

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche e Chirurgiche Cliniche

Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche Umane e Molecolari

Settore Disciplinare BIO/16

Dipartimento di Scienze Anatomiche Umane
e Fisiopatologia dell'Apparato Locomotore

TERAPIA MIRATA DELL'ASSE DI PI3K/AKT/MTOR COME POSSIBILE NUOVA STRATEGIA TERAPEUTICA NEL TRATTAMENTO DELLE LEUCEMIE LINFOBLASTICHE ACUTE T

Tesi di Dottorato

Tutore:

CHIAR.MO PROF. ALBERTO M. MARTELLI

Presentata da:

DOTT.SSA FRANCESCA CHIARINI

Coordinatore:

CHIAR.MO PROF. LUCIO COCCO

XXII Ciclo

Anno Accademico 2008/2009

INDICE

Introduzione

1.1.	Terapia Mirata nel Cancro	1
1.1.1.	Alterazioni nella Trasduzione del Segnale nelle Leucemie Linfoblastiche Acute	1
1.1.2.	L'asse di Sopravvivenza della PI3K/Akt/mTOR nelle Leucemie Linfoblastiche Acute	2
1.2.	La Famiglia delle Fosfoinositide-3-Chinasi (PI3K)	4
1.2.1.	PI3K di Classe I	4
1.2.2.	La Serina/Treonina Chinasi Akt	6
1.2.3.	La Regolazione Negativa della via di Segnalazione PI3K/Akt/mTOR	7
1.2.4.	Bersagli Anti-Apoptotici della via PI3K/Akt/mTOR	8
1.2.5.	Il Pathway PI3K/Akt/mTOR e la Regolazione del Ciclo Cellulare	9
1.2.6.	Il Pathway PI3K/Akt/mTOR e il Metabolismo Cellulare: Ruolo di mTORC1	10
1.3.	L'Inibizione dell'Asse PI3K/Akt/mTOR come Nuova Strategia Terapeutica	11
1.3.1.	Doppi Inibitori di PI3K/mTOR	12
1.3.2.	Terapia Mirata con Doppi Inibitori di PI3K/mTOR: PI-103	13
1.3.3.	Terapia Mirata con Doppi Inibitori di PI3K/mTOR: NVP-BEZ235	13
1.3.4.	Inibitori di PI3K	15
1.3.5.	Inibitori di mTOR	16
1.3.6.	Inibitori di Akt	17
1.3.7.	La Perifosina	18

Scopo della Ricerca	20
----------------------------	-----------

Materiali e Metodi

3.1.	Reagenti e Farmaci	21
3.2.	Colture Cellulari	21
3.3.	Co-Colture di Cellule Leucemiche con Cellule Stromali	22
3.4.	Saggio MTT e Valutazione della Crescita Cellulare in vitro	22
3.5.	Analisi degli Effetti Procurati dall'Uso Combinato di Farmaci	23
3.6.	Risultati Statistici	24

3.7.	Analisi del Ciclo Cellulare	24
3.8.	Determinazione dell'Apoptosi Cellulare	29
3.9.	Analisi del Fenotipo tramite Citometria a Flusso	25
3.10.	Analisi della Side Population (SP) in Cellule di LAL-T Tramite Citometria a Flusso	25
3.11.	Analisi Immunocitochimiche	26
3.12.	Western Blotting	26
3.13.	Immunoprecipitazione	28
3.14.	Frazionamento Mitocondriale	29
3.15.	Silenziamento Genico con Small Interfering RNA (siRNA)	29
3.16.	Estrazione dell'RNA e Sintesi del cDNA	30
3.17.	Real-Time PCR con Sonde TaqMan	30
3.18.	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	30

Risultati

4.1.	Inibizione di Akt-Specifica con Perifosina	32
4.1.1.	La Perifosina Riduce l'Attività Metabolica e Induce Apoptosi Caspasi-Dipendente in Cellule di LAL-T CEM	32
4.1.2.	La Citotossicità Causata dalla Perifosina nelle Cellule CEM-R dipende dall'Integrità dei Lipid Rafts e dal Legame Fas-L/Fas	36
4.1.3.	Il Trattamento con Perifosina Induce una Diminuzione dei Livelli di p-Akt in Cellule CEM-R	38
4.1.4.	La Perifosina Attiva JNK e c-Jun nelle Cellule CEM-R	38
4.1.5.	La Perifosina Causa una Diminuzione dell'Espressione Genica di MDR-1 e Promuove l'Attività di Legame al DNA di AP-1, attraverso l'Attivazione di JN	39
4.1.6.	La Perifosina Modula Negativamente l'Espressione e l'Attività della P-GP	41
4.2.	Doppia Inibizione di PI3K/mTOR: PI-103	42
4.2.1.	Il PI-103 Doppio Inibitore di PI3K/mTOR ha un Effetto Citotossico e Pro-Apoptotico su Cellule di LAL-T	42
4.2.2.	Il PI-103 Modula l'Asse di Sopravvivenza di PI3K/Akt/mTOR nelle Linee Cellulari di LAL-T	44
4.2.3.	Caratterizzazione dell'Asse di Sopravvivenza PI3K/Akt/mTOR nelle cellule di LAL-T	46
4.2.4.	Il PI-103 Sinergizza con la Vincristina	47

4.2.5. I Blasti Leucemici di Pazienti Pediatrici affetti da LAL-T sono Sensibili al Trattamento con PI-103	48
4.3. Doppia Inibizione di PI3K/mTOR: NVP-BEZ235	49
4.3.1. L’NVP-BEZ235 Doppio Inibitore di PI3K/mTOR ha un effetto pro-apoptotico e induce un accumulo nella Fase G0/G1 del Ciclo Cellulare in Cellule di Leucemia Linfoblastica Acuta T (LAL-T)	49
4.3.2. L’NVP-BEZ235 Induce Attivazione delle Caspasi	52
4.3.3. Effetto dell’NVP-BEZ235 sui componenti critici dell’asse di sopravvivenza di PI3K/Akt/mTOR nelle cellule di LAL-T	53
4.3.4. L’NVP-BEZ235 sinergizza con Agenti Chemioterapici Tradizionali utilizzati per il Trattamento delle LAL-T e diminuisce la Resistenza alla Vincristina in Cellule Jurkat	53
4.3.5. Effetto dell’NVP-BEZ235 su Blasti di Pazienti pediatrici affetti da LAL-T con attivazione costitutiva dell’asse di PI3K/Akt/mTOR	55
4.3.6. L’NVP-BEZ235 agisce sulle cellule della Side Population (SP) di Cellule di LAL-T	57
Discussione	
5.1. Inibizione Akt-specifica con Perifosina	60
5.2. Doppia Inibizione di PI3K/mTOR	63
Bibliografia	65

INTRODUZIONE

1.1 TERAPIA MIRATA NEL CANCRO

Le nuove conoscenze sui meccanismi coinvolti nel processo di trasformazione e progressione tumorale, ed il riconoscimento delle proteine coinvolte nella regolazione di questi processi, ha aperto una nuova era nella formulazione e nella valutazione clinica di nuovi farmaci, le cosiddette terapie mirate. Le proteine che regolano la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi e l'invasività cellulare sono alla base della trasformazione neoplastica e sono il bersaglio di questo nuovo approccio terapeutico. I maggiori sforzi si sono concentrati nel trattamento delle neoplasie più frequenti, quali il tumore della mammella, del colon-retto e del polmone, ma anche nel trattamento di tumori meno frequenti, come il carcinoma del rene. Alcuni di questi farmaci innovativi sono oggi comunemente utilizzati nel trattamento delle leucemie come la leucemia mieloide cronica.

Lo studio di alcuni aspetti della biologia molecolare, come fattori di crescita, molecole coinvolte nella trasduzione del segnale, angiogenesi, apoptosi, invasività e ciclo cellulare ha consentito di identificare nuovi bersagli farmacologici in grado di interferire con eventi chiave della trasformazione e proliferazione della cellula neoplastica. Come le cellule normali, la maggior parte delle cellule neoplastiche utilizzano multiple vie di segnalazione intracellulare al fine di assicurare il mantenimento e l'attività di funzioni critiche per la loro sopravvivenza. Le proteine che quindi preservano la funzione, la sopravvivenza, la proliferazione ed i recettori espressi sulla superficie cellulare possono costituire il bersaglio di nuove forme di terapia mirata. Le nuove linee di ricerca farmacologica si sono quindi rivolte all'identificazione di agenti (terapia target) in grado di interferire in maniera selettiva contro bersagli molecolari specifici, al fine di aumentare la selettività del bersaglio e di ridurre gli effetti collaterali sistemici.

1.1.1. Alterazioni nella trasduzione del segnale nelle leucemie linfoblastiche acute T

Le leucemie linfoblastiche acute T (LAL-T) sono i disordini neoplastici più aggressivi del lineage dei linfociti commissionati a cellule T. Negli ultimi dieci anni, i tassi di sopravvivenza dei pazienti sono notevolmente migliorati, grazie ai progressi ottenuti con lo sviluppo di nuovi protocolli chemioterapici [Zhao, 2009]. Tuttavia le ricadute sono frequenti e i pazienti mostrano un peggioramento delle condizioni cliniche. Questo ha sottolineato l'importanza di sviluppare nuovi trattamenti biologici, da soli o in combinazione con le terapie convenzionali. Molteplici vie di trasduzione del segnale, con un ruolo fisiologico nella normale emopoiesi, si sono rivelate attivate in maniera aberrante nella controparte tumorale e strettamente in relazione alla progressione della malattia; è emerso inoltre che l'attivazione impropria di questi network è un evento chiave nella patogenesi delle LAL-T, rendendo le molecole intermediarie di queste vie di segnalazione eccellenti candidati per una terapia mirata.

1.1.2. L'asse di sopravvivenza della PI3K/AKT/mTOR nelle leucemie linfoblastiche acute T

La via di trasduzione del segnale della PI3K/AKT/mTOR ha una funzione critica nella proliferazione cellulare, nella progressione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nel metabolismo. AKT è la serina-treonina chinasi che viene direttamente attivata in risposta a PI3K, ed è il più importante effettore della PI3K [Engelman et al., 2006].

Nonostante AKT sia l'effettore di PI3K maggiormente coinvolto nell'insorgenza e nello sviluppo di neoplasie, vi sono altre vie indipendenti da AKT, ma che vengono attivate da PI3K, implicate nella polarità e nella migrazione cellulare [Cain and Ridley, 2009].

Il principale effettore a valle di AKT è il complesso mTORC1: esso è capace di integrare segnali provenienti dall'esterno e dall'interno della cellula, come ad esempio segnali legati allo stato energetico, alla presenza di nutrienti e di fattori di crescita.

Attualmente vi è uno sviluppo clinico di molti composti che hanno come bersaglio l'asse di sopravvivenza di PI3K/AKT/mTOR ; in particolare sono state sviluppate molecole che vanno ad inibire PI3K, AKT ed inibitori di mTOR, sia allosterici (rapamicina e derivati) che del sito catalitico.

Di notevole importanza è la complessa regolazione di mTORC1, che gioca un ruolo fondamentale da un punto di vista terapeutico, ed infatti è per questo che attualmente si stanno sviluppando farmaci, doppi inibitori di PI3K ed mTOR. I doppi inibitori di PI3K/mTOR potrebbero infatti offrire un vantaggio terapeutico, in quanto è noto come la PI3K non sia l'unico regolatore di mTOR [Engelman, 2009].

Le LAL-T sono caratterizzate dall'attivazione costitutiva dell'asse di sopravvivenza della PI3K/AKT/mTOR; ciò può essere determinato da diversi meccanismi, fra cui l'attivazione di Notch1, che porta alla soppressione della trascrizione del gene di PTEN attraverso Hes1, l'ossidazione o fosforilazione di PTEN, e l'inattivazione della fosfatasi SHIP1 [Calzavara et al., 2008; Palomero et al., 2007; Silva et al., 2008].

