniques i biològiques. S'han realitzat molts estudis amb la finalitat de desenvolupar un algoritme capaç de classificar els diferents tipus de tumor segons el risc que comporten al pacient. La major part d'aquests sistemes de classificació combinen variables com l'edat del pacient, els marcadors genètics i la histologia del tumor. A continuació s'expliquen els procediments de classificació més utilitzats en clínica a l'hora d'estratificar la severitat del neuroblastoma.

CLASSIFICACIÓ PATOLÒGICA INTERNACIONAL DEL NEUROBLASTOMA (INPC):

Basant-se en la classificació histopatològica de Shimada i col·laboradors (Shimada et al. 1984), la INPC estableix 4 categories de neuroblastoma segons les característiques morfològiques del tumor, la seva composició cel·lular, l'índex mitòtic i l'edat del pacient en el moment de la diagnosi. La taula 1 recapitula els paràmetres considerats en la segregació dels diferents grups (Shimada et al. 1999; Cheung & Cohn 2006).

▼ Taula 1: Esquema de classificació INPC

Adaptat de (Shimada et al. 1999)

CLASSIFICACIÓ INPC		CLASSIFICACIÓ SHIMADA ORIGINAL	GRUP PROGNÒSTIC
Neuroblastoma	Tumor schwannoide, poc estroma	Poc estroma	
FAVORABLE		Favorable	Favorable
<1,5 anys	Poc diferenciat o en vies de diferenciació i MKI baix o intermedi		
1,5-5 anys	En vies de diferenciació i MKI baix		
NO FAVORABLE		No favorable	No favorable
<1,5 anys	Tumor indiferenciat i/o MKI alt		
1,5-5 anys	Tumor indiferenciat o poc diferenciat i/o MKI intermedi o alt		
> 5 anys	Tots els tumors		
Ganglioneuroblastoma entremesclat	Tumor schwannoide, ric en estroma	Ric en estroma, entremesclat (favorable)	Favorable

Ganglioneuroma	Tumor schwannoide, majorment estroma	Ben diferenciat (favorable)	Favorable
En procés de maduració		Ganglioneuroma	
Madur			
Ganglioneuroblastoma nodular	Tumor schwannoide compost de tots els anteriors	Ric en estroma, nodular (no favorable)	No favorable

MKI: index mitòsi/cariorexi

Tot i que aquest sistema d'estratificació proporciona pistes sobre la severitat del tumor, no considera altres factors pronòstics importants, com aberracions cromosòmiques específiques o sobreexpressió de gens claus per al manteniment de l'estat indiferenciat. Altres sistemes de classificació han incorporat el sistema de Shimada, juntament amb altres anomalies característiques dels neuroblastomes, per obtenir una prognosi més exacta.

SISTEMA DE CLASSIFICACIÓ INTERNACIONAL DELS NEUROBLASTOMES (INSS):

Des de mitjans de la dècada dels 90, el mètode més utilitzat per classificar l'estadi i la progressió de la malaltia és el INSS (Brodeur et al. 1993). Aquest sistema va representar el primer pas cap a l'homogeneïtzació de l'estratificació de la malaltia a tot el món. L'INSS és un sistema d'anàlisi postoperatori que utilitza les dades obtingudes de la resecció quirúrgica per dividir els pacients en 5 estadis de risc, com se simplifica en la taula 2.

▼ Taula 2: Esquema de classificació INSS

GRUP PROGNÒSTIC	DESCRIPCIÓ
1	Tumor localitzat amb escissió macroscòpica, amb o sense malaltia residual. Nòduls limfàtics ipsilaterals negatius microscòpicament pel tumor.
2A	Tumor localitzat amb escissió macroscòpica incompleta; nòduls limfàtics ipsilaterals no adherents negatius microscòpicament pel tumor.
2B	Tumor localitzat ambo sense escissió macroscòpica completa, amb nòduls limfàtics ipsilaterals no adherents positius pel tumor. Els nòduls limfàtics contralaterals han de ser negatius pel tumor.
3	Tumor unilateral no operable infiltrat en la línia mitjana, amb o sense compromís dels nòduls limfàtics regionals; o tumor localitzat unilateral amb nòduls limfàtics contralaterals compromesos; o tumor en la línia mitjana amb extensió per infiltració (no operable) o per compromís dels nòduls limfàtics.

4	Qualsevol tumor primari amb disseminació a: nòduls limfàtics distants, os, medul·la ossia, fetge, pell i/o altres òrgans, a excepció dels tumors 4S.
4S	Tumor primari localitzat similiar als tipus 1, 2A o 2B, amb disseminació limitada a la pell, fetge i/o medul·la espinal. Limitat a infants de menys de 12 mesos. El compromís medul·lar hauria de ser mínim (<10%).

Malauradament, aquest sistema de separació dóna lloc a certa variabilitat en l'assignació de les diferents categories a causa de les diferències en l'estratègia quirúrgica en diferents països (Ikeda et al. 2002; Castleberry et al. 1994). Com a resultat dels avenços en el coneixement de la biologia i la genètica del neuroblastoma, una nova classificació que incorpora factors clínics i biològics addicionals a les categories de l'INSS va ser desenvolupada per facilitar l'assignació dels grups de risc.

Per facilitar la tasca de fer un pronòstic del decurs de la malaltia, diferents grups han col·laborat per elaborar una classificació que relacionés diferents característiques del tumor i del pacient amb la severitat de la prognosi.

SISTEMA DE CLASSIFICACIÓ INTERNACIONAL DELS NEUROBLASTOMES EN GRUPS DE RISC (INRGSS):

És un sistema de segregació preoperatòria que determina l'extensió de la malaltia mitjançant la presència o absència de metàstasis i factors de risc definits per tècniques d'imatge. L'anàlisi es pot realitzar abans de qualsevol tipus de tractament o cirurgia, detectant possibles factors de risc quirúrgics que podrien fer que l'extirpació total del tumor fos difícil o arriscada (Monclair et al. 2009; Cohn et al. 2009). El INRGSS simplifica la classificació en 4 estadis: L1, L2, M i MS (Taula 3). Avui en dia, la majoria dels protocols internacionals estan incorporant l'ús d'aquest sistema de classificació en l'assignació del risc i, en conseqüència, del tractament a utilitzar. Es preveu per tant la utilització de nomenclatures estandarditzades que contribuïran a uniformitzar l'estratificació del neuroblastoma i així facilitar la comparació dels assaigs clínics duts a terme en diferents parts del món.

▼ Taula 3: Esquema de classificació INRGSS

Adaptat de (Cohn et al. 2009)

ESTADI INRG	EDAT (mesos)	CATEGORIA HISTOLÒGICA	DIFERENCIACIÓ DEL TUMOR	MYCN	11Q MUTAT	PLOIDIA	GRUP DE RISC
L1/L2		GN en maduració, GNB mixt					A Molt baix
L1		Qualsevol menys GN en maduració i GNB mixt		NA A			B Molt baix K Elevat

L2	<18	Qualsevol menys GN en maduració i GNB mixt		NA	No		D Baix
					Sí		G Intermedi
	>18	GNB nodular, NB	En procés de diferenciació	NA	No		E Baix
				NA	Sí		H Intermedi
NA					H Intermedi		
		Poc diferenciat, no diferenciat	A			N Elevat	
M	<18			NA		H	F Baix
	<12			NA		D	I Intermedi
	12 a 18			NA		D	J Intermedi
	<18			A			O Alt
	>18						P Alt
MS	<18			NA	No		C Molt baix
					Sí		Q Alt
				A			R Alt

GN: ganglioneuroma; GNB: ganglioneuroblastoma; NA: No amplificat; A: amplificat; H: Hiperploide; D: Diploid

TRACTAMENT

Actualment, les tècniques terapèutiques per tractar el neuroblastoma inclouen la cirurgia, la quimioteràpia, la radioteràpia i la immunoteràpia. L'heterogeneïtat biològica del neuroblastoma ha portat a una diversificació en les estratègies terapèutiques, que depenen del grup de risc al qual pertany el tumor: la taula 4 resumeix els enfocaments terapèutics dels principals tipus de neuroblastoma segons la seva prognosi.

▼ Taula 4: Tractament i probabilitat de supervivència segons la categoria prognòstica

Adaptat de (Maris 2010)

VARIABLE	CATEGORIA PROGNÒSTICA*			
	Risc baix	Risc intermedi	Risc elevat	Estadi 4S
Localització del tumor	Tumor localitzat	Tumor localitzat amb invasió locoregional als nòduls limfàtics; metàstasi a la mèdul·la òssia en els nens >1 any	Metàstasi a la mèdul·la òssia i a l'os en nens >1 any	Metàstasi al fetge i la pell amb mínima invasió a la mèdul·la òssia en nens >1 any
Marcadors genètics	Guany de cromosomes sencers	Guany de cromosomes sencers	Aberracions cromosòmiques segmentades	Guany de cromosomes sencers
Tractament	Cirurgia**	Quimioteràpia moderada i cirurgia**	Quimioteràpia intensiva, cirurgia, radioteràpia en el tumor primari i els llocs de metàstasi resistents. Quimioteràpia mieloabativa amb transplantaments autòlegs de cèl·lules estaminals hematopoietiques; immunoteràpia amb agents anti-G ₂	Cures de suport***
Percentatge de supervivència	>98	90-95	40-50	>90

* Els pacients estan catalogats en grups pronòstics segons les pautes del Children's Oncology Group, on el nivell de risc està directament relacionat amb la possibilitat de morir degut a la malaltia. L'estadi 4S es considera separatament a causa del seu fenotip únic.

** La cirurgia es realitza per evitar lesions en les estructures circumdants i obtenir material per realitzar anàlisis moleculars. Molts tumors localitzats reverteixen sense necessitat de cirurgia.

*** Baixes dosis de quimioteràpia, radioteràpia o ambdues es mantenen si hi ha risc de mort a causa de les metàstasi hepàtiques o de una hepatomegàlia massiva.

Tot i que els pacients amb la malaltia de risc baix i intermedi, així com els casos que pertanyen a la categoria 4S, necessiten enfocaments terapèutics poc agressius per arribar a tasses de supervivència altes, la majoria dels casos diagnosticats són de risc elevat. El règim quimioterapèutic d'inducció més utilitzat en aquests casos inclou quatre cicles de tractament amb dosis altes de cisplatí i etopòsid alternats amb tres cicles de vincristina, doxorubicina i ciclofosfamida (Kushner et al. 1994). El topotecan ha estat inclòs recentment en la teràpia degut a la seva activitat antineoplàstica en casos de recidives (Simon et al. 2007), així com el tractament amb àcid retinoic en la fase de manteniment (Matthay et al. 2009). Malgrat la intensa teràpia doni una bona resposta inicial, reduint la dimensió del tumor i les cèl·lules metastàtiques circulants, un 50% dels pacients desenvolupen recidives amb pronòstic dolent (Maris 2010). Aquest fenomen depèn de la sensibilitat a la quimioteràpia que presenten els diferents fenotips cel·lulars que componen el tumor. Habitualment les cèl·lules altament proliferants (tipus N o I) són més proclius als agents apoptòtics i diferenciants, mentre que les de tipus S, que presenten una velocitat de duplicació més lenta, són més resistents (Chen et al. 2000; Mühlethaler-Mottet et al. 2008). Donada la capacitat que tenen totes les cèl·lules de neuroblastoma de desdiferenciar-se o transdiferenciar-se indistintament entre els tres fenotips, existeix sempre l'amenaça potencial que les cèl·lules resistents reconstitueixin el tumor amb factors de resistència a la teràpia (Ross et al. 1983). Cal encara desenvolupar una teràpia que elimini tots els tipus cel·lulars de neuroblastoma o que en previngui la seva desdiferenciació.

Un altre problema de les teràpies actuals és la manca de discerniment entre els teixits normals en desenvolupament i el teixit neoplàstic. L'efecte genotòxic dels fàrmacs utilitzats sobre els teixits immadurs crea seqüeles greus en els nens. Estudis sobre els efectes col·laterals del tractament demostren l'alta neurotoxicitat i nefrotoxicitat dels compostos, així com la pèrdua de la sensibilitat auditiva i de la funció de la medul·la òssia com a efectes secundaris (Ganeshan & Schor 2011; Ruggiero et al. 2013). El descobriment de noves drogues amb toxicitat inferior, així com d'una finestra de sensibilitat major entre el tumor i els teixits normals és necessari per millorar la qualitat del tractament.

Inhibidors de les histona desacetilases

ACETILACIÓ I CÀNCER

El càncer és generalment considerat una malaltia genètica, donada l'alta freqüència amb la qual es troben defectes en els gens que regulen l'homeòstasi cel·lular. No obstant això, les modificacions post-transcripcionals també juguen un rol clau en la iniciació dels processos tumorals, amb resultats diferents segons el context biològic (Dawson & Kouzarides 2012). Un dels mecanismes de regulació post-transcripcional més estudiat és l'acetilació de proteïnes, un procés dinàmic altament regulat per dos grups d'enzims: les histona acetiltransferases (HAT), encarregades de transferir un grup acetil del acetil coenzim A a un residu de lisina de la proteïna diana; i les histona desacetilades (HDAC), que compleixen la funció oposada, produint una lisina desacetilada i un ió acetat (Li & Zhu 2014). Aquestes últimes presenten una alta potencialitat com diana terapèutica per revertir modificacions epigenètiques associades al càncer.

LA FAMÍLIA DE LES HISTONA DESACETILASES

Actualment, s'han identificat divuit enzims d'aquesta família en els mamífers, amb funcions només parcialment redundants (Marks 2010).

Les HDAC se solen agrupar en quatre grups segons la seva estructura (Taula 5).

Els enzims de classe I es troben en el nucli de les cèl·lules de tots els teixits, a excepció de la HDAC3, que també es troba al citoplasma. Presenten una estructura simple, amb una subunitat catalítica molt conservada i un C-terminal curt, i normalment fan part de complexos multiproteics amb reguladors transcripcionals amb funció repressora, jugant un paper important en la silenciament de la transcripció (Li & Zhu 2014).

Les HDAC de classe II estan presents només en alguns teixits, on presenten funcions teixit-específiques. Les seves diferències estructurals i funcionals entre elles les divideixen en dos subgrups. El subgrup IIa està format per proteïnes més grans amb regions molt conservades d'enllaç per a factors de transcripció i xaperones que les transporten entre el nucli i el citoplasma. El subgrup IIb, en canvi, presenta proteïnes més petites amb una segona subunitat catalítica, encara que aquesta subunitat no sigui funcional en la HDAC10. Es localitzen principalment al citoplasma (Marks 2010).

La HDAC11, únic membre de la classe IV, presenta analogies estructurals amb ambdues classes I i II, sense mostrar una clara identitat per posar-la en un dels dos grups. Es troba principalment al nucli, on sembla regular la transcripció de IL-10, controlant així la immunitat mitjançada per les cèl·lules T (Villagra et al. 2009).

Les classes I i II són considerades les "HDAC clàssiques" i presenten una homologia estructural als enzims RPD3 i HDA1 del llevat, respectivament. Juntament amb l'únic membre de la classe IV, aquestes HDACs utilitzen el Zn^{2+} com a cofactor en les seves reaccions. Els enzims Zn^{2+} dependents presenten un lloc actiu amb una estructura semblant que consisteix en una butxaca cilíndrica formada per aminoàcids hidrofòbics i aromàtics. L'ió de zinc es troba al fons de la butxaca, on coordina juntament amb una molècula d'aigua, l'atac nucleòfil al carbonil de la lisina (Kristensen et al. 2009).

La classe III de HDACs, anomenades sirtuïnes, són enzims NAD^+ dependents anàlegs a la proteïna Sir2 del llevat (Bolden et al. 2006). Poden trobar-se en el nucli, el citoplasma i fins i tot en els mitocondris, i semblen estar relacionades principalment amb la regulació del metabolisme i la senescència (Finkel et al. 2009).

Tot i que s'anomenen histona desacetilases, anàlisis filogenètics han demostrat que les HDACs van sorgir abans de les histones en l'evolució (Marks 2010). De fet, entre les proteïnes modificades per les HDACs trobem també tant proteïnes estructurals no històniques de la cromatina com proteïnes citoplasmàtiques amb gran diversitat de funcions.

▼ Taula 5: Classificació de les HDACs

ENZIM	LOCALITZACIÓ	CO-FACTOR	HOMÒLEG EN LLEVAT
Classe I			
HDAC1	Nucli	Zn ²⁺	RPD3
HDAC2	Nucli	Zn ²⁺	RPD3
HDAC3	Nucli, citoplasma i membranes	Zn ²⁺	RPD3
HDAC8	Nucli	Zn ²⁺	RPD3
Classe IIa			
HDAC4	Nucli i citoplasma	Zn ²⁺	HDA1
HDAC5	Nucli i citoplasma	Zn ²⁺	HDA1
HDAC7	Nucli i citoplasma	Zn ²⁺	HDA1
HDAC9	Nucli i citoplasma	Zn ²⁺	HDA1
Classe IIb			
HDAC6	Nucli i citoplasma	Zn ²⁺	HDA1
HDAC10	Nucli i citoplasma	Zn ²⁺	HDA1
Classe III			
SIRT1	Nucli	NAD ⁺	SIR2
SIRT2	Citoplasma	NAD ⁺	SIR2
SIRT3	Nucli i mitocondris	NAD ⁺	SIR2
SIRT4	Mitocondris	NAD ⁺	SIR2
SIRT5	mitocondris	NAD ⁺	SIR2
SIRT6	Nucli	NAD ⁺	SIR2
SIRT7	Nucli	NAD ⁺	SIR2
Classe IV			
HDAC11	Nucli	Zn ²⁺	Presenta característiques de les classes I i II

SUBSTRATS DE LES HDACS

Les HDAC són principalment conegudes pel seu paper en la regulació de la transcripció. En els eucariotes, el material genètic es troba empaquetat en el nucli, en unitats fonamentals anomenades nucleosomes (figura 4). Cada nucleosoma conté un fil d'aproximadament 146 bases nitrogenades de DNA que s'emboliquen al voltant d'un octàmer format per dos parells de quatre proteïnes bàsiques (H2A, H2B, H3 i H4) anomenades histones (Kristensen et al. 2009). L'acetilació de les histones va ser el primer mecanisme epigenètic de regulació de la transcripció identificat, i és un dels més ben caracteritzats: l'acetilació per part de les HAT d'un residu de lisina en el seu domini N-terminal, neutralitza la càrrega negativa del DNA. En conseqüència, es relaxa l'estructura de la cromatina, permetent l'accés dels factors de transcripció. Les HDAC, en canvi, catalitzen la reacció oposada, portant a la condensació del DNA i a la repressió transcripcional (Bolden et al. 2006).

A més a més de les histones, es coneixen altres proteïnes que són dianes de les HDACs: estudis han demostrat que existeixen almenys 1750 proteïnes que presenten lisines acetilades, i que el 10% d'aquestes està subjecte a la regulació de les HDAC (Choudhary et al. 2009). Entre aquestes proteïnes trobem factors de transcripció i reguladors transcripcionals, xaperones, proteïnes estructurals i mediadors de la inflamació que, de manera directa o indirecta, estan relacionats amb el control de la proliferació, la diferenciació i la mort cel·lular (Marks & Xu 2009). Errors en la regulació d'aquestes proteïnes per part de les HDAC pot fàcilment induir a la transformació tumoral de la cèl·lula, portant al desenvolupament del càncer.

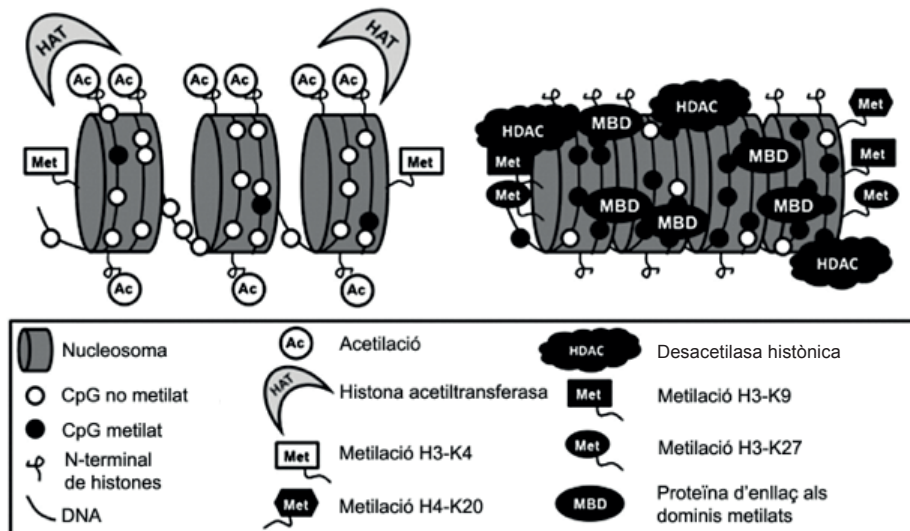


Figura 4. Modificacions epigenètiques de la cromatina. A l'esquerra s'esquematitza el promotor d'un gen actiu. L'acetilació de les codes històniques afavoreix l'estructura oberta de la cromatina, promovent l'enllaç del maquinari de transcripció. A la dreta s'il·lustra el promotor d'un gen silenciós. Les illes CpG metilades, juntament amb les MBDs, recluten les histona desacetilases. Aquestes treuen els grups acetil de les histones, tancant l'estructura cromatínica. Adaptat de Kristensen et al. 2009.

MECANISMES DE DESREGULACIÓ DE LES HDACS

Es coneixen tres mecanismes de desregulació de les HDACs que podrien portar al desenvolupament del càncer: les mutacions estructurals, els canvis en la seva expressió i els errors en el reclutament d'aquests enzims en promotors específics.

Pel que fa les mutacions estructurals, aquestes semblen tenir una representació marginal en processos de transformació tumoral. Avui en dia s'han identificat només dues mutacions estructurals carcinogèniques: la primera, en l'enzim HDAC2, està associada als carcinomes causats per inestabilitat dels microsatèl·lits, o al càncer colorectal (Ropero et al. 2006). La segona mutació ha estat identificada en la HDAC4 expressada en cèl·lules de càncer de mama i de còlon rectal (Sjoblom et al. 2006).

Les modificacions en el patró d'expressió de les HDACs estan molt més documentades. Les variacions en l'expressió de cadascuna d'aquestes proteïnes pot dependre del tipus de neoplàsia i el context cel·lular: la HDAC1 s'ha trobat sobreexpressada en el càncer de pròstata (Halkidou et al. 2004) i el càncer gàstric (Choi et al. 2001); la HDAC2 presenta sobreexpressions en els tumors colorectals (Zhu et al. 2004), cervicals (Huang et al. 2005) i pancreàtics (Fritsche et al. 2009); variacions en els nivells de HDAC3 semblen induir el càncer de còlon (Wilson et al. 2006) i també regular la transició epiteli-mesènquima (Mani & Barton 2011); mentre l'expressió de la HDAC8 està relacionada amb els neuroblastomes de pitjor prognosi (Oehme et al. 2009). No només les desacetilases de classe I mostren funcions associades al càncer: la desacetilasa de classe IIa HDAC5 té un rol important en la repressió de l'angiogènesi (Peixoto et al. 2012), mentre la HDAC6, que pertany a la classe IIb, està involucrada en els processos metastàtics a causa de la seva regulació de l'estabilitat del citoesquelet (Sakamoto & Aldana-Masangkay 2011).

Finalment, les aberracions en el reclutament de les HDACs es poden deure principalment a dos motius. El primer i millor documentat és l'associació d'aquests enzims amb proteïnes de fusió oncogèniques que interactuen amb el DNA, per exemple PML-RAR α , PLFZ-RAR α i AML1-ETO (Marks & Xu 2009). Aquestes proteïnes es formen per translocacions cromosòmiques, i indueixen la leucèmia promielítica (PML) i la leucèmia promielítica aguda (AML) mitjançant el reclutament de complexos repressors on trobem les HDACs (Lin et al. 2001). Els complexos reprimeixen constitutivament l'expressió de gens específics que regulen la diferenciació de les cèl·lules hematopoiètiques, afavorint la iniciació tumoral (Fenrick & Hiebert 1998). La segona modalitat de reclutament tumorigènic de les HDACs es deu a la sobreexpressió de repressors transcripcionals. Pasquallucci i col·laboradors van demostrar que la sobreexpressió de BCL-6, una mutació freqüent en els limfomes grans de cèl·lules B, portava a un reclutament aberrant de la HDAC2 i a la consegüent repressió de gens reguladors del creixement, com CDKN1A, que codifica la proteïna p21Waf1/Cip1 (Schneider et al. 2011).

Tot i que encara se sap poc sobre com les HDACs indueixen el desenvolupament tumoral, la seva correlació amb el càncer està àmpliament documentada. S'ha demostrat que la pèrdua global de l'acetilació de la lisina 16 en la histona H4, així com la desacetilació de la lisina 9 en la histona H3 de promotors que regulen gens oncosupressors poden contribuir al desenvolupament del càncer (Esteller 2007; Esteller 2008). Els nivells proteics de les HDACs solen ser més alts en les biòpsies de diferents teixits tumorals respecte a les biòpsies de teixits control (Weichert 2009), i experiments de silenciament de les HDACs han demostrat la disminució de la supervivència en diverses línies tumorals (Marks & Xu 2009).

HDACS EN EL NEUROBLASTOMA

Diferents membres de la família de les HDACs s'expressen de forma aberrant en el neuroblastoma (Witt et al. 2009). L'HDAC1 presenta nivells elevats de mRNA en aquest tumor, i la seva sobreexpressió sembla estar relacionada amb la resistència a diferents fàrmacs (Keshelava et al. 2007). HDAC1 té també un paper en l'oncogenicitat de N-Myc, amb qui forma un complex repressor pel gen de la TG2 (Liu et al. 2007). De la mateixa manera, N-Myc interactua amb l'HDAC2, inhibint transcripcionalment el gen codificant el miR-183 i, mantenint així, l'estat tumoral (Lodrini et al. 2013). L'HDAC6 promou la interacció entre la proteïna proapoptòtica Bax i Ku70. HDAC6 manté l'estat desacetilat de Ku70, que permet el segrest de Bax i la inactivació de l'apoptosi Bax-dependent (Subramanian et al. 2011). Una altra funció de la HDAC6 sembla ser la regulació de l'activitat de la txaperona HSP90, mantenint el seu estat desacetilat i promovent la protecció de factors oncogènics, com el de la p53mut (Li et al. 2011). HDAC8 també sembla tenir un rol important en el neuroblastoma, tot i que els seus mecanismes no han sigut encara identificats. HDAC8 està fortament associada amb la progressió del neuroblastoma, i la seva expressió és index d'un mal pronòstic (Oehme et al. 2009). Finalment, s'ha demostrat que la HDAC10 promou l'autofàgia protectora *in vitro*.

Aquesta correlació amb la transformació tumoral fa de les HDACs una interessant diana farmacològica. Amb aquest propòsit, diferents inhibidors d'aquests enzims han sigut desenvolupats amb la finalitat d'utilitzar-los com agents anticancerígens.

INHIBIDORS DE LES HDACS

Els inhibidors d'HDACs (HDIs) és un grup de fàrmacs que interfereixen amb l'activitat catalítica de les HDACs que utilitzen com a cofactor el zinc. Excloent excepcions contades, aquestes drogues presenten tres característiques estructurals comunes: una regió d'enllaç amb l'ió Zn^{2+} del centre actiu, una caputxa a la seva extremitat oposada que interacciona amb l'extrem del centre actiu, i una cadena hidrofòbica que connecta les dues regions anteriors. Tot i que els HDI de primera generació són molt hidrofòbics, els compostos més recents incorporen modificacions químiques que augmenten la seva solubilitat, millorant les seves propietats farmacocinètiques (Marks 2010).

La interacció directa dels HDIs amb el situ actiu impedeixen l'acció catalítica de les HDAC sobre les seves dianes, produint l'augment tant d'histones com de proteïnes citoplasmàtiques acetilades (figura 5). Aquesta variació en el patró d'acetilació pot afectar l'estabilitat, la localització o la capacitat de formar enllaços proteïna-proteïna, causant així tant modificacions funcionals com alteracions en la transcripció i l'estabilitat cromosòmica (Marks & Xu 2009). L'increment en l'estat d'acetilació de les histones promou l'alteració d'un 2-20% del transcriptoma, induint d'igual manera la repressió i l'expressió dels gens diana (Bolden et al. 2006). Pel que fa a les proteïnes no històniques, la seva acetilació pot modificar tant la regulació de l'expressió gènica (Bereshchenko et al. 2002) com altres funcions relacionades amb la carcinogènesi, entre elles la migració cel·lular, l'angiogènesi i la progressió del cicle cel·lular (Glozak et al. 2005).

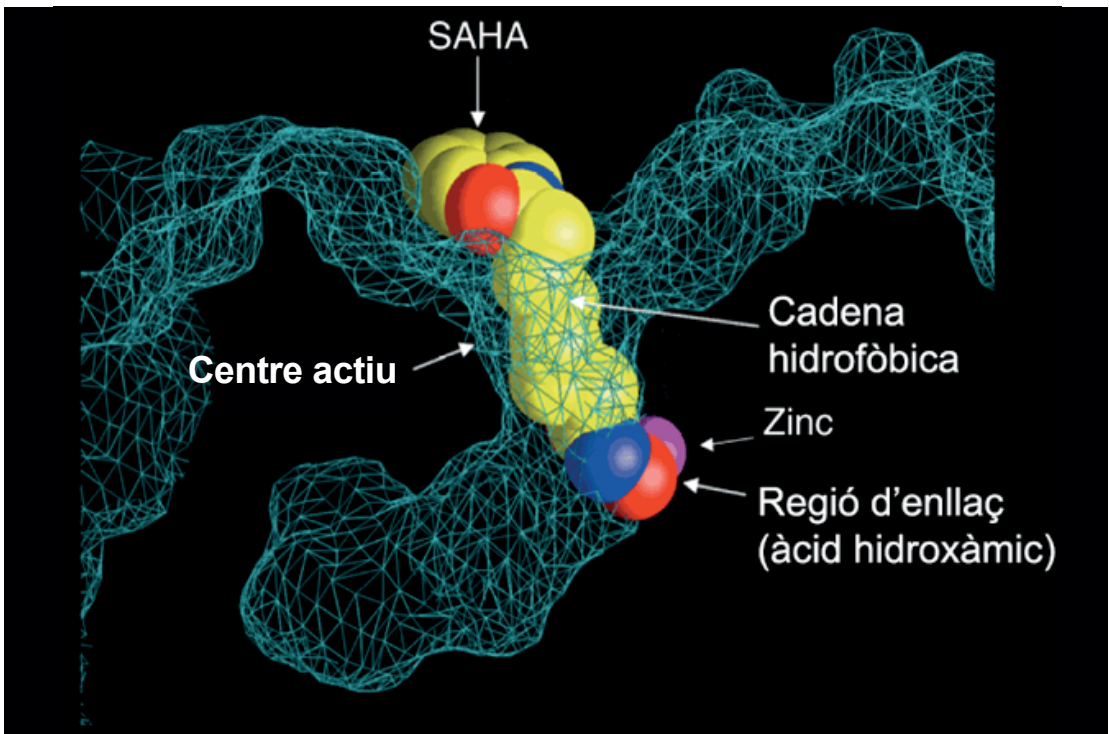


Figura 5. Estructura d'un àcid hidroxàmic lligat a un model de HDAC. Adaptat de Marks 2007

CLASSIFICACIÓ DELS HDI

Ja siguin d'origen natural o sintetitzats químicament, els HDIs poden classificar-se en 6 grups basant-se en les seves propietats químiques i estructurals: àcids grassos de cadena curta, àcids hidroxàmics, benzamides, pèptids cíclics, quetones electrofíliques i altres (Taula 6). Tant la potència de cadascú dels fàrmacs com la seva especificitat, els nivells de toxicitat i els efectes biològics que desencadenen semblen dependre de diferències estructurals específiques, i no del grup al qual pertanyen.

▼ Taula 6: Classificació d'alguns dels HDIs més utilitzats

CLASSE	COMPOST	HDAC DIANA
Àcid Hidroxàmic	TSA	Classes I i II
	SAHA	Classes I, II i IV
	Belinostat	Classes I, II i IV
	Oxamflatin	N/A
	Panobinostat	Classes I, II i IV
	CBHA	N/A
	Tubacina	Classe Iib
Pèptids cíclics	Romidepsina	HDAC 1 i 2
	Depsipèptid	Classe I
	Trapoxin A	Classe I i IIa
	Apicidina	HDAC1 i 3
	CHAPS	Classe I
Benzamides	Etinostat	HDAC1, 2 i 3
	Tacedinalina	N/A
Àcids alifàtics	Fenibutirrat	Classe I i IIa
	VPA	Classe I i IIa
	Pivanex	N/A
	Baceca	Classe I
	Savicol	N/A
Quetones electrofíliques	Trifluorometilquetona	N/A
Altres	Depudecina	Classe I, II

EFECTES BIOLÒGICS DELS HDI

Els efectes induïts pels HDIs són una conseqüència d'alteracions en els patrons d'acetilació. Aquests poden variar depenent del fàrmac emprat, del temps d'exposició i de les cèl·lules tractades (Ungerstedt et al. 2005). Entre les moltes accions descrites pels HDIs podem trobar:

ATURADA DEL CICLE CEL·LULAR:

Els HDIs van ser descoberts per la seva capacitat d'induir la diferenciació, un efecte que va associat a l'aturada del cicle cel·lular en fase G1/S (Marks et al. 2000). El bloqueig en fase G1 es deu principalment a la transcripció p53-independent de p21WAF1/CIP1, induïda per l'acetilació del seu promotor (Richon et al. 2000) i al decrement de proteïnes amb acció repressora sobre el seu promotor (Li & Wu 2004). Els HDIs també promouen l'augment de l'inhibidor del cicle cel·lular p27Kip1, tot i que la pujada dels nivells proteïcs sembla dependre de mecanismes post-transcripcionals (Chen & Faller 2005; Uehara et al. 2012). A més a més de l'increment dels nivells d'aquests inhibidors de les CDKs, els HDIs també induïxen la repressió de la ciclina D1 (Kim et al. 1999). Totes aquestes modificacions porten a la hipofosforilació de la pRb, bloquejant l'activitat transcripcional d'E2F1, un regulador de nombrosos gens implicats en la progressió de la fase G1 i la transició G1/S (Polager & Ginsberg 2009). L'activació del punt de control G1/S pot ser també induïda per mecanismes independents del nivell de fosforilació de pRB. Un exemple és la repressió transcripcional d'alguns gens involucrats en la síntesi del DNA, com a la CTP sintasa o la timidilat sintasa (Glaser et al. 2003). La disminució d'aquests enzims inhibeix la progressió a la fase S del cicle cel·lular, contribuint així a l'aturada del cicle cel·lular en fase G1/S.

S'ha demostrat que a més del punt de control G1/S, els HDIs també poden activar el punt de control G2/M, tot i que a concentracions més elevades dels respectius HDIs (Marks & Xu 2009; Qiu et al. 2000). Aquesta activació sembla ser regulada tant a nivell d'anomalies del fus mitòtic, degudes a la degradació de les quinases Aurora A i B (Cha et al. 2009; Ishii et al. 2008), com a alteracions de l'abundància relativa de les ciclines E i A (Sambucetti et al. 1999; Kim et al. 1999).

INDUCCIÓ DE L'APOPTOSI:

Un gran nombre d'estudis independents corrobora el rol de l'apoptosi en la mort cel·lular induïda pels HDIs, ja sigui per via extrínseca o intrínseca. Pel que fa l'apoptosi extrínseca, els HDIs regulen l'expressió tant dels membres de la superfamília de receptors TNF com dels seus lligants en línies tumorals, però no en cèl·lules normals (Bolden et al. 2006). La necessitat d'activar la via dels receptors de mort és controvertida: només un estudi sembla indicar que juga un rol important en l'apoptosi induïda pels HDIs (Insinga et al. 2005). La via intrínseca, en canvi, sembla ser la causa principal de mort cel·lular. El mecanisme darrere l'activació de l'apoptosi mitocondrial no està del tot clar. Molts estudis han proposat que els HDIs alteren l'equilibri entre els gens pro i antiapoptòtics, provocant la resposta apoptòtica (Marks & Xu 2009). Una altra hipòtesi sembla afavorir una inducció més directa, desencadenada pel punt de control del dany al DNA (Marks 2010). Aquesta via de transducció pot ser activada mitjan-

çant la silenciació transcripcional de proteïnes implicades en la reparació del DNA, o bé a través del dany oxidatiu causat per l'increment dels nivells d'espècies reactives d'oxigen (ROS) en resposta a la disminució dels enzims antioxidants (Frew et al. 2009). Cal destacar que els efectes proapoptòtics dels HDIs poden ser activats de manera dependent o independent de p53, probablement dependent del context cel·lular (Li & Zhu 2014).

ACTIVACIÓ DE L'AUTOFÀGIA:

L'autofàgia és un procés de autodegradació dels components cel·lulars innecessaris o disfuncionals que utilitza el maquinari lisosomal (He & Klionsky 2009). El paper que juga aquest procés en el desenvolupament del càncer és controvertit, amb evidències que indiquen tant el seu rol tumorigènic com de oncosupressor (White & DiPaola 2009). S'ha demostrat que diferents HDIs indueixen l'activació d'aquesta via (Shao et al. 2004), possiblement mitjançant la inhibició de l'HDAC1 (Oh et al. 2008), l'acetilació de ATG3 (Yi et al. 2012), o l'activació de mTOR (Gammoh et al. 2012).

INESTABILITAT CROMOSÒMICA:

Els HDIs provoquen l'acetilació aberrant de les histones que es localitzen en la regió pericèntrica de l'heterocromatina, causant la pèrdua de la interacció amb les proteïnes que s'associen amb la cromatina del centròmer (Robbins et al. 2005). També s'ha documentat la inducció de la degradació de les proteïnes Aurora A i B, dues quinases fonamentals per a la progressió de la prometafase (Zhang et al. 2008; Cha et al. 2009). En ambdós casos, s'ha observat que el tractament amb HDIs porta a una mitosi aberrant i a la mort cel·lular per catàstrofe mitòtica.

