



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE 'A. AVOGADRO'

XVII CICLO – DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

Dottoranda: Deborah Pace

Relazione del terzo anno

Ruolo della ceramide nell'apoptosi di cellule di neuroblastoma umano

Tutore: Prof. C. Isidoro

Introduzione

Gli sfingolipidi sono stati implicati in vari processi cellulari quali crescita, interazioni recettore-ligando, cellula-cellula ed inoltre nel fenomeno differenziativo. Oltre ad essere importanti per la loro funzione di "serbatoio" di metaboliti che sono coinvolti nei diversi pathway metabolici cellulari, gli sfingolipidi contribuiscono a fornire l'ordine strutturale ai lipidi ed alle proteine della membrana all'interno del monostrato.

Le prime osservazioni fatte su cellule di leucemia umana (HL-60) in cui si notava come l'idrolisi di sfingomielinina (SM) nel ceramide potesse essere indotta dalla 1,25-diidrossi-vitamina D₃, hanno suggerito l'idea che il metabolismo degli sfingolipidi può essere regolato in risposta agli agenti extracellulari. In accordo con ciò, gli studi successivi hanno identificato una varietà di citochine quali TNF α , γ -interferone ed interleukin-1, in grado di indurre l'idrolisi di SM.

Studi supplementari hanno indicato che gli analoghi cellula-permeabili, esogeni del ceramide e le sfingomielinasi batteriche esogene riproducono molti degli effetti biologici di questi agenti, suggerendo così un ruolo per il ceramide generato nelle risposte di mediazione e di regolazione cellulare. Ulteriori studi hanno rivelato che l'uso del ceramide è accompagnato da citotossicità e che questi effetti erano altamente specifici per il ceramide, poichè le molecole strettamente collegate quale il di-idroceramide (cioè che difettano del doppio legame *trans* tra i carboni 4-5) non possedevano tale attività. Inoltre, gli studi di frammentazione del DNA hanno rivelato che la morte indotta da ceramide ha le caratteristiche di apoptosi (1-4).

Quindi, il ceramide è stato proposto come regolatore chiave dell' apoptosi. Fin ad oggi sono stati pubblicati molti articoli che correlano ceramide ed apoptosi, ed i risultati di questi studi ci forniscono un'immagine generale in cui gli induttori del processo apoptotico, quali: TNF, Fas ligand, agenti chemioterapeutici e di ischemia/riperfusion, che regolano uno o più enzimi del metabolismo del ceramide, conducono all'accumulo del ceramide stesso(11). A sua volta, il ceramide può regolare gli effettori intracellulari comprese le fosfatasi, le proteasi e le chinasi che mediano l'azione del ceramide sul programma apoptotico(11).

Tenendo conto dei metaboliti degli sfingolipidi, oltre a ceramide (Cer) e sfingosina (Sph), dobbiamo considerare anche Sfosingosina-1-fosfato (S1P), derivato da Sph e fosforilato dalla chinasi della sfingosina (SPHK1), che svolge un ruolo importante nella regolazione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare. Similmente, la ceramide-chinasi può generare ceramide-1-fosfato (C1P) dal ceramide, promuovendo la relativa attività biologica. Infatti, gli effetti biologici della sfingosina e del ceramide possono variare fra i diversi modelli cellulari, ma la loro azione è stata associata ad effetti negativi sullo sviluppo e sulla vitalità cellulare (9.10). D'altra parte si è visto che C1P media la sopravvivenza delle cellule ed è coinvolto nella fusione vescicolare sinaptica in cellule neuronali, così come nella formazione dei fagolisosomi nei neutrofili (6), come del resto S1P, infatti, si è visto che possiede numerose azioni biologiche e, si comporta al contrario del ceramide per mediare lo sviluppo cellulare (7.8) quindi, si può dire che S1P e C1P stimolano lo sviluppo e sopprimono l'apoptosi (5). Poiché questi metaboliti sono interconvertibili, è stato proposto che non fossero gli importi assoluti di questi metaboliti, ma piuttosto i loro livelli relativi a determinare il destino delle cellule.

L'attinenza di questo spartiacque nel metabolismo degli sfingolipidi e del relativo ruolo nel destino regolante le cellule si è confermata tramite diversi lavori usando linee cellulari e circostanze sperimentali differenti . La chiave di volta di questi studi sembrerebbe essere che SPHK e CERK siano critici per il balancing degli sfingolipidi che produce non soltanto a livello di pro-sviluppo, i messaggeri anti-apoptotici come il S1P ed il C1P, ma fa anche diminuire i livelli dei secondi messaggeri pro-apoptotici (Cer e di Sph). Non desta

sorprese, quindi, il fatto che il metabolismo degli sfingolipidi se, deregolarizzato, potesse essere una delle cause di cancro. Sulla base di questi presupposti è immaginabile che i farmaci antineoplastici che designano il metabolismo come bersaglio degli sfingolipidi possono essere clinicamente rilevanti. Effettivamente, l'inibizione di SPHK o CERK è stata indicata per sopprimere lo sviluppo gastrico del tumore, mentre l'over-espressione di SPHK aumenta la tumorigenicità(2). Gli effetti citoprotettivi di SPHK/S1P o di CERK/C1P possono anche essere importanti per il beneficio clinico, poichè S1P è stato indicato per proteggere gli oociti dalla morte indotta da radiazioni delle cellule in vivo(12). Di conseguenza, l'esistenza di questa modulazione nel pathway degli sfingolipidi incide profondamente sugli effetti indotti dagli analoghi esogenamente trasportati dagli sfingolipidi. Nella figura 1 è riportato il catabolismo del ceramide da parte di CERK e degli altri due enzimi fondamentali che portano alla formazione di S1P, considerando anche gli inibitori degli enzimi stessi.

