

Dottorando: Dario Barbone



Tutore: Prof G. Gaudino



NUOVI BERSAGLI FARMACOLOGICI PER LA TERAPIA DEL MESOTELIOMA MALIGNO DA ASBESTO

Relazione del quarto anno

Il Mesotelioma Maligno (MMe), un tumore aggressivo e invasivo che colpisce generalmente la cavità pleurica, dimostra una elevata resistenza alla radioterapia e alla chemioterapia, inoltre la sua rimozione chirurgica risulta poco praticabile (Carbone et al., 2002).

Durante i primi tre anni di Dottorato l'attività di ricerca è stata rivolta allo studio di meccanismi molecolari e nuovi potenziali farmaci in grado di ampliare la limitata disponibilità di terapie per questa neoplasia.

Il MMe è strettamente correlato all'esposizione a fibre di asbesto (Mossman et al., 1990; Mossman and Churg, 1998; Nicholson, 1991; Robledo and Mossman, 1999), minerali silicati a differente cancerogenicità e sebbene l'asbesto sia il maggior agente patogeno (Mossman, 1996), l'infezione da SV40 è stata proposta come possibile concausa (Klein et al., 2002).

Le fibre di asbesto sono in grado di indurre aberrazioni cromosomiche (Wang, 1987) attraverso la produzione di radicali dell'ossigeno (Broaddus V.C., 1996) e danni al DNA (Liu, 2000), portando ad una elevata instabilità genomica (Levresse, 1998) che può portare alla loro trasformazione (Xu, 1999).

L'integrazione di sequenze virali di SV40 nel genoma delle cellule mesoteliali è in grado di conferire un vantaggio selettivo a queste ultime, rendendole meno

sensibili al processo apoptotico innescato dai fenomeni ossidativi. La trasformazione delle cellule mesoteliali segue quindi un percorso progressivo che vede la cooperazione di fibre di asbesto, infezione da SV40 e alterazioni della via di trasduzione di PI3chinasi/Akt (Cacciotti et al., 2005), insieme ad altre molecole chiave come il fattore di trascrizione NF- κ B (Yang et al., 2006), pRB e p53 (Carbone et al., 1997).

Nell'ultimo decennio, lo studio dei tumori solidi e della loro resistenza agli agenti pro-apoptotici si è avvalso di nuove tecniche di coltura cellulare tridimensionali, in grado di fornire modelli di studio (sferoidi multicellulari) in grado di rappresentare più fedelmente i tumori solidi rispetto ad un modello bi-dimensionale quali i normali monostrati cellulari usati in ricerca.

Nel quadro di una collaborazione con il laboratorio della Dr.ssa Broaddus a San Francisco (UCSF), mi è stata offerta la possibilità trascorrere l'ultimo anno di Dottorato nel dipartimento di Biologia Polmonare presso l'Università della California San Francisco (UCSF), al fine di studiare la resistenza multicellulare dimostrata dagli sferoidi rispetto ai monostrati cellulari e le vie di segnale intracellulari implicate in questo fenomeno.

SFEROIDI MULTICELLULARI

I primi studi di Holtfreter su strutture tridimensionali *in vitro* risalgono agli anni 40 (Holtfreter, 1944), successivamente Moscona, durante gli anni 50 (Moscona, 1952; Moscona, 1957a; Moscona, 1957b; Moscona, 1961), 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 (Inch et al., 1970; Sutherland, 1988; Sutherland et al., 1971a; Sutherland et al., 1970; Sutherland et al., 1971b) 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 cinque 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-vascolarizzazione 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 1)

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

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 chemioterapici:

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 e collagene;
3. Un aumento delle vie di trasduzione 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

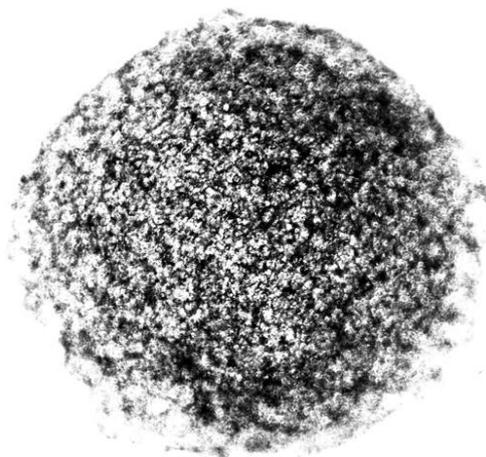


Figura 1: sferoide formato da 50000 cellule di mesotelioma (Ren) dopo 24 ore di coltura

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) (Bates et al., 2000) (Hamilton, 1998) e HSP27 (chaperone coinvolto nella protezione da ROS) e diminuzione di alcuni recettori per i fattori di crescita come EGF (Mansbridge et al., 1994)

Il minor tasso metabolico, la diminuzione della sintesi e la rilocalizzazione sub-cellulare di Topoisomerasi II (Oloumi et al., 2000) 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 ha recentemente pubblicato un articolo (Kim et al., 2005) in cui si analizza la resistenza multicellulare degli sferoidi (in particolare sferoidi generati da frammenti di mesotelioma – *ex vivo* tumor fragment spheroids) e si evidenzia la capacità di inibitori della via PI3K/Akt/mTOR (LY294002 e Rapamicina) nel sensibilizzare significativamente questo modello alla terapia. Sulla base di questi risultati è nato un interesse comune per lo studio della via di PI3K/Akt in sferoidi composti da cellule di mesotelioma (MMe multicellular spheroids).

Inizialmente sono stati valutati diversi sistemi di produzione di questi ultimi (Lund-Johansen M, 1992), poichè non esiste un metodo standard di coltura ed era necessario elucidare eventuali variabili sperimentali collegate a questo aspetto.

Esiste un sistema chiamato “liquid-overlay” (Yuhas et al., 1977) che prevede la semina delle cellule in normali piastre di petri ricoperte con un sottile strato di agar. Gli sferoidi così prodotti sono caratterizzati da diverse dimensioni e la loro formazione richiede diversi giorni. Il limite intrinseco di questo metodo è la variabilità del diametro degli sferoidi generati e la difficoltà nel comparare i risultati con i rispettivi monostrati.

Il sistema RCCS (Rotatory Cell Culture System), prodotto dalla società Synthecon, è stato sviluppato in collaborazione con la NASA (National Aeronautics and Space Administration) per la produzione di strutture cellulari tridimensionali.



Figura 2: Apparato RCCS prodotto dalla società Synthecon, Texas, USA. (www.synthecon.com)

Con questo approccio rotazionale siamo stati in grado di ottenere la completa formazione di sferoidi in due settimane, tuttavia il metodo presenta gli stessi svantaggi del sistema “liquid overlay” e purtroppo richiede un tempo eccessivo per l’ottenimento delle strutture tridimensionali.

Abbiamo quindi preferito un metodo basato su piastre con 96 pozzetti a fondo rotondo ricoperti di Poly-Hema [Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)], un polimero che

previene l'adesione delle cellule alla superficie delle piastre, coltivando le cellule per 24 ore (figura 3).

