



**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

# IBERNAT-NBL

*“ Identificazione di bersagli molecolari per lo sviluppo  
di nuove strategie terapeutiche per il neuroblastoma ”*

**Progetto Cluster “Top-Down” finanziato da Sardegna Ricerche**

con fondi *POR FESR 2014/2020*

*ASSE PRIORITARIO I “RICERCA SCIENTIFICA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE*

*Stato di avanzamento del progetto: 2° semestre*



UNIONE EUROPEA

Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Imprese che partecipano al Cluster**

*Prigen (Pula, CA)*

*Biomedical Research (Pula, Ca)*

*be biotech (CA)*

*Technical Project Service (CA)*

*Microbiol (Macchiareddu, CA)*

*Kinetika Sardegna (Quartu S. Elena, CA)*

*Ardea (CA)*



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**

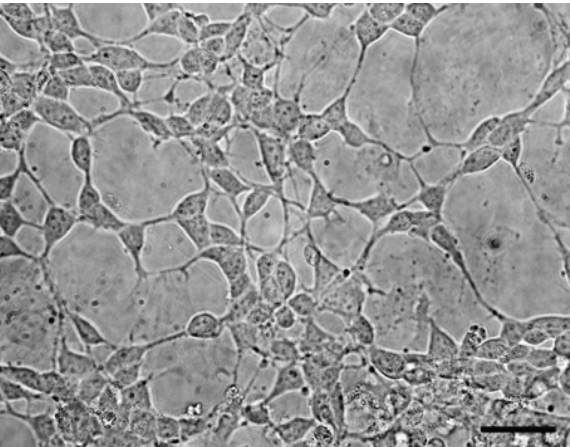


**Università' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## Modelli cellulari di neuroblastoma umano utilizzati



**Linea cellulare      N-MYC status      mut. Alk**

---

<b>LAN-1</b>	<b>ampl</b>	<b>F1174L</b>
<b>Kelly</b>	<b>ampl</b>	<b>F1174L</b>
<b>BE(2C)</b>	<b>ampl</b>	
<b>IMR-32</b>	<b>ampl</b>	
<b>NB1</b>	<b>ampl</b>	<b>ampl.</b>
<b>SH-SY5Y</b>	<b>no ampl.</b>	<b>F1174L</b>



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attivita' svolte nel 2° semestre**

:

### **Attivita' 1:**

***studio della citotossicita' indotta dall' interferone- $\beta$   
(IFN- $\beta$ ) nelle cellule di neuroblastoma umano.***



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attività 1- Risultati :**

- 1) E' stato osservato che la morte per apoptosi delle cellule di neuroblastoma SH-SY5Y indotta dall'  $IFN-\beta$  si associa ad un aumento significativo dei livelli cellulari della proteina ISG54;*
- 2) ISG54 appartiene alla famiglia delle proteine indotte da IFN, RNA a doppia catena e da virus. Svolge un ruolo importante nell' attivita' antivirale degli IFN e, se sovra-espressa, causa morte cellulare per apoptosi;*
- 3) lo studio ha inoltre dimostrato che l'attivazione dei recettori muscarinici di tipo M3 antagonizza la morte cellulare e l'induzione di ISG54 indotte da  $IFN-\beta$ .*



