



Viti i VII-të i Botimit, Nr.2,
Dhjetor 2016

(R)-9-HSA PARAQET EFEKTE ANTIPROLIFERATIVE MË TË THEKSUARA KRAHASUAR ME (S)-9-HSA

***Johana Hysomema**

***Departamenti i Infermierisë dhe Fizioterapisë, Albanian University, Shqipëri**

Adresë kontakti: johanahysomema@gmail.com

Përmbledhje

Acidi 9-hidroksistearik (9-HSA) është një produkt endogjen i procesit të peroksidimit të lipideve që paraqitet si një agjent bllokues i efektshëm i deacetilazës histonike 1 (HDAC1). 9-HSA ka efekte antiproliferative mbi linjën qelizore të adenocarcinomës së kolonit, HT29, në të cilën shkakton aktivizimin e pavarur nga p53 të gjenit p21_{WAF}1 [1]. Bashkëveprimi mes 9-HSA dhe një modeli 3D të HDAC1 është analizuar nëpërmjet *docking*-ut molekular. Duket se domeni katalitik i HDAC1 bashkëvepron në mënyrë më të qëndrueshme me (R)-9-HSA krahasuar me izomerin (S): në fakt, energjia e bashkëveprimit është -8.45 kcal/mol dhe -1.97 kcal/mol përkatësisht për izomerët (R) dhe (S), ndërsa energjia e lirë e përlllogaritur rezulton -6.31 kcal/mol për izomerin (R) dhe +4.98 kcal/mol për (S)-9-HSA [2].

Në këtë studim, izomerët (R) dhe (S) të 9-HSA u izoluan dhe aktiviteti i tyre biologjik u testua në qelizat HT29. Pas 24 orë kultivimi, qelizat HT29 u trajtuan me 50M të (R) dhe (S)-9-HSA dhe më pas membranat e tyre qelizore u bënë të përshkueshme nëpërmjet një solucionit të përbërë nga *RNase* dhe propidium jodi (PI). Fluoreshenca e PI u analizua me citometrin Epics Elite (Coulter) dhe analiza e ciklit qelizor u krye me programin M Cycle (Verity) dhe MODFIT 5.0.

Trajtimi me (S)-9-HSA shkaktoi një bllokim të ciklit qelizor në fazën G0/G1. Për të njëjtin përqendrim, (R)-9-HSA pati një efekt më të theksuar: u verifikua një rritje e ndjeshme e numrit të qelizave në fazën G0/G1. Për të studiuar efektin e (R) dhe (S)-9-HSA mbi aktivitetin e deacetilazave histonike (HDAC1, HDAC2 dhe HDAC3), enzimata u imunoprecipituan nga qelizat HT29 dhe aktiviteti i tyre katalitik u analizua duke përdorur si substrat histone [³H]. Sasia e acetatit [³H] të lëshuar pas aktivitetit të deacetilazave u shpreh si cpm/mg proteinë. Në prani të (R)-9-HSA u vëzhguar një rënie e theksuar e sasisë së acetatit [³H], treguese e efektit më të fortë bllokues mbi aktivitetin e HDAC1, HDAC2 dhe HDAC3 krahasuar me izomerin S.

Fjalë çelës: (R)- dhe (S)-9-HSA, HDAC1, cikël qelizor, aktivitet enzimatik në radioaktivitet.

*(R)-9-HSA HAS A MORE REMARKABLE ANTIPROLIFERATIVE EFFECT COMPARED TO (S)-9-HSA***Abstract**

The endogenous lipoperoxidation product 9-hydroxystearic acid (9-HSA) is an inhibitor of HDAC1 and its administration to HT29, a colon adenocarcinoma cell line, induces a proliferative arrest mediated by a direct activation of the p21_{WAF}1 gene, bypassing p53[1]. In a recent work the interaction of 9-HSA with the catalytic site of the 3D model of HDAC1 has been tested with a docking procedure. Noticeably, when interacting with the catalytic site, the (R)-9-enantiomer is more stable than the (S) one: in fact the energies of interaction are -8.45 kcal/mol and -1.97 kcal/mol for the (R) and (S) isomer, respectively, and the estimated free energies of binding are -6.31 kcal/mol and +4.98 kcal/mol for (R) and (S), respectively[2].

In this study (R) and (S)-9-HSA were isolated and their biological activity tested in HT29. After 24h of growth HT29 cells were treated with 50 M of (R) or (S)-9-HSA and then permeabilized by incubation with a solution of RNase and propidium iodide (PI). PI fluorescence was analyzed with a flow cytometer Epics Elite (Coulter), and cell cycle analyses were performed by M Cycle (Verity) and MODFIT 5.0 software.