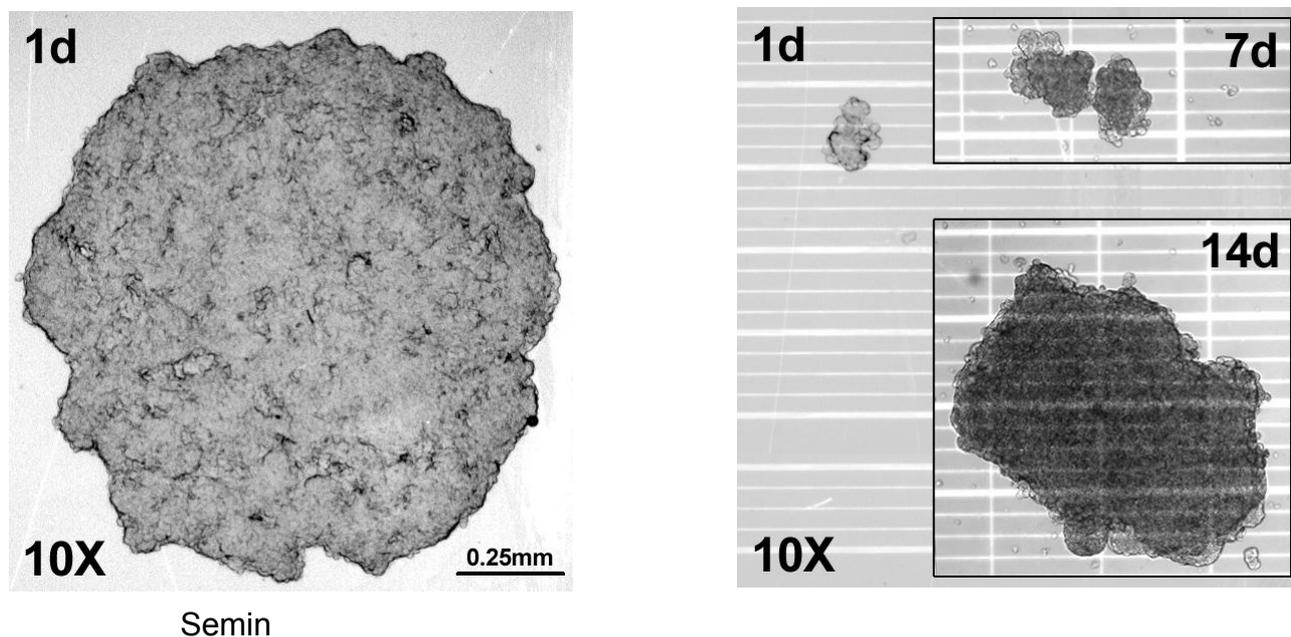


Figura 3: MME multicellular spheroid formato da 10000 cellule M28 dopo un giorno in coltura in pozzetti a fondo tondo rivestiti di poly-hema (sinistra) e sferoidi ottenuti con il sistema RCSS dopo 1,7 e 14 giorni (destra).

Seminando un numero esatto di cellule in ogni pozzetto, possiamo ottenere sferoidi di dimensioni controllate e riproducibili, minimizzando anche l'insorgenza di un core necrotico che viene descritto in letteratura comparire solo dopo 24 ore di coltura.

I primi esperimenti hanno avuto lo scopo di caratterizzare lo stato di fosforilazione delle più importanti vie di trasduzione del segnale in sferoidi di diverse dimensioni. Sono stati quindi generati sferoidi di diverse dimensioni (utilizzando un numero crescente di cellule M28 e Ren) e l'analisi in western-blot ha evidenziato come la via PI3K/Akt e mTOR/p70S6K siano sostanzialmente ridotte rispetto ai rispettivi monostrati (figura 4).

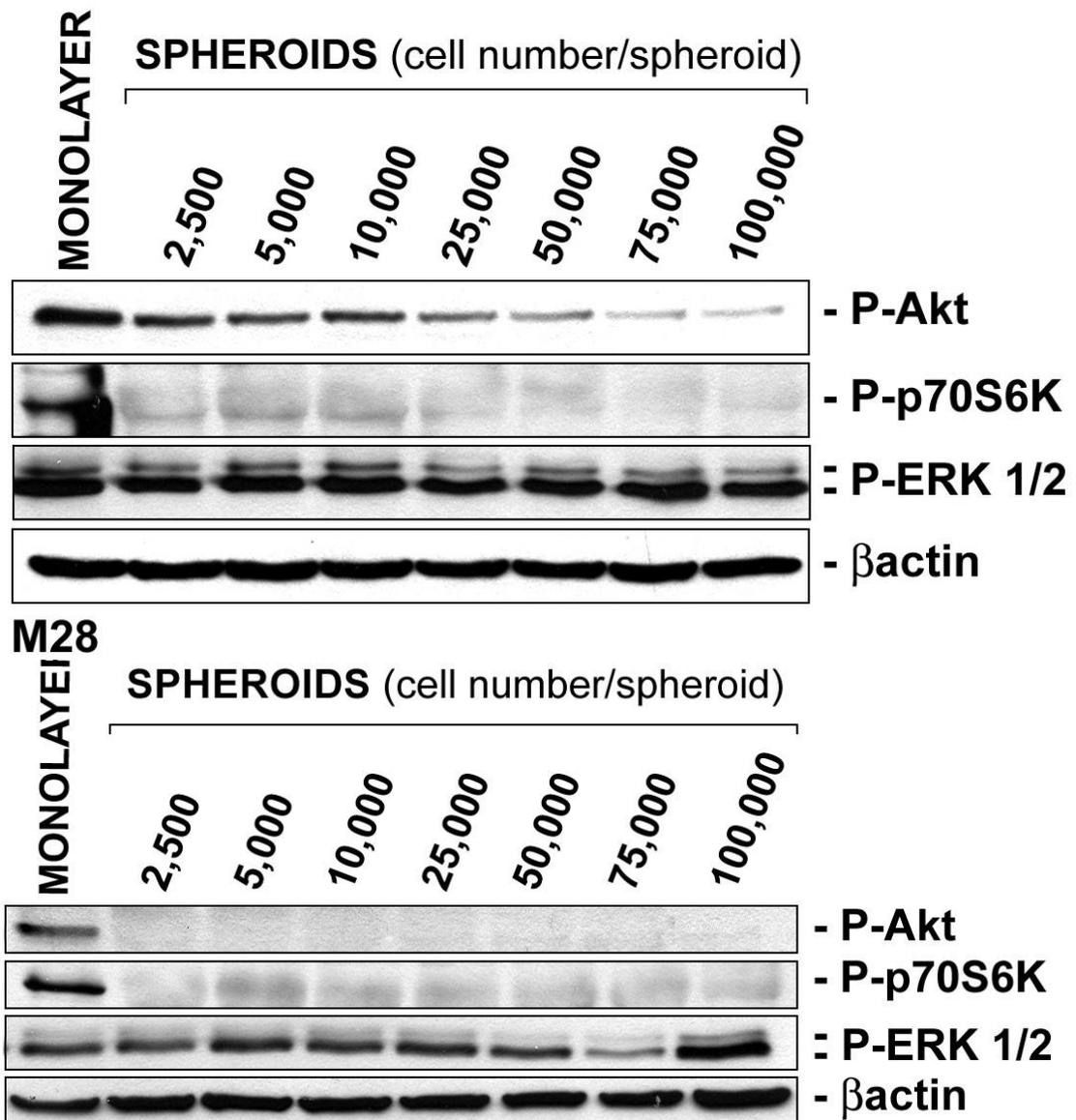


Figura 5

REN

e

Abbiamo inoltre valutato l'eventuale presenza di cellule apoptotiche negli sferoidi generati ([figura 5](#)) ed abbiamo quindi deciso di continuare gli studi utilizzando sferoidi composti da 10000 cellule, poiché gli sferoidi formati da 25000 cellule e le successive dimensioni presentano una piccola percentuale di cellule apoptotiche che potrebbero falsare i risultati biologici di resistenza alla chemioterapia.