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**







**SARDEGNA  
RICERCHE**



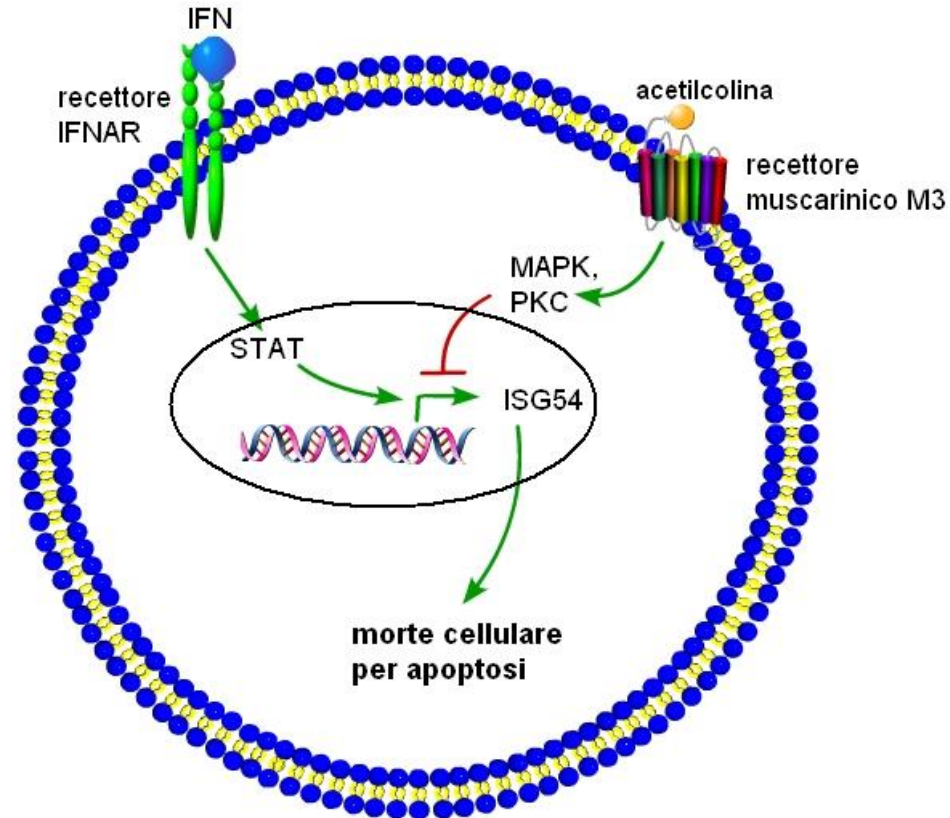
**Università' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attività' 1- Risultati :**

*L'attivazione dei recettori muscarinici M3 antagonizza l'induzione di ISG54 e la morte cellulare indotte da IFN-β in cellule di neuroblastoma*



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Università' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attività' 1 – Conclusioni:**

*L'antagonismo esercitato dai recettori muscarinici M3 sulla morte cellulare ed induzione di ISG54 indotte da IFN- $\beta$  costituisce un importante esempio di come la trasmissione colinergica possa favorire la resistenza del tumore ad agenti citotossici.*



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attività' 2 : studio dell'espressione di bersagli molecolari indotta dall' IFN- $\beta$ in linee cellulari di neuroblastoma umano.**

In questa parte dello studio e' stata esaminata l' efficacia del trattamento con IFN- $\beta$  nell' indurre morte cellulare per apoptosi ed espressione del recettore p75NTR nelle linee cellulari di neuroblastoma IMR32 e BE(2)-C portatrici di amplificazione del gene MYCN, un fattore prognostico sfavorevole del tumore.



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**







**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attivita' 2 – Risultati**

Nelle linee cellulari IMR32 e BE(2)-C l' IFN- $\beta$  ha mostrato un' attivita' pro-apoptotica piu' debole di quella osservata nella linea cellulare SH-SY5Y priva di amplificazione del gene MYCN.

Inoltre l'esposizione ad IFN- $\beta$  ha causato una riduzione, piuttosto che aumento, dei livelli di p75NTR nelle cellule IMR32, e non ha modificato i livelli di questo recettore nelle cellule BE(2)-C.



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attivita' 2 – Conclusioni**

:

La ridotta sensibilita' delle cellule IMR32 e BE(2)-C all' effetto pro-apoptotico e all' induzione di p75NTR indotti dall' IFN- $\beta$  suggerisce che lo stato di amplificazione del gene MYCN presente in queste cellule possa essere implicato nella resistenza all' azione citotossica della citochina.



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

**Attivita' 3:** Studio del potenziamento dell'attivita' citotossica dell' IFN- $\beta$  indotta da farmaci epigenetici in linee cellulari di neuroblastoma umano



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attività' 3 – Risultati**

**1) *l'associazione di IFN- $\beta$  con l'acido valproico, un inibitore delle deacetilasi degli istoni (HDAC), ha causato un potenziamento della morte cellulare per apoptosi sia in cellule SH-SY5Y, prive di amplificazione MYCN, che nelle cellule LAN-1, portatrici di amplificazione MYCN;***

**2) *l'acido valproico ha potenziato l'effetto stimolatorio di IFN- $\beta$  sulla fosforilazione e degradazione proteolitica della  $\beta$ -catenina, una proteina citoplasmatica che regola la trascrizione genica e promuove la proliferazione cellulare;***

**3) *l'acido valproico ha prodotto un significativo aumento della fosforilazione/attivazione di STAT1, una proteina di segnalazione che media l'effetto pro-apoptotico di IFN- $\beta$ ;***