Il più efficace trattamento per inibire la via di sopravvivenza dipenderà dal particolare meccanismo di attivazione in ciascuna neoplasia.

Lo sviluppo clinico di farmaci inibitori dell'asse di sopravvivenza di PI3K/AKT/mTOR dovrà avere come obiettivo non solo l'inibizione della via di segnalazione, ma l'inibizione dovrà portare anche ad una risposta clinica nel paziente.

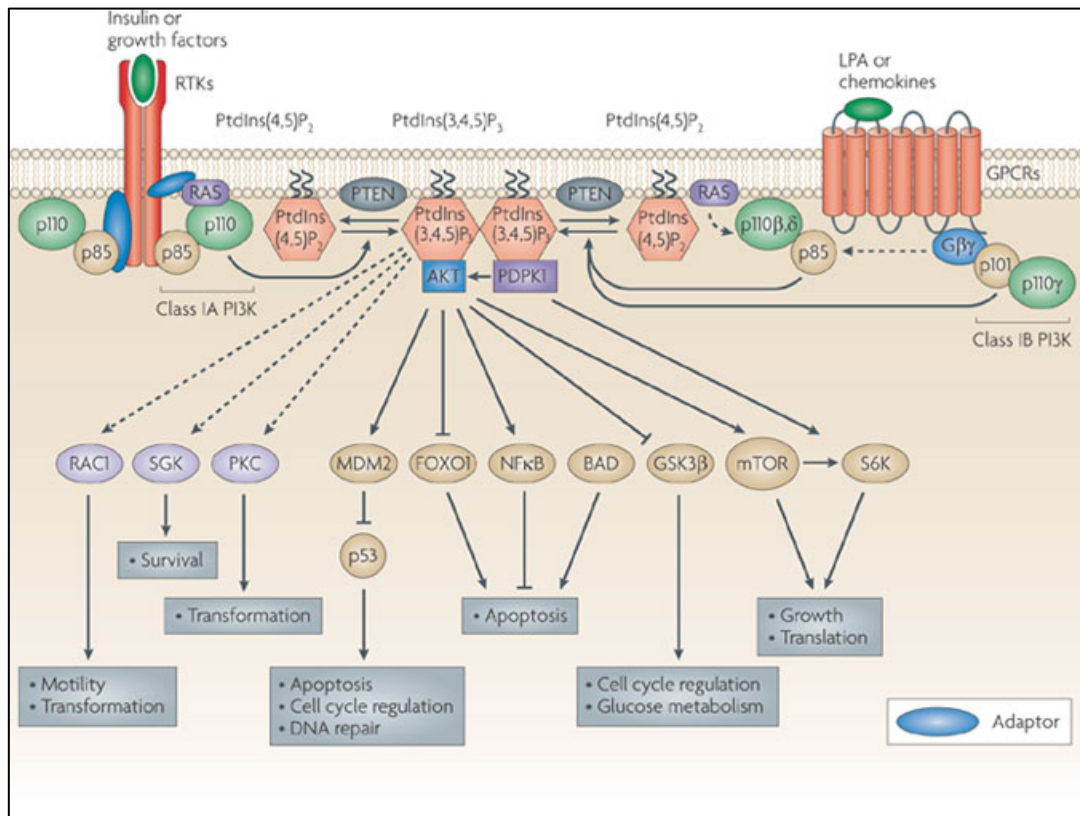


Fig. 1.1. Modello del meccanismo di attivazione della PI3K di classe IA e IB

1.2. LA FAMIGLIA DELLE FOSFOINOSITIDE 3-CHINASI (PI3K)

Le fosfoinositide 3-chinasi sono proteine eterodimeriche costituite da una subunità catalitica e da una regolatoria. Sono distinte in tre classi di PI3K (classe I, II e III) in base ai domini proteici che le costituiscono e ne determinano la specificità (Fig 2.). Di queste la classe I è quella meglio caratterizzata e comprende una serie di elementi chiave per l'integrazione di diversi segnali cellulari.

1.2.1. PI3K di classe I

Le PI3K di classe I catalizzano il trasferimento di un gruppo γ -fosforico dell' ATP sulla posizione D₃ del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) producendo così fosfatidilinositolo-3,4,5 trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) il quale a sua volta funge da ligando per reclutare, sulla faccia interna della membrana cellulare, proteine contenenti domini Pleckstrin Homology (PH), tra cui AKT [Martelli et al., 2006; Vivanco and Sawyers, 2002].

La classe I viene ulteriormente suddivisa in due sottoclassi, IA e IB.

Classe IA: le PI3K di classe IA vengono attivate da recettori ad attività tirosina-chinasica (RTK) e sono composte da una subunità catalitica del peso di 110 kDa (p110), e da una subunità regolatoria del peso di 85KDa.

La subunità p110 è codificata da tre differenti geni (p110 α , p110 β , p110 δ) e contiene diversi domini tra cui quello per il legame alla subunità regolatrice p85.

Il meccanismo che porta all'attivazione delle PI3K di classe IA (Fig.1) prevede che in condizioni di riposo il complesso p85-p110 sia presente in forma inattiva all'interno del citoplasma e che, in seguito a stimolazione delle RTK da parte di specifici ligandi, i recettori dimerizzino e si fosforilino *in trans* sui residui di tirosina presenti a livello delle loro porzioni citoplasmatiche.

La dimerizzazione del recettore e la sua attivazione per fosforilazione permettono, quindi, il reclutamento alla membrana plasmatica del complesso p85-p110 della PI3K tramite interazione dei domini SH2 di p85 con i residui di fosfo-tirosina della RTK.

Il legame della subunità regolatoria p85 al recettore determina, a sua volta variazioni conformazionali della PI3K che, a livello della subunità catalitica, giunge in prossimità del suo substrato lipidico [Vivanco and Sawyers, 2002].

Evidenze sperimentali dimostrano che p110 può essere attivata anche in maniera indiretta attraverso l'intervento di Ras o di molecole adattatrici, tra cui GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2). Questa proteina è in grado, infatti, di legare le tirosine fosforilate di RTK e reclutare a sua volta la famiglia di molecole adattatrici GAB (GRB2-associated binding proteins) che legano p85 [Chan et al., 2002; Cully et al., 2006; Rodriguez-Viciana et al., 1994] (Fig.1).

Classe IB: Queste PI3K sono costituite dalla subunità catalitica p110 γ associata ad una subunità regolatrice di 101 kDa (p101) (Fig.2) e vengono attivate da recettori di membrana associati a proteine G eterotrimeriche.

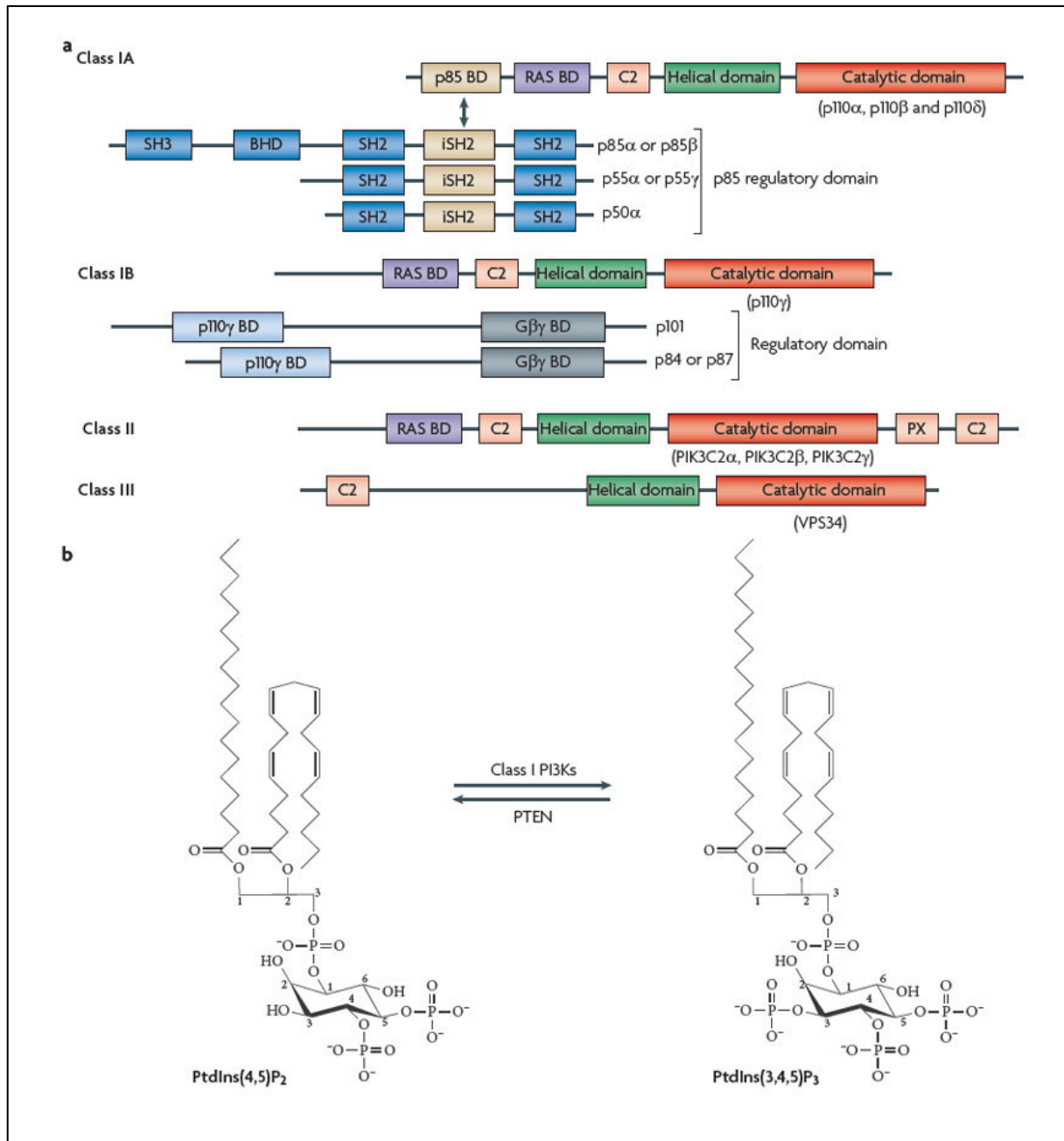


Fig. 1.2. Classificazione delle isoforme di PI3K. Le chinasi di tutte e tre le classi vengono ampiamente espresse nell'intero organismo, ad eccezione della classe IA con subunità catalitica p110 δ , presente prevalentemente nei leucociti.

1.2.2. La serina/treonina chinasi AKT

AKT (anche nota come proteina chinasi B (PKB)) è una serina/treonina chinasi del peso di 57KDa [Franke et al., 2003]. Attualmente se ne riconoscono tre isoforme (AKT1/ α , 2/ β e 3/ γ), tutte strettamente correlate tra loro e con un elevato grado di conservazione [Martelli et al., 2006; Martelli et al., 2005]. AKT1 è ubiquitariamente espressa ad alti livelli ad eccezione di rene, milza e fegato; AKT2 è presente in tutti gli organi con livelli di espressione differenti (molto abbondante nei muscoli scheletrici, nell'intestino e nei tessuti riproduttivi); AKT3 manca in numerosi tessuti in cui sono presenti le altre due isoforme, ma mostra livelli d'espressione relativamente elevati a livello del cervello e dei testicoli.

Le isoforme di AKT possiedono tutte la stessa organizzazione strutturale in cui il dominio catalitico è localizzato nella parte centrale della proteina, mentre nelle regioni C- ed N-terminali sono presenti rispettivamente un dominio regolatorio e un dominio PH.