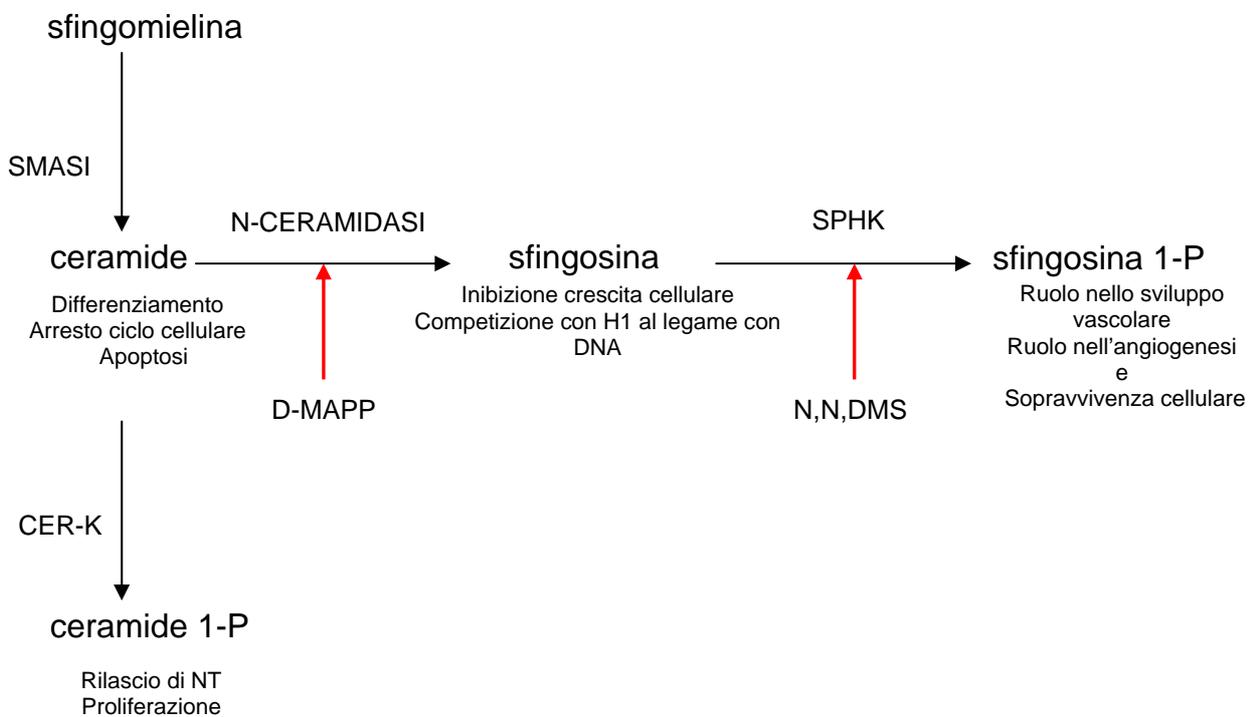


Fig. 1. Schema esemplificativo del catabolismo di ceramide in cui vengono considerati i tre enzimi chiave del processo e gli inibitori selettivi.

Discussione dei dati fin'ora ottenuti

Sulla base di questi presupposti, durante questo anno di dottorato, abbiamo studiato gli effetti di diversi analoghi di ceramide e di sfingosina (riportati in tabella 1) in cellule di leucemia di topo (32 D), e in una linea di cellule di neuroblastoma umano (SK-N-BE). A tale riguardo, nelle due linee cellulari in esame sono state effettuate curve dose/risposta per valutare la sopravvivenza e la proliferazione in risposta ai trattamenti con concentrazioni crescenti di ceramide, sfingosina e analoghi strutturali (fig.2). sia da soli che in presenza di un inibitore specifico per l'enzima che volevamo bloccare coinvolto nel catabolismo di ceramide; in particolare abbiamo utilizzato N,N, dimetilsfingosina e D-eritromapp a 24, 48, 72 ore per inibire rispettivamente SPHK ed N-ceramidasi, purtroppo non è in commercio un inibitore per CERK.

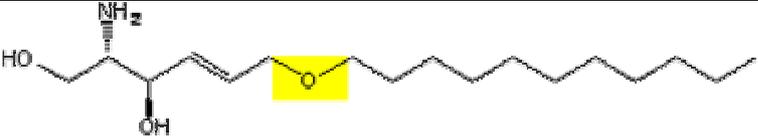
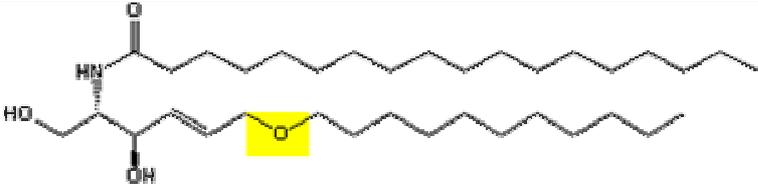
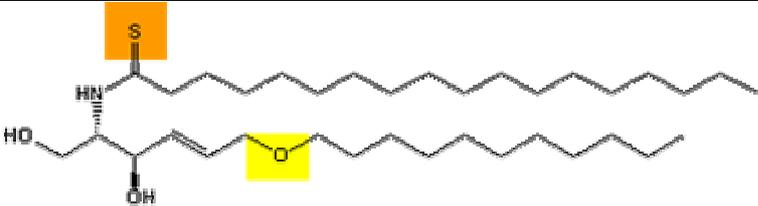
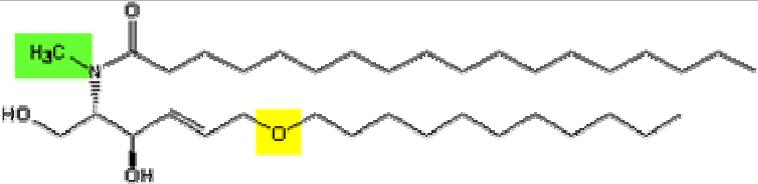
oxasfingosina	
oxaceramide	
tioceramide	
N,Me-ceramide	

Tabella 1. sono raffigurati i composti di sintesi utilizzati nei nostri esperimenti e vengono rappresentate con quadrati di diversi colori le modificazioni strutturali rispetto alla struttura originale.