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attività' 3 – Risultati**

- 4) nelle cellule LAN-1 l'esposizione ad acido valproico ha ridotto i livelli cellulari di MYCN;**
- 5) gli effetti dell'acido valproico sono stati osservati a concentrazioni terapeutiche del farmaco (0.6 – 1.0 mM);**
- 6) l'esposizione a concentrazioni terapeutiche di acido valproico ha prodotto un significativo aumento dello stato di acetilazione degli istoni;**
- 5) come l'acido valproico, altri inibitori di HDAC hanno potenziato l'effetto pro-apoptotico di IFN- $\beta$  nelle cellule di neuroblastoma.**



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



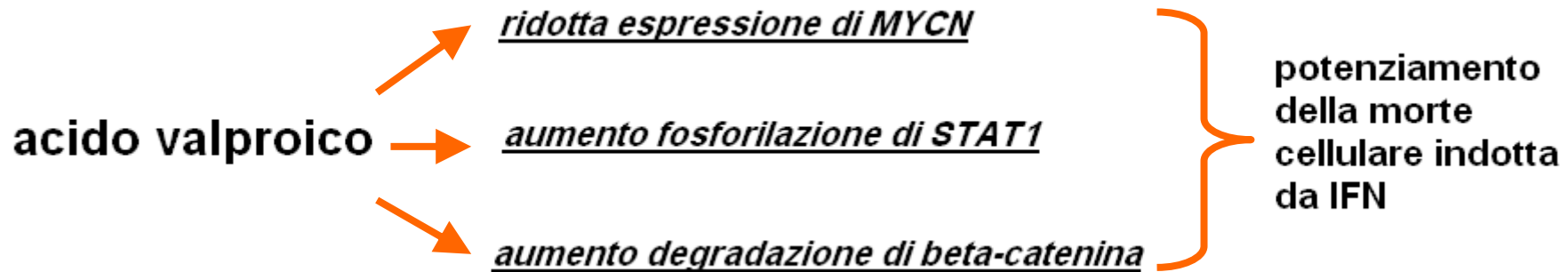
**Università' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## Attività' 3 – Risultati

### Effetti dell' associazione dell' acido valproico con IFN- $\beta$



UNIONE EUROPEA

Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**







**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attività 3 – Conclusioni**

*I risultati ottenuti indicano che l'associazione dell' IFN- $\beta$  con l'acido valproico o con altri inibitori di HDAC esercita un maggior effetto citotossico sulle cellule di neuroblastoma e puo' costituire una valida strategia terapeutica per questo tumore.*



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attivita' 4** : Effetto dell'acido valproico e di altri farmaci epigenetici sull'espressione del recettore TrkB



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attività' 4 – Risultati**

- 1) *In cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, Kelly e LAN-1 differenziate con acido retinoico, l'esposizione ad acido valproico ed altri inibitori di HDAC di classe I ha causato una marcata riduzione dell'espressione di TrkB, il recettore per la neurotrofina BDNF (brain-derived neurotrophic factor);***
- 2) *il trattamento con acido valproico ha prodotto una inibizione significativa nella segnalazione intracellulare e nell'attività neurotrofica indotte dal BDNF;***
- 3) *il silenziamento genico di HDAC1 ha riprodotto l'effetto inibitorio dell'acido valproico sull'espressione del recettore TrkB;***



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Università' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attività' 4 – Risultati**

- 4) *l'acido valproico ha indotto l'espressione di RUNX3, un fattore di trascrizione che controlla negativamente l'espressione di TrkB;***
- 5) *Il knock-down di RUNX3 ha attenuato l'effetto inibitorio dell'acido valproico sulla espressione di TrkB;***
- 6) *l'acido valproico ha causato una caduta nei livelli cellulari di EZH2, un enzima che metila l'istone H3 e che inibisce l'espressione di RUNX3***



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



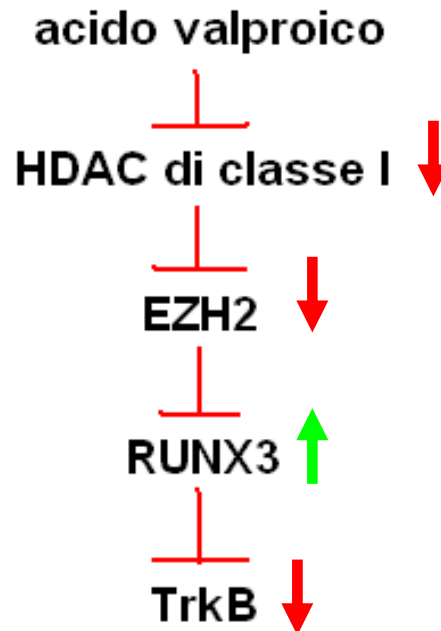
**Università' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## Attività' 4 – Risultati