AKT viene attivata attraverso una doppia fosforilazione; dal momento, però, che normalmente nella sua forma inattiva AKT è localizzata a livello citoplasmatico, il primo passo necessario alla sua attivazione comporta il reclutamento della proteina alla membrana cellulare.

Tramite il suo dominio PH, presente all'estremità N-terminale della molecola, AKT è in grado di legarsi a molecole di PtdIns(3,4,5)P3 (e in minor misura di PtdIns(3,4)P2), a loro volta prodotte dalle PI3K e presenti a livello della membrana plasmatica.

Il reclutamento di AKT alla membrana cellulare provoca una variazione conformazionale della molecola che consente al suo residuo Thr308 di venire fosforilato da PDK1, una serina/treonina chinasi contenente un dominio PH. Questa fosforilazione è necessaria, ma non sufficiente alla completa attivazione di AKT, che richiede pertanto una seconda fosforilazione per completare la sua attivazione, da parte del complesso mTORC2 (mammalian target of rapamycin)/Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) sul residuo Ser473 a livello della estremità C-terminale. [Martelli et al., 2006; Vivanco and Sawyers, 2002].

Una volta fosforilata, AKT migra sia all'interno del nucleo sia nel citoplasma, con una prevalenza in questo secondo compartimento cellulare, dal momento che la maggior parte dei suoi bersagli hanno una localizzazione citosolica.

L'attività di AKT viene controllata da un complesso sistema di proteine regolatrici in grado d'interagire con il suo dominio PH, chinasi o C-terminale [Du and Tschlis, 2005]. Un esempio è la *heat-shock protein-90* (HSP90), un *chaperon* molecolare che assieme al *co-chaperon* Cdc37 dà vita ad un complesso che lega il dominio chinasi di AKT. Esistono, inoltre, una serie di stress cellulari che determinano l'aumento dell'attività di AKT quali lo *shock* termico, l'ipossia, lo stress ossidativo, l'ipoglicemia e la luce ultravioletta [West et al., 2002]. Questo fenomeno d'iperattivazione stress-indotto risulta di particolare interesse alla luce del fatto che viene messo in atto dalle cellule come meccanismo compensativo per evitare la morte.

1.2.3. La regolazione negativa della via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR

La via principale attraverso cui l'asse PI3K/AKT/mTOR viene inattivato è la defosforilazione dei prodotti delle PI3K che fungono da secondi messaggeri per l'attivazione di AKT.

Le molecole di PtdIns(3,4,5)P3 non sono, infatti, substrato di nessuna delle fosfolipasi C conosciute, ma sono invece defosforilati dalle fosfatasi PTEN (Phosphatase and TENsin homologue deleted on chromosome 10) e SHIP (SH domain-containing Inositol Phosphatases). La prima è una fosfatasi dotata di doppia specificità in quanto è in grado di defosforilare sia proteine che lipidi ed è in grado di rimuovere il gruppo fosfato in posizione 3 [Maehama and Dixon, 1998; Stambolic et al., 1998].

SHIP1 e SHIP2, defosforilano il PtdIns(3,4,5)P3 rimuovendo il gruppo fosfato in posizione 5 [Choi et al., 2002].

Negli ultimi anni diversi studi hanno mostrato come il *pathway* PI3K/AKT sia regolato anche mediante defosforilazione della stessa AKT. Esempi delle fosfatasi coinvolte in questo tipo di meccanismo sono la PP2A (Protein Phosphatase 2A) che può agire direttamente su fosfo-AKT [Borgatti et al., 2003; Liu et al., 2003] e la famiglia di fosfatasi PP2C (nota come PHLPP) in grado di rimuovere il fosfato dalla Ser473 di AKT [Gao et al., 2005].

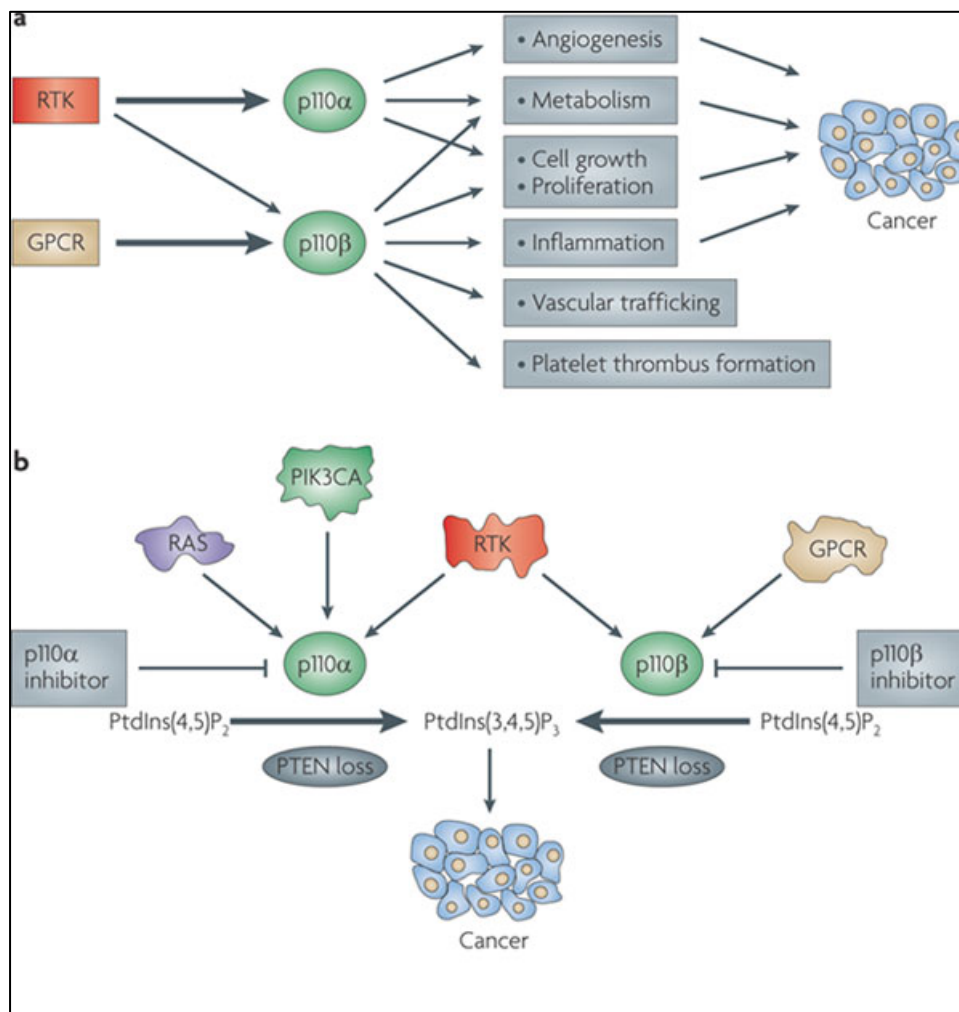


Fig. 1.3. Rappresentazione schematica dell'inibizione selettiva delle isoforme di PI3K

1.2.4. Bersagli anti-apoptotici della via PI3K/AKT/mTOR

AKT è in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare in quanto tra i suoi *target* proteici, sia diretti che indiretti, figurano diverse proteine coinvolte nel processo apoptotico.

Il segnale di sopravvivenza cellulare che viene trasmesso a seguito dell'attivazione di AKT si esplica attraverso una duplice via: l'inattivazione di segnali pro-apoptotici e viceversa, l'attivazione di segnali anti-apoptotici.

AKT, infatti, esercita parte della sua attività anti-apoptotica prevenendo il rilascio del citocromo C dai mitocondri mediante fosforilazione e conseguente inattivazione dei fattori pro-apoptotici Bad (un membro della famiglia Bcl-2) e della caspasi-9 [Thompson and Thompson, 2004]. Inoltre, è stato dimostrato che il trattamento con LY294002, inibitore della PI3K, è in grado di ridurre i livelli di fosforilazione di Bad sulla Ser136 ed indurre quindi apoptosi in blasti di AML (leucemia mieloide acuta) caratterizzati da un'attivazione costitutiva dell'asse PI3K/AKT [Zhao et al., 2004]. Un simile

meccanismo di regolazione da parte di AKT è stato dimostrato anche per YAP (Yes-associated protein), la cui fosforilazione da parte di AKT è in grado di ridurre l'espressione della proteina pro-apoptotica Bax [Basu et al., 2003]. Un altro importante mediatore di apoptosi di cui AKT è in grado di influenzare l'attività è SAPK/JNK (Stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase); questa chinasi è attiva in cellule esposte ad una grande varietà di stimoli nocivi, inclusi agenti chemioterapici. AKT può interferire con questo *pathway* e inibire l'apoptosi, fosforilando e inattivando ASK1, una chinasi a monte di JNK [Hanada et al., 2004].

D'altro canto, fra i bersagli di AKT vanno annoverati anche proteine di tipo anti-apoptotico, tra cui I- κ B kinase (IKK) che induce la degradazione dell'inibitore di NF- κ B, I- κ B [Aggarwal, 2004; Shishodia and Aggarwal, 2002]; e i fattori trascrizionali FoxO.

NF- κ B (nuclear factor-kappaB) è un fattore trascrizionale in grado d'indurre l'espressione di numerose proteine anti-apoptotiche quali cIAP-1 e 2, XIAP e TRAFs. Nello stato inattivo per interazione con I- κ B, NF- κ B si trova all'interno del citoplasma ma, una volta degradato il suo inibitore, NF- κ B diventa libero di migrare nel nucleo. Il nostro laboratorio ha precedentemente dimostrato che l'asse PI3K/AKT è in grado di regolare l'espressione di geni dipendenti da NF- κ B in cellule HL-60 [Bortol et al., 2003; Tabellini et al., 2005]; inoltre l'iperespressione di NF- κ B è stata anche documentata in blasti di AML con attivazione costitutiva dell'asse PI3K/AKT [Birkenkamp et al., 2004; Grandage et al., 2005].

I fattori FoxO, invece, si trovano principalmente localizzati all'interno del nucleo dove attivano la trascrizione di geni pro-apoptotici come quello per il ligando Fas (FasL) e per Bim. Se fosforilati da AKT, questi fattori vengono inattivati a seguito della loro traslocazione nel citoplasma grazie a *chaperon* molecolari della famiglia delle proteine 14-3-3 [Arden and Biggs, 2002; Van Der Heide et al., 2004].

1.2.5. Il *pathway* PI3K/AKT/mTOR e la regolazione del ciclo cellulare

AKT interviene a regolare la proliferazione delle cellule agendo su elementi proteici che fanno parte del macchinario di controllo del ciclo cellulare.

Tra questi, uno dei bersagli di AKT è p27Kip1, un diretto inibitore di cdk2 (cyclin-dependent kinase 2) responsabile a sua volta dell'attivazione dei fattori trascrizionali E2F1 che promuovono la replicazione del DNA. Una volta fosforilato da AKT sulla Thr157, p27Kip1 si localizza nel citoplasma dove non può più esercitare la sua funzione inibitoria; pertanto la cdk2 non è inibita ed il DNA viene duplicato [Du and Tsichlis, 2005].

Il controllo di AKT sul ciclo cellulare può avvenire anche tramite l'inibizione dei fattori trascrizionali FoxO che nel nucleo sono in grado di regolare l'espressione di geni che promuovono l'arresto del ciclo cellulare in fase G1/S (come lo stesso p27Kip1 o p21Waf/Cip1) [Kops et al., 2002; Medema

et al., 2000; Seoane et al., 2004] o regolando l'espressione della ciclina D1 e D2 [Ramaswamy et al., 2002; Schmidt et al., 2002].

