

Dottorando: Dario Barbone



Tutore: Prof G. Gaudino



Relazione del terzo anno

NUOVI BERSAGLI FARMACOLOGICI PER LA TERAPIA DEL MESOTELIOMA MALIGNO DA ASBESTO

□ INTRODUZIONE

Il Mesotelioma Maligno (MMe), diagnosticato per la prima volta nel 1947 [1], è un tumore aggressivo e invasivo che colpisce generalmente la cavità pleurica, può anche svilupparsi in sede peritoneale e paratesticolare. E' un tumore resistente alla radioterapia e alla chemioterapia, inoltre molto spesso la sua rimozione chirurgica risulta poco praticabile [3]. Il MMe è strettamente correlato all'esposizione a fibre di asbesto [4-7], minerali silicati a differente cancerogenicità. Sebbene l'asbesto sia la maggior causa riconosciuta di questa neoplasia [8], l'infezione da SV40 è stata proposta come possibile concausa [9]. Le fibre di asbesto sono in grado di indurre aberrazioni cromosomiche [10] e possono indirizzare le cellule mesoteliali verso la via apoptotica, attraverso la produzione di radicali dell'ossigeno [11] e danni al DNA [12].

Le cellule mesoteliali SV40/Tag-positive sono meno sensibili alla citotossicità indotta da asbesto e le cellule sopravvivenenti sono soggette ad alta instabilità genomica [13] che può portare alla loro trasformazione [14]. Le cellule di Mesotelioma Maligno (MMe) sono inoltre più resistenti agli agenti pro-

apoptotici, se confrontate con le cellule primarie mesoteliali, sebbene il meccanismo non sia ancora pienamente chiarito [15].

La trasformazione delle cellule mesoteliali segue quindi un percorso progressivo che vede la cooperazione di fibre di asbesto, infezione da SV40 e via di trasduzione di PI3chinasi/Akt [16]: sulla base di questi dati, nuovi farmaci diretti verso la via di PI3chinasi/Akt potrebbero quindi essere una nuova strategia per la prevenzione e la terapia del Mesotelioma Maligno SV40 positivo [17].

Grazie alla collaborazione del Prof. G.B. Giovenzana del DiSCAFF (Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche), nel corso del primo anno di Dottorato è iniziato un progetto comune per la messa a punto di una serie di inibitori di sintesi a partire dallo “scheletro” di sostanze già note come Wortmannina e LY294002; è stata analizzata la loro capacità inibente la trasduzione del segnale di PI3-chinasi e la citotossicità dimostrata *in vitro* su cellule mesoteliali e di mesotelioma in coltura.

Tra le molecole di possibile interesse farmacologico a valle di PI3-chinasi riveste un notevole interesse NF- κ B (Nuclear Factor kappa B), fattore di trascrizione originariamente studiato per la sua capacità di attivare risposte immunitarie e infiammatorie, inducendo l'espressione di geni codificanti citochine, loro recettori e molecole implicate nell'adesione cellulare [18, 19]. Recentemente NF- κ B è stato collegato a meccanismi di proliferazione cellulare e di oncogenesi, per quanto un suo ruolo nelle neoplasie appaia ancora molto complesso poiché coinvolto nel controllo dell'apoptosi, della progressione del ciclo cellulare e probabilmente nella differenziazione, migrazione cellulare e nell'angiogenesi.

NF- κ B può essere indotto da Akt/PKB [20] e in cellule di mesotelioma sono rilevabili livelli basali della sua attivazione, non strettamente correlati alla presenza di SV40 nel genoma e all'espressione di Ta; inoltre le cellule mesoteliali non presentano questa attività costitutiva. Al fine di chiarire il possibile coinvolgimento di questa molecola nel processo neoplastico sono stati condotti esperimenti sulle cellule a nostra disposizione. Sono state utilizzate cellule primarie mesoteliali, provenienti da essudati pleurici prelevati da pazienti affetti da mesotelioma o da altre patologie nonché cellule appartenenti a linee

provenienti da ATCC (American Tissue Culture Collection) e dalla “banca” dell’IST (Istituto Nazionale dei tumori di Genova). .

Molti fattori di crescita sono coinvolti nello sviluppo e nella progressione del MMe quali Epidermal Growth Factor (EGF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [21], Platelet Derived Growth Factor (PDGF) [22, 23] e Transforming Growth Factor-beta (TGF-B). E’ stato dimostrato un aumento dell’espressione di PDGF- β receptor (PDGFR- β) nelle cellule di MMe ma non nelle cellule mesoteliali normali ed è stato verificato come il blocco di questo recettore comporti una significativa riduzione del tasso di crescita dei mesoteliomi [23, 24].

Un farmaco di attuale interesse è l’Imatinib mesilato o STI571 (Gleevec®) [25, 26] che, oltre ad essere un inibitore selettivo per le tirosina chinasi abl e bcr-abl (proteina di fusione coinvolta nella leucemia mieloide cronica) e c-kit, è risultato attivo anche su PDGFR- β [27], aprendo una nuova strada alla terapia di alcune neoplasie solide come il tumore stromale gastrointestinale, il dermatofibrosarcoma, il glioblastoma e il tumore del polmone a piccole cellule (SCLC) [28].

Nel corso dei primi tre anni di dottorato l’obiettivo è stato quello di valutare l’attività di questo farmaco nella riduzione della crescita delle linee di MMe e nella maggiore suscettibilità al trattamento con alcuni chemioterapici di uso clinico; inoltre è stata valutata l’eventuale sinergia delle associazioni tra farmaci chemioterapici di uso clinico ed STI571.

Durante il secondo anno di Dottorato è inoltre iniziata una nuova linea di ricerca al fine di verificare e chiarire i meccanismi d’azione di un nuovo farmaco potenzialmente utile nella terapia del MMe: Taurolidina (Tn),

Taurolidina, prodotto durante gli anni ‘70 dalla Geistlich Pharma [29, 30], è una molecola derivata dall’acido taurinico avente attività anti-microbica e sfruttata nelle procedure chirurgiche per la disinfezione del cavo addominale e al fine di ridurre fenomeni di adesione batterica [31-33]. Diversi studi in vitro hanno dimostrato che la molecola di Tn è in grado di inibire la crescita di alcune forme neoplastiche [34] [35-37] e di indurre apoptosi [37, 38] .

Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare la capacità della molecola di Taurolidina di inibire la crescita delle cellule di MMe che, come già detto, sono molto resistenti alla chemioterapia tradizionale. Proprio questo aspetto sarà oggetto di studio durante l'ultimo anno di Dottorato, nel laboratorio della Dr.ssa Broaddus a San Francisco, nel quadro di una collaborazione con il nostro laboratorio. Avrò l'opportunità di lavorare su strutture tridimensionali (sferoidi multicellulari) [39-42], che nell'ultimo decennio sono state largamente utilizzate come modello di tumorigenesi *in vitro* e considerate estremamente più predittive di un modello bi-dimensionale quali i normali monostrati cellulari usati in ricerca.

Gli sferoidi offrono la possibilità di superare i limiti delle normali colture cellulari e di avvicinarsi ad una situazione biologica più simile alle strutture riscontrabili *in vivo*. Nel particolare sarà oggetto di studio la resistenza multicellulare dimostrata dagli sferoidi rispetto ai monostrati cellulari e le vie di segnale intracellulari implicate in questo fenomeno.

□ RISULTATI

INIBITORI della PI3-chinasi

Le PI3-chinasi sono enzimi espressi in modo ubiquitario e giocano un ruolo molto importante in alcune neoplasie umane. Sebbene sia ancora difficile valutarne il potenziale, possono essere considerate un potente bersaglio farmacologico.

Un grosso limite allo sviluppo di una farmacologia diretta verso le PI3-chinasi è l'ampio spettro di azioni biologiche che esse svolgono; l'uso di inibitori ad ampio spettro è chiaramente impossibile anche alla luce di recenti esperimenti di *knock-out* per p110 α sui topi [43].

Un ulteriore rischio è quello di sottovalutare la possibile inibizione di altre chinasi come le PI3-chinasi di classe III, la DNA-PK (DNA-Dependent Protein Kinase), enzima coinvolto nella riparazione del DNA e ATM, chinasi attivata in risposta a rotture della doppia elica del DNA. La potenziale tossicità può peraltro essere modulata ingegnerizzando composti la cui attività sia rivolta verso poche isoforme oppure verso molecole a valle di PI3-chinasi, ipotesi molto promettente come dimostrato dai recenti successi clinici del CCI 779, inibitore di mTOR analogo alla Rapamicina [44].

Nel corso del primo anno di Dottorato, in collaborazione del Prof. G.B. Giovenzana del DiSCAFF (Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche), sono state sintetizzate nuove molecole in base ai dati raccolti dallo studio struttura/reattività della molecola di Wortmannina (inibitore suicida altamente selettivo). Da questa prima fase sono nate 11 molecole (CCC001-11) che non hanno dimostrato attività inibitoria sulla fosforilazione di Akt, proteina a valle di PI3-chinasi normalmente fosforilata nelle linee di mesotelioma SV40 positive.

La molecola della Wortmannina, originariamente isolata da *Penicillium wortmannii* [45] e poi caratterizzata per la sua inibizione di PI3-chinasi [46-48], si lega covalentemente al sito di legame per l'ATP attraverso l'attacco nucleofilo sull'anello furanico da parte di una ammina primaria (es. Lys-802 per p110 α) presente nel sito attivo della PI3-chinasi [49, 50]. La formazione di questo

complesso covalente irreversibile e le numerose modificazioni conformazionali della molecola, impediscono totalmente il legame dell'ATP nel sito attivo e rendono conto dell'elevata tossicità dimostrata dall'inibitore.

Altri inibitori come LY294002, quercetina, myricetina e staurosporina sono caratterizzati invece dalla capacità di generare legami meno forti con la PI3-chinasi a scapito tuttavia di specificità e affinità. La seconda fase di sintesi si è quindi orientata verso LY294002, un inibitore sintetico di PI3-chinasi la cui molecola è un morfolino derivato ottenuto dallo scheletro della quercetina, meno selettivo della Wortmannina tuttavia meno tossico, grazie ad un meccanismo d'azione reversibile. L'obiettivo è rendere la molecola di LY294002 più efficiente, stabilizzandone la carica negativa in modo da creare un sito attivo più attraente alla tasca che lega l'ATP sulla PI3chinasi.

Secondo questa prospettiva, durante i primi tre anni di Dottorato sono nate diverse molecole, che non hanno dimostrato tuttavia di possedere attività inibitoria sulla fosforilazione di Akt. Attualmente sussistono ritardi legati alla sintesi di alcuni derivati, legati alla difficoltà di purificazione e alla conferma della struttura molecolare mediante spettroscopia ad infrarossi tuttavia questa linea di ricerca, estremamente promettente, sarà seguita parallelamente agli altri progetti avviati dal laboratorio.

NF-κB NEL MESOTELIOMA MALIGNO

Le prime indicazioni sulla funzione di NF-κB nella soppressione del processo apoptotico emersero da analisi su topi knock-out per RelA (RelA^{-/-}) [51], che morivano al quindicesimo giorno di vita embrionale affetti da un'estesa apoptosi del tessuto epatico. Ulteriori esperimenti mostrarono come la delezione del gene per RelA aumentava la sensibilità a stimoli pro-apoptotici come il TNFα in linee cellulari di fibroblasti normalmente poco sensibili a tale stimolo.