*Meccanismi epigenetici coinvolti nella inibizione dell'espressione di TrkB indotta dall'acido valproico*



UNIONE EUROPEA

Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attivita' 4 – Conclusioni**

***Studi preclinici e clinici indicano che nel neuroblastoma l'attivita' del complesso BDNF/TrkB si associa ad invasivita', metastasi e resistenza ai chemioterapici.***

***I risultati conseguiti dalla ricerca suggeriscono che l'impiego di acido valproico o di altri inibitori di HDAC di classe I puo' essere un valido strumento terapeutico per sopprimere l'espressione di TrkB nelle forme piu' aggressive di neuroblastoma***



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**







**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

# **Attività 5** – Analisi proteomica nelle cellule di neuroblastoma esposte ad acido valproico



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attivita' 5 – Risultati**

***I risultati sinora ottenuti nelle cellule SH-SY5Y hanno dimostrato che l'esposizione prolungata (24 h) all'acido valproico causa:***

***a) un aumento dei livelli di proteine «chaperone» e di proteine che regolano la funzione mitocondriale, l'omeostasi cellulare del calcio ed il processamento e stabilizzazione dell'RNA messaggero;***

***b) diminuzione dell'espressione di proteine del citoscheletro, di chemochine proinfiammatorie e della subunita'  $\gamma$  dell'enzima che forma il mannosio fosfato.***



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Attivita' 5 – Conclusioni**

***L' esposizione prolungata delle cellule di neuroblastoma umano all' acido valproico induce alterazioni significative del corredo proteomico con possibili conseguenze per molteplici funzioni cellulari.***



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

**Attivita' svolte nel 2° semestre  
in collaborazione con le Imprese del Cluster**

**1) Attivita' svolte in collaborazione con l'Impresa Prigen:**

- a) allestimento di colture di fibroblasti isolati dalla cute umana e di cellule di melanoma murino (B16-F1);
- b) messa a punto di saggi di vitalita' e proliferazione cellulari nei fibroblasti e nelle cellule B16-F1;
- c) messa a punto di metodiche per lo studio della melanogenesi e della attivita' della tirosinasi in estratti cellulari;
- d) sviluppo di metodiche per lo studio della produzione di matrice extracellulare.



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

**Attività svolte nel 2° semestre  
in collaborazione con le Imprese del Cluster**

**2) Attività svolte in collaborazione con l'Impresa be.biotech:**

**a) ricerca di bersagli molecolari in modelli cellulari di carcinoma della prostata;**

**b) studio dell' induzione di p75NTR da parte di farmaci epigenetici nella linea cellulare di carcinoma della prostata umano PC3;**

**c) analisi di biomarcatori tumorali in esosomi e microvescicole extracellulari.**



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

**Attività svolte nel 2° semestre  
in collaborazione con le Imprese del Cluster**

### **3) Attività svolte in collaborazione con l'Impresa Microbiol :**

**a) supporto tecnico-scientifico per lo sviluppo di terreni e supplementi per la coltura di linee cellulari di mammifero.**



**UNIONE EUROPEA**  
cnel la  
Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**







**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Universita' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## **Divulgazione dei risultati e prodotti**

Partecipazione all' Evento UniCa & Imprese - CESAR Open Day organizzato dall' Universita' degli Studi di Cagliari in data 27 Giugno 2019 presso la sede CESAR, Cittadella Universitaria di Monserrato – Blocco A.