INHIBICIÓ DE L'ANGIOGÈNESI:

La formació de nous vasos és essencial per proveir nutrients i facilitar el creixement tumoral. Els HDIs bloquegen l'angiogènesi mitjançant la baixada de la transcripció de factors que estimulen aquest procés, com a HIF-1 α , bFGF, TIE2, eNOS i VEGF (Bolden et al. 2006). Les funcions dels HDIs no es limiten només a la repressió transcripcional. HIF-1 α , un dels principals factors transcripcionals darrera l'angiogènesi, és interromput també amb mecanismes postraduccional. La inhibició de l'activitat catalítica de HDAC4 i HDAC6 en resposta als HDIs porta a un augment en l'acetilació de la K532 de HIF-1 α , marcant la proteïna per la degradació (Qian et al. 2006). La HDAC7 també regula els processos proangiogènics, formant un complex amb HIF-1 α per augmentar la seva capacitat transcripcional (Kato et al. 2004). La inhibició d'aquest enzim podria portar a una disminució de l'activació transcripcional de HIF-1 α .

INHIBICIÓ DE LA MIGRACIÓ CEL·LULAR:

S'ha demostrat que els HDIs incrementen la transcripció dels gens supressors de metàstasis al mateix temps que disminueixen els nivells de factors prometastàtics (Marks 2010). En particular, l'increment de E-caderina i la baixada del col·lagen de tipus I supprimeixen la transició epiteli-mesènquima (EMT) induïda per la TGF-B en diferents tumors (Yoshikawa et al. 2007; Kaimori et al. 2010).

EFACTES IMMUNOLÒGICS:

La resposta immunitària antitumoral pot incentivar-se amb tres modalitats: modificant l'immunogenicitat de les cèl·lules tumorals per fer-les dianes més atractives, alterant l'activitat de les cèl·lules immunitàries, o incrementant la producció de citoquines. Els canvis induïts per les HDIs en el transcriptoma de cèl·lules tumorals, però no de cèl·lules sanes, porta a la transcripció del complex major d'histocompatibilitat (MHC) de classe I, així com a l'increment de proteïnes co-estimulatòries com a CD40, CD80, CD86, ICAM1, MICA, MICB. Aquestes proteïnes interactuen amb els immunoreceptors en la superfície de les cèl·lules T i NK, fomentant així la resposta immunitària (Bolden et al. 2006).

Malgrat els resultats prometedors tant en teràpies combinades com en protocols en els quals s'utilitza com únic agent terapèutic, la falta d'informació sobre els mecanismes exactes darrere dels efectes biològics dels HDIs fa que no puguin aconseguir plenament el seu màxim potencial com agents antineoplàsics. Tot i així, dues drogues han aconseguit ser aprovades per la FDA com teràpia per al tractament de neoplàsies hematològiques: la romidepsina i el SAHA (Bose et al. 2014).

SAHA

L'àcid hidroxàmic de suberoilànilda (SAHA) és inhibidor antagonista no selectiu de les HDACs de classe I, II i IV, que indueix l'aturada del cicle cel·lular i la mort de diferents tipus de cèl·lules tumorals a concentracions de l'ordre micromolar (Marks 2007; Li & Zhu 2014). Els mecanismes darrere la seva acció antitumoral no s'han comprès del tot, però és molt probable que tant els seus efectes sobre l'expressió gènica com la regulació de proteïnes citosòliques juguin un paper important.

El SAHA és, juntament amb la romidepsina, l'únic àcid hidroxàmic que ha sigut aprovat per la FDA com a teràpia contra la leucèmia cutània de cèl·lules T (Mann et al. 2007). Malgrat que s'hagi demostrat la seva capacitat clínica en els càncers hematològics, els tumors sòlids presenten més reticència a respondre favorablement en els assajos clínics, donant resultats favorables principalment en tumors no tractats prèviament (Slingerland et al. 2013). Un dels problemes principals és la seva toxicitat, tot i que normalment és més baixa que la de molts agents quimioterapèutics utilitzats actualment en clínica (Tan et al. 2010). Entre els efectes col·laterals més comuns es troben nàusees, vòmit, diarrea, anorèxia i fatiga. Malgrat l'aparició d'aquests efectes secundaris, al interrompre la teràpia solen ser reversibles (Marks 2010). Un altre problema que sorgeix és la resistència a la teràpia. Les vies subjacents no han sigut del tot elucidades, per tant la identificació dels marcadors de resistència podria portar a una millor explotació d'aquesta droga (Fantin & Richon 2007).

Una manera per eludir aquests problemes i aprofitar el potencial oncosupressor del SAHA podria ser el seu ús en teràpies combinades amb altres fàrmacs. Nombrosos estudis preclínic i assaigs clínics demostren els avantatges d'utilitzar el SAHA en combinació amb agents terapèutics amb les més variades funcions (Bots & Johnstone 2009).

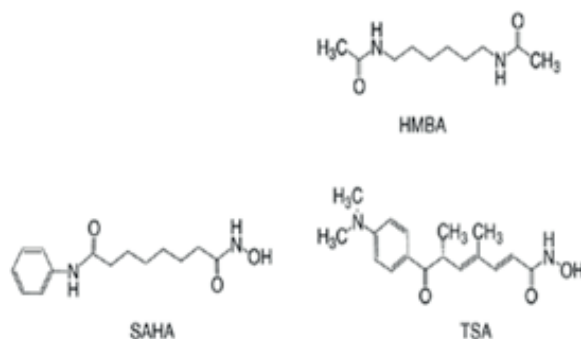


Figura 6. Estructura química de algunes molècules de la família dels àcids hidroxàmics. HNBA: bisacetamida hexametilene; SAHA: àcid hidroxàmic de suberoilànilda; TSA: tricostatina A. Adaptat de Marks, 2007.

L'estrès ribosòmic

BIOGÈNESI DELS RIBOSOMES

El ribosoma dels eucariotes és un complex ribonucliproteic format per dues subunitats: la subunitat 60S està formada pels rRNA 25S, 5,8S i 5S, més 46 proteïnes ribosòmiques (RPs); i la subunitat 40S està composta pel rRNA 18S i 33 RPs (Ben-Shem et al. 2010). La seva biogènesi és una operació extraordinàriament complexa que coordina múltiples processos, separats espacialment i regulats per mecanismes diferents (figura 7).

SÍNTESI I PROCESSAMENT DEL rRNA:

La biogènesi dels ribosomes comença amb la transcripció en el nuclèol d'un precursor de rRNA comú per les dues subunitats. La producció d'aquesta molècula requereix la formació d'un complex de preiniciació (PIC) en el promotor d'una de les nombroses còpies de rDNA, i la conseqüent transcripció del rRNA per la RNA polimerasa I (Quin et al. 2014). A mesura que es transcriu, al voltant de 70 petites ribonucleoproteïnes nucleolars (snoRNPs) modifiquen covalentment el rRNA mitjançant metilacions i pseudouridilacions (Montanaro et al. 2012). Un dels esdeveniments clau de la maduració del rRNA és l'escissió del rRNA en el seu lloc A2, que pot ocórrer durant la transcripció o després que aquesta s'hagi completat. Aquest tall separa el filament de rRNA 20S, que anirà a formar part de la subunitat 40S, del rRNA 27S, que donarà lloc a dues de les tres espècies de rRNA de la subunitat 60S. Abans de sortir del nucli, el rRNA 27S serà tallat encara una altra vegada, generant els rRNAs 25S i 7S. Aquest últim, així com el 20S de la subunitat ribosòmica petita, acabaran el seu processament al citoplasma per convertir-se, respectivament, en les formes de rRNA madur 5.8S i 18S (Kressler et al. 2010).

Pel que fa el rRNA 5S, aquest és transcrit en el nucleoplasma per la RNA polimerasa III i, successivament, és importat al nuclèol per integrar-se en la subunitat pre-60S (Montanaro et al. 2012).

SÍNTESI DE LES PROTEÏNES RIBOSÒMIQUES:

El mRNA de les RPs és transcrit per la RNA polimerasa II en el nucli i, successivament, traduït en el citoplasma pels ribosomes. Una vegada acabada la traducció proteica, les RPs són importades al nucli, on s'uniran amb el rRNA durant la seva transcripció (Bursac et al. 2012). Estudis han demostrat que les proteïnes ribosòmiques són produïdes en quantitats superiors a les necessàries i que l'equilibri dels diferents components ribosòmics és mantingut gràcies a la degradació de les proteïnes sobrants per part del proteosoma (Lam et al. 2007).

FORMACIÓ I MADURACIÓ DE LES SUBUNITATS 60S I 40S:

Tot i que encara el mecanisme exacte d'aquest procés no està del tot definit, la formació d'ambdues subunitats ribosòmiques comença en el nuclèol, simultàniament a la transcripció del rRNA 47S (Thomson et al. 2013). Aquest procés es caracteritza per la reducció gradual dels factors associats a les pre-subunitats ribosòmiques, a mesura que aquestes es traslladen des del nuclèol al citoplasma. En aquest compartiment, les dues partícules preribosòmiques continuaran la seva maduració, que acabarà una vegada que tots els factors de maduració i d'exportació s'hagin dissociat de les dues subunitats (Kressler et al. 2010).

La importància dels ribosomes en el manteniment i la proliferació de les cèl·lules fa que s'inverteixi una enorme quantitat d'energia en la seva producció. Més de 150 proteïnes no ribosòmiques i al voltant de 70 snoRNAs estan involucrats en la producció d'aquests orgànuls citoplasmàtics (Montanaro et al. 2012). Per tal de que aquest procés sigui regulat segons les necessitats de la cèl·lula, així com per garantir el seu correcte funcionament, s'ha desenvolupat un mecanisme de control que identifica els possibles errors i prevé l'aparició d'estats patològics.

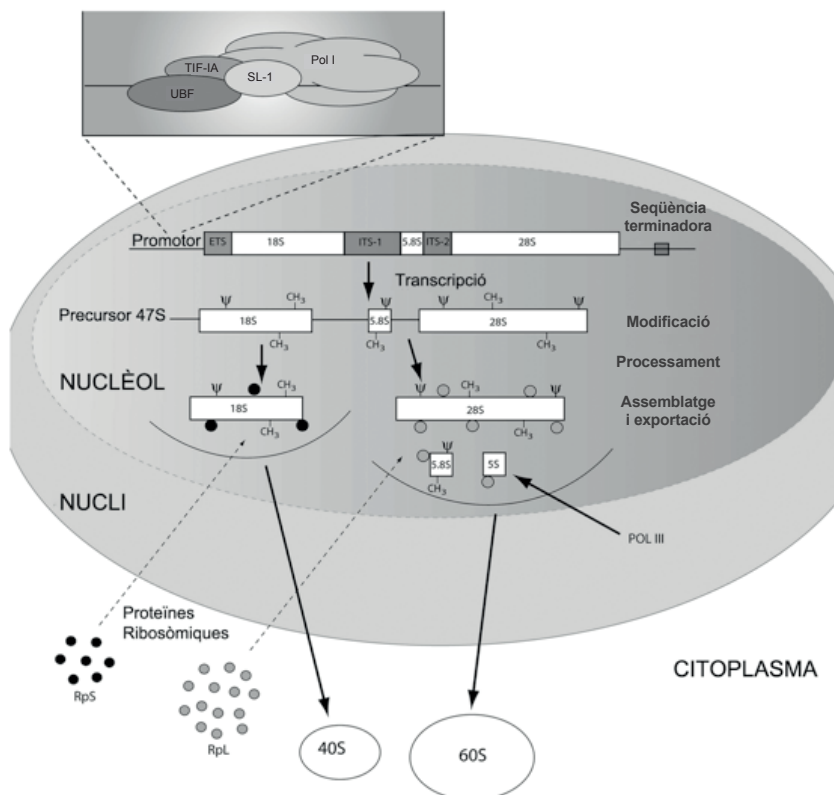


Figura 7. Esquema de la biogènesi ribosòmica. El gen codificant pel rRNA 47S inclou el promotor, la regió transcrita i la seqüència terminadora. Els factors de transcripció basals que s'uneixen al promotor necessaris per a la transcripció del gen es troben en la part superior de la figura. ETS: regió transcrita externa; ITS: regió transcrita interna. Després de la transcripció, el precursor rRNA 47S és modificat i processat, i el rRNA 18S madur és assemblat en la subunitat 40S del ribosoma. Els rRNA 5.8S, 18S, juntament amb el rRNA 5S, transcrit per la RNA polimerasa III, s'assemblen a la subunitat 60S. Les subunitats parcialment completes s'exporten al citoplasma per constituir els ribosomes madurs. Adaptat de Montanaro et al. 2012.

PUNT DE CONTROL DE L'ESTRÈS RIBOSÒMIC

En condicions fisiològiques, els nivells de p53 han de mantenir-se baixos per portar endavant el cicle cel·lular. Un dels principals mecanismes per conservar aquesta condició és la degradació proteosòmica de p53, induïda mitjançant l'addició de ubiquïtines del seu C-terminal. Tot i que s'han descobert molts enzims ubiquïtina lligasa capaços d'actuar sobre p53, el principal i més estudiat és el MDM2. Breument, la funció E3 ubiquïtina lligasa de MDM2 s'activa quan aquest enzim dimeritza amb MDMX, una altra proteïna de la mateixa família però sense activitat catalítica. El complex MDM2/MDMX s'uneix a p53 i en promou l'exportació nuclear i la degradació proteosòmica, afegint-ne una o més ubiquïtines (Hock & Vousden 2014). En condicions d'estrès cel·lular, diferents mecanismes de control poden bloquejar aquesta interacció, estabilitzant la p53. L'augment dels nivells de p53 porta a la transcripció de gens que indueixen l'aturada del cicle cel·lular o, si el dany és massa greu, a la mort de la cèl·lula (Carvajal & Manfredi 2013).

Els primers indicis de que la biogènesi dels ribosomes controla el cicle cel·lular, van sorgir dels estudis realitzats en el laboratori del Dr. George Thomas. Utilitzant un model murí, es va demostrar que l'eliminació induïble del gen *RPS6*, causava l'aturada de la proliferació cel·lular en el fetge després d'una hepatectomia parcial (Volarevic et al. 2000). Successivament, diferents estudis van demostrar l'existència d'un punt de control que relacionava l'activació de p53 amb l'estrès ribosòmic. Aquest mecanisme responia a variacions en la producció de diferents components dels ribosomes (Pestov et al. 2001; Sulic et al. 2005), o al bloqueig del tràfic de les proteïnes ribosòmiques entre el citoplasma i el nucli (Golomb et al. 2012).

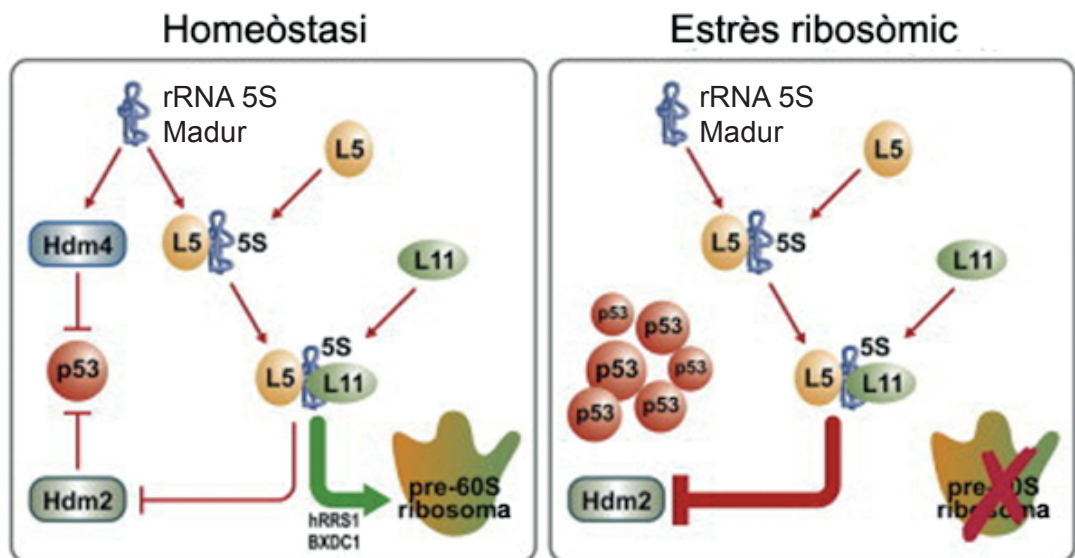


Figura 8. Model de la regulació del complex L5/L11/5S. Adaptat de Donati et al. 2013.

Avui en dia no hi ha un model únic i irrefutable que expliqui l'activació del punt de control de l'estrès ribosòmic. Un dels models més encertats proposa l'existència d'un complex pre-ribosòmic "guardià", format per les proteïnes RPL5 i RPL11, i el rRNA 5S (figura 8). En situacions d'homeòstasi proliferativa, aquest complex proteic s'uneix amb les altres RPs corresponents, per formar la subunitat 60S. Variacions en l'estequiometria dels diferents components del ribosoma porta a l'activació del punt de control de l'estrès ribosòmic. Aquestes alteracions indueixen al complex RPL5/RPL11/5S a interactuar amb MDM2, ja sigui en el citoplasma o en el nucli, inhibint la seva funció de E3 ubiquitina lligasa sobre p53 (Donati et al. 2013).

Altres estudis han demostrat que la interacció de RPL11 amb MDM2 indueix l'ubiquitinació i la degradació de MDMX. Aquesta degradació és necessària per a la total activació de p53 (Gilkes et al. 2006).

El punt de control de l'estrès ribosòmic també s'activa de manera independent a p53. En cèl·lules sense una proteïna p53 funcional, la inhibició de la biogènesi ribosòmica indueix l'aturada del cycle cel·lular. El motiu d'aquest fenomen sembla estar lligat a la funció estabilitzadora de MDM2 sobre el factor de transcripció E2F1, una proteïna clau en la progressió del cycle cel·lular. La interacció entre RPL11 i MDM2 impedeix a aquesta última d'estabilitzar E2F1, disminuint els nivells cel·lulars d'aquesta proteïna (Donati et al. 2011).

L'estrès ribosòmic també regula negativament la proliferació mitjançant un altre factor de transcripció clau del cycle cel·lular: c-Myc. En resposta a l'estrès ribosòmic, els nivells citoplasmàtics de RPL11 augmenten (Zhang & Lu 2009). La presència de RPL11 en el citoplasma porta a la seva interacció amb el 3'-UTR del mRNA de c-Myc. RPL11 interactua també amb el complex miR-24/miRISC, que inhibeix la traducció de nombrosos mRNAs, entre els quals es troba el mRNA de c-Myc (Lal et al. 2009). Així doncs, RPL11 afavoreix el reclutament del complex miR-24/miRISC al 3'-UTR del mRNA de c-Myc, provocant la reducció dels nivells proteics de c-Myc (Challagundla et al. 2011).

En conclusió, la biogènesi ribosòmica és un mecanisme finament regulat per la cèl·lula de manera dependent i independent de p53. La importància d'aquest procés pel creixement i la proliferació cel·lular fa que sigui sovint diana de mutacions en les cèl·lules canceroses.

LA BIOGÈNESI RIBOSÒMICA EN EL DESENVOLUPAMENT DEL CÀNCER

El primer indici que la biogènesi dels ribosomes podia tenir una correlació amb el càncer va ser l'observació que diferents tipus de cèl·lules tumorals presentaven un nombre major de nuclèols, o bé un nuclèol més gran (Quin et al. 2014). El nombre i la mida del nuclèol estan directament relacionats amb la biogènesi ribosòmica; per tant, s'ha formulat la hipòtesi que aquest mecanisme es veuria potenciat en el desenvolupament tumoral. Diferents estudis van il·lustrar com estadis cel·lulars preneoplàsics presentaven nuclèols hipertròfics i una taxa de biogènesi ribosòmica més elevada en comparació a les cèl·lules sanes (Montanaro et al. 2012).

L'increment en la producció de ribosomes en les cèl·lules tumorals no sembla ser degut a mutacions de l'aparat transcripcional (Bywater et al. 2013), sinó a mutacions en els mateixos oncògens o oncosupressors que controlen el cicle cel·lular. El creixement de la cèl·lula és necessari per mantenir les seves dimensions després de la divisió (Thomas 2000), per tant no és d'estranyar que els mateixos factors regulin ambdós mecanismes. Moltes proteïnes implicades en la regulació del cicle cel·lular han estat associades a la inducció o repressió de la biogènesi ribosòmica (Grummt 2010; Quin et al. 2014). En particular, la família de factors de transcripció Myc sembla ser un dels factors clau involucrats en aquest procés. Aquestes proteïnes es troben sovint sobreexpressades en teixits tumorals (Kinzler et al. 1986), a causa de la seva capacitat de regular factors que indueixen la proliferació (Patel et al. 2004) i de controlar la transcripció de les tres RNA polimerases (Boon et al. 2001; van Riggelen et al. 2010). Recentment, dos estudis independents van demostrar que gran part del poder tumorigènic de Myc és deu a la seva capacitat de potenciar la biogènesi ribosòmica. Barna i col·laboradors van creuar ratolins heterozigots per *RPL24* amb transgènics E μ -Myc, els quals desenvolupaven limfomes de cèl·lules B a causa de la sobreexpressió del gen de c-Myc. Els ratolins presentaven un retard en l'inici del tumor respecte als ratolins que presentaven ambdues còpies de *RPL24* (Barna et al. 2008). Per altra banda, Macias i col·laboradors van demostrar que la pèrdua de la interacció entre MDM2 i les proteïnes ribosòmiques RPL5 i RPL11 reduïa dràsticament els nivells de p53 i accelerava el desenvolupament de limfoma en ratolins E μ -Myc (Macias et al. 2010). Així doncs, la biogènesi ribosòmica sembla tenir un rol important en el desenvolupament tumoral, almenys pels tumors dependents de Myc. Considerant que les proteïnes de la família de Myc es troben sobreexpressades aproximadament en el cinquanta per cent dels tumors (Dang 2012), l'increment de la producció de ribosomes no ha de ser subestimat. El protagonisme que aquesta via pot tenir en el desenvolupament tumoral porta a pensar que la seva inhibició seria una nova diana a explotar en teràpies antineoplàsiques: si l'augment de la biogènesi dels ribosomes és una etapa crucial en el desenvolupament tumoral, la utilització de drogues que bloquegin la producció de ribosomes podria obstaculitzar-ne l'aparició.

INHIBIDORS DE LA BIOGÈNESI DELS RIBOSOMES

La síntesi dels ribosomes com a diana per a la teràpia contra el càncer ha sigut ignorada durant molt de temps perquè la producció de ribosomes és considerada necessària per al correcte funcionament de totes les cèl·lules. Es pensava que el tractament amb agents que ataquessin aquesta via no discriminaria entre cèl·lules tumorals i cèl·lules sanes proliferants. La reavaluació de la biogènesi ribosòmica com a diana terapèutica és deguda tant a l'actual comprensió del seu rol en la transformació tumoral, com al descobriment del control que aquest mecanisme exerceix sobre l'activació de p53.

Una anàlisi dels diferents quimioteràpics actualment utilitzats en clínica va demostrar que bona part d'ells afectaven la biogènesi ribosòmica (Burger et al. 2010). Un d'aquests fàrmacs és l'actinomicina D, un intercalant del DNA amb propietats antineoplàsiques utilitzat durant més de cinquanta anys en el tractament de tumors embrionals o infantils (Metzger & Dome 2005; Raney et al. 2011; Aghajanian 2011; Miser et al. 2004). La droga inhibeix la síntesi del RNA, intercalant-se en les regions del DNA riques en repeticions CG. Donat l'alt percentatge de repeticions CG en el rDNA, la RNA polimerasa I és la més sensible al tractament amb actinomicina D (Perry & Kelley 1970). Es va demostrar que dosis baixes d'actinomicina D, que afecten només la transcripció de la RNA polimerasa I, induïen l'apoptosi en cèl·lules d'adenocarcinoma de colon sense causar dany genotòxic, independentment de l'estatus de p53. D'altra banda, l'efecte en queratinocits normals era més moderat, causant només l'aturada reversible del cicle cel·lular (Choong et al. 2009). L'ús de l'actinomicina D en la major part dels règims quimioterapèutics actuals està restringit, principalment per la seva toxicitat a dosis elevades (Mondick et al. 2008; Veal et al. 2003). L'ús d'aquesta droga a concentracions més baixes com, per exemple, les necessàries per inactivar només la RNA polimerasa I, podria superar aquest problema i portar nous beneficis en teràpies combinades.

Recentment, la major comprensió de la biogènesi ribosòmica va portar al desenvolupament d'una sèrie de molècules que inhibeixen específicament la RNA polimerasa I. Una d'aquestes drogues, la CX-3543, va presentar una bona resposta antitumoral en models murins de diferents tumors. Tot i que els resultats dels primers assajos clínics eren prometedors, va ser retirat per problemes de biodisponibilitat (Drygin et al. 2009; Balasubramanian et al. 2011). Malgrat aquests problemes, els resultats obtinguts amb aquesta droga han obert el camí per la recerca d'altres drogues amb propietats similars, com la CX-5461 (Drygin et al. 2011).

La via de p53

p53: EL GUARDIÀ DEL GENOMA

Els organismes pluricel·lulars necessiten eliminar les cèl·lules defectuoses dels seus teixits per mantenir el correcte funcionament dels seus òrgans. Per satisfer aquesta necessitat, l'evolució ha desenvolupat un sistema capaç de controlar la manutenció de les condicions apropiades per la correcta funció de les cèl·lules: la proteïna p53. Nombrosos estudis semblen indicar que la p53 és una de les principals barreres davant de la transformació tumoral. Aquesta proteïna es troba mutada aproximadament en el 50% dels tumors (Vogelstein et al. 2000) i, a més, molts tumors que presenten el gen p53 *wild type* tenen les seves funcions antitumorals inactivades mitjançant altres mecanismes (Brown et al. 2011).

La p53 és un factor de transcripció homotetramèric format per quatre polipèptids de 400 residus. Cadascun dels monòmers és subdivisible en diferents dominis funcionals (figura 9). A l'extremitat N-terminal trobem el domini de transactivació (TAD), responsable de l'activació dels objectius transcripcionals de p53. El TAD és seguit per un domini ric en prolina que indueix la resposta de p53 al dany al DNA. En la regió central es localitza el domini d'unió del DNA (DBD), el senyal de localització nuclear (NLS), i el domini de tetramerització, que uneix els quatre monòmers gràcies a interaccions hidrofòbiques. Finalment, a l'extremitat C-terminal trobem el domini d'exportació nuclear (NES) i un domini bàsic d'interacció no específica al DNA que és àmpliament modificat post-traduccionament per les proteïnes que regulen l'activitat de p53 (Okorokov & Orlova 2009).

En les cèl·lules amb la via de p53 intacta, la percepció d'un estímul lesiu per part d'una de les seves vies d'activació porta a l'estabilització d'aquest factor de transcripció. Actualment, es coneixen múltiples mecanismes d'inducció de p53, entre els quals destaquen la fosforilació de p53 per part de les quinases ATM, ATR i DNA-PK en resposta al dany al DNA, la inducció de p14^{ARF} per contrarestar l'estrès mitogènic, i l'activació del punt de control de la biogènesi ribosòmica (Biegging & Attardi 2012; Bursac et al. 2014). Qualsevol d'aquestes vies comportarà la modificació post-traducciona de p53, principalment mitjançant la fosforilació del TAD, l'acetilació del DBD i del seu C-terminal, o la inhibició de la ubiquitinació, portant a la seva estabilització (Meek & Anderson 2009, Bursac et al. 2014). L'increment dels nivells cel·lulars de p53 donarà lloc a l'activació dels seus objectius transcripcionals i citoplasmàtics, provocant l'aturada del cicle cel·lular, la senescència o l'apoptosi (Vousden & Prives 2009). L'elecció del mecanisme de resposta sembla dependre dels gens activats per p53, ja que no totes les dianes transcripcionals s'activen simultàniament. Així doncs, sembla que existeixen diferents sistemes que regulen l'activitat transcripcional de p53. En primer lloc, nivells cel·lulars elevats de p53 indueixen l'apoptosi, mentre que nivells més baixos només aturen el cicle cel·lular (Kracikova et al. 2013). Els cofactors reclutats juntament amb la p53 també determinen el mecanisme de resposta activat. Per exemple, els cofactors de la família ASPP promouen l'associació de p53 als promotors pro-apoptòtics, però no als de CDK1NA o MDM2 (Samuels-Lev et al. 2001). Les modificacions post-traduccionals de p53 també determinen el patró dels gens activats per aquest factor de transcripció. L'acetilació

de la lisina 120 de p53 és una de les modificacions post-traduccionals millor caracteritzades. Aquesta modificació induïx tant la localització de p53 en els promotors dels gens apoptòtics, com la seva localització mitocondrial, on influencia directament l'acció proapoptòtica de BAK (Sykes et al. 2006; Sykes et al. 2009). La fosforilació de la serina 46 també sembla afavorir la transcripció de factors pro-apoptòtics (Oda et al. 2000).

En condicions d'homeòstasi, la p53 és mantinguda a nivells cel·lulars mínims. Existeixen molts mecanismes que regulen negativament p53, com el control de la seva activitat transcripcional, la seva estabilitat i la seva localització. Tot i així, el principal inhibidor de p53 és la E3 ubiquïtina lligasa MDM2 (Brown et al. 2011).

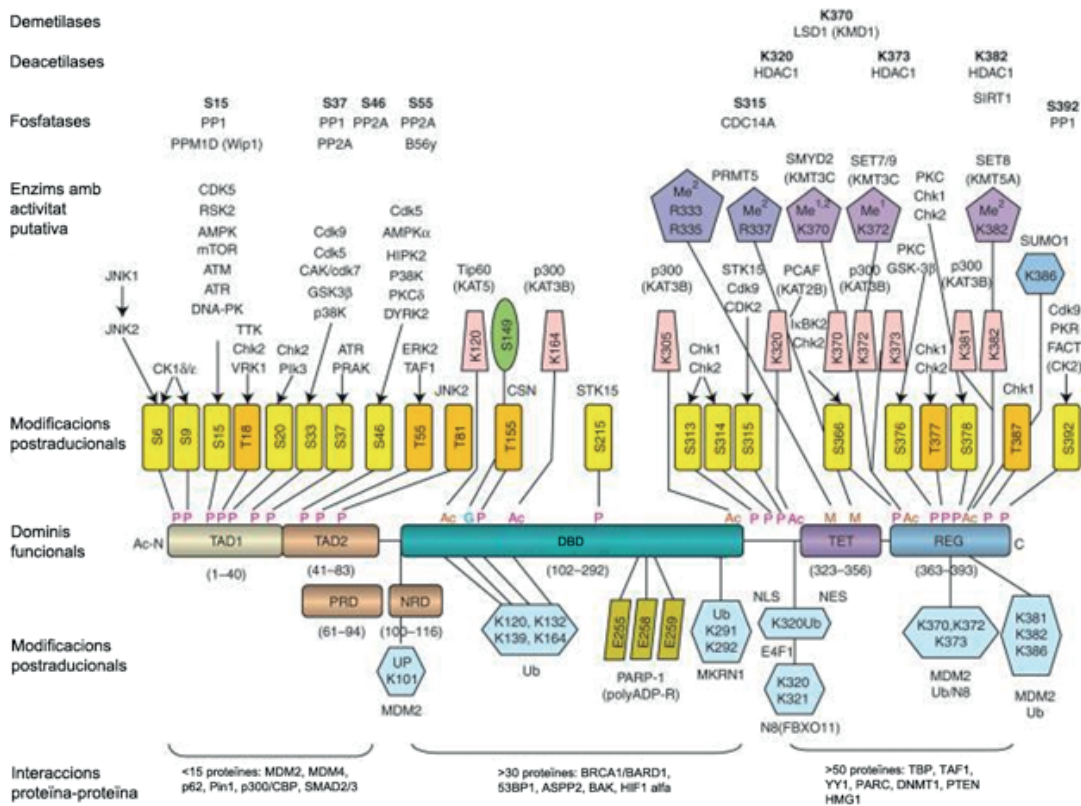


Figura 9. Esquema dels principals dominis funcionals de p53 i les seves modificacions post-traduccionals. Adaptat de Meek & Anderson 2009

L'ONCOPROTEÏNA MDM2

L'ubiquïtina lligasa MDM2 és una oncoproteïna nuclear de 491 aminoàcids, coneguda principalment per la seva funció inhibidòria sobre p53 (Nag et al. 2013). Existeixen nombrosos mecanismes amb els quals aquesta proteïna contrarresta l'activitat de la p53. La proteïna MDM2 s'associa, mitjançant una butxaca hidròfoba que es troba en el seu N-terminal, a tres residus localitzats en el TAD de p53, impedit la interacció de p53 amb els seus cofactors i el maquinari basal de transcripció (Brown et al. 2011). A nivells cel·lulars baixos, MDM2 causa la monoubiquïtinació de p53, estímulant la seva relocalització en el citoplasma gràcies a l'exhibició del seu senyal d'exportació nuclear. Aquesta modificació també disminueix la capacitat transactivadora de p53, impedit l'acetilació de les lisines necessàries per a la seva funció transcripcional. Nivells cel·lulars més alts de MDM2 provoquen la poliubiquïtinació de p53, marcant-la per la degradació proteosòmica, reduint així els nivells cel·lulars de p53 (Hock & Vousden 2014). A més de la ubiquïtinació de p53, MDM2 pot modificar post-transcripcionalment les histones dels promotors activats per p53, causant la seva repressió (Minsky & Oren 2004). Finalment, MDM2 també pot reprimir l'activitat de p53 reclutant altres repressors transcripcionals, com HDAC1 i YY1 (Ito et al. 2002; Sui et al. 2004). Un esquema de la interacció entre MDM2 i p53, així com d'altres proteïnes involucrades en la regulació d'aquesta associació es presenta en la figura 10. L'equilibri entre MDM2 i p53 és finament regulat mitjançant un mecanisme de retroinhibició. El gen codificant la proteïna MDM2 presenta dos elements promotors: P1 i P2. Mentre P1 manté els nivells basals de MDM2, P2 és activat per p53. L'increment de MDM2 porta a la degradació de p53, mantenint els seus nivells cel·lulars baixos, impedit així l'activació dels gens antiproliferants i apoptòtics que resulten lesionats per les cèl·lules (Nag et al. 2013).

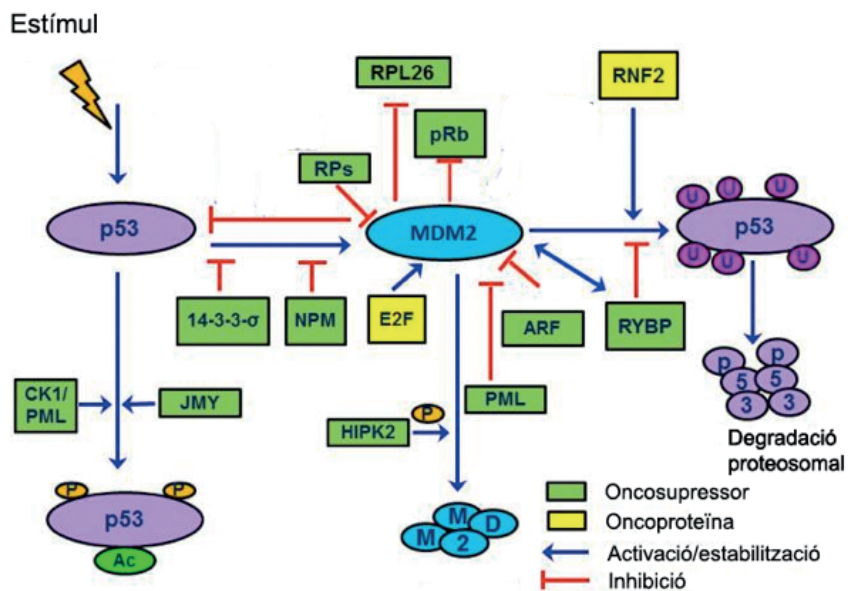


Figura 10. Proteïnes implicades en la regulació de la interacció entre p53 i MDM2.

MDM2 presenta també funcions independents a la regulació de p53 (Ganguli & Wasylyk 2003). Es va demostrar que MDM2 pot regular la síntesi i reparació del DNA interactuant amb la DNA polimerasa ϵ (Asahara et al. 2003; Vlatkovic et al. 2000). També es va demostrar el seu rol en la degradació proteosòmica de la E-caderina (Yang et al. 2006), en el control de la via de pRb-E2F (Tang et al. 2012; Uchida et al. 2005) i en l'amplificació dels centrosomes (Carroll et al. 1999). A més, la possibilitat d'associació entre el domini RING de MDM2 i el RNA, ha portat al descobriment de la seva funció com a regulador de l'estabilitat del mRNA (Elenbaas et al. 1996; Zhou et al. 2011).

En resum, la proteïna MDM2 sembla tenir un rol important en la regulació de diferents processos involucrats tant en el cicle cel·lular com en l'apoptosi, de manera dependent o independent de p53. Donats els efectes d'aquesta oncoproteïna sobre la proliferació, la seva sobreexpressió i la seva amplificació gènica han estat relacionades amb la prognosi negativa de diferents tumors (Momand et al. 1998).