NF-κB è tipicamente un eterodimero composto dalle subunità p50 (NFκB 1) e p65 (RelA), in grado di legare elementi di risposta (*responsive elements*) sul DNA [52-54].

NF-κB risiede nel citoplasma sequestrato da una classe di proteine (IκBs – Inhibitory κB proteins) le quali, se fosforilate da specifiche chinasi (IKKs), sono poliubiquitinate e successivamente degradate dal complesso multicatalitico del proteasoma 26S: NF-κB è quindi libero di traslocare nel nucleo [55] e legarsi a specifiche sequenze sul DNA (κB sequences - T GGGGACTTTC GC).

L'attività anti-apoptotica di NF-κB dipende prevalentemente dall'induzione dei geni che codificano per proteine implicate nell'inibizione del processo apoptotico quali c-IAPs, caspase-8-c-Flip (FLICE inhibitory protein) e A1 (conosciuta anche come Bfl1).

Le fibre di asbesto sono in grado di attivare fattori di trascrizione come NF-κB [56-58] e recentemente è stato osservato come IAP-1 sia altamente espressa in cellule di Mesotelioma Maligno Pleurico e che la sua inibizione renda queste cellule meno vitali e circa 20 volte più sensibili al trattamento con Cisplatino [59].

Durante il primo anno di dottorato, gli esperimenti sono stati rivolti alla valutazione dell'attivazione di NF-κB nelle cellule di mesotelioma a nostra disposizione.

Nelle cellule delle linee MMB ed MMP si osserva attivazione costitutiva di NF-κB mentre le

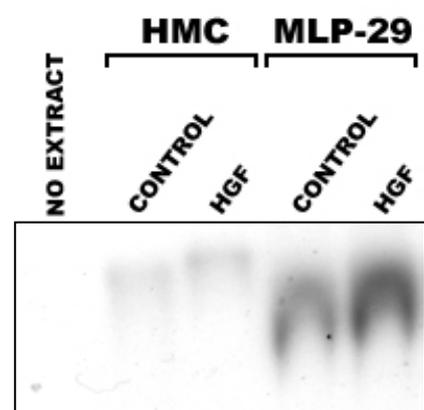


Figura 1: Saggio EMSA su cellule mesoteliali e MLP-29 (cellule epatiche) stimulate con rhHGF (50ng/ml) per 30'. Come controllo sono state utilizzate cellule MLP-29 in cui HGF induce un aumento del legame di NF-κB al DNA. [2]

cellule di origine mesoteliale (HMC) presentano un segnale debole, che, a differenza di quanto riportato per le cellule MLP29 (embrionali epatiche di ratto) [2], non viene modificato dalla stimolazione con HGF ricombinante umano (rhHGF) (**figura 1**).

Il trattamento con BAY 11-7082 (inibitore della fosforilazione di $I\kappa B\alpha$) è in grado di ridurre l'intensità del legame del fattore di trascrizione al DNA, mentre Wortmannina non altera il suo stato di attivazione. Inoltre, il trattamento con un pannello di inibitori della via PI3K/Akt non è in grado di variare lo stato di attivazione/fosforilazione della subunità p65, confermando quindi che NF- κ B, nei nostri modelli di MM, non dipende da questa via di traduzione (**figura 2-3**).

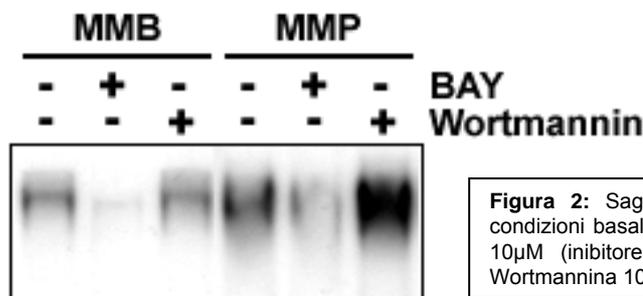


Figura 2: Saggio EMSA su cellule di MM in condizioni basali e dopo trattamento BAY 11-7082 10 μ M (inibitore della fosforilazione di $I\kappa B\alpha$) e Wortmannina 100 nM (inibitore della via di PI3K).

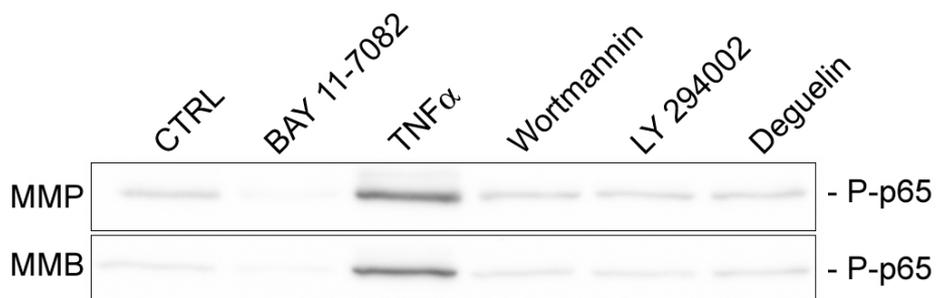


Figura 3: Analisi della fosforilazione della subunità p65 di NF- κ B dopo trattamento con un pannello di inibitori della via PI3K/Akt. Gli inibitori non sono in grado di variare lo stato di attivazione del fattore di trascrizione.

A conferma della funzione anti-apoptotica di NF- κ B, saggi di citotossicità eseguiti su cellule mesoteliali e di MMe (**figura 4**) hanno evidenziato come queste ultime risentano maggiormente della inibizione del fattore di trascrizione. La linea cellulare MMP dimostra una minore suscettibilità al trattamento, rispetto alle cellule MMB, in funzione forse della presenza nel suo genoma di sequenze di SV40 che conferiscono loro una maggiore resistenza agli stimoli pro-apoptotici.

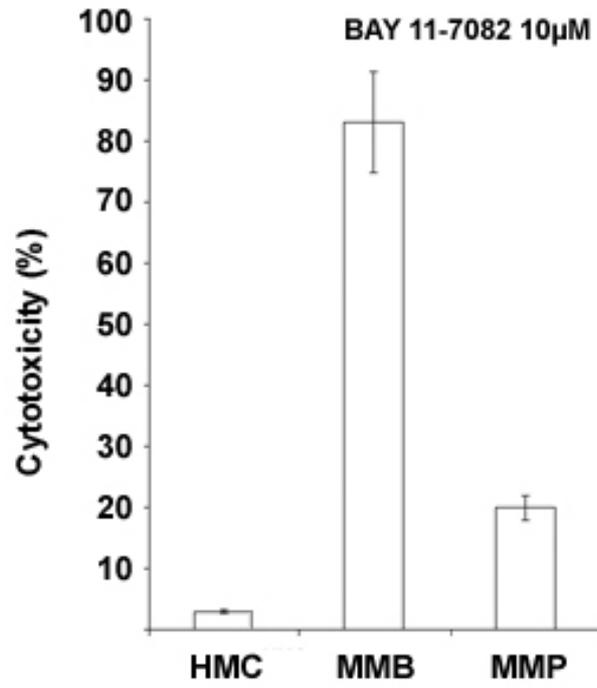


Figura 4: Saggio MMT su cellule mesoteliali e di MMe dopo trattamento con BAY 11-7082 10µM per 48h. Le cellule di mesotelioma sono più sensibili delle cellule mesoteliali all'inibizione di NF-κB.

ATTIVITA' DI STI571

Esperimenti condotti durante il primo anno di Dottorato hanno dimostrato che STI571 induce citotossicità, apoptosi e modificazioni morfologiche su cellule di mesotelioma PDGFR- β positive, in modo dose dipendente. Questi effetti sono causati dall'inibizione della fosforilazione di PDGFR- β e quindi dall'interferenza con la via di trasduzione di PI3-chinasi.

Al fine di valutare se questo farmaco abbia azione sinergica in associazione con chemioterapici di utilizzo clinico (Gemcitabina, Cisplatino, Doxorubicina, Etoposide), le curve dose-risposta di citotossicità relative ad ogni farmaco sono state valutate in modo da calcolare il valore di LC_{50} . Successivamente, prove di citotossicità eseguite mantenendo fissa la LC_{50} dei farmaci e variando la concentrazione di Gleevec, oppure viceversa, hanno permesso il calcolo del Combination Index (CI), mediante l'equazione di Chou-Talalay [60]. Come riferimento è stata misurato l'effetto sinergico di Cisplatino e Gemcitabina, associazione già utilizzata clinicamente con discreto successo terapeutico. Tra tutti i farmaci saggiati, Gemcitabina e Doxorubicina hanno dimostrato un comportamento sinergico in associazione con STI571; i valori ottenuti hanno evidenziato risultati molto incoraggianti per Gemcitabina mentre i dati relativi a Doxorubicina sono stati meno evidenti. Per questo motivo ci siamo concentrati sulla combinazione Gemcitabina / STI571.

In questa prima fase la sinergia delle associazioni è stata valutata in un ristretto intervallo di concentrazioni dei due farmaci, poiché l'indice di combinazione (CI) è riferito a dosi equiattive (LC_{50}) e non fornisce informazioni sull'ampiezza del fenomeno. Questo approccio è sicuramente valido, ma incompleto.

Abbiamo quindi utilizzato il metodo dell'isobologramma [61-64] che permette di valutare l'effetto sinergico dei farmaci in un più ampio intervallo di concentrazioni. Questo metodo permette di valutare in un solo grafico la variazione della LC_{50} del chemioterapico considerato, al variare della concentrazione del farmaco usato in associazione. Sugli assi vengono riportati i valori di LC_{50} dei farmaci usati singolarmente. La retta che unisce questi punti rappresenta la conservazione dell'isobologramma, ovvero l'andamento che dovrebbero avere i valori di LC_{50} al variare delle concentrazioni dei due farmaci,

nel caso ci fosse tra loro un rapporto di additività. Le deviazioni di questo grafico verso il basso determinano una relazione di sinergia tra i farmaci, mentre l'antagonismo è rappresentato da una deviazione verso l'alto.