**UNIONE EUROPEA**

Fondo europeo di sviluppo regionale



**REPUBBLICA ITALIANA**



**REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA**





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Università' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## Divulgazione dei risultati

Comunicazione al Congresso della  
Society for Neuroscience,  
Sessione: Neuro-Oncology,  
Chicago, IL, USA,  
22 ottobre 2019

NEUROSCIENCE 2019  
[https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/7883]

**Session 557 - Neuro-Oncology** Add to itinerary

557.12 / C10 - Altered neurotrophin receptor expression and signalling by histone deacetylase inhibitors in human neuroblastoma cells

October 22, 2019, 4:00 PM - 5:00 PM Hall A

#### Session Type

Poster

#### Grant Support

Sardegna Ricriche-Progetto  
IBERNAT-HBL-P.O.R.  
Sardegna 2014-2020, CUP  
F21B17000730005

#### Authors

**S. DEDONI**<sup>1</sup>, **L. MARRAS**<sup>2</sup>, **M. C. OLIANAS**<sup>3</sup>, **A. INGIANNI**<sup>2</sup>, \***P. ONALI**<sup>2</sup>;  
<sup>1</sup>Univ. of Cagliari, Dept Biomed. Sci., Cagliari, Italy; <sup>2</sup>Univ. of Cagliari,  
Dept. Biomedical Sci., Cagliari, Italy; <sup>3</sup>Biomed. Sciences, Sect. Neurosci., Univ. of  
Cagliari, Monserrato, Italy

#### Disclosures

**S. Dedoni:** None. **L. Marras:** None. **M.C. Olanas:** None. **A. Inganni:**  
None. **P. Onali:** None.

#### Abstract

Neurotrophin receptors, including TrkA, TrkB, TrkC and p75NTR, have been shown to play a critical role in the biology of human neuroblastoma. Preclinical and clinical studies have demonstrated that the expression of TrkB, the receptor of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), is associated with tumour aggressiveness and resistance to chemotherapy. On the other hand, enhanced expression of the common neurotrophin receptor p75NTR has been reported to induce neuroblastoma cell apoptosis. In the present study we investigated the effects of various histone deacetylase (HDAC) inhibitors on the expression and functional activity of Trk and p75NTR receptors in human neuroblastoma cell lines. We found that in retinoic acid (RA)-differentiated SH-SY5Y cells the HDAC inhibitor valproic acid reduced the expression of TrkB at the protein and mRNA levels, and inhibited the intracellular signalling, neurotrophic activity, and pro-survival function of BDNF. VPA down-regulated TrkB and curtailed BDNF-induced signalling also in RA-differentiated MYCN-amplified LAN-1 and Kelly cells. The class I HDAC inhibitors entinostat and romidepsin mimicked the VPA effect, whereas the class II HDAC inhibitor MC1568, the HDAC 6 inhibitor tubacin and the HDAC 8 inhibitor PCI 34051 were inactive. VPA and entinostat increased the cellular levels of the transcription factor RUNX3, a suppressor of TrkB gene expression. Exposure to VPA enhanced the protein and transcript levels of p75NTR and its co-receptor sortilin in SH-SY5Y and LAN-1 cells. In both cell lines, this effect was associated with a potentiation of VPA-induced apoptosis in response to proNGF. Collectively, these data indicate that some HDAC inhibitors alter neurotrophin receptor expression to promote apoptotic cell death and suggest that this action may contribute to the anti-neuroblastoma activity of these agents.

#### Abstract Citation



UNIONE EUROPEA  
Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA





**SARDEGNA  
RICERCHE**



**Università' degli Studi  
di Cagliari**



**Dipartimento di  
Scienze Biomediche**

## Divulgazione dei risultati e prodotti

Pubblicazione su rivista scientifica internazionale dei risultati sulla regolazione dell' espressione del recettore TrkB da parte dell'acido valproico ed altri inibitori di HDAC nelle cellule di neuroblastoma umano

<https://doi.org/10.1124/jpet.119.258129>

Supplemental material to this article can be found at <http://jpet.aspetjournals.org/content/suppl/2019/07/15/jpet.119.258129.DC1>

Downregulation of TrkB Expression and Signaling by Valproic Acid and Other Histone Deacetylase Inhibitors<sup>1</sup>

○Simona Dedoni, Luisa Marras, ○Marta C. Olanas, Angela Inganni, and ○Pierluigi Onali  
Laboratory of Cellular and Molecular Pharmacology, Section of Neurosciences, Department of Biomedical Sciences (S.D., M.C.O., P.O.) and Section of Microbiology, Department of Biomedical Sciences (L.M., A.I.) University of Cagliari, Cagliari, Italy  
Received March 15, 2019; accepted June 14, 2019