ROL DE LA PROTEÏNA MDM2 EN EL DESENVOLUPAMENT DEL NEUROBLASTOMA

Els tumors necessiten que una sèrie de mecanismes cel·lulars de control siguin abrogats per tal de permetre el seu desenvolupament. Una d'aquestes és l'activitat oncosupressora de la p53, que impedeix la proliferació descontrolada de les cèl·lules. Tot i que la mutació de p53 és el mecanisme més comú d'inactivació d'aquest factor de transcripció en els càncers d'adults, la incidència de mutacions en el gen de p53 és inferior al 2% en el moment de la diagnosi en els neuroblastomes (Vogan et al. 1993; Tweddle et al. 2001). Nombrosos estudis han demostrat com diferents modificacions en la via de MDM2 aconseguen anul·lar la funció oncosupressora de p53, portant a la transformació tumoral. L'amplificació de les seqüències del cromosoma 12q, on es troba el gen codificant la proteïna MDM2, han sigut descrites en tumors i en línies cel·lulars de neuroblastoma que presenten l'amplificació del gen *MYCN* associada a l'atenuació de l'activitat transcripcional de p53 (Keshelava et al. 2001; Corvi et al. 1995; Van Roy et al. 1995). S'ha demostrat també que MDM2 és un objectiu transcripcional directe de N-Myc (Slack et al. 2005). L'associació entre aquestes dues oncoproteïnes suggereix un avantatge en el desenvolupament del neuroblastoma en les cèl·lules que presenten la sobreexpressió d'aquests dos factors. L'expressió de MDM2 atenuaria la via de p53 en les cèl·lules, permetent l'evasió de l'apoptosi induïda per l'estrès oncogènic causat per la sobreexpressió de N-Myc. Aquesta relació explicaria també la baixa freqüència de mutacions observada en el gen *TP53*.

Finalment, un estudi realitzat per Bond i col·laboradors va proposar que la presència d'un polimorfisme, anomenat SNP309 i localitzat en el promotor de MDM2, augmentaria l'afinitat del promotor pel factor de transcripció Sp1. D'això en resultaria una major expressió de MDM2, i la pensió més gran a formar tumors (Bond et al. 2004).

INHIBIDORS DE MDM2: NUTLINA-3

La baixa percentual de mutacions de p53 en el neuroblastoma fa que la seva reactivació sigui una estratègia antitumoral a tenir en compte. Entre les diferents possibilitats, la inhibició selectiva de la interacció entre p53 i MDM2 és una de les estratègies més rellevants per restaurar les funcions dependents d'aquest factor de transcripció. Existeixen tres modalitats per impedir l'efecte inhibitori de MDM2: el bloqueig de l'expressió de MDM2, la reducció de la seva activitat ubiquitina lligasa, i la inhibició de la seva interacció amb p53. Aquesta última estratègia sembla ser la més afavorida des d'un punt de vista farmacològic. Els estudis inicials evidenciaren que es podia bloquejar la interacció entre p53 i MDM2 utilitzant pèptids curts com a agents inhibitoris (García-Echeverría et al. 2000). Això es deu al fet que l'enllaç entre p53 i MDM2 es forma mitjançant tres aminoàcids (F19, W23 i L26), localitzats en el TAD de p53, que es projecten en una butxaca hidrofòbica present en la superfície de la regió N-terminal de MDM2 (figura 9). El descobriment d'aquesta interacció va portar ràpidament a la síntesi dels primers antagonistes de MDM2 amb activitat inhibitoria *in vivo*: les nutlines. La nutlina-3, una molècula pertanyent a aquest grup de drogues, desplaça la p53 a concentracions nanomolars, demostrant així, una forta afinitat i una especificitat elevada per MDM2 en diferents línies tumorals. La seva interacció amb la butxaca hidrofòbica de MDM2 porta a l'estabilització de p53 i a la inducció de les diferents vies activades per aquest factor de transcripció (Vassilev et al. 2004a). Tot i que les nutlines van ser dissenyades inicialment per inhibir la interacció entre MDM2 i p53, s'han trobat nombroses activitats independents a aquesta funció a concentracions més elevades. Això es deu, probablement, al fet que moltes proteïnes vinculades als processos tumorigens, presenten seqüències aminoacídiques similars a la regió d'interacció amb MDM2 de p53. De fet, s'ha demostrat la interacció entre MDM2 i diferents proteïnes involucrades en la progressió o la inhibició dels processos tumorals, com per exemple p73, E2F1 o HIF1a (LaRusch et al. 2007; Ray et al. 2011).

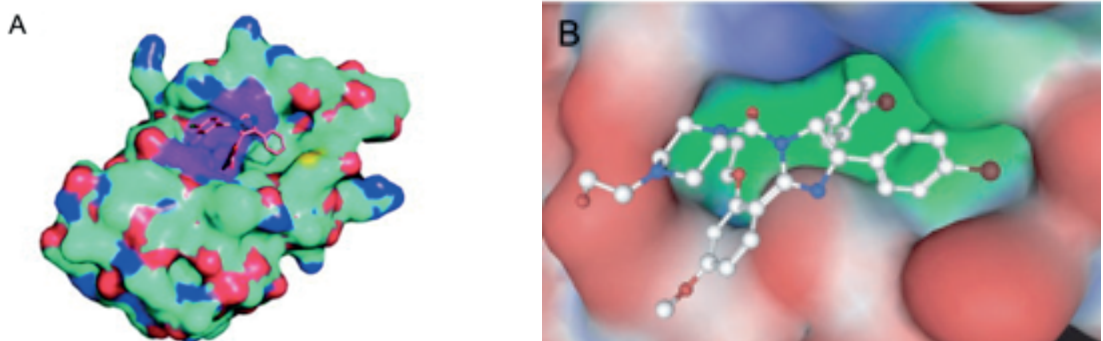


Figura 11. Estructura i modalitat d'unió de la nutlina-3 a MDM2. A) Interpretació de la interacció de la butxaca hidrofòbica de MDM2 (zona violeta) amb la nutlina-3. B) Primer pla de la interacció entre MDM2 i una molècula de la família de les nutlines, la nutlina-2 (zona còncava, verd; zones sobresortides, vermell), mostrant com el grup bromofenilic entra en la butxaca hidrofòbica. Adaptat de Brown et al. 2011 i Vassilev et al. 2004.

La reactivació de la via de p53 és una estratègia terapèutica especialment atractiva per als tumors pediàtrics, ja que s'obtenen els beneficis dels efectes antitumorals de p53 sense provocar els danys genotòxics. Això suggereix una menor toxicitat en comparació a la majoria dels agents quimioteràpics utilitzats actualment. En el neuroblastoma, el tractament amb nutlina-3 provoca una ràpida acumulació de p53, així com una forta inducció dels objectius transcripcionals d'aquesta proteïna, independentment del tipus cel·lular de les línies analitzades (Van Maerken et al. 2011).

Objectius

Objectius

Els neuroblastomes es caracteritzen per l'heterogeneïtat de les cèl·lules que els componen (Walton et al. 2004) i la capacitat de transdiferenciar entre els diferents fenotips cel·lulars (Ross et al. 1983). La freqüència de mutacions en el gen de p53 és molt baixa en el moment de la diagnosi, manifestant-se normalment només després del tractament inicial (Van Maerken et al. 2014). Aquestes característiques són les causes principals del fracàs dels tractaments actuals contra aquesta neoplàsia. L'objectiu d'aquesta tesi ha estat assajar noves estratègies terapèutiques que poguessin resultar eficaces contra tots els tipus cel·lulars, per tal d'evitar l'aparició de recidives. Basant-nos en els coneixements actuals sobre la malaltia i en estudis previs d'agents quimioterapèutics, hem decidit utilitzar dues drogues amb eficàcia clínica demostrada. D'una banda, s'ha escollit el SAHA, un inhibidor inespecífic de les HDACs que ha demostrat la seva eficàcia independentment del context de p53. Per altra banda, s'ha seleccionat l'inhibidor de la transcripció actinomicina D, que ha demostrat ser més eficaç contra les cèl·lules que expressen p53. La nutlina-3 s'ha utilitzat com a control per verificar la repercussió de p53 en l'efecte de l'actinomicina D.

L'efecte d'aquests compostos s'ha comprovat utilitzant-los per separat i conjuntament, per tal de determinar possibles interaccions entre els fàrmacs. L'objectiu de la tesi s'ha desglossat doncs en els següents objectius específics:

- 1. Estudiar els efectes del tractament amb SAHA sobre diferents línies cel·lulars de neuroblastoma humà.**
- 2. Estudiar els efectes de dosis baixes d'actinomicina D en línies cel·lulars de neuroblastoma.**
- 3. Comprovar fins a quin punt l'activació de p53 determina els efectes desencadenats per l'actinomicina D, comparant-los amb els efectes de la nutlina-3.**
- 4. Assajar la interacció entre el SAHA i l'actinomicina D o la nutlina-3.**

Resultats

1. Caracterització de les línies cel·lulars utilitzades

Les línies cel·lulars de neuroblastoma es subdivideixen en tres fenotips: les cèl·lules de tipus N s'assemblen a precursors de la línia neuronal, les de tipus S són semblants a les cèl·lules precursors gials, i les de tipus I mostren un fenotip intermedi menys diferenciats, semblant al d'una cèl·lula mare del sistema nerviós (Walton et al. 2004). En aquest treball s'han utilitzat cinc línies cel·lulars de neuroblastoma: dos de tipus N (SH-SY5Y i LA1-55n), una de tipus I (SK-N-JD) i dos de tipus S (SK-N-AS i SH-EP/Tet21N). Dues d'aquestes línies cel·lulars (LA1-55n i SK-N-JD) presenten amplifcacions del gen MYCN (Walton et al. 2004). Per determinar l'estadi de diferenciació de les línies cel·lulars utilitzades, s'ha realitzat una anàlisi preliminar dels nivells proteics de diferents marcadors de diferenciació neuronal. A més, s'han controlat els factors de transcripció E2F1, N-Myc i p53, així com la viabilitat cel·lular, per conèixer el potencial proliferant i apoptòtic de cadascuna de les línies cel·lulars.

Els factors transcripcionals de la família Myc són proteïnes clau per la progressió del cicle cel·lular i el desenvolupament del càncer (Dang 2012). En particular, N-Myc sembla ser un dels principals factors d'inducció de la transformació neoplàsica en el neuroblastoma (Schwab et al. 1985). L'anàlisi de l'expressió de les proteïnes c-Myc i N-Myc mostra un patró d'expressió diferent en totes les línies examinades. Les cèl·lules de tipus N SH-SY5Y i LA1-55n expres-

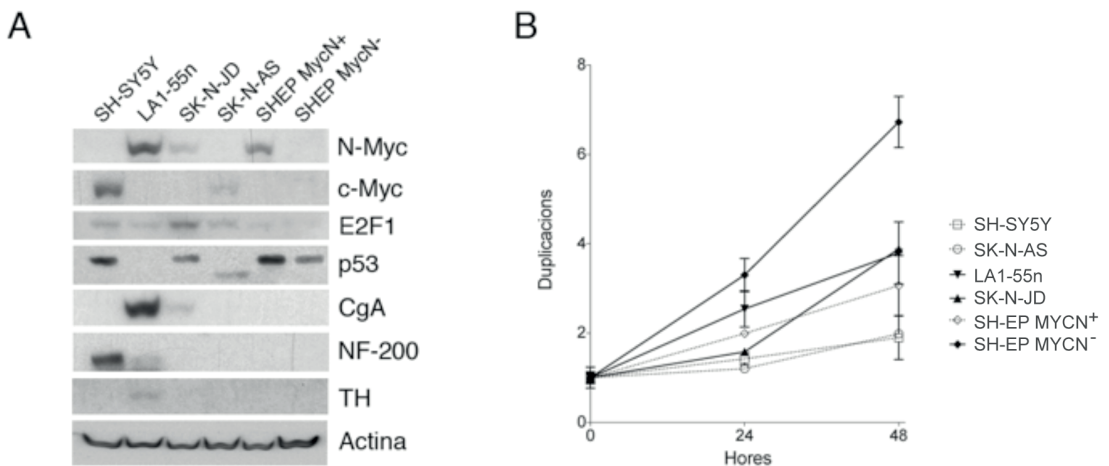


Figura 11: Caracterització de les línies cel·lulars de Neuroblastoma. A) Anàlisi de l'expressió proteica per Western blot. La figura mostra proteïnes associades amb la progressió del cicle cel·lular i la supervivència (N-Myc 67kDa, c-Myc 60kDa, E2F1 50kDa i p53 53kDa) i marcadors de diferents estadis de diferenciació neuronal (CgA 60kDa, NF-200 200kDa, TH 60kDa). B) Corbes de proliferació de les diferents línies de neuroblastoma. El gràfic representa el nombre de duplicacions ± S.E.M

sen respectivament c-Myc i N-Myc (figura 1.1A). SK-N-JD, la línia cel·lular de tipus I, expressa només la proteïna N-myc. La línia cel·lular SK-N-AS, pertanyent al fenotip S, presenta nivells detectables de proteïna c-Myc, però no de N-Myc. Finalment, la línia cel·lular SH-EP/*Tet21N*, que té el gen de N-Myc sota el control d'un promotor reprimible (Lutz et al. 1996), expressa N-Myc només en les cèl·lules cultivades sense tetraciclina.

Els nivells proteics d'E2F1, un factor de transcripció clau en la regulació de la transició G1/S del cicle cel·lular (DeGregori et al. 1995), són més elevats en les cèl·lules SK-N-JD en comparació a les altres línies cel·lulars. L'expressió més elevada d'E2F1 correspon a l'estat menys diferenciat de les línies de tipus I (Palm et al. 2013; Walton et al. 2004).

Paral·lelament s'han controlat els nivells de la proteïna p53. Les línies SH-SY5Y, SK-N-JD i SH-EP/*Tet21N* presenten la forma *wild type* de p53, mentre que la SK-N-AS expressa una isoforma de menor pes molecular. L'isoforma de p53 present en la línia cel·lular SK-N-AS ha estat caracteritzada en altres estudis, indicant que és incapaç d'induir la transcripció de p21 (Nakamura et al. 2007). Finalment, l'expressió de p53 no s'ha detectat en la línia cel·lular LA1-55n, com ja s'havia descrit anteriorment (Carr et al. 2006).

En darrer lloc, s'han analitzat tres paràmetres de diferenciació neuronal per determinar l'estadi de maduració de les línies examinades. La cromogranina A (CgA) és un marcador de diferenciació primerenca detectable al voltant de la tercera setmana de l'embriogènesi humana, lligat a la desdiferenciació i al desenvolupament tumoral en teixits neuroendocrins (Taupe-not et al. 1996). La proteïna del neurofilament 200 (NF-200) és un component del citoesquelet i un marcador tardà de neurodiferenciació, que es troba present des de la vuitena setmana de gestació humana (Kleinert 1991). Finalment, la tirosina hidroxilasa (TH) és un marcador de les neurones catecolaminèrgiques (Kumer & Vrana 1996). Els tres marcadors neuronals s'han detectat en les cèl·lules LA1-55n: la CgA s'expressa a nivells elevats, mentre que l'expressió de NF-200 i la TH és menor. La línia SH-SY5Y presenta nivells detectables de NF-200, però no de CgA, suggerint un major estat de diferenciació en comparació a les cèl·lules LA1-55n. Convé destacar que aquestes cèl·lules no presenten nivells detectables de TH, tot i que s'ha demostrat que pertanyen al llinatge dopaminèrgic (Xie et al. 2010). Les cèl·lules SK-N-JD expressen els marcadors de diferenciació primerenca CgA i N-Myc, en conformitat amb el seu menor grau de diferenciació neuronal. D'altra banda, ambdues línies cel·lulars de tipus S no presenten nivells detectables de cap paràmetre de diferenciació neuronal, indicant que aquestes cèl·lules pertanyen a un altre llinatge.

A més dels marcadors moleculars, s'ha avaluat la taxa de proliferació de les diferents línies utilitzades en aquest estudi. Els resultats demostren que les cèl·lules amb una expressió de N-Myc més elevada proliferen més ràpidament (Fig. 1.1B), suggerint una correlació entre l'expressió de N-Myc i la proliferació cel·lular.

2. Efecte del SAHA en línies de neuroblastoma humà

EL SAHA DISMINUEIX LA VIABILITAT EN CÈL·LULES DE NEUROBLASTOMA

Els efectes de la inhibició de les desacetilases s’han estudiat emprant el SAHA, un àcid hidroxàmic actualment utilitzat com a teràpia per al tractament del limfoma cutani de cèl·lules T (Mann et al. 2007). Amb aquesta finalitat, s’ha avaluat l’efecte sobre la viabilitat de quatre línies cel·lulars de neuroblastoma. El tractament amb dosis creixents de SAHA durant 24 hores mostra que no tots els tipus cel·lulars presenten la mateixa sensibilitat al compost. La línia SK-N-JD resulta ser més sensible al tractament, mentre que les altres línies arribaven a una pèrdua màxima de viabilitat a una concentració de 2,5µM (figura 2.1A). Donats aquests resultats, es va decidir utilitzar aquesta dosi per als següents experiments.

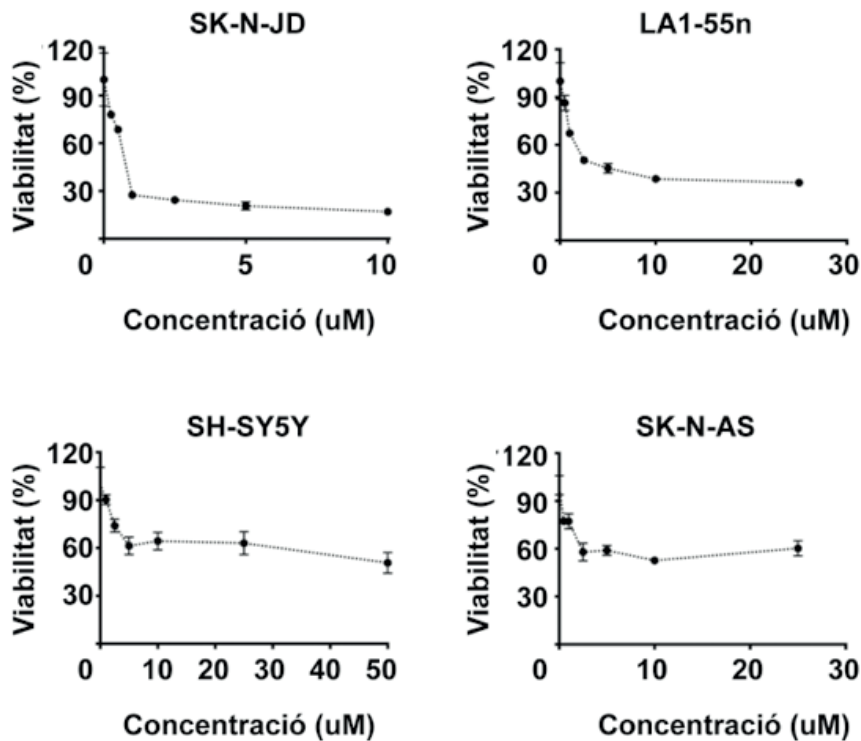


Figura 2.1: El SAHA disminueix la viabilitat cel·lular de les diferents línies del neuroblastoma. Les línies cel·lulars de neuroblastoma es van tractar durant 24 hores amb diferents concentracions de SAHA. El nombre de cèl·lules viables es va determinar per MTS (SK-N-JD, LA1-55n i SH-SY5Y) o per tinció amb cristall violeta (SK-N-AS). Els valors representen el percentatge de cèl·lules viables en comparació al control ± S.E.M.

L'anàlisi del tractament amb SAHA 2,5 μ M durant períodes de temps més prolongats mostra una pèrdua de la viabilitat dependent del temps (figura 2.2). La reducció de la viabilitat és més lenta en les cèl·lules SH-SY5Y i SK-N-AS en comparació a les cèl·lules LA1-55n i SK-N-JD, suggerint que la sensibilitat al SAHA pot dependre de l'expressió de N-Myc.

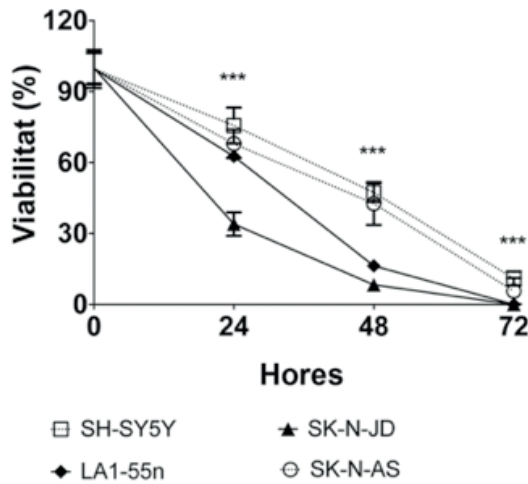


Figura 2.2: El SAHA disminueix la viabilitat cel·lular de les línies del neuroblastoma en funció del temps. Les cèl·lules de neuroblastoma es van tractar durant els temps indicats amb la dosi de SAHA 2,5 μ M. El nombre de cèl·lules viables es va determinar per MTS (SH-SY5Y, LA1-55n i SK-N-JD) o tinció amb cristall violeta (SK-N-AS). Els valors representen el percentatge de cèl·lules viables respecte al control \pm S.E.M. (***) $p < 0.001$ 2way ANOVA + Tukey's test).

EL SAHA INDUEIX APOPTOSI I AUTOFÀGIA EN LÍNIES CEL·LULARS DE NEUROBLASTOMA

La pèrdua de la viabilitat causada pel tractament amb SAHA pot ser deguda tant a la disminució de factors de proliferació com a la inducció de diferents processos de mort cel·lular. Per tal d'investigar el mecanisme que hi ha darrera a l'efecte del SAHA sobre la viabilitat, s'ha analitzat l'expressió de proteïnes relacionades amb el control del cicle cel·lular, la supervivència, l'apoptosi i l'autofàgia. Els resultats mostren una reducció dels nivells de N-Myc en les línies cel·lulars amb el gen *MYCN* amplificat (figura 2.3A). La quantificació del mRNA de N-Myc

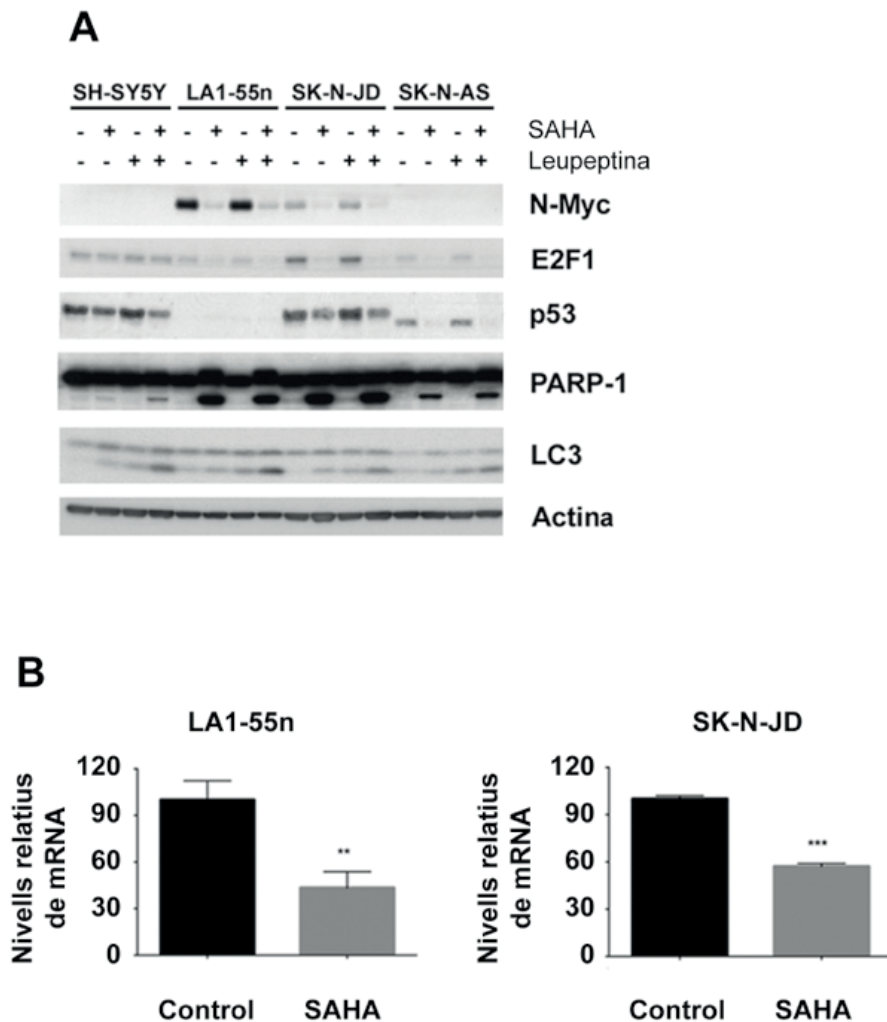


Figura 2.3: Efecte del SAHA sobre l'expressió de proteïnes i de mRNA. A) Anàlisi per *Western blot* de proteïnes associades a la proliferació cel·lular (N-myc, E2F1 i p53), l'apoptosi (PARP-1) i l'autofàgia (LC3). L'anàlisi s'ha realitzat després de 24 hores d'incubació amb SAHA 2,5 µM. La leupeptina (3,5 mg/ml) s'ha usat per corroborar que l'augment observat en LC3-II (banda baixa) es deu a un increment en el flux autofàgic. B) Anàlisi dels nivells relatius de mRNA per qRT-PCR en cèl·lules LA1-55n i SK-N-JD després de 6 hores de tractament amb SAHA 2,5 µM. Els valors representen el percentatge respecte al control no tractat ± S.E.M. (**p<0.01; ***p<0.001 ANOVA + Tukey's test).

mostra una disminució dels seus nivells en les cèl·lules LA1-55n i SK-N-JD (figura 2.3B), suggerint que la disminució de la proteïna pot ser deguda a la reducció dels nivells de mRNA.

El factor de transcripció p53 també disminueix els seus nivells en resposta al tractament en totes les línies que expressen aquesta proteïna. E2F1 també redueix els seus nivells proteics en resposta al tractament amb SAHA en totes les línies cel·lulars, a excepció de la línia SH-SY5Y.

Finalment, s'ha investigat l'activació de dues vies relacionades amb la mort programada: l'apoptosi i l'autofàgia (Ouyang et al. 2012).

En el cas de l'apoptosi, s'ha examinat l'hidròlisi de la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1). La figura 2.3A mostra com el tractament amb SAHA induïx l'activació de l'apoptosi en totes les línies cel·lulars examinades, determinant una resposta més consistent en les cèl·lules amb sobreexpressió de N-Myc. A més, s'ha analitzat l'expressió de factors possiblement involucrats en el desencadenament de l'apoptosi en la línia cel·lular SK-N-JD. D'acord amb l'activació de l'apoptosi, s'observa un augment en l'expressió de gens proapoptòtics com NOXA, PUMA i BAK, així com la disminució dels gens antiapoptòtics de la família Bcl-2. També s'ha observat un marcat augment del gen CDKN1A, que codifica la proteïna p21 (figura 2.4).

Pel que fa l'autofàgia, s'ha analitzat la conversió de la forma lliure de la proteïna LC3 (LC3-I) a la seva forma conjugada amb fosfatidiletanilamina (LC3-II). La forma lipidada és capaç d'unir-se a la membrana dels autofagosomes, activant el procés autofàgic (Mizushima et al. 2010). Els resultats mostren un augment de LC3-II en totes les línies (figura 2.3A). Per confirmar que l'augment de LC3-II és degut a una potenciació del flux autofàgic, hem utilitzat la leupeptina, un inhibidor d'endoproteases lisosomals que impedeix la degradació de LC3-II en l'autofagolisosoma (Haspel et al. 2011). L'augment de LC3-II observat en totes les línies cel·lulars, ja sigui en presència o absència de leupeptina, indica una potenciació del mecanisme autofàgic independent de l'estat de N-Myc.

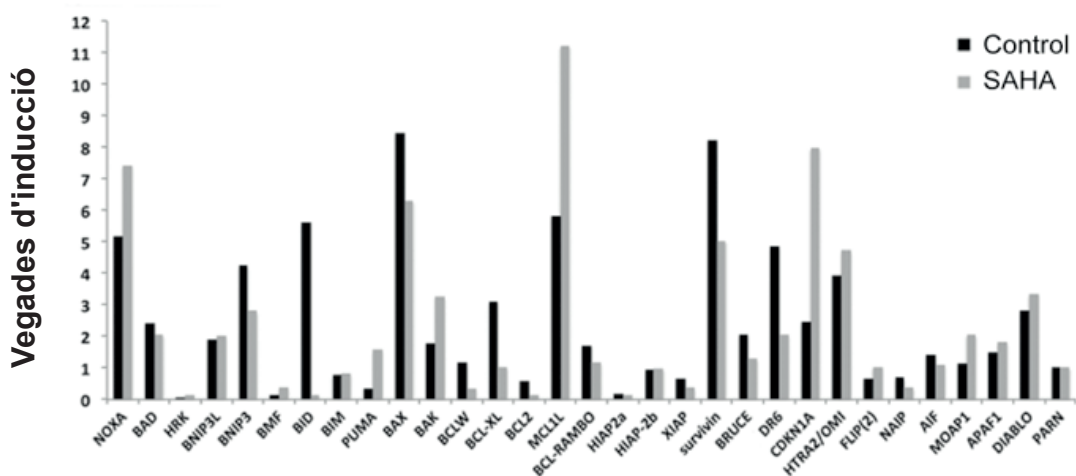


Figura 2.4: Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi modificats pel tractament amb SAHA. Les cèl·lules SK-N-JD van incubar-se durant 24 hores amb SAHA 2,5 μ M. L'expressió dels gens relacionats amb l'apoptosi va analitzar-se per RT-MLPA. Els resultats es mostren com a vegades d'inducció vers les cèl·lules no tractades. Els nivells de mRNA estan normalitzats per el gen *PARN*.

L'APOPTOSI ÉS LA CAUSA DE LA MORT OBSERVADA EN RESPOSTA AL SAHA

Per determinar la contribució de l'apoptosi a la mort cel·lular induïda per SAHA, s'ha avaluat l'efecte d'aquesta droga en presència de l'inhibidor de caspases Oph-QVD. La inhibició de les caspases reverteix completament la proteòlisi de PARP-1, alhora que recupera la viabilitat en totes les línies cel·lulars, a excepció de la línia SK-N-AS (figura 2.5A). El tractament amb Oph-QVD no impedeix la reducció dels nivells de N-Myc en resposta a SAHA (figura 2.5B), suggerint que aquest efecte no depèn de l'activació de les caspases. D'altra banda, el tractament conjunt amb SAHA i Oph-QVD augmenta els nivells de LC3-II (figura 2.5B). Aquest efecte es pot interpretar com una potenciació de l'autofàgia en resposta a la inhibició de l'apoptosi. Així doncs, l'apoptosi sembla ser el principal mecanisme de mort cel·lular activat en resposta al tractament amb SAHA.

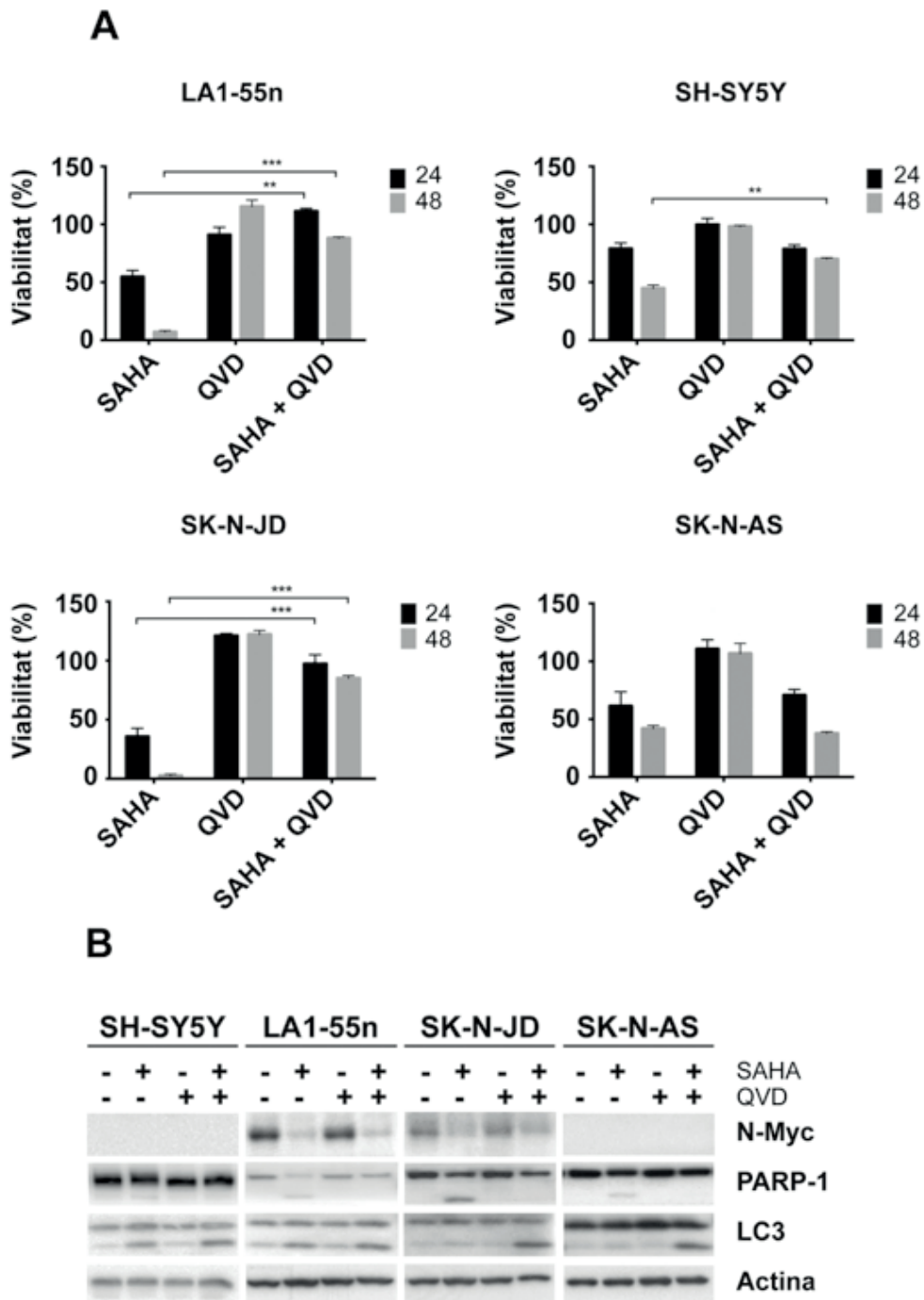


Figura 2.5: Efecte de la inhibició de les caspases en cèl·lules de neuroblastoma tractades amb SAHA. A) Gràfiques de viabilitat de les línies de neuroblastoma examinades front a SAHA 2,5 μ M i Oph-QVD 20 μ M durant diferents temps, mesurades per MTS (SK-N-JD, LA1-55n i SH-SY5Y) o per tinció amb cristall violeta (SK-N-AS). Els valors representen el percentatge de cèl·lules viables respecte al control \pm S.E.M. (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 2way ANOVA + Tukey's test). B) *Western blot* de proteïnes associades al cicle cel·lular (N-myc), l'apoptosi (PARP-1) i l'autofàgia (LC3). Les quatre línies cel·lulars van ser tractades amb 2,5 μ M de SAHA, en presència o absència de Oph-QVD (20 μ M), durant 24 hores.

L'ACTIVACIÓ DE L'AUTOFÀGIA INDUÏDA PER SAHA NO DEPÈN DE LA VIA mTORC1

L'autofàgia és un procés catabòlic que preveu la degradació de components cel·lulars innecessaris o deteriorats mitjançant un sistema de vesícules anomenades autofagosomes (Hurley & Schulman 2014). Un dels sistemes reguladors de l'autofàgia més ben caracteritzat és la via de mTORC1. Aquest complex proteic inactiva la quinasa ULK1 mitjançant la seva fosforilació, impedit el desencadenament de l'autofàgia. La inhibició de mTORC1 portaria doncs a l'activació de l'autofàgia. Altres dianes directament fosforilades per mTORC1 són la proteïna d'unió al factor d'iniciació de la traducció eucariota (4E-BP1) i la quinasa de S6 p70 (S6K1), ambdues relacionades amb el creixement cel·lular i la síntesi proteica (Green & Levine 2014; Shen & Mizushima 2014). El control de mTORC1 sobre el metabolisme cel·lular determina l'equilibri entre anabolisme i catabolisme.

Amb l'objectiu de verificar si el SAHA inhibeix mTORC1, s'han analitzat els nivells de fosforilació de les proteïnes 4E-BP1 i S6K1 en la línia cel·lular LA1-55n (figura 2.6). El tractament amb SAHA disminueix els nivells d'aquestes proteïnes, però no el seu estat de fosforilació. Aquests resultats indiquen que l'activitat de mTORC1 no es veu afectada pel tractament amb SAHA, suggerint que l'activació de l'autofàgia no depèn de la inactivació d'aquesta via.

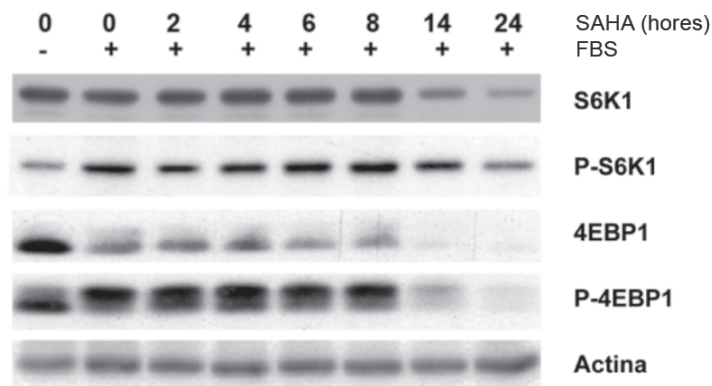


Figura 2.6: La via de mTORC1 no està implicada en l'activació de l'autofàgia en resposta al tractament amb SAHA. *Western blot* de les diferents dianes de fosforilació del complex mTORC1. L'anàlisi s'ha realitzat en llisats de proteïnes totals extrets als temps indicat d'incubació amb SAHA 2,5 μ M.