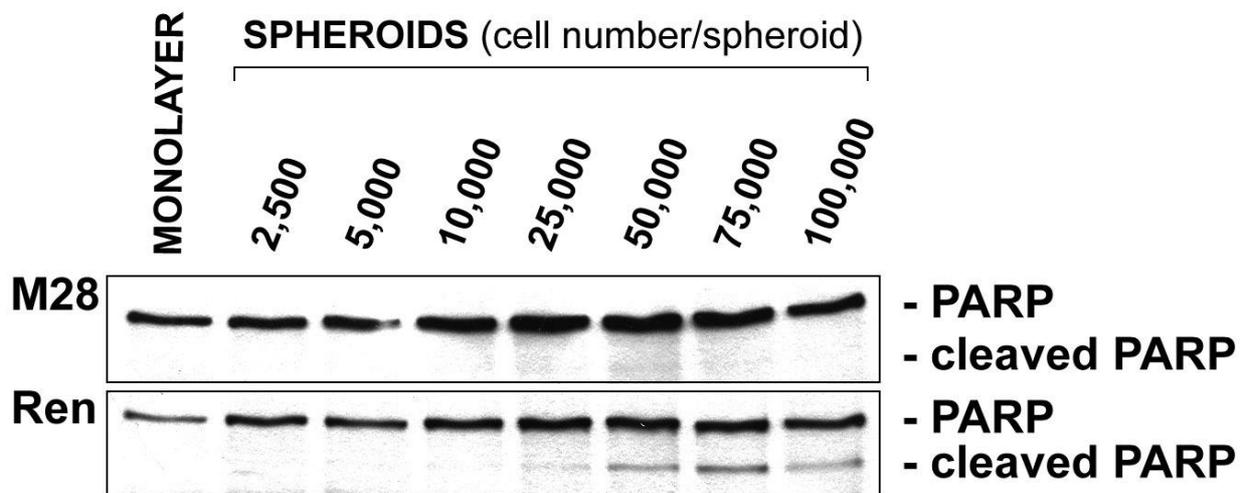


Figura 5: Western-blot relativo al taglio enzimatico dell'enzima PARP (Poly ADP Ribosome Polymerase) in sferoidi di cellule Ren e M28 di diverse dimensioni. Negli sferoidi formati da 25000 cellule si può notare la comparsa (netta in cellule Ren) del frammento a minor peso molecolare generato dal taglio proteolitico dell'enzima da parte delle caspasi attive, il quale è sintomo di

Successivamente abbiamo verificato se la riduzione delle vie di segnale osservata potesse essere riconducibile al cambiamento di forma delle cellule nella transizione 2D-3D. Al fine di valutare questo aspetto, abbiamo coltivato le cellule utilizzando sfere di materiale plastico per colture cellulari di dimensioni variabili tra 70 e 150 μm (dimensioni inferiori agli sferoidi ma comunque comparabili).

I risultati ottenuti ([figura 6](#)) dimostrano come la torsione generata dalla coltura su una superficie non perfettamente piatta non induca una significativa riduzione delle vie di segnale analizzate. Gli sferoidi inoltre presentano una maggiore espressione di FLIP_L (Flice Inhibitory Protein), molecola direttamente implicata nella resistenza al trattamento con Trail, tramite inibizione dell'attivazione di caspasi 8 (Zhang and Fang, 2005).

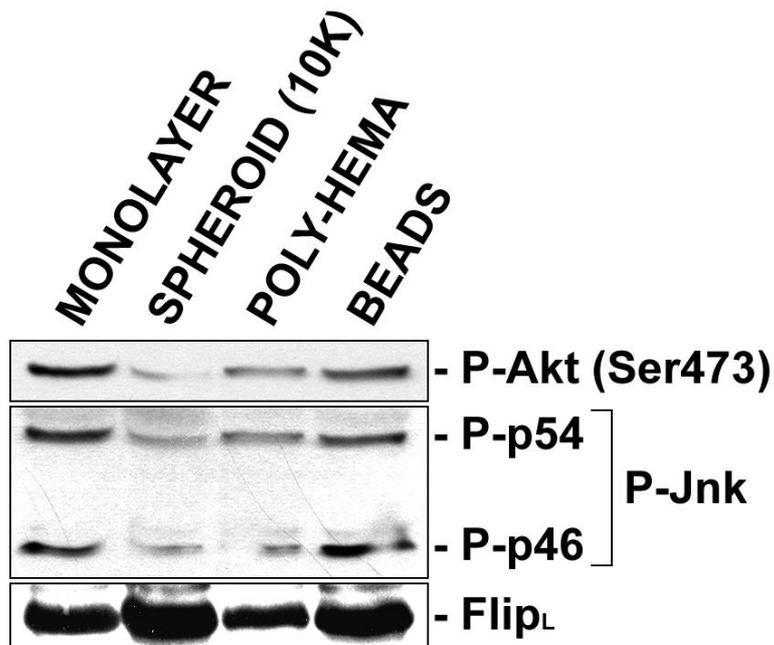
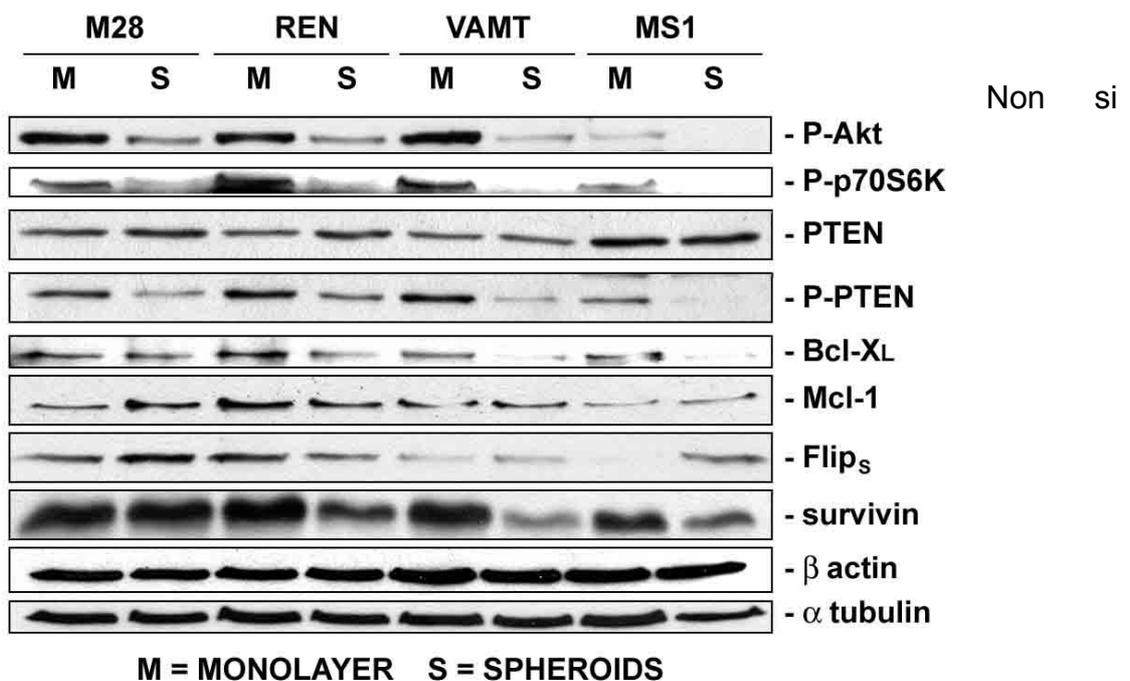