A concentration of 50 M (S)-9-HSA induced a growth arrest in G0/ G1. At the same concentration (R)-9-HSA showed a more remarkable antiproliferative effect, resulting in an increase of cells in G0/ G1. To assess the effects of (R) and (S)-9-HSA on histone deacetylase 1 (HDAC1), HDAC2 and HDAC3 activity, HDACs were immunoprecipitated from HT29 cells and their catalytic activity were assayed by using [³H] histones as the substrate. The amount of [³H] acetate released by deacetylase was expressed as cpm/mg protein. In presence of (R)-9-HSA a drastic reduction of percentage of [³H] acetate released was observed, showing a stronger inhibitor effect on HDAC1, HDAC2 and HDAC3 activity than the S isomer.

Key words: *(R)- dhe (S)-9-HSA, HDAC1, cell cycle, catalytic activity.*

Hyrje

Studime të ndryshme mbi peroksidimin e lipideve endogjene kanë treguar se produktet e këtyre proceseve luajnë një rol të rëndësishëm në shumëfishimin qelizor. Përqendrimi i produkteve të peroksidimit të lipideve ulet dukshëm në qelizat tumorale: me rritjen e shkallës së malinjitetit të tumorit, ulet përqendrimi i produkteve të peroksidimit lipidik. Acidi 9-hidroksistearik (9-HSA) është një nga produktet e peroksidimit lipidik, përqendrimi i të cilit ulet ndjeshëm në qelizat tumorale krahasuar me ato normale [3]. Analiza e efekteve biologjike të shkaktua nga trajtimi me 9-HSA i linjave të ndryshme tumorale, ka treguar se ky acid vepron mbi deacetilazat e histoneve (HDAC) [4].

Deacetilazat e histoneve (HDAC) eliminojnë grupet acetile nga lizinat e skajeve aminike të proteinave histonike duke kontrolluar shprehjen e gjeneve [5] që rregullojnë proceset e shumëfishimit

dhe diferencimit qelizor, të alteruara në format e ndryshme tumorale [6] [7] [8]. HDAC-të e klasës I (HDAC1, HDAC2, HDAC3) lokalizohen në bërthamat e qelizave [9] [10] dhe rezultojnë të hiperaktivizuara në lloje të ndryshme tumoresh [11] [12] [13]. Bllokimi i aktivitetit të tyre është një nga fushat e veprimit të terapisë antitumorale.

9-HSA vepron si agjent bllokues i aktivitetit katalitik të HDAC1 dhe shkakton efekte citostatike dhe citotoksike në linja të ndryshme tumorale, por nuk ka efekt në qelizat normale (veçse në doza shumë të larta) [14]. Në linjën qelizore të adenocarcinomës së kolonit, HT29, acidi 9-hidroksistearik shkakton aktivizimin e pavarur nga p53, të gjenit p21_{WAF}1 [1]. Si pasojë, cikli qelizor bllokohet në fazën G0/G1 dhe aktivizohet diferencimi i qelizave [1] [14].

Acidi 9-HSA paraqitet si një kandidat potencial për zhvillimin e një bari antitumoral të kategorisë së agjentëve bllokues të HDAC-ve, pasi karakterizohet nga një shkallë e lartë specificiteti, në përputhje me fokusin e protokolleve farmaceutike.

Në këtë studim janë analizuar efektet që shkakton kiraliteti i 9-HSA në bashkëveprimin me HDAC-të e klasës I, si dhe pasojat biologjike të këtij bashkëveprimi.

Fokusi i parë i këtij studimi ka qenë përcaktimi i specificitetit të bashkëveprimit të 9-HSA dhe HDAC1. Në fakt, studimet e mëparshme të *docking*-ut molekular kanë treguar një bashkëveprim të fortë mes HDAC1-9-HSA, dhe në veçanti (R)-9-HSA krijon lidhje më të fortë krahasuar me izomerin (S): në fakt, energjia e bashkëveprimit është -8.45 kcal/mol dhe -1.97 kcal/mol përkatësisht për izomerët (R) dhe (S), ndërsa energjia e lirë e përllogaritur rezulton -6.31 kcal/mol për izomerin (R) dhe +4.98 kcal/mol për (S)-9-HSA [2].

Duke qenë se kiraliteti i molekulave luan një rol thelbësor në sistemet biologjike, izomerët e pastër (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA u sintetizuan *in vitro* dhe efektet e tyre biologjike u analizuan në linjën qelizore HT29.

Për më tepër, efekti i të dy izomerëve mbi aktivitetin e enzimave HDAC1, HDAC2 e HDAC3 të izoluar nga këto qeliza, u analizua edhe *in vitro* me qëllim konfirmimin e të dhënave eksperimentale të arritura me eksperimentet e *docking*-ut molekular dhe përcaktimin e specificitetit të 9-HSA për HDAC-të e klasës I.

