

Dottorando: Dario Barbone

Tutore: Prof G. Gaudino

Relazione del secondo anno

NUOVI BERSAGLI MOLECOLARI PER LA TERAPIA DEL MESOTELIOMA MALIGNO DA ASBESTO

□ INTRODUZIONE

Il Mesotelioma Maligno (MM), 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, dimostra resistenza alla radio e chemioterapia e molto spesso la sua rimozione chirurgica risulta poco agevole [3]. Il MM 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 promuovere 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 linee cellulari di Mesotelioma Maligno (MMc) sono inoltre più resistenti agli agenti apoptogeni, se comparate alle linee 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 della PI3chinasi/Akt: sulla base di questo assunto, 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 [16].

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, recettori per quest’ultime e molecole implicate nell’adesione cellulare [17, 18]. Recentemente è stato collegato a meccanismi di proliferazione cellulare e oncogenesi, per quanto un suo ruolo nelle neoplasie appaia ancora molto complesso poiché coinvolto nel controllo dell’apoptosi, della progressione del ciclo cellulare e possibilmente nella differenziazione, migrazione cellulare e nell’angiogenesi.

NF- κ B può essere indotto da Akt/PKB [19] e nelle linee di mesotelioma sono rilevabili livelli basali della sua attivazione, non strettamente correlati alla presenza di SV40 nel genoma e all’espressione di Tag, inoltre le linee mesoteliali non presentano questa attività costitutiva. Al fine di chiarire il possibile coinvolgimento di questa molecola nel processo neoplastico saranno condotti alcuni esperimenti sulle cellule a nostra disposizione. Sono state utilizzate cellule primarie mesoteliali provenienti da essudati pleurici prelevati da pazienti sani ed affetti da mesotelioma. Le cellule di queste linee sono state caratterizzate per presenza di SV40 nel genoma ed espressione di PDGFR- β (tabella 1).

	PDGFR- β	SV40
HMC	-	-
MMB	+	-
MMCa	-	+
MMP	+	+

Tabella 1: Espressione di PDGFR β e presenza di SV40 nelle cellule a nostra disposizione

Molti fattori di crescita sono coinvolti nello sviluppo e nella progressione del MM 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) [20], platelet derived growth factor (PDGF) [21, 22] e transforming growth factor-beta (TGF-B). E' stato dimostrato un aumento dell'espressione di PDGF- β receptor (PDGFR- β) nelle linee di MM ma non nelle linee mesoteliali normali ed è stato verificato come il blocco di questo recettore comporti una significativa riduzione del tasso di crescita dei mesoteliomi [22, 23].

Un farmaco di attuale interesse è l'imatinib mesilato o STI571 (Gleevec®) [24, 25] che, oltre ad essere un inibitore selettivo per le tirosina chinasi abl e bcr-abl (proteina di fusione coinvolta nella leucemia mieloide cronica), è risultato attivo anche su PDGFR- β [26], 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) [27].

Nel corso del primo anno di dottorato l'obiettivo è stato quello di valutare l'attività di questo farmaco nella riduzione della crescita delle linee di MM 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 MM.

Taurolidina (Tn), prodotta durante gli anni '70 dalla Geistlich Pharma [28, 29], è una molecola derivata dall'acido taurinico avente attività anti-microbica e sfruttata in chirurgia per la disinfezione del cavo addominale e al fine di ridurre fenomeni di adesione batterica [30-32].

Diversi studi in vitro hanno dimostrato che la molecola di TN è in grado di inibire la crescita di alcune forme neoplastiche [33-36] e di indurre apoptosi [36, 37].

Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare la capacità della molecola di Taurolidina di inibire la crescita neoplastica cellulare, nel caso particolare delle cellule di Mesotelioma Maligno Pleurico (MMc), altamente resistenti alla chemioterapia classica.

□ RISULTATI

INIBITORI PI3-chinasi

Le PI3-chinasi sono espresse in modo ubiquitario e giocano un ruolo molto importante in alcune neoplasie umane e, 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 [38].

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 [39].

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 6 molecole (CCC001-6) 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* [40] e poi caratterizzata per la sua inibizione di PI3-chinasi [41-43], 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 [44, 45]. 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 era 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, sono nate diverse molecole (tabella 2), che non hanno dimostrato tuttavia di possedere attività inibitoria sulla fosforilazione di Akt (fatta eccezione per QUIN 5 alla concentrazione di 20µM, che tuttavia perde attività alla concentrazione di 5-10µM) (figura 1).

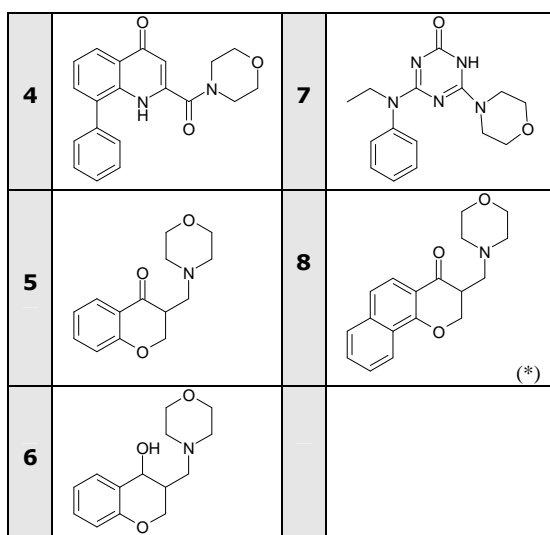


Tabella 2: Strutture dei farmaci (QUIN) sintetizzati durante il secondo anno di Dottorato. (*) La presenza di impurezze, difficilmente eliminabili poiché residui di reazione, ha impedito di ottenere un prodotto con il richiesto grado di purezza e di consentire una corretta assegnazione di struttura allo spettro NMR.