Fig.2

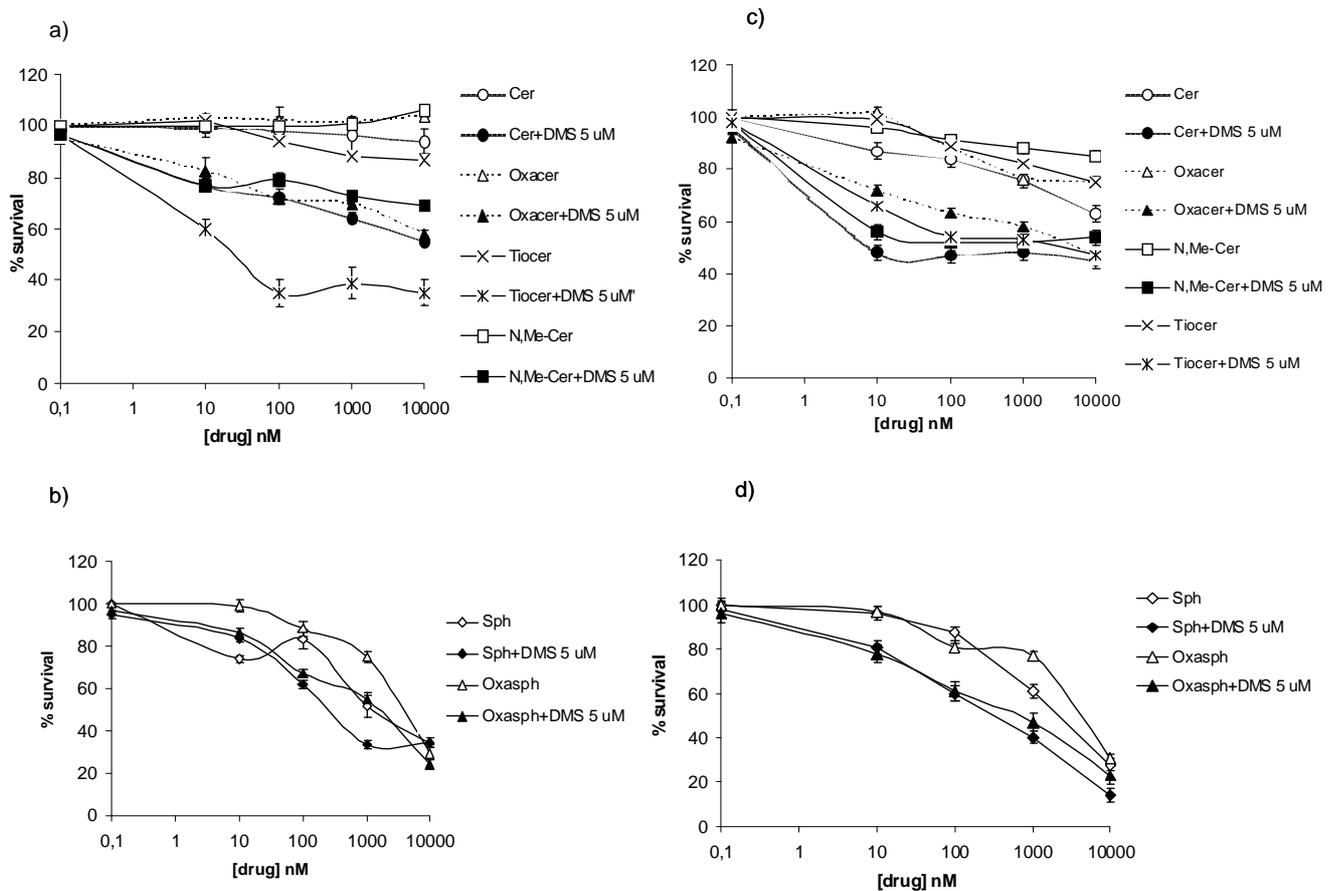


Fig. 2. Curve di sopravvivenza in cellule di neuroblastoma SK-N-BE. nei grafici 2 a) le cellule sono state incubate per 72h con ceramide e gli analoghi strutturali di ceramide. Si osserva che solo il trattato con tioceramide determina un effetto citotossico. In una seconda serie di esperimenti abbiamo associato ceramide ed analoghi all'inibitore selettivo per SPHK, ed abbiamo ottenuto un significativo aumento della morte cellulare (simboli in chiaro). Nel pannello 2 b) è stata effettuata la medesima prova, utilizzando sfingosina ed oxasfingosina anche in questo caso associate all'inibitore N,N,DMS. Nei pannelli 2 c) e 2 d) viene riportato lo stesso esperimento condotto sulla linea murina decisamente più responsiva ai ceramidi. I dati riportati sono una media di otto esperimenti separati condotti in quadruplicato.

I grafici ci forniscono una chiara chiave di lettura per cui il ceramide e i suoi analoghi ad esclusione del tioceramide nella linea SK-N-BE sono del tutto inefficaci anche a 72 h (Fig. 2 a) sulle cellule di neuroblastoma, mentre la loro citotossicità è interessante quando si associa ai diversi composti l'inibitore specifico di SPHK ,N,N, dimetilsfingosina ad una concentrazione fissa (5 μ M) che di per sé non altera la vitalità cellulare. Il composto maggiormente tossico che è stato rilevato sia da solo che somministrato contestualmente all'inibitore è il tioceramide, infatti si rileva una mortalità cellulare dell'15% in somministrazione singola, mentre circa il 60% in combinazione con l'inibitore, sulla base dei dati riportati possiamo ipotizzare che bloccando la sfingosina fosfato chinasi si abbia un aumento della citotossicità dovuto all'accumulo di sfingosina.

Nella figura 2b invece abbiamo voluto valutare, sempre sulla linea di neuroblastoma umano SK-N-BE, l'efficacia della sfingosina e del suo analogo strutturale oxasfingosina, anche in questo caso usate separatamente o in associazione con N,N,DMS. Come si può notare in questo caso le curve di sfingosina ed oxasfingosina hanno circa la stessa pendenza ed anche l'associazione con l'inibitore non sposta di molto la loro efficacia, questo ci fa presupporre che, essendo la sfingosina già tossica di per sé non si ottiene un effetto sinergico con l'inibitore.

Gli stessi esperimenti condotti in parallelo sulla linea leucemica sono mostrati in figura 2 c. in questo caso già la somministrazione di ceramide singolarmente si è rilevata tossica (mortalità del 35%), e risulta evidente che anche le associazioni dei diversi composti analoghi con l'inibitore abbiano aumentato di circa un 25% la propria efficienza.