Materialet dhe Metodat

Kulturat qelizore dhe trajtimi me 9-HSA

Modeli eksperimental i përdorur në këtë studim është linja qelizore e adenocarcinomës së kolonit, HT29, në të cilën gjeni i p53 është i inaktivizuar si pasojë e një mutacioni. Qelizat janë kultivuar në medium 1640 (Euroclone) në të cilin janë shtuar 10% (v/v) serum fetal bovin (FBS) dhe 2 mM L-glutaminë (Sigma). Ato janë vendosur në inkubator në 37°C me atmosferë 5% (v/v) CO₂ dhe janë tripsinizuar çdo tre-katër ditë. Gjatë tripsinizimit, qelizat janë larë paraprakisht me tamponin fosfat PBS që përmban 8 g/L NaCl (Sigma), 1.15 g/L Na₂PO₄ (Sigma), 0.2 g/L KH₂PO₄ (Sigma), 0.2 g/L KCl (Sigma), dhe janë trajtuar për 5 minuta në 37°C me 0.125% (w/v) tripsinë (Seromed) - 0.02% (w/v) EDTA (Sigma). Pas shkëputjes nga piastra e kultivimit, aktiviteti i tripsinës është bllokuar me mediumin e kultivimit dhe qelizat e numëruara me Burker janë inokuluar në piastra të reja me një përqendrim 1x10⁶ qeliza/cm².

Acidi 9-hidroksistearik (9-HSA) me përqendrim 33.3 mM është tretur në etanol absolut dhe është mbajtur në +4°C. Pas 24 orë kultivimi, qelizat janë trajtuar duke tretur 9-HSA në mediumin e kultivimit në përqendrime të përkatëse.

Sinteza e (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA

Format e purifikuara të acidit (R)- dhe (S)-9-hidroksistearik janë sintetizuar në laboratorin e Dr. Carla Boga në Departamentin e Kimisë Organike “A. Mangini” të Universitetit të Bolonjës [15].

Testi i MTT

Përcaktimi i dozës së (R)-9-HSA apo (S)-9-HSA që bllokon rritjen e 50% të qelizave (IC₅₀) është bërë me metodën e MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium) bromide. Në këtë metodë, shfrytëzohet aftësia e enzimës mitokondriale, suksinat dehidrogenazë, për të reduktuar MTT në formazan, i cili ka ngjyrë të kuqe dhe është i patretshëm në ujë. Krijimi i precipitateve të formazanit është tregues i integritetit qelizor, pra formazani formohet vetëm nga qelizat e gjalla.

Qelizat HT-29 janë inokuluar në piastra 6-multiwell dhe pas 24 orë kultivimi janë trajtuar për 24 orë me përqendrimet rritëse 5 nM – 300 µM të (R)-9-HSA apo (S)-9-HSA. 1 mL solucion MTT (0,2 g/L në PBS) është shtuar në çdo 6-multiwell pas eliminimit të mediumit të rritjes. Qelizat janë vendosur për 2 orë në inkubator dhe më pas MTT është zëvendësuar me 2 mL izopropanolol, në të cilin treten kristalet e formazanit [16]. Pas 20 min në temperaturë ambiente, tretësira është analizuar në 570 nm me spektrofotometrin UVIKON 930 (KONTRON). Vlera e IC₅₀ është përlllogaritur si funksion i densitetit optik në 570 nm kundrejt logaritmit të përqendrimeve të (R)-9-HSA apo (S)-9-HSA duke përdorur *software*-in PRISM PROJECT 3.

Analiza e ciklit qelizor

24 orë pas trajtimit me 50 µM (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA, qelizat HT-29 dhe qelizat e rritura në të njëjtat kushte, por të patrajuara (kontroll) janë tripsinizuar, numëruar në Burkert dhe janë centrifuguar për 10 min në 240 g. Ato janë larë dy herë me PBS dhe janë vendosur në solucionin citrat hipotonik/propidium joduri (PI): 0.1% (w/v) citrat trisodik (Sigma), 0.01% (v/v) Nonidet P40 (Sigma), 10 mg/mL ARN-azë (Sigma), 50 mg/mL PI (Sigma). Qelizat janë vendosur për 30 min në inkubator në 37°C, për të mundësuar degradimin e ARN-së qelizore nga nukleazat.

PI është një sondë fluoreshente që futet mes bazave të ADN-së dhe pas eksitimit në 495 nm, lëshon fluoreshencë në 639 nm. Intensiteti i fluoreshencës së lëshuar është në përpjesëtim të drejtë me sasinë e ADN-së që gjendet në çdo qelizë.

Qelizat janë analizuar me citometrin Epics Elite (Coulter). Përcaktimi i sasisë së qelizave të shpërndara në secilën fazë të ciklit qelizor është bërë me programet M Cycle (Verity) dhe MODFIT 5.0.

Ekstraktimi i histoneve

Pas tripsinizimit qelizat janë cetrifuguar për 10 min në 240 g. Ato më pas janë larë me PBS të ftohtë dhe rreth 1.5×10^7 qeliza janë lizuar për 15 min në akull me 750 µL një tampon që përmban: tampon 10 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (Sigma) me pH 7.4, 10 mM NaCl (Sigma), 5 mM MgCl₂ (Sigma), 0.1% (v/v) Nonidet (Sigma), 0.5 mM vanadat natriumi (Sigma), 0.5 mM fenil-metil-sulfonil-fluorur (PMSF) (Sigma) dhe 10 µg/mL për secilin agjent bllokues të proteazave (aprotininë, leupeptinë, antipainë, pepstatinë) (Calbiochem).