L'AUTOFÀGIA NO ÉS DETERMINANT EN L'EFFECTE SOBRE LA VIABILITAT INDUÏT PER SAHA

Tot i que l'autofàgia s'ha associat amb la supervivència cel·lular, diferents estudis citen l'autofàgia com un mecanisme de mort cel·lular programada (Green & Levine 2014). Per determinar el paper de l'autofàgia en la resposta al SAHA, s'ha inhibït aquest mecanisme, disminuint els nivells de ATG7 mitjançant l'ús de siRNA. ATG7 és una proteïna crucial per a la fusió de l'autofagosoma amb el lisosoma, sense la qual el procés autofàgic no es pot dur a terme (Hurley & Schulman 2014). Tot i que s'ha assolit una disminució del 80% de la proteïna ATG7 (figura 2.7B), la pèrdua de viabilitat en resposta al tractament amb SAHA es manté (figura 2.7A). Així doncs, els resultats indiquen que l'autofàgia no és determinant en l'efecte sobre la viabilitat induït per SAHA.

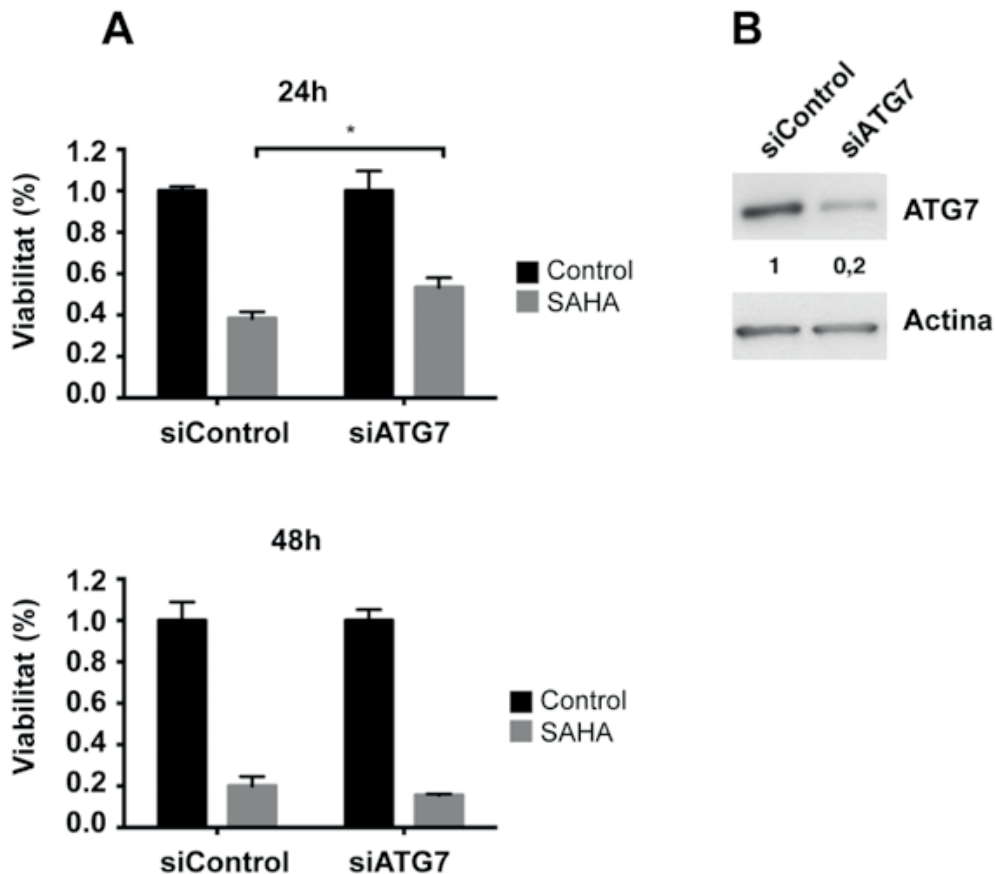


Figura 2.7: L'autofàgia no té un paper determinant en la resposta al SAHA. Les cèl·lules SK-N-AS van ser incubades 24 hores amb siATG7 10nM, i successivament tractades per 24 o 48 hores amb SAHA 2,5 μ M. A) Anàlisi de l'efecte sobre la viabilitat a 24 o 48 hores del tractament amb SAHA en cèl·lules amb o sense ATG7 silenciada, mesurat pel mètode de tinció amb cristall violeta. Els valors representen el percentatge de cèl·lules viables respecte al control \pm S.E.M. B) Nivells proteics de ATG7 48 hores després del tractament amb siATG7.

N-MYC DETERMINA UNA MAJOR SENSIBILITAT AL SAHA DEPENDENT DE LA LÍNIA CEL·LULAR

La importància de N-myc en la biologia del neuroblastoma ha sigut àmpliament documentada (Weiss et al. 1997; Burkhart et al. 2003; Jiang et al. 2011).

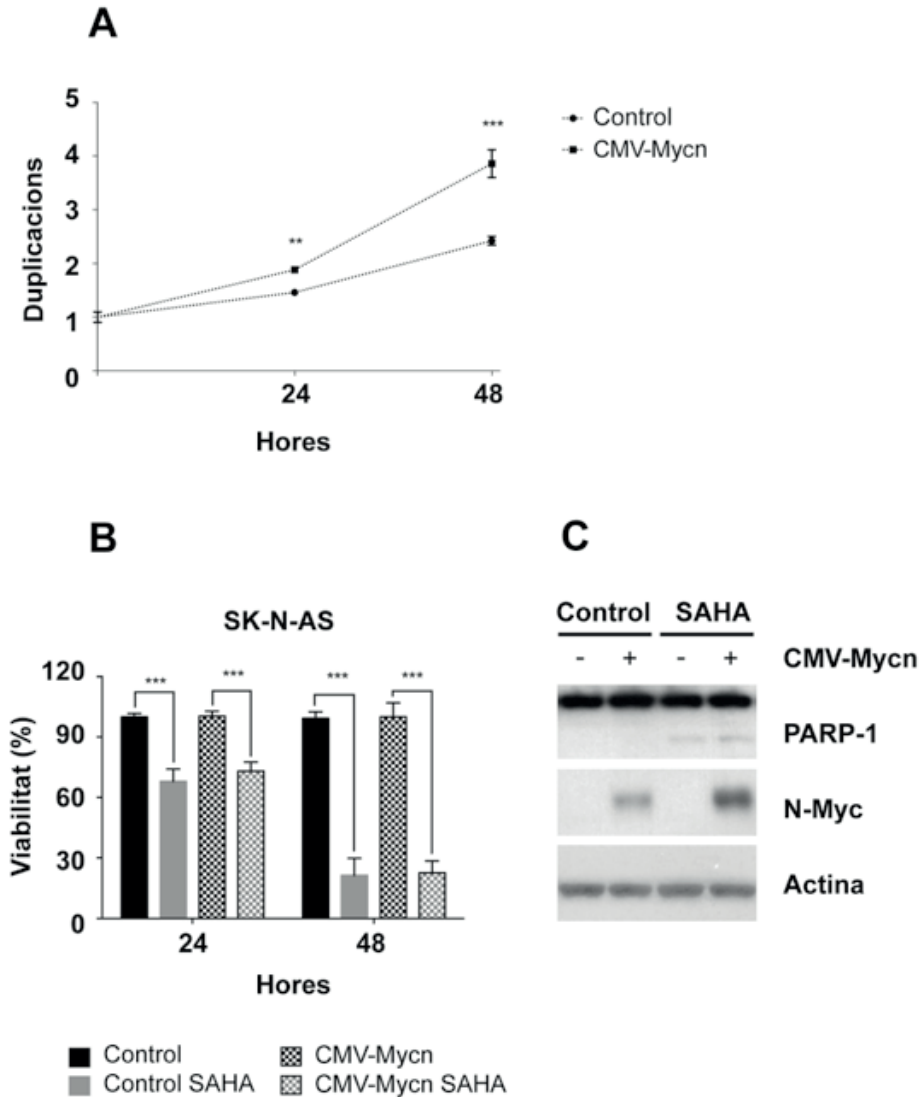


Figura 2.8: Efecte de la sobreexpressió de N-Myc en cèl·lules SK-N-AS tractades amb SAHA. A) Corbes de proliferació de cèl·lules SK-N-AS infectades amb un vector de control o de sobreexpressió de N-myc (CMV-Mycn). Els valors representen el nombre de duplicacions \pm S.E.M. (***) $p < 0,001$ 2way ANOVA + Tukey's test). B) Gràfiques de viabilitat de les cèl·lules front a SAHA 2,5 μ M durant els temps indicats, mesurades pel mètode de tinció amb cristall violeta. Els valors representen el percentatge respecte al control no tractat \pm S.E.M. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 2way ANOVA + Tukey's test). C) Anàlisi de l'expressió proteica per Western blot 24 hores després del tractament amb SAHA 2,5 μ M.

Per verificar si N-Myc juga un paper important en la resposta a SAHA, s'han utilitzat tres sistemes diferents: la sobreexpressió de N-Myc en cèl·lules amb nivells baixos d'aquesta proteïna (SK-N-AS), la silenciació de N-Myc en cèl·lules amb el gen *MYCN* amplificat (LA1-55n), i la regulació dels nivells de transcripció d'un gen *MYCN* ectòpic mitjançant un promotor reprimible (SH-EP/Tet21N).

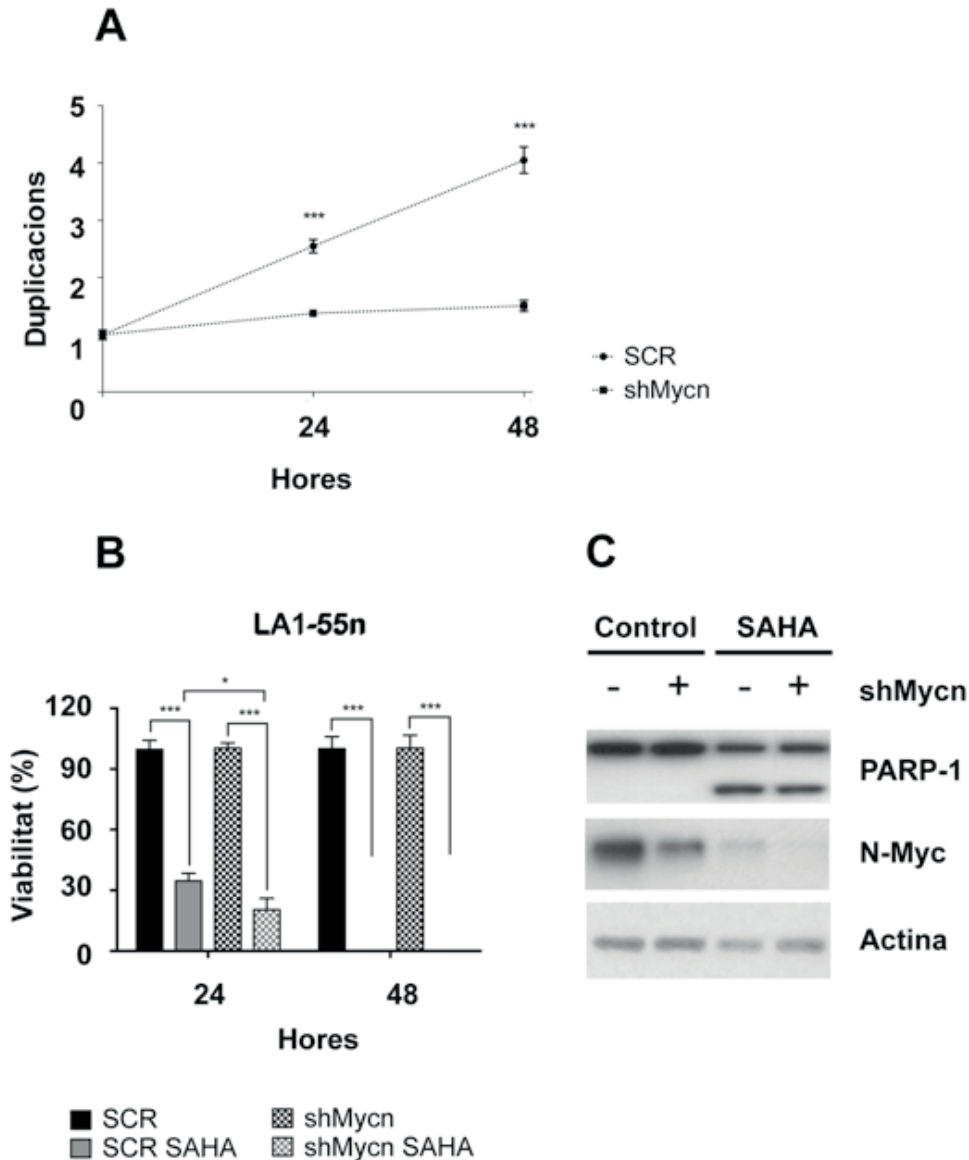


Figura 2.9: Efecte de la silenciació de N-Myc en cèl·lules LA1-55n tractades amb SAHA. A) Corbes de proliferació de cèl·lules LA1-55n infectades amb un vector de control o un vector inhibidor de l'expressió de N-Myc (shMycn). Els punts representen el nombre de duplicacions \pm S.E.M. *** $p < 0,001$ (2way ANOVA + Tukey's test). B) Anàlisi de la viabilitat cel·lular després del tractament amb SAHA 2,5 μ M durant 24 o 48 hores pel mètode MTS. Els valors representen el percentatge de cèl·lules viables respecte al control \pm S.E.M. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ 2way ANOVA + Tukey's test). C) Anàlisi de l'expressió proteica per Western blot 24 hores després del tractament amb SAHA 2,5 μ M.

Per començar, s'ha utilitzat la línia cel·lular SK-N-AS per estudiar l'efecte de la sobreexpressió de N-Myc en la resposta al SAHA. Els resultats mostren un augment en la taxa de proliferació en les cèl·lules infectades amb el vector lentiviral de sobreexpressió de N-Myc (figura 2.8A). Tot i això, la sobreexpressió de N-Myc no afecta la pèrdua de viabilitat ni l'activació de l'apoptosi induïdes en resposta al tractament amb SAHA (figura 2.8B i C). Cal destacar que les cèl·lules que sobreexpressen N-Myc no redueixen els seus nivells en resposta al tractament, a diferència de les línies cel·lulars amb sobreexpressió endògena (figura 2.8C). Això suggereix que l'expressió de N-Myc no està regulada per les HDACs en aquest context.

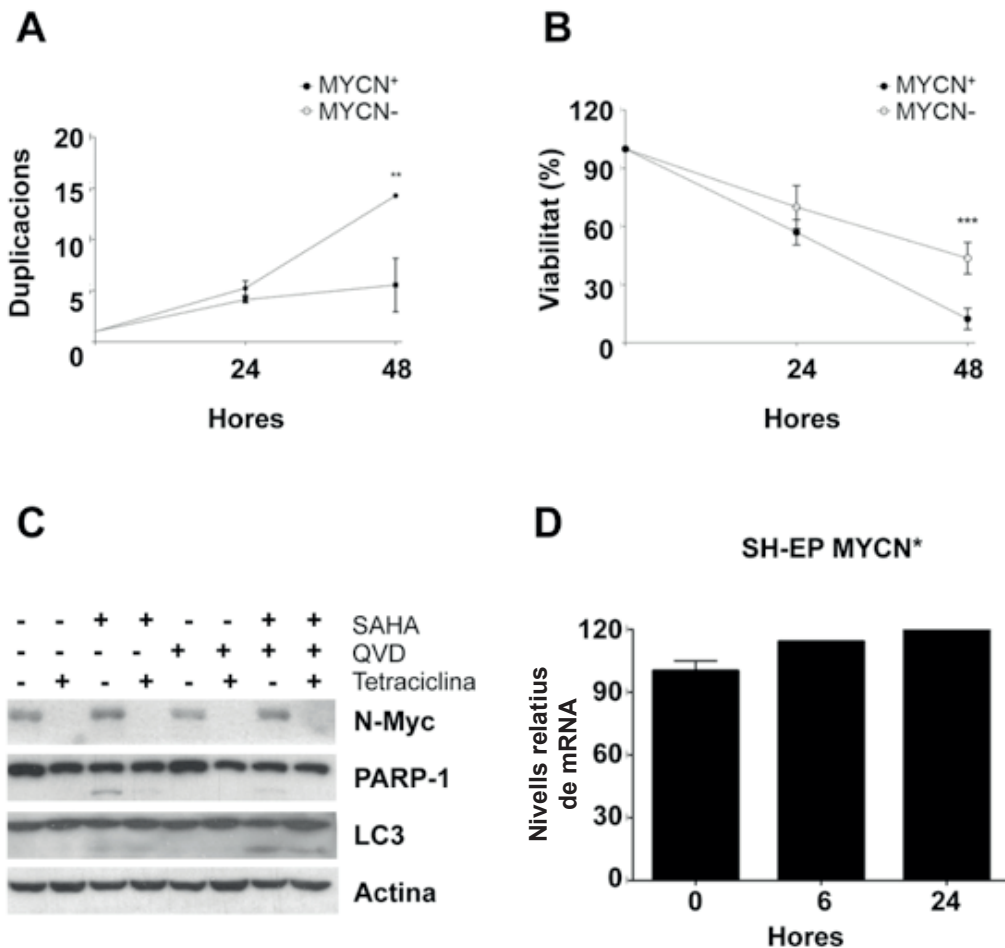


Figura 2.10: Efecte de la regulació transcripcional de N-Myc en cèl·lules SH-EP/Tet21N tractades amb SAHA. A) Corbes de proliferació de cèl·lules SH-EP/Tet21N cultivades amb o sense tetraciclina 1 µg/ml. Els valors representen el nombre de duplicacions ± S.E.M. (** p < 0,01 2way ANOVA + Tukey's test). B) Anàlisi de la viabilitat cel·lular després del tractament amb SAHA 2,5 µM durant 24 o 48 hores. Els valors representen el percentatge de cèl·lules viables respecte al control ± S.E.M. (***) p < 0,001 2way ANOVA + Tukey's test). C) Western blot de proteïnes associades al cicle cel·lular (N-Myc), l'apoptosi (PARP-1) i l'autofàgia (LC3). L'anàlisi es va realitzar després de 24 hores d'incubació amb SAHA 2,5 µM. D) Anàlisi dels nivells relatius de mRNA per qRT-PCR després dels temps indicats en cèl·lules tractades amb 2,5 µM de SAHA. Els valors representen el percentatge respecte al control no tractat ± S.E.M.

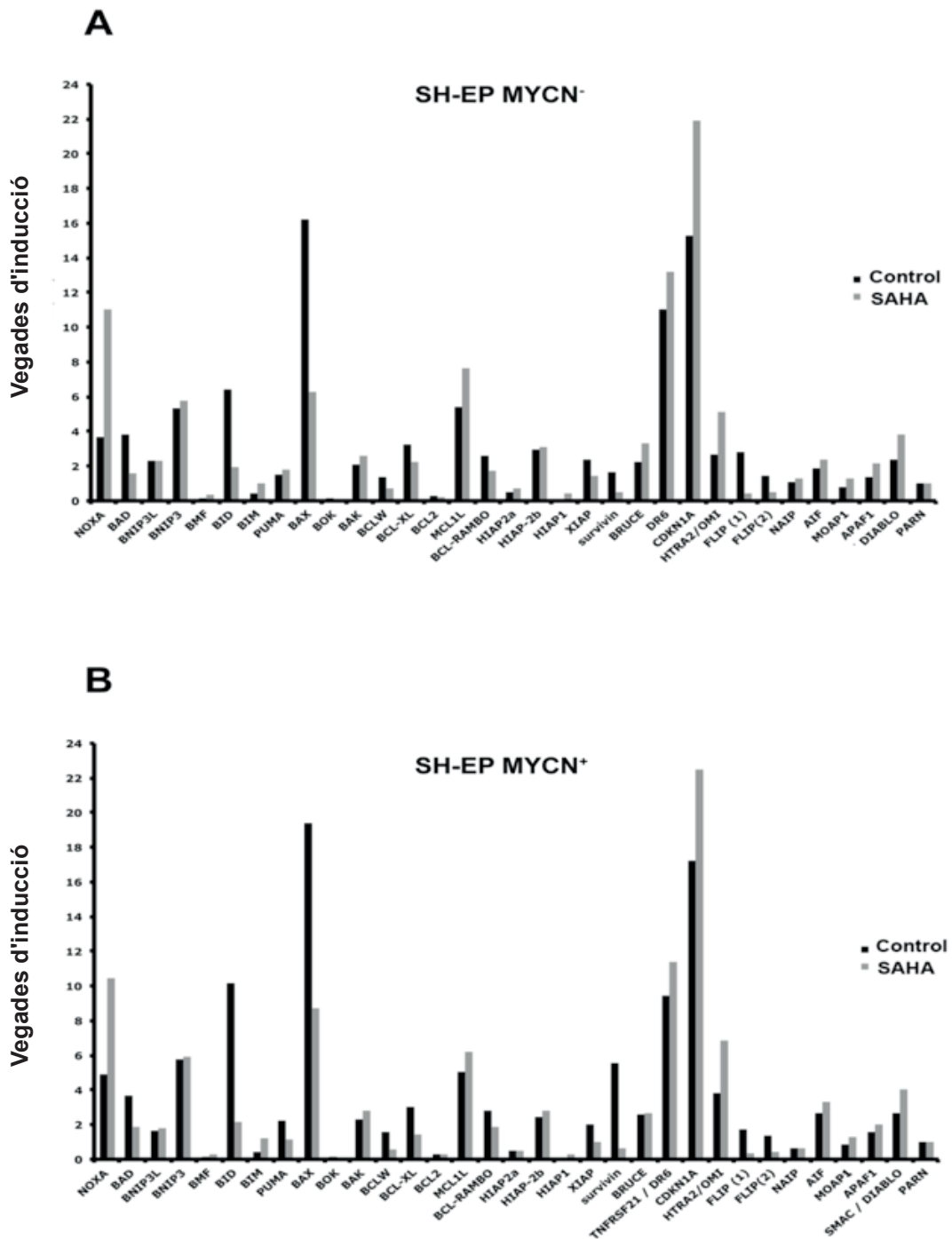


Figura 2.11: Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi modificats pel tractament amb SAHA. Les cèl·lules van ser incubades durant 24 hores amb SAHA 2,5 μ M, en presència (A) o absència (B) de tetraciclina 1 μ g/ml. L'expressió dels gens relacionats amb l'apoptosi es va analitzar per RT-MLPA. Els resultats es mostren com a vegades d'inducció vers les cèl·lules no tractades. Els nivells de mRNA estan normalitzats per el gen *PARN*.

En segon lloc, l'estudi de la silenciació de N-Myc s'ha fet en la línia cel·lular LA1-55n. Amb aquesta finalitat, les cèl·lules s'han infectat prèviament amb un vector lentiviral que expressa un *short hairpin* RNA (shRNA) que impedeix la traducció del mRNA de N-Myc. La silenciació de N-Myc amb aquest sistema ha disminuït els nivells cel·lulars de la proteïna en un 60%, reduint dràsticament la proliferació (figura 2.9A). La disminució dels nivells de N-Myc augmenta lleument la sensibilitat al tractament amb SAHA a 24 hores (figura 2.9B), indicant que la silenciació parcial de N-Myc potencia l'efecte del SAHA en aquesta línia cel·lular.

Finalment, s'ha estudiat l'efecte de la sobreexpressió de N-Myc i la seva repercussió sobre la resposta al SAHA en la línia cel·lular SH-EP/*Tet21N*. L'anàlisi de la taxa de proliferació mostra com la sobreexpressió de N-Myc augmenta la proliferació en aquesta línia cel·lular (figura 2.10A). Pel que fa al tractament amb SAHA, les cèl·lules que sobreexpressen N-Myc resulten més sensibles en comparació amb les cèl·lules sense nivells detectables d'aquesta proteïna (figura 2.10B). Com ja s'ha observat en les cèl·lules SK-N-AS, el tractament amb SAHA no redueix el mRNA ni la proteïna N-Myc (figura 2.10C-D). L'examen de la proteòlisi de PARP-1 indica un augment en la resposta apoptòtica al tractament amb SAHA quan es sobreexpressa N-Myc (figura 2.10C). Tot i això, el perfil d'expressió de factors involucrats en la via apoptòtica no mostra variacions consistents entre les cèl·lules amb i sense sobreexpressió de N-Myc (figura 2.11A i B).

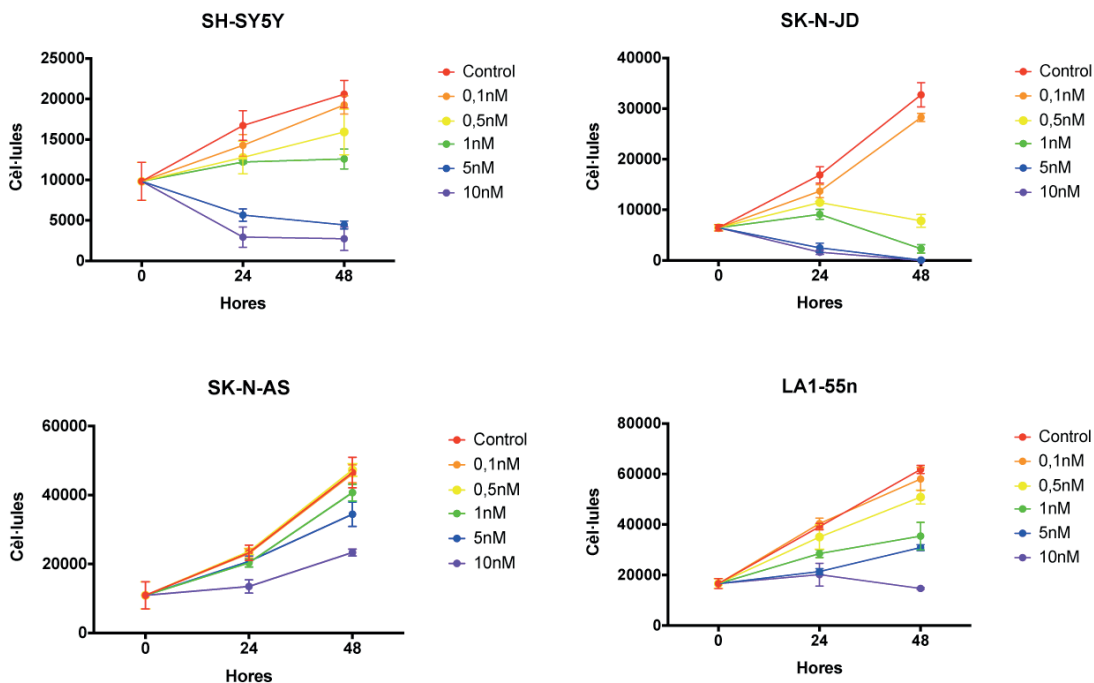
En definitiva, els resultats obtinguts indiquen que N-Myc juga un paper important en la proliferació de les cèl·lules de neuroblastoma. La reducció dels nivells de N-Myc observada en les cèl·lules amb sobreexpressió endògena, però no exògena, suggereix que SAHA regula el contingut cel·lular d'aquesta proteïna a nivell transcripcional. Finalment, el paper de N-Myc en la resposta al SAHA sembla dependre de la línia cel·lular.

3. Efecte de l'Actinomicina D en línies de neuroblastoma humà

L'ACTINOMICINA D DISMINUEIX LA VIABILITAT EN CÈL·LULES DE NEUROBLASTOMA

Els efectes de la inhibició de la RNA polimerasa I en cèl·lules de neuroblastoma s'han estudiat utilitzant l'Actinomicina D, un fàrmac emprat en clínica pel tractament de tumors embrionals i infantils (Metzger & Dome 2005; Aghajanian 2011; Miser et al. 2004). S'han utilitzat concentracions inferiors a 10nM, ja que s'ha demostrat que inhibeixen la RNA polimerasa I sense interferir amb l'activitat de les altres RNA polimerases (Perry & Kelley 1970).

El tractament amb actinomicina D causa la pèrdua de viabilitat en totes les línies cel·lulars examinades (figura 3.1). Tot i així, no tots els tipus cel·lulars mostren el mateix grau de sensibilitat al compost. Les línies cel·lulars SH-SY5Y i SK-N-JD, que expressen la forma *wild type* (wt) de la proteïna p53, redueixen la seva viabilitat més ràpidament i a concentracions menors. Per contra, les línies LA1-55n i SK-N-AS que, respectivament, no expressen la proteïna p53 o no presenten una forma transcripcionalment activa, són menys sensibles al tractament. Aquestes diferències suggereixen que p53 és un factor determinant en la sensibilitat al tractament amb actinomicina D.

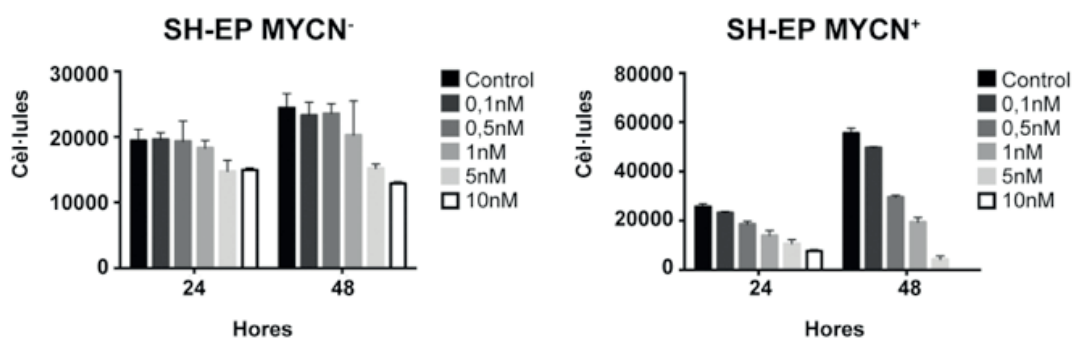


ESTAT DE TP53	LÍNIA CEL·LULAR	ED ₅₀ 24h	ED ₅₀ 48h
Wild type	SH-SY5Y	2,83	1,41
	SK-N-JD	1,23	0,36
Mutat	SK-N-AS	31,3	4,66
	LA1-55n	22,9	2,2

Figura 3.1 L'actinomicina D disminueix la viabilitat cel·lular en el neuroblastoma. Les cèl·lules de neuroblastoma van ser tractades durant 24 o 48 hores amb diferents concentracions d'actinomicina D. El nombre de cèl·lules viables es va determinar per MTS (SK-N-JD, LA1-55n i SH-SY5Y) o per tinció amb cristall violeta (SK-N-AS). Els valors representen el nombre de cèl·lules viables ± S.E.M. | La taula expressa els valors de ED₅₀ a diferents temps en les línies cel·lulars examinades.

N-MYC SENSIBILITZA LES CÈL·LULES DE NEUROBLASTOMA AL TRACTAMENT AMB ACTINOMICINA D

La família de factors de transcripció Myc està íntimament relacionada amb la biogènesi ribosòmica. Tant N-Myc com c-Myc regulen transcripcionalment les proteïnes ribosòmiques i nombrosos factors de maduració del ribosoma (Boon et al. 2001; van Riggelen et al. 2010). Pel que fa la proteïna c-Myc, s'ha demostrat una correlació entre la expressió de c-Myc i la sensibilitat a la inhibició de la biogènesi ribosòmica (Kim et al. 2011). Així doncs, s'ha formulat la hipòtesi de que N-Myc podria sensibilitzar les cèl·lules de neuroblastoma al tractament amb actinomicina D. Els resultats obtinguts suggereixen que, en un mateix context genètic de p53, existeix una correlació entre la sensibilitat al compost i la sobreexpressió de N-Myc (figura 3.1). Per determinar el paper de N-Myc en la resposta al SAHA, s'ha avaluat l'efecte del tractament sobre la viabilitat utilitzant la línia SH-EP/*Tet21N*, descrita anteriorment. El tractament amb diferents concentracions d'actinomicina D mostra que les cèl·lules que sobreexpressen N-Myc resulten ser més sensibles en comparació a les cèl·lules amb el promotor exogen silenciït (figura 3.2). Aquests resultats suggereixen que N-Myc sensibilitza les cèl·lules al tractament amb actinomicina D.



ESTAT DE N-MYC	ED ₅₀ 24h	ED ₅₀ 48h
Amplificat	2,31	0,41
No amplificat	11,4	9,99

Figura 3.2: N-Myc augmenta la sensibilitat al tractament amb actinomicina D. Anàlisi de la proliferació cel·lular en cèl·lules SH-EP/*Tet21N* cultivades en presència (MYCN⁻) o absència (MYCN⁺) de tetraciclina 1 µg/ml, mesurat pel mètode de tinció amb cristall violeta. Els anàlisis es van realitzar 24 o 48 hores després del tractament amb actinomicina D. Els resultats representen la mitjana dels triplicats ± S.E.M. | La taula expressa els valors de ED₅₀ a diferents temps en les línies cel·lulars examinades.

L'ACTINOMICINA D INDUEIX LA PÈRDUA DE VIABILITAT MITJANÇANT MECANISMES DEPENDENTS I INDEPENDENTS A L'APOPTOSI

Estudis previs mostren com l'actinomicina D activa l'apoptosi únicament en cèl·lules que expressen p53 (Choong et al. 2009). Per tal d'investigar si l'apoptosi sensibilitzava les línies cel·lulars en funció de p53, s'ha analitzat la proteòlisi de PARP-1 en les línies SK-N-JD i LA1-55n.

Estudis previs han demostrat que el tractament amb dosis baixes d'actinomicina D inhibeix la biogènesi ribosòmica, provocant la interacció del complex pre-ribosòmic RPL5/RPL11/S5 RNA amb MDM2. Aquesta interacció impedeix la funció ubiquitina lligasa de MDM2, estabilitzant p53 i activant el programa apoptòtic (Donati et al. 2013). D'acord amb aquest model, el tractament amb actinomicina D indueix la proteòlisi de PARP-1 en la línia cel·lular SK-N-JD (figura 3.3A). La proteòlisi de PARP-1 correlaciona amb l'augment dels nivells de p53 i de les seves dianes transcripcionals MDM2 i p21. A més, s'ha observat una disminució en els nivells dels factors de transcripció E2F1 i N-Myc. La incubació simultània amb l'actinomicina D i l'inhibidor de caspases Oph-QVD reverteix tant l'efecte de l'actinomicina D sobre la viabilitat cel·lular (figura 3.4A) com la reducció dels nivells de E2F1 i N-Myc (figura 3.4C).

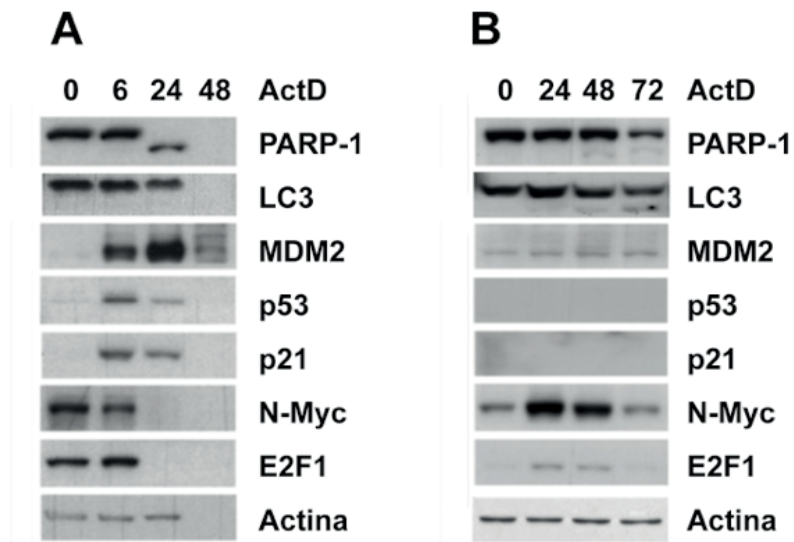


Figura 3.3: Efecte de l'actinomicina D en diferents línies de neuroblastoma depèn de p53. Anàlisi per *Western blot* dels nivells de diferents proteïnes associades a la proliferació, la supervivència i a processos de mort cel·lular al llarg del temps. Les línies cel·lulars SK-N-JD (A) i LA1-55n (B) van ser tractades amb actinomicina D 10nM durant els temps indicats.

En quant a la línia cel·lular LA1-55n, el tractament amb actinomicina D no hidrolitza PARP-1, suggerint que l'apoptosi no resulta activada (figura 3.3B). A més, s'observa la conversió de LC3-I a LC3-II, suggerint l'activació de l'autofàgia. Aquesta observació suggereix que l'autofàgia podria tenir un paper en la resposta al tractament amb actinomicina D en les cèl·lules que no expressen p53. A continuació, s'ha analitzat si la inhibició de les caspases revertia l'efecte causat per l'actinomicina D. A diferència dels resultats obtinguts en la línia SK-N-JD, el tractament simultani amb Oph-QVD no impedeix la pèrdua de viabilitat provocada per l'actinomicina D (figura 3.4C), suggerint que l'activació de les caspases no és responsable d'aquest fenomen.

Recapitulant, els resultats obtinguts indiquen que la mort cel·lular observada en les cèl·lules SK-N-JD és deguda a l'activació de l'apoptosi dependent de p53. En les cèl·lules LA1-55n, en canvi, la reducció de la viabilitat no és deguda a l'activació de les caspases.