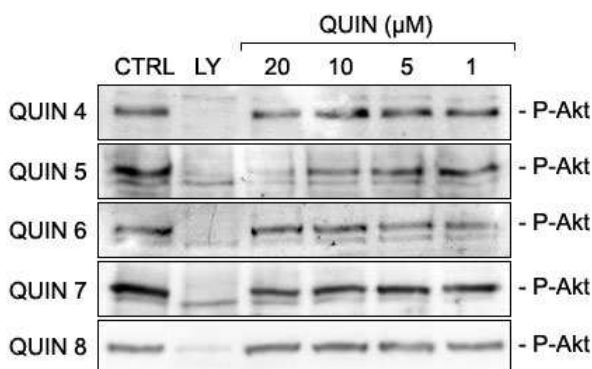


Figura 1: Inibizione di P-Akt in cellule di MM dopo trattamento con inibitori di PI3chinasi neo-sintetizzati. Le molecole sono state diluite in DMSO e aggiunte al medium di coltura per 30' a 37°C, il controllo positivo corrisponde a LY 10µM.

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 [46]. 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 [47-50] 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.

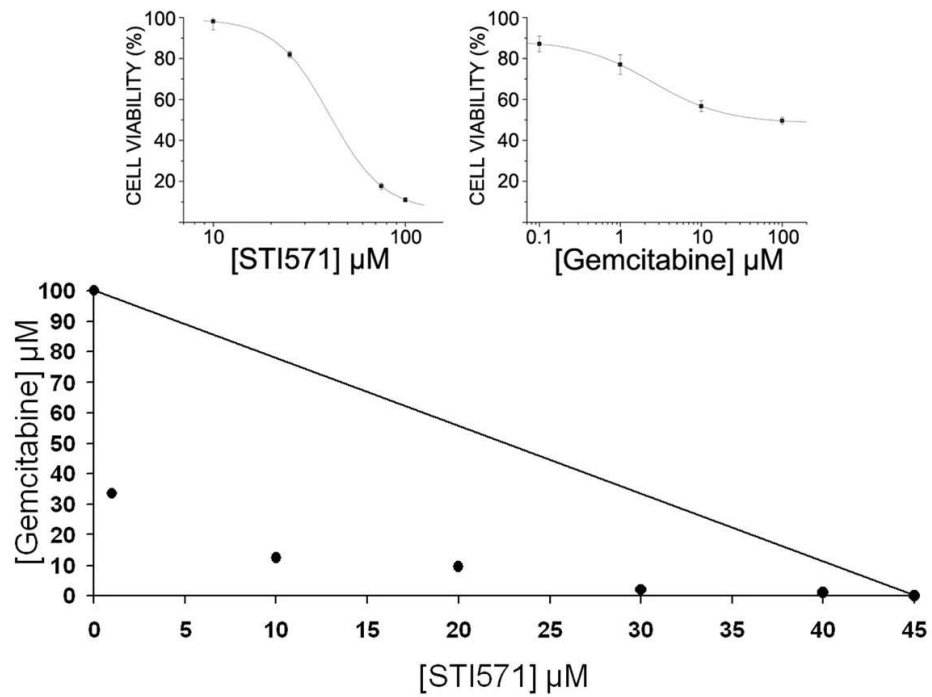


Figura 2: Curve di tossicità di STI571 e Gemcitabina relative a cellule MMP (in alto). Isobologramma relativo alla combinazione Gemcitabina/STI571 (in basso).

L'associazione Gemcitabina/STI571 si è rivelata sinergica anche con il metodo dell'isobologramma ([figura 2](#)).

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 [51, 52]. Le sue proprietà sono probabilmente mediate da metaboliti attivi come gruppi idrossimetilici, dalla molecola di Taurultam e dall'amminoacido essenziale taurina [53-56], che vengono generati per via idrolitica (figura 3).

Taurolidina possiede attività anti-adesiva ed è in grado di contrastare l'effetto delle endotossine [52, 57-59]. 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 [60, 61]. 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 [62]. Il meccanismo d'azione non è ancora ben chiaro, tuttavia esistono evidenze del fatto che la molecola di Taurolidina eserciti un effetto pro-apoptotico [37, 63]. Inizialmente sono stati eseguiti dei saggi di citotossicità che hanno permesso di valutare la capacità citotossicità del farmaco sulle cellule a nostra disposizione (figura 4-5).