Lizati është trajtuar me 3% (w/v) paraformaldehid (Sigma) për të penguar shkatërrimin e membranave bërthamore ndërkohë që tretja e citoplazmave është kontrolluar në mikroskopin optik. Bërthamat e qelizave janë izoluar nëpërmjet centrifugimit për 5 min në 2000 g në temperaturë +4°C dhe janë larë dy herë në 10 mM PBS-butirat natriumi (Sigma).

Për ekstraktimin e histoneve, bërthamat e qelizave janë trajtuar për një orë në +4°C me 0.2 mL

(R)-9-HSA paraqet efekte antiproliferative më të theksuara krahasuar me (S)-9-HSA

të 0.2 M H_2SO_4 dhe më pas janë centrifuguar për 5 min në 15.000 g. Surnatanti është trazuar me aceton dhe është lënë në $-20^\circ C$ *overnight* për të mundësuar precipitimin e histoneve. Të nesërmen preparati është centrifuguar për 5 min në 15.000 g. Histonet e precipituara janë tharë me fluks azoti në një kapë kimike dhe janë tretur në 50 μL H_2O .

Dozimi i proteinave

Dozimi i proteinave është bërë me metodën spektrofotometrike të Bradford. Përpara secilit dozim, spektrofotometri është taruar me përqendrimet e njohura të albuminës së serumit bovin (BSA) (Sigma). Ngjyruesi i Bradford, *Comassie Brilliant Blue G-250* (Bio-Rad), u është shtuar kampionëve (BSA apo lizate qelizore) dhe absorbanca në 595 nm është matur me spektrofotometrin Uvikon 930 (Kontron). Përqendrimet proteike të lizateve qelizore janë përfutur duke ekstrapoluar vlerat përkatëse nga grafiku i BSA.

Testi i bllokimit të aktivitetit enzimatik të HDAC-ve

Pas izolimit të bërthamave qelizore (përshkruar më sipër) të HT29, enzimat HDAC1, 2 dhe 3 janë izoluar nëpërmjet imunoprecipitimit. Bërthamat janë larë në PBS të ftohtë, janë tretur në tamponin HDA (20 mM TRIS (Sigma) me pH 8, 150 mM NaCl (Sigma), 10% (v/v) glicerol (Sigma), 0.1 mM PMSF (Sigma), 10 $\mu g/mL$ të secilit nga agjentët bllokues të proteazave: aprotininë, leupeptinë, pepstatinë, antipainë (Calbiochem)) dhe janë vendosur për 3 min në sonikator me fuqi maksimale.

Një sasi prej 500 μg proteinash bërthamore është trajtuar me tamponin HDA që përmbante 5 μg të antitruptit kundër HDAC1 (Upstate), HDAC2 (BioLegend) apo HDAC3 (BioLegend) dhe është lënë *overnight* në $+4^\circ C$. Të nesërmen kompleset antitrupt-HDAC janë imunoprecipituar në rezinë "Protein A Sepharose" (GE Healthcare) dhe janë larë katër herë me tampon HDA. Antitruptat e përdorur për imunoprecipitim nuk alterojnë aktivitetin e enzimave.

Si substrat për enzimat e precipituara më sipër, janë përdorur histonet (me 3H) e ekstraktuara nga qelizat HT-29. 5×10^6 qeliza janë trajtuar për një orë në $37^\circ C$ me 0.5 mCi/mL di acetat natriumi të triciuar. Janë izoluar bërthamat qelizore dhe prej tyre janë ekstraktuar histonet (si përshkruar më sipër). Sasia e histoneve të ekstraktuara është matur me metodën e Bradford (përshkruar më sipër) dhe radioaktiviteti i tyre është përcaktuar në β counter.

Enzimat e imunoprecipituara (HDAC1, 2 o 3) janë vendosur për 30 min në $4^\circ C$ në tamponin HDA (50 μL) në prani apo në mungesë të 5 μM të secilit prej agjentëve bllokues (R)-9-HSA apo (S)-9-HSA. Kësaj tretësire i janë shtuar më pas 6000 cpm histone të triciuara dhe reaksioni është lënë të zhvillohet në banjë termostatike ($37^\circ C$) për 2 orë. Reaksioni është bllokuar me 50 μL tamponi të përbërë nga 1 M HCl dhe 0.16 M acid acetik.

Më pas, për të ekstraktuar acetilet e triciuar, janë shtuar 400 μL etilacetati dhe pas përzierjes në vortex është marrë faza organike e tretësirës. Kjo fazë është tretur në 10 mL lëngu shintilimi dhe radioaktiviteti i saj është matur në β counter. Numërimet për minutë (cpm) që janë përfutur në β counter, janë normalizuar më pas me sasinë e proteinave.