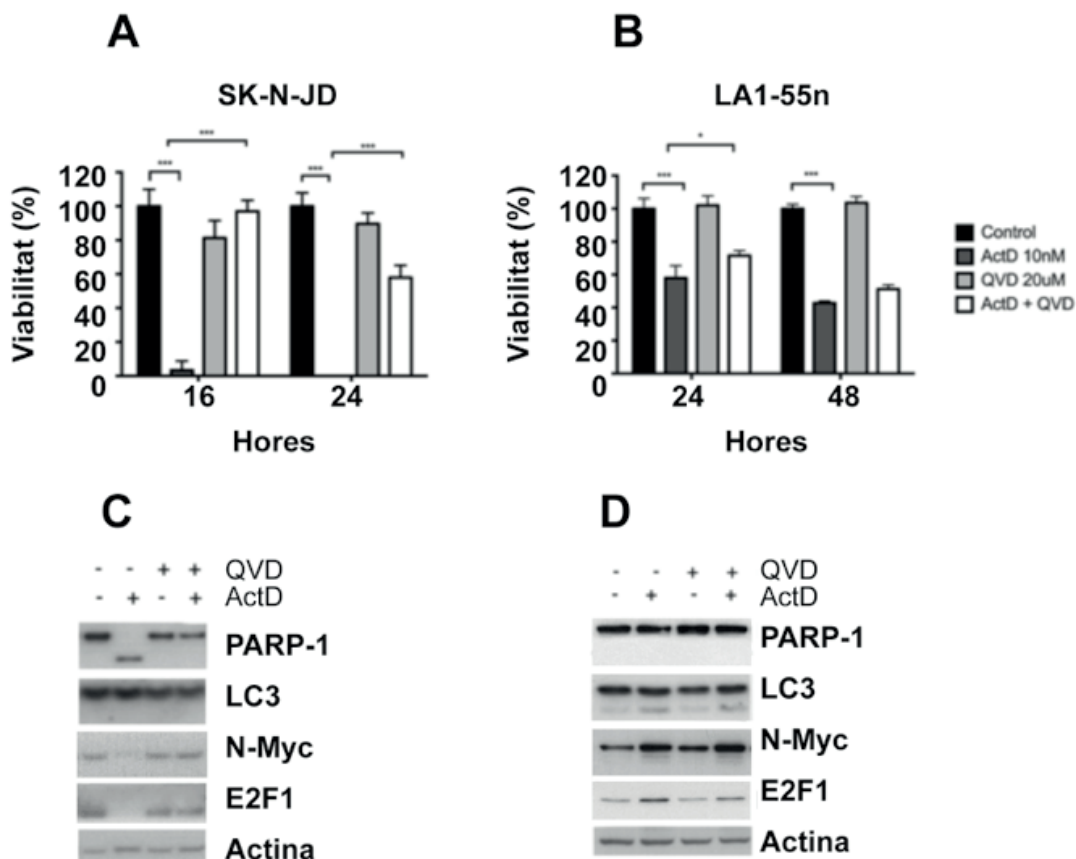


Figura 3.4: Inhibició de les caspases en cèl·lules de neuroblastoma tractades amb actinomicina D. A i B) Gràfiques de viabilitat de les línies SK-N-JD (A) i LA1-55n (B) tractades amb actinomicina D 10nM i Oph-QVD 20 μ M durant diferent temps. Els resultats es van mesurar per MTS. Els valors representen el percentatge respecte al control no tractat \pm S.E.M. (* p <0.05; *** p <0.001 2way ANOVA + Tukey's test). C i D) Anàlisi per *Western blot* dels nivells de proteïnes associades a la proliferació, la supervivència i a processos de mort cel·lular 24h després del tractament amb actinomicina D i Oph-QVD 20 μ M.

L'ACTINOMICINA D INDUEIX CANVIS EN EL CICLE CEL·LULAR EN CÈL·LULES DE NEUROBLASTOMA

Estudis realitzats en cèl·lules de càncer colorectal han demostrat com el tractament amb actinomicina D indueix tant l'apoptosi com l'aturada del cycle cel·lular (Choong et al. 2009). Els resultat obtinguts per citometria de flux confirmen com el tractament amb actinomicina D 10nM altera la progressió del cycle cel·lular en les dues línies cel·lulars utilitzades. Els resultats mostren com l'actinomicina D redueix la població de cèl·lules en fase G0/G1 en la línia cel·lular SK-N-JD, al mateix temps que augmenta la població de cèl·lules en G2/M (figura 3.5C i D). D'altra banda, s'observa també un augment de la població de cèl·lules en fase Sub-G1, indicant la fragmentació del DNA.

En la línia cel·lular LA1-55n, el tractament amb actinomicina D indueix l'acumulació de les cèl·lules en fase G0/G1 i la disminució de les cèl·lules en fase S (figura 3.5A i B), suggerint l'activació d'un punt de control del cycle cel·lular en fase G1. L'anàlisi mostra també un lleuger augment del pic sub-G1, indicant que el DNA també és fragmentat en aquesta línia cel·lular.

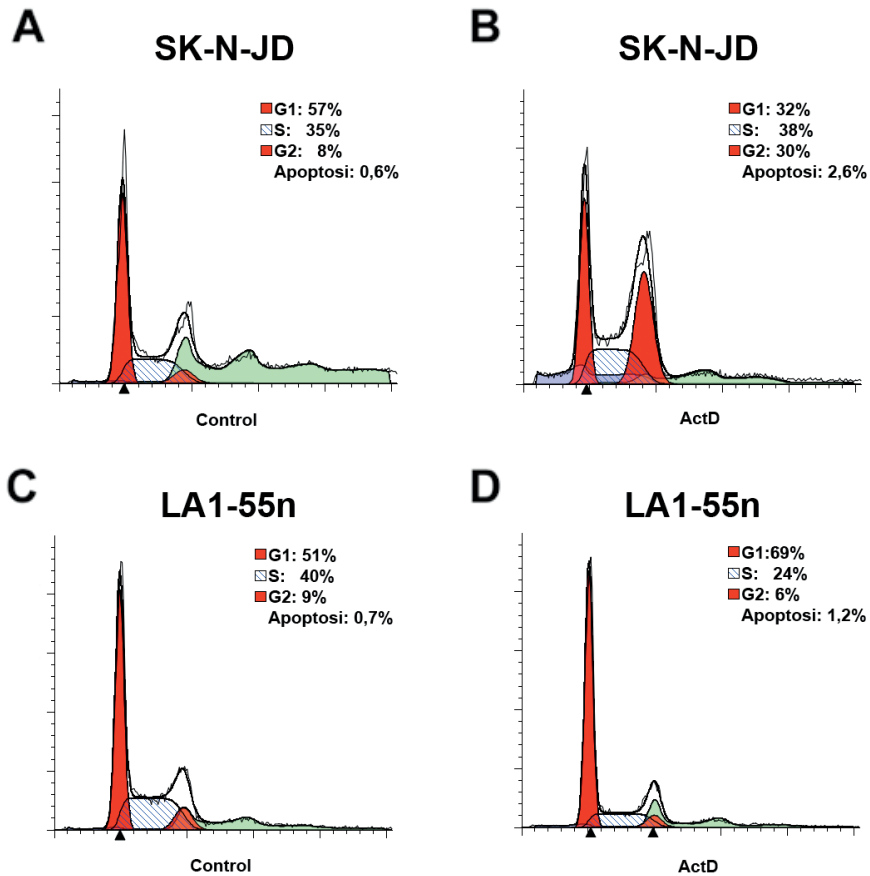
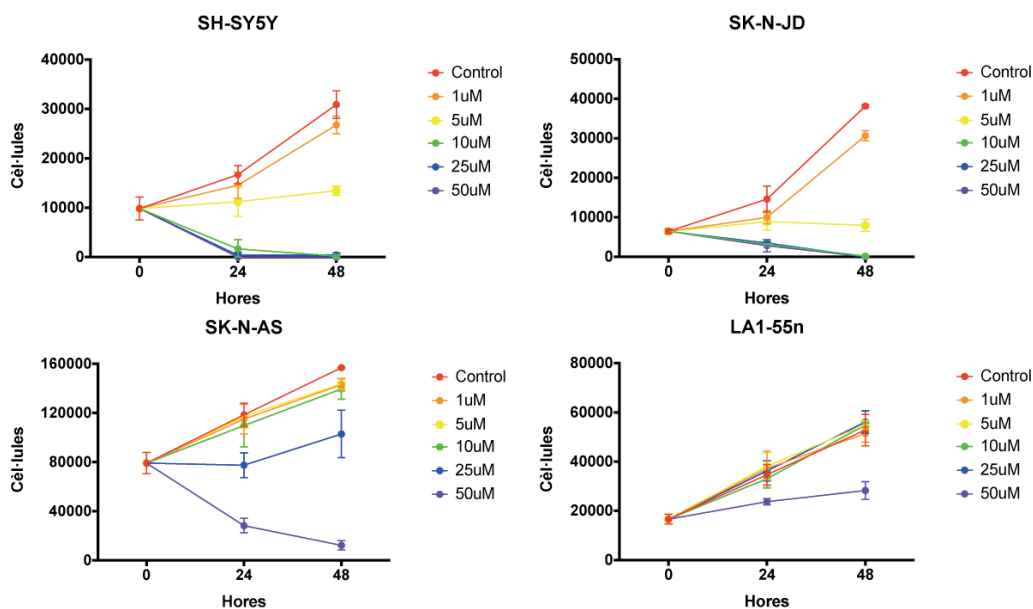


Figura 3.5: Efecte de l'actinomicina D sobre el cycle cel·lular de cèl·lules de neuroblastoma. A-B) Anàlisi del cycle cel·lular en la línia SK-N-JD després de 24 hores d'incubació amb el vehicle control (A) o actinomicina D 10nM (B). C-D) Anàlisi del cycle cel·lular en la línia LA1-55n després de 24 hores d'incubació amb el vehicle control (C) o actinomicina D 10nM (D). Els percentatges de G1, S i G2 són la fracció del total de cèl·lules diploides examinades. Les cèl·lules apoptòtiques s'han comptat com el percentatge del nombre total d'esdeveniments.

4. Efecte de la Nutlina-3 en línies de neuroblastoma humà

LA NUTLINA-3 DISMINUEIX LA VIABILITAT EN CÈL·LULES DE NEUROBLASTOMA

Per comprovar fins a quin punt l'activació de p53 determina els efectes desencadenats per l'actinomicina D, s'han estudiat els efectes de la nutlina-3 sobre línies cel·lulars de neuroblastoma. Aquesta droga s'uneix al domini d'interacció amb p53 de MDM2, impedit-li exercir la seva funció reguladora sobre p53 (Vassilev et al. 2004). Donada l'especificitat de la nutlina-3 (Tovar et al. 2006), els efectes desencadenats per aquesta podrien donar informació sobre la incidència de l'activació de p53 en la resposta a l'actinomicina D. Per començar, s'ha estudiat



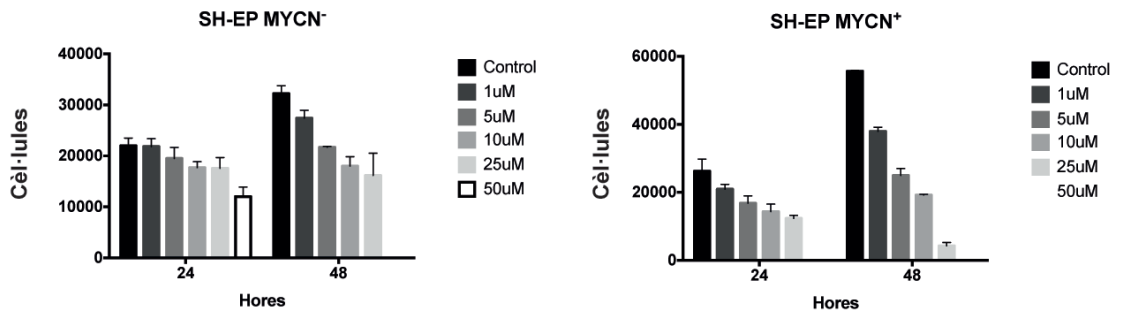
ESTAT DE TP53	LÍNIA CELL	ED ₅₀ 24h	ED ₅₀ 48h
Wild type	SH-SY5Y	2,52	2,6
	SK-N-JD	4,91	2,06
Mutat	SK-N-AS	28,5	23,2
	LA1-55n	51,2	50,1

Figura 4.1 Efecte de la nutlina-3 sobre la viabilitat cel·lular en el neuroblastoma. Les cèl·lules de neuroblastoma van ser tractades durant 24 o 48 hores amb diferents concentracions de nutlina-3. El nombre de cèl·lules viables es va determinar per MTS (SK-N-JD, LA1-55n i SH-SY5Y) o per tinció amb cristall violeta (SK-N-AS). Els valors representen el nombre de cèl·lules viables ± S.E.M. La taula expressa els valors de ED₅₀ a diferents temps en les línies cel·lulars examinades.

l'efecte del tractament amb nutlina-3 sobre la viabilitat cel·lular en diferents línies cel·lulars de neuroblastoma. La nutlina-3 causa una disminució del nombre de cèl·lules en totes les línies cel·lulars examinades, tot i que no totes les línies presenten la mateixa sensibilitat a aquest fàrmac. Les línies SH-SY5Y i SK-N-JD mostren una pèrdua de viabilitat ja a concentracions de l'ordre 5 µM. D'altra banda, les línies LA1-55n i SK-N-AS responen al tractament a dosis molt més elevades (figura 4.1), confirmant la major sensibilitat de les cèl·lules que expressen una proteïna p53wt.

N-MYC SENSIBILITZA LES CÈL·LULES DE NEUROBLASTOMA AL TRACTAMENT AMB NUTLINA-3

Nombrosos estudis demostren com les proteïnes de la família Myc estan implicades en la transcripció de diferents factors que regulen la proteïna p53 (Bell et al. 2010). Així doncs, N-Myc podria sensibilitzar les cèl·lules al tractament amb nutlina-3. Per verificar aquesta hipòtesi, s'ha analitzat l'efecte d'aquest compost en la línia cel·lular SH-EP/*Tet21N*, comparant el seu efecte en cèl·lules amb i sense sobreexpressió de N-Myc. Els resultats demostren com les cèl·lules que sobreexpressen N-Myc són més sensibles al tractament amb nutlina-3, en comparació a les cèl·lules sense sobreexpressió de N-Myc. Això suggereix que N-Myc contribueix a la sensibilitat al tractament amb nutlina-3, de forma anàloga als resultats obtinguts en aquesta línia cel·lular per l'actinomicina D (figura 4.2).



ESTAT DE N-MYC	ED ₅₀ 24h	ED ₅₀ 48h
Amplificat	4,02	1,06
No amplificat	58,4	2,6

Figura 4.2 N-Myc augmenta la sensibilitat al tractament amb nutlina-3. Anàlisi de la proliferació cel·lular en cèl·lules SH-EP/*Tet21N* cultivades en presència (MYCN⁻) o absència (MYCN⁺) de tetraciclina 1 µg/ml, mesurat pel mètode de tinció amb cristall violeta. Els anàlisis es van realitzar 24 o 48 hores després del tractament amb nutlina-3. Els resultats representen la mitjana dels triplicats ± S.E.M. | La taula expressa els valors de ED₅₀ a diferents temps en les línies cel·lulars examinades.

LA NUTLINA-3 INDUEIX LA MORT CEL·LULAR MITJANÇANT L'ACTIVACIÓ DE L'APOPTOSI EN LES CÈL·LULES QUE EXPRESSEN p53

La proteïna p53 pot provocar l'aturada del cycle cel·lular o l'apoptosi depenent de l'estímul que indueix el seu augment (Wade et al. 2013). Per determinar el mecanisme causant de la pèrdua de viabilitat en les línies cel·lulars, s'ha analitzat l'efecte apoptòtic de la nutlina-3. Els resultats mostren que el tractament amb nutlina-3 10 μ M indueix la proteòlisi de PARP-1 en la línia cel·lular SK-N-JD, indicant l'activació de l'apoptosi (figura 4.3A). El tractament també causa l'augment dels nivells de p53, MDM2 i p21, i la reducció dels nivells proteics d'E2F1 i N-Myc. Aquest resultat concorden amb els observats pel tractament amb actinomicina D, suggerint que l'activació de la via p53 determina els efectes causats per aquest compost.

La línia LA1-55n, que no expressa p53, no sembla activar l'apoptosi en resposta al tractament amb nutlina-3 10 μ M (figura 4.3B). L'expressió de les proteïnes analitzades no sembla sofrir cap canvi significatiu, corroborant els resultats de l'anàlisi de la proliferació cel·lular (figura 4.1).

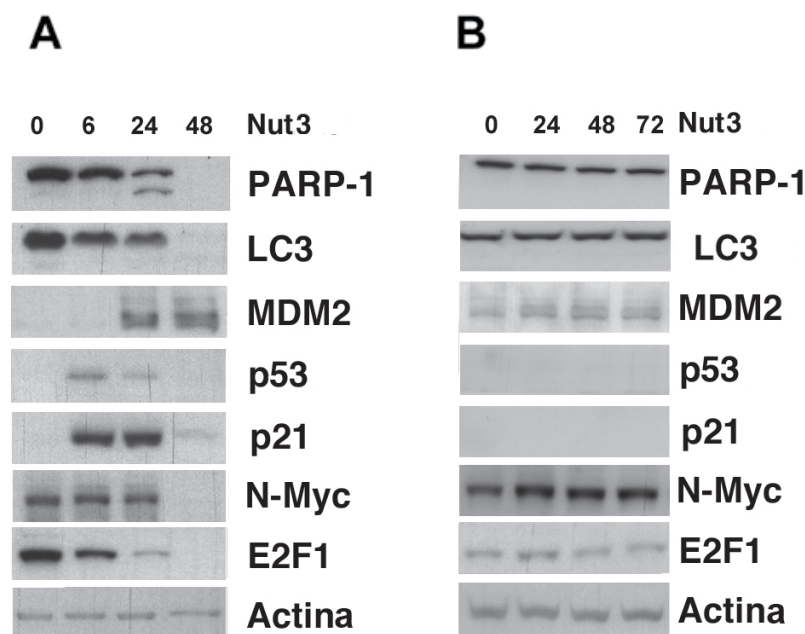


Figura 4.3: L'Efecte de la nutlina-3 en diferents línies de neuroblastoma depèn de l'estat de p53. Anàlisi per *Western blot* dels nivells de proteïnes associades a la proliferació, la supervivència i a processos de mort cel·lular al llarg del temps. Les línies cel·lulars SK-N-JD (A) i LA1-55n (B) van ser tractades amb nutlina-3 10 μ M durant els temps indicats.

A continuació, s'ha estudiat si la inhibició de les caspases podia revertir els efectes de la nutlina-3 en la línia SK-N-JD. El tractament conjunt amb nutlina-3 i l'inhibidor de caspases Oph-QVD reverteix completament l'efecte del compost sobre la viabilitat cel·lular (figura 4.4A), així com la reducció dels nivells de E2F1 i N-Myc (figura 4.4C). D'altra banda, la línia cel·lular LA1-55n no mostra cap efecte sobre la viabilitat o l'expressió de les proteïnes examinades. Aquests resultats indiquen que la nutlina-3 indueix l'apoptosi de manera dependent de p53 en les cèl·lules de neuroblastoma, de forma anàloga al tractament amb actinomicina D.

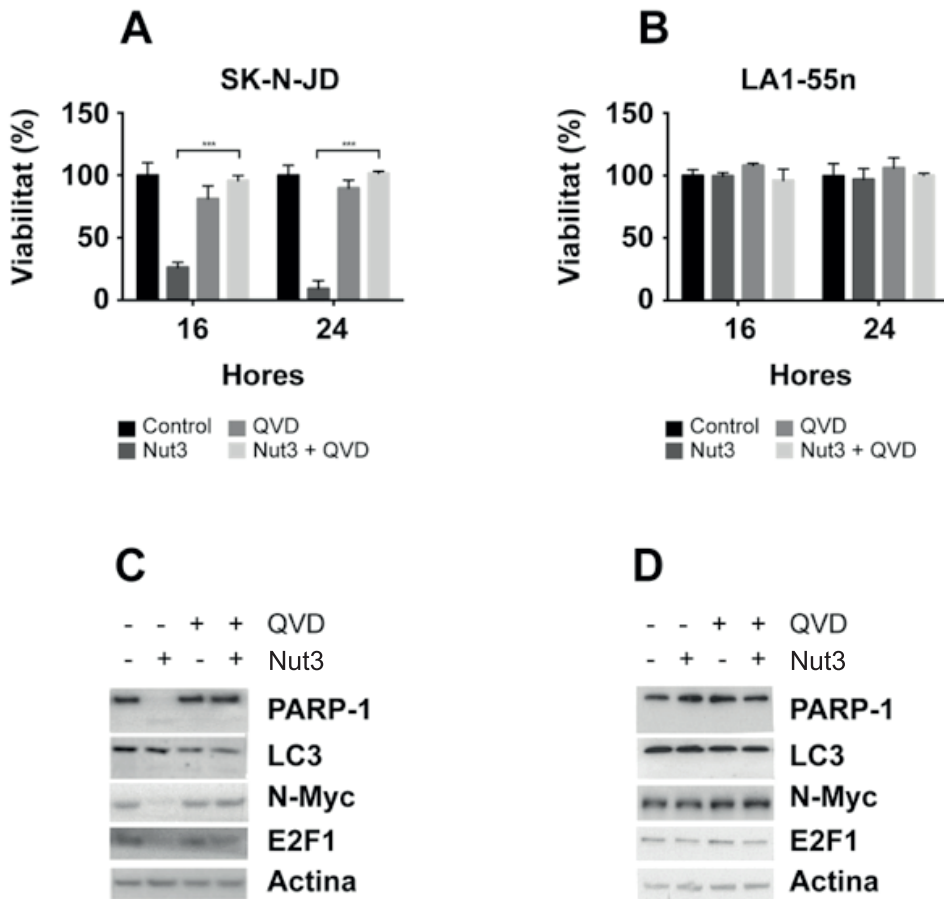


Figura 4.4: Efecte de la inhibició de les caspases en cèl·lules SK-N-JD i LA1-55n tractades amb nutlina-3. A i B) Gràfiques de viabilitat de les línies SK-N-JD (A) i LA1-55n (B) tractades amb nutlina-3 10 µM i Oph-QVD 20 µM durant diferents temps. Els resultats es van mesurar per MTS. Els valors representen el percentatge respecte al control no tractat ± S.E.M. (***)p<0.001 2way ANOVA + Tukey's test). C i D) Anàlisi per *Western blot* dels nivells de proteïnes associades a la proliferació, la supervivència i a processos de mort cel·lular 24h després del tractament amb nutlina-3 i Oph-QVD 20 µM.

LA NUTLINA-3 INDUEIX L'ATURADA DEL CICLE CEL·LULAR EN CÈL·LULES QUE EXPRESSEN p53

Finalment, s'ha volgut comprovar l'efecte de la nutlina-3 en la progressió del cicle cel·lular de les línies de neuroblastoma. Amb aquesta finalitat, les línies SK-N-JD i LA1-55n s'han incubat amb la droga durant 24 hores, després de les quals s'han analitzat les diferents poblacions cel·lulars per citometria de flux.

Les cèl·lules SK-N-JD mostren una reducció de la població cel·lular en fase S i la conseqüent acumulació de cèl·lules en fase G0/G1 i G2/M (figura 4.5A i B), indicant l'aturada del cicle cel·lular (figura 4.3). Al contrari, la línia LA1-55n mostra menys variació en la distribució de les fases del cicle cel·lular (figura 4.C i D).

En definitiva, podem concloure que la nutlina-3 indueix l'apoptosi i l'aturada del cicle cel·lular en les cèl·lules de neuroblastoma que expressen p53. Les cèl·lules que no expressen aquesta proteïna, en canvi, no semblen ser sensibles al tractament a concentracions que resulten letals per les cèl·lules amb expressió de p53.

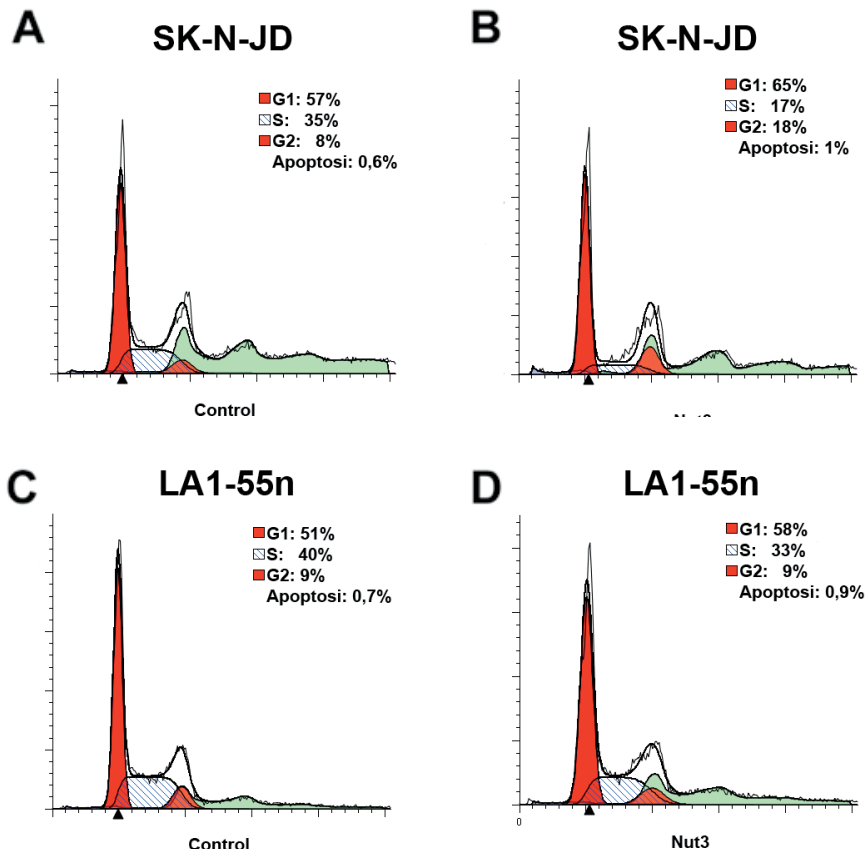
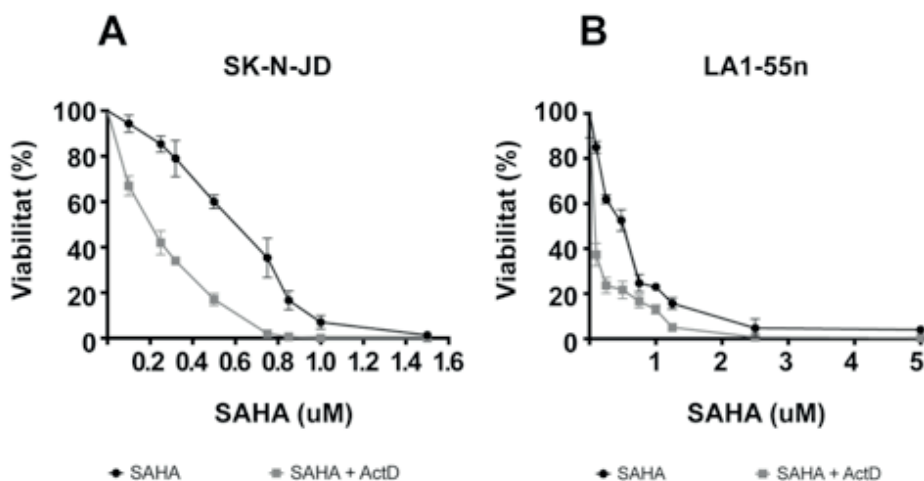


Figura 4.5: Efecte de la nutlina-3 sobre el cicle cel·lular de cèl·lules de neuroblastoma. A-B) Anàlisi del cicle cel·lular en la línia SK-N-JD després de 24 hores d'incubació amb el vehicle control (A) o nutlina-3 10 μ M (B). C-D) Anàlisi del cicle cel·lular en la línia LA1-55n després de 24 hores d'incubació amb el vehicle control (C) o nutlina-3 10 μ M (D). Els percentatges de G1, S i G2 són la fracció del total de cèl·lules diploides examinades. Les cèl·lules apoptòtiques s'han comptat com el percentatge del nombre total d'esdeveniments.

5. Efecte de la combinació de SAHA amb actinomicina D i nutlina-3

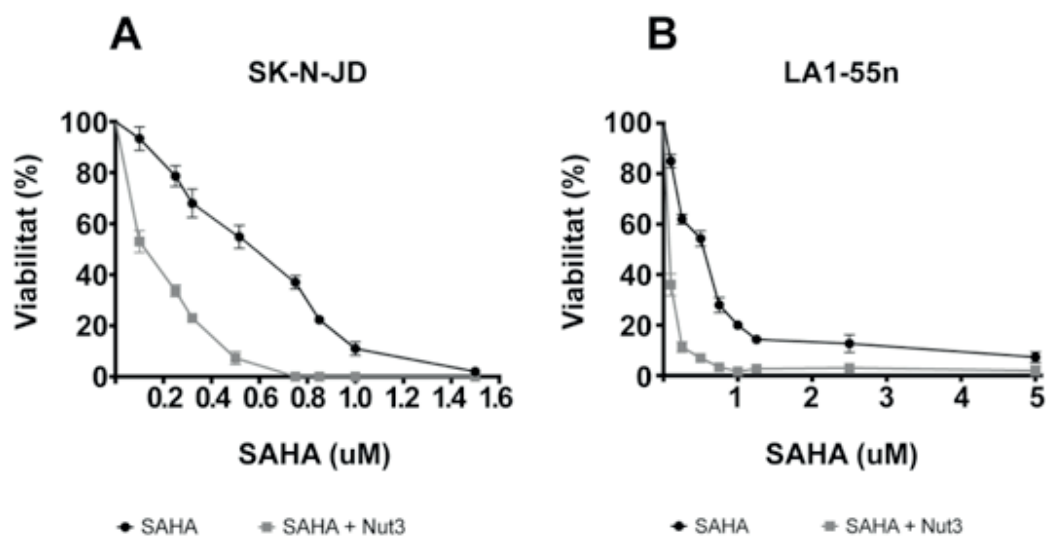
LA COMBINACIÓ DE SAHA AMB ACTINOMICINA D O NUTLINA-3 POTENCIA L'EFECTE SOBRE LA VIABILITAT CEL·LULAR

Nombrosos assajos preclínic i clínic han proporcionat informació suficient per considerar el SAHA com a un potencial adjuvant en el tractament de diferents tumors, inclòs el neuroblastoma (Witt et al. 2012; Spiller et al. 2008; Kerl et al. 2013; Heinicke & Fulda 2014). El nostres resultats, juntament amb aquests antecedents, ens han portat a estudiar l'efecte del SAHA en combinació amb altres drogues. Amb aquest propòsit, s'ha comparat l'efecte del tractament amb SAHA en presència o absència de concentracions equivalents a l'ED₅₀ de l'actinomicina D. La combinació de drogues indueix una potenciació significativa en l'efecte sobre la viabilitat en comparació al tractament únicament amb SAHA, tant en les cèl·lules SK-N-JD com en la línia LA1-55n (figura 5.1). La combinació de SAHA amb nutlina-3 mostra un efecte similar en ambdues línies cel·lulars (figura 5.2).



LÍNIA CEL·LULAR	ED ₅₀ SAHA (uM)	ED ₅₀ SAHA + ActD (uM)
SK-N-JD	0.52	0.23
LA1-55n	0.66	0.31

Figura 5.1 L'actinomicina D potencia l'efecte del SAHA. A) Anàlisi de la viabilitat en cèl·lules SK-N-JD després de 48 hores de tractament amb concentracions creixents de SAHA en presència o absència d'actinomicina D 0,25nM. Els resultats es van mesurar per MTS. Els valors representen la mitjana dels triplicats ± S.E.M. B) Anàlisi de la viabilitat en cèl·lules LA1-55n després de 48 hores de tractament amb concentracions creixents de SAHA, en presència o absència d'actinomicina D 0,25nM. Els resultats es van mesurar per MTS. Els valors representen la mitjana dels triplicats ± S.E.M. | La taula expressa els valors de ED₅₀ a diferents temps en les línies cel·lulars examinades.



LÍNIA CEL·LULAR	ED ₅₀ SAHA (µM)	ED ₅₀ SAHA + Nut3 (µM)
SK-N-JD	0.53	0.16
LA1-55n	0.66	0.38

Figura 5.2 La nutlina-3 potencia l'efecte del SAHA. A) Anàlisi de la viabilitat en cèl·lules SK-N-JD després de 48 hores de tractament amb concentracions creixents de SAHA en presència o absència de nutlina-3 2,5 µM. Els resultats es van mesurar per MTS. Els valors representen la mitjana dels triplicats ± S.E.M. B) Anàlisi de la viabilitat en cèl·lules LA1-55n després de 48 hores de tractament amb concentracions creixents de SAHA, en presència o absència de nutlina-3 50 µM. Els resultats es van mesurar per MTS. Els valors representen la mitjana dels triplicats ± S.E.M. | La taula expressa els valors de ED₅₀ a diferents temps en les línies cel·lulars examinades.

EL SAHA ACTUA SINÈRGICAMENT AMB L'ACTINOMICINA D I LA NUTLINA-3 EN LES CÈL·LULES DE NEUROBLASTOMA

El principal objectiu d'utilitzar combinacions de drogues és reduir les dosis utilitzades per tal d'aconseguir un efecte igual o major. Alhora, es disminueix la toxicitat deguda a efectes col·laterals. La potenciació de l'efecte sobre la viabilitat cel·lular al combinar el SAHA amb l'actinomicina D o la nutlina-3, prèviament descrit, suggereix una interacció positiva entre aquests fàrmacs. Per determinar el tipus d'interacció entre aquests compostos, s'han analitzat ambdues combinacions de drogues utilitzant el mètode de Chou-Talalay (Chou 2010). Aquest mètode, basat en la llei d'acció de masses, introdueix un paràmetre anomenat "índex de combinació" (CI). Aquesta constant és capaç de quantificar les tres possibles interaccions entre drogues: el sinergisme (CI<1), és a dir, la potenciació mútua de les drogues, l'addició (CI=1), i l'antagonisme (CI>1).

L'exposició simultània al SAHA i a l'actinomicina D mostra un efecte sinèrgic sobre la viabilitat, tant en les cèl·lules que expressen p53 com en les cèl·lules que no expressen aquesta proteïna (figura 5.3A, B i C). La combinació de SAHA amb nutlina-3 també genera un efecte sinèrgic en ambdues línies cel·lulars examinades, tot i que l'efecte és més consistent (figura 5.3D, E i F).

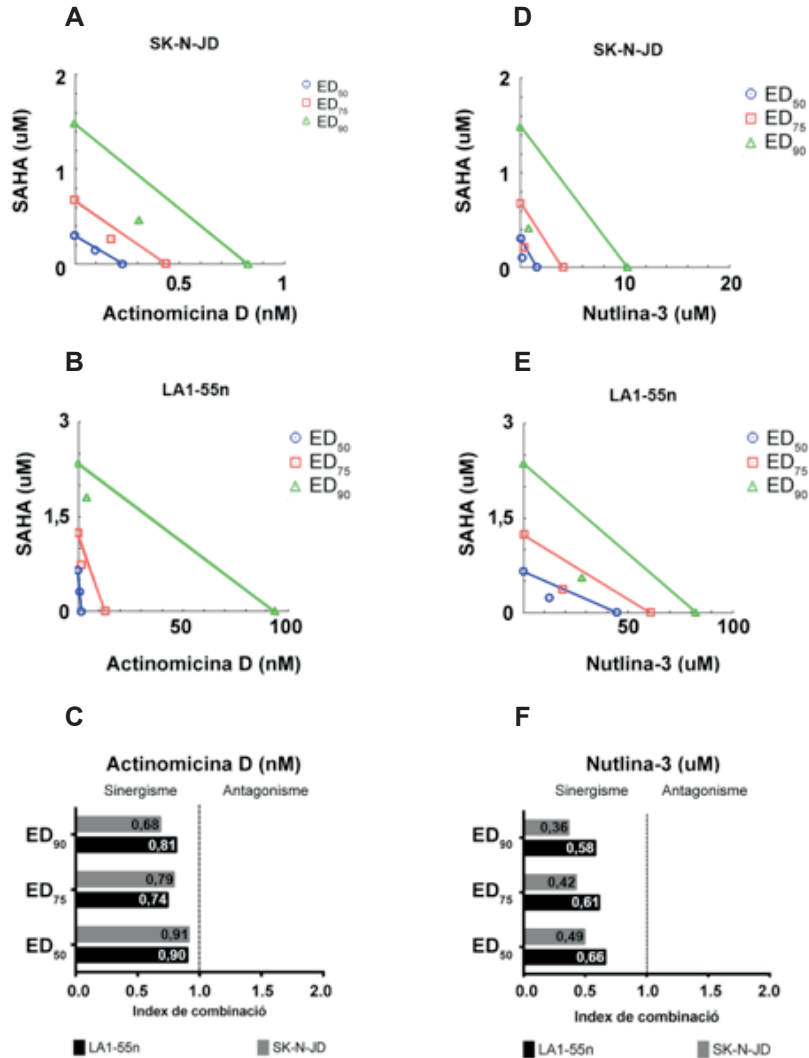


Figura 5.3 El tractament combinat de SAHA amb actinomicina D o nutlina-3 té un efecte sinèrgic sobre les cèl·lules de neuroblastoma. A i B) Isobologrames de l'efecte de la combinació de SAHA amb l'actinomicina D sobre la viabilitat en cèl·lules SK-N-JD i LA1-55n. La viabilitat s'ha mesurat 48h després del tractament mitjançant el mètode de MTS. Les combinacions corresponen als punts situats sota la corresponent línia de l'additivitat, calculada per l'ED₅₀ (blau), l'ED₇₅ (vermell) i l'ED₉₀ (verd). C) Valors de l'índex de combinació a diferents EDs per ambdues línies cel·lulars tractades amb actinomicina D. D i E) Isobolograma de l'efecte de la combinació de SAHA amb la nutlina-3 sobre la viabilitat en cèl·lules SK-N-JD i LA1-55n. La viabilitat s'ha mesurat 48h després del tractament mitjançant el mètode de MTS. Les combinacions corresponen als punts situats sota la corresponent línia de l'additivitat calculada per l'ED₅₀ (blau), l'ED₇₅ (vermell) i l'ED₉₀ (verd). F) Valors de l'índex de combinació a diferents EDs per ambdues línies cel·lulars tractades amb nutlina-3.