Figura 6: Analisi in western blot della fosforilazione di Akt (Ser473), Jnk ed espressione di FLIP_L, in cellule M28 coltivate su monostrato, come sferoidi, cellule sparse su poly-hema (pozzetti a fondo piatto) e su *microcarrier* sferici per colture cellulari. Gli sferoidi mostrano una ridotta fosforilazione di Akt e Jnk mentre le cellule coltivate su una superficie sferica mostrano un comportamento simile a quello del monostrato cellulare.

Sulla base dei dati di espressione della proteina FLIPL, è stato analizzato in western-blot un pannello di proteine coinvolte nei processi apoptotici (figura 7).



evidenziano grandi differenze nell'espressione di molecole che in letteratura sono

Figura 7: Analisi in western blot della fosforilazione di Akt e p70S6K e di un pannello di proteine coinvolte nei processi apoptotici in monostrati e sferoidi di cellule M28, Ren, VAMT e MS1.

state associate al mesotelioma maligno tranne per Mcl-1 e FlipS in cellule M28. Il dato più interessante è la ridotta fosforilazione di PTEN, lipide fosfatasi che regola la presenza in membrana di fosfatidil-inositolo 3,4,5 trifosfato, molecola chiave nella via di segnale PI3K/Akt. La ridotta fosforilazione spiegherebbe la maggiore attività della fosfatasi e l'attenuamento dell'attività di Akt. Questa linea di ricerca è sicuramente promettente e sarà ampliata in futuro utilizzando siRNA diretti contro Flip e trasfettando le cellule con vettori esprimenti una forma costitutivamente attiva di PDK1, la chinasi residente in membrana responsabile della fosforilazione di Akt in serina 473 e della sua attivazione.

Attualmente sono in corso degli esperimenti di immunoistochimica al fine di localizzare la variazione di fosforilazione delle vie di segnale osservate, poichè i dati di western-blot indicano una loro riduzione globale che tuttavia potrebbe essere una proprietà di tutta la popolazione cellulare oppure solo degli strati più interni. Gli sferoidi saranno quindi inclusi in blocchi di paraffina e saranno analizzate sezioni di circa 5-10 μm .

Dati preliminari ([figura 8](#)) suggeriscono che la fosforilazione di Akt sia uniformemente ridotta negli sferoidi tuttavia sono necessarie ulteriori analisi.

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) è stato scelto come agente pro-apoptotico (Bouralexis et al., 2005) poiché le cellule di mesotelioma utilizzate, rese sensibili mediante l'attivazione di Jnk (Jun N-terminal kinase) con Etoposide, Cicloesimmide o Anisomicina (Vivo et al., 2003) (Broaddus et al., 2005) o co-somministrazione di agenti chemioterapici (Liu et al., 2001), sono in grado di attivare il processo di morte programmata efficientemente in tempi brevi (6 ore). Questo aspetto è decisamente importante ai fini dello studio delle vie di traduzione del segnale e per ridurre le variabili legate ai meccanismi intracellulari innescati dal trattamento.

Inizialmente abbiamo valutato la corretta concentrazione di Trail da utilizzare negli esperimenti ([figura 9](#)).

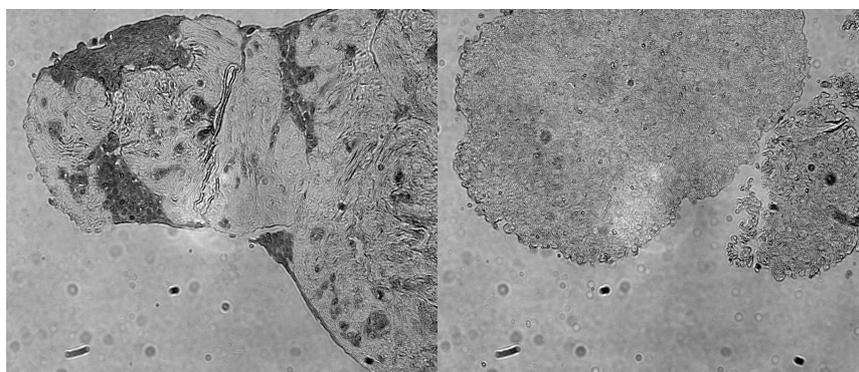


Figura 8: Immunoistochimica anti fosfo-Akt (Ser473) di una sezione di mesotelioma (M15, a sinistra) e di sferoide (Ren, a destra). Si nota come il tumore (controllo positivo), composto da diversi tipi cellulari, abbia una forte componente cellulare con elevata fosforilazione di Akt mentre lo sferoide presenti una ridotta marcatura sulla sua intera superficie.