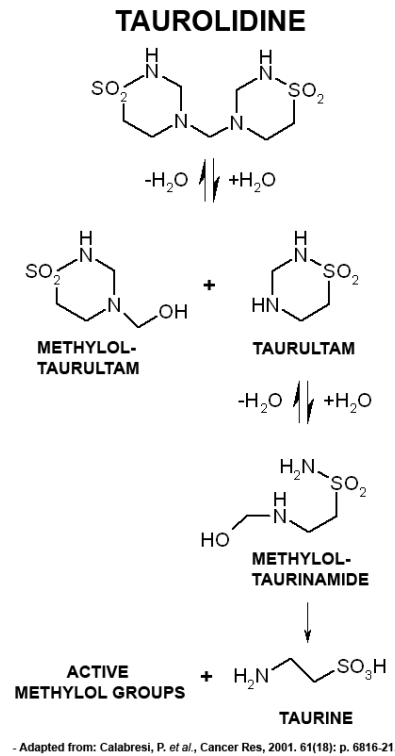


Figura 3: Schema delle reazioni idrolitiche che portano alla formazione di gruppi idrossimetilici attivi e taurina a partire dalla molecola di Taurolidina.

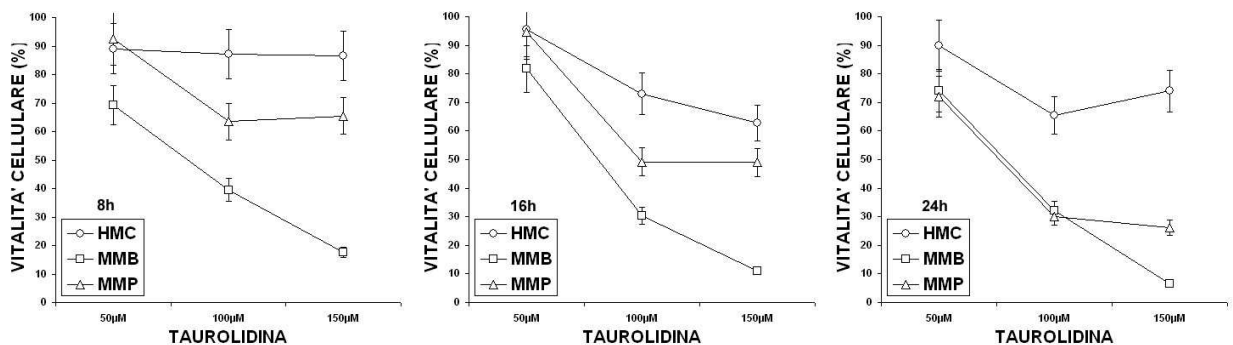


Figura 4: Cinetica della citotossicità indotta dal trattamento con Taurolidina a diverse concentrazioni (50, 100 e 150 µM) in cellule mesoteliali (HMC) MMB ed MMP.

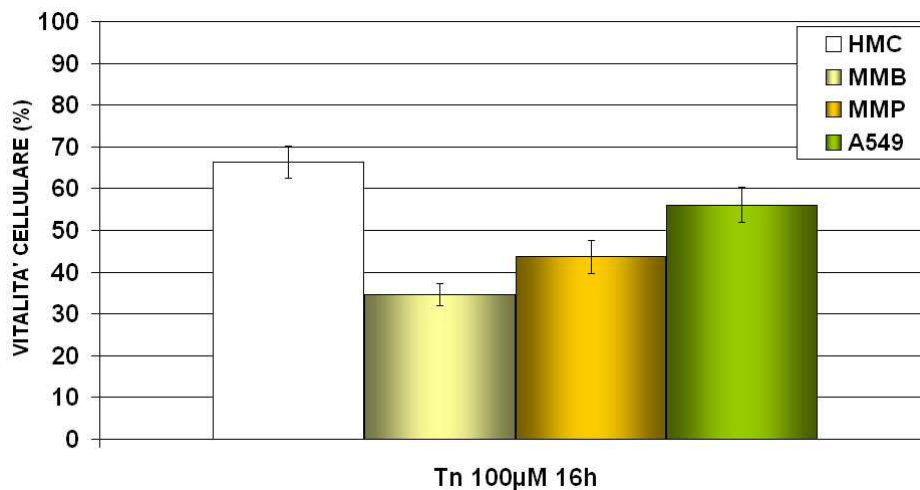


Figura 5: Quadro riassuntivo della riduzione di vitalità cellulare dopo trattamento con Tn 100 μ M per 16h in cellule mesoteliali, di MM e in una linea tumorale polmonare non mesoteliale.

I dati ottenuti hanno evidenziato una differente risposta delle cellule al trattamento con Taurolidina e soprattutto come le cellule mesoteliali subiscano meno l'effetto citotossico rispetto alla controparte tumorale (anche in cellule A549, di origine epiteliale). Sulla base di questi dati abbiamo valutato alcuni marcatori del processo apoptotico: (1) alterazioni del ciclo cellulare mediante citofluorimetria, (2) il taglio proteolitico di alcuni substrati, quali caspasi 8 e PARP, mediante immunoblotting (3) frammentazione della cromatina mediante colorazione Hoechst .