L'anàlisi per Western blot demostra com ambdues combinacions augmenten la proteòlisi de PARP-1 en les cèl·lules SK-N-JD, suggerint que l'ús simultani de SAHA amb actinomicina D o nutlina-3 potencia l'apoptosi (figura 5.4A). La potenciació de l'apoptosi en aquesta línia cel·lular no està relacionada amb un augment del factor de transcripció p53, tot i que s'observa un augment de la proteïna p21.

La línia LA1-55n no sembla incrementar la inducció de l'apoptosi en resposta al tractament de SAHA amb nutlina-3, mentre que el tractament simultani de SAHA amb actinomicina D induïx la degradació total de les proteïnes cel·lulars en les condicions analitzades (figura 5.4B).

En conclusió, podem afirmar que la combinació de SAHA amb actinomicina D o nutlina-3 potencia sinèrgicament l'efecte sobre la viabilitat de les cèl·lules de neuroblastoma, independentment de l'estat de p53.

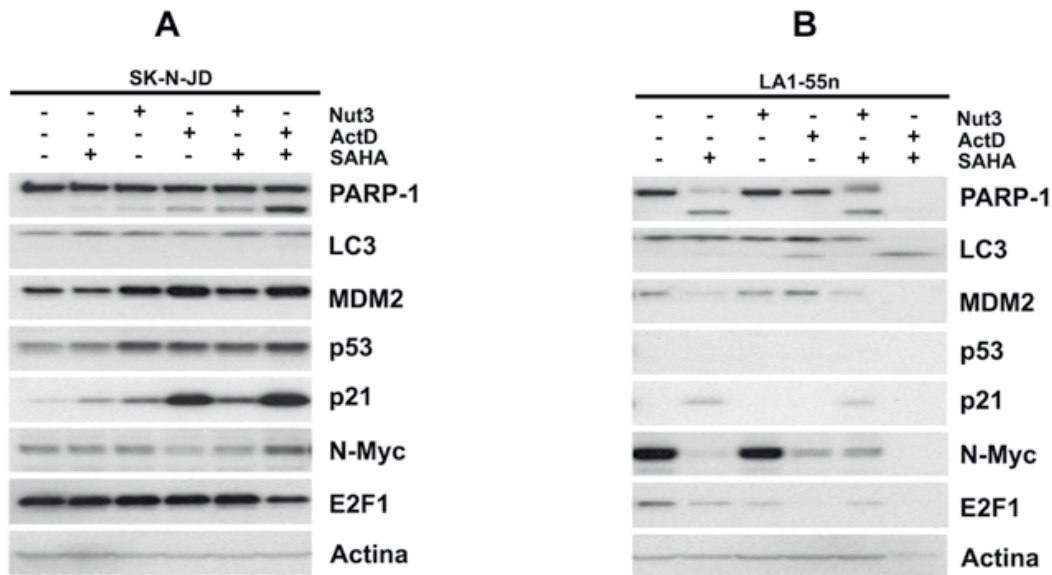


Figura 5.4 El sinergisme del tractament combinat de SAHA amb actinomicina D o nutlina-3 no depèn de p53. Anàlisi de l'expressió proteica de proteïnes associades a la proliferació, la supervivència i a processos de mort cel·lular 48 hores després del tractament A) La línia cel·lular SK-N-JD va ser tractada amb SAHA 0,25 μ M, actinomicina D 0,25nM i nutlina-3 2,5 μ M, corresponents al ED₅₀ de cada droga. B) La línia cel·lular LA1-55n va ser tractada amb SAHA 1 μ M, actinomicina D 2nM i nutlina-3 50 μ M, corresponents al ED₅₀ de cada droga.

Discussió

Discussió

El neuroblastoma és una de les neoplàsies infantils menys resoltes avui en dia. Aproximadament el 50% dels casos diagnosticats són de risc elevat, requerint tractaments basats en una seqüència de quimioteràpia, cirurgia i radiació (Maris 2010). Més de la meitat dels pacients desenvolupen recidives resistents al tractament, determinant una taxa de supervivència a llarg termini inferior al 40% (Van Roy et al. 2009). D'altra banda, l'agressivitat de la teràpia genera seqüeles greus i permanents relacionades amb problemes en el desenvolupament infantil (Laverdière et al. 2005). La carència d'una teràpia eficaç contra aquests tumors ens ha portat a investigar alternatives als tractaments actuals contra el neuroblastoma.

En el present treball hem estudiat nous abordatges quimioteràpics del neuroblastoma, amb la finalitat d'acostar-nos a tractaments més eficaços i menys agressius. Els coneixements sobre teràpies actualment utilitzades pel tractament de diferents tipus de tumors indiquen que la potenciació de l'acetilació proteica i de l'activació de p53 poden ser una bona estratègia, poc assajada encara, en el neuroblastoma (Marks 2007; Van Maerken et al. 2014). Així doncs, hem estudiat l'eficàcia terapèutica de dos compostos: el SAHA i l'actinomicina D. A més, s'han comparat els efectes causats per l'actinomicina D i la nutlina-3 per verificar la repercussió de p53 en l'efecte de l'actinomicina D.

L'heterogeneïtat dels tumors neuroblàstics suposa una variabilitat en la resposta dels diferents tipus cel·lulars que componen el tumor, als tractaments farmacològics (Spengler et al. 1986). Conseqüentment, hem utilitzat com a model diferents línies de neuroblastoma humà per fer-nos una idea del comportament global del neuroblastoma davant dels compostos estudiats.

Aquest treball ha demostrat com el SAHA i l'actinomicina D disminueixen la viabilitat de totes les línies cel·lulars analitzades. El mecanisme i la potència d'aquest fenomen depenen tant del fàrmac utilitzat, com de la línia cel·lular examinada. Els resultats obtinguts demostren el potencial d'aquests compostos i de la seva combinació com a estratègia terapèutica per al neuroblastoma.

EFFECTE DEL SAHA EN LES LÍNIES CEL·LULARS DE NEUROBLASTOMA

Els resultats obtinguts mostren com el tractament amb SAHA redueix la viabilitat cel·lular en totes les línies de neuroblastoma analitzades. Tot i així, la pèrdua de viabilitat varia entre les línies examinades: mentre que les línies SH-SY5Y i SK-N-AS requereixen dosis i temps més llargs per respondre al tractament, la reducció de la viabilitat és més ràpida i consistent en les línies cel·lulars LA1-55n i SK-N-JD. La major taxa de proliferació en aquestes dues línies cel·lulars podria ser el factor de sensibilització davant del tractament amb SAHA.

El tractament amb SAHA activa l'apoptosi en totes les línies cel·lulars analitzades, tal com indica la proteòlisi de PARP-1. L'anàlisi del perfil d'expressió de gens pro- i antiapoptòtics, realitzada en la línia cel·lular SK-N-JD, corrobora els resultats obtinguts per *Western blot*: el SAHA augmenta els nivells de mRNA de gens proapoptòtics i antiproliferants, alhora que redueix l'mRNA dels factors antiapoptòtics. Tot i que s'observen alguns canvis en l'expressió dels gens analitzats que no concorden amb l'activació de l'apoptosi intrínseca, aquest procés depèn del balanç global dels membres pro- i antiapoptòtics de la família de proteïnes BH3 (Happo et al. 2012).

L'apoptosi és el mecanisme principal que hi ha darrera la mort observada en resposta al tractament amb SAHA en gairebé totes les línies cel·lulars. La incubació simultània amb SAHA i l'inhibidor de caspases Oph-QVD ha mostrat la recuperació de la viabilitat en les línies SH-SY5Y, LA1-55n i SK-N-JD. Només la línia cel·lular SK-N-AS no ha revertit l'efecte del SAHA en resposta a la incubació conjunta amb Oph-QVD, indicant que altres mecanismes indueixen la mort cel·lular en aquesta línia, com la necrosi o l'autofàgia.

A més de l'apoptosi, els resultats mostren que el tractament amb SAHA provoca l'activació de l'autofàgia en totes les línies cel·lulars. L'autofàgia té la funció fisiològica d'eliminar els components defectuosos de les cèl·lules, així com de compensar la disminució dels recursos nutritius. L'inici de l'autofàgia comença per la formació d'una doble membrana lipídica, anomenada fagòfor, al voltant dels elements que han de ser eliminats. La nucleació d'aquesta membrana comporta la formació dels autofagosomes que, en fusionar-se amb els lisosomes, donen lloc a l'autofagolisosoma i a l'hidròlisi del seu contingut (Mariño et al. 2014). L'activació de l'autofàgia en resposta al tractament amb HDIs ja ha sigut documentada tant pel SAHA com per altres inhibidors de desacetilases (Shao et al. 2004; Francisco et al. 2011). Tot i així, el mecanisme que hi ha darrera l'activació de l'autofàgia en resposta al SAHA no ha estat caracteritzat en el neuroblastoma. Un dels principals mecanismes d'inducció d'aquesta via és la inactivació de mTORC1 (Gammoh et al. 2012). Aquest complex enzimàtic fosforila la quinasa ULK1, un dels factors d'inici de l'autofàgia, impedit així la formació del fagòfor. En la línia LA1-55n, s'ha comprovat que els nivells de fosforilació de 4E-BP1 i S6K1, dues dianes de fosforilació de mTORC1 implicades en l'activació de la síntesi proteica, no canvien considerablement en resposta al SAHA. Aquest resultat suggereix que l'activitat quinasa de mTORC1 no disminueix en resposta al tractament amb SAHA i que, en conseqüència, la inducció de l'autofàgia en el nostre model no és causant de la inactivació de la via de mTORC1. Altres vies de senyalització descrites com a mecanismes reguladors de l'autofàgia, com la disminució dels nivells d'inositol o del cAMP, del Ca²⁺ intracel·lular, o el segrest de la Beclina-1 per part dels membres antiapoptòtics de la família Bcl-2, podrien ser-ne responsables (Sarkar 2013).

Una dada interessant que ha sorgit de la combinació del SAHA amb l'inhibidor de caspases Oph-QVD ha sigut que la inhibició de l'apoptosi augmentava els nivells cel·lulars de LC3-II, indicant la potenciació en l'autofàgia. Les possibles interaccions entre l'apoptosi i l'autofàgia són moltes i semblen dependre tant del context cel·lular com de l'estímul al qual les cèl·lules estan sent sotmeses (Eisenberg-Lerner et al. 2009). Malgrat que l'autofàgia s'hagi considerat una resposta de supervivència a estímuls potencialment nocius per a la cèl·lula, altres estudis evidencien el seu paper com a sistema de mort cel·lular programada en cèl·lules tumorals (White & DiPaola 2009). L'augment de l'autofàgia observat com a resposta al tractament simultani de SAHA i Oph-QVD podria, doncs, indicar l'activació d'una via de mort alternativa a l'apoptosi en el nostre sistema. Aquesta hipòtesi s'ha estudiat en la línia cel·lular SK-N-AS, l'única que no va revertir la seva pèrdua de viabilitat en presència de SAHA i Oph-QVD. Els resultats obtinguts demostren que la inhibició de l'autofàgia no comporta canvis significatius en la pèrdua de viabilitat, indicant que, almenys en aquesta línia cel·lular, l'autofàgia induïda per SAHA no potencia la mort cel·lular.

És important remarcar que la mort cel·lular en resposta al SAHA succeeix independentment de l'estat de p53, N-Myc o E2F1, suggerint que l'efecte de SAHA no depèn de cap d'aquestes vies de senyalització.

Nombrosos estudis citen la sobreexpressió del factor de transcripció N-Myc com a element condicionant en el desenvolupament del neuroblastoma, així com la seva importància com a factor pronòstic (Schwab et al. 1985; Schweigerer et al. 1990; Monclair et al. 2009). Aquesta proteïna es redueix dràsticament en resposta al SAHA en les cèl·lules amb el gen *MYCN* amplificat. De manera anàloga, els nivells de mRNA de N-Myc baixen ràpidament en aquestes cèl·lules, mostrant una forta disminució ja al cap de sis hores de tractament. L'acetilació de les histones en la regió dels promotors és generalment considerada un senyal d'activació de la transcripció (Bolden et al. 2006), per tant, la reducció del mRNA de N-Myc podria ser deguda a altres mecanismes, com l'augment de la transcripció de represors transcripcionals o de miRNAs reguladors de l'expressió proteica.

L'amplificació del gen *MYCN* en les línies més sensibles al tractament ens ha fet formular la hipòtesi que la major sensibilitat al SAHA es devia a la sobreexpressió de N-Myc. Nombrosos estudis han analitzat el paper d'aquest factor de transcripció en la sensibilització als agents quimioteràpics, sense donar una resposta conclusiva (Nesbit et al. 1998; Mühlethaler-Mottet et al. 2008). Les nostres anàlisis, realitzades en un context isogènic per minimitzar la incidència d'altres factors en els resultats obtinguts, ens han fet concloure que l'efecte de N-Myc en la resposta a SAHA depèn de la línia cel·lular analitzada. Les cèl·lules SK-N-AS transfectades per sobreexpressar N-Myc, així com les cèl·lules LA1-55n amb N-Myc silenciada, no mostren grans canvis en la resposta al tractament amb SAHA. D'altra banda, les cèl·lules SH-EP/*Tet21N*, que presenten el gen codificant per N-Myc sota el control d'un promotor reprimible per tetraciclina, són considerablement més sensibles quan N-Myc es troba sobreexpressat. Tot i això, el tractament amb SAHA no disminueix l'expressió de N-Myc en les cèl·lules SH-EP/*Tet21N* amb sobreexpressió exògena de N-Myc. Possiblement, en aquesta construcció N-Myc està regulat per un promotor que no resulta afectat per la desacetilació induïda pel SAHA (Lutz et al. 1996).

La dràstica reducció de N-Myc en resposta a la incubació amb SAHA en les línies amb el gen *MYCN* amplificat pot implicar la inhibició de vies regulades per aquesta proteïna. De fet, la sobreexpressió de N-Myc porta a l'expressió de diferents proteïnes i miRNAs

que indueixen la proliferació i inhibeixen la diferenciació (Alaminos et al. 2004; Galderisi et al. 1999). S'ha descrit com la disminució de N-Myc en línies de neuroblastoma amb el gen *MYCN* amplificat porta a la mort cel·lular, probablement mitjançant un mecanisme de dependència de les vies de supervivència i proliferació activades per aquest factor (Janardhanan et al. 2009). N-Myc tindria, doncs, la doble funció de promoure la proliferació i la malignitat, al mateix temps que sensibilitzaria les cèl·lules a l'apoptosi induïda per diferents agents quimioteràpics (Fulda et al. 1999; Petroni et al. 2011).

Un dels objectius d'aquest treball consistia en investigar si la inhibició de les histona desacetilases amb SAHA podia ser efectiva per a reduir la viabilitat de les cèl·lules de neuroblastoma. Ens interessava especialment comprovar l'efecte del SAHA sobre els tipus cel·lulars N, S i I, i sobre les cèl·lules amb i sense sobreexpressió de N-Myc. Encara que les línies cel·lulars de tipus N i les cèl·lules amb sobreexpressió de N-Myc han semblat inicialment més sensibles al tractament amb SAHA, tots els tipus cel·lulars han vist reduïda la seva viabilitat. Les cèl·lules que sobreexpressen N-Myc resulten més sensibles a l'efecte del SAHA. Això no sembla ser degut directament a la sobreexpressió d'aquest factor, sinó a la major taxa de proliferació en les línies cel·lulars amb N-Myc sobreexpressat. En general, les línies cel·lulars més proliferants són més sensibles a l'augment de l'acetilació proteica induïda pel SAHA. Així doncs, les cèl·lules de tipus I resulten força sensibles a l'efecte de SAHA, seguides per les cèl·lules de tipus N que sobreexpressen N-Myc. Les cèl·lules que no sobreexpressen N-Myc i tenen una baixa proliferació, com poden ser les de tipus S, són les menys sensibles al tractament. Tot i així, aquest tipus cel·lular pot desdiferenciar-se i metastatitzar, motiu pel qual segueix sent un problema en el tractament del neuroblastoma.

Tot i moure'ns en la limitació que imposen les línies cel·lulars establertes, podem concloure que la utilització de SAHA redueix la viabilitat de tots els tipus cel·lulars presents en el neuroblastoma, tant si expressen N-Myc com si no.

EFFECTE DE L'ACTINOMICINA D SOBRE LA VIABILITAT DE LÍNIES CEL·LULARS DE NEUROBLASTOMA

Els ribosomes són indispensables per al creixement de la cèl·lula, entès com a l'augment en dimensió i components cel·lulars. Així mateix, el creixement de la cèl·lula és fonamental perquè la proliferació s'efectuï correctament (Conlon & Raff 1999). El manteniment d'una quantitat suficient de ribosomes resulta doncs indispensable per a la proliferació cel·lular.

Les cèl·lules tumorals presenten una alta taxa de proliferació, sustentada per la potenciació de la biogènesi ribosòmica (Montanaro et al. 2012). Aquest augment permet l'adaptació als requeriments metabòlics de la cèl·lula tumoral. Basant-se en aquestes observacions, Drygin et al. van formular la hipòtesi que la inhibició de la transcripció del rRNA 47S podria ser el fonament d'una teràpia antitumoral no genotòxica. Els seus estudis, realitzats en limfoma de cèl·lules B, van demostrar que inhibidors específics de la RNA polimerasa I presenten una citotoxicitat específica sobre les cèl·lules tumorals sense causar la mort de les cèl·lules B normals. Aquestes dades proporcionaren la primera evidència directa del potencial terapèutic de la inhibició de la biogènesi ribosòmica (Drygin et al. 2009).

L'actinomicina D és un fàrmac àmpliament utilitzat a concentracions micromolars com a inhibidor inespecífic de les RNA polimerases. A concentracions baixes de l'ordre nanomolar, el seu efecte s'exerceix únicament sobre la RNA polimerasa I (Perry & Kelley 1970). La conseqüent inhibició de la síntesi del rRNA 47S, el pas limitant de la biogènesi ribosòmica, porta a la supressió de la producció de ribosomes.

Donades aquestes premisses, s'ha estudiat l'efecte de la inhibició de la transcripció RNA polimerasa I en línies cel·lulars de neuroblastoma. Com a inhibidor d'aquest enzim s'ha utilitzat l'actinomicina D a concentracions que no interfereixen amb l'activitat de les altres RNA polimerases. Els resultats obtinguts demostren que l'actinomicina D disminueix la viabilitat en totes les línies tumorals examinades. Les línies que expressen la proteïna p53wt (SH-SY5Y i SK-N-JD) són més sensibles al tractament. En canvi, les línies cel·lulars que no expressen la forma *wild type* de p53 (SK-N-AS i LA1-55n), requereixen dosis més altes i temps més llargs per a mostrar un efecte sobre la viabilitat.

La pèrdua de viabilitat en la línia cel·lular SK-N-JD és deguda a l'activació de l'apoptosi, com suggereix la proteòlisi de PARP-1. La inhibició farmacològica de les caspases reverteix parcialment la pèrdua de viabilitat, indicant la implicació d'altres mecanismes en aquest efecte.

Un dels efectes del tractament amb concentracions baixes d'actinomicina D és l'aturada del cicle cel·lular en fase G2 (Choong et al. 2009). L'examen del cicle cel·lular confirma aquestes observacions, indicant que a més de l'apoptosi, l'actinomicina D a baixes concentracions indueix l'aturada del cicle cel·lular. Tot i així, l'anàlisi per citometria de flux no detecta un augment consistent de la població cel·lular en fase sub-G1, en resposta al tractament amb actinomicina D. Aquesta discrepància podria ser deguda a que la fragmentació del DNA es detecta posteriorment a l'activitat de les caspases. La proteòlisi de PARP-1 és un signe de l'activació de les caspases, mentre que l'acumulació de cèl·lules en fase sub-G1 denota l'activació de la deoxiribonucleasa CAD (Sakahira et al. 1998). Les caspases i la CAD no s'activen simultàniament, sent la fragmentació del DNA un marcador d'apoptosi tardana (Collins et al. 1997). Així doncs, els resultats obtinguts reflecteixen un estat apoptòtic primerenc, sense una extensa fragmentació del DNA.

L'anàlisi per *Western blot* mostra com el tractament amb actinomicina D en les cèl·lules SK-N-JD modifica l'expressió de diverses proteïnes implicades en la regulació de la pro-

liferació i l'apoptosi. En primer lloc, s'observa un augment dels nivells de les proteïnes p53 i p21. L'increment de p53 ha estat àmpliament descrit després del tractament amb actinomicina D (Montanaro et al. 2007; Choong et al. 2009), i s'ha relacionat amb la capacitat d'aquest compost d'induir l'estrès ribosòmic. En un estat d'homeòstasi cel·lular, tant el rRNA 47S com les proteïnes ribosòmiques estan compromesos a sintetitzar nous ribosomes (Thomson et al. 2013). La disminució dels nivells del rRNA 47S, causada per exemple pel tractament amb actinomicina D, crea un desequilibri en l'estequiometria dels diferents components del ribosoma. Això porta a l'acumulació de les proteïnes ribosòmiques lliures, la majoria de les quals són degradades pel proteosoma (Lam et al. 2007). Tot i així, dues proteïnes ribosòmiques, RPL5 i RPL11, formen un complex pre-ribosòmic amb el rRNA 5S que les protegeix de la degradació (Bursaç et al. 2012). Aquest complex interacciona i segresta MDM2. En conseqüència, la degradació de p53 s'inhibeix, augmentant els seus nivells proteics i, consegüentment, la seva activitat transcripcional (Bursaç et al. 2014). Així doncs, els resultats obtinguts suggereixen que l'estrès ribosòmic seria la causa de l'activació de la via de transcripció de p53, alhora que p53 induiria l'apoptosi.

Una observació interessant és que el tractament amb actinomicina D incrementa els nivells de la proteïna MDM2. Aquesta proteïna forma un bucle de realimentació amb p53: p53 indueix la transcripció de MDM2, la qual estimula successivament la degradació de p53 (Moll & Petrenko 2003). La inhibició de MDM2 per part de l'actinomicina D porta al trencament d'aquest cicle, augmentant els nivells de p53 i, per tant, la transcripció de MDM2.

El tractament amb actinomicina D disminueix els nivells proteics dels factors transcripcionals N-Myc i E2F1 en la línia cel·lular SK-N-JD. Aquest efecte es reverteix quan s'inhibeixen les caspases, indicant que aquestes proteases estan implicades en la regulació d'ambdós factors de transcripció. Ni N-Myc ni E2F1 presenten la seqüència de reconeixement per a la proteòlisi caspasa dependent, suggerint que les caspases no actuen directament sobre aquestes proteïnes (Lüthi & Martin 2007; Uniprot, human E2F1 webpage 2014; UniProt, human N-Myc webpage 2014). Entre les dianes de les caspases que promouen l'estabilitat de E2F1, trobem el complex acetiltransferasa CBP/pCAF i la proteïna pRB (Lüthi & Martin 2007). Per altra banda, E2F1 indueix la transcripció de N-Myc (Strieder & Lutz 2003). Així doncs, l'activació de les caspases podria causar la proteòlisi dels factors que estableixen E2F1, portant a una baixada dels seus nivells i, consegüentment, de la transcripció de N-Myc.

La sobreexpressió de N-Myc comporta una major pèrdua de viabilitat en cèl·lules amb un mateix context genètic de p53 (SH-EP/Tet21N), com a resposta a l'actinomicina D. La major sensibilitat observada pot ser deguda al paper fonamental que juga N-Myc en la regulació de la biogènesi ribosòmica. N-Myc i c-Myc són activadors de la transcripció de proteïnes ribosòmiques i de factors de maduració del ribosoma (Boon et al. 2001; van Riggelen et al. 2010). A més a més, N-Myc regula l'expressió de p53 (Chen et al. 2010). L'increment de totes aquestes proteïnes en resposta a la sobreexpressió de N-Myc podria sensibilitzar les cèl·lules al tractament amb l'actinomicina D (van Riggelen et al. 2010).

En la línia LA1-55n, que no expressa p53, no s'observa l'activació de l'apoptosi en resposta al tractament amb actinomicina D, com indica la falta de proteòlisi de PARP-1. A més, la inhibició farmacològica de les caspases no reverteix l'efecte de l'actinomicina D sobre la viabilitat, indicant que aquestes cèl·lules no activen l'apoptosi en resposta al tractament. Així doncs, altres mecanismes haurien de ser responsables de la pèrdua de viabilitat observada com, per exemple, l'aturada del cicle cel·lular, l'autofàgia o la necrosi.

L'anàlisi del cicle cel·lular mostra un augment en la població de cèl·lules en fase G1, indicant l'aturada del cicle cel·lular. Aquesta observació podria explicar la inhibició de la proliferació observada en resposta al tractament amb actinomicina D. Estudis previs han suggerit que els ribosomes són fonamentals per a la proliferació, i que la seva disminució comporta l'aturada del cicle cel·lular (Montanaro et al. 2007; Teng et al. 2013). La transcripció del rRNA 47S és el pas limitant de la producció de ribosomes. La seva inhibició, per part de l'actinomicina D, portaria a una disminució del nombre de ribosomes en les cèl·lules, impeding que aquestes proliferin.

A més de l'aturada del cicle cel·lular, l'actinomicina D incrementa el flux autofàgic, com indica l'augment de LC3-II. Aquest efecte s'ha demostrat també en resposta a altres inhibidors de la transcripció de la RNA polimerasa I, tot i que el mecanisme subjacent a aquesta activació és encara desconegut (Drygin et al. 2011). A més de la inhibició de la RNA polimerasa I, altres models demostren la correlació entre una biogènesi ribosòmica deficient i l'augment de l'autofàgia. En el model genètic del peix zebra *titania*, la biogènesi ribosòmica es veu alterada per la manca maduració del rRNA 18S. Els embrions d'aquests peixos mostren nivells d'autofàgia molt més elevats en comparació als embrions no mutants. Això indica que l'esgotament dels ribosomes, causat per la incorrecta maduració de la subunitat 40S, podria ser la responsable d'un major flux autofàgic. Altres anàlisis són necessàries per elucidar tant el mecanisme d'activació de l'autofàgia com la seva funció en la resposta al tractament amb actinomicina D.

L'actinomicina D augmenta inicialment els nivells proteics de E2F1 en la línia cel·lular LA1-55n. Aquest resultat contrasta amb estudis previs que demostren la degradació proteosòmica de E2F1 en resposta a la inhibició de la RNA polimerasa I (Donati et al. 2011). La diferència podria ser deguda a les diferents metodologies d'inhibició de la transcripció del rRNA 47S. L'estudi de Donati i col·laboradors utilitza un dominant negatiu de p53 (p53DD) per inhibir les funcions dependents de p53. S'ha demostrat que p53DD inhibeix les funcions transcripcionals de p53, però no interfereix amb les seves funcions mitocondrials o citoplasmàtiques (Heyne et al. 2008). La baixada d'E2F1 en el model de Donati i col·laboradors podria deure's, per tant, a l'activació de funcions de p53 que són independents de la regulació transcripcional. Una altra possibilitat és que el mecanisme utilitzat per inhibir la transcripció de la RNA polimerasa I determini l'augment dels nivells de E2F1. Per exemple, l'actinomicina D podria induir la resposta al dany del DNA. S'ha demostrat que l'activació de la quinasa ATM, un dels marcadors clau de la resposta al dany al DNA, fosforila i augmenta l'estabilitat de E2F1 (Carcagno et al. 2009; Jin et al. 2014). Tot i així, diferents estudis han suggerit que el tractament a concentracions de l'ordre nanomolar d'actinomicina D no induïx la resposta al dany al DNA, ja que no s'observa un augment en els nivells de la histona γ H2A.X (Choong et al. 2009; Montanaro et al. 2007). Malgrat l'absència d'aquest marcador del dany al DNA, els mateixos estudis han demostrat la fosforilació de les serines 15 i 46 de p53. La fosforilació del p53 en aquests residus és un marcador de l'activitat de ATM, ATR i DNA-PK, que indica l'activació d'aquestes quinases (Shiloh & Ziv 2013; Nam & Cortez 2011; Goodwin & Knudsen 2014). Estudis previs suggereixen una realimentació positiva entre E2F1 i N-Myc (Strieder & Lutz 2003; Oliver et al. 2003). L'augment de qualsevol d'aquests factors de transcripció en resposta al tractament amb actinomicina D podria portar a un bucle d'amplificació, incrementant els nivells d'ambdues proteïnes.

Podem concloure doncs, que l'actinomicina D, a concentracions de l'ordre nanomolar, disminueix la viabilitat de totes les línies cel·lulars de neuroblastoma, tant si expres-sen p53 com si no.

EFFECTE DE LA NUTLINA-3 SOBRE LA VIABILITAT DE LÍNIES CEL·LULARS DE NEUROBLASTOMA

La resposta de p53 és una de les barreres fonamentals contra el desenvolupament tumoral, provocant l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi en resposta a estímuls oncogènics. Per tal de permetre el desenvolupament tumoral, les funcions de p53 han de ser suprimides mitjançant mutacions en el gen de p53 o alteracions en les proteïnes reguladores de la seva activitat. Un dels principals reguladors de p53 és la proteïna MDM2, que actua com a ubiquitina lligasa E3 i com a inhibidor transcripcional de p53 (Van Maerken et al. 2014). Les mutacions del gen de p53 no són habituals en el neuroblastoma, on aquesta mutació es manifesta en menys del 2% dels casos en el moment de la diagnosi (Vogan et al. 1993). En canvi, el mecanisme més habitual per suprimir l'acció antitumoral de p53 és l'augment de l'activitat de MDM2 (Van Maerken et al. 2009). Estudis previs han demostrat que la nutlina-3, un inhibidor de MDM2, és capaç d'activar la resposta de p53, provocant un potent efecte antitumoral en el neuroblastoma (Van Maerken et al. 2006). En aquest estudi, s'ha utilitzat la nutlina-3 per tal de determinar els efectes apoptòtics dependents de p53.

Els nostres resultats demostren que el tractament amb nutlina-3 redueix la viabilitat de totes les línies examinades. Les cèl·lules SH-SY5Y i SK-N-JD, que expressen la proteïna p53wt, presenten una major sensibilitat a la nutlina-3. Les línies LA1-55n i SK-N-AS, que no expressen la forma *wild type* de p53, requereixen dosis més altes i temps més llargs per exercir el seu efecte sobre la viabilitat.

En la línia cel·lular SK-N-JD, la pèrdua de viabilitat és deguda a l'activació de les caspases, tal i com demostra la proteòlisi de PARP-1. La inhibició farmacològica de les caspases ha revertit completament la pèrdua de viabilitat causada per la nutlina-3, indicant que l'efecte sobre la viabilitat és degut a l'activació de les caspases. En resum, aquests resultats mostren que l'apoptosi és el principal mecanisme responsable de la pèrdua de viabilitat en resposta al tractament amb nutlina-3. Tot i així, l'anàlisi per citometria de flux no mostra un augment consistent en el nombre de cèl·lules en fase sub-G1. Aquesta aparent discordança en les dades obtingudes pot ser deguda al temps seleccionat per examinar la distribució del cicle cel·lular. La fragmentació del DNA és un esdeveniment posterior a l'activació de les caspases (O'Brien et al. 2001), per tant, és possible que les cèl·lules es trobin en una fase primerenca de l'apoptosi. L'anàlisi del cicle cel·lular mostra un augment en la població de cèl·lules en les fases G1 i G2. L'aturada del cicle cel·lular és especialment interessant, ja que podria significar l'activació d'altres programes cel·lulars amb funcions antitumorals en les cèl·lules sense una via apoptòtica funcional, com la senescència i la diferenciació (Van Maerken et al. 2006). L'acció pleiotròpica de la nutlina-3 podria, doncs, tenir un efecte antitumoral en les cèl·lules que aconsegueixen evitar l'activació de l'apoptosi.

La proteïna p53 i les seves dianes transcripcionals MDM2 i p21 augmenten ràpidament els seus nivells en resposta al tractament amb nutlina-3. Aquest resultat concorda amb estudis previs realitzats en altres línies de neuroblastoma, on l'increment dels nivells de p53 indueix la transcripció, tant de p21 com de les dianes proapoptòtiques de p53 (Van Maerken et al. 2011). El paral·lelisme entre aquests dos estudis suggereix que l'apoptosi observada en la línia cel·lular SK-N-JD és deguda a l'activació de p53.

El factor de transcripció N-Myc també sembla influir en la resposta al tractament amb nutlina-3. Els resultats obtinguts en exposar cèl·lules SH-EP/Tet21N a la nutlina-3 10 µM en presència o absència de tetraciclina demostren que la sobreexpressió de N-Myc potencia

l'efecte sobre la viabilitat cel·lular. Estudis previs demostren que la presència de N-Myc sensibilitza les cèl·lules a l'apoptosi induïda per diferents quimioteràpics (Fulda et al. 1999; Lutz et al. 1998). Les nostres observacions semblen sostenir la teoria que N-Myc, tot i que dona un avantatge proliferant a les cèl·lules tumorals, també les fa més sensibles als tractaments. L'increment de la transcripció basal de p53, una de les dianes transcripcionals de N-Myc, podria ser la causa de la major sensibilitat a la nutlina-3 (Chen et al. 2010).

La nutlina-3 redueix els nivells proteics del factor de transcripció E2F1. Aquesta disminució depèn en part de l'activació de les caspases, ja que la incubació simultània amb Oph-Q-VD reverteix parcialment l'efecte de la nutlina-3. La recuperació incompleta dels nivells d'E2F1 suggereix que altres factors que regulen l'estabilitat d'aquesta proteïna han de ser alterats per la nutlina-3. Entre aquests es troba la proteïna MDM2. La interacció entre MDM2 i E2F1 impedeix l'ubiquïtinació d'aquesta última per part de l'ubiquïtina lligasa SKP2 (Zhang et al. 2005). El tractament amb nutlina-3 podria desestabilitzar la interacció de MDM2 amb E2F1, portant a la degradació proteosòmica de E2F1 i a una reducció dels seus nivells.

La línia cel·lular LA1-55n, que no expressa la proteïna p53, ha resultat ser molt menys sensible al tractament amb nutlina-3 respecte a la línia SK-N-JD. El tractament a la concentració de 10 μM no ha suposat cap efecte sobre la viabilitat i el cycle cel·lular. Els efectes sobre aquesta línia cel·lular s'han observat només a concentracions molt més elevades: el tractament amb nutlina-3 50 μM redueix la viabilitat sense activar l'apoptosi, com demostra la manca de proteòlisi de PARP-1. La reducció en la viabilitat podria ser deguda tant a l'aturada del cycle cel·lular com a altres mecanismes de mort, com per exemple la necrosi.

El tractament amb nutlina-3 50 μM redueix els nivells proteics del factor de transcripció E2F1 en la línia LA1-55n. És probable que la inhibició de MDM2 també sigui responsable de la pèrdua d'estabilitat d'E2F1 en aquesta línia cel·lular. La baixada dels nivells d'E2F1 podria explicar la disminució de la viabilitat observada: E2F1 és un dels principals reguladors del cycle cel·lular (Chen et al. 2009); per tant la seva disminució provocaria l'aturada del cycle cel·lular en G1, impeding la proliferació sense activar cap programa de mort cel·lular. Tot i que estudis previs han demostrat que el tractament amb nutlina-3 4 μM indueix l'expressió d'E2F1 (Peirce & Findley 2009), els nostres resultats indiquen que el tractament amb 10 μM de nutlina-3 no té cap efecte sobre els nivells cel·lulars d'E2F1.

En resum, el tractament amb nutlina-3 indueix la pèrdua de viabilitat en totes les cèl·lules de neuroblastoma, mostrant un efecte més pronunciat en les línies que expressen una proteïna p53wt. La similitud entre els resultats obtinguts en la línia SK-N-JD amb la nutlina-3 i l'actinomicina D, indiquen que els efectes de l'actinomicina D sobre les línies de neuroblastoma que expressen p53 depenen, en gran part, de la inactivació de MDM2. En la línia cel·lular LA1-55n, que no expressa p53, els resultats obtinguts amb les dues drogues són menys semblants. A diferència de l'actinomicina D, les concentracions efectives en les cèl·lules que expressen p53 no indueixen cap efecte en les línies sense expressió de p53. Cal destacar que el tractament amb actinomicina D indueix l'activació de l'autofàgia, mentre que la nutlina-3 no sembla activar aquest mecanisme. Així doncs, l'activació de l'autofàgia podria ser la causant de la diferència de toxicitat entre l'actinomicina D i la nutlina-3.

EFFECTE DE LA COMBINACIÓ DE SAHA AMB ACTINOMICINA D I NUTLINA-3

L'heterogeneïtat molecular de les cèl·lules tumorals ha suposat des de sempre un desafiament en el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques. Aquest problema es deu principalment a la capacitat dels tumors de desenvolupar resistències als agents quimioteràpics mitjançant tres mecanismes: la inducció de mutacions en la via a la qual pertany la diana terapèutica, la desactivació de la via de mort induïda en resposta al tractament, o la potenciació d'una o més bombes d'eliminació de xenobiòtics (MDR) (Niero et al. 2014). La toxicitat intrínseca de les drogues també suposa un problema, ja que molts fàrmacs presenten efectes col·laterals greus a les concentracions amb eficàcia clínica. Per aquests motius, la tendència dels tractaments actuals és utilitzar combinacions de drogues amb mecanismes d'acció diferents, que permetin atacar diferents vies cel·lulars al mateix temps que permetin reduir la quantitat de fàrmac necessària per obtenir l'efecte antitumoral.