1.2.6. Il *pathway* PI3K/AKT/mTOR e il metabolismo cellulare: ruolo di mTORC1

La serina/treonina chinasi mTOR regola i processi di traduzione proteica in risposta a fattori di crescita e nutrienti fosforilando componenti di macchinari traduzionali come p70S6K e il fattore trascrizionale 4E-BP1. La regolazione di mTOR da parte di AKT è un processo complesso che coinvolge diverse proteine. Una di queste molecole, coinvolta nel controllo della crescita cellulare direttamente inattivata da AKT, è TSC2 (tuberous sclerosis 2); nello stato non fosforilato, TSC2 eterodimerizza con TSC1 per promuovere l'attività GTPasica di Rheb (Ras homologue enriched in brain) il quale, una volta associata a GTP, promuove l'attivazione di mTORC1, che si comporta da sensore di nutrienti (quali glucosio e amminoacidi) e media vari segnali di crescita cellulare generati dall'attivazione della PI3K [Hay and Sonenberg, 2004; Li et al., 2004].

L'attività di AKT si esplica, in questo contesto, inibendo TSC2 e provocando in questo modo una diminuzione dell'idrolisi del GTP da parte di Rheb con conseguente aumento dei complessi Rheb-GTP in grado di attivare mTORC1.

Nello stato attivo, mTOR dà vita a due differenti complessi multiproteici. Il primo (complesso TOR rapamicina-sensibile o mTORC1) è costituito da Raptor (regulatory associated protein of TOR) e G β L (G-protein β -subunit-like) e fosforila p70S6K e l'inibitore 4E-BP1 (eucaryotic translation-initiation factor 4E-inhibitory binding protein) [Fingar et al., 2002; Kim et al., 2002; Kim et al., 2003], entrambi coinvolti nella regolazione della sintesi proteica. P70S6K infatti attiva la traduzione di mRNA fosforilando la proteina S6 del complesso ribosomiale 40S, mentre la fosforilazione e inibizione di 4E-BP1 consente il rilascio del fattore eIF-4E che può così prendere parte alla formazione di un complesso d'inizio della traduzione. Attualmente è noto che la prolungata esposizione ad antibiotici macrolidici come la rapamicina e i suoi analoghi può portare ad una inibizione anche del complesso mTORC2 [Kim et al., 2002].

Assieme a Rictor, mTOR dà vita ad un secondo complesso (complesso TOR rapamicina-insensibile o mTORC2) che può sia mediare segnali al citoscheletro in risposta a stimolazione mitogenica, sia fosforilare AKT sulla Ser473 innescando un *feedback* positivo ed una risposta tumorigenica [Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2005]. Un altro importante substrato di AKT nella regolazione del metabolismo cellulare è la proteina GSK3 β che fosforila, inattivandola, la glicogeno sintetasi a seguito di stimolazione insulinica. AKT è in grado di fosforilare GSK3 β sulla serina in posizione 9, inattivandola [Hardt and Sadoshima, 2002]. Alti livelli di espressione della GSK3 β sono stati, infatti, riscontrati in blasti di AML recanti una iperfosforilazione di AKT.

1.3. L'INIBIZIONE DELL'ASSE PI3K/AKT/MTOR COME NUOVA STRATEGIA TERAPEUTICA

L'attivazione costitutiva dell'asse della PI3K/AKT/mTOR è una caratteristica comune delle LAL-T; le cellule leucemiche isolate da pazienti affetti da LAL-T alla diagnosi, frequentemente presentano iperattivazione della via di trasduzione del segnale mediata da AKT [Zhao, 2009]. E' per questa fondamentale caratteristica comune ai pazienti che nuovi inibitori terapeutici dell'asse PI3K/AKT/mTOR e dei suoi bersagli a valle stanno diventando candidati sempre più attraenti per il trattamento di queste neoplasie.

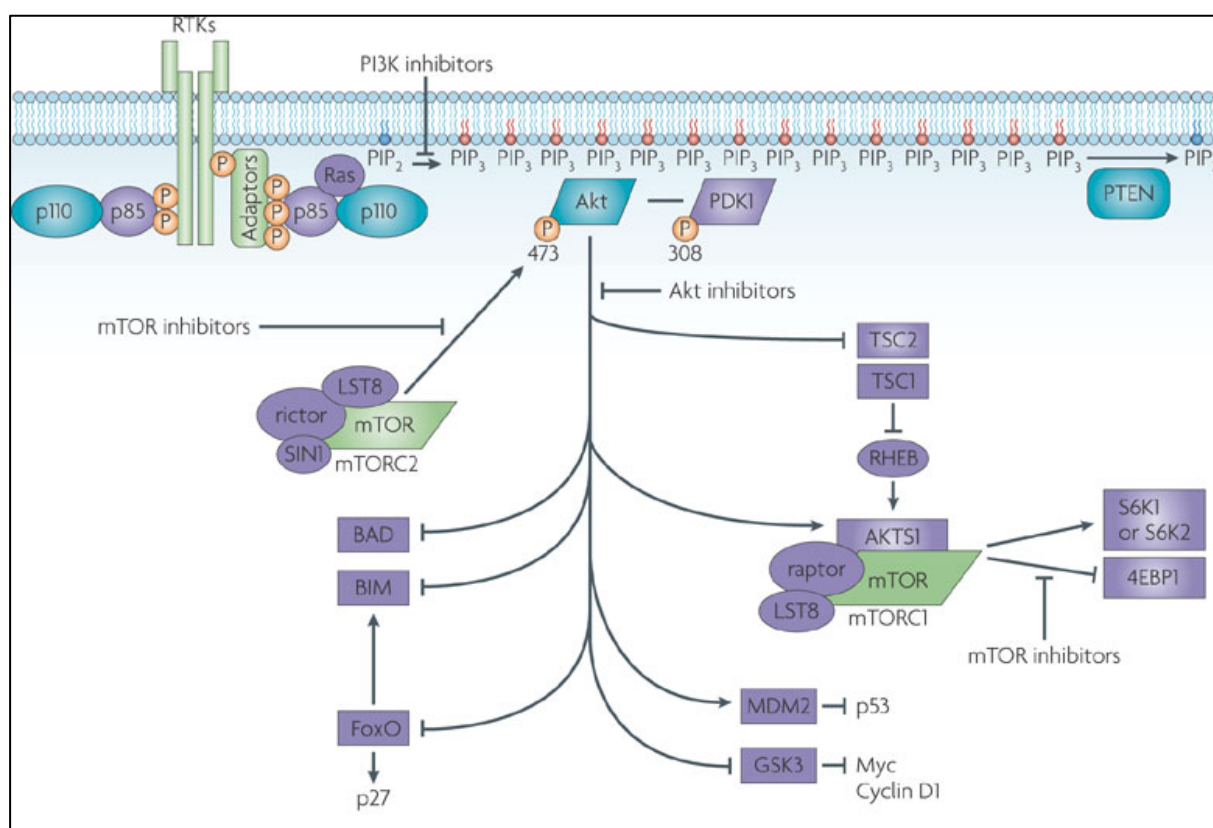


Fig. 1.4. Rappresentazione schematica dell'inibizione dell'asse di sopravvivenza della PI3K/AKT/mTOR

Diverse piccole molecole che inibiscono la cascata di segnalazione della PI3K/AKT/mTOR sono attualmente in via di sviluppo. Le nostre ricerche si concentrano principalmente sullo studio di 4 classi di inibitori: doppi inibitori di PI3K/mTOR, inibitori di PI3K, inibitori di AKT ed inibitori di mTOR.

Inhibitor	Company	Phase of clinical trial	Refs
<i>Dual PI3K and mTOR inhibitors</i>			
BEZ235	Novartis	Phase I/II	37,92,96,103,149
BGT226	Novartis	Phase I/II	NS
XL765	Exelixis	Phase I	NS
SF1126	Semafore	Phase I/II	NS
GSK1059615	GSK	Preclinical	150
<i>PI3K inhibitors</i>			
XL147	Exelixis	Phase I	NS
PX866	Oncothyreon	Phase I	100,151,152
GDC0941	Genentech/Piramed/Roche	Phase I	NS
BKM120	Novartis	Phase I	NS
CAL101 (targets p110 δ)	Calistoga Pharmaceuticals	Phase I	NS
<i>Akt inhibitors</i>			
Perifosine	Keryx	Phase I/II	153–156
GSK690693	GSK	Phase I	157,158
VQD002	Vioquest	Phase I	NS
MK2206	Merck	Phase I	NS
<i>mTOR inhibitors (catalytic site)</i>			
OSI027	OSI Pharmaceuticals	Phase I	NS
AZD8055	AstraZeneca	Phase I/II	NS
NS, not stated.			

Tabella 1.5. Elenco dei principali farmaci attualmente in trials clinici, utilizzati nella target therapy dell'asse PI3K/AKT/mTOR

1.3.1. Doppi Inibitori di PI3K/mTOR

La subunità p110 di PI3K ed mTOR hanno struttura molto simile nel sito catalitico che differisce per soli due amminoacidi, quindi piccole molecole inibitrici della p110, spesso inibiscono anche mTOR. La maggior parte dei doppi inibitori di PI3K ed mTOR hanno come target le subunità p110 alfa, beta e delta, mTORC1 ed mTORC2 [Garcia-Echeverria and Sellers, 2008]. La potenzialità di questi doppi inibitori è quella di essere efficaci in quelle neoplasie in cui si ha una resistenza a singoli inibitori di PI3K e di AKT. Questa classe di inibitori potrebbe essere anche indicata per quelle neoplasie caratterizzate da mutazioni o amplificazioni di AKT, perché l'attività sia di PI3K che di mTORC2 potrebbe essere richiesta per una completa attivazione di AKT. Inoltre, è ormai noto come l'utilizzo degli inibitori tradizionali di mTORC1, come la Rapamicina ed i suoi analoghi, possa portare ad una attivazione a feedback di PI3K e non essere quindi totalmente efficace [Fan et al., 2007].

1.3.2. Terapia mirata con doppi Inibitori di PI3K/mTOR: PI-103

La necessità di inibizione di molteplici target è correlata alla complessità della modulazione delle vie di segnalazione nella progressione tumorale e all'abilità della cellula tumorale di adattarsi agli stress. Per questa ragione vi è una sempre maggiore attenzione allo sviluppo di inibitori che abbiano molteplici bersagli. Il PI-103, è una molecola appartenente alla classe delle pirimidil-furanopirimidine, il cui effetto è stato inizialmente associato all'inibizione di PI3K in diverse linee cellulari di glioma [Fan et al., 2006]. L'attività di questo composto è stata testata in base all'abilità di bloccare selettivamente la subunità della p110alfa ed mTOR, a concentrazioni nanomolari. L'inibizione combinata dei due bersagli si è dimostrata essere ben tollerata in vivo in modelli murini xenograft, suggerendo che la doppia inibizione rappresenti una terapia efficace e sicura nel trattamento delle neoplasie con alterazione dell'asse PI3K/AKT/mTOR [Fan et al., 2006]. È stato osservato un effetto antiproliferativo trattando linee cellulari di glioblastoma (in cui si ha l'attivazione della via PI3K/AKT/mTOR e iperespressione del recettore per l'EGF) con PI-103 in associazione con l'inibitore del recettore per l'EGF Erlotinib. Al contrario, non è stato osservato un arresto della proliferazione cellulare trattando queste linee cellulari solo con l'inibitore Erlotinib.

Il PI-103 ha inoltre dimostrato di inibire la proliferazione e la capacità clonogenica di cellule leucemiche di AML e di indurre una significativa apoptosi nei blasti leucemici, specialmente nel compartimento in cui sono presenti le cellule leucemiche staminali. Cellule CD34+ normali, trattate con PI-103, non hanno mostrato una significativa diminuzione della capacità clonogenica [Tamburini et al., 2008].