Rezultatet

Përcaktimi i dozave toksike të (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA në qelizat HT29

(R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA të sintetizuara në laborator janë përdorur për të trajtuar qelizat HT29. Doza që shkakton vdekjen e 50% të qelizave (IC50) është përcaktuar me metodën e MTT. Pas 24

orë trajtimi me përqendrimet rritëse të (R)-9-HSA apo (S)-9-HSA, vlerat e IC_{50} të përfthuara janë 60.1 μM për izomerin (R)-9-HSA dhe 52.1 μM për izomerin (S)-9-HSA (Fig. 1).

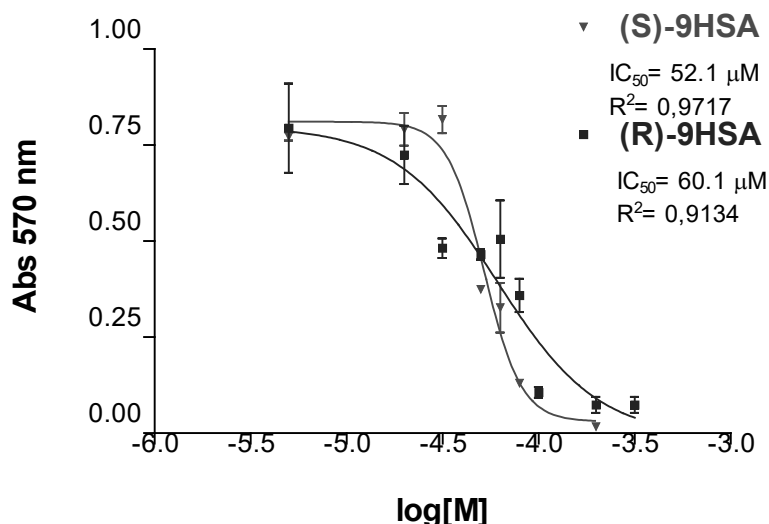


Figura 1: Përcaktimi i vlerës së IC_{50} nëqelizat HT29 e trajtuara me përqendrime rritëse të (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA, duke përdorur programin PRISM PROJECT 3.

Efektet e (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA mbi ciklin qelizor të qelizave HT29

Paralelisht me përcaktimin e vlerave të IC_{50} , janë vlerësuar edhe efektet që kanë të dy izomerët mbi ciklin qelizor të qelizave HT29. Cikli qelizor është analizuar pas 24 orësh trajtimi me përqendrimin 50 μM të (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA (Fig. 2).

Dihet se në përqendrimin 100 μM 9-HSA (pra forma totale që përmban të dy izomerët) shkakton bllokim e ciklit qelizor në fazën G0/G1.

Nga eksperimentet rezultoi gjithashtu se pas 24 orësh edhe (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA, në përqendrimin 50 μM , shkaktojnë grumbullimin e qelizave në fazën G0/G1 të ciklit qelizor. Në veçanti, bllokimi i ciklit qelizor në këtë fazë është më i theksuar për izomerin (R)-9-HSA.

Vlen të theksohet se, pavarësisht vlerave pothuaj të njëjta të IC_{50} , efektet mbi bllokimin e ciklit qelizor janë shumë të ndryshme.

(R)-9-HSA shkakton grumbullimin e qelizave në fazën G0/G1 (69% vs 55% të qelizave kontroll) të ciklit qelizor dhe një ulje të theksuar të numrit të qelizave në fazat S dhe G2/M (përkatesisht 13% dhe 17% vs 23% dhe 21% të qelizave kontroll).

Ndryshe ndodh me (S)-9-HSA që shkakton vetëm një ngadalësim të ciklit qelizor, në fazën G0/G1 (62% vs 55% të qelizave kontroll), ndërkohë që në fazat S dhe G2/M qelizat e trajtuara janë përkatesisht 18% dhe 20% vs 23% dhe 21% të qelizave kontroll, pra qelizave u duhet më shumë kohë për të kaluar nga njëra fazë në fazën tjetër të ciklit.

Këto eksperimente tregojnë se efektet e (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA mbi ciklin qelizor nuk varen nga doza (përqendrimi) e përdorur në trajtimin e qelizave.

(R)-9-HSA paraqet efekte antiproliferative më të theksuara krahasuar me (S)-9-HSA