Recentment, un estudi en pacients amb tumors pediàtrics tractats amb SAHA com a únic agent terapèutic, conclou que aquesta droga presenta un efecte molt variable. Així doncs, l'estudi proposa la combinació del SAHA amb altres fàrmacs per potenciar el seu efecte antitumoral (Fouladi et al. 2010). L'efecte del SAHA sobre el neuroblastoma s'ha estudiat en combinació amb múltiples drogues. Una de les primeres estratègies combinatòries assajades ha sigut el tractament amb SAHA i l'àcid retinoic (ATRA). Ambdues drogues indueixen la diferenciació (Reynolds et al. 2003; Witt et al. 2009), un mecanisme que es troba inactivat en aquest tumor. Els resultats han demostrat que la combinació d'aquests compostos potenciava sinèrgicament la diferenciació en línies cel·lulars de neuroblastoma, al mateix temps que disminuïa la velocitat de creixement del tumor (Hahn et al. 2008). Altres estratègies combinatòries que han potenciat l'efecte del SAHA, tant *in vitro* com *in vivo*, han sigut el tractament de SAHA amb l'inhibidor genèric de Cdks flavopiridol (Huang et al. 2010) i el tractament de SAHA amb naringenina, un activador natural de la transamidació (Ling et al. 2012). Finalment, un estudi recent demostra com la combinació de SAHA amb l'inhibidor de la quinasa Aurora A MLN8237, indueix la pèrdua de la viabilitat de forma additiva en línies cel·lulars pertanyents a diferents tumors pediàtrics (Muscal et al. 2013). Els prometedors resultats obtinguts en aquests estudis ens han portat a estudiar la inhibició de les HDACs en combinació a la potenciació de p53, mitjançant l'ús del SAHA amb actinomicina D o nutlina-3.

El tractament simultani de SAHA amb actinomicina D en la línia cel·lular SK-N-JD ha mostrat un major efecte sobre la viabilitat cel·lular respecte al tractament únicament amb SAHA. L'anàlisi amb el mètode de Chou-Talalay indica que els fàrmacs actuen de forma sinèrgica. A més, la combinació de SAHA amb actinomicina D augmenta lleument els nivells de p53 i p21, tal com mostra l'anàlisi per *Western blot*. Aquest increment correlaciona amb una major proteòlisi de PARP-1 respecte al tractament individual amb cadascun dels fàrmacs, indicant una potenciació del mecanisme apoptòtic.

La combinació de SAHA i nutlina-3 en les cèl·lules SK-N-JD presenta un efecte similar a l'observat pel tractament conjunt amb actinomicina D. El tractament simultani amb ambdues drogues potencia l'efecte observat sobre la viabilitat cel·lular respecte a les drogues assajades per separat. L'anàlisi de la interacció entre el SAHA i la nutlina-3 demostra que els fàrmacs actuen de forma sinèrgica, i que el sinergisme és més fort que l'observat per l'actinomicina D. El tractament augmenta la proteòlisi de PARP-1, corroborant la potenciació de l'apoptosi. Una observació interessant és que els nivells de p53 no augmenten en resposta

al tractament combinat de SAHA i nutlina-3. Estudis previs han demostrat que l'acetilació de p53 porta a l'activació de les seves dianes transcripcionals pro-apoptòtiques (Loughery & Meek 2013) i a la inducció de l'apoptosi mitocondrial provocada per BAX (Yamaguchi et al. 2009), sense afectar els nivells proteics de p53. A més, altres estudis demostren que la inhibició de la HDAC1, una de les dianes farmacològiques de SAHA, és responsable de la inactivació de p53, actuant en concomitància amb MDM2 (Ito et al. 2002). El SAHA doncs, podria incrementar l'efecte de la nutlina-3 impedit a les HDACs desacetilar els residus de lisina que són dianes de MDM2, augmentant així l'estabilitat de p53. Aquesta hipòtesi ha estat confirmada anteriorment en cèl·lules de carcinoma de pulmó, mostrant una potenciació de l'apoptosi causada per l'augment de l'acetilació de p53 en resposta al tractament amb SAHA i nutlina-3 (Palani et al. 2012).

La potenciació de l'efecte sobre la viabilitat s'ha pogut observar també en la línia LA1-55n. L'ús conjunt de SAHA amb l'actinomicina D disminueix la viabilitat de forma més marcada respecte al tractament amb les drogues per separat. L'anàlisi d'interacció de fàrmacs mitjançant el mètode de Chou-Talalay ha demostrat que les drogues actuen de manera sinèrgica, tot i que la sinergia és menys forta que en la línia cel·lular SK-N-JD. Els resultats a nivell molecular confirmen aquestes observacions: la potenciació de l'efecte sobre la viabilitat cel·lular en la línia cel·lular LA1-55n porta a la degradació de la major part de les proteïnes examinades al temps i concentració assajats. Anàlisis a temps més curts de tractament podrien donar informació sobre els mecanismes que indueixen la mort cel·lular.

El tractament simultani amb SAHA i nutlina-3, en la línia cel·lular LA1-55n, potencia l'efecte sobre la viabilitat respecte al tractament amb les drogues per separat. La interacció de les drogues resulta ser sinèrgica, mostrant un sinergisme més fort respecte a la combinació de SAHA amb actinomicina D. Els resultats obtinguts de l'anàlisi per *Western blot* demostren que en aquest cas no es dona una potenciació de l'efecte apoptòtic, malgrat la marcada reducció de la viabilitat. És per tant probable que altres vies de mort, independents de p53, com per exemple la necrosi, exerceixin un paper en la potenciació de la mort cel·lular observada.

Actualment, nombrosos assajos clínics estan avaluant l'eficàcia i seguretat dels HDI (West & Johnstone 2014). Tot i així, els resultats semblen indicar un efecte moderat sobre el creixement tumoral, mostrant efectes col·laterals lligats a la toxicitat d'aquests fàrmacs a les seves dosis efectives (Gryder et al. 2012). Les dades presentades en aquest treball demostren la potenciació sinèrgica *in vitro* entre el SAHA i dues drogues diferents: la nutlina-3 i l'actinomicina D. L'efecte sobre la viabilitat cel·lular es verifica tant en cèl·lules que expressen la proteïna p53wt, com en les línies que no presenten aquest factor de transcripció, suggerint que aquestes estratègies combinatòries podrien augmentar l'eficàcia del tractament. Caldria analitzar l'efecte d'aquestes combinacions *in vivo* abans de proposar el seu ús clínic. Aquests experiments s'estan duent a terme actualment en el nostre laboratori.

Conclusions

Conclusions

1. El tractament amb l'inhibidor d'histona desacetilases SAHA 2,5 μ M redueix la viabilitat en totes les línies cel·lulars examinades, tant si expressen com si no p53 i N-Myc. Aquest efecte és més marcat en les cèl·lules amb una taxa de proliferació més elevada.
2. La pèrdua de viabilitat en resposta al tractament amb SAHA 2,5 μ M és causada, principalment, per l'activació de l'apoptosi.
3. El SAHA indueix autofàgia en totes les línies cel·lulars. Aquest efecte augmenta en resposta a la inhibició de les caspases. Tot i així, l'autofàgia no sembla tenir una especial rellevància en la supervivència o mort de les cèl·lules de neuroblastoma en resposta al tractament.
4. La relació entre l'efecte del SAHA i la sobreexpressió de N-Myc depèn de la línia cel·lular. Les línies amb sobreexpressió endògena de N-Myc són generalment més sensibles al tractament.
5. L'actinomicina D indueix la reducció de la viabilitat cel·lular a les concentracions utilitzades en totes les línies de neuroblastoma analitzades.
6. Les cèl·lules que expressen la forma *wild type* de p53 presenten una major sensibilitat a l'actinomicina D, ja que activen l'apoptosi com a resposta al tractament.
7. En un mateix context genètic de p53, les línies cel·lulars que sobreexpressen N-Myc són més sensibles al tractament amb actinomicina D. Aquest efecte ha sigut corroborat utilitzant la línia cel·lular SH-EP/*Tet21N*.
8. La nutlina-3 indueix la reducció de la viabilitat cel·lular en totes les línies de neuroblastoma analitzades. Les línies cel·lulars que expressen la forma *wild type* de p53 activen l'apoptosi com a resposta al tractament, resulten ser més sensibles a la nutlina-3.
9. La sobreexpressió de N-Myc augmenta l'efecte de la nutlina-3 en la línia cel·lular SH-EP/*Tet21N*.
10. El tractament combinat de SAHA amb actinomicina D o nutlina-3 té un efecte sinèrgic sobre la reducció de la viabilitat cel·lular, ja sigui en cèl·lules amb o sense p53.
11. La utilització conjunta de SAHA amb actinomicina D o amb nutlina-3 hauria de considerar-se com a possible assaig clínic en neuroblastomes de mal pronòstic.

Material i mètodes

Material i mètodes

LÍNIES CEL·LULARS I REACTIUS

Les línies cel·lulars de NB que es van utilitzar pertanyen als 3 diferents tipus de NB, tal i com es resumeix en la taula.

LÍNIA CEL·LULAR	TIPUS NEUROBLÀSTIC	ORIGEN	MEDI
SH-SY5Y	N	ATCC	DMEM
LA1-55n	N	J. Mora ¹	RPMI
SK-N-JD	I	J. Mora ¹	RPMI
SK-N-AS	S	J. Mora ¹	DMEM
SH-EP/Tet21N	S	M. Schwab ²	DMEM

1) Línies cel·lulars cedides pel grup del Dr. Jaume Mora de l'Hospital St. Joan de Déu, Barcelona.

2) Línies cel·lulars cedides pel grup del Dr. Manfred Schwab del Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg.

Les cèl·lules van ser cultivades en DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) o en RPMI 1640 (*Royal Park Memorial Institute*), suplementats ambdós amb 10% FBS (*Fetal bovine serum*), 2% glutamina 2mM, 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina (GIBCO, Life Technologies). Per silenciar l'expressió del gen MYCN en la línia SH-EP/Tet21N es van agregar 1 µg/ml de tetraciclina (Sigma-Aldrich) al medi de cultiu.

Les cèl·lules HEK-293T van ser cultivades en DMEM suplementat amb 10% FBS, 2% glutamina 2mM, 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina.

Els cultius van ser mantinguts en una atmosfera humida a una temperatura de 37°C amb un 5% de CO₂.

TRANSFECCIÓ TRANSIENT AMB LÍPIDS CATIÒNICS

TRANSFECCIÓ DE PLASMIDIS

Les transfeccions de plasmidis es van realitzar seguint les instruccions del proveïdor utilitzant el reactiu Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Breument, els plasmidis van ser resuspesos juntament amb 150µl de lipofectamina en 3ml de Opti-MEM (Life Technologies), i la barreja es va addicionar gota a gota en plaques de 100mm contenint les cèl·lules a transfectar en 4ml de DMEM. Després de 6 hores, el medi es va a canviar per 7ml de DMEM fresc. Els plasmidis pMDLg/pRRE, pMD2.g, pRSV-Rev, pLKO.1 scramble shRNA i pLOVE-Nmyc van ser comprats a Addgene, mentre pLKO.1 MYCN shRNA va ser comprat a Sigma-Aldrich.

TRANSFECCIÓ DE siRNA

Les transfeccions de siRNA es van realitzar seguint les instruccions del proveïdor, utilitzant el reactiu Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) durant 24 hores a una concentració final de 25nM. Breument, els siRNAs van ser resuspesos juntament amb 15µl de lipofectamina en 1ml de Opti-MEM (Life Technologies), i la barreja es va addicionar gota a gota en plaques de 60mm contenint les cèl·lules a transfectar en 1ml de DMEM. Després de 6 hores, el medi es va a canviar per 3ml de DMEM fresc. Es van utilitzar els següents siRNAs: siRNA Negative Control #1, esiRNA1 ATG7. Ambdós van ser comprats a Sigma-Aldrich.

TRANSDUCCIÓ ESTABLE AMB VECTORS LENTIVIRALS

PRODUCCIÓ DEL VECTOR LENTIVIRAL

Les cèl·lules HEK-293T van ser transfectades simultàniament amb quatre plasmidis utilitzant el protocol explicat anteriorment:

- **pMDLg/pRRE:** vector d'empaquetament lentiviral de tercera generació contenint els gens de les proteïnes GAG i POL. Es van utilitzar 5µg per placa de 100mm.
- **pMD2.G:** vector codificador de la glicoproteïna G de la càpside del virus de l'estomatitis vesicular (VSV-G) i les altres proteïnes de la càpside viral. Es van utilitzar 2,5µg per placa de 100mm.
- **pRSV-Rev:** vector codificador de la proteïna lentiviral Rev. Es van utilitzar 2,5µg per placa de 100mm.
- **Vector de traducció:** es van utilitzar vectors tant d'expressió (pLOVE-Nmyc) com vectors que codificaven elements silenciants (pLKO.1 MYCN shRNA). El vector pLKO.1 *scramble* shRNA s'ha utilitzat com a control negatiu. Es van utilitzar 10µg de plasmidi vector per placa de 100mm.

El sobrenedant que contenia les partícules virals es va recollir 24 i 48 hores després de la transfecció, es va filtrar utilitzant un filtre de 0.45µm (Millipore) i es va aliquotar. Les aliquotes van ser conservades a -80°C. Fins a la seva utilització.

TRANSDUCCIÓ AMB LENTIVIRUS

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 6 pous en un volum final de 2ml el dia anterior a l'inici de l'experiment. La transducció es va fer per addició directa del sobrenedant lentiviral al cultiu cel·lular juntament amb 5 µg/ml de polibré (Sigma-Aldrich). Aquest últim es va agregar per afavorir la transducció. Les cèl·lules es van centrifugar a 1800rpm per 30 minuts i, posteriorment, es van incubar durant 3 hores a 37°C. Acabada la incubació el sobrenedant va ser aspirat i les cèl·lules es van cultivar en medi normal durant unes altres 72 hores.

ANÀLISI DE LA VIABILITAT CEL·LULAR

ANÀLISI DE VIABILITAT PER CRISTALL VIOLETA

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 48 pous en un volum final de 300µl el dia anterior a l'inici de l'experiment. Després del tractament indicat, les cèl·lules es van rentar 2 vegades amb PBS, es van tenyir amb una solució de cristall violeta (Sigma-Aldrich) durant 10 minuts i es van rentar fins a eliminar tota el tint residual. Les cèl·lules tenyides es van lisar amb SDS 5% (Sigma-Aldrich) i l'absorbància de la solució es va mesurar a 540nm en un lector multiplaca. La viabilitat s'expressa com a percentatge respecte a la viabilitat de les cèl·lules que van ser tractades només amb el solvent vehicle (control). Cada condició experimental es va realitzar per triplicat.

ANÀLISI DE LA VIABILITAT PER MTS

Les cèl·lules es van cultivar en plaques de 96 pous en un volum final de 100µl el dia anterior a l'inici de l'experiment. Després del tractament indicat, a cada pou es van addicionar 20µl de la solució preparada a partir del *MTS/PMS Cell Proliferation Kit* (Promega), utilitzant 20ml de MTS per cada 1ml de PMS. Les cèl·lules es van incubar a 37°C durant dues hores i l'absorbància de la solució es va mesurar a 540nm en un lector multiplaca. La viabilitat s'expressa com a percentatge respecte a la viabilitat de les cèl·lules que van ser tractades només amb el solvent vehicle (control). Cada condició experimental es va realitzar per triplicat.

ANÀLISI DELS EFECTES DE LA COMBINACIÓ DE DROGUES

Per avaluar els efectes de la combinació de les drogues utilitzades es van analitzar els resultats de les anàlisis de viabilitat utilitzant el *software CompuSyn*. Aquest *software* es basa en el mètode de l'efecte medi de Chou-Talalay (Chou & Talalay, 1984). Breument, els tres tipus d'interacció entre drogues (antagonisme, additivitat i sinèrgisme) es poden definir matemàticament mitjançant l'índex de combinació (CI):

$$CI = (D_1 + D_2) / (ED_{x1} + ED_{x2})$$

on D_1 i D_2 són les concentracions necessàries de les drogues 1 i 2 utilitzades en combinació per produir un cert efecte (ED_{50} , ED_{75} , ED_{90} , etc); ED_{x1} i ED_{x2} són les concentracions de les drogues 1 i 2 que produeixen el mateix efecte utilitzades individualment. En aquesta equació, $CI > 1.1$ representa una interacció antagònica, $1.1 > CI > 0.9$ una interacció additiva, i $CI < 0.9$ un efecte sinèrgic. Aquests valors es poden representar gràficament mitjançant l'isoblograma, com explica la figura següent:

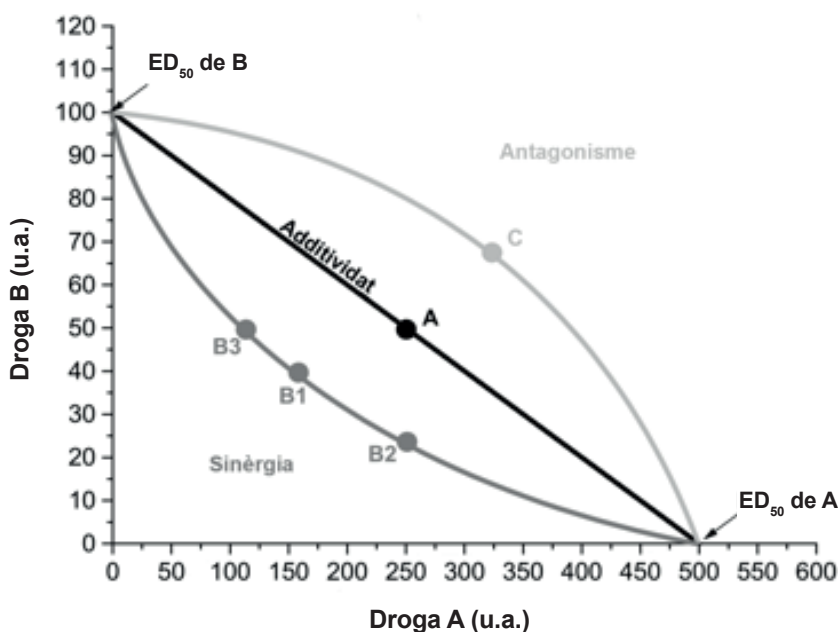


Figura 1. Isoblograma. Les unitats en les abscesses i les ordenades són les concentracions de les drogues A i B. La línia negra connecta les concentracions de les drogues utilitzades individualment que produeixen el mateix efecte en el sistema. En aquest exemple, s'utilitza l' ED_{50} . L'additivitat està representada amb les concentracions que donen un 50% d'inhibició (punt A). Si el 50% d'inhibició s'aconsegueix amb concentracions inferiors a l' ED_{50} de ambdues drogues utilitzades individualment (punts B1, B2 i B3), les drogues són sinèrgiques. Si la inhibició obtinguda per la combinació és menor del 50%, les drogues són antagòniques (punt C).

ANÀLISI DEL CICLE CEL·LULAR I DE L'APOPTOSI PER CITOMETRIA DE FLUX

Després del tractament, les cèl·lules adherides i flotants van ser centrifugades a 1000 rpm durant cinc minuts. A continuació, un milió de cèl·lules van ser rentades en PBS estèril i centrifugades a 1000 rpm durant cinc minuts, fixades en 1ml d'etanol 70%, i deixades a 4°C durant un mínim de dues hores. Posteriorment, les cèl·lules es van centrifugar per eliminar l'etanol, i el precipitat es va resuspendre i incubar durant 30 minuts a 37°C en una solució de RNasa A (Sigma-Aldrich) 100 µg/ml en PBS. Finalment, les mostres es filtren, s'addicionen 13µl/ml de iodur de propidi 1mg/ml, i s'analitzen pel citòmetre de flux.

EXTRACCIÓ TOTAL DE PROTEÏNES

Després del tractament indicat, les cèl·lules van ser rentades dues vegades amb PBS i resuspeses en 100µl de tampó de lisi (40mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 0.2% Nonidet P-40, 1% coctel inhibidor de proteases, 1% coctel 2 i 3 inhibidor de fosfatases (Sigma)). El lisat de cèl·lules es va centrifugar a 4°C durant 5 minuts a 13000rpm i el precipitat es va descartar.

La concentració de proteïnes en el lisat cel·lular va ser quantificada mitjançant el kit *BCA Protein Assay* seguint les instruccions del fabricant (Thermo Scientific). Breument, es va incubar 2µl de lisat cel·lular durant 30 minuts en 200ul d'una solució obtinguda barrejant 196µl de solució A amb 4µl de solució B. Passat el temps, les mostres en van a analitzar en un lector multiplaca a 562nm.

WESTERN BLOT

20 µg de proteïna van ser resuspesos en tampó de Laemmli i carregats en gels SDS-PAGE del 10% o 15% d'acrilamida. L'electroforesi es va realitzar amb tampó d'electroforesi (Tris-HCl 25mM pH8.8, SDS 0.1%, glicina 192mM) i, successivament, les proteïnes van ser transferides a una membrana de PVDF 0,45µm (G&E Healthcare).

Finalitzada la transferència, les membranes es van incubar durant una hora en TBS-Tween20 0,1% amb 5% llet desnatada per a bloquejar unions inespecífiques. L'incubació amb els anticossos primaris es va realitzar durant la nit a 4°C. Els diferents anticossos primaris que es van utilitzar són: anti-PARP-1, anti-p53, anti-MDM2 (Santa Cruz Biotechnologies), anti-tyrosine hydroxylase, anti-N-myc, anti-p21 (Calbiochem), anti-LC3 (MBL International), anti-E2F1(Cell Signaling Technology), anti-chromogranin A (BioGenex), anti-NF200, anti-β-actin (Sigma). Després d'aquesta incubació, les membranes es van rentar amb TBS-Tween20 0.1% i posteriorment es van incubar una hora en presència de un anticòs secundari biotinitat, marcat amb HRP (peroxidasa de rave picant) (DAKO).

Acabat el procés d'hibridació, les membranes es van rentar amb TBS-Tween20 0.1% i es van revelar amb *ECL Western blotting detection reagents* (GE Healthcare) utilitzant pel·lícules autoradiogràfiques (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare).

EXTRACCIÓ DEL RNA

Les cèl·lules es van cultivar en plaques de 6 pous en un volum final de 2ml el dia anterior al inici de l'experiment. Després del tractament indicat, les cèl·lules van ser rentades dues vegades amb PBS i resospes en 1ml de TriZOL (Life Technologies). L'extracció es va realitzar seguint les instruccions del proveïdor. Breument, les mostres es van resuspendre en 1ml de TriZOL i es van incubar per 5 minuts. Passat aquest temps, es van addicionar 200µl de cloroform. Les mostres es van barrejar i incubar durant 5 minuts, després dels quals es va separar la fase aquosa del fenol centrifugant durant 10 minuts a 13000 rpm. Una vegada es va recuperar la fase aquosa, aquesta es va barrejar amb 500ul d'isopropanol. La barreja es va incubar durant 10 minuts per tal de precipitar el RNA i, posteriorment, es va centrifugar durant 10 minuts a 13000 rpm, per tal de facilitar la precipitació del RNA. El sobrenadant va ser eliminat, i el RNA es va rentar amb etanol 75%. Finalment, es va centrifugar la mostra durant 5 minuts a 13000 rpm i, una vegada eliminat el sobrenadant, es va deixar assecar durant 15 minuts i es va resuspendre en 30µl d'aigua *Nuclease-Free Water* (Life Technologies). La concentració de RNA en el llistat cel·lular va ser quantificada en un NanoDrop 2000 (thermo Scientific).

qPCR

3 µg de RNA van ser retrotranscrits utilitzant la transcriptasa inversa MMLV (Life Technologies) seguint les instruccions del proveïdor. El cDNA obtingut es va utilitzar per amplifícacions de PCR diluït 1:100, utilitzant el termociclador *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (Roche Applied Science). L'anàlisi de les quantitats relatives de mRNA es va fer utilitzant el *software Light Cycler 480*. Els primers utilitzats van ser:

- **MYCN:** *forward primer:* 5' TCCACCAGCAGCACAACACTATG;
reverse primer: 5' GTCTAGCAAGTCCGAGCGTGT.
- **ACTB:** *forward primer:* 5' CGTCTTCCCCTCCATCG;
reverse primer: 5' CTCGTTAATGTACGCAC.

RT-MLPA

Aquesta tècnica permet la quantificació relativa de fins a 45 seqüències d'àcids nucleics en una sola reacció. Utilitzant el kit *SALSA MLPA R011 Apoptosis Probemix* de MRC-Holland, es van retrotranscriure les seqüències de RNA a cDNA amb els primers específics per a cada seqüència. A continuació, 200ng del cDNA obtingut es van incubar a 60°C durant 16 hores amb les sondes del kit. Els oligonucleòtids obtinguts es van lligar durant 15 minuts a 54°C, i els productes de lligació van ser amplificats per PCR. Els fragments amplificats produïts amb la PCR van ser separats per electroforesi capil·lar en un *48 capillary ABI-PRISM 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). L'àrea de cadascun dels pics va ser analitzada amb el programa Coffalyser.NET.

Bibliografia

Bibliografia

- Aghajanian, C. (2011). Treatment of low-risk gestational trophoblastic neoplasia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *29*(7), 786-8.
- Alaminos, M., Davalos, V., Cheung, N.-K. V, Gerald, W. L., Esteller, M. (2004). Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*, *96*(16), 1208-19.
- American Cancer Society. (n.d.). *Signs and symptoms of neuroblastoma*. Retrieved July 17, 2014, from <http://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma/detailedguide/neuroblastoma-signs-and-symptoms>
- Asahara, H., Li, Y., Fuss, J., Haines, D. S., Vlatkovic, N., Boyd, M. T., Linn, S. (2003). Stimulation of human DNA polymerase epsilon by MDM2. *Nucleic Acids Research*, *31*(9), 2451-9.
- Attiyeh, E. F., London, W. B., Mossé, Y. P., Wang, Q., Winter, C., Khazi, D., Maris, J. M. (2005). Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine*, *353*(21), 2243-53.
- Balasubramanian, S., Hurley, L. H., Neidle, S. (2011). Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nature Reviews. Drug Discovery*, *10*, 261-275.
- Barna, M., Pusic, A., Zollo, O., Costa, M., Kondrashov, N., Rego, E., Ruggero, D. (2008). Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature*, *456*, 971-975.
- Bell, E., Chen, L., Liu, T., Marshall, G. M., Lunec, J., Tweddle, D. A. (2010). MYCN oncoprotein targets and their therapeutic potential. *Cancer Letters*.
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6008), 1203-9.
- Bereshchenko, O. R., Gu, W., Dalla-Favera, R. (2002). Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nature Genetics*, *32*, 606-613.
- Biegging, K. T., Attardi, L. D. (2012). Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends in Cell Biology*, *22*(2), 97-106.
- Bolden, J. E., Peart, M. J., Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *5*, 769-784.
- Bond, G. L., Hu, W., Bond, E. E., Robins, H., Lutzker, S. G., Arva, N. C., Levine, A. J. (2004). A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*, *119*, 591-602.
- Boon, K., Caron, H. N., Van Asperen, R., Valentijn, L., Hermus, M. C., Van Sluis, P., Versteeg, R. (2001). N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO Journal*, *20*, 1383-1393.
- Bose, P., Dai, Y., Grant, S. (2014). Histone deacetylase inhibitor (HDACi) mechanisms of action: Emerging insights. *Pharmacology and Therapeutics*.

- Bots, M., Johnstone, R. W. (2009). Rational combinations using HDAC inhibitors. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15, 3970-3977.
- Bourdeaut, F., de Carli, E., Timsit, S., Coze, C., Chastagner, P., Sarnacki, S., Michon, J. (2009). VIP hypersecretion as primary or secondary syndrome in neuroblastoma: A retrospective study by the Société Française des Cancers de l'Enfant (SFCE). *Pediatric Blood & Cancer*, 52(5), 585-90.
- Breitinger, H.-G. (2012). *Toxicity and Drug Testing*. (B. Acree, Ed.). InTech.
- Brodeur, G. M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews. Cancer*, 3(3), 203-216.
- Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castelberry, R. P., Hedborg, F. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 11(8), 1466-77.
- Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science (New York, N.Y.)*, 224(4653), 1121-4.
- Brown, C. J., Cheok, C. F., Verma, C. S., Lane, D. P. (2011). Reactivation of p53: From peptides to small molecules. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32, 53-62.
- Burger, K., Mühl, B., Harasim, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Orban, M., Eick, D. (2010). Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 12416-12425.
- Burkhardt, C. A., Cheng, A. J., Madafiglio, J., Kavallaris, M., Mili, M., Marshall, G. M., Haber, M. (2003). Effects of MYCN antisense oligonucleotide administration on tumorigenesis in a murine model of neuroblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 1394-1403.
- Bursac, S., Brdovcak, M. C., Donati, G., Volarevic, S. (2014). Activation of the tumor suppressor p53 upon impairment of ribosome biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(6), 817-30.
- Bursac, S., Brdovcak, M. C., Pfannkuchen, M., Orsolici, I., Golomb, L., Zhu, Y., Volarevic, S. (2012). Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 20467-72.
- Bywater, M. J., Pearson, R. B., McArthur, G. a, Hannan, R. D. (2013). Dysregulation of the basal RNA polymerase transcription apparatus in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 13, 299-314.
- Carcagno, A. L., Ogara, M. F., Sonzogni, S. V., Marazita, M. C., Sirkin, P. F., Ceruti, J. M., Cánepa, E. T. (2009). E2F1 transcription is induced by genotoxic stress through ATM/ATR activation. *IUBMB Life*, 61(5), 537-43.
- Caron, H. (1995). Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Medical and Pediatric Oncology*, 24(4), 215-21.

- Carr, J., Bell, E., Pearson, A. D. J., Kees, U. R., Beris, H., Lunec, J., Tweddle, D. A. (2006). Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14(ARF) pathway in neuroblastoma cell lines established at relapse. *Cancer Research*, *66*(4), 2138-45.
- Carroll, P. E., Okuda, M., Horn, H. F., Biddinger, P., Stambrook, P. J., Gleich, L. L., Fukasawa, K. (1999). Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene*, *18*, 1935-1944.
- Carvajal, L., Manfredi, J. J. (2013). Another fork in the road--life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Reports*, *14*, 414-21.
- Castleberry, R. P., Shuster, J. J., Smith, E. I. (1994). The Pediatric Oncology Group experience with the international staging system criteria for neuroblastoma. Member Institutions of the Pediatric Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *12*(11), 2378-81.
- Cha, T.-L., Chuang, M.-J., Wu, S.-T., Sun, G.-H., Chang, S.-Y., Yu, D.-S., Hsiao, P.-W. (2009). Dual degradation of aurora A and B kinases by the histone deacetylase inhibitor LBH589 induces G2-M arrest and apoptosis of renal cancer cells. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(3), 840-50.
- Challagundla, K. B., Sun, X.-X., Zhang, X., Devine, T., Zhang, Q., Sears, R. C., Dai, M.-S. (2011). Ribosomal Protein L11 Recruits miR-24/miRISC To Repress c-Myc Expression in Response to Ribosomal Stress. *Molecular and Cellular Biology*, *31*, 4007-4021.
- Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y., Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature Reviews. Cancer*, *9*, 785-797.
- Chen, J. S., Faller, D. V. (2005). Histone deacetylase inhibition-mediated post-translational elevation of p27KIP1 protein levels is required for G1 arrest in fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, *202*(1), 87-99.
- Chen, L., Iraci, N., Gherardi, S., Gamble, L. D., Wood, K. M., Perini, G., Tweddle, D. A. (2010). p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Research*, *70*, 1377-1388.
- Chen, S., Caragine, T., Cheung, N. K., Tomlinson, S. (2000). Surface antigen expression and complement susceptibility of differentiated neuroblastoma clones. *The American Journal of Pathology*, *156*(3), 1085-91.
- Cheung, N.-K. V., Dyer, M. A. (2013). Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, *13*, 397-411.
- Cheung, N.-K. V., Cohn, S. L. (2006). *Neuroblastoma* (p. 315). Springer Science & Business Media.
- Choi, J. H., Kwon, H. J., Yoon, B. I., Kim, J. H., Han, S. U., Joo, H. J., Kim, D. Y. (2001). Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Japanese Journal of Cancer Research : Gann*, *92*, 1300-1304.
- Choong, M. L., Yang, H., Lee, M. A., Lane, D. P. (2009). Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *8*, 2810-2818.

- Chou, T. C., Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27-55.
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Research*, 70(2), 440-6.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, N.Y.)*, 325, 834-840.
- Cohn, S. L., Pearson, A. D. J., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., Matthay, K. K. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(2), 289-97.
- Collins, J. A., Schandi, C. A., Young, K. K., Vesely, J., Willingham, M. C. (1997). Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 45(7), 923-34.
- Conlon, I., Raff, M. (1999). Size control in animal development. *Cell*, 96(2), 235-44.
- Corvi, R., Savelyeva, L., Breit, S., Wenzel, A., Handgretinger, R., Barak, J., Schwab, M. (1995). Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. *Oncogene*, 10, 1081-1086.
- D'Angio, G. J., Evans, A. E., Koop, C. E. (1971). Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *Lancet*, 1(7708), 1046-9.
- Dai, M.-S., Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 44475-44482.
- Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell*. Mar 30;149(1):22-35
- Dawson, M. A., Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell*. Jul 6;150(1):12-27.
- De Bernardi B, Pianca, C., Pistamiglio, P., Veneselli, E., Viscardi, E., Pession, A., Bruzzi, P. (2001). Neuroblastoma with symptomatic spinal cord compression at diagnosis: treatment and results with 76 cases. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(1), 183-90.
- De Preter, K., Vandesompele, J., Heimann, P., Yigit, N., Beckman, S., Schramm, A., Speleman, F. (2006). Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes. *Genome Biology*, 7(9), R84.
- DeGregori, J., Kowalik, T., Nevins, J. R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Molecular and Cellular Biology*, 15, 4215-4224.

- Donati, G., Brighenti, E., Vici, M., Mazzini, G., Treré, D., Montanaro, L., Derenzini, M. (2011). Selective inhibition of rRNA transcription downregulates E2F-1: a new p53-independent mechanism linking cell growth to cell proliferation. *Journal of Cell Science*, *124*, 3017-3028.
- Donati, G., Peddigari, S., Mercer, C. A., Thomas, G. (2013). 5S Ribosomal RNA Is an Essential Component of a Nascent Ribosomal Precursor Complex that Regulates the Hdm2-p53 Checkpoint. *Cell Reports*, *4*, 87-98.
- Drygin, D., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C. B., O'Brien, S. E., Proffitt, C., Rice, W. G. (2011). Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Research*, *71*, 1418-1430.
- Drygin, D., Siddiqui-Jain, A., O'Brien, S., Schwaebe, M., Lin, A., Bliesath, J., Rice, W. G. (2009). Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Research*, *69*, 7653-7661.
- Eggert, A., Grotzer, M. A., Ikegaki, N., Liu, X. G., Evans, A. E., Brodeur, G. M. (2000). Expression of neurotrophin receptor TrkA inhibits angiogenesis in neuroblastoma. *Medical and Pediatric Oncology*, *35*(6), 569-72.
- Eggert, A., Ikegaki, N., Liu, X. G., Brodeur, G. M. (2000). Prognostic and biological role of neurotrophin-receptor TrkA and TrkB in neuroblastoma. *Klinische Pädiatrie*, *212*(4), 200-5.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.-U., Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation*, *16*, 966-975.
- Elenbaas, B., Dobbstein, M., Roth, J., Shenk, T., Levine, A. J. (1996). The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *2*(4), 439-51.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews. Genetics*, *8*(4), 286-98.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine*, *358*(11), 1148-59.
- Fantin, V. R., Richon, V. M. (2007). Mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors and their therapeutic implications. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *13*, 7237-7242.
- Fenrick, R., Hiebert, S. W. (1998). Role of histone deacetylases in acute leukemia. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, *30-31*, 194-202.
- Finkel, T., Deng, C.-X., Mostoslavsky, R. (2009). Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, *460*, 587-591.
- Fouladi, M., Park, J. R., Stewart, C. F., Gilbertson, R. J., Schaiquevich, P., Sun, J., Adamson, P. C. (2010). Pediatric phase I trial and pharmacokinetic study of vorinostat: a Children's Oncology Group phase I consortium report. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(22), 3623-9.

- Francisco, R., Pérez-Perarnau, A., Cortés, C., Gil, J., Tauler, A., Ambrosio, S. (2011). Histone deacetylase inhibition induces apoptosis and autophagy in human neuroblastoma cells. *Cancer Letters*. May 1;318(1):42-52
- Frew, A. J., Johnstone, R. W., Bolden, J. E. (2009). Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Letters*. Aug 8;280(2):125-33.
- Fritsche, P., Seidler, B., Schüler, S., Schnieke, A., Göttlicher, M., Schmid, R. M., Schneider, G. (2009). HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut*, 58, 1399-1409.
- Fulda, S., Lutz, W., Schwab, M., Debatin, K. M. (1999). MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-induced apoptosis. *Oncogene*, 18, 1479-1486.
- Galderisi, U., Di Bernardo, G., Cipollaro, M., Peluso, G., Cascino, A., Cotrufo, R., Melone, M. A. (1999). Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells: role of N-myc gene product. *Journal of Cellular Biochemistry*, 73, 97-105.
- Gammoh, N., Lam, D., Puente, C., Ganley, I., Marks, P. A., Jiang, X. (2012). Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Apr 24;109(17):6561-5.
- Ganeshan, V. R., Schor, N. F. (2011). Pharmacologic management of high-risk neuroblastoma in children. *Paediatric Drugs*, 13(4), 245-55.
- Ganguli, G., Wasyluk, B. (2003). p53-independent functions of MDM2. *Molecular Cancer Research* : MCR, 1(14), 1027-35.
- García-Echeverría, C., Chène, P., Blommers, M. J., Furet, P. (2000). Discovery of potent antagonists of the interaction between human double minute 2 and tumor suppressor p53. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(17), 3205-8.
- Gilkes, D. M., Chen, L., Chen, J. (2006). MDMX regulation of p53 response to ribosomal stress. *Embo J*, 25, 5614-5625.
- Glaser, K. B., Staver, M. J., Waring, J. F., Stender, J., Ulrich, R. G., Davidsen, S. K. (2003). Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(2), 151-63.
- Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X., Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. Dec 19;363:15-23
- Golomb, L., Bublik, D. R., Wilder, S., Nevo, R., Kiss, V., Grabusic, K., Oren, M. (2012). Importin 7 and exportin 1 Link c-Myc and p53 to regulation of ribosomal Biogenesis. *Molecular Cell*, 45, 222-232.
- Goodwin, J. F., Knudsen, K. E. (2014). Beyond DNA Repair: DNA-PK Function in Cancer. *Cancer Discovery*, 4(10), 1126-1139.
- Green, D. R., Levine, B. (2014). To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell*, 157(1), 65-75.