Anche in questo caso l'induzione di morte sollecitata con sfingosina e oxasfingosina è risultata essere molto simile in quanto entrambe i composti hanno generato due curve di vitalità pressoché sovrascrivibili, ed esponendo le cellule all'associazione dei due composti con l'inibitore si può vedere come a tutte le concentrazioni i due composti abbiano la stessa attività (Fig 2d).

Per chiarire se la morte cellulare indotta da ceramide, sfingosina ed analoghi fosse apoptosi classica, abbiamo utilizzato la colorazione a fluorescenza con Hoechst 33258. l'hoechst è un intercalante del DNA che ci consente di monitorare le prime fasi del processo apoptotico , quali l'addensamento della cromatina, la formazione di interdigitazioni e in ultimo la formazione di corpi apoptotici. Le due linee cellulari sono state trattate con ceramide e sfingosina e due analoghi strutturali per ceramide uno particolarmente inefficace (oxaceramide) anche in presenza di N,N,DMS e il più efficace il tioceramide, inoltre per quel che riguarda l'analogo strutturale della sfingosina abbiamo utilizzato l'unico composto a nostra disposizione: l'oxasfingosina; le concentrazioni e i tempi utilizzati sono riportati in figura 3.

Le fluorescenze ottenute con Hoechst ci forniscono un'ulteriore prova di quali siano le concentrazioni tossiche di ceramide, sfingosina ed analoghi, mettendo in evidenza la formazione di corpi apoptotici con particolare evidenza nei co-trattamenti (fig.3 a,b,c,d).

Fig 3.

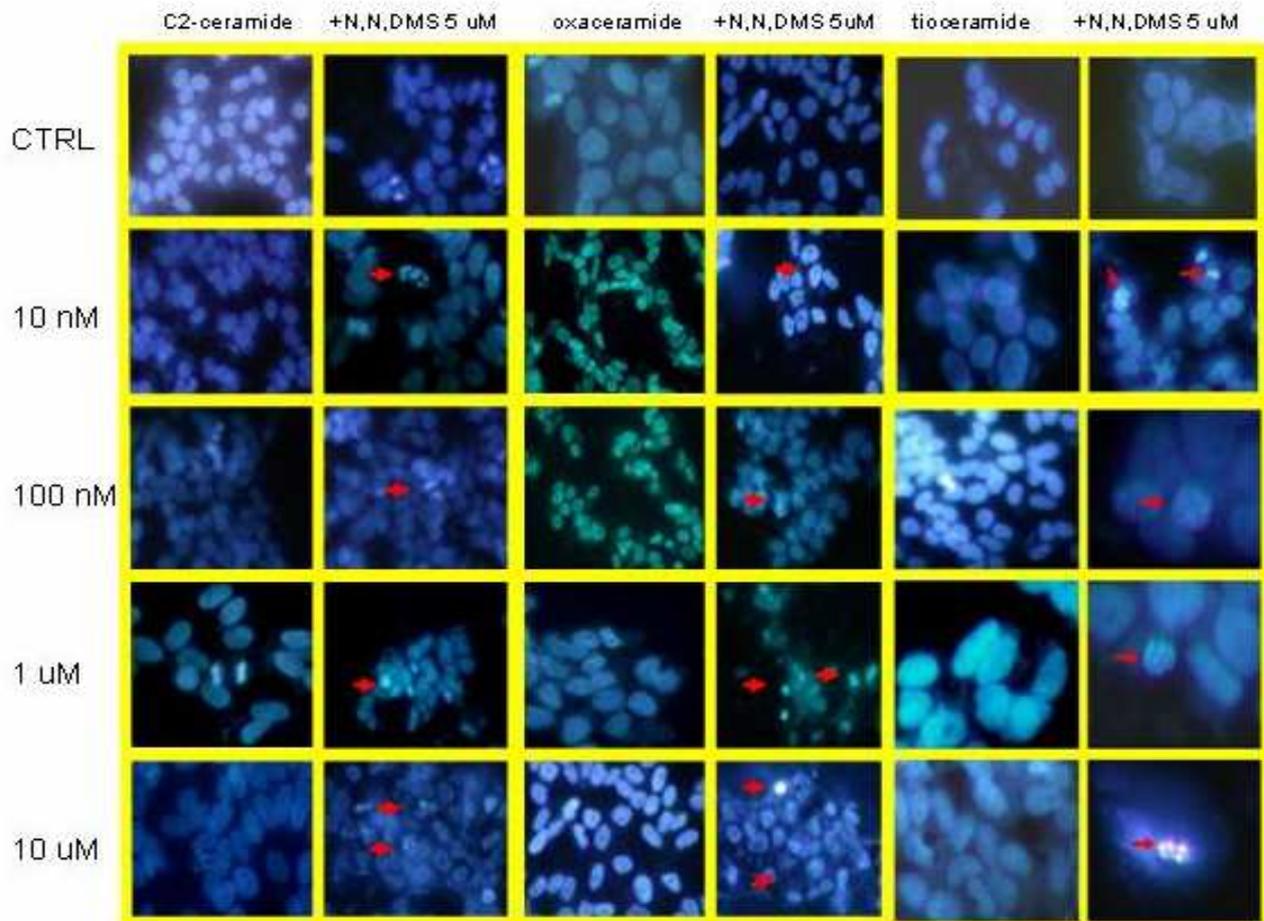


Fig. 3 a). Cellule della linea di neuroblastoma umano sono state piastrate su vetrino posto nel pozzetto del multi-well da 24 (10^5 cellule a pozzetto) e successivamente incubate per 72h con ceramide e due analoghi di sintesi alle concentrazioni indicate. Le cellule sono state “colorate” con un intercalante del DNA per valutare la morte di tipo apoptotico. Si può notare come la maggiore tossicità sia correlata all’associazione dei composti con N,N,DMS che di per sé, alla concentrazione da noi utilizzata (5 uM) non risulta essere tossico.