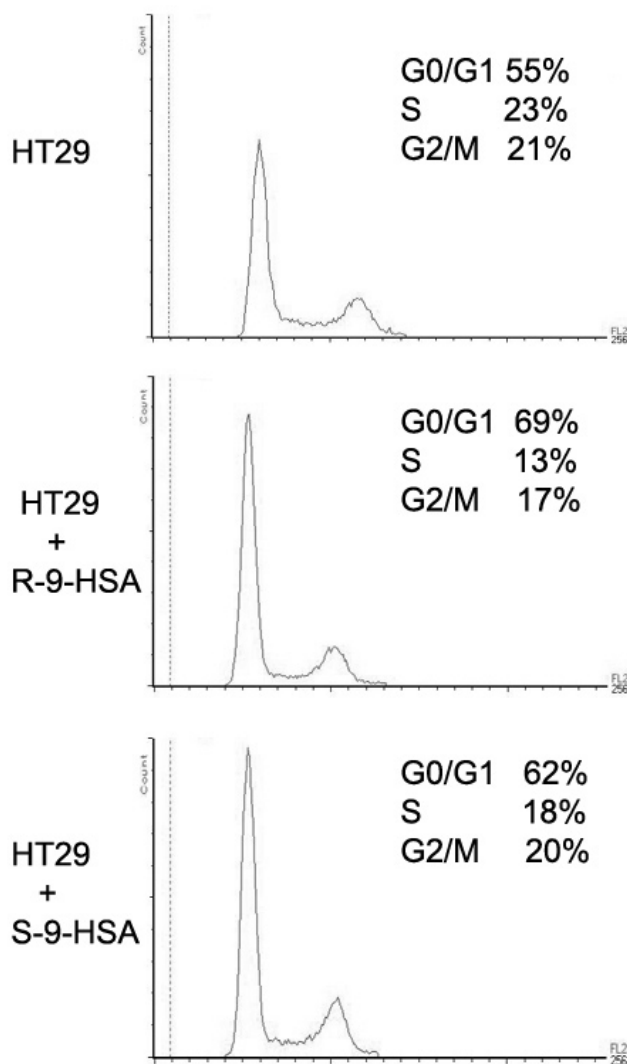


Figura 2: Analizë e ciklit qelizor të qelizave HT29 kontroll apo të trajtuara me 50 μ M (R)-9-HSA apo (S)-9-HSA në citometrën Epics Elite (Coulter).

Blokimi i aktivitetit të enzimave HDAC

Aftësia e izomerëve (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA për të vepruar si agjentë që bllokojnë aktivitetin e enzimave HDAC1, HDAC2 e HDAC3, të cilat i përkasin klasës I të HDAC-ve, u vlerësua me reaksione *in vitro*.

Aktiviteti i enzimave të imunoprecipituara nga qelizat HT29 është analizuar në prani dhe në mungesë të 5 mM të agjentëve bllokues (R)-9-HSA apo (S)-9-HSA, duke përdorur si substrate histonet [3 H] (të ekstraktuara nga qelizat HT29). Agjentët bllokues janë përdorur në të njëjtin përqendrim të matur për 9-HSA në bërthamat e qelizave HT29.

Acetatet [3 H] të lëshuara pas veprimit të enzimave, ekstrahohen në fazë organike dhe radioaktiviteti

i tyre matet në b counter.

Në figurat 3-5 tregohet aktiviteti i matur për enzimën HDAC1, 2 e 3. Aktiviteti i enzimave të pabllokuara (në reaksionet e të cilave nuk janë shtuar (R)-9-HSA apo (S)-9-HSA) është përcaktuar në mënyrë arbitrare si 100% (që nënkupton aktivitet të plotë krahasuar me aktivitetin e enzimave në prani të agjentëve bllokues).

Për analizat statistike u përdor versioni 5 i GraphPad Prism. Vetëm vlera të $P \leq 0.05$ u konsideruan të pranueshme. Në figurën 3 vërehet se izomeri (S)-9-HSA bllokoi 52% të aktivitetit të HDAC1, ndërsa (R)-9-HSA bllokoi 81% të aktivitetit të saj. Izomeri (S)-9-HSA bllokoi 18% të aktivitetit të HDAC2, që tregohet në figurën 4, ndërsa (R)-9-HSA bllokoi 40% aktivitetit të saj. Së fundi, (S)-9-HSA bllokoi 11% të aktivitetit të HDAC3 dhe (R)-9-HSA 17% të aktivitetit të saj (fig. 5).

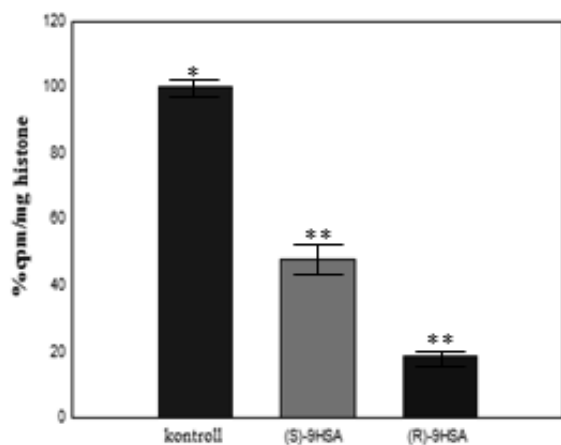


Figura 3: Aktiviteti enzimatik i HDAC1 në qelizat kontroll dhe të trajtuara me 5 mM (S)-9-HSA apo (R)-9-HSA, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