Trattamenti con PI-103 in associazione con farmaci che hanno come bersaglio il DNA, in particolare la Doxorubicina, hanno aumentato in modo significativo l'apoptosi e ridotto la formazione di colonie rispetto a trattamenti chemioterapici singoli. Il meccanismo di sensibilizzazione è stato dimostrato attraverso due approcci indipendenti: una inibizione farmacologica ed una genetica della PI3K, DNA-PK ed mTOR [Westhoff et al., 2009].

1.3.3. Terapia mirata con doppi Inibitori di PI3K/mTOR: NVP-BE235

Sviluppando nuovi inibitori di PDK1 ed utilizzando la struttura di base dei composti imidazolchinolinici, è stata identificata una nuova molecola che inibisce tutte le isoforme delle PI3K di classe I, ed mTOR: l'NVP-BE235, sintetizzato da Novartis (Basel, Switzerland). La struttura dei composti imidazolchinolinici è in grado di mimare l'interazione dell'ATP con la regione cerniera del sito catalitico, in diversi modi.

L'attività cellulare del composto è stata testata usando linee cellulari tumorali con il pathway di PI3K/AKT/mTOR attivato. La somministrazione del farmaco a cellule di glioblastoma U87G, caratterizzate dall'assenza di PTEN, è stata capace di ridurre la fosforilazione di AKT sul residuo Ser473 e sul Thr308, con un andamento dose dipendente. Analogamente, è stato osservato lo

stesso effetto trattando con NVP-BEZ235 le cellule di carcinoma prostatico PTEN-null PC3M. Nessun effetto è stato riscontrato invece sui livelli della proteina totale, dimostrando che il composto non ha effetti sulla stabilità proteica [Maira et al., 2008].

Il potenziale antitumorale dell'NVP-BEZ235 ha mostrato valori di IC_{50} nanomolari nell'indurre citotossicità in cellule di glioma, andando ad agire specificamente su bersagli dell'asse della PI3K/AKT/mTOR, quali AKT, p70S6K, S6 e 4E-BP1. Il trattamento ha portato ad un accumulo di cellule in fase G_0/G_1 del ciclo cellulare ed ha indotto autofagia. Inoltre l'espressione del fattore di crescita endoteliale (VEGF), importante modulatore angiogenico nelle cellule di glioma, è significativamente diminuita, suggerendo che l'NVP-BEZ235 possa avere un ruolo nell'inibizione dell'angiogenesi.

Studi preclinici riguardanti l'efficacia terapeutica del farmaco hanno mostrato come sia significativamente prolungata la sopravvivenza di animali con tumori, senza causare un effetto tossico. Estratti proteici da animali dopo il trattamento farmacologico hanno mostrato che NVP-BEZ235 è stato capace di inibire proteine bersaglio dell'asse PI3K. Analisi immunohistochimiche hanno mostrato una riduzione nello staining del VEGF nei campioni tumorali trattati, rispetto a quelli di controllo, confermando il ruolo antiangiogenico dell'NVP-BEZ235 anche in vivo. [Liu et al., 2009].

Linee cellulari di Mieloma Multiplo (MM), sensibili e resistenti alla chemioterapia con agenti convenzionali (desametasone ed agenti citotossici), erano molto sensibili all'NVP-BEZ235 (IC_{50} , <25 nmol/L). Il BEZ235 ha indotto un rapido aumento della morte cellulare a dosi farmacologicamente raggiungibili in vivo, mentre le leucociti da donatori sani hanno mostrato una sensibilità significativamente minore rispetto alle cellule di MM studiate, suggerendo un'indicazione terapeutica favorevole. Inoltre il NVP-BEZ235 è stato in grado di agire sulle cellule di MM, anche in presenza di Interleuchina 6 esogena ed IGF-1, cellule stromali od osteoclasti, noti per avere un ruolo protettivo verso diversi composti anti MM. I profili molecolari hanno mostrato come i trattamenti diminuivano l'intensità della trasduzione del segnale associata a Myc, ai ribosomi e alle funzioni del proteosoma.

Studi in vivo su modelli tumorali xenograft hanno mostrato una significativa riduzione della massa del tumore [McMillin et al., 2009].

Nel lavoro svolto da Maira è stato dimostrato che l' NVP-BEZ235 ha avuto proprietà farmacologiche che hanno permesso il suo uso anche in vivo. Dosi del farmaco, somministrate per via orale, hanno mostrato un effetto inibitorio in modelli tumorali xenograft murini e di ratto [Maira et al., 2008].

L'effetto dell'NVP-BEZ235 è stato testato in vivo in modelli di tumori pancreatici trapiantati nel topo, mostrando che una singola somministrazione orale inibiva completamente i bersagli a valle di PI3K/mTOR (seguendo così l'andamento cinetico della concentrazione del farmaco nel plasma),

mentre una somministrazione cronica determinava l' inibizione della crescita cellulare [Cao et al., 2009].

1.3.4. Inibitori di PI3K

Nel trattamento chemioterapico delle AML è stato dimostrato che Wortmannin o LY294002, inibitori di PI3K, portano a una diminuzione dell'attività di AKT e aumentano la sensibilità ad etoposide e doxorubicina. Sia in vivo che in vitro, questi inibitori hanno mostrato una buona capacità di indurre apoptosi e di aumentare la sensibilità a farmaci chemioterapici [Martelli et al., 2005].

Wortmannina inibisce irreversibilmente PI3K, modificando Lys802 della subunità catalitica p110, mentre LY294002, derivato morfolinico della quercitina, è un inibitore reversibile che compete con l'ATP a livello del sito catalitico di PI3K.

Nonostante la loro capacità di inattivare la cascata di PI3K/AKT, l'utilizzo di questi inibitori è però limitato dagli effetti collaterali [Martelli et al., 2006]. Si tratta infatti di inibitori di prima generazione. Essi sono tuttavia largamente utilizzati al fine di studiare e approfondire i meccanismi ed il coinvolgimento della via di segnalazione di PI3K/AKT in diversi sistemi biologici.

Sulla base di questi studi effettuati, sono stati sintetizzati i composti cosiddetti di seconda generazione. Esempi sono il derivato della wortmannina PX-866 e dall' LY294002 RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser)-coniugato, più stabili e con migliori proprietà farmacocinetiche. Entrambi i farmaci sono attualmente in fase di sperimentazione clinica, in trials clinici di fase I [Ihle et al., 2009; Ihle and Powis, 2009].

Molti inibitori di PI3K, attualmente in sviluppo clinico, inibiscono l'attività catalitica di tutte le isoforme di classe IA (alfa, beta, delta), mentre altri sono in grado di agire in modo selettivo su ciascuna isoforma. Rimane ancora poco chiaro quale tipo di inibitore sia più efficace; la risposta dipende dalla maggiore tossicità che può essere causata dalla completa inibizione di tutte le isoforme con l'impiego di inibitori non selettivi.

Gli inibitori isoforma-specifici potrebbero essere particolarmente adatti ed efficaci in quelle malattie in cui si abbiano mutazioni isoforma-specifiche; ad esempio inibitori specifici dell'isoforma alfa, potrebbero essere utilizzati in presenza di malattie in cui si riscontrino mutazioni a carico di PIK3CA.

L'efficacia di inibitori di PI3K potrebbe inoltre risultare molto diversa rispetto a doppi inibitori di PI3K/mTOR, in quanto l'inibizione della sola PI3K potrebbe portare alla perdita della segnalazione su mTOR, tuttavia l'ipotesi che tutti gli inibitori di PI3K possano portare alla inibizione anche di mTOR non è stata ancora completamente dimostrata.

Nel caso di tumori con mutazioni di PIK3CA o perdita di PTEN, l'utilizzo di inibitori specifici di PI3K potrebbe essere favorito, in quanto in questi casi si otterrebbe una modulazione negativa di

mTORC1 senza causare la tossicità causata dall'inibizione di mTORC1 ed mTORC2 nelle cellule non tumorali, in seguito al trattamento con un doppio inibitore.

Infine, l'utilizzo di inibitori specifici di PI3K e di altri inibitori di importanti vie di segnalazione, come ad esempio gli inibitori di MEK, potrebbe essere meglio tollerato rispetto all'impiego di doppi inibitori di PI3K/mTOR [Engelman, 2009]. Tuttavia esistono anche tumori in cui l'asse PI3K/AKT non è l'unico a controllare l'attività di mTORC1, come ad esempio i tumori caratterizzati da mutazioni BRAS o BRAF, che attivano MEK/ERK. In questi casi l'utilizzo di doppi inibitori PI3K/mTOR potrebbe avere un importante ruolo terapeutico.

1.3.5. Inibitori di mTOR

Anche se mTOR è stato definito membro dell'asse di sopravvivenza di PI3K da relativamente poco tempo, esso è il primo nodo ad essere diventato bersaglio terapeutico nella clinica. La Rapamicina, o Sirolimus, è il farmaco prototipo inibitore di mTOR, utilizzata in principio per le sue proprietà antifungine. In seguito è stato scoperto come essa avesse inoltre capacità immunosoppressive e, più recentemente, antineoplastiche. La rapamicina si associa con il suo recettore intracellulare, FKBP12, che si lega direttamente ad mTOR e inibisce la fosforilazione dei suoi bersagli a valle p70S6K e 4E-BP1. Gli analoghi della Rapamicina, (detti anche rapanaloghi), come il Temsirolimus (CCI779/Torisel) e l'Everolimus (RAD001/Afinitor) sono stati sviluppati come farmaci antitumorali [Faivre et al., 2006]. Essi inibiscono mTOR attraverso l'utilizzo dello stesso meccanismo di azione della Rapamicina, ma hanno migliori caratteristiche farmacologiche e sono quindi molecole più adatte per l'utilizzo clinico. Il composto AP23573 è stato studiato per il trattamento di sarcomi dei tessuti molli, e risultati ottenuti da studi clinici recenti mostrano come il Torisel e il RAD001, utilizzati come singoli agenti chemioterapici, abbiano migliorato la sopravvivenza in pazienti con carcinoma renale a cellule chiare in fase avanzata, portando quindi all'approvazione di questi composti per questo tipo di malattia [Faivre et al., 2006; Guertin and Sabatini, 2007; Hay, 2005] [Atkins et al., 2004]. Tuttavia studi preliminari con inibitori di mTOR in molti altri tipi di tumore hanno mostrato una bassa risposta, dovuta probabilmente al fatto che questi farmaci sono potenti citostatici ma hanno scarsa attività pro-apoptotica.

mTOR presenta un potenziale secondo bersaglio, in quanto mTORC2, come già detto, è in grado di fosforilare AKT sulla Ser473, un evento importante per la completa attività di AKT. Anche se il ruolo clinico di questa fosforilazione non è ancora chiaro, in un recente studio è stato mostrato come mTORC2 sia richiesto per lo sviluppo di tumori alla prostata caratterizzati dall'assenza di PTEN [Guertin et al., 2009]. Lo sviluppo di inibitori chinasi di entrambi i complessi mTORC1 ed mTORC2 potrebbe favorire una inibizione più efficace dell'asse della PI3K/AKT/mTOR, rispetto a composti come la Rapamicina ed i suoi analoghi. In recenti studi è stato descritto il ruolo di molecole capaci di inibire anche mTORC2, andando a competere con il sito ATPasico di mTOR: il

Torin-1 ed i Torkinibs (PP30 e PP242). Queste molecole sono state capaci di agire su entrambi i complessi, diminuendo la crescita cellulare e la proliferazione in modo più efficace rispetto alla Rapamicina [Feldman et al., 2009]. E' interessante notare come l'aumentata attività di questi inibitori dell'attività catalitica, potrebbe non essere dovuta all'effetto su mTORC2, ma piuttosto ad una maggiore inibizione del complesso mTORC1, come indicato dallo stato di fosforilazione dei bersagli a valle, tipo 4E-BP1. Infatti, sta emergendo che la fosforilazione di 4E-BP1 (e di conseguenza la sintesi proteica) è resistente al trattamento con Rapamicina e derivati in parecchi modelli cellulari. Attualmente due inibitori dell'attività catalitica sono entrati in trials clinici per la cura di pazienti con linfoma o tumori solidi: l'AZD8055 e l'OSI-027 [Feldman et al., 2009; Thoreen et al., 2009; Thoreen and Sabatini, 2009].