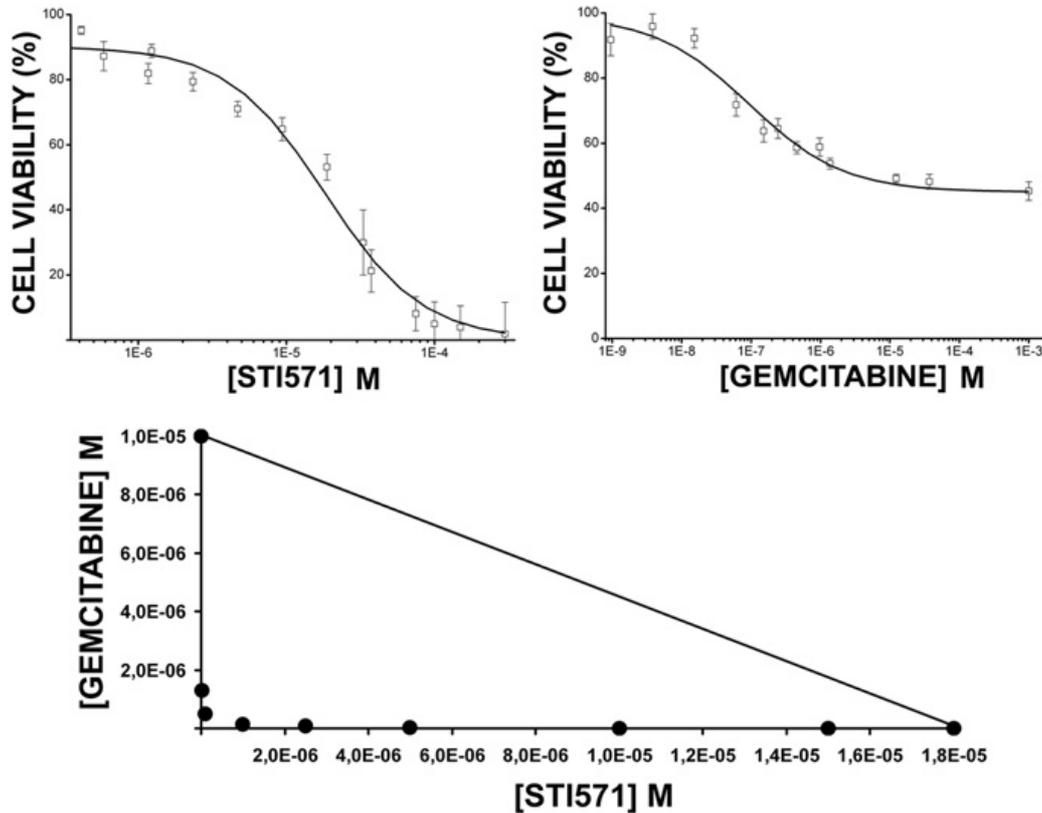


Figura 5: Curve di tossicità di STI571 e Gemcitabina relative a cellule MMP (in alto). Isobologramma relativo alla combinazione Gemcitabina/STI571 (in basso).

L'associazione Gemcitabina/STI571 si è rivelata sinergica anche con il metodo dell'isobologramma (**figura 5**).

Al fine di validare ulteriormente i risultati e di valutare qualitativamente l'effetto sinergico, abbiamo marcato con Hoechst 33342 le cellule trattate con Gemcitabina ed STI571, singolarmente e in associazione (**figura 6**).

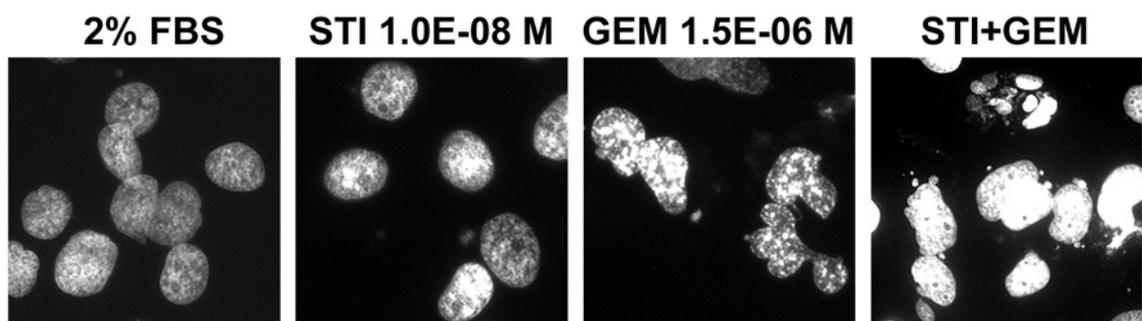


Figura 6: Marcatura con Hoechst 33342 di cellule MMP trattate per 48h con i singoli farmaci e la loro associazione. Risulta evidente la comparsa di nuclei apoptotici in seguito ai trattamenti.

I singoli trattamenti, ma soprattutto la loro associazione, inducono la comparsa di nuclei condensati in 48 ore di trattamento, conferma dell'effetto pro-apoptotico indotto dai farmaci. Questo risultato è di estrema importanza ai fini dell'uso terapeutico dell'associazione poiché esclude la necrosi come causa della citotossicità indotta.

L'analisi dell'esternalizzazione in membrana di fosfatidil-serina, tramite marcatura con AnnexinaV-FITC in citofluorimetria, ci ha permesso inoltre di valutare quantitativamente l'aumento del fenomeno apoptotico indotto dall'associazione Gemcitabina/STI571. L'incremento della marcatura con AnnexinaV è parallelo ai dati di marcatura nucleare e, a conferma dei valori ottenuti con i saggi di citotossicità, l'apoptosi indotta dalla co-somministrazione dei farmaci, risulta statisticamente maggiore della somma dei singoli contributi (**figura 7**).

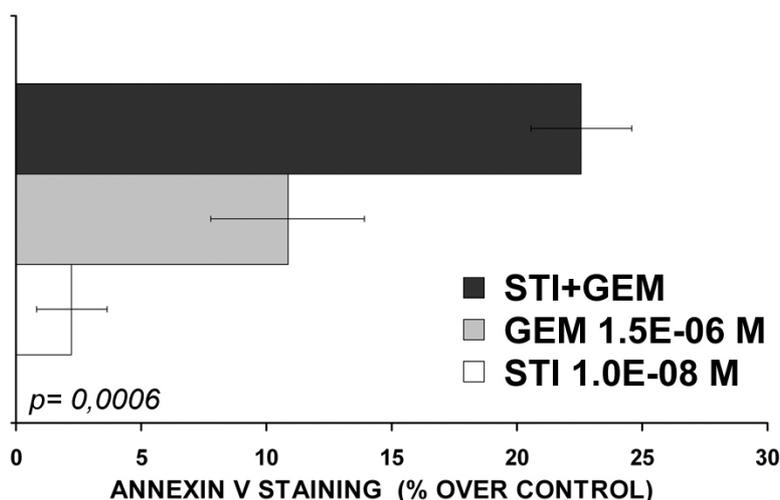


Figura 7: Istogramma relativo all'aumento percentuale della marcatura con AnnexinaV-FITC, in cellule MMP trattate con i singoli farmaci e la loro associazione, rispetto alle cellule non trattate.

L'insieme di questi dati ha incoraggiato a intraprendere uno studio clinico pilota su quattro pazienti in progressione di malattia, dopo diversi trattamenti chemioterapici tradizionali. Lo studio è tuttora in corso presso l'IRCCS dei Ospedale S. Matteo di Pavia (Dr. C. Porta), nel quadro di un progetto collaborativo a rete, coordinato dal G.I.Me. (Gruppo Italiano per lo studio del Mesotelioma) e approvato dal Comitato etico dell'istituto. I risultati dello studio hanno dimostrato come la singola somministrazione di STI571 non abbia effetto terapeutico, mentre l'associazione STI571/Gemcitabina migliori sensibilmente la

sintomatologia e porti alla riduzione della massa (valutata tramite FDG-PET) di tutti e quattro i pazienti trattati. Inoltre, secondo i criteri RECIST [65], un paziente ha mostrato una risposta a lungo termine (>24 mesi) mentre gli altri tre pazienti hanno risposto positivamente nei 5 mesi successivi alla terapia.

Si sono altresì evidenziati lievi effetti tossici quali anemia (1/4), affaticamento (3/4) e trombocitopenia (1/4) di grado 3 oltre a febbre (2/4), anoressia (2/4) e tossicità epatica (2/4) di grado 1.

Sebbene questi ultimi effetti osservati non possano essere considerati irrilevanti è importante sottolineare come questi pazienti abbiano risposto a questo protocollo terapeutico, pur avendo mostrato un progressivo aumento della patologia durante precedenti trattamenti di chemioterapia.

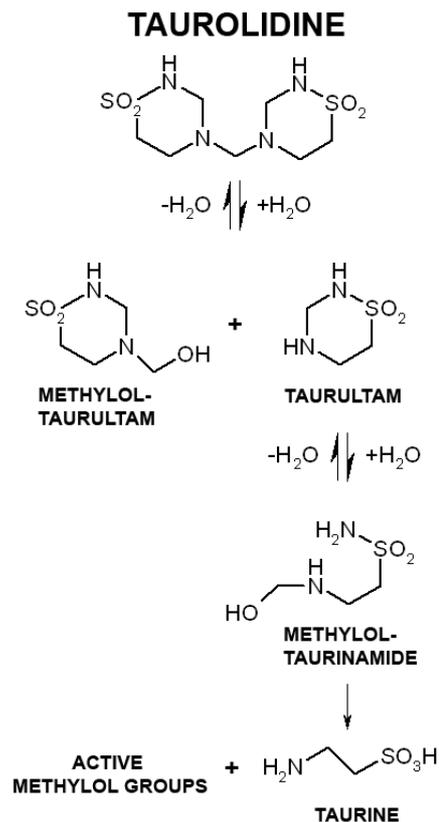
I risultati di questi esperimenti, insieme ad altri effettuati dal dottorando Pietro Bertino sulla sinergia tra STI571 e Pemetrexed (Alimta®), sono stati descritti in un manoscritto che è in fase di sottomissione.

TAUROLIDINA

Taurolidina è un composto utilizzato con successo da anni, sia localmente sia sistemicamente, come soluzione di lavaggio peritoneale, al fine di prevenire l'insorgenza di peritoniti [66, 67]. Le sue proprietà sono probabilmente mediate da metaboliti attivi come gruppi idrossimetilici, dalla molecola di Taurultam e dall'amminoacido essenziale taurina [68-71], che vengono generati per via idrolitica (**figura 8**).

Taurolidina possiede attività anti-adesiva ed è in grado di contrastare l'effetto delle endotossine [67, 72-74]. Inoltre è descritta la sua capacità di aumentare la sopravvivenza di un modello animale per il melanoma e di inibire la proliferazione di una linea cellulare metastatica di ratto, sia in vitro sia in vivo [75, 76]. Recentemente è stato dimostrato come Taurolidina sia in grado di inibire la sintesi proteica in cellule di adenocarcinoma del colon, come anche in cellule procariotiche [77]. Il meccanismo d'azione non è ancora ben chiaro, tuttavia esistono evidenze del fatto che la molecola di Taurolidina eserciti un effetto pro-apoptotico [38, 78]. Inizialmente sono stati eseguiti dei saggi di citotossicità che hanno permesso di

valutare la capacità citotossicità del farmaco sulle cellule a nostra disposizione (**figura 9**). I dati ottenuti hanno evidenziato una differente risposta delle cellule al trattamento con Taurolidina e soprattutto che le cellule normali (mesoteliali e fibroblasti umani dermici) sono molto meno sensibili all'effetto citotossico del composto, rispetto alla controparte tumorale (anche in cellule A549, di origine epiteliale).



- Adapted from: Calabresi, P. *et al.*, *Cancer Res.* 2001, 61(18): p. 6816-21.

Figura 8: Schema delle reazioni idrolitiche che portano alla formazione di gruppi idrossimetilici attivi e taurina a partire dalla molecola di Taurolidina.