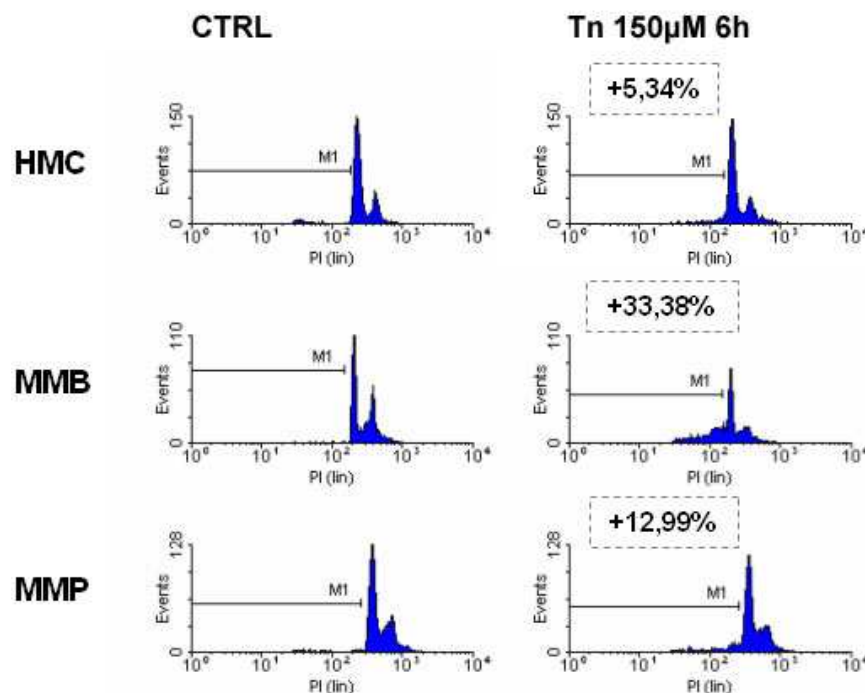


Figura 6: Analisi al citofluorimetro del ciclo cellulare di cellule mesoteliali e di MM dopo trattamento con Tn 150 μ M per 6h. Le percentuali mostrano l'aumento della popolazione ipoploide sub-G1.

L'analisi del ciclo cellulare ([figura 6](#)) 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.

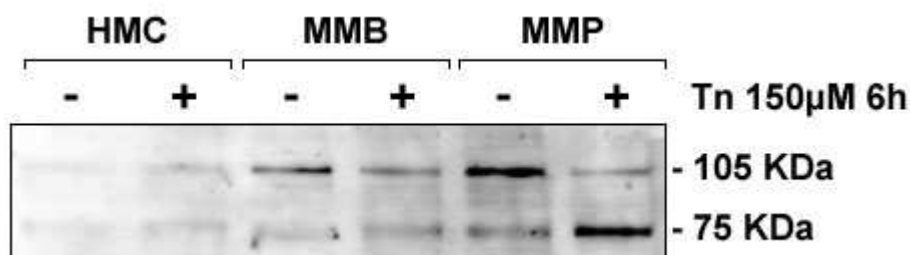


Figura 7: Taglio dell'enzima PARP in cellule mesoteliali e di MM dopo stimolazione con Tn 150µM per 6h.

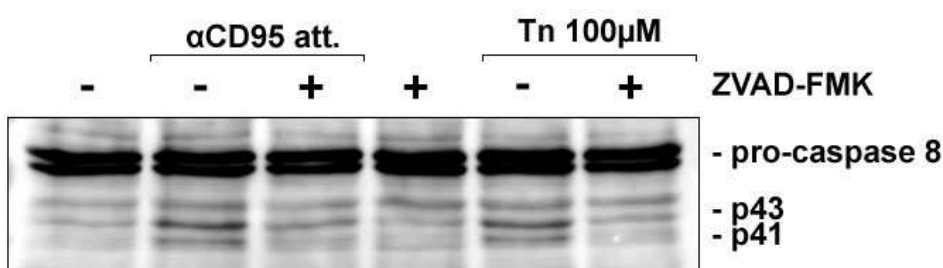


Figura 8: Taglio di pro-caspasi 8 in cellule MMB dopo trattamento con Tn 100µM per 16h e in presenza di un inibitore dell'attività pan-caspasica (ZVAD-FMK 100µM). Come controllo positivo è stato utilizzato un anticorpo attivante CD95 alla concentrazione di 200ng/ml.

I dati di westernblotting ([figura 7-8](#)) mostrano come Taurolidina induca un netto taglio di PARP nelle cellule di MM e di caspasi 8 in cellule MMB. Sono ora in corso ulteriori esperimenti per valutare il taglio proteolitico di caspasi 3 e Bid al fine di convalidare il significato funzionale del taglio di caspasi 8.

Infine, la colorazione Hoechst di cellule di MM ([figura 9](#)) mostra chiaramente la frammentazione del DNA indotta dal trattamento con Tn.

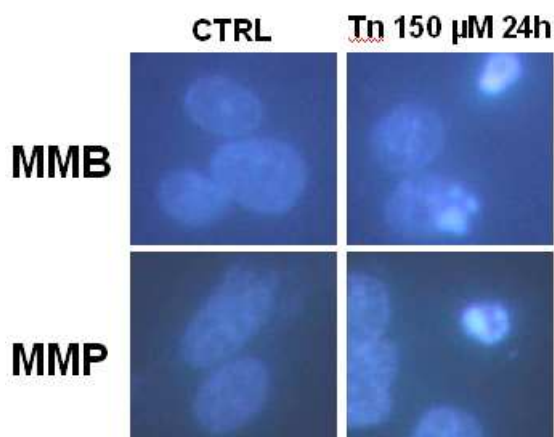


Figura 9: Colorazione Hoechst (8µg/ml) su cellule di MM dopo trattamento con Tn 150µM

Tn è in grado di innescare il processo apoptotico facilitando la via estrinseca mediata da Fas-ligando [63] e con un meccanismo citocromo C dipendente [37] 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 cloramina (Tau-Cl), un intermedio più stabile e meno tossico [64, 65]. 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) [66-68]. 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 [69].