1.3.6. Inibitori di AKT

AKT è il più importante nodo dell'asse di PI3K/AKT/mTOR, ed è un bersaglio molto attraente, utilizzato nella target therapy. Numerosi inibitori di AKT sono stati sviluppati; essi possono essere raggruppati in: analoghi dei fosfolipidi, inibitori competitivi del sito catalitico per l'ATP ed inibitori allosterici. I primi studi riguardo alla inibizione di AKT sono stati svolti utilizzando molecole di basso peso molecolare che fossero in grado di inibire l'attività catalitica della molecola.

La perdita della fosforilazione di AKT serve come misura farmacodinamica dell'inibizione di questo bersaglio. Inoltre, tali inibitori potrebbero non bloccare la fosforilazione di AKT, ma piuttosto indurre una maggiore fosforilazione, attraverso la perdita della regolazione a feedback negativo di PI3K. Quindi, per valutare l'effetto di tali composti, andrebbe determinata l'attivazione di proteine bersaglio di AKT, come GSK3beta, PRAS40 e i fattori di trascrizione FOXO.

La maggior parte degli inibitori del sito catalitico non sono selettivi per le tre isoforme di AKT, come ad esempio il GSK 690693, che agisce a dosi nanomolari ed è attivo anche contro altre chinasi della famiglia delle AGC (cicline AMP dipendenti, cGMP dipendenti e proteine chinasi C).

I principali inibitori delle chinasi sono però inibitori competitivi per ATP, il cui sito di legame è un dominio estremamente conservato fra le chinasi. Questo ha comportato, pertanto, una mancanza di specificità nell'azione inibitoria di AKT e la ricerca di un possibile approccio alternativo [Engelman, 2009].

Per raggiungere un maggiore beneficio terapeutico sfruttando la specificità per le isoforme di AKT, recentemente sono stati sviluppati un consistente numero di inibitori allosterici di AKT.

AKTi-1/2, un doppio inibitore allosterico di AKT1 e AKT2, è caratterizzato da una potente attività antineoplastica testata su modelli murini ed il suo analogo MK2206 è già in trials clinici di fase I in pazienti con carcinoma in situ o tumori metastatici.

Recentemente ha assunto sempre maggior consistenza l'idea di inibire AKT inattivando il suo dominio PH, interferendo così con il legame del fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato e quindi con la sua traslocazione a livello della membrana cellulare. Questo approccio garantirebbe, inoltre, una maggiore specificità in quanto le isoforme di AKT presentano riguardo il dominio PH solo il 30% di analogia con altre proteine presentanti lo stesso dominio [Kumar and Madison, 2005]. Gli analoghi del fosfatidilinositolo sono in grado di inibire questa interazione in quanto non possono essere fosforilati da PI3K. Quindi agiscono come competitori per l'attivazione di AKT e la sua traslocazione alla membrana [Martelli et al., 2006]. Questi composti hanno come principale effetto collaterale l'emolisi, per cui recentemente sono stati testati altri inibitori, tra cui la perifosina [Martelli et al., 2006].

1.3.7. La perifosina

La perifosina è un nuovo farmaco sintetico appartenente alla classe delle alchilfosfocoline. La perifosina è un analogo dei fosfolipidi di membrana che presenta un residuo ciclico alifatico alchilico legato al gruppo fosfato. Essa è recentemente entrata in fase II della sperimentazione clinica per il trattamento di alcuni tumori, in quanto ha dimostrato di avere attività antineoplastica in numerosi tipi di neoplasie, sia in vivo che in vitro [Kondapaka et al., 2003]. La perifosina, così come altri analoghi dei fosfolipidi (eldefosina e miltefosina), ha dimostrato di avere effetti pro-apoptotici in quanto interferisce con il turnover e la sintesi dei fosfolipidi di membrana e blocca la sopravvivenza delle cellule tumorali [Ruiter et al., 2003]. A differenza della maggior parte dei farmaci antitumorali che agiscono sul DNA, la perifosina ha effetto sui processi di segnalazione a livello delle membrane cellulari [Vink et al., 2005]. Recenti studi hanno dimostrato un'attività di inibizione dose-dipendente di AKT da parte della perifosina [Kondapaka et al., 2003]. La perifosina agisce legandosi al dominio PH di AKT, impedendo così al fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato di interagire con AKT e di ancorarla a livello della membrana cellulare [Kondapaka et al., 2003].

In uno studio effettuato su cellule leucemiche T (Jurkat), la perifosina ha dimostrato di avere effetti antiproliferativi ed inoltre di provocare un aumento della morte cellulare, associato ad una riduzione di fosfo-AKT Ser 473 [Nyakern et al., 2006].

Da alcuni studi, è emerso che la perifosina può arrestare il ciclo cellulare attraverso l'induzione di p21 Waf/Cip1, un inibitore delle cdk [Patel et al., 2002]. Inoltre, la perifosina può inibire la via anti-apoptotica di ERK ed attivare quella pro-apoptotica di JNK, alterando il bilancio tra le vie della sopravvivenza e quelle della morte cellulare, e favorendo così l'apoptosi. Nondimeno, esistono in letteratura lavori che indicano come la perifosina sia in grado di attivare ERK1/2. Ad esempio, in cellule T-linfoblastoidi Jurkat, l'esposizione a basse concentrazioni di perifosina per tempi lunghi o a più alte concentrazioni per tempi brevi, comportava l'attivazione transitoria della via della MAP chinasi e l'aumento dei livelli di fosfo-ERK 1/2 [Nyakern et al., 2006].

Inoltre, il trattamento di cellule di MM con perifosina, provocava un aumento della fosforilazione di MEK ed ERK secondo una modalità tempo- e dose-dipendente. Trattando queste cellule contemporaneamente con perifosina e U0126 (un inibitore farmacologico di MEK), si aveva una riduzione della fosforilazione di ERK e quindi veniva potenziato l'effetto citotossico indotto dalla perifosina [Hideshima et al., 2006].

Il trattamento di cellule di MM con la perifosina innesca anche l'attivazione di un altro gruppo di MAP chinasi, cioè JNK, seguita dal clivaggio delle caspasi 8 e 9, dalla proteolisi di PARP (poly ADP-ribose polymerase) e infine, dall'apoptosi [Hideshima et al., 2006].

Recenti studi hanno dimostrato che la perifosina e il suo analogo eldefosina, inducono selettivamente l'apoptosi nelle cellule leucemiche grazie all'attivazione del recettore della morte Fas/CD95. Questo recettore, così come tutti quelli appartenenti alla superfamiglia dei recettori del Tumor Necrosis Factor (TNF), in seguito all'interazione con il suo ligando o con anticorpi agonisti, ha la capacità di trasmettere segnali apoptotici attraverso la presenza di un dominio di morte nella sua porzione citoplasmatica. Al contrario dei domini citoplasmatici degli altri recettori coinvolti nella trasduzione del segnale, la porzione intracellulare di Fas media la segnalazione attraverso l'interazione proteina-proteina [Gajate and Mollinedo, 2007].

L'attivazione di Fas/CD95 comporta una dimerizzazione del recettore ed il reclutamento a livello della membrana della molecola adattatrice FADD (Fas-associated death domain-containing protein) attraverso l'interazione del suo dominio di morte con quello del recettore. FADD, a sua volta, contiene un dominio effettore di morte che si lega ad un analogo dominio ripetuto in tandem e presente sulla pro-caspasi 8. La formazione di questo oligomero è necessaria per l'attivazione della pro-caspasi 8, che, attraverso un taglio auto-catalitico, si trasforma in caspasi 8. L'aggregato Fas/CD95, FADD, pro-caspasi 8 forma il cosiddetto complesso DISC (death-inducing signaling complex). La caspasi 8 media l'attivazione delle caspasi effettrici a valle (tipo la caspasi 3), che conducono all'apoptosi [Gajate and Mollinedo, 2007]. Inoltre, la caspasi 8 porta all'attivazione della via mitocondriale dell'apoptosi, incentrata sulla caspasi 9 [de Vries et al., 2007].

E' stato inoltre dimostrato che, oltre all'attivazione delle caspasi, il trattamento con perifosina di cellule Jurkat portava ad una variazione dell'espressione di alcune proteine che agiscono nel mitocondrio, tra cui Bid, Bim e Bcl-XL. Infatti la caspasi 8 e la caspasi 3 possono attivare la forma citosolica di Bid mediante clivaggio: il frammento attivo di Bid interagisce con la proteina pro-apoptotica Bax, presente nel mitocondrio, la quale induce il rilascio del citocromo c. Inoltre, la caspasi 3 può indurre anche il clivaggio di Bim, producendo un frammento con elevata attività pro-apoptotica che è in grado di antagonizzare la funzione anti-apoptotica di Bcl-2 e Bcl-xL, attraverso un'interazione diretta [Nyakern et al., 2006].

SCOPO DELLA RICERCA

Come già evidenziato in precedenza, la via di trasduzione del segnale della PI3K/Akt/mTOR è cruciale nei processi di crescita cellulare, sopravvivenza ed apoptosi e la sua attivazione costitutiva è implicata sia nella patogenesi che nella progressione di una larga varietà di neoplasie. Recentemente è emerso che tale via risulta attivata nel 50-75% dei pazienti affetti da leucemia acuta linfoblastica-T (LAL-T), condizionandone in senso negativo la prognosi. Le LAL-T sono forme leucemiche molto aggressive causate dalla proliferazione di precursori dei linfociti-T. Negli ultimi 20 anni la prognosi della LAL-T è migliorata grazie all'adozione di più efficaci protocolli terapeutici. Tuttavia, anche per la LAL-T è avvertita l'esigenza di terapie mirate a livello molecolare che abbiano come bersaglio vie di trasduzione del segnale attivate in maniera aberrante e che contribuiscono alla proliferazione, sopravvivenza e farmacoresistenza delle cellule leucemiche. Le nuove linee di ricerca farmacologica si sono quindi rivolte all'identificazione di agenti (terapia target) in grado di interferire in maniera selettiva contro bersagli molecolari specifici, al fine di aumentare la selettività del bersaglio e di ridurre gli effetti collaterali sistemici. Le alchilfoscoline sintetiche (ALPs) (perifosina, mitelfosina ed edelfosina) costituiscono un gruppo eterogeneo di fosfolipidi di sintesi con differenti effetti biologici, tra cui l'inibizione dell'invasione di cellule tumorali, l'induzione alla differenziazione cellulare e l'apoptosi. È stato stabilito che le alchilfoscoline, usati singolarmente od in combinazione con altri agenti chemioterapici classici come l'etoposide sono in grado di indurre apoptosi in cellule di leucemia acuta umana mieloide (LAM) in coltura e nei basti di quei pazienti affetti da LAM recanti un'iperattivazione dell'asse PI3K/Akt.

Muovendo da queste premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare il potenziale terapeutico delle alchilfoscoline nelle LAL-T. L'analisi è stata condotta a diversi livelli, volti a quantificare la vitalità cellulare e ad effettuare una fenotipizzazione citofluorimetrica. Sono stati valutati gli effetti degli alchilfosfolipidi su diverse linee cellulari LAL-T, caratterizzate dall'attivazione dell'asse PI3K/Akt e dalla sovra-espressione della glicoproteina-P che determina un fenotipo farmaco resistente (MDR). È stato inoltre analizzato il potenziale terapeutico di nuovi farmaci, doppi inibitori di PI3K ed mTOR (PI-103 e NVP-BEZ235), su cellule di LAL-T da soli o in combinazione con farmaci chemioterapici tradizionali (Vincristina, Ciclofosfamide, ARA-C). Inoltre, l'effetto dell'NVP-BEZ235 è stato studiato sulle cellule della Side Population, al fine di approfondire l'analisi delle caratteristiche di staminalità di tali cellule.