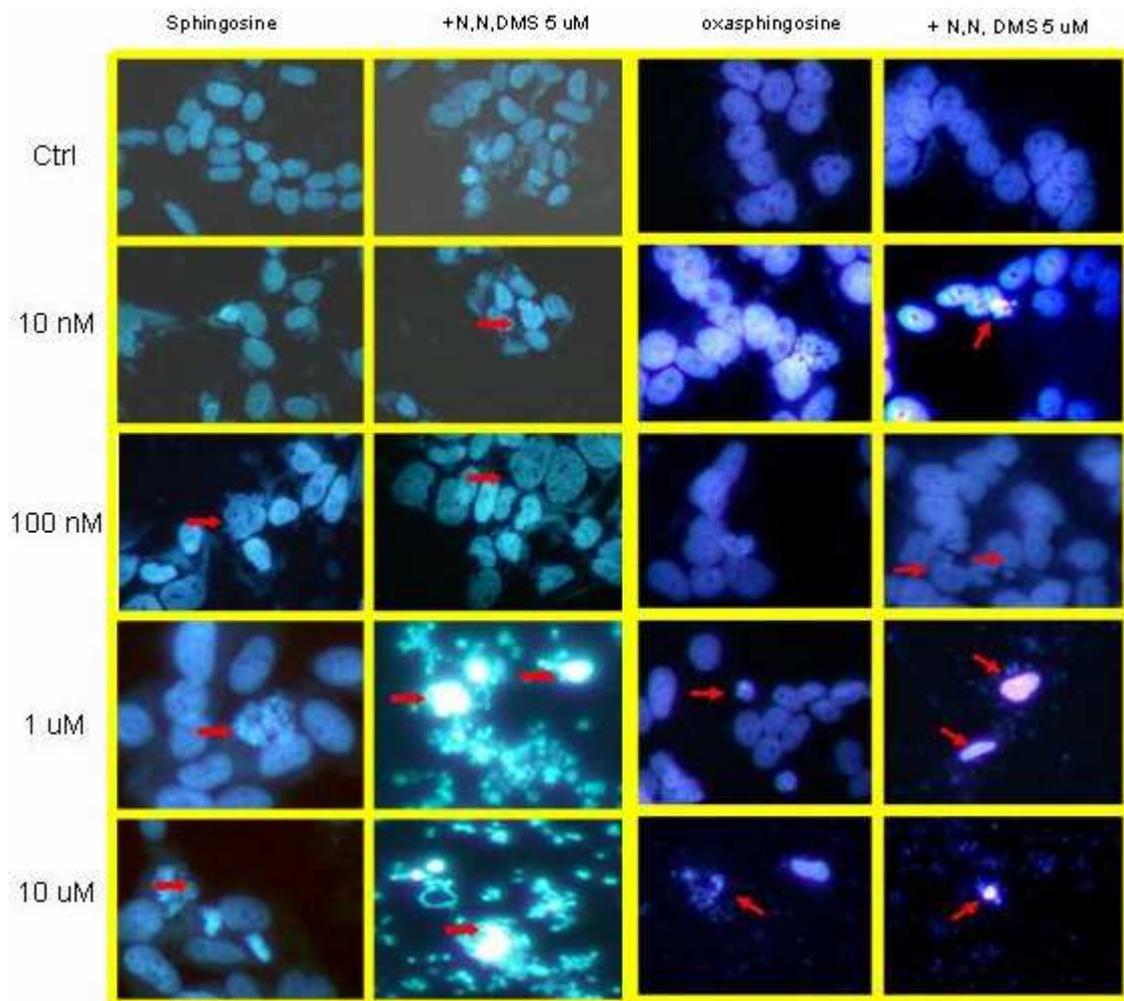


Fig. 3 b). Le cellule della linea di neuroblastoma umano sono state piastrate su vetrino (10^5 cellule a pozzetto) e successivamente incubate per 72h con sfingosina e oxasfingosina alle concentrazioni indicate, successivamente le cellule sono state "colorate" con un intercalante del DNA per valutare la morte di tipo apoptotico. Si può notare che sia la sfingosina sia l'oxasfingosina, anche da sole, sono tossiche già a concentrazioni basse (100 nM), tale tossicità è accentuata dall'associazione dei composti con N,N,DMS.