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 MM e successivi esperimenti hanno confermato questa ipotesi.

Sono stati quindi condotti dei saggi EMSA al fine di verificare il comportamento di NF- κ B in cellule di MM in seguito a trattamento con TN (figure 10-11).

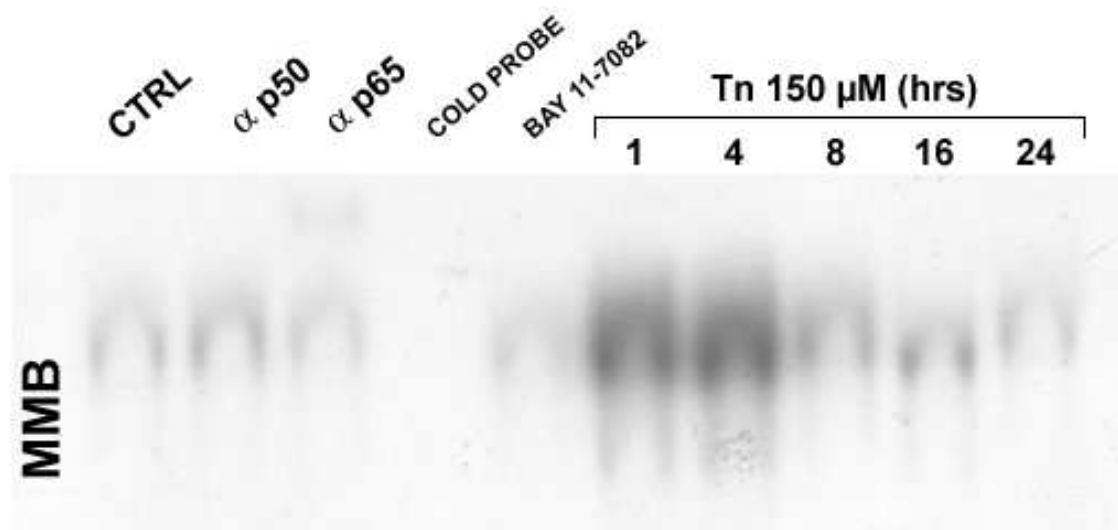


Figura 10: Saggio EMSA su cellule MMB. 5 μ g degli estratti nucleari sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 6% e separati per 4 ore a 150V. Gli anticorpi diretti verso p50 e p65 sono stati utilizzati alla concentrazione di 10 μ g/ml. Bay11-7082 è stato utilizzato alla concentrazione di 10 μ M per 30 minuti.

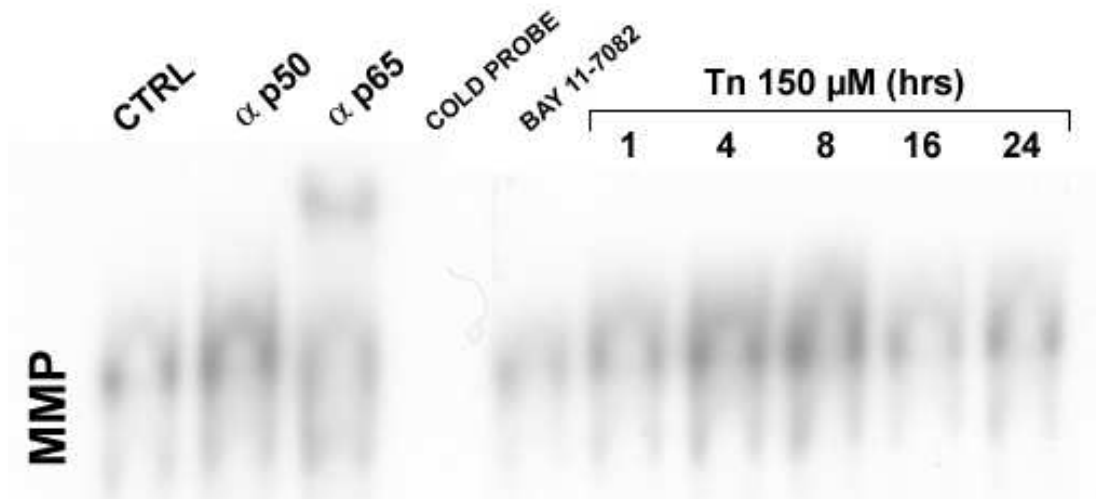


Figura 11: Saggio EMSA su cellule MMP. 5 μg degli estratti nucleari sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 6% e separati per 4 ore a 150V. Gli anticorpi diretti verso p50 e p65 sono stati utilizzati alla concentrazione di 10 μg/ml. Bay11-7082 è stato utilizzato alla concentrazione di 10 μM per 30 minuti.

I saggi di elettro mobility shift mostrano chiaramente come l'attività di NF-κB nelle cellule di MM 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-κB 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-κB e le diverse cinetiche di attivazione possono essere attribuite ai diversi tempi di risposta delle due linee di MM al farmaco.

Per esaminare se anche nelle linee di MM Taurolidina sia in grado di aumentare la risposta apoptotica al trattamento con Fas ligando [63] abbiamo eseguito analisi al citofluorimetro utilizzando una doppia marcatura, propidio ioduro/annessina V (figure12-13-14).