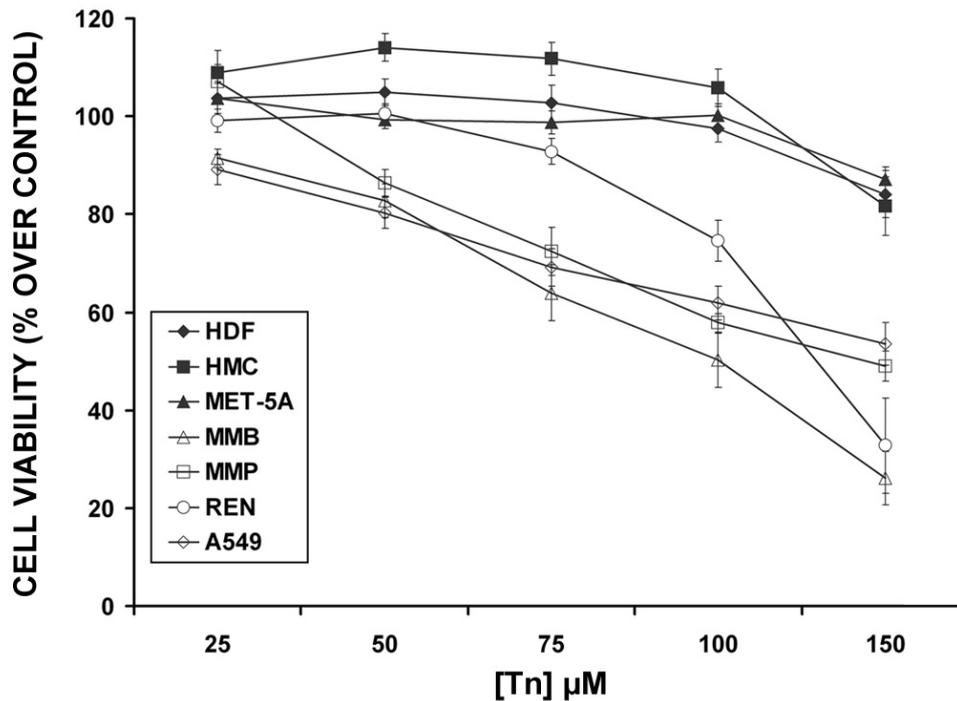


Figura 9: Cinetica dose-dipendente della citotossicità indotta dal trattamento con Taurolidina a diverse concentrazioni (25-150 μM) di fibroblasti umani (HDF), cellule mesoteliali (HMC, MET-5A), cellule tumorali di mesotelioma (MMB, MMP, REN) e di NSCLC (A549). L'analisi della citotossicità di cellule HDF e A549 è stata utilizzata come controllo rispettivamente per le cellule mesoteliali e per le cellule di mesotelioma, per escludere una resistenza intrinseca delle linee saggiate.

Sulla base di questi dati abbiamo valutato alcuni marcatori del processo apoptotico: (1) alterazioni del ciclo cellulare mediante analisi citofluorimetrica, (2) il taglio proteolitico di alcuni substrati, quali caspasi 8 e PARP, mediante immunoblotting (3) e la comparsa di nuclei condensati mediante colorazione Hoechst .

L'analisi del ciclo cellulare (**figura 10**) mostra come il trattamento con Taurolidina induca, con un profilo simile ai dati di citotossicità, la comparsa di una popolazione ipoploide sub-G1, caratteristica dei fenomeni apoptotici.

I dati di western-blotting (**figura 11-12**) mostrano come Taurolidina induca un netto taglio di PARP nelle cellule di MMe e di caspasi 8 in cellule MMB. Infine, la colorazione Hoechst di cellule di MMe (**figura 13**) mostra chiaramente la frammentazione del DNA indotta dal trattamento con Tn.

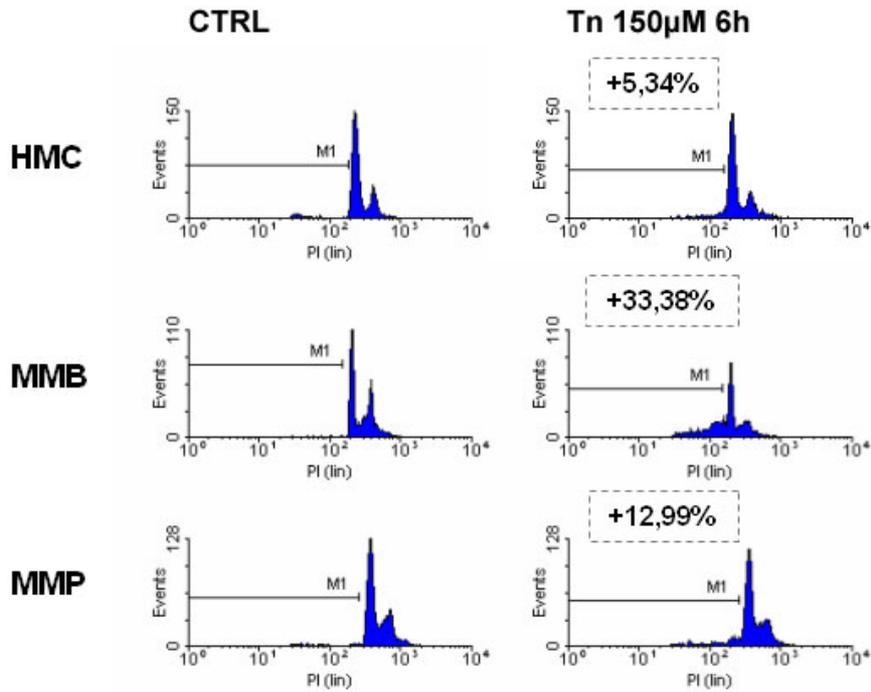


Figura 10: Analisi al citofluorimetro del ciclo cellulare di cellule mesoteliali e di MMe dopo trattamento con Tn 150µM per 6h. Le percentuali mostrano l'aumento della popolazione ipoploide sub-G1.

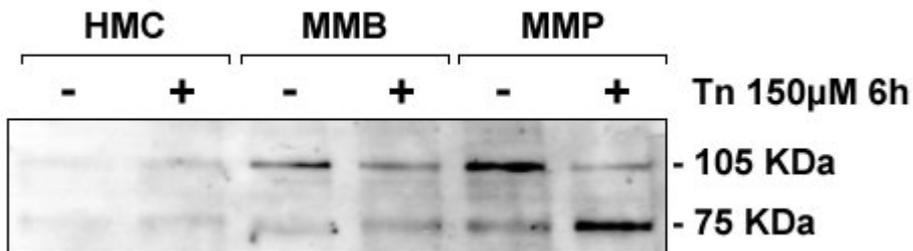


Figura 11: Taglio dell'enzima PARP in cellule mesoteliali e di MM dopo stimolazione con Tn 150µM per 6h.

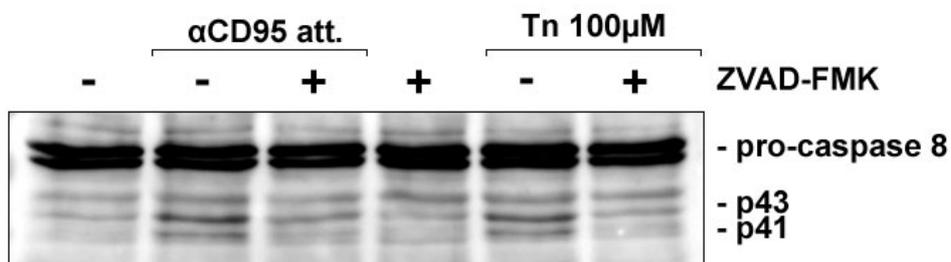
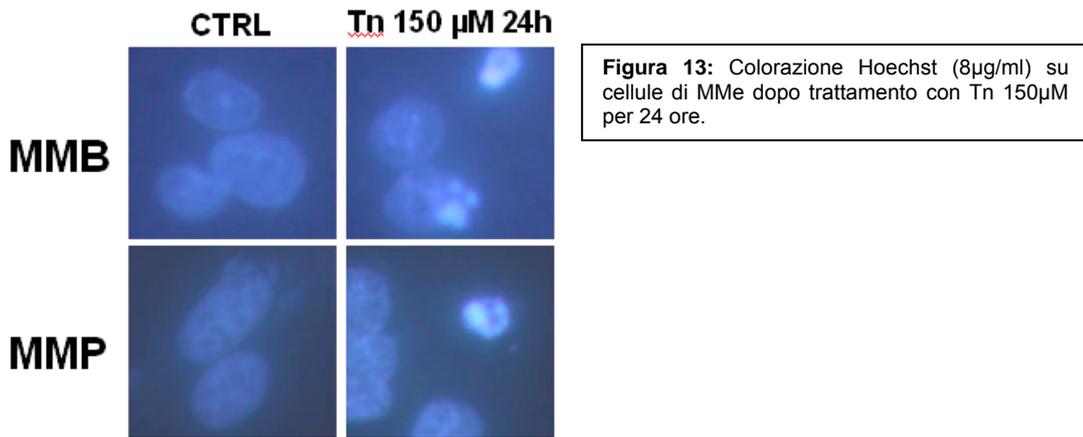


Figura 12: Taglio di pro-caspasi 8 in cellule MMB dopo trattamento con Tn 100µM per 16h e in presenza di un inibitore dell'attività pan-caspasica (ZVAD-FMK 100µM). Come controllo positivo è stato utilizzato un anticorpo attivante CD95 alla concentrazione di 200ng/ml.



Tn è in grado di innescare il processo apoptotico facilitando la via estrinseca mediata da Fas-ligando [78] e con un meccanismo citocromo C dipendente [38] tuttavia non si conoscono esattamente i protagonisti molecolari di questa sua attività.

La molecola di taurina inoltre, si comporta, *in vivo*, come uno *scavenger* di HOCl formando taurina clorammina (Tau-Cl), un intermedio più stabile e meno tossico [79, 80]. Tau-Cl inibisce la traslocazione di NF- κ B nel nucleo in macrofagi alveolari di ratto e sostiene la presenza di I κ B α nel citoplasma senza inibire direttamente l'attività di IKK (I κ B kinase) [81-83]. L'inibizione di NF- κ B sembra essere dovuta all'ossidazione, Tau-Cl mediata, di un residuo di metionina (Met45) sulla molecola di I κ B α [84].

Esperimenti condotti durante il primo anno di dottorato ci avevano suggerito come lo stato di attivazione di NF- κ B fosse un fattore di sopravvivenza per le linee di MMe e successivi esperimenti hanno confermato questa ipotesi.

Sono stati quindi condotti dei saggi EMSA al fine di verificare il

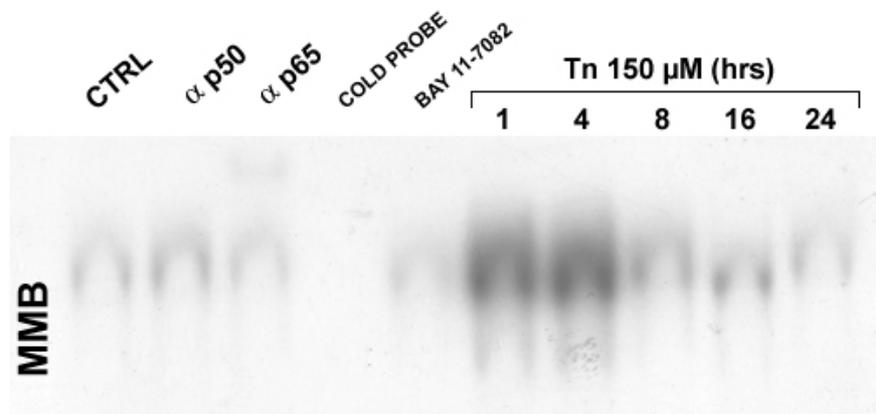


Figura 14: Saggio EMSA su cellule MMB. 5 μ g degli estratti nucleari sono stati caricati su gel di poliaccrilammide al 6% e separati per 4 ore a 150V. Gli anticorpi diretti verso p50 e p65 sono stati utilizzati alla concentrazione di 10 μ g/ml. Bay 11-7082 è stato utilizzato alla concentrazione di 10 μ M per 30 minuti.

comportamento di NF- κ B in cellule di MMe in seguito a trattamento con TN (figure 14-15).