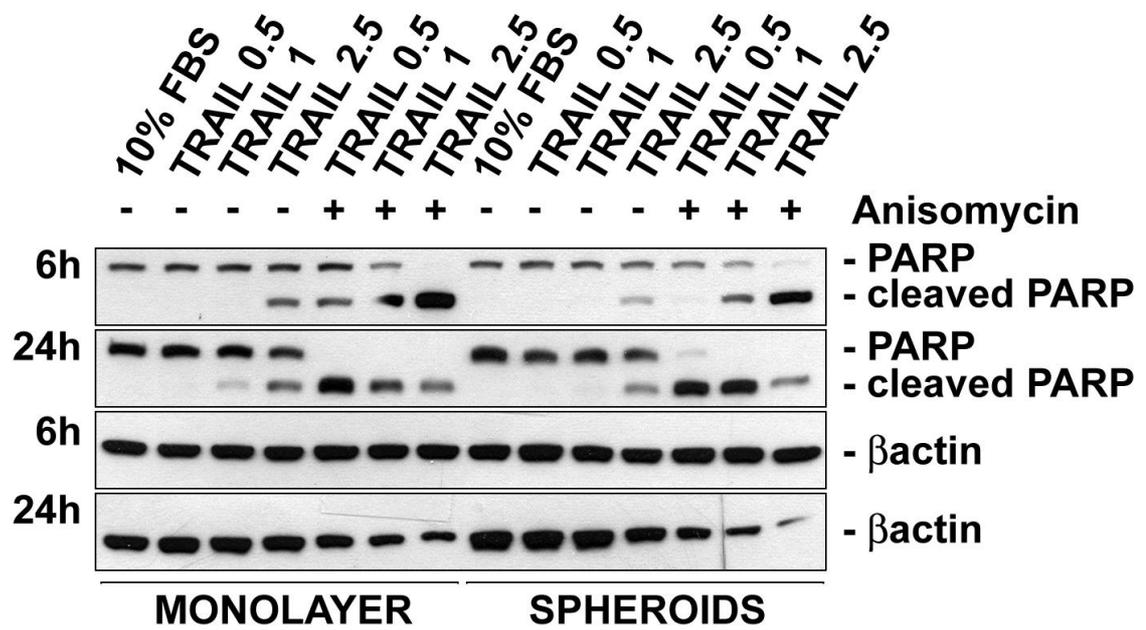


Figura 9: Analisi in western-blot del taglio proteolitico dell'enzima PARP su cellule M28 trattate con differenti concentrazioni di Trail (0.5-2.5 ng/ml) come singolo agente chemioterapico e in associazione con Anisomicina (25 ng/ml).

Abbiamo scelto di utilizzare Trail 0,5 ng/ml poiché in grado di differenziare più chiaramente sferoidi e monostrati nella resistenza al trattamento rispetto alle altre concentrazioni. E' stato inoltre deciso di analizzare il fenomeno apoptotico dopo 6 ore di trattamento poiché l'analisi a 24 ore comporta l'insorgenza di altre variabili difficilmente controllabili sperimentalmente.

Dopo aver fissato la concentrazione di Trail , abbiamo seguito il variare della fosforilazione di Akt, p70S6K e Jnk nell'arco di 6 ore durante il trattamento con Trail e Anisomicina (figura 10).

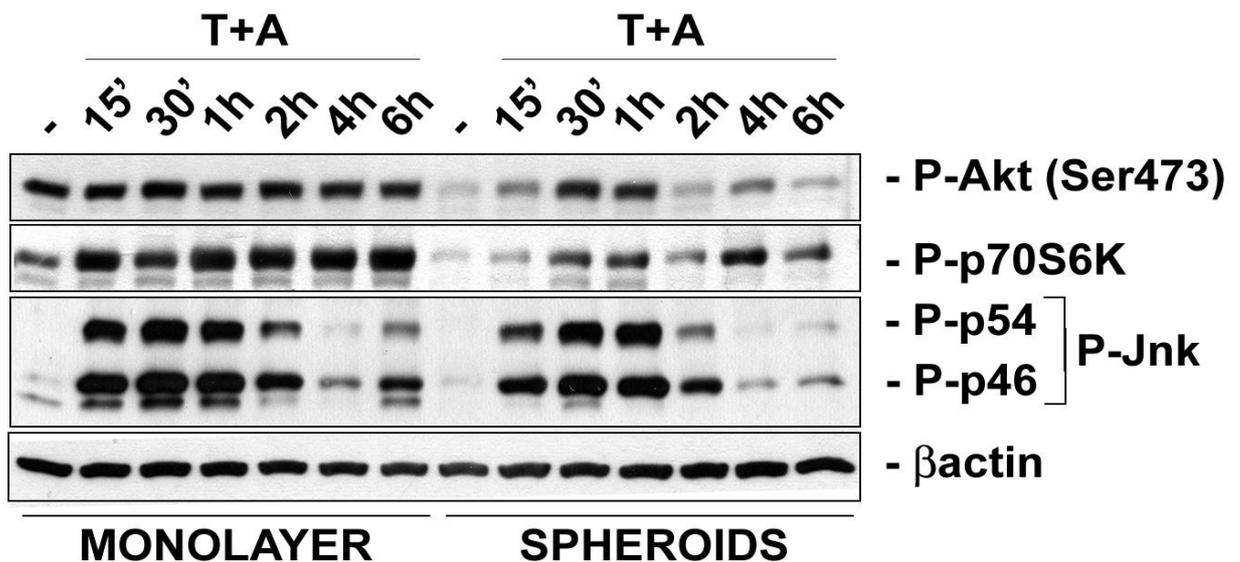


Figura 10: Fosforilazione di Akt (Ser473), p70S6K e Jnk in cellule M28 dopo trattamento con Trail 0,5 ng/ml e Anisomicina 25 ng/ml (T+A) a diversi tempi.

Sostanzialmente, gli sferoidi e i monostrati rispondono al trattamento con una cinetica simile: le cellule mostrano un picco di fosforilazione dopo 30 minuti che

declina nelle due ore successive. Si può notare inoltre come la via Akt/mTOR, ridotta negli sferoidi, possa essere comunque attivata con efficienza; l'analisi densitometrica dell'intensità delle bande mostra come l'incremento di fosforilazione di Akt negli sferoidi sia circa 10 volte superiore a quello osservato nei monostrati (figura 10). Questa differenza è sicuramente dovuta al diverso grado di fosforilazione in condizioni basali tuttavia si può ipotizzare che gli sferoidi siano in grado di sfruttare meglio questa via di segnale intracellulare.