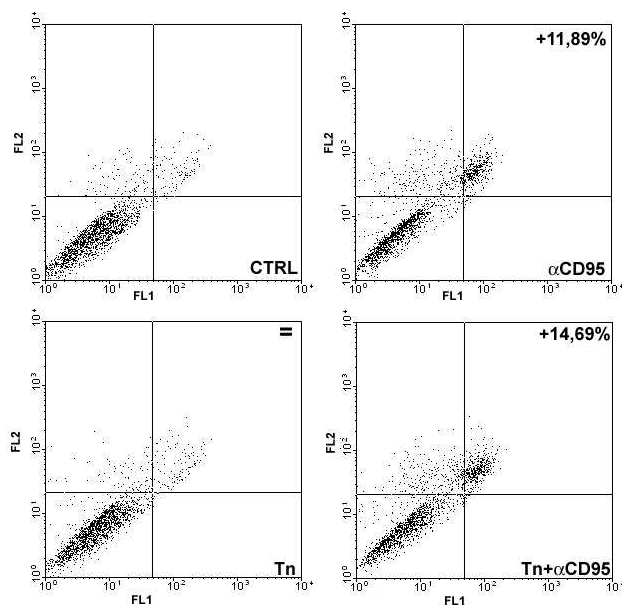


Figura 12: Analisi al citofluorimetro (Propidio ioduro / Annessina V) di cellule HMC trattate con Tn 100 μM, anticorpo CD95 attivante 100 ng/ml e la loro associazione per 16h. Le percentuali si riferiscono all'aumento della popolazione del quadrante considerato rispetto al controllo.

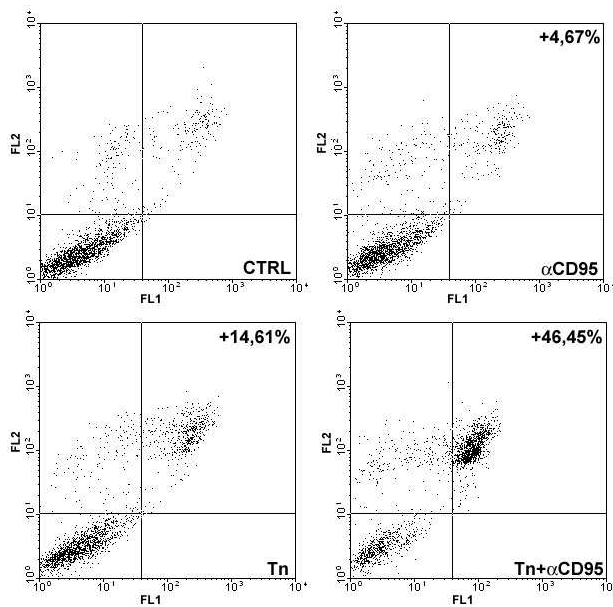


Figura 13: Analisi al citofluorimetro (Propidio ioduro / Annessina V) di cellule MMB trattate con Tn 100 μ M, anticorpo CD95 attivante 100 ng/ml e la loro associazione per 16h. Le percentuali si riferiscono all'aumento della popolazione del quadrante considerato rispetto al controllo.

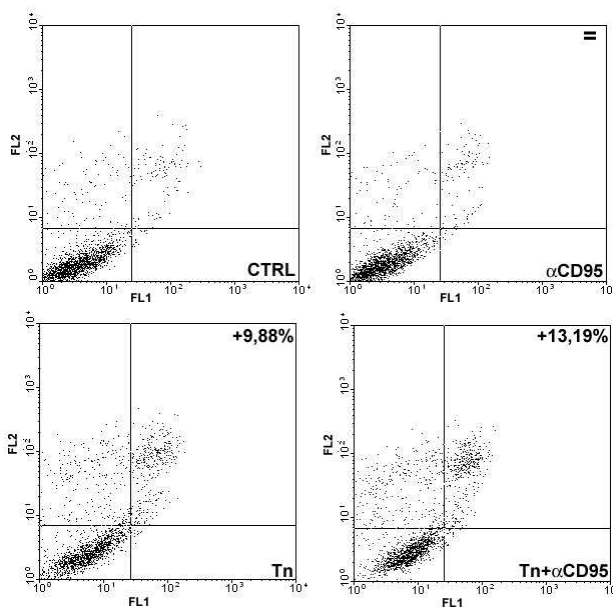


Figura 14: Analisi al citofluorimetro (Propidio ioduro / Annessina V) di cellule MMP trattate con Tn 100 μ M, anticorpo CD95 attivante 100 ng/ml e la loro associazione per 16h. Le percentuali si riferiscono all'aumento della popolazione del quadrante considerato rispetto al controllo.

I dati ottenuti in citofluorimetria sono confrontabili con i dati di citotossicità, e confermano l'effetto pro-apoptotico di taurolidina in cellule di MM, ma non in cellule mesoteliali. 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.

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^{-/-}) [70], 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 [71-73].

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 [74] 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 [75-77] 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 [78].

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

Le cellule MMB ed MMP dimostrano una attivazione costitutiva di NF-κB mentre le cellule di origine mesoteliale presentano un debole segnale, che non viene modificato dalla stimolazione con rhHGF (figura 15).