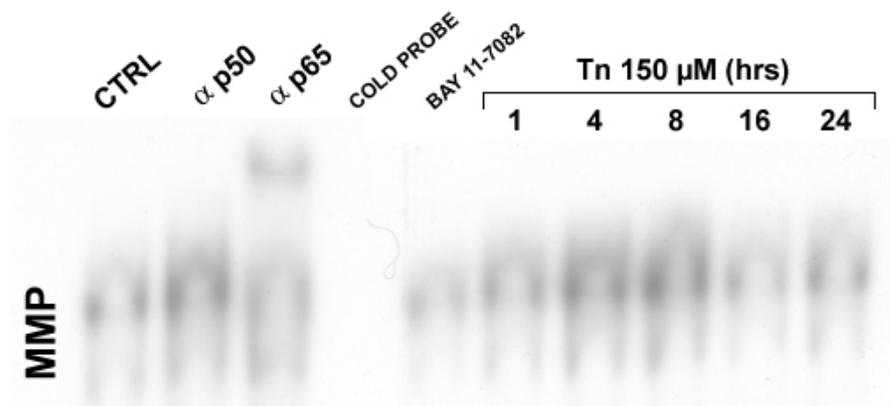


Figura 15: Saggio EMSA su cellule MMP. 5 μ g degli estratti nucleari sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 6% e separati per 4 ore a 150V. Gli anticorpi diretti verso p50 e p65 sono stati utilizzati alla concentrazione di 10 μ g/ml. Bay 11-7082 è stato utilizzato alla concentrazione di 10 μ M per 30 minuti.

I saggi di electro-mobility shift mostrano chiaramente come l'attività di NF- κ B nelle cellule di MMe non sia inibita dal trattamento con Taurolidina ma sia invece aumentata, con cinetiche differenti. Le cellule MMB mostrano un netto aumento della traslocazione nel nucleo di NF- κ B nelle prime 4 ore di trattamento mentre le cellule MMP tra le 4 e le 8 ore. Taurolidina quindi non esercita la sua azione pro-apoptotica mediante inibizione della via di trasduzione di NF- κ B e le diverse cinetiche di attivazione possono essere attribuite ai diversi tempi di risposta delle due linee di MMe al farmaco.

Per esaminare se anche nelle linee di MMe Taurolidina sia in grado di aumentare la risposta apoptotica al trattamento con Fas ligando [78] abbiamo eseguito analisi al citofluorimetro utilizzando una doppia marcatura, propidio ioduro/annessina V (figure 16-17-18).

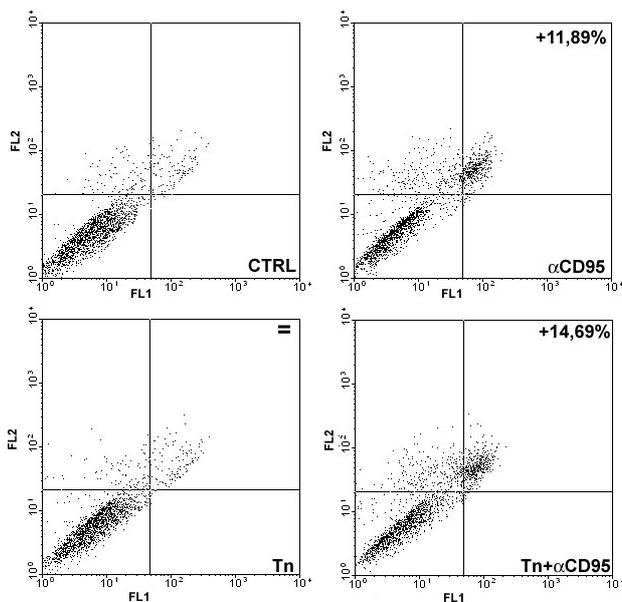


Figura 16: Analisi al citofluorimetro (Propidio ioduro / Annessina V) di cellule HMC trattate con Tn 100 μ M, anticorpo CD95 attivante 100 ng/ml e la loro associazione per 16h. Le percentuali si riferiscono all'aumento della popolazione del quadrante considerato rispetto al controllo.

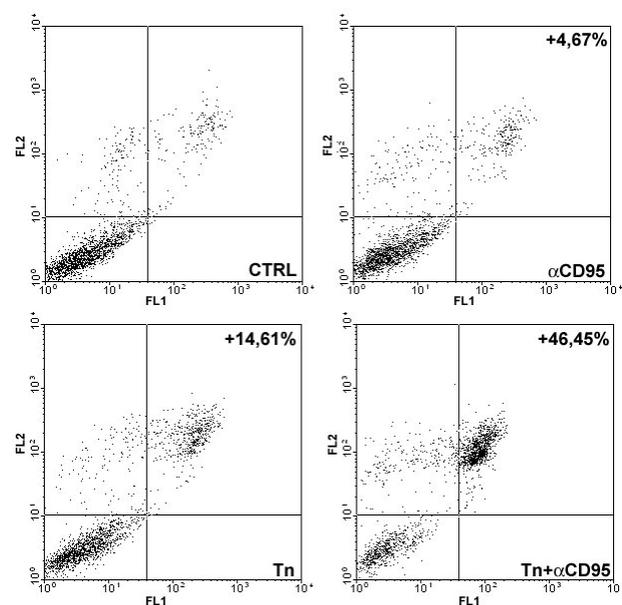


Figura 17: Analisi al citofluorimetro (Propidio ioduro / Annessina V) di cellule MMB trattate con Tn 100 μ M, anticorpo CD95 attivante 100 ng/ml e la loro associazione per 16h. Le percentuali si riferiscono all'aumento della popolazione del quadrante considerato rispetto al controllo.

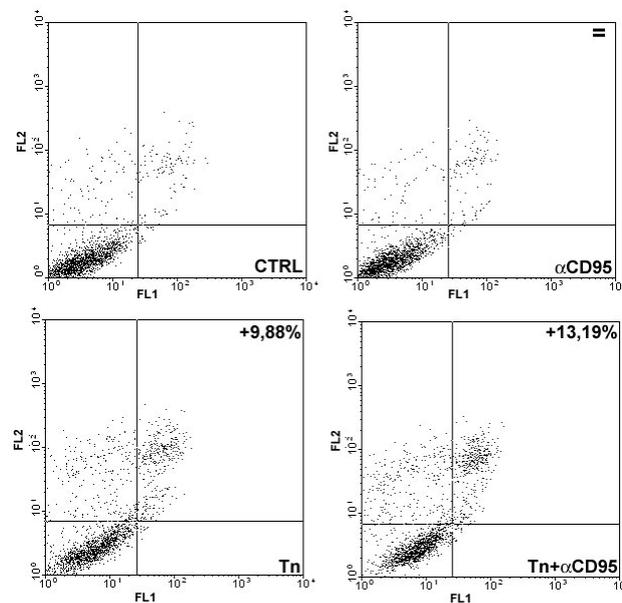


Figura 18: Analisi al citofluorimetro (Propidio ioduro / Annessina V) di cellule MMP trattate con Tn 100 μ M, anticorpo CD95 attivante 100 ng/ml e la loro associazione per 16h. Le percentuali si riferiscono all'aumento della popolazione del quadrante considerato rispetto al controllo.

dati ottenuti in citofluorimetria sono confrontabili con i dati di citotossicità, e confermano l'effetto pro-apoptotico di Taurolidina in cellule di MMe, ma non in cellule mesoteliali (HMC). Inoltre essi confermano l'azione sinergica di Tn in associazione agli anticorpi CD95 attivanti. Infatti, le cellule MMB, che subiscono maggiormente la citotossicità indotta da Taurolidina rispondono meglio al trattamento combinato mentre le cellule MMP e le cellule mesoteliali rispondono decisamente meno.

Un articolo recentemente pubblicato dimostra come Taurolidina sia in grado di inibire la sintesi proteica in cellule di adenocarcinoma del colon [77]. Abbiamo quindi valutato l'azione di Taurolidina sulla fosforilazione di p70S6K, come controllo dello stato di attivazione di mTOR, proteine entrambe coinvolte nella regolazione della sintesi proteica.

Il trattamento con Taurolidina riduce sensibilmente lo stato di fosforilazione/attivazione di p70S6K specificamente nelle cellule di mesotelioma.

Questo risultato ci ha suggerito di valutare lo stato di attivazione di proteine precedenti mTOR nella via di segnale classica PI3K/Akt e sorprendentemente è stato osservato come la fosforilazione di Akt sia decisamente ridotta nelle cellule di mesotelioma trattate con Taurolidina mentre le cellule mesoteliali mostrano solo debolmente questo effetto (**figura 19**).

Il trattamento con Rapamicina non influisce lo stato di fosforilazione di Akt per cui abbiamo verosimilmente escluso un suo controllo funzionale da parte di mTOR, tuttavia quest'ultimo è controllato tramite fosforilazione proprio da Akt.

Incoraggiati da questi risultati preliminari abbiamo iniziato a valutare il meccanismo attraverso il quale avvenga questa inibizione di Akt e soprattutto se questa sia funzionale per il processo apoptotico.

Dati precedenti avevano dimostrato come Taurolidina aumenti la traslocazione di NF- κ B nel nucleo e l'aumento del suo legame al DNA; alla luce di un recente articolo in cui si dimostra la sua abilità di indurre la formazione di ROS (Reactive Oxygen Species) in cellule di glioma [85], abbiamo considerato quel risultato come una risposta ad uno stress ossidativo.