I dati ottenuti mostrano come i farmaci siano stati in grado di provocare citotossicità e apoptosi in tutte le linee cellulari analizzate ed in blasti leucemici di pazienti pediatrici con attivazione costitutiva dell'asse. Inoltre entrambi i farmaci hanno modulato negativamente i principali target dell'asse di sopravvivenza di PI3K/AKT/mTOR.

MATERIALI E METODI

3.1. Reagenti e Farmaci

La perifosina è stata gentilmente fornita dalla AEterna Zentaris GmbH (Frankfurt, Germany). La polvere è stata disciolta in H₂O ad una concentrazione finale di 50 mM. Il PI-103 è stato acquistato dalla Alexis Biochemicals, mentre l' NVP-BE235 è stato gentilmente fornito da Novartis.

SP600125, Rapamicina, LY294002, Wortmannin, Vinblastina, Vincristina, Ciclofosfamide, Ara-C, Hoechst 33342, Fumitremorgin c, Propidio Ioduro (PI), RNasi A, Metil-beta-ciclodestrina (MCD), fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled cholera toxin B (FITCCTx B) subunit, anticorpo contro la 170 kDa glicoproteina P (P-gp, clone F4) provengono dalla Sigma-Aldrich Corporation.

Il kit per l'MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), è stato acquistato dalla Roche Applied Science. L'Annessina V-FITC kit proviene dalla Bender MedSystem.

L'inibitore della p110 α PI3K [composto 15e o [3-[4-(4-Morpholinyl)thieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl]-phenol] è stato acquistato da Alexis Biochemicals, mentre l'inibitore di p110 β (TGX-221), di p110 γ [5-(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione] e di Akt 1/2 da Calbiochem-Novabiochem. Gli anticorpi contro AKT1 (goat) e AKT2 (mouse) provengono da Santa Cruz Biotechnology. Gli anticorpi contro p110 α , p110 β , and p110 δ PI3K sono stati acquistati da Upstate Biotechnology/Millipore Corporation. Dove non indicato gli anticorpi provengono da Cell Signaling Technology.

Gli anticorpi secondari coniugati alle perossidasi (anti-rabbit e anti-mouse) sono stati forniti dalla Cell Signaling Technology, mentre l'ECL Plus Western Blotting Detection System dalla GE Healthcare.

Gli anticorpi utilizzati per la citometria a flusso sono stati acquistati da Cell Signaling e sono coniugati con AlexaFluor 488 o AlexaFluor 647: anti Ser473 p-Akt, Thr 37/46 p-4E-BP1, o caspasi-3 clivata, (Ser235/236) p-S6RP, Ser63 p-Jun, rabbit IgG AlexaFluor 488.

Gli anticorpi bloccanti contro Fas sono stati forniti dalla Alexis Biochemicals.

3.2. Colture cellulari

Linee cellulari di LAL-T [Molt-4, Jurkat, CEM-S, CEM-R (CEM VBL100, che overesprimono la P-gp [Chiarini et al., 2008]), RPMI-8402, BE-13] sono state coltivate in terreno RPMI-1640 (EuroClone, CELBIO) completato con l'aggiunta di 10% di siero bovino fetale (heat-inactivated fetal calf serum) (FBS, EuroClone, CELBIO) penicillina 100 U/mL (Cambrex Bio Science Walkersville), streptomina 100 mg/mL (Cambrex Bio Science) ed L-glutamina 5 mM (Cambrex Bio Science), mentre blasti leucemici provenienti da pazienti pediatriche affetti da LAL-T sono stati coltivati in RPMI con 20% di FBS. Cellule stromali murine MS-5, sono state coltivate in terreno α -MEM completato con l'aggiunta di 10% di FBS, penicillina e streptomina.

Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di anidride carbonica a una densità cellulare compresa fra 4 x 10⁵ e 1 x 10⁶ cellule/mL.

La resa e la vitalità cellulare sono state valutate mediante colorazione con Eritrosina e conta con emocitometro (camera di Neubauer).

3.3. Co-Culture di cellule leucemiche con cellule stromali

Le cellule Jurkat sono state incubate per 3 ore a 37°C in RPMI + 10% FBS ad una densità di 1×10^6 /mL in co-cultura con cellule stromali MS-5, che erano state prima lavate con PBS per rimuovere il terreno di coltura α -MEM. Dopo l'incubazione sono stati effettuati i trattamenti con i farmaci (Vincristina, NVP-BEZ235), da soli od in combinazione. Dopo 24 h di trattamento, le cellule sono state raccolte, centrifugate e risospese in Binding Buffer contenente Anessina-FITC. Le cellule inoltre sono state colorate con antiCD45, o rispettivo controllo isotipico, per escludere dall'analisi le cellule stromali, e sono state analizzate al citofluorimetro.

3.4. Saggio MTT e valutazione della crescita cellulare in vitro

Il saggio MTT è un saggio colorimetrico che permette di valutare la vitalità di cellule metabolicamente attive. Si basa sulla riduzione del sale di tetrazolio (MTT) a cristalli di formazano. La reazione, in cellule metabolicamente attive, viene catalizzata dall'enzima succinato reduttasi ed utilizza come cofattori NADH e NADPH.

Una volta ottenuti, i cristalli di formazano sono solubilizzati con SDS (sodio dodecilsolfato) e la soluzione derivante viene quantificata misurandone l'assorbanza tramite un lettore ELISA (Bio-Rad).

Le cellule sono state seminate in *multiwell* da 96 pozzetti (Nunc), in un volume finale di 100 μ L ciascuno ed incubate tutta la notte a 37°C in atmosfera umidificata per permetterne la crescita esponenziale. Il giorno seguente, le cellule sono state trattate con le diverse concentrazioni degli inibitori studiati, da soli od in combinazione fra loro, per 24 o 48 h. In ogni esperimento è stato utilizzato un campione di cellule non trattate come controllo. Alla fine dei trattamenti, sono stati aggiunti 10 μ L/campione di MTT labeling reagent (Reagente 1) e le cellule sono state incubate 4h a 37°C, in atmosfera umidificata per permettere la formazione dei cristalli di formazano da parte delle cellule metabolicamente attive. Trascorse le 4 ore di incubazione, le cellule venivano solubilizzate aggiungendo 100 μ L/campione di Solubilization Reagent (Reagente 2) e incubate overnight (O.N.) a 37°C atmosfera umidificata al 5% di anidride carbonica. L'attività metabolica è stata valutata mediante lettura allo spettrofotometro ELISA Reader (Bio-Rad) alla lunghezza d'onda di 570 nm con reference a 655. Ogni campione è stato allestito in triplicato ed in tre esperimenti indipendenti. La frazione di cellule vitali è stata determinata attraverso il rapporto fra la densità ottica media dei campioni trattati e quella del campione di controllo non trattato. La lettura del solo terreno è stata sottratta dalle letture effettuate sui campioni con cellule.

Per determinare la velocità di crescita in vitro, cellule CEM-R e CEM-S sono state seminate ad una densità di 0.3×10^6 /mL, in serie di quattro fiasche di 25 cm² (Falcon), in RPMI 10% FBS. Ogni 24 h, per i successivi quattro giorni, le cellule di una fiasca venivano contate; i tempi di raddoppiamento venivano calcolati nella fase esponenziale di crescita.

3.5. Analisi degli effetti procurati dall'uso combinato di farmaci

Per studiare le possibili interazioni, gli effetti della combinazione tra i farmaci e una possibile sinergia tra i diversi inibitori, è stata effettuata un'analisi quantitativa secondo la teoria della relazione dose-effetto descritta da Chou e Talalay [Chou and Talalay, 1984].

Dall'equazione generale di relazione dose-effetto

$$f_a/f_u = (D/D_m)^m$$

Dove:

D rappresenta il dosaggio del farmaco in esame;

D_m (o IC₅₀) indica la concentrazione di farmaco necessaria per provocare la morte di metà della popolazione cellulare;

f_a la frazione affetta;

f_u la frazione non affetta;

m un esponente che descrive l'andamento della curva.

è possibile ricavare il *combination index* (CI) e l'equazione che permette di calcolarlo.

L'equazione per il calcolo del CI, permette di determinare non solo un effetto additivo fra due o più farmaci, ma anche una sinergia o antagonismo.

Posto che i due farmaci hanno un simile o identico meccanismo d'azione avremo che il

$$CI = (D)_1/(Dx)_1 + (D)_2/(Dx)_2$$

Dove (Dx)₁ e (Dx)₂ sono le dosi dei due farmaci presi singolarmente tali da determinare la frazione affetta x₁ e x₂.

Questo metodo di analisi generalmente fissa i valori di CI compresi tra 0.3 e 0.7 come sinergismo, i valori di CI < 0.3 come forte sinergismo, mentre valori di *combination index* maggiori di 1.1 sono utilizzati per indicare antagonismo.

Per calcolare il CI tra i farmaci nei vari trattamenti combinati è stato utilizzato il programma Calcsyn Biosoft Inhibit Synergy.

3.6. Risultati Statistici

Sui risultati ottenuti dal test di vitalità cellulare è stata, inoltre, eseguita un'analisi statistica per valutarne la significatività. I dati sono stati, infatti, statisticamente analizzati con un test di Dunnett dopo ANOVA (un'analisi di varianza calcolata con il software GRAPH PAD PRISM). I dati mostrati rappresentano la media \pm la deviazione standard (SD).

3.7. Analisi del ciclo cellulare

Per l'analisi del ciclo cellulare le cellule sono state seminate ad una densità di 0.3×10^6 /mL e incubate O.N. in atmosfera umidificata a 37°C per permettere la crescita esponenziale. Il giorno successivo le cellule sono state trattate. Come controllo è stato utilizzato un campione di cellule non trattato.

Al termine dei tempi di trattamento, sono state raccolte e centrifugate a 1000 rotazioni al minuto (r.p.m) per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso in 1 mL di PBS a 4°C ed è stato nuovamente centrifugato a 1000 r.p.m per 10 minuti. Successivamente, il pellet è stato trattato con 1 ml di etanolo al 70% (-20°C) per fissare le cellule e permeabilizzarle così da permettere PI di penetrare nelle cellule e legare il DNA. I campioni sono stati conservati a 4°C per tutta la notte. Il giorno dopo i campioni sono stati centrifugati a 1000 r.p.m per 10 minuti a 4°C, il pellet è stato risospeso in 1 ml/campione di PBS e nuovamente centrifugato alla stessa velocità. Scartato il surnatante, il pellet è stato risospeso in una soluzione contenente PI alla concentrazione finale di 50 µg/ml e RNAsi A. Dopo un'incubazione di almeno 30 minuti al buio, si è proceduti all'analisi del ciclo cellulare per determinare il contenuto di DNA, mediante un citofluorimetro a flusso (CoulterEpics XL/XL-MCL) supportato da un opportuno software (Beckman Coulter Immunology).

3.8. Determinazione dell'apoptosi cellulare

L'apoptosi è stata determinata tramite colorazione con Annessina V-FITC e PI. Questa colorazione si basa sull'osservazione che subito dopo l'inizio dell'apoptosi, in molti tipi cellulari si ha traslocazione della fosfatidilserina (PS) dalla faccia interna della membrana cellulare alla superficie. Una volta esposta, la PS può essere facilmente rivelata per colorazione con un coniugato fluorescente dell'Annessina V, una proteina con alta affinità di legame per la PS e i lipidi di membrana in genere.