- Grummt, I. (2010). Wisely chosen paths - regulation of rRNA synthesis: Delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden. *FEBS Journal*, 277, 4626-4639.
- Gryder, B. E., Sodji, Q. H., Oyelere, A. K. (2012). Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. *Future Medicinal Chemistry*. Mar;4(4):505-24.
- Guha, M., Altieri, D. C. (2009). Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(17), 2708-10.
- Hahn, C. K., Ross, K. N., Warrington, I. M., Mazitschek, R., Kanegai, C. M., Wright, R. D., Stegmaier, K. (2008). Expression-based screening identifies the combination of histone deacetylase inhibitors and retinoids for neuroblastoma differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(28), 9751-6.
- Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., Robson, C. N. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate*, 59, 177-189.
- Happo, L., Strasser, A., Cory, S. (2012). BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 5), 1081-7.
- Haspel, J., Shaik, R. S., Ifedigbo, E., Nakahira, K., Dolinay, T., Englert, J. A., Choi, A. M. K. (2011). Characterization of macroautophagic flux in vivo using a leupeptin-based assay. *Autophagy*, 7(6), 629-42.
- He, C., Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*, 43, 67-93.
- Heinicke, U., Fulda, S. (2014). Chemosensitization of rhabdomyosarcoma cells by the histone deacetylase inhibitor SAHA. *Cancer Letters*, 351(1), 50-8.
- Heyne, K., Schmitt, K., Mueller, D., Armbruester, V., Mestres, P., Roemer, K. (2008). Resistance of mitochondrial p53 to dominant inhibition. *Molecular Cancer*, 7(1), 54.
- Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T., Minturn, J. E., Ikegaki, N., Foster, P., Brodeur, G. M. (2002). Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Research*, 62(22), 6462-6.
- Hock, A. K., Vousden, K. H. (2014). The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(1), 137-49.
- Hoebeek, J., Michels, E., Pattyn, F., Combaret, V., Vermeulen, J., Yigit, N., Vandesompele, J. (2009). Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer Letters*, 273, 336-346.
- Huang, B. H., Laban, M., Leung, C. H.-W., Lee, L., Lee, C. K., Salto-Tellez, M., Hooi, S. C. (2005). Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death and Differentiation*, 12(4), 395-404.
- Huang, J.-M., Sheard, M. A., Ji, L., Spoto, R., Keshelava, N. (2010). Combination of vorinostat and flavopiridol is selectively cytotoxic to multidrug-resistant

- neuroblastoma cell lines with mutant TP53. *Molecular Cancer Therapeutics*, *9*, 3289-3301.
- Hurley, J. H., Schulman, B. A. (2014). Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion. *Cell*, *157*(2), 300-11.
- Ikeda, H., Iehara, T., Tsuchida, Y., Kaneko, M., Hata, J., Naito, H., Takamatsu, H. (2002). Experience with International Neuroblastoma Staging System and Pathology Classification. *British Journal of Cancer*, *86*(7), 1110-6.
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Pelicci, P. G. (2005). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nature Medicine*, *11*(1), 71-6.
- Ishii, S., Kurasawa, Y., Wong, J., Yu-Lee, L.-Y. (2008). Histone deacetylase 3 localizes to the mitotic spindle and is required for kinetochore-microtubule attachment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(11), 4179-84.
- Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Nakagawara, A. (2000). High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*, *19*(5), 617-23.
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C.-H., Kovacs, J. J., Higashimoto, Y., Appella, E., Yao, T.-P. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *The EMBO Journal*, *21*(22), 6236-45.
- Janardhanan, R., Banik, N. L., Ray, S. K. (2009). N-Myc down regulation induced differentiation, early cell cycle exit, and apoptosis in human malignant neuroblastoma cells having wild type or mutant p53. *Biochemical Pharmacology*, *78*, 1105-1114.
- Jiang, R., Xue, S., Jin, Z. (2011). Stable knockdown of MYCN by lentivirus-based RNAi inhibits human neuroblastoma cells growth in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *410*, 364-370.
- Jin, Y.-Q., An, G.-S., Ni, J.-H., Li, S.-Y., Jia, H.-T. (2014). ATM-dependent E2F1 accumulation in the nucleolus is an indicator of ribosomal stress in early response to DNA damage. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *13*(10), 1627-38.
- Kaimori, A., Potter, J. J., Choti, M., Ding, Z., Mezey, E., Koteish, A. A. (2010). Histone deacetylase inhibition suppresses the transforming growth factor beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *52*, 1033-1045.
- Kaneko, Y., Knudson, A. G. (2000). Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *29*(2), 89-95.
- Kato, H., Tamamizu-Kato, S., Shibasaki, F. (2004). Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1alpha and increases transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*, 41966-41974.
- Kerl, K., Ries, D., Unland, R., Borchert, C., Moreno, N., Hasselblatt, M., Frühwald, M. (2013). The histone deacetylase inhibitor SAHA acts in synergism with fenretinide and doxorubicin to control growth of rhabdoid tumor cells. *BMC Cancer*, *13*(1), 286.

- Keshelava, N., Davicioni, E., Wan, Z., Ji, L., Sposto, R., Triche, T. J., Reynolds, C. P. (2007). Histone deacetylase 1 gene expression and sensitization of multidrug-resistant neuroblastoma cell lines to cytotoxic agents by depsipeptide. *Journal of the National Cancer Institute*, *99*(14), 1107-19.
- Keshelava, N., Zuo, J. J., Chen, P., Waidyaratne, S. N., Luna, M. C., Gomer, C. J., Reynolds, C. P. (2001). Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Research*, *61*, 6185-6193.
- Kim, H. D., Kim, T.-S., Kim, J. (2011). Aberrant ribosome biogenesis activates c-Myc and ASK1 pathways resulting in p53-dependent G1 arrest. *Oncogene*, *30*, 3317-3327.
- Kim, Y. B., Lee, K. H., Sugita, K., Yoshida, M., Horinouchi, S. (1999). Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. *Oncogene*, *18*(15), 2461-70.
- Kinzler, K. W., Zehnbauer, B. A., Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Trent, J. M., Meltzer, P. S., Vogelstein, B. (1986). Amplification units containing human N-myc and c-myc genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*, 1031-1035.
- Kleinert, R. (1991). Immunohistochemical characterization of primitive neuroectodermal tumors and their possible relationship to the stepwise ontogenetic development of the central nervous system. 2. Tumor studies. *Acta Neuropathologica*, *82*, 508-515.
- Knudson, A. G. (1992). Stem cell regulation, tissue ontogeny, and oncogenic events. *Seminars in Cancer Biology*, *3*(3), 99-106.
- Kracikova, M., Akiri, G., George, a, Sachidanandam, R., Aaronson, S. a. (2013). A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, *20*, 576-88.
- Kressler, D., Hurt, E., Baßler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. *Jun;1803*(6):673-83.
- Kristensen, L. S., Nielsen, H. M., Hansen, L. L. (2009). Epigenetics and cancer treatment. *European Journal of Pharmacology*. *Dec 25;625*(1-3):131-42.
- Kumer, S. C., Vrana, K. E. (1996). Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *Journal of Neurochemistry*, *67*, 443-462.
- Kushner, B. H., LaQuaglia, M. P., Bonilla, M. A., Lindsley, K., Rosenfield, N., Yeh, S., Cheung, N. K. (1994). Highly effective induction therapy for stage 4 neuroblastoma in children over 1 year of age. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *12*(12), 2607-13.
- Lal, A., Navarro, F., Maher, C. A., Maliszewski, L. E., Yan, N., O'Day, E., Lieberman, J. (2009). miR-24 inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Molecular Cell*, *35*(5), 610-25.
- Lam, Y. W., Lamond, A. I., Mann, M., Andersen, J. S. (2007). Analysis of Nucleolar Protein Dynamics Reveals the Nuclear Degradation of Ribosomal Proteins. *Current Biology*, *17*, 749-760.

- LaRusch, G. A., Jackson, M. W., Dunbar, J. D., Warren, R. S., Donner, D. B., Mayo, L. D. (2007). Nutlin3 blocks vascular endothelial growth factor induction by preventing the interaction between hypoxia inducible factor 1alpha and Hdm2. *Cancer Research*, 67, 450-454.
- Laverdière, C., Cheung, N.-K. V, Kushner, B. H., Kramer, K., Modak, S., LaQuaglia, M. P., Sklar, C. A. (2005). Long-term complications in survivors of advanced stage neuroblastoma. *Pediatric Blood & Cancer*, 45(3), 324-32.
- Li, D., Marchenko, N. D., Moll, U. M. (2011). SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6-Hsp90 chaperone axis. *Cell Death and Differentiation*.
- Li, H., Wu, X. (2004). Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21WAF1/CIP1 expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(2), 860-7.
- Li, Z., Zhu, W.-G. (2014). Targeting Histone Deacetylases for Cancer Therapy: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *International Journal of Biological Sciences*, 10(7), 757-770.
- Lin, R. J., Sternsdorf, T., Tini, M., Evans, R. M. (2001). Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 20(49), 7204-15.
- Ling, D., Marshall, G. M., Liu, P. Y., Xu, N., Nelson, C. A., Iismaa, S. E., Liu, T. (2012). Enhancing the anticancer effect of the histone deacetylase inhibitor by activating transglutaminase. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 48(17), 3278-87.
- Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., Black, R. E. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 379(9832), 2151-61.
- Liu, T., Tee, A. E. L., Porro, A., Smith, S. A., Dwarthe, T., Liu, P. Y., Marshall, G. M. (2007). Activation of tissue transglutaminase transcription by histone deacetylase inhibition as a therapeutic approach for Myc oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18682-7.
- Lodrini, M., Oehme, I., Schroeder, C., Milde, T., Schier, M. C., Kopp-Schneider, A., Deubzer, H. E. (2013). MYCN and HDAC2 cooperate to repress miR-183 signaling in neuroblastoma. *Nucleic Acids Research*, 41(12), 6018-33.
- Loughery, J., Meek, D. (2013). Switching on p53: an essential role for protein phosphorylation? *BioDiscovery*, 8(7).
- Lüthi, A. U., Martin, S. J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, 14(4), 641-50. 3
- Lutz, W., Fulda, S., Jeremias, I., Debatin, K. M., Schwab, M. (1998). MycN and IFNgamma cooperate in apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene*, 17, 339-346.
- Lutz, W., Stöhr, M., Schürmann, J., Wenzel, A., Löhr, A., Schwab, M. (1996). Conditional expression of N-myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin and ornithine decarboxylase and accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene*, 13, 803-812.

- Macias, E., Jin, A., Deisenroth, C., Bhat, K., Mao, H., Lindström, M. S., Zhang, Y. (2010). An ARF-Independent c-MYC-activated tumor suppression pathway mediated by ribosomal protein-Mdm2 interaction. *Cancer Cell*, 18, 231-243.
- Mani, S. A., Barton, M. C. (2011). HDAC3 at the Fulcrum of an Epithelial-Mesenchymal Balance. *Molecular Cell. Sep 2;43(5):697-8*.
- Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R., Pazdur, R. (2007). FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *The Oncologist*, 12(10), 1247-52.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15, 81-94.
- Mariño-Enríquez, A., Dal Cin, P. (2013). ALK as a paradigm of oncogenic promiscuity: different mechanisms of activation and different fusion partners drive tumors of different lineages. *Cancer Genetics*, 206(11), 357-73.
- Maris, J. M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 362(23), 2202-11.
- Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R., Cohn, S. L. (2007). Neuroblastoma. *Lancet. Jun 23;369(9579):2106-20*.
- Maris, J. M., Weiss, M. J., Mosse, Y., Hii, G., Guo, C., White, P. S., Shusterman, S. (2002). Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Research*, 62(22), 6651-8.
- Marks, P. A. (2010). Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1799, 717-25.
- Marks, P. A. (2007). Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene*, 26, 1351-1356.
- Marks, P. A., Richon, V. M., Rifkind, R. A. (2000). Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 92(15), 1210-1216.
- Marks, P. A., Xu, W.-S. (2009). Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(4), 600-8.
- Matthay, K. K., Blaes, F., Hero, B., Plantaz, D., De Alarcon, P., Mitchell, W. G., Pistoia, V. (2005). Opsoclonus myoclonus syndrome in neuroblastoma a report from a workshop on the dancing eyes syndrome at the advances in neuroblastoma meeting in Genoa, Italy, 2004. In *Cancer Letters* (Vol. 228, pp. 275-282).
- Matthay, K. K., Reynolds, C. P., Seeger, R. C., Shimada, H., Adkins, E. S., Haas-Kogan, D., Villablanca, J. G. (2009). Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(7), 1007-13.

- Meek, D. W., Anderson, C. W. (2009). Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009 Dec;1(6):a000950.
- Metzger, M. L., Dome, J. S. (2005). Current therapy for Wilms' tumor. *The Oncologist*, 10(10), 815-26.
- Minsky, N., Oren, M. (2004). The RING domain of Mdm2 mediates histone ubiquitylation and transcriptional repression. *Molecular Cell*, 16(4), 631-9.
- Miser, J. S., Krailo, M. D., Tarbell, N. J., Link, M. P., Fryer, C. J. H., Pritchard, D. J., Grier, H. E. (2004). Treatment of metastatic Ewing's sarcoma or primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of combination ifosfamide and etoposide--a Children's Cancer Group and Pediatric Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(14), 2873-6.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine, B. (2010). Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*. Feb 5;140(3):313-26.
- Moll, U. M., Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 Interaction. *Mol. Cancer Res.*, 1(14), 1001-1008.
- Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S., Niland, J. (1998). The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Research*. Aug 1;26(15):3453-9.
- Monclair, T., Brodeur, G. M., Ambros, P. F., Brisse, H. J., Cecchetto, G., Holmes, K., Pearson, A. D. J. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(2), 298-303.
- Mondick, J. T., Gibiansky, L., Gastonguay, M. R., Skolnik, J. M., Cole, M., Veal, G. J., Barrett, J. S. (2008). Population pharmacokinetic investigation of actinomycin-D in children and young adults. *Journal of Clinical Pharmacology*, 48, 35-42.
- Montanaro, L., Mazzini, G., Barbieri, S., Vici, M., Nardi-Pantoli, A., Govoni, M., Derenzini, M. (2007). Different effects of ribosome biogenesis inhibition on cell proliferation in retinoblastoma protein- and p53-deficient and proficient human osteosarcoma cell lines. *Cell Proliferation*, 40(4), 532-49.
- Montanaro, L., Tréré, D., Derenzini, M. (2012). Changes in ribosome biogenesis may induce cancer by down-regulating the cell tumor suppressor potential. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Jan;1825(1):101-10.
- Mossé, Y. P., Laudenslager, M., Khazi, D., Carlisle, A. J., Winter, C. L., Rappaport, E., Maris, J. M. (2004). Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *American Journal of Human Genetics*, 75(4), 727-30.
- Mossé, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., Maris, J. M. (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*, 455(7215), 930-5.
- Mühlethaler-Mottet, A., Meier, R., Flahaut, M., Bours, K. B., Nardou, K., Joseph, J.-M., Gross, N. (2008). Complex molecular mechanisms cooperate to mediate histone deacetylase inhibitors anti-tumour activity in neuroblastoma cells. *Molecular Cancer*, 7, 55.

- Muscal, J. A., Scorsone, K. A., Zhang, L., Ecsedy, J. A., Berg, S. L. (2013). Additive effects of vorinostat and MLN8237 in pediatric leukemia, medulloblastoma, and neuroblastoma cell lines. *Investigational New Drugs*, 31(1), 39-45.
- Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of Biomedical Research*, 27(4), 254-71.
- Nakagawara, A., Arima-Nakagawara, M., Scavarda, N. J., Azar, C. G., Cantor, A. B., Brodeur, G. M. (1993). Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 328(12), 847-54.
- Nakagawara, A., Ohira, M. (2004). Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. *Cancer Letters*. Feb 20;204(2):213-24.
- Nakamura, Y., Ozaki, T., Niizuma, H., Ohira, M., Kamijo, T., Nakagawara, A. (2007). Functional characterization of a new p53 mutant generated by homozygous deletion in a neuroblastoma cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(4), 892-8.
- Nam, E. A., Cortez, D. (2011). ATR signalling: more than meeting at the fork. *The Biochemical Journal*, 436(3), 527-36.
- National Cancer Institute Webpage. (2014). *Neuroblastoma Treatment (PDQ®) - National Cancer Institute*. Retrieved July 20, 2014, from http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/neuroblastoma/HealthProfessional/page3#Section_830
- Nesbit, C. E., Grove, L. E., Yin, X., Prochownik, E. V. (1998). Differential apoptotic behaviors of c-myc, N-myc, and L-myc oncoproteins. *Cell Growth & Differentiation* : *The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(9), 731-41.
- Niero, E. L., Rocha-Sales, B., Lauand, C., Cortez, B. A., de Souza, M. M., Rezende-Teixeira, P., Machado-Santelli, G. M. (2014). The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* : *CR*, 33, 37.
- O'Brien, M. A., Moravec, R. A., Riss, T. L. (2001). Poly (ADP-ribose) polymerase cleavage monitored in situ in apoptotic cells. *BioTechniques*, 30(4), 886-91.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Taya, Y. (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 102(6), 849-62.
- Oehme, I., Deubzer, H. E., Lodrini, M., Milde, T., Witt, O. (2009). Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(11), 1605-17.
- Oh, M., Choi, I. K., Kwon, H. J. (2008). Inhibition of histone deacetylase1 induces autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369, 1179-1183.
- Okorokov, A. L., Orlova, E. V. (2009). Structural biology of the p53 tumour suppressor. *Current Opinion in Structural Biology*. 77:557-82.

- Oliver, T. G., Grasfeder, L. L., Carroll, A. L., Kaiser, C., Gillingham, C. L., Lin, S. M., Wechsler-Reya, R. J. (2003). Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(12), 7331-6.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.-T., Zhou, T.-T., Liu, B., Bao, J.-K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, *45*, 487-98.
- Palani, C. D., Beck, J. F., Sonnemann, J. (2012). Histone deacetylase inhibitors enhance the anticancer activity of nutlin-3 and induce p53 hyperacetylation and downregulation of MDM2 and MDM4 gene expression. *Investigational New Drugs*, *30*(1), 25-36.
- Palm, T., Hemmer, K., Winter, J., Fricke, I. B., Tarbashevich, K., Sadeghi Shakib, F., Schwamborn, J. C. (2013). A systemic transcriptome analysis reveals the regulation of neural stem cell maintenance by an E2F1-miRNA feedback loop. *Nucleic Acids Research*, *41*(6), 3699-712.
- Patel, J. H., Loboda, A. P., Showe, M. K., Showe, L. C., McMahon, S. B. (2004). Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nature Reviews. Cancer*, *4*, 562-568.
- Peirce, S. K., Findley, H. W. (2009). The MDM2 antagonist nutlin-3 sensitizes p53-null neuroblastoma cells to doxorubicin via E2F1 and TAp73. *International Journal of Oncology*, *34*, 1395-1402.
- Peixoto, P., Castronovo, V., Matheus, N., Polese, C., Peulen, O., Gonzalez, A., Mottet, D. (2012). HDAC5 is required for maintenance of pericentric heterochromatin, and controls cell-cycle progression and survival of human cancer cells. *Cell Death and Differentiation*. Jul;19(7):1239-52
- Perry, R. P., Kelley, D. E. (1970). Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *Journal of Cellular Physiology*, *76*(2), 127-39.
- Pestov, D. G., Strezoska, Z., Lau, L. F. (2001). Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(13), 4246-55.
- Petroni, M., Veschi, V., Gulino, A., Giannini, G. (2012). Molecular mechanisms of MYCN-dependent apoptosis and the MDM2-p53 pathway: an Achilles' heel to be exploited for the therapy of MYCN-amplified neuroblastoma. *Frontiers in Oncology*.
- Petroni, M., Veschi, V., Prodosmo, A., Rinaldo, C., Massimi, I., Carbonari, M., Giannini, G. (2011). MYCN sensitizes human neuroblastoma to apoptosis by HIPK2 activation through a DNA damage response. *Molecular Cancer Research*, *9*, 67-77.
- Plantaz, D., Mohapatra, G., Matthay, K. K., Pellarin, M., Seeger, R. C., Feuerstein, B. G. (1997). Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *The American Journal of Pathology*, *150*(1), 81-9.
- Plantaz, D., Rubie, H., Michon, J., Mechinaud, F., Coze, C., Chastagner, P., Hartmann, O. (1996). The treatment of neuroblastoma with intraspinal extension with chemotherapy followed by surgical removal of residual disease. A prospective study

- of 42 patients--results of the NBL 90 Study of the French Society of Pediatric Oncology. *Cancer*, 78(2), 311-9.
- Polager, S., Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nature Reviews. Cancer*, 9(10), 738-48.
- Qian, D. Z., Kachhap, S. K., Collis, S. J., Verheul, H. M. W., Carducci, M. A., Atadja, P., Pili, R. (2006). Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Cancer Research*, 66, 8814-8821.
- Qiu, L., Burgess, A., Fairlie, D. P., Leonard, H., Parsons, P. G., Gabrielli, B. G. (2000). Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Molecular Biology of the Cell*, 11(6), 2069-83.
- Quin, J. E., Devlin, J. R., Cameron, D., Hannan, K. M., Pearson, R. B., Hannan, R. D. (2014). Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Jun;1842(6):802-16.
- Raney, R. B., Walterhouse, D. O., Meza, J. L., Andrassy, R. J., Breneman, J. C., Crist, W. M., Anderson, J. R. (2011). Results of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group D9602 protocol, using vincristine and dactinomycin with or without cyclophosphamide and radiation therapy, for newly diagnosed patients with low-risk embryonal rhabdomyosarcoma: a report from the Soft. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(10), 1312-8.
- Ray, R. M., Bhattacharya, S., Johnson, L. R. (2011). Mdm2 inhibition induces apoptosis in p53 deficient human colon cancer cells by activating p73- and E2F1-mediated expression of PUMA and Siva-1. *Apoptosis*, 16, 35-44.
- Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G., Maurer, B. J. (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Letters*, 197(1-2), 185-92.
- Richon, V. M., Sandhoff, T. W., Rifkind, R. A., Marks, P. A. (2000). Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 10014-9.
- RNTI-SEHOP. (2012). *Cáncer infantil en España, Estadísticas 1980-2012*.
- Robbins, A. R., Jablonski, S. A., Yen, T. J., Yoda, K., Robey, R., Bates, S. E., Sackett, D. L. (2005). Inhibitors of histone deacetylases alter kinetochore assembly by disrupting pericentromeric heterochromatin. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 4, 717-726.
- Ropero, S., Fraga, M. F., Ballestar, E., Hamelin, R., Yamamoto, H., Boix-Chornet, M., Esteller, M. (2006). A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nature Genetics*, 38, 566-569.
- Ross, R. A., Spengler, B. A., Biedler, J. L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 71(4), 741-7.
- Ruggiero, A., Trombatore, G., Triarico, S., Arena, R., Ferrara, P., Scalzone, M., Riccardi, R. (2013). Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anti-Cancer Drugs*, 24(10), 1007-19.

- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391(6662), 96-9.
- Sakamoto, K. M., Aldana-Masangkay, G. I. (2011). The role of HDAC6 in cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011:875824.
- Samaraweera, L., Grandinetti, K. B., Huang, R., Spengler, B. A., Ross, R. A. (2014). MicroRNAs define distinct human neuroblastoma cell phenotypes and regulate their differentiation and tumorigenicity. *BMC Cancer*, 14, 309.
- Sambucetti, L. C., Fischer, D. D., Zabudoff, S., Kwon, P. O., Chamberlin, H., Troiani, N., Cohen, D. (1999). Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34940-7.
- Samuels-Lev, Y., O'Connor, D. J., Bergamaschi, D., Trigiante, G., Hsieh, J. K., Zhong, S., Lu, X. (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Molecular Cell*, 8, 781-794.
- Sarkar, S. (2013). Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society Transactions*, 41(5), 1103-30.
- Schneider, C., Pasqualucci, L., Dalla-Favera, R. (2011). Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 28, 167-177.
- Schwab, M., Alitalo, K., Klempner, K. H., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Gilbert, F., Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*, 305(5931), 245-8.
- Schwab, M., & Bishop, J. M. (1988). Sustained expression of the human protooncogene MYCN rescues rat embryo cells from senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), 9585-9.
- Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M. (1985). Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature*, 316(6024), 160-2.
- Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Grzeschik, K. H., Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Trent, J. (1984). Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature*, 308(5956), 288-91.
- Schweigerer, L., Breit, S., Wenzel, A., Tsunamoto, K., Ludwig, R., Schwab, M. (1990). Augmented MYCN expression advances the malignant phenotype of human neuroblastoma cells: evidence for induction of autocrine growth factor activity. *Cancer Research*, 50(14), 4411-6.
- Scotting, P. J., Walker, D. A., Perilongo, G. (2005). Childhood solid tumours: a developmental disorder. *Nature Reviews: Cancer*, 5, 481-8.
- Shao, Y., Gao, Z., Marks, P. A., Jiang, X. (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 18030-18035.

- Shen, H.-M., Mizushima, N. (2014). At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(2), 61-71.
- Shiloh, Y., Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(4), 197-210.
- Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P., Hata, J., Joshi, V. V., Roald, B., Castleberry, R. P. (1999). The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*, 86(2), 364-72.
- Shimada, H., Chatten, J., Newton, W. A., Sachs, N., Hamoudi, A. B., Chiba, T., Misugi, K. (1984). Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 73(2), 405-16.
- Shimada, H., Umehara, S., Monobe, Y., Hachitanda, Y., Nakagawa, A., Goto, S., Matthay, K. K. (2001). International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*, 92(9), 2451-61.
- Simon, T., Längler, A., Harnischmacher, U., Frühwald, M. C., Jorch, N., Claviez, A., Hero, B. (2007). Topotecan, cyclophosphamide, and etoposide (TCE) in the treatment of high-risk neuroblastoma. Results of a phase-II trial. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 133(9), 653-61.
- Sjoberg, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Velculescu, V. E. (2006). The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science*. Oct 13;314(5797):268-74.
- Slack, A., Lozano, G., Shohet, J. M. (2005). MDM2 as MYCN transcriptional target: Implications for neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Letters*. Oct 18;228(1-2):21-7.
- Slingerland, M., Guchelaar, H.-J., Gelderblom, H. (2013). Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anti-Cancer Drugs*, 1-10.
- Smith, S. J., Diehl, N. N., Smith, B. D., Mohney, B. G. (2010). Incidence, ocular manifestations, and survival in children with neuroblastoma: a population-based study. *American Journal of Ophthalmology*, 149(4), 677-682.e2.
- Spengler, B. A., Ross, R. A., Biedler, J. L. (1986). Differential drug sensitivity of human neuroblastoma cells. *Cancer Treatment Reports*, 70(8), 959-65.
- Spiller, S. E., Ditzler, S. H., Pullar, B. J., Olson, J. M. (2008). Response of preclinical medulloblastoma models to combination therapy with 13-cis retinoic acid and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *Journal of Neuro-Oncology*, 87(2), 133-41.
- Strieder, V., Lutz, W. (2003). E2F proteins regulate MYCN expression in neuroblastomas. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 2983-9.
- Subramanian, C., Jarzembowski, J. A., Pipari, A. W., Castle, V. P., Kwok, R. P. (2011). HDAC6 Deacetylates Ku70 and Regulates Ku70-Bax Binding in Neuroblastoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 13, 726-734.

- Sui, G., Affar, E. B., Shi, Y., Brignone, C., Wall, N. R., Yin, P., Shi, Y. (2004). Yin Yang 1 is a negative regulator of p53. *Cell*, *117*(7), 859-72.
- Sulic, S., Panic, L., Barkic, M., Mercep, M., Uzelac, M., Volarevic, S. (2005). Inactivation of S6 ribosomal protein gene in T lymphocytes activates a p53-dependent checkpoint response. *Genes & Development*, *19*, 3070-3082.
- Sykes, S. M., Mellert, H. S., Holbert, M. A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W. S., McMahon, S. B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Molecular Cell*, *24*(6), 841-51.
- Sykes, S. M., Stanek, T. J., Frank, A., Murphy, M. E., McMahon, S. B. (2009). Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(30), 20197-205.
- Tan, J., Cang, S., Ma, Y., Petrillo, R. L., Liu, D. (2010). Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J.Hematol.Oncol.*, *3*, 5-.
- Tang, Y. A., Lin, R. K., Tsai, Y. T., Hsu, H. S., Yang, Y. C., Chen, C. Y., Wang, Y. C. (2012). MDM2 overexpression deregulates the transcriptional control of RB/E2F leading to DNA methyltransferase 3A overexpression in lung cancer. *Clinical Cancer Research*, *18*, 4325-4333.
- Taupenot, L., Ciesielski-Treska, J., Ulrich, G., Chasserot-Golaz, S., Aunis, D., Bader, M. F. (1996). Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience*, *72*, 377-389.
- Teng, T., Mercer, C. A., Hexley, P., Thomas, G., Fumagalli, S. (2013). Loss of tumor suppressor RPL5/RPL11 does not induce cell cycle arrest but impedes proliferation due to reduced ribosome content and translation capacity. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(23), 4660-71.
- Thomas, G. (2000). An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nature Cell Biology*, *2*, E71-E72.
- Thomson, E., Ferreira-Cerca, S., Hurt, E. (2013). Eukaryotic ribosome biogenesis at a glance. *Journal of Cell Science*, *126*, 4815-21.
- Tovar, C., Rosinski, J., Filipovic, Z., Higgins, B., Kolinsky, K., Hilton, H., Vassilev, L. T. (2006). Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*, 1888-1893.
- Tweddle, D. A., Malcolm, A. J., Bown, N., Pearson, A. D., Lunec, J. (2001). Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer Res.*, *61*, 8-13.
- Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Kitagawa, M. (2005). Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *The EMBO Journal*, *24*, 160-169.
- Uehara, N., Yoshizawa, K., Tsubura, A. (2012). Vorinostat enhances protein stability of p27 and p21 through negative regulation of Skp2 and Cks1 in human breast cancer cells. *Oncology Reports*, *28*(1), 105-10.

- Ungerstedt, J. S., Sowa, Y., Xu, W.-S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., Marks, P. A. (2005). Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(3), 673-8.
- Uniprot, human E2F1 webpage, 2014. (2014). *E2F1 - Transcription factor E2F1 - Homo sapiens (Human)*. Retrieved September 07, 2014, from <http://www.uniprot.org/uniprot/Q01094>
- UniProt, human N-Myc webpage, 2014. (2014). *MYCN - N-myc proto-oncogene protein - Homo sapiens (Human)*. Retrieved September 07, 2014, from <http://www.uniprot.org/uniprot/P04198>
- Van Maerken, T., Rihani, A., Dreidax, D., De Clercq, S., Yigit, N., Marine, J.-C., Speleman, F. (2011). Functional analysis of the p53 pathway in neuroblastoma cells using the small-molecule MDM2 antagonist nutlin-3. *Molecular Cancer Therapeutics*, *10*, 983-993.
- Van Maerken, T., Rihani, A., Van Goethem, A., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. (2014). Pharmacologic activation of wild-type p53 by nutlin therapy in childhood cancer. *Cancer Letters*. *Mar 28;344(2):157-65*.
- Van Maerken, T., Speleman, F., Vermeulen, J., Lambertz, I., De Clercq, S., De Smet, E., Vandesompele, J. (2006). Small-molecule MDM2 antagonists as a new therapy concept for neuroblastoma. *Cancer Research*, *66*, 9646-9655.
- Van Maerken, T., Vandesompele, J., Rihani, A., De Paepe, A., Speleman, F. (2009). Escape from p53-mediated tumor surveillance in neuroblastoma: switching off the p14(ARF)-MDM2-p53 axis. *Cell Death and Differentiation*, *16*(12), 1563-72.
- Van Riggelen, J., Yetil, A., Felsher, D. W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nature Reviews. Cancer*, *10*, 301-309.
- Van Roy, N., De Preter, K., Hoebeeck, J., Van Maerken, T., Pattyn, F., Mestdagh, P., Speleman, F. (2009). The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy. *Genome Medicine*, *1*, 74.
- Van Roy, N., Forus, A., Myklebost, O., Cheng, N. C., Versteeg, R., Speleman, F. (1995). Identification of two distinct chromosome 12-derived amplification units in neuroblastoma cell line NGP. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *82*, 151-154.
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Liu, E. A. (2004a). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5659), 844-8.
- Veal, G. J., Errington, J., Sludden, J., Griffin, M. J., Price, L., Parry, A., Boddy, A. V. (2003). Determination of anti-cancer drug actinomycin D in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, *795*, 237-243.
- Villagra, A., Cheng, F., Wang, H.-W., Suarez, I., Gluzak, M., Maurin, M., Sotomayor, E. M. (2009). The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nature Immunology*, *10*, 92-100.

- Vlatkovic, N., Guerrero, I., Li, Y., Linn, S., Haines, D. S., Boyd, M. T. (2000). MDM2 interacts with the C-terminus of the catalytic subunit of DNA polymerase epsilon. *Nucleic Acids Research*, 28(18), 3581-6.
- Vogan, K., Bernstein, M., Leclerc, J. M., Brisson, L., Brossard, J., Brodeur, G. M., Gros, P. (1993). Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Research*, 53, 5269-5273.
- Vogan, K., Bernstein, M., Leclerc, J. M., Brisson, L., Brossard, J., Brodeur, G. M., Gros, P. (1993). Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Research*, 53(21), 5269-73.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307-10.
- Volarevic, S., Stewart, M. J., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., Thomas, G. (2000). Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science (New York, N.Y.)*, 288, 2045-2047.
- Vousden, K. H., Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. May 1;137(3):413-31.
- Wade, M., Li, Y.-C., Wahl, G. M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 13, 83-96.
- Walton, J. D., Kattan, D. R., Thomas, S. K., Spengler, B. A., Guo, H.-F., Biedler, J. L., Ross, R. A. (2004). Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 6(6), 838-45.
- Weichert, W. (2009). HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Letters*. Aug 8;280(2):168-76.
- Weiss, W. A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B. G., Bishop, J. M. (1997). Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO Journal*, 16, 2985-2995.
- Wenzel, A., Cziepluch, C., Hamann, U., Schürmann, J., Schwab, M. (1991). The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *The EMBO Journal*, 10(12), 3703-12.
- West, A. C., Johnstone, R. W. (2014). New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *The Journal of Clinical Investigation*, 124, 30-9.
- White, E., DiPaola, R. S. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15, 5308-5316.
- Wilson, A. J., Byun, D.-S., Popova, N., Murray, L. B., L'Italien, K., Sowa, Y., Mariadason, J. M. (2006). Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 13548-13558.
- Witt, O., Deubzer, H. E., Lodrini, M., Milde, T., Oehme, I. (2009). Targeting histone deacetylases in neuroblastoma. *Current Pharmaceutical Design*, 15(4), 436-47.

- Witt, O., Milde, T., Deubzer, H. E., Oehme, I., Witt, R., Kulozik, A., Karapanagiotou-Schenkel, I. (2012). Phase I/II intra-patient dose escalation study of vorinostat in children with relapsed solid tumor, lymphoma or leukemia. *Klinische Pädiatrie*, 224(6), 398-403.
- Xie, H., Hu, L., Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123, 1086-1092.
- Yamaguchi, H., Woods, N. T., Piluso, L. G., Lee, H. H., Chen, J., Bhalla, K. N., Wang, H. G. (2009). p53 acetylation is crucial for its transcription-independent proapoptotic functions. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 11171-11183.
- Yang, J.-Y., Zong, C. S., Xia, W., Wei, Y., Ali-Seyed, M., Li, Z., Hung, M.-C. (2006). MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 7269-7282.
- Yi, C., Ma, M., Ran, L., Zheng, J., Tong, J., Zhu, J., Yu, L. (2012). Function and molecular mechanism of acetylation in autophagy regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6080), 474-7.
- Yoshikawa, M., Hishikawa, K., Marumo, T., Fujita, T. (2007). Inhibition of Histone Deacetylase Activity Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition Induced by TGF- β 1 in Human Renal Epithelial Cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18, 58-65.
- Zhang, X.-H., Rao, M., Loprieto, J. A., Hong, J. A., Zhao, M., Chen, G.-Z., Schrupp, D. S. (2008). Aurora A, Aurora B and survivin are novel targets of transcriptional regulation by histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 7, 1388-1397.
- Zhang, Y., Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell*, 16(5), 369-77.
- Zhang, Y., Wolf, G. W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W. A., Xiong, Y. (2003). Ribosomal Protein L11 Negatively Regulates Oncoprotein MDM2 and Mediates a p53-Dependent Ribosomal-Stress Checkpoint Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), 8902-8912.
- Zhang, Z., Wang, H., Li, M., Rayburn, E. R., Agrawal, S., Zhang, R. (2005). Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway. *Oncogene*, 24(48), 7238-47.
- Zhao, Z., Ma, X., Hsiao, T.-H., Lin, G., Kostic, A., Yu, X., Du, L. (2014). A high-content morphological screen identifies novel microRNAs that regulate neuroblastoma cell differentiation. *Oncotarget*, 5(9), 2499-512.
- Zhou, S., Gu, L., He, J., Zhang, H., Zhou, M. (2011). MDM2 regulates vascular endothelial growth factor mRNA stabilization in hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 31(24), 4928-37.
- Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K. P., Güttlicher, M. (2004). Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*, 5, 455-463.