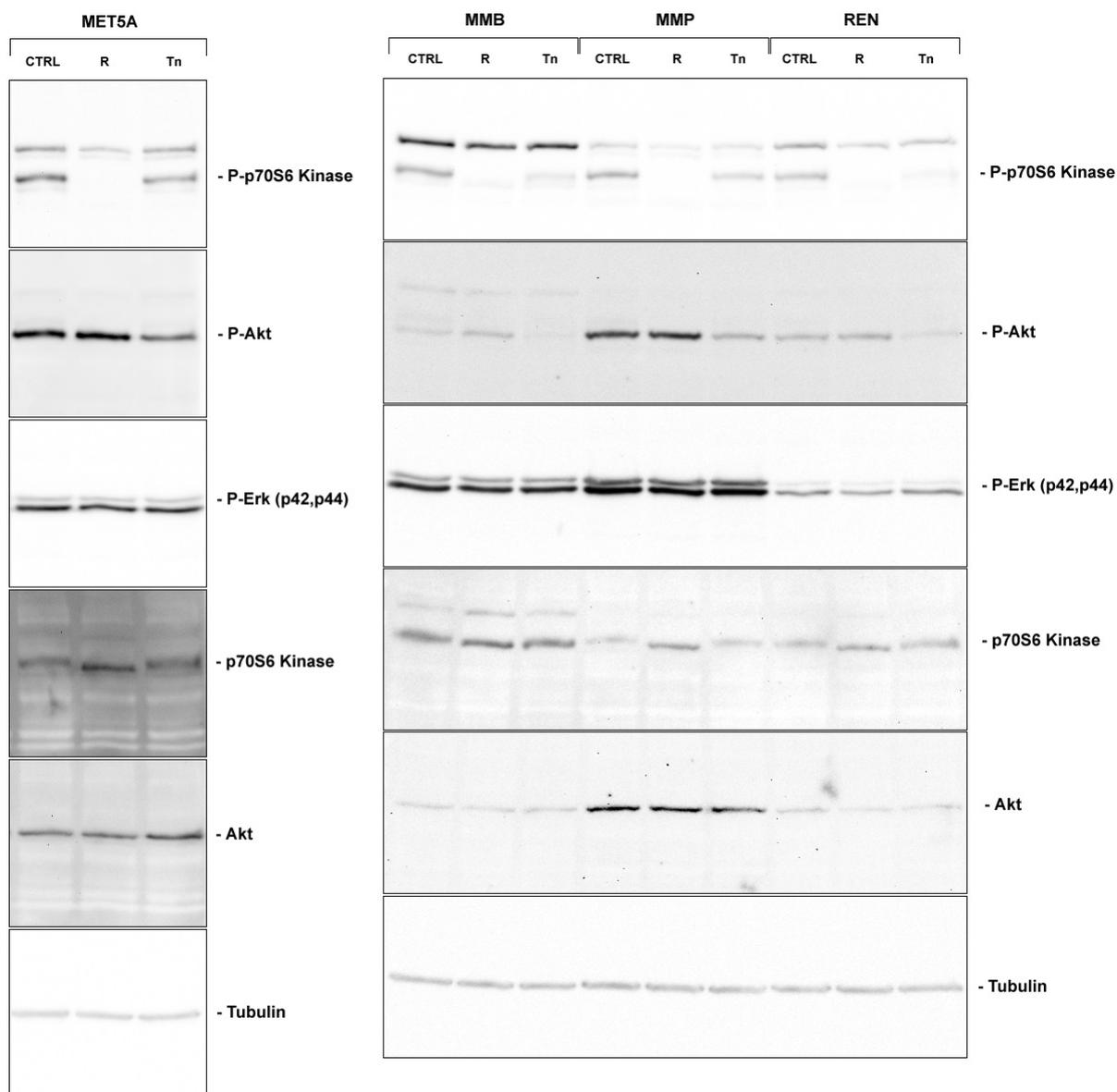


Figura 19: Western-blot relativo al trattamento di cellule mesoteliali e di mesotelioma trattate con Taurolidina 100 μ M e Rapamicina 200nM per 30 minuti. E' stata valutata anche la fosforilazione delle MAP-chinasi p42 e p44 come controllo della specificità d'azione dei trattamenti.

Il passo successivo è stato analizzare lo stato di fosforilazione di SAPK/JNK (Stress Activated Protein Kinase/Jun N-terminal Kinase) poiché direttamente attivata in seguito a stress cellulare e poiché è dimostrato come lo stress ossidativo sia accompagnato anche da un aumento dell'attività di NF- κ B e una diminuzione della fosforilazione di Akt [86].

Il trattamento con Taurolidina, come atteso, aumenta la fosforilazione di JNK, con una cinetica ritardata (2 h) rispetto alla defosforilazione di Akt nel caso delle cellule MMP (**figura 20**): l'effetto è comunque comune a tutte le linee mesoteliali e di mesotelioma saggiate perciò questo dato di per se non spiega la

pronunciata defosforilazione osservata in MMP. a tempi brevi (30') ma al massimo un'eventuale effetto di mantenimento dello stato inattivo, generato da altre cause.

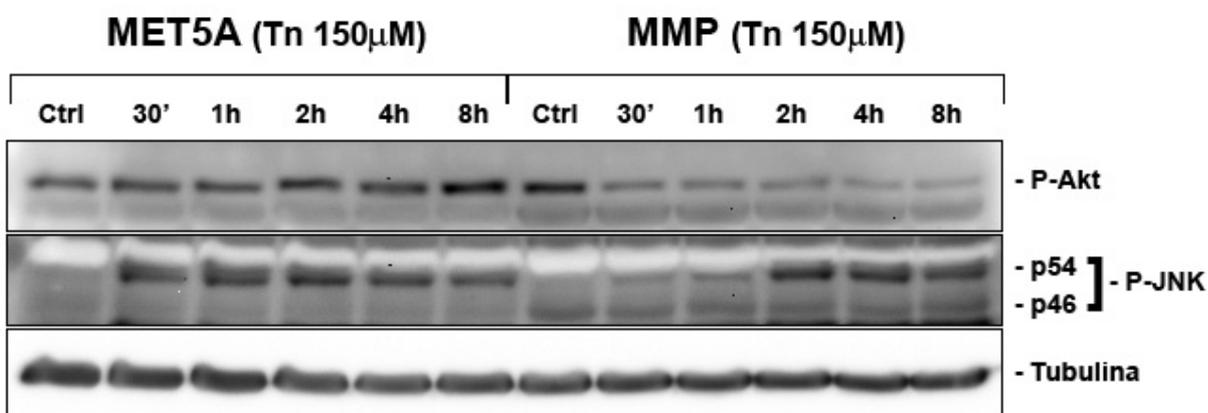


Figura 20: Time-course relativo alla fosforilazione di Jnk e Akt in cellule mesoteliali (Met-5A) e di mesotelioma (MMP) in seguito a trattamento con Tauridina 150 μ M. La fosforilazione di AKT diminuisce nei primi 30 minuti in cellule MMP mentre nelle cellule Met-5A non si osservano variazioni. Lo stato di fosforilazione di JNK aumenta in entrambe le cellule utilizzate che tuttavia mostrano una cinetica di risposta differente.

Abbiamo quindi verificato l'effettiva produzione di specie ossidanti da parte di Tauridina e dati preliminari confermano la comparsa in 24 ore di addotti al DNA come l'8-idrossi-2-deossi-guanosina (8OHdG, marcatore di danni ossidativi al DNA) e come vi sia un aumento nella produzione di nitriti già dopo 30 minuti di trattamento.

La somministrazione contemporanea di L-N-acetil-cisteina (LNAC) o Glutazione etilestere, entrambi in grado di essere assorbiti dalle cellule ed aumentare il pool intracellulare di anti-ossidanti, protegge sensibilmente dall'effetto citotossico di Tauridina e con entrambe le molecole si è inoltre osservato una minore riduzione della fosforilazione di Akt (dati preliminari).

(**figura 21**)

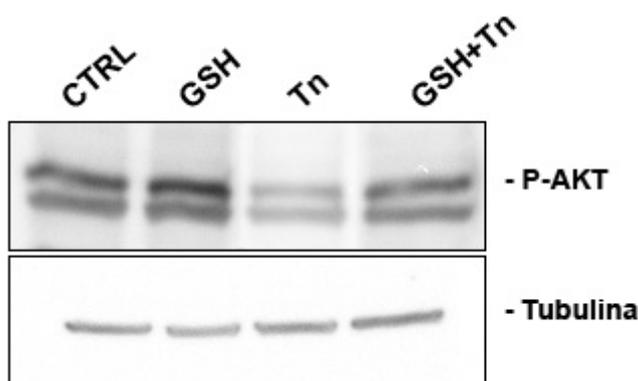


Figura 21: Western-blot di estratti totali di cellule MMP pre- trattate con glutatione-etilestere 1mM per 15 min, con Tn 150 μ M per 30 min e con entrambi i trattamenti. La presenza del glutatione consente una minore riduzione della fosforilazione di Akt.

Quest'ultimo fenomeno risulta più marcato con il trattamento con Glutathione etilestere e questo è spiegabile poiché è descritto come in alcune cellule LNAC non sia in grado di sostituire completamente l'azione antiossidante del glutathione e come peraltro possa inoltre agire anche sulla sintesi di DNA e sulla proliferazione cellulare, fornendo risultati poco chiari [87, 88].

Sono stati inoltre eseguiti diversi esperimenti volti a chiarire il meccanismo molecolare alla base della riduzione della fosforilazione di Akt e, seppur in modo preliminare, si può dire che non c'è coinvolgimento delle protein-fosfatasi PP1 e PP2A e della lipide-fosfatasi PTEN.

In un recente articolo [89] viene proposto per cellule vascolari endoteliali un interessante meccanismo di inibizione di PI3K da stress ossidativo, mediante nitratura della subunità regolatoria p85, con conseguente riduzione della fosforilazione di Akt e del suo controllo su p38 [90], che infine inoltra la cellula verso un programma apoptotico.

Sono attualmente in corso esperimenti per verificare se il meccanismo alla base dell'azione ossidante di Taurolidina sia attribuibile alla nitratura dei radicali di tirosina della PI3 chinasi, già osservato in cellule endoteliali.

SFEROIDI MULTICELLULARI

I primi studi di Holtfreter su strutture tridimensionali *in vitro* risalgono agli anni 40 [91], successivamente Moscona, durante gli anni 50 [92-95], ampliò la conoscenza di tali strutture analizzando la formazione di “aggregati” di cellule embrionali di pollo e di topo. Più recentemente, intorno agli anni 70, Sutherland [96-100] inaugurò l'utilizzo degli sferoidi tumorali nello studio sistematico della risposta dei tumori alla terapia. Attualmente gli sferoidi rappresentano una preziosa risorsa per la ricerca biomedica e negli ultimi 5 anni sono stati fatti enormi progressi nello studio della biologia e della caratterizzazione molecolare di queste strutture tridimensionali, che rappresentano l'anello di congiunzione tra la ricerca *in vitro* classica e lo studio delle strutture *in vivo* (organi e tumori).

Uno dei vantaggi degli sferoidi è la loro geometria definita, riproducibile, che rende possibili, ad esempio, alcuni saggi di neo-vascularizzazione e che soprattutto rappresenta più fedelmente l'ambiente cellulare *in vivo* (morfologia, espressione genica e comportamento biologico).

Il sistema tuttavia non è privo di variabili, alcune difficilmente superabili, come la diffusione di alcune macromolecole all'interno degli sferoidi oppure l'intrinseca struttura “a strati” che li contraddistingue (**figura 22**)

Gli sferoidi, a seconda della dimensione e dal numero di cellule da cui sono formati, possiedono tre zone ben distinte :

1. uno strato esterno di cellule proliferanti e metabolicamente attive
2. uno strato più interno formato da cellule quiescenti
3. un *core* formato da cellule necrotiche e/o apoptotiche

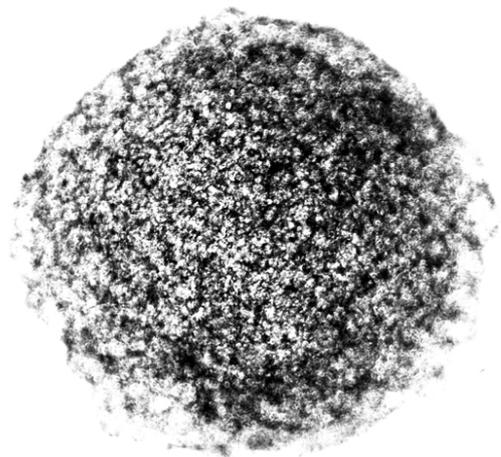


Figura 22: sferoide formato da 50000 cellule di mesotelioma (Ren) dopo 24 ore di coltura

L'importanza di questa suddivisione è fondamentale nei saggi di tossicità e soprattutto se si vuole valutare la risposta di sostanze utilizzate in chemioterapia.

Genericamente si possono evidenziare differenze biologiche che possono alterare la risposta di queste strutture ai normali trattamenti:

1. Un gradiente di nutrienti e ossigeno verso l'interno e di anidride carbonica verso l'esterno. Questo può essere la causa del *core* necrotico tuttavia esistono evidenze in letteratura che la perfusione di strutture tridimensionali non è un limite. Verosimilmente questa situazione genera un diverso pH extracellulare che può influenzare l'assorbimento di alcune sostanze;
2. Un aumento di sintesi di matrice extracellulare rispetto ai normali monostrati, soprattutto acido ialuronico;
3. Un aumento delle vie di traduzione del segnale indotte dalle caderine (in alcune strutture è stata anche osservata una diminuzione dell'espressione di alcune subunità integriniche, in particolare $\alpha 6$ e $\beta 4$);
4. Un rimodellamento del citoscheletro, una migliore integrazione intercellulare tramite *gap-junctions* (*social control*) e un aumento dell'addensamento cromatinico che correla con la diminuzione del metabolismo e della sintesi proteica dello strato intermedio;
5. Differenze di espressione di alcuni geni come aumento di p21, p27 (per cui accumulo delle cellule in fase G0/G1) e HSP27 (chaperone coinvolto nella protezione da ROS) e diminuzione di alcuni recettori per i fattori di crescita come EGF [101]

Il minor tasso metabolico, la diminuzione della sintesi di Topoisomerasi II e la forma più compatta della cromatina rendono, ad esempio, gli sferoidi resistenti al trattamento con Etoposide mentre il diverso pH intercellulare e i problemi di diffusione vanificano l'azione di sostanze come la Doxorubicina. Gli sferoidi risultano resistenti anche a diversi stimoli fisici, tra cui calore, radiazioni e terapia fotodinamica.

Esiste anche una teoria, detta di "replacement", ipotizzata da Sutherland, in cui egli spiega come alcuni protocolli di chemioterapia possano verosimilmente colpire solo le cellule proliferanti dello strato più esterno, mentre le cellule nello strato intermedio sarebbero in grado di entrare nuovamente nel ciclo cellulare e sostituire le cellule morte. L'efficacia terapeutica sarebbe quindi la stessa osservabile in un monostrato cellulare, tuttavia gli sferoidi hanno una sorta di "backup", che ne aumenta la resistenza in valore assoluto.

Nello studio di una neoplasia come il mesotelioma maligno, l'utilizzo di questo sistema è un passo fondamentale verso la scoperta dei meccanismi molecolari da sfruttare ai fini terapeutici.

Il gruppo della Dr.ssa Broaddus è da anni interessato a questo aspetto e recentemente ha pubblicato un articolo [40] che analizza la resistenza multicellulare degli sferoidi (in particolare sferoidi generati da frammenti di mesotelioma – tumor fragment spheroids) ed evidenzia come inibitori della via PI3K/Akt/mTOR (LY294002 e Rapamicina) siano in grado di sensibilizzare significativamente questo modello alla terapia. Sulla base di questi risultati è nata una collaborazione da il nostro gruppo e quello della Dr.ssa Broaddus per lo studio di queste vie di segnale in strutture tridimensionali

Avendo acquisito esperienza nello studio dei meccanismi molecolari e nella ricerca sul mesotelioma maligno durante i primi tre anni di Dottorato, ho avuto l'opportunità di poter lavorare un anno a San Francisco, nel laboratorio della Dr.ssa Broaddus, presso il "Lung Biology Center" San Francisco General Hospital, UCSF.

Attualmente è in fase di studio la resistenza al trattamento con Trail e Anisomicina di sferoidi di cellule di mesotelioma (REN, M28 e VAMT-1) rispetto ai rispettivi monostrati. Questi ultimi sono resi sensibili al trattamento con Trail mediante l'attivazione di Jnk (con Etoposide o Anisomicina) [102] o tramite co-somministrazione di agenti chemioterapici [103], mentre gli sferoidi mostrano una maggiore resistenza ai trattamenti.

Saranno eseguiti dei "size-course" per analizzare lo stato di attivazione delle principali vie anti-apoptotiche in condizioni basali e per valutare se esiste un incremento della resistenza parallelo all'aumento della dimensione degli sferoidi. Saranno inoltre validati i risultati ottenuti sui "tumor fragment spheroids" (sferoidi generati da frammenti di mesotelioma) utilizzando sui "multicellular spheroids" (REN, M28 e VAMT-1) gli inibitori già precedentemente utilizzati e valutando il coinvolgimento della via PI3/Akt.

□ SEMINARI FREQUENTATI:

- 25 Novembre 2004 REPERTAXIN, UN NUOVO INIBITORE DI IL-8: RISULTATI PRECLINICI E IDENTIFICAZIONE DEL MECCANISMO D'AZIONE Dr. Riccardo Bertini (Centro Ricerche Dompé, L'Aquila)
- 11 Marzo 2005 PROTEOMICA DELL'EPITELIO INTESTINALE Prof.ssa Margherita Ruoppolo (Dip.di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Napoli "Federico II")
- 21 Marzo 2005 SCLEROSI MULTIPLA: RICERCA DI GENI DI SUSCETTIBILITA' NELLA POPOLAZIONE FINLANDESE Dott.ssa Rosanna Asselta (Dip. Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano)
- 23 Marzo 2005 LE CELLULE DENDRITICHE, UN GIOCATORE CHIAVE NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA: QUALI E QUANTI TIPI? Dott.ssa Stefania Nicola (Dip. Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro")
- 6 Aprile 2005 TOWARDS REGULATION OF GENE EXPRESSION BY CHROMATIN MODIFICATION: SOME BIOMEDICAL MODEL. Prof. Gerardo Lopez-Rodas (Dipartimento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de Valencia)

□ PUBBLICAZIONI

- Cacciotti P, Barbone D, Porta C, Altomare DA, Testa JR, Mutti L, Gaudino G. SV40-dependent AKT activity drives mesothelial cell transformation after asbestos exposure. *Cancer Res.* 2005 Jun 15;65(12):5256-62

□ BIBLIOGRAFIA

1. *Case records of the Massachusetts General Hospital (case 33111).* N. Engl. J. Med., 1947. **236**: p. 407-412.
2. Muller, M., A. Morotti, and C. Ponzetto, *Activation of NF-kappaB is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(4): p. 1060-72.
3. Carbone, M., R.A. Kratzke, and J.R. Testa, *The pathogenesis of mesothelioma.* Semin Oncol, 2002. **29**(1): p. 2-17.

4. Mossman, B.T., et al., *Asbestos: scientific developments and implications for public policy*. Science, 1990. **247**(4940): p. 294-301.
5. Mossman, B.T. and A. Churg, *Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(5 Pt 1): p. 1666-80.
6. Robledo, R. and B. Mossman, *Cellular and molecular mechanisms of asbestos-induced fibrosis*. J Cell Physiol, 1999. **180**(2): p. 158-66.
7. Nicholson, W.J., *Comparative dose-response relationships of asbestos fiber types: magnitudes and uncertainties*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **643**: p. 74-84.
8. Mossman, B.T., Kamp, D.W. & Weitzman, S.A., *Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers*. Cancer. Invest., 1996. **14**: p. 466-480.
9. Klein, G., A. Powers, and C. Croce, *Association of SV40 with human tumors*. Oncogene, 2002. **21**(8): p. 1141-9.
10. Wang, N.S.e.a., *The interactions between asbestos fibers and metaphase chromosomes of rat pleural mesothelial cells in culture. A scanning and transmission electron microscopic study*. Am. J. Pathol., 1987. **126**: p. 343-349.
11. Broaddus V.C., Y.L., Scavo L.M., Ernst J.D. & Boylan A.M., *Asbestos induces apoptosis of human and rabbit pleural mesothelial cells via reactive oxygen species*. J. Clin. Invest., 1996. **98**: p. 2050-2059.
12. Liu, W., Ernst, J.D. & Broaddus, V., *Phagocytosis of Crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells*. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 2000. **23**: p. 371-378.
13. Levresse, V.e.a., *Effect of simian virus large T antigen expression on cell cycle control and apoptosis in rat pleural mesothelial cells exposed to DNA damaging agents*. Oncogene, 1998. **16**: p. 1041-1053.
14. Xu, L.e.a., *Asbestos induction of extended lifespan in normal human mesothelial cells: interindividual susceptibility and SV40 T antigen*. Carcinogenesis, 1999. **20**(773-783).
15. Narasimhan, S.R., et al., *Resistance of pleural mesothelioma cell lines to apoptosis: relation to expression of Bcl-2 and Bax*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): p. L165-71.
16. Cacciotti, P., et al., *SV40-dependent AKT activity drives mesothelial cell transformation after asbestos exposure*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5256-62.
17. Stein, R.C., *Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(3): p. 237-48.
18. Baldwin, A.S., Jr., *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 649-83.
19. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
20. Kane, L.P., et al., *Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase*. Curr Biol, 1999. **9**(11): p. 601-4.
21. Ohta, Y., et al., *VEGF and VEGF type C play an important role in angiogenesis and lymphangiogenesis in human malignant mesothelioma tumours*. Br J Cancer, 1999. **81**(1): p. 54-61.

22. Pogrebniak, H.W., I.A. Lubensky, and H.I. Pass, *Differential expression of platelet derived growth factor-beta in malignant mesothelioma: a clue to future therapies?* Surg Oncol, 1993. **2**(4): p. 235-40.
23. Langerak, A.W., et al., *Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptors in human malignant mesothelioma in vitro and in vivo.* J Pathol, 1996. **178**(2): p. 151-60.
24. Gerwin, B.I., et al., *Comparison of production of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor by normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines.* Cancer Res, 1987. **47**(23): p. 6180-4.
25. Manley, P.W., et al., *Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor.* Eur J Cancer, 2002. **38 Suppl 5**: p. S19-27.
26. Buchdunger, E., T. O'Reilly, and J. Wood, *Pharmacology of imatinib (STI571).* Eur J Cancer, 2002. **38 Suppl 5**: p. S28-36.
27. Buchdunger, E., et al., *Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(1): p. 139-45.
28. Krystal, G.W., et al., *The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3319-26.
29. Browne, M.K., G.B. Leslie, and R.W. Pffirmann, *Taurolin, a new chemotherapeutic agent.* J Appl Bacteriol, 1976. **41**(3): p. 363-8.
30. Knight, B.I., et al., *NMR studies and GC analysis of the antibacterial agent taurolidine.* J Pharm Sci, 1983. **72**(6): p. 705-7.
31. Gorman, S.P., et al., *Reduced adherence of micro-organisms to human mucosal epithelial cells following treatment with Taurolin, a novel antimicrobial agent.* J Appl Bacteriol, 1987. **62**(4): p. 315-20.
32. Hovenden, J.L. and G. Phillips, *Taurolidine peritoneal lavage as prophylaxis against infection after elective colorectal surgery.* Br J Surg, 1995. **82**(2): p. 280.
33. Baker, D.M., et al., *Taurolidine peritoneal lavage as prophylaxis against infection after elective colorectal surgery.* Br J Surg, 1994. **81**(7): p. 1054-6.
34. Ribizzi, I., et al., *Taurolidine: preclinical evaluation of a novel, highly selective, agent for bone marrow purging.* Bone Marrow Transplant, 2002. **29**(4): p. 313-9.
35. McCourt, M., et al., *Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo.* Ann Surg Oncol, 2000. **7**(9): p. 685-91.
36. Stendel, R., et al., *The effect of taurolidine on brain tumor cells.* Anticancer Res, 2002. **22**(2A): p. 809-14.
37. Darnowski, J.W., et al., *Mechanistic and antineoplastic evaluation of taurolidine in the DU145 model of human prostate cancer.* Cancer Chemother Pharmacol, 2004. **54**(3): p. 249-58.
38. Han, Z., et al., *The antibacterial drug taurolidine induces apoptosis by a mitochondrial cytochrome c-dependent mechanism.* Anticancer Res, 2002. **22**(4): p. 1959-64.
39. Desoize, B. and J. Jardillier, *Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?* Crit Rev Oncol Hematol, 2000. **36**(2-3): p. 193-207.

40. Kim, K.U., et al., *A Novel In Vitro Model of Human Mesothelioma for Studying Tumor Biology and Apoptotic Resistance*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005.
41. Hamilton, G., *Multicellular spheroids as an in vitro tumor model*. Cancer Lett, 1998. **131**(1): p. 29-34.
42. Kunz-Schughart, L.A., *Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor*. Cell Biol Int, 1999. **23**(3): p. 157-61.
43. Bi, L., et al., *Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10963-8.
44. Hidalgo, M. and E.K. Rowinsky, *The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy*. Oncogene, 2000. **19**(56): p. 6680-6.
45. Brian, P.W., et al., *Wortmannin, an antibiotic produced by Penicillium wortmanni*. Trans. Br. Mycol., 1957. **40**: p. 365-368.
46. Arcaro, A. and M.P. Wymann, *Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses*. Biochem J, 1993. **296** (Pt 2): p. 297-301.
47. Yano, H., et al., *Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(34): p. 25846-56.
48. Ui, M., et al., *Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(8): p. 303-7.
49. Wymann, M.P., et al., *Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1722-33.
50. Walker, E.H., et al., *Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine*. Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 909-19.
51. Beg, A.A., et al., *Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B*. Nature, 1995. **376**(6536): p. 167-70.
52. Bours, V., et al., *Cloning of a mitogen-inducible gene encoding a kappa B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs*. Nature, 1990. **348**(6296): p. 76-80.
53. Ghosh, S., et al., *Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal*. Cell, 1990. **62**(5): p. 1019-29.
54. Kieran, M., et al., *The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product*. Cell, 1990. **62**(5): p. 1007-18.
55. Okazaki, T., et al., *Phosphorylation of serine 276 is essential for p65 NF-kappaB subunit-dependent cellular responses*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(4): p. 807-12.
56. Brown, D.M., P.H. Beswick, and K. Donaldson, *Induction of nuclear translocation of NF-kappaB in epithelial cells by respirable mineral fibres*. J Pathol, 1999. **189**(2): p. 258-64.
57. Janssen, Y.M., et al., *Asbestos causes translocation of p65 protein and increases NF-kappa B DNA binding activity in rat lung epithelial and pleural mesothelial cells*. Am J Pathol, 1997. **151**(2): p. 389-401.

58. Mossman, B.T., et al., *Cell Signaling Pathways Elicited by Asbestos*. Environ Health Perspect, 1997. **105S**(Suppl 5): p. 1121-5.
59. Gordon, G.J., et al., *Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma*. Carcinogenesis, 2002. **23**(6): p. 1017-24.
60. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. Adv Enzyme Regul, 1984. **22**: p. 27-55.
61. Tallarida, R.J., *Drug synergism: its detection and applications*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(3): p. 865-72.
62. Loewe, S., *The problem of synergism and antagonism of combined drugs*. Arzneimittelforschung, 1953. **3**(6): p. 285-90.
63. Loewe, S., *Antagonisms and antagonists*. Pharmacol Rev, 1957. **9**(2): p. 237-42.
64. Gessner, P.K. and B.E. Cabana, *A study of the interaction of the hypnotic effects and of the toxic effects of chloral hydrate and ethanol*. J Pharmacol Exp Ther, 1970. **174**(2): p. 247-59.
65. Byrne, M.J. and A.K. Nowak, *Modified RECIST criteria for assessment of response in malignant pleural mesothelioma*. Ann Oncol, 2004. **15**(2): p. 257-60.
66. Billing, A., D. Frohlich, and G. Ruckdeschel, *[The effect of taurolin on endogenous immunity and pathogen elimination in human peritonitis]*. Langenbecks Arch Chir, 1992. **377**(3): p. 180-5.
67. Browne, M.K., *The treatment of peritonitis by an antiseptic - taurolin*. Pharmatherapeutica, 1981. **2**(8): p. 517-22.
68. Knight, B.I., et al., *The characterisation and quantitation by high-performance liquid chromatography of the metabolites of taurolin*. Br J Clin Pharmacol, 1981. **12**(3): p. 439-40.
69. Watson, R.W., et al., *Taurolidine, an antilipopopolysaccharide agent, has immunoregulatory properties that are mediated by the amino acid taurine*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(3): p. 299-306.
70. Myers, E., et al., *The relationship between structure and activity of taurolin*. J Appl Bacteriol, 1980. **48**(1): p. 89-96.
71. Calabresi, P., F.A. Goulette, and J.W. Darnowski, *Taurolidine: cytotoxic and mechanistic evaluation of a novel antineoplastic agent*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6816-21.
72. Monson, J.R., P.S. Ramsey, and J.H. Donohue, *Taurolidine inhibits tumour necrosis factor (TNF) toxicity--new evidence of TNF and endotoxin synergy*. Eur J Surg Oncol, 1993. **19**(3): p. 226-31.
73. Knight, B.I., et al., *Peritoneal absorption of the antibacterial and antiendotoxin taurolin in peritonitis*. Br J Clin Pharmacol, 1981. **12**(5): p. 695-9.
74. Bedrosian, I., et al., *Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells*. Cytokine, 1991. **3**(6): p. 568-75.
75. Shroyer, D.P., et al., *The effect of Taurolidine on adherent and floating subpopulations of melanoma cells*. Anticancer Drugs, 2003. **14**(4): p. 295-303.
76. Da Costa, M.L., H.P. Redmond, and D.J. Bouchier-Hayes, *Taurolidine improves survival by abrogating the accelerated development and proliferation of solid tumors and development of organ metastases from circulating tumor cells released following surgery*. J Surg Res, 2001. **101**(2): p. 111-9.

77. Braumann, C., et al., *The tumor-suppressive reagent taurolidine is an inhibitor of protein biosynthesis*. Int J Cancer, 2004. **112**(2): p. 225-30.
78. Stendel, R., et al., *Enhancement of Fas-ligand-mediated programmed cell death by taurolidine*. Anticancer Res, 2003. **23**(3B): p. 2309-14.
79. Grisham, M.B., et al., *Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines*. J Biol Chem, 1984. **259**(16): p. 10404-13.
80. Weiss, S.J., et al., *Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation*. J Clin Invest, 1982. **70**(3): p. 598-607.
81. Barua, M., Y. Liu, and M.R. Quinn, *Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF-alpha gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF-kappaB activation and IkappaB kinase activity*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2275-81.
82. Kanayama, A., et al., *Oxidation of Ikappa Balpha at methionine 45 is one cause of taurine chloramine-induced inhibition of NF-kappa B activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24049-56.
83. Schuller-Levis, G.B. and E. Park, *Taurine: new implications for an old amino acid*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **226**(2): p. 195-202.
84. Miyamoto, Y., et al., *Taurine is involved in oxidation of IkappaB alpha at Met45: N-halogenated taurine and anti-inflammatory action*. Adv Exp Med Biol, 2003. **526**: p. 373-80.
85. Rodak, R., et al., *Induction of reactive oxygen intermediates-dependent programmed cell death in human malignant ex vivo glioma cells and inhibition of the vascular endothelial growth factor production by taurolidine*. J Neurosurg, 2005. **102**(6): p. 1055-68.
86. Taylor, J.M., et al., *Akt phosphorylation and NFkappaB activation are counterregulated under conditions of oxidative stress*. Exp Cell Res, 2004. **300**(2): p. 463-75.
87. Ho, Y.S., et al., *Suppression of nitric oxide-induced apoptosis by N-acetyl-L-cysteine through modulation of glutathione, bcl-2, and bax protein levels*. Mol Carcinog, 1997. **19**(2): p. 101-13.
88. Yan, C.Y., G. Ferrari, and L.A. Greene, *N-acetylcysteine-promoted survival of PC12 cells is glutathione-independent but transcription-dependent*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26827-32.
89. el-Remessy, A.B., et al., *Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 1): p. 243-52.
90. Gratton, J.P., et al., *Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30359-65.
91. Holtfreter, J., *A study of the mechanism of gastrulation*. J. Exp. Zool, 1944. **95**: p. 171-212.
92. Moscona, A., *Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos*. Exp. Cell Res., 1952. **3**: p. 535-539.
93. Moscona, A., *Formation of lentoids by dissociated retinal cells of the chick embryo*. Science, 1957. **125**: p. 598-599.
94. Moscona, A., *The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1957. **43**: p. 184-194.

95. Moscona, A., *Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells*. Exp. Cell Res., 1961. **22**: p. 455-475.
96. Inch, W.R., J.A. McCredie, and R.M. Sutherland, *Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture*. Growth, 1970. **34**(3): p. 271-82.
97. Sutherland, R.M., J.A. McCredie, and W.R. Inch, *Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas*. J Natl Cancer Inst, 1971. **46**(1): p. 113-20.
98. Sutherland, R.M., W.R. Inch, and J.A. McCredie, *Phytohemagglutinin (PHA)-induced transformation of lymphocytes from patients with cancer*. Cancer, 1971. **27**(3): p. 574-8.
99. Sutherland, R.M., et al., *A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model*. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1970. **18**(5): p. 491-5.
100. Sutherland, R.M., *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. Science, 1988. **240**(4849): p. 177-84.
101. Mansbridge, J.N., et al., *Adaptation of EGF receptor signal transduction to three-dimensional culture conditions: changes in surface receptor expression and protein tyrosine phosphorylation*. J Cell Physiol, 1994. **161**(2): p. 374-82.
102. Vivo, C., W. Liu, and V.C. Broaddus, *c-Jun N-terminal kinase contributes to apoptotic synergy induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand plus DNA damage in chemoresistant, p53 inactive mesothelioma cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25461-7.
103. Liu, W., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy cooperate to induce apoptosis in mesothelioma cell lines*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(1): p. 111-8.