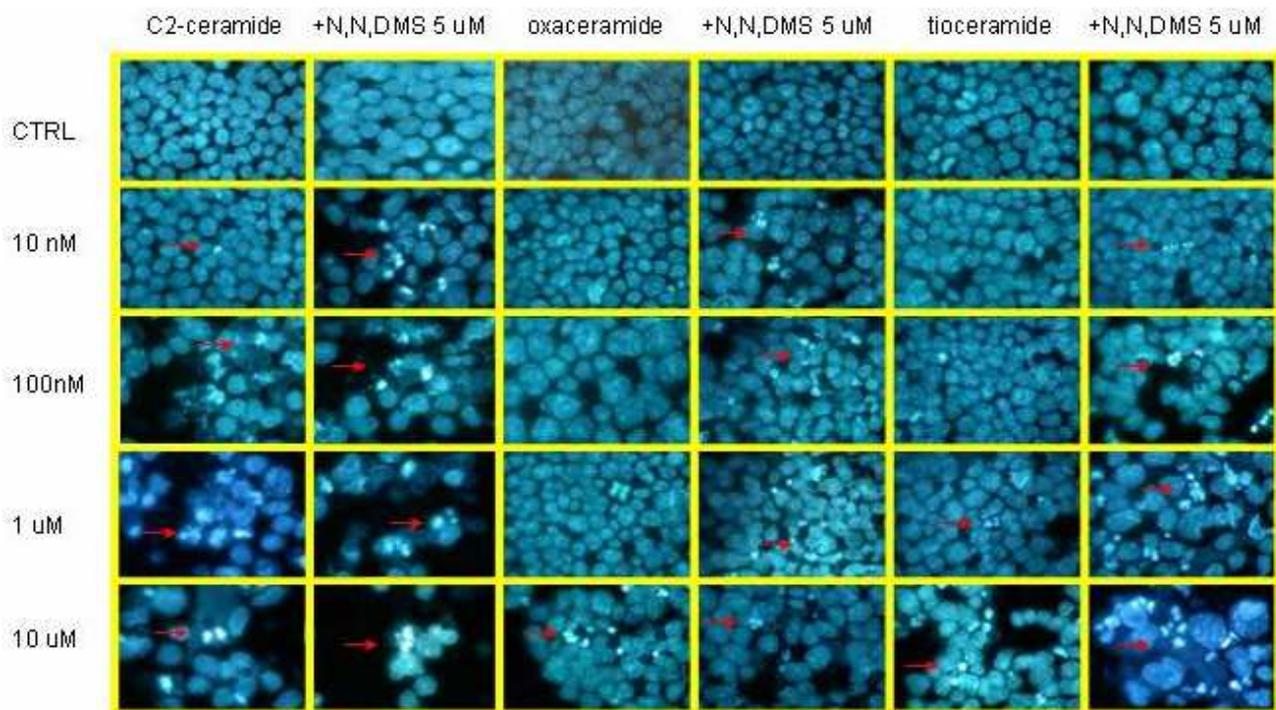


Fig. 3 c). Le cellule della linea leucemica murina sono state piastrate a $25 \cdot 10^5$ cellule/ml ed incubate per 72h con ceramide e due analoghi di sintesi alle concentrazioni indicate. Successivamente le cellule dopo essere state contate e citocentrifugate su vetrino sono state "colorate" con un intercalante del DNA per valutare la morte di tipo apoptotico. In questa figura si osserva come già ceramide e gli analoghi siano pro-apoptotici da soli e l'associazione con N,N,DMS potenzi sinergicamente l'azione citotossica dei composti.

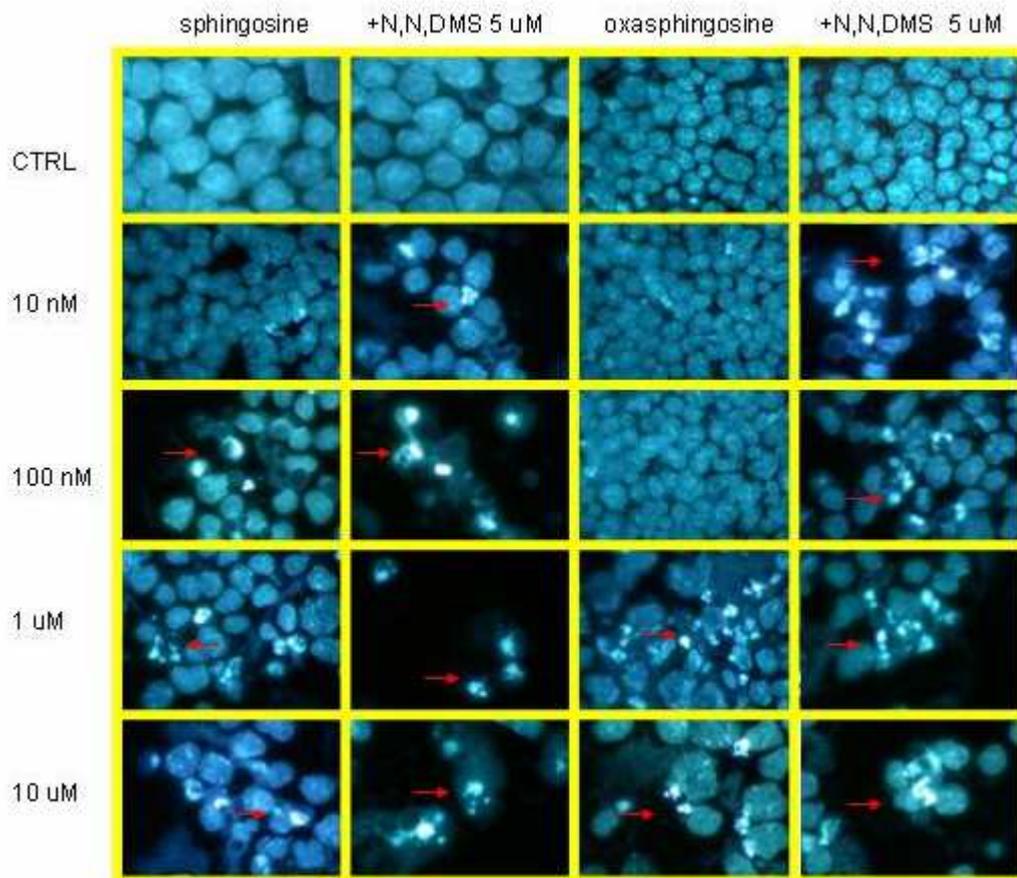


Fig. 3 d). Le cellule della linea leucemica murina sono state piastrate a $25 \cdot 10^5$ cellule/ml ed incubate per 72h con sfingosina ed oxasfingosina alle concentrazioni indicate, e successivamente contate e citocentrifugate su vetrino. successivamente le cellule sono state “colorate” con un intercalante del DNA per valutare la morte di tipo apoptotico. Similmente a ciò che succede nella linea di neuroblastoma umano anche in questo caso si vede che sfingosina ed oxasfingosina da sole sono già citotossiche, e che l’associazione con l’inibitore enzimatico in questo caso non potenzia l’azione dei due composti, ma la percentuale di morte rimane pressoché costante.

Valutando lo schema proposto in figura 1 si può notare come il ceramide subisca due destini differenti a seconda di quale enzima agisca come venga metabolizzato.

Abbiamo visto, quindi, che sia ceramide che sfingosina vengono fosforilati da specifiche chinasi generando così dei metaboliti incapaci di svolgere attività citotossica, abbiamo avviato questo problema con l’utilizzo di specifici inibitori. Infatti abbiamo dimostrato come andando a bloccare la SPHK si abbia un aumento della citotossicità e lo stesso potenziamento avviene bloccando l’enzima antecedente: la ceramidasi, ma per valutare l’altra via che interessa maggiormente i ceramidi, quindi, l’intervento della ceramide chinasi non abbiamo potuto avvalerci del supporto di un inibitore selettivo, per cui siamo andati a valutare sia nella linea responsiva, quella leucemica, che nel neuroblastoma l’espressione proteica dei livelli di CERK e SPHK, ma per quel che riguarda CERK non è stato possibile in quanto in commercio non è disponibile un anticorpo, e per SPHK l’unico anticorpo in commercio dà segnali molto sporchi e poco specifici, quindi il passo successivo è stato quello di valutare i livelli di mRNA di CERK e di SPHK tramite RT-PCR.