**ABSTRACT**  
Valproic acid (VPA) has been shown to regulate the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but it is not known whether this drug can affect the neuronal responses to BDNF. In the present study, we show that in retinal astrocyte-derived SH-SY5Y human neuroblastoma cells, prolonged exposure to VPA reduces the expression of the BDNF receptor TrkB at the protein and mRNA levels and inhibits the intracellular signaling, neurotrophic activity, and pro-survival function of BDNF. VPA downregulates TrkB and curtails BDNF-induced signaling also in differentiated fetal and LAM-1 neuroblastoma cells and primary mouse cortical neurons. The VPA effect is mimicked by several histone deacetylase (HDAC) inhibitors, including the class I HDAC inhibitors entinostat and romidepsin. Conversely, the class II HDAC inhibitor M315B, the HDAC inhibitor tubacin, the HDAC3 inhibitor PCI-34050, and the VPA derivative valpromide have no effect. In neuroblastoma cells and primary neurons both VPA and entinostat increase the cellular levels of the transcription factor RUNX3, which negatively regulates TrkB gene expression. Treatment with RUNX3 siRNA attenuates VPA-induced RUNX3 elevation and TrkB downregulation. VPA, entinostat, HDAC1 depletion by RNAi, and 5-deazaazacytosine (5-DAZA), an inhibitor of the polycomb repressor complex 2 (PRC2), decrease the PRC2 core component EZH2, a RUNX3 suppressor. Like

VPA, HDAC1 depletion and 5-DAZA increase RUNX3 and decrease TrkB expression. These results indicate that VPA downregulates TrkB through epigenetic mechanisms involving the EZH2/RUNX3 axis and provide evidence that the effect implicates relevant consequences with regard to BDNF efficacy in stimulating intracellular signaling and functional responses.

**SIGNIFICANCE STATEMENT**  
The trophomyosin-related kinase receptor B (TrkB) mediates the stimulatory effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on neuronal growth, differentiation, and survival and is highly expressed in aggressive neuroblastoma and other tumors. Here we show that exposure to valproic acid (VPA) downregulates TrkB expression and functional activity in retinal astrocyte-derived human neuroblastoma cell lines and primary mouse cortical neurons. The effects of VPA are mimicked by other histone deacetylase (HDAC) inhibitors and HDAC1 knockdown and appear to be mediated by an epigenetic mechanism involving the upregulation of RUNX3, a suppressor of TrkB gene expression. TrkB downregulation may have relevance for the use of VPA as a potential therapeutic agent in neuroblastoma and other pathologies characterized by an excessive BDNF/TrkB signaling.

**Introduction**  
The short-chain branched fatty acid valproic acid (VPA) is commonly used in the clinic as an anticonvulsant for the treatment of various forms of epilepsy, also considered as a first-line agent for the management of bipolar mood disorder, and as an analgesic for migraine headaches (Leucher, 2002). Moreover, in clinical trials VPA has been investigated as a potential anticancer agent for both hematologic and solid tumors (Chakravarti et al., 2010). This wide array of pharmacological properties likely stems from the ability of VPA to display multiple mechanisms of action, including inhibition of voltage-gated sodium and calcium channels, potentiation of GABAergic transmission, silencing of glutamate signaling, and alteration of the activity of distinct intracellular signaling mediators (Leucher, 2002). Moreover, VPA at clinically relevant concentrations has been demonstrated to act as an antiproliferative of histone deacetylase (HDAC) (Gatzicher et al., 2001; Phul et al., 2001), which plays a critical role in the epigenetic regulation of gene transcription (Thuggingsen et al., 2005; Bolden et al., 2008). Among the four distinct classes of mammalian HDACs, so far identified, VPA preferentially inhibits HDACs belonging to class I and II (Bolden et al., 2008).

A number of preclinical studies have shown that VPA can exert neuroprotective effects against a variety of brain insults, suggesting a therapeutic potential in different neurodegenerative

**ASSOCIATIONS:** A1, protein kinase B; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; 5-DAZA, 5-deazaazacytosine; A, ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; EZH2, enhancer of zeste homolog 2; FCS, fetal calf serum; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GSK-3 $\beta$ , glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ; HDAC, histone deacetylase; MAP2, microtubule-associated protein 2; PAWP, poly (ADP-ribose) polymerase; PRC2, polycomb repressor complex 2; PRC2, polycomb repressor complex 2; pRC2, quantitative polymerase chain reaction; RA, all-trans retinoic acid; siRNA, small interfering RNA; TrkB-F1, TrkB full-length isoform; TrkB-T1, TrkB truncated isoform; VPA, valproic acid.

**400**



UNIONE EUROPEA  
Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA  
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA