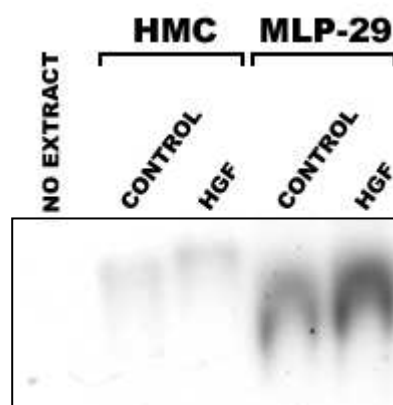


Figura 15: Saggio EMSA su cellule mesoteliali e MLP-29 (cellule epiteliali epatiche) stimulate con rhHGF (50ng/ml) per 30'. Come controllo sono state utilizzate cellule MLP-29 in cui HGF induce un aumento del legame di NF-κB al DNA. [2]

Il trattamento con BAY 11-7082 (inibitore della fosforilazione di I κ B α) è in grado di ridurre l'intensità del legame del fattore di trascrizione al DNA, mentre Wortmannina non altera il suo stato di attivazione (figura 16). NF- κ B quindi, nei nostri modelli di MM, non dipende dalla via di trasduzione di PI3K/Akt.

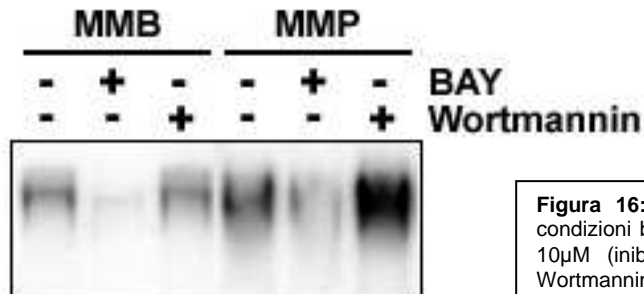


Figura 16: Saggio EMSA su cellule di MM in condizioni basali e dopo trattamento BAY 11-7082 10 μ M (inibitore della fosforilazione di I κ B α) e Wortmannina 100 nM (inibitore della via di PI3K).

A conferma della funzione anti-apoptotica di NF- κ B, saggi di citotossicità eseguiti su cellule mesoteliali e di MM (figura 17) 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.

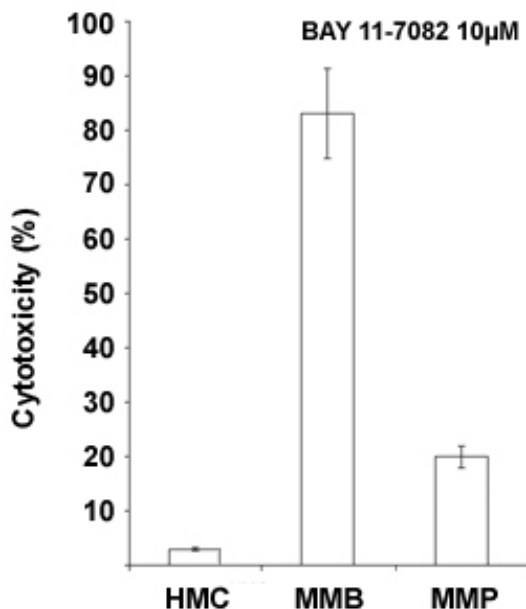


Figura 17: Saggio MMT su cellule mesoteliali e di MM dopo trattamento con BAY 11-7082 10 μ M per 48h.

□ SEMINARI FREQUENTATI:

- Prof. Martin Ronis del (Dept of Pharmacology and Toxicology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, USA) Ethanol metabolism and Toxicity in Pregnancy
- Prof. Armando Bartolazzi (Dipartimento di Patologia, Facoltà di Medicina, Ospedale St.Andrea, Università La Sapienza – Roma) From the bench to the bedside: Galectin-3 immunodetection for improving the preoperative diagnosis of the follicular thyroid lesions
- Manlio Ferrarini (IST e Università di Genova) Meccanismi patogenetici della Leucemia Linfatica Cronica
- Dott. David Murphy (Dipartimento di Neuroscienze e Neuroendocrinologia, Università di Bristol) Functional genomics of hypothalamic homeostatic plasticity
- Dott. David Murphy (Dipartimento di Neuroscienze e Neuroendocrinologia, Università di Bristol) Biomedical discovery using microarrays: principles, prospects and problems
- Prof. Christopher Day (Centre for Liver Research, Medical School, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK) Pitfalls of genetic studies in liver disease.
- Dott. Antonio Puccetti (Università di Genova) Virus e malattie autoimmuni
- Prof. Angiolo Benedetti (Dipartimento di Fisiopatologia e Medicina Sperimentale dell'Università di Siena) Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico
- Dott. Alberto Martini (Istituto Scientifico Gaslini e Università di Genova) Le artriti croniche del bambino
- Dott. Frédéric Rieux-Laucat (INSERM 429, Hôpital Necker, Paris) Genetic bases of the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) subtypes
- Dott. Marco Brambilla (Università del Piemonte Orientale, Novara) Norme operative di protezione e sicurezza per i laboratori di ricerca
- Dott.ssa S. Ceffa (Comunità di Sant'Egidio, Novara) Progetto DREAM (Drug Resource Enhancement Against AIDS in Mozambico)
- Dott.ssa Antonia Follenzi (Albert Einstein College of Medicine, Liver Research Center 1300 Morris Park Avenue, Bronx, NY 10461 – USA) Espressione epato-specifica del fattore IX antiemofilico mediante l'uso di vettori lentivirali
- Prof. Guido Valesini (Cattedra di Reumatologia, Università la Sapienza di Roma) TNF, anti-TNF ed autoimmunità
- Dott.ssa Bice Chini (CNR Istituto di Neuroscienze, Sezione di Farmacologia cellulare e molecolare, Milano) Lipid rafts e recettore per l' ossitocina: modulazione del signalling e del controllo della proliferazione cellulare