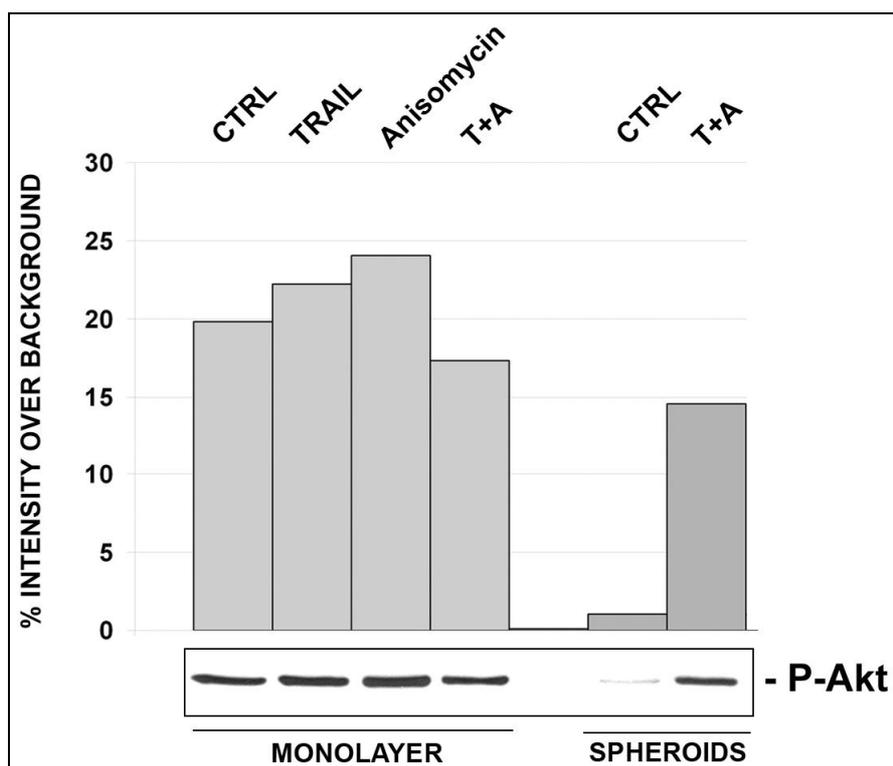
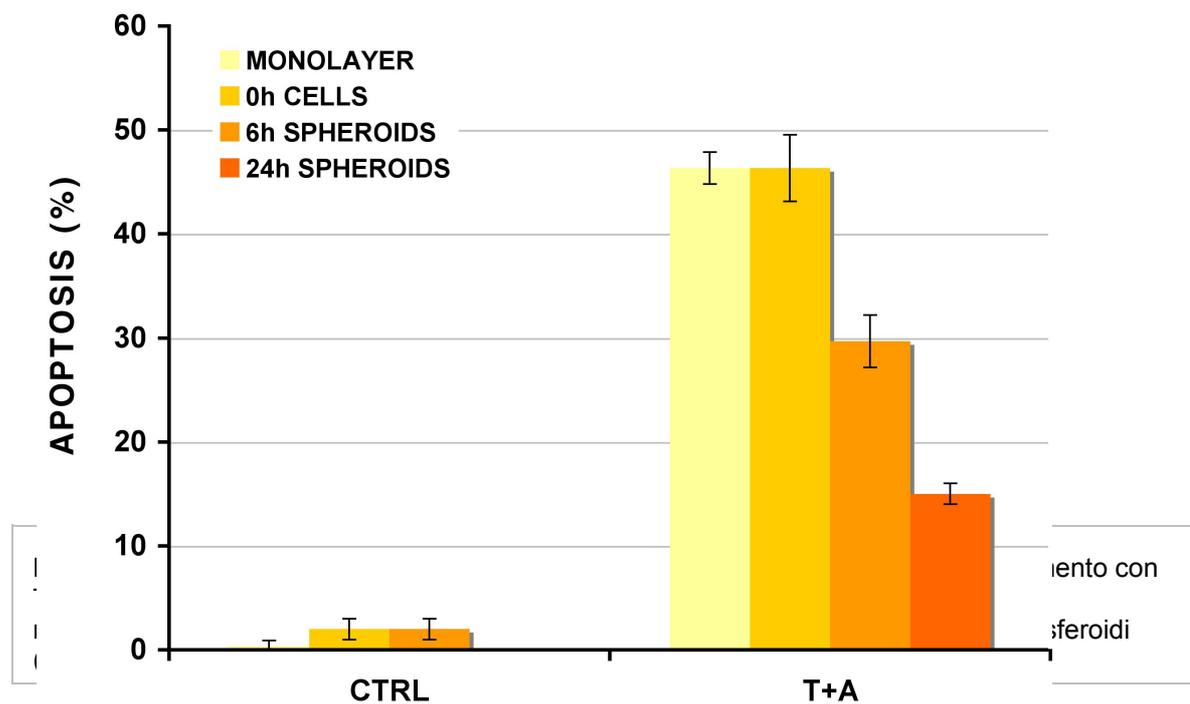


Figura 11: Analisi in western-blot e densitometri relativa alla fosforilazione del residuo di serina 473 della protein chinasi Akt dopo trattamento di un'ora con Trail (0.5 ng/ml), Anisomicina (25 ng/ml) e la loro combinazione in cellule M28 (monostrati e sferoidi).

La resistenza degli sferoidi a Trail e Anisomicina è un fenomeno progressivo che si instaura durante la formazione degli sferoidi (figura 12). Utilizzando cellule M28, abbiamo considerato la resistenza all'apoptosi di un monostrato, cellule appena disaggregate e sferoidi formati a 6 e 24 ore. Mentre il monostrato e le cellule in sospensione non mostrano una variazione della sensibilità al trattamento, le cellule piastrate su poly-hema iniziano a dimostrare resistenza a 6 ore, sebbene le cellule non siano ancora perfettamente integrate in uno sferoide, ma semplicemente a contatto reciproco sul fondo del pozzetto.



Dati precedentemente pubblicati dal laboratorio (Kim et al., 2005) dimostrano che LY294002, inibitore reversibile di PI3K, e rapamicina, inibitore di mTOR, sono in grado di ripristinare la sensibilità alla chemioterapia degli sferoidi tumorali (TFS). mTOR (mammalian target of rapamycin) è una serina-treonina chinasi la cui attività è fondamentale per la regolazione della sintesi proteica ed è stato recentemente dimostrato un suo ruolo diretto nella resistenza a Trail (Panner et al., 2005).

LY294002 e rapamicina sono effettivamente in grado di ridurre anche la resistenza degli sferoidi multicellulari al trattamento pro-apoptotico, riportando i livelli percentuali di apoptosi a quelli dei monostrati trattati in assenza degli inibitori (figure 13-14).

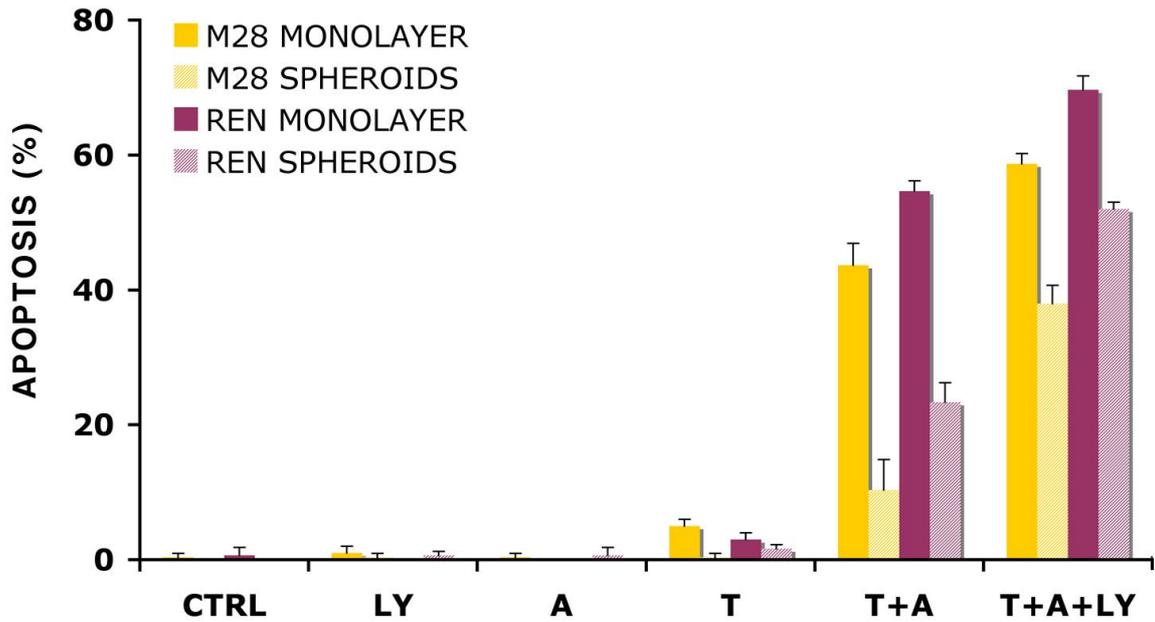


Figura 13: Percentuale di cellule M28 apoptotiche (colorazione Hoechst) dopo trattamento con Anisomicina 25 ng/ml (A), LY294002 5 μ M (LY), Trail 0,5 ng/ml (T) e la loro associazione (T+A e T+A+LY). LY294002 è in grado di sensibilizzare gli sferoidi al processo apoptotico portando il livello di apoptosi a livelli simili al monostrato trattato con Trail ed Anisomicina.