Inizialmente è stata valutata la presenza, nei controlli delle due linee cellulari, delle proteine CERK e di SPHK valutandone l' RNA messaggero e quantificandolo in rapporto all'espressione di un gene hauskeeping come l'actina (fig 4).

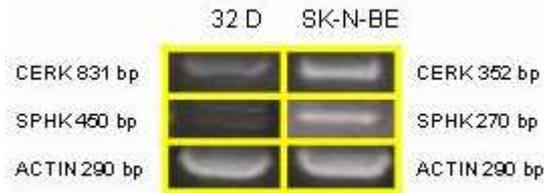


Fig 4. RT-PCR effettuata sui controlli delle cellule della linea murina (32D) e sul neuroblastoma (SK-N-BE) per valutare l'espressione genica di CERK ed SPHK. I primer utilizzati come si vede dagli ampliconi sono diversi perché disegnati uno per il target umano e l'altro per il murino. Come controllo interno per valutare la correttezza del caricamento ho utilizzato il gene per l'actina.

Una volta appurata la presenza dei due enzimi, ci siamo chiesti se la ceramide, esogena potesse essere fosforilata da CERK molto più velocemente rispetto alla via che potrebbe intraprendere diventando così citotossica. Abbiamo, quindi, valutato i livelli di mRNA di CERK e di SPHK nelle cellule di neuroblastoma (figura 5) e in quelle leucemiche (figura 6) incubate con concentrazioni crescenti di ceramide (a) e tioceramide (b) (10 nM 10 uM).

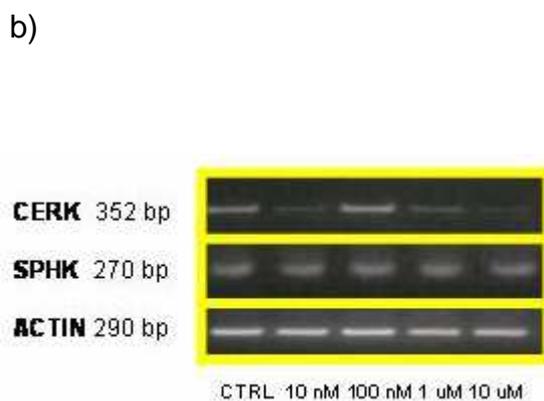
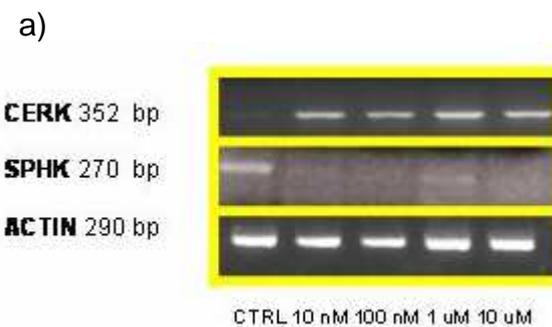


Fig. 5. RT-PCR sulle cellule di neuroblastoma umano in a) trattate con ceramide e in b) con tioceramide.

In figura 5 a) si osserva che, in presenza di ceramide, l'espressione di CERK aumenta notevolmente rispetto al controllo, mentre SPHK diminuisce fino a quasi a scomparire, mentre, nelle cellule trattate con tioceramide (5 b) i livelli di CERK diminuiscono utilizzando le concentrazioni più alte di tioceramide e per quel che riguarda SPHK i livelli di mRNA rimangono invariati.

Questo dato avvalorza la nostra ipotesi in quanto ci fa presupporre che effettivamente la CERK fosforili molto velocemente ceramide rendendola così inattiva, mentre la tioceramide, probabilmente per la presenza del gruppo solforico che è stericamente ingombrante e maggiormente elettrone-attrattore contrasta la fosforilazione da parte di CERK sull'idrossile primario, rendendosi così maggiormente attiva.

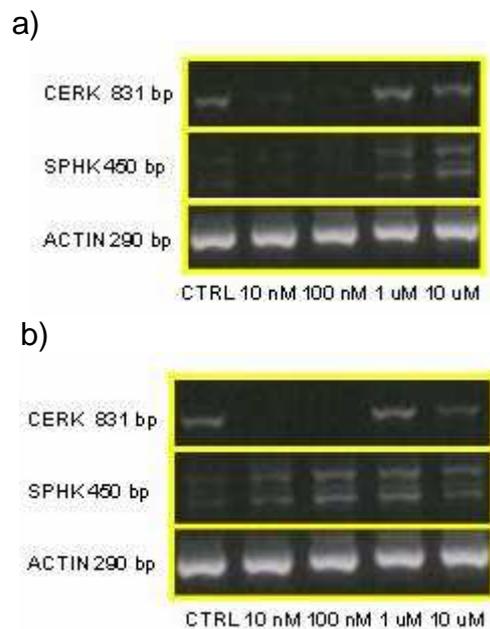


Fig. 6. RT-PCR sulle cellule di leucemia di topo in a) trattate con ceramide e in b) con tioceramide.

Un esperimento analogo è stato effettuato sulle cellule di leucemia murina (figura 6) e si osserva che i livelli di CERK, sia nei campioni trattati con ceramide che con tioceramide, alle alte concentrazioni, diminuiscono rispetto al controllo e l'espressione di SPHK aumenta anche se in forma di doppietti, questo potrebbe essere dovuto a possibili splicing alternativi della proteina.

Nel prossimo futuro ci proponiamo di sintetizzare un composto che non subisca la fosforilazione da parte di CERK e che rispetti le caratteristiche di relazione struttura ed attività (S.A.R.) di ceramide.