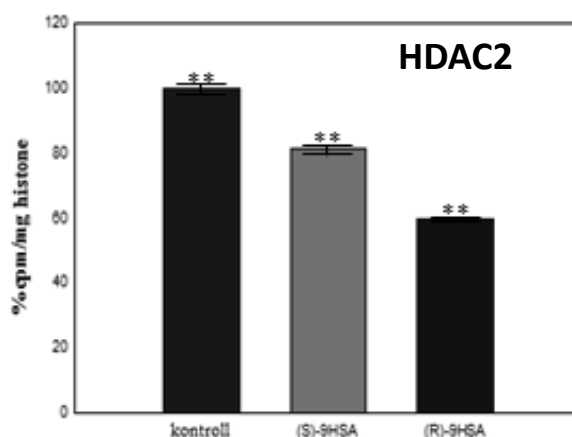


Figura 4: Aktiviteti enzimatik i HDAC2 në qelizat kontroll dhe të trajtuara me 5 mM (S)-9-HSA apo (R)-9-HSA, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

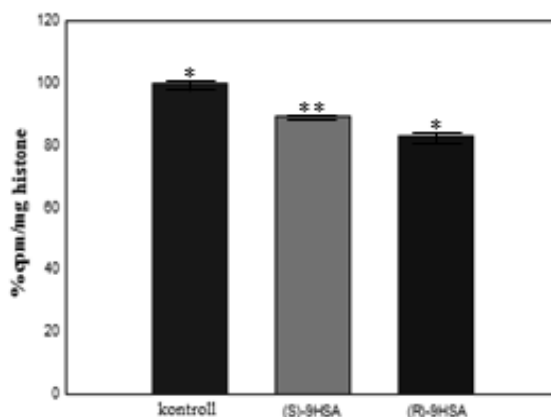


Figura 5: Aktiviteti enzimatik i HDAC3 në qelizat kontroll dhe të trajtuara me 5 mM (S)-9-HSA apo (R)-9-HSA, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Vërehet se efekti i të dy izomerëve të 9-HSA është shumë i fortë në bllokimin e aktivitetit të HDAC1 dhe se (R)-9-HSA bllokoi aktivitetin e të tria HDAC-ve të klasës I më shumë se (S)-9-HSA.

Veprimi i (R)-9-HSA pothuaj e anuloi plotësisht aktivitetin e HDAC1 dhe ul dukshëm atë të HDAC2 duke qenë se sitet katalitike të HDAC1 dhe HDAC2 janë të shumë të ngjashme dhe të konservuara gjatë procesit të evolucionit. Si (R)-9-HSA, ashtu edhe (S)-9-HSA bllokojnë vetëm pjesërisht aktivitetin e HDAC3.

Vërtetohet kështu se kiraliteti i 9-HSA është përcaktues për aktivitetin e tij bllokues mbi enzimat e klasës I të HDAC-ve dhe për efektet biologjike të shkaktuara në vijim të bllokimit të këtij aktiviteti katalitik.

Diskutim

Acidi 9-hidroksistearik është një agjent bllokues i HDAC-ve që shkakton bllokim të ciklit qelizor në linjën qelizore të adenocarcinomës së kolonit, HT29 dhe diferencimin e qelizave drejt një fenotipi benign. Cikli qelizor bllokohet në fazën G0/G1 nëpërmjet aktivizimit të gjenit p21^{WAF1} në mënyrë të pavarur nga p53. Efekte biologjike të ngjashme janë raportuar në linja të ndryshme qelizore edhe për agjentë të tjerë bllokues të HDAC-ve, si MS-275 apo butirati të cilët shkaktojnë hiperacetilim të histoneve.

Në këtë studim, është analizuar bashkëveprimi i 9-HSA me HDAC1, duke u ndalur në veçanti tek efektet e shkaktuara nga kiraliteti i molekulës. Një studim i mëparshëm me metodën e *docking*-ut molekular, kishte hedhur hipotezën se HDAC1 mund të kishte afinitet të ndryshëm për izomerët e 9-HSA. Për këtë qëllim, në bashkëpunim me Departamentin e Kimisë Organike “A. Mangini” të Universitetit të Bolonjës, u sintetizuan izomerët (R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA dhe u analizua aktiviteti i tyre biologjik në qelizat HT29.

(R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA kanë IC50 shumë të ngjashme, por (R)-9-HSA bllokoi dukshëm ciklin qelizor në fazën G0/G1, krahasuar me izomerin (S)-9-HSA. Në mbështetje të këtij rezultati, është edhe aftësia më e madhe e (R)-9-HSA për të bllokuar aktivitetin katalitik të të tria enzimave HDAC1, 2 dhe 3, krahasuar me izomerin (S)-9-HSA. Për më tepër (R)-9-HSA vepron në mënyrë specifike mbi HDAC1 duke anuluar pothuaj plotësisht aktivitetin e saj katalitik *in vitro*.

(R)-9-HSA dhe (S)-9-HSA bllokojnë ndjeshëm edhe aktivitetin e HDAC1 dhe HDAC2, por vetëm lehtësisht atë të HDAC3. Këto rezultate mund të shpjegohen nga ngjashmëria e madhe e sekuencave të HDAC1 dhe HDAC2 të njeriut, të cilat janë 82% të njëjta [17][18]. Njëkohësisht, aminoacidet e domenit katalitik të këtyre dy enzimave janë plotësisht të njëjta. Ndryshe ndodh për HDAC3, e cila edhe pse ka ngjashmëri të domenit katalitik dhe të mekanizmit të veprimit, shfaq një shkallë më të ulët homologjie me sekuencat e dy enzimave të tjera.