- Dott.ssa Maria Gabriella Scordo (Department of Medical Sciences Clinical Pharmacology University of Uppsala, Svezia) Citocromo P450: polimorfismi genetici e risposta clinica ai farmaci
- Dr.ssa Rita Clementi (Università di Pavia) Alterazioni del gene della perforina nelle patologie linfoproliferative
- Prof. Magnus Ingelman-Sundberg (Division of Molecular Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) Pharmacogenetics: a tool for a more efficient and safe drug therapy

☐ PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

- 7° CONVEGNO I.M.I.G. Brescia 24-26 Giugno 2004 (*Poster presentation*)
Barbone D., Cacciotti P., Locatelli A., Boccafoschi F., Porta C., Mazzini G., Manzo L., Mutti L., Gaudino G. "Taurolidine: a new drug for the local treatment of mesothelioma"

☐ PUBBLICAZIONI

- Cacciotti P., Barbone D., Porta C., Sartore-Bianchi A., Tognon M., Altomare D.A., Testa J.R., Gaudino G. and Mutti L. "Akt and NF- κ B co-operate with asbestos in mesothelial transformation: a rationale for novel and selective targets for mesothelioma therapy." (*submitted*)

☐ 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. Stein, R.C., *Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(3): p. 237-48.
17. 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.
18. 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.
19. Kane, L.P., et al., *Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase*. Curr Biol, 1999. **9**(11): p. 601-4.

20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Manley, P.W., et al., *Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor*. Eur J Cancer, 2002. **38 Suppl 5**: p. S19-27.
25. Buchdunger, E., T. O'Reilly, and J. Wood, *Pharmacology of imatinib (STI571)*. Eur J Cancer, 2002. **38 Suppl 5**: p. S28-36.
26. 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.
27. 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.
28. Browne, M.K., G.B. Leslie, and R.W. Pfirrmann, *Taurolin, a new chemotherapeutic agent*. J Appl Bacteriol, 1976. **41**(3): p. 363-8.
29. Knight, B.I., et al., *NMR studies and GC analysis of the antibacterial agent taurolidine*. J Pharm Sci, 1983. **72**(6): p. 705-7.
30. 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.
31. 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.
32. 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.

33. 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.
34. McCourt, M., et al., *Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo*. Ann Surg Oncol, 2000. **7**(9): p. 685-91.
35. Stendel, R., et al., *The effect of taurolidine on brain tumor cells*. Anticancer Res, 2002. **22**(2A): p. 809-14.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Brian, P.W., et al., *Wortmannin, an antibiotic produced by Penicillium wortmanni*. Trans. Br. Mycol., 1957. **40**: p. 365-368.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.

46. 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.
47. Tallarida, R.J., *Drug synergism: its detection and applications*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(3): p. 865-72.
48. Loewe, S., *The problem of synergism and antagonism of combined drugs*. Arzneimittelforschung, 1953. **3**(6): p. 285-90.
49. Loewe, S., *Antagonisms and antagonists*. Pharmacol Rev, 1957. **9**(2): p. 237-42.
50. 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.
51. 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.
52. Browne, M.K., *The treatment of peritonitis by an antiseptic - taurolin*. Pharmatherapeutica, 1981. **2**(8): p. 517-22.
53. 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.
54. Watson, R.W., et al., *Taurolidine, an antilipopolsaccharide agent, has immunoregulatory properties that are mediated by the amino acid taurine*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(3): p. 299-306.
55. Myers, E., et al., *The relationship between structure and activity of taurolin*. J Appl Bacteriol, 1980. **48**(1): p. 89-96.
56. 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.
57. 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.
58. 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.

59. 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.
60. Shrayar, D.P., et al., *The effect of Taurolidine on adherent and floating subpopulations of melanoma cells*. Anticancer Drugs, 2003. **14**(4): p. 295-303.
61. 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.
62. Braumann, C., et al., *The tumor-suppressive reagent taurolidine is an inhibitor of protein biosynthesis*. Int J Cancer, 2004. **112**(2): p. 225-30.
63. Stendel, R., et al., *Enhancement of Fas-ligand-mediated programmed cell death by taurolidine*. Anticancer Res, 2003. **23**(3B): p. 2309-14.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. Schuller-Levis, G.B. and E. Park, *Taurine: new implications for an old amino acid*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **226**(2): p. 195-202.
69. 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.
70. 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.

71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. Mossman, B.T., et al., *Cell Signaling Pathways Elicited by Asbestos*. Environ Health Perspect, 1997. **105S**(Suppl 5): p. 1121-5.
78. Gordon, G.J., et al., *Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma*. Carcinogenesis, 2002. **23**(6): p. 1017-24.