Bibliografia

1. Levade, T., Malagarie-Cazenave, S., Gouaze, V., Segui, B., Tardy, C., Betito, S., Andrieu-Abadie, N., and Cuvillier, O. (2002). Ceramide in apoptosis: a revisited role. *Neurochem. Res.* 27, 601–607.
2. Riboni, L., Campanella, R., Bassi, R., Villani, R., Gaini, S.M., Martinelli-Boneschi, F., Viani, P., and Tettamanti, G. (2002). Ceramide levels are inversely associated with malignant progression of human glial tumors. *Glia* 39, 105–113.
3. Litvak, D.A., Bilchik, A.J., and Cabot, M.C. (2003). Modulators of ceramide metabolism sensitize colorectal cancer cells to chemotherapy: a novel treatment strategy. *J. Gastrointest. Surg.* 7, 140–148.
4. Buccoliero, R., and Futerman, A.H. (2003). The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. *Pharmacol. Res.* 47, 409–419.
5. Maceyka, M., Payne, S.G., Milstien, S., and Spiegel, S. (2002). Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 193–201.
6. Hinkovska-Galcheva VT, Boxer LA, Mansfield PJ, Harsh D, Blackwood A, Shayman JA, The formation of ceramide-1-phosphate during neutrophil phagocytosis and its role in liposome fusion, *J. Biol. Chem.* 273, 33203–9 (1998).
7. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S, Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate, *Nature* 381, 800–3 (1996).
8. Spiegel S, Milstien S, Sphingosine-1-phosphate: Signaling inside and out, *FEBS Lett* 476, 55–7 (2000).
9. Hannun YA, Bell RM, Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation, *Science* 243, 500–7 (1989).
10. Hannun YA, Luberto C, Argraves KM, Enzymes of sphingolipid metabolism: From modular to integrative signaling, *Biochemistry* 40, 4893–903 (2001).
11. Benjamin J, Pettus, Charles E, Chalfant, Yusuf A, Hannun Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Bioch. et Biophys. Acta* 1585 114– 125 (2002)
12. Roth Z, Hansen PJ. Sphingosine 1-Phosphate Protects Bovine Oocytes from Heat Shock During Maturation. *Biol Reprod.* (2004)

Partecipazione ai seminari presso il Dipartimento di Scienze Mediche

- 7 luglio 2004. Prof. Martin Ronis "Ethanol metabolism and Toxicity in Pregnancy"
- 5 luglio 2004 Prof. A. Bartolazzi "From the bench to the bedside: galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions"
- 30 giugno 2004 Prof. Manlio Ferrarini "Meccanismi patogenetici della Leucemia Linfatica Cronica"
- 29 giugno 2004 Prof. Emilio Hirsch "La fosfatidil-inositolo 3-cinasi-g regola la contrattilità e l'ipertrofia cardiaca mediante funzioni dipendenti e indipendenti dalla attività lipide-cinasi"
- 15 giugno 2004 Prof David Murphy "Functional genomics of hypothalamic homeostatic plasticity"
- 14 giugno 2004 Prof. David Murphy "Biomedical discovery using microarrays: principles, prospects and problems".
- 14 giugno 2004 Prof. Christopher Day "Pitfalls of genetic studies in liver disease"
- 28 maggio 2004 Prof. Angiolo Benedetti "Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico"
- 20 maggio 2004 Prof. Alberto Martini "Le artriti croniche del bambino"
- 3 maggio 2004 Dr. Frédéric Rieux-Laucat "Genetic bases of the Autoimmune LymphoProliferative Syndrome (ALPS) subtypes".
- 31 marzo 2004 Dr Antonia Follenzi Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso di vettori lentivirali
- 10 marzo 2004 Prof. Guido Valesini "TNF, anti-TNF ed autoimmunità".
- 30 gennaio 2004 Prof Magnus Ingelman-Sundberg Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy "
- 30 settembre 2003 Dr. A. Boullerne "Multiplex role of nitric oxide in multiple sclerosis"
- 15 settembre 2003 Dr. Geoffrey Thiele "Malondialdehyde-Acetaldehyde (MAA) Modified Proteins Induce Immune, Pro-Inflammatory and Pro-Fibrotic Responses."

Partecipazione ai seminari presso il DISCAFF

- 3 ottobre 2003 Dott.ssa Luisa Pugliese "Analisi di sequenze e strutture di proteine su larga scala: una nuova tecnologia per interpretare dati originati di genomica e proteomica e ottimizzare la selezione degli obiettivi farmacologici",
- 30 ottobre 2003 Dott. Andrea Vecchione "Approccio genetico alla fisiopatologia del cancro: FEZ-1, dalla sequenza alla funzione"
- 21 novembre 2003 Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof "Human bitter taste perception: few receptors-numerous compounds".
- 21 novembre 2003 Prof. Ernesto Fattorusso "Nuove tossine da molluschi eduli del Mediterraneo".
- 27 gennaio 2004 Prof. Alan Kozikovski "Natural product targeting of the brain for the treatment of neurodegenerative diseases", "Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy"
- 17 febbraio 2004 Dott.ssa Maria Gabriella Scordo "Citocromo P450: polimorfismi genetici e risposta clinica ai farmaci"
- 1 aprile 2004 Prof. Vincenzo Di Marzo "Recettori dei cannabinoidi e dei vanilloidi: due facce della stessa medaglia?"
- 23 aprile 2004 "Seminario di cultura brevettuale"
- 5 maggio 2004 Prof.ssa Bice Fubini "Come comprendere i meccanismi di patogenicità delle fibre di amianto? Necessità di un approccio multidisciplinare"

10 maggio 2004. Dott. Federico Dajas “Neuroprotective south american medicinal plants: a hypothesis on their mechanism of action”

18 maggio 2004 Dott. Marco Bella “Diazonamide ed organocatalisi. Esperienze di post-doc ai due lati dell’oceano”

24 maggio 2004 Dott.ssa Alessandra Fiorio-Pla “TRPC1 media l’ingresso di Ca^{2+} durante la proliferazione di cellule staminali embrionali neuronali indotta da bFGF/FGFR-1”

Elenco delle comunicazioni orali e dei poster presentati ai congressi nel seguente anno

Gargiulo M., Pace D., Condorelli F., Canonico P. L. “Valproic acid differentially affects viability and differentiation of neuroblastoma cells”. 4th Forum of European Neuroscience 10-10 july 2004 Lisbona.

Gargiulo M., Pace D., Condorelli F. Canonico P.L. “HDAC inhibitors and valproic acid: histone deacetylation in neuronal differentiation and apoptosis”.

Partecipazione a congressi

IIND Meeting on molecular strategies for understanding neurological and psychiatric disorders 7 april, 2004 Pavia.