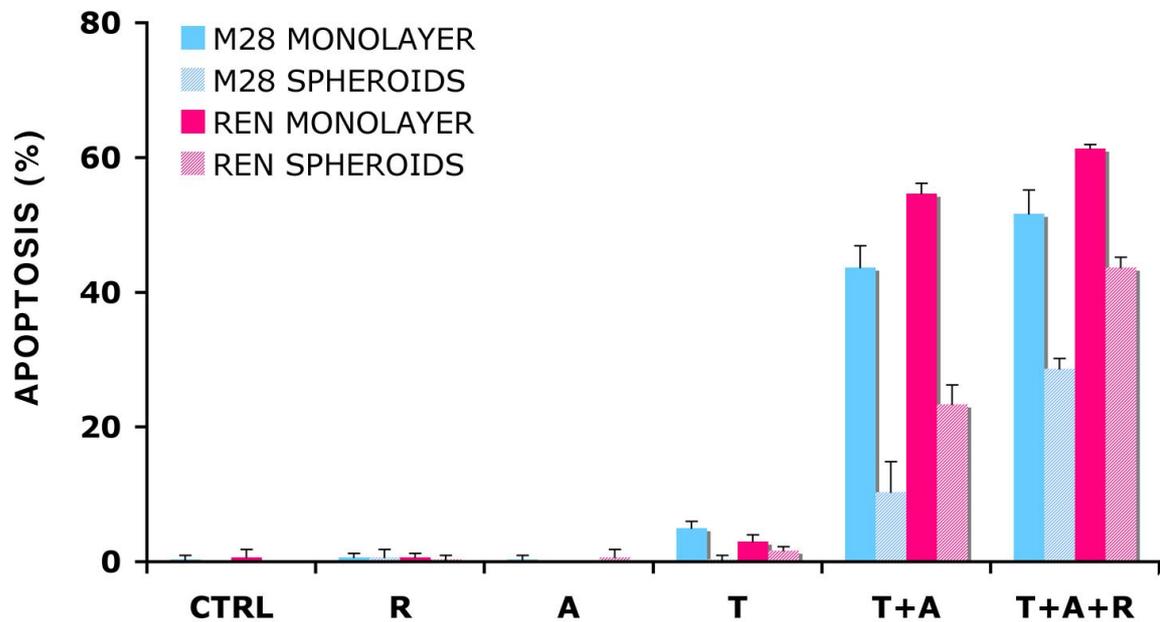


Figura 14: Percentuale di cellule M28 apoptotiche (colorazione Hoechst) dopo trattamento con Anisomicina 25 ng/ml (A), rapamicina 5 ng/ml (R), Trail 0,5 ng/ml (T) e la loro associazione (T+A e T+A+R). Rapamicina è in grado di sensibilizzare gli sferoidi al processo apoptotico portando il livello di apoptosi ad un livello comparabile al monostrato trattato con Trail ed Anisomicina.

LY294002 riduce effettivamente la resistenza degli sferoidi, con un effetto maggiore rispetto a quello esercitato da rapamicina: questo può essere spiegato in base al diverso meccanismo d'azione dei due inibitori e alla diversità nella specificità di inibizione. LY294002 ha sicuramente un potere inibitorio meno specifico rispetto a rapamicina e ultimamente è stato considerato un inibitore poco selettivo della via di PI3K (Knight et al., 2006).

Poiché LY294002 agisce su PI3K e non specificamente su Akt, ed mTOR è regolato da Akt tramite fosforilazione del complesso regolatorio TSC1/TSC2 (Hay, 2005), l'utilizzo di questi inibitori non ci permette di capire quale sia il reale meccanismo con cui la sensibilizzazione degli sferoidi avvenga. mTOR inoltre appartiene alla stessa famiglia di PI3K (PI3Kinase related Kinases - PIKKs) per cui l'utilizzo di inibitori del sito catalitico di PI3K (come Wortmannina ed LY294002) può influire direttamente sull'attività di mTOR.

Un'ulteriore complicazione legata allo studio della trasduzione del segnale è il possibile coinvolgimento di mTOR (complesso mTOR/RICTOR) nella regolazione della fosforilazione del residuo di serina 473 di Akt (Dong and Liu, 2005; Hresko and Mueckler, 2005; Sarbassov et al., 2005), necessario per la stabilizzazione della sua attività chinasi. L'utilizzo di PI-103, un inibitore di recente sintesi in grado di bloccare in modo specifico i due complessi regolatori di mTOR (mTOR-Rictor ed mTOR-Raptor) (Fan et al., 2006), ci permetterà di valutare meglio la reversibilità della resistenza all'apoptosi degli sferoidi.

Parallelamente allo studio della variazione delle vie di traduzione del segnale negli sferoidi abbiamo eseguito un saggio di espressione genica (microarray), in

collaborazione con il Sandler Genomics Core (UCSF) confrontando monostrati e sferoidi di cellule M28.

I risultati sono ora in fase di elaborazione e saranno analizzate altre due linee cellulari (Ren e VAMT) al fine di trovare elementi comuni che caratterizzino la transizione da monostrato a sferoide. L'utilizzo del software Ingenuity (www.ingenuity.com) ha permesso di integrare i risultati ottenuti per le cellule M28, tracciando un profilo abbastanza netto di come la variazione del profilo di espressione genica nella formazione degli sferoidi ne modifichi il loro comportamento.

Il software associa i geni differenzialmente espressi a vie di segnale note in letteratura (utilizzando un database proprietario) e, valutando la validità statistica dei risultati che gli vengono forniti, è virtualmente in grado di predire alterazioni funzionali derivanti dall'alterato profilo di espressione genica.

Le principali funzioni che vengono modificate negli sferoidi sono crescita cellulare e proliferazione, cancerogenesi e resistenza alla morte cellulare.

La maggiorparte dei geni differenzialmente espressi coinvolge vie metaboliche ed è difficile interpretarne singolarmente gli effetti tuttavia il software ci ha fornito dati incoraggianti per quanto riguarda il comportamento degli sferoidi. All'interno del set di geni analizzati (circa 23000) ci sono anche risultati interessanti riguardo alcuni geni chiave come BIRC3 e AQP3 che offrono nuovi spunti di ricerca, tuttavia solo il confronto tra diverse linee cellulari ci potrà mostrare quali geni siano effettivamente ed esclusivamente coinvolti nella transizione 2D-3D.