Pra, duket se afiniteti i di 9-HSA për domenin katalitik të HDAC-ve të klasës I dhe/ose fortësia e bashkëveprimit mes tyre, ndikohet nga aminoacidet që gjenden përreth domenit katalitik, por që nuk përfshihen direkt në reaksionet katalitike.

Konkluzione

9-HSA vepron duke bllokuar aktivitetin katalitik të HDAC-ve të klasës I dhe në veçanti izomeri (R)-9-HSA ka efekt më të fortë antiproliferativ në qelizat HT29. (R)-9-HSA është njëkohësisht më i fuqishëm në bllokimin e aktivitetit katalitik të HDAC-vetë klasës I: HDAC1 > HDAC2 >>

HDAC3. Pra rezulton se kiraliteti i 9-HSA është përcaktues për aktivitetin molekulës dhe për efektet biologjike të shkaktuara prej saj.

Mekanizmat molekularë që preken nga veprimi i 9-HSA mbi HDAC-të e klasës I duhet të analizohen më tej për të përcaktuar me qartësi rrugët brendaqelizore që preken nga veprimi i kësaj molekule mbi HDAC-të. Gjithsesi, specificiteti i lartë i treguar nga (R)-9-HSA e bën atë një kandidat potencial për zhvillimin e një bari antitumoral të kategorisë së agjentëve bllokues të HDAC-ve.

Referencat

1. N. Calonghi, C. Cappadone, E. Pagnotta, G. Farruggia, F. Buontempo, C. Boga, G. L. Brusa, M.A. Santucci, and L. Masotti, 9-Hydroxystearic acid upregulates p21(WAF1) in HT29 cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 314 (2004) 138-42.
2. N. Calonghi, C. Cappadone, E. Pagnotta, C. Boga, C. Bertucci, J. Fiori, G. Tasco, R. Casadio, and L. Masotti, Histone deacetylase 1: a target of 9-hydroxystearic acid in the inhibition of cell growth in human colon cancer. *J Lipid Res* 46 (2005) 1596-603.
3. L. Masotti, E. Casali, N. Gesmundo, G. Sartor, T. Galeotti, S. Borrello, M. V. Piretti, and G. Pagliuca, Lipid peroxidation in cancer cells: chemical and physical studies. *Ann N Y Acad Sci* 551 (1988) 47-57; discussion 57-8.
4. N. Gesmundo, E. Casali, G. Farruggia, A. Spisni, and L. Masotti, In vitro effects of hydroxystearic acid on the proliferation of HT29 and I407 cells. *Biochem Mol Biol Int* 33 (1994) 705-12.
5. A. Mai, S. Massa, D. Rotili, I. Cerbara, S. Valente, R. Pezzi, S. Simeoni, and R. Ragno, Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev* 25 (2005) 261-309.
6. S. Jacobson, and L. Pillus, Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 9 (1999) 175-84.
7. M. Esteller, and J.G. Herman, Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196 (2002) 1-7.
8. J. E. Bolden, M.J. Peart, and R.W. Johnstone, Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 5 (2006) 769-84.
9. X. J. Yang, and E. Seto, The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008) 206-18.
10. A. J. de Ruijter, A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp, and A. B. van Kuilenburg, Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370 (2003) 737-49.
11. K. Halkidou, L. Gaughan, S. Cook, H. Y. Leung, D. E. Neal, and C. N. Robson, Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 59 (2004) 177-89.
12. A. J. Wilson, D. S. Byun, N. Popova, L. B. Murray, K. L'Italien, Y. Sowa, D. Arango, A. Velcich, L. H. Augenlicht, and J. M. Mariadason, Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* 281 (2006) 13548-58.
13. B. H. Huang, M. Laban, C. H. Leung, L. Lee, C. K. Lee, M. Salto-Tellez, G. C. Raju, and S. C. Hooi, Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ* 12 (2005) 395-404.
14. E. Pagnotta, N. Calonghi, C. Boga, and L. Masotti, N-methylformamide and 9-hydroxystearic acid: two anti-proliferative and differentiating agents with different modes of action in colon cancer cells. *Anticancer Drugs* 17 (2006) 521-6.
15. P. Caruana, Sintesi di acido 9-idrossistearico

(R)-9-HSA paraqet efekte antiproliferative më të theksuara krahasuar me (S)-9-HSA

- e suoi derivati plurideuterati in forma racemica e, attingendo al pool chirale presente in natura, nelle due forme otticamente pure Tesi di Laurea in Chimica Industriale, Classe 21, Scienze e tecnologie chimiche Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, A. A. 2005-2006.
16. I. Mickuviene, V. Kirveliëne, and B. Juodka, Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 18 (2004) 639-48.
 17. D. H. Kim, M. Kim, and H. J. Kwon, Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents. *J Biochem Mol Biol* 36 (2003) 110-9.
 18. C. M. Grozinger, and S. L. Schreiber, Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* 9 (2002) 3-16.