□ SEMINARI

- Ciclo di seminari/progress-reports/journal club settimanali – Lung Biology Center, UCSF
- Pulmonary retreats – UCSF

□ CONGRESSI

- ASCB, Cell Biology meeting, 10-14 Dicembre 2005, San Francisco, CA

- FASEB, Experimental Biology meeting, 1-5 Aprile 2006, San Francisco, CA

□ 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

- Bates, R. C., Edwards, N. S., and Yates, J. D. (2000). Spheroids and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 36, 61-74.
- Bouralexis, S., Findlay, D. M., and Evdokiou, A. (2005). Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL. *Apoptosis* 10, 35-51.
- Broaddus V.C., Y. L., Scavo L.M., Ernst J.D. & Boylan A.M. (1996). Asbestos induces apoptosis of human and rabbit pleural mesothelial cells via reactive oxygen species. *J Clin Invest* 98, 2050-2059.
- Broaddus, V. C., Dansen, T. B., Abayasiriwardana, K. S., Wilson, S. M., Finch, A. J., Swigart, L. B., Hunt, A. E., and Evan, G. I. (2005). Bid mediates apoptotic synergy between tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and DNA damage. *J Biol Chem* 280, 12486-12493.
- Cacciotti, P., Barbone, D., Porta, C., Altomare, D. A., Testa, J. R., Mutti, L., and Gaudino, G. (2005). SV40-dependent AKT activity drives mesothelial cell transformation after asbestos exposure. *Cancer Res* 65, 5256-5262.
- Carbone, M., Kratzke, R. A., and Testa, J. R. (2002). The pathogenesis of mesothelioma. *Semin Oncol* 29, 2-17.
- Carbone, M., Rizzo, P., Grimley, P. M., Procopio, A., Mew, D. J., Shridhar, V., de Bartolomeis, A., Esposito, V., Giuliano, M. T., Steinberg, S. M., *et al.* (1997). Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nat Med* 3, 908-912.
- Dong, L. Q., and Liu, F. (2005). PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E187-196.
- Fan, Q. W., Knight, Z. A., Goldenberg, D. D., Yu, W., Mostov, K. E., Stokoe, D., Shokat, K. M., and Weiss, W. A. (2006). A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell* 9, 341-349.
- Hamilton, G. (1998). Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Lett* 131, 29-34.
- Hay, N. (2005). The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* 8, 179-183.
- Holtfreter, J. (1944). A study of the mechanism of gastrulation. *J Exp Zool* 95, 171-212.

- Hresko, R. C., and Mueckler, M. (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* *280*, 40406-40416.
- Inch, W. R., McCredie, J. A., and Sutherland, R. M. (1970). Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. *Growth* *34*, 271-282.
- Kim, K. U., Wilson, S. M., Abayasiwardana, K. S., Collins, R., Fjellbirkeland, L., Xu, Z., Jablons, D. M., Nishimura, S. L., and Broaddus, V. C. (2005). A Novel In Vitro Model of Human Mesothelioma for Studying Tumor Biology and Apoptotic Resistance. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Klein, G., Powers, A., and Croce, C. (2002). Association of SV40 with human tumors. *Oncogene* *21*, 1141-1149.
- Knight, Z. A., Gonzalez, B., Feldman, M. E., Zunder, E. R., Goldenberg, D. D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A., Toth, B., *et al.* (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* *125*, 733-747.
- Levresse, V. e. a. (1998). 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* *16*, 1041-1053.
- Liu, W., Bodle, E., Chen, J. Y., Gao, M., Rosen, G. D., and Broaddus, V. C. (2001). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy cooperate to induce apoptosis in mesothelioma cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* *25*, 111-118.
- Liu, W., Ernst, J.D. & Broaddus, V. (2000). Phagocytosis of Crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* *23*, 371-378.
- Lund-Johansen M, B. R., Rucklidge GJ. (1992). Tumor spheroids from monolayer cultures.
- . Spheroid Culture in Cancer Research
- Mansbridge, J. N., Ausserer, W. A., Knapp, M. A., and Sutherland, R. M. (1994). Adaptation of EGF receptor signal transduction to three-dimensional culture conditions: changes in surface receptor expression and protein tyrosine phosphorylation. *J Cell Physiol* *161*, 374-382.
- Moscona, A. (1952). Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Exp Cell Res* *3*, 535-539.
- Moscona, A. (1957a). The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. *Proc Natl Acad Sci USA* *43*, 184-194.
- Moscona, A. (1957b). Formation of lentoids by dissociated retinal cells of the chick embryo. *Science* *125*, 598-599.
- Moscona, A. (1961). Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. *Exp Cell Res* *22*, 455-475.
- Mossman, B. T., Bignon, J., Corn, M., Seaton, A., and Gee, J. B. (1990). Asbestos: scientific developments and implications for public policy. *Science* *247*, 294-301.
- Mossman, B. T., and Churg, A. (1998). Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* *157*, 1666-1680.
- Mossman, B. T., Kamp, D.W. & Weitzman, S.A. (1996). Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers. *Cancer Invest* *14*, 466-480.
- Nicholson, W. J. (1991). Comparative dose-response relationships of asbestos fiber types: magnitudes and uncertainties. *Ann N Y Acad Sci* *643*, 74-84.
- Oloumi, A., MacPhail, S. H., Johnston, P. J., Banath, J. P., and Olive, P. L. (2000). Changes in subcellular distribution of topoisomerase IIalpha correlate with etoposide resistance in multicell spheroids and xenograft tumors. *Cancer Res* *60*, 5747-5753.
- Panner, A., James, C. D., Berger, M. S., and Pieper, R. O. (2005). mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells. *Mol Cell Biol* *25*, 8809-8823.
- Robledo, R., and Mossman, B. (1999). Cellular and molecular mechanisms of asbestos-induced fibrosis. *J Cell Physiol* *180*, 158-166.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* *307*, 1098-1101.

- Sutherland, R. M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240, 177-184.
- Sutherland, R. M., Inch, W. R., and McCredie, J. A. (1971a). Phytohemagglutinin (PHA)-induced transformation of lymphocytes from patients with cancer. *Cancer* 27, 574-578.
- Sutherland, R. M., Inch, W. R., McCredie, J. A., and Kruuv, J. (1970). A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 18, 491-495.
- Sutherland, R. M., McCredie, J. A., and Inch, W. R. (1971b). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 46, 113-120.
- Vivo, C., Liu, W., and Broaddus, V. C. (2003). 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* 278, 25461-25467.
- Wang, N. S. e. a. (1987). 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* 126, 343-349.
- Xu, L. e. a. (1999). Asbestos induction of extended lifespan in normal human mesothelial cells: interindividual susceptibility and SV40 T antigen. *Carcinogenesis* 20.
- Yang, H., Bocchetta, M., Kroczyńska, B., Elmishad, A. G., Chen, Y., Liu, Z., Bubici, C., Mossman, B. T., Pass, H. I., Testa, J. R., *et al.* (2006). TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10397-10402.
- Yuhás, J. M., Li, A. P., Martínez, A. O., and Ladman, A. J. (1977). A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 37, 3639-3643.
- Zhang, L., and Fang, B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12, 228-237.