E' stata effettuata una doppia colorazione con PI che, intercalandosi nel DNA, è in grado di discriminare i diversi tipi cellulari. Con questa tecnica, infatti, le cellule non vengono permeabilizzate e l'ingresso del PI all'interno della cellula è possibile solo in presenza di danni necrotici alla membrana. L'Annessina V coniugata al FITC emette fluorescenza nel verde, mentre le cellule colorate con PI emettono fluorescenza nel rosso. Il citometro a flusso discrimina le cellule

vive, negative all'Annessina V e al PI, le cellule apoptotiche precoci, positive all'Annessina V, ma non al PI, e quelle in necrosi post-apoptotica, positive ad entrambi i composti. Sono state seminate 0.3×10^6 /mL cellule, incubate in ambiente umidificato a 37°C per permetterne la crescita esponenziale. Il giorno seguente sono state trattate ed incubate a 37°C. E' stato utilizzato come controllo un campione di cellule non trattato. Le cellule sono state quindi raccolte e centrifugate 10 minuti a 1000 r.p.m. Il pellet è stato risospeso in terreno fresco ed è stata eseguita una conta vitale attraverso una colorazione con Eritrosina.

Sono state prelevate 1×10^6 cellule/campione e centrifugate per 5 min a 1200 r.p.m. Il pellet, una volta eliminato il surnatante, è stato lavato in PBS, e risospeso in 1ml di Binding Buffer 1x. Sono stati aggiunti 8µl/campione di Annessina V FITC e si è incubato per 15 min a temperatura ambiente, al buio. Successivamente le cellule sono state centrifugate per 5 min a 1200 r.p.m. e risospese in Binding Buffer. Sono stati aggiunti 5 µg/ml di PI in ogni campione. I campioni sono stati quindi analizzati al citofluorimetro. La fluorescenza che risulta dal FITC e dal PI veniva misurata rispettivamente a 530 e a 620 nm.

3.9. Analisi del fenotipo tramite citometria a flusso

Sono state prelevate 500.000 cellule/campione e centrifugate per 10 min a 1000 r.p.m. e lavate in PBS. Le cellule sono state quindi fissate con il Reagente 1 dell'Intraprep kit (Beckman Coulter Immunology) per 20 min a temperatura ambiente, permeabilizzate, dove richiesto, con il Reagente 2, incubate O.N. a 4°C con l'anticorpo primario coniugato con Alexa Fluor in 0,5% BSA in PBS. Dopo l'incubazione con l'anticorpo le cellule sono state lavate in PBS ed analizzate al citofluorimetro. Sono stati analizzati circa 10000 eventi per ogni campione.

3.10. Analisi della side population (SP) in cellule di LAL-T tramite citometria a flusso

Le cellule sono state risospese ad una densità di 1×10^6 /ml in RPMI 1640 + 2% FBS ed è stato aggiunto il colorante Hoechst 33342, ad una concentrazione finale di 5 µg/ml, in presenza/assenza di Fumitremorgin c. Le cellule sono state incubate a 37°C per 90 minuti, in seguito lavate con PBS + 2% FBS e risospese in PBS. In alcuni esperimenti, le cellule sono state preincubate con un anticorpo contro ABCG2 coniugato con ficoeritrina (PE) e relativo controllo isotipico. Dopo 20 min di incubazione, le cellule sono state lavate e processate per la colorazione con Hoechst 33342.

I campioni sono stati analizzati con un citofluorimetro Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter Immunology) equipaggiato con una lampada UV ed un laser 488. L' Hoechst 33342 è stato eccitato ad una lunghezza d'onda di 366 nm. Le cellule della SP sono state plottate in un istogramma FL1/FL3, mentre la marcatura delle stesse con l'anticorpo contro ABCG2 è stato valutata nel canale di fluorescenza FL2.

3.11. Analisi immunocitochimiche

L'analisi immunocitochimica si basa sul legame di un anticorpo primario ad una specifica proteina da analizzare; la formazione del legame viene visualizzata attraverso un anticorpo secondario coniugato con un fluorocromo. Mediante l'emissione della fluorescenza, visibile attraverso un microscopio a fluorescenza, è possibile stabilire la localizzazione delle proteine nei diversi compartimenti cellulari.

Le cellule CEM sono state raccolte e centrifugate ad una densità di 3×10^5 cellule/ml e poste su vetrini, attraverso l'utilizzo del Shandon Cytospin (Thermo Electron Corporation) a bassa accelerazione (800 r.p.m./min per 5 min). I campioni sono stati poi fissati in formaldeide al 4% in PBS, pH 7.4, per 10 min a temperatura ambiente e, se richiesto, permeabilizzati con una soluzione allo 0.2% Triton X-100 in PBS per 5 min. Dopo 2 lavaggi in PBS, I vetrini sono stati saturati in PBS/5% BSA per 1 h a temperatura ambiente.

A-Caspasi-3 clivata: Le cellule sono state trattate come sopra e incubate con un anticorpo primario contro la caspasi-3 clivata (Cell Signaling Technology), e in seguito un anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con FITC.

B-Colocalizzazione del citocromo C e del complesso V mitocondriale: E' stata effettuata una doppia marcatura con anticorpo contro il citocromo C (isotipo IgG2a, con un anticorpo secondario goat anti-mouse IgG2a coniugato con FITC) e con un anticorpo anti-Complesso V (isotipo IgG2b, con un anticorpo secondario goat anti-mouse IgG2b coniugato con Texas Red).

C-Analisi dei lipid rafts: I campioni sono stati incubati con 8 µg/ml FITC-CTx B subunit in PBS/1% BSA O.N. a 4 °C al buio, poi lavati 3 volte in PBS. Per gli esperimenti di colocalizzazione con Fas, i campioni sono stati incubati anche con 500 ng/ml di anticorpo contro Fas (SM1/1, IgG2a) a 4 °C. I campioni sono poi stati marcati con un anticorpo secondario coniugato con Cy3. Per visualizzare i nuclei, i campioni sono stati incubati per 1 minuto con 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, 0.5 µg/ml). I vetrini sono stati infine analizzati con un microscopio Zeiss Axio Imager con un ingrandimento 40x/NA 0.75.

3.12. Western blotting

Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 1500 r.p.m. per 5 min a 4°C. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet, lavato con 1 ml di 1X PBS contenente 5 mM EDTA, è stato trasferito in tubi da 1.5 ml e centrifugato a 13.200 r.p.m. per 1 min. Una volta eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso nel tampone di lisi Gold Lysis Buffer (GLB) composto da:

- 20 mM Tris pH 7.5
- 137 mM NaCl
- 5 mM EDTA
- 1% Triton X-100
- 15% glicerolo

e addizionato dei seguenti inibitori (GLB+):

- Inibitore di serina/treonina fosfatasi (PPI) composto da 1 mM EDTA, 10 mM sodio fluoruro, 1 mM Na₄PPI, 0.1 mM beta-glicerofosfato
- 10 µg/ml Aprotinina (inibitore di proteasi)
- 10 µg/ml Leupeptina (inibitore di proteasi)
- 0.1 mM sodio ortovanadato (Na₃VO₄) (inibitore di tirosina fosfatasi)
- 1 mM PMSF (inibitore di proteasi)

I lisati sono stati incubati in agitazione (750 r.p.m.) per circa 1 h a 4°C e quindi centrifugati per 10 minuti a 13200 r.p.m. per rimuovere i detriti. Il surnatante contenente il lisato proteico è stato raccolto e si è proseguito con la determinazione della concentrazione proteica. La quantificazione delle proteine presenti nei vari campioni è stata realizzata con l'impiego del Kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad) che si basa sul dosaggio colorimetrico (metodo di Lowry). Utilizzando tale tecnica, assieme all'analisi dei campioni è necessario realizzare anche una curva di taratura che fornisca una relazione matematica tra i valori di assorbanza ottenuti e le concentrazioni corrispondenti. Tale curva è stata costruita utilizzando concentrazioni note e crescenti di BSA in tampone di lisi. Nella determinazione proteica si è lavorato in multiwell da 96 pozzetti. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 1 µl di campione e 19 µl di acqua bidistillata, mentre per realizzare la curva di taratura in ciascun pozzetto si sono aggiunti 0, 1, 2, 4, 6 e 8 µl di BSA (soluzione stock 1 mg/ml), 1 µl di GLB+ e acqua bidistillata fino ad un volume di 20 µl. A questo punto, in tutti i pozzetti si sono addizionati i vari reagenti del Kit *DC Protein Assay* come da protocollo: 25 µl di una miscela di reagente A (soluzione alcalina) + reagente S (in un rapporto di 20 µl di reagente S per ml di reagente A) e 200 µl del reagente B (diluizione del Reagente di Folin). Il tutto è stato incubato al buio e in agitazione per circa 15-30 minuti. La successiva lettura allo spettrofotometro ($\lambda = 655 \text{ nm}$) ha consentito la costruzione di una curva di taratura utilizzando i valori noti di concentrazione e assorbanza della BSA; da tale curva è poi stato possibile ricavare le concentrazioni proteiche dei vari campioni in funzione delle loro assorbanze. Per ogni lisato proteico sono stati caricati su gel 50 µg di proteine. I campioni sono stati preparati per il caricamento portandoli tutti allo stesso volume finale mediante aggiunta di GLB+ e addizionando a ciascuno 5X Protein Sample Buffer (20% glicerolo, 10% SDS, 2% *beta*-mercaptoetanolo, 0.5% blu di bromofenolo, 250 mM Tris, pH 6.8). I campioni sono poi stati bolliti per 5 min, brevemente centrifugati e quindi sottoposti ad analisi mediante Western blotting.

I lisati proteici sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide in sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) per ottenere la separazione delle proteine in base alle loro dimensioni. Al termine della corsa elettroforetica, le proteine presenti nel gel sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa utilizzando come metodo di trasferimento l'elettroblotting.

Il trasferimento è avvenuto su membrane di nitrocellulosa Hybond-ECL (Amersham) utilizzando un Semi-dry Transblotter (Sigma-Aldrich Corporation) e 1X Transblotting Buffer composto da 10%

metanolo, 25 mM Tris, 200 mM glicina e acqua distillata. Il tutto è stato realizzato all'amperaggio costante di 400 mAmps per circa 2 h. Prima di procedere con la fase d'immunoblotting, l'effettivo trasferimento delle proteine sulla membrana è stato accertato mediante colorazione della stessa con Rosso Ponceau.

Le membrane sono state decolorate con 1X PBS contenente 0.05% Tween-20 (PBS/T) e incubate a 4°C per 1 h in un tampone di saturazione composto da 5% di latte scremato (non-fat dry milk) in PBS/T. I blots sono poi stati lavati tre volte in PBS/T e incubati overnight a 4°C nell'anticorpo primario diluito in 5% BSA in PBS/T.

Terminata l'incubazione, le membrane sono state lavate tre volte con PBS/T e poi incubate per 2h con anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (HRP) diluito 1:2000 in 5% latte scremato in PBS/T. Per ciascun anticorpo primario si è utilizzato uno dei due secondari @-rabbit:HRP o @-mouse:HRP. I blots sono poi stati lavati tre volte in PBS/T e visualizzati utilizzando la tecnica dell'ECL.

Le bande corrispondenti alle varie proteine d'interesse sono state impressionate su lastre fotografiche (Kodak) e la loro intensità è stata stimata mediante analisi densitometrica utilizzando il software Image J.

3.13. Immunoprecipitazione

L'immunoprecipitazione è stata condotta su cellule in fase logaritmica di crescita. In seguito all'estrazione delle proteine totali e alla determinazione della concentrazione proteica, due volumi di campione corrispondenti a 500 µg di proteine sono stati trasferiti in tubi da 1.5 ml per essere sottoposti ad immunoprecipitazione, mentre 100 µg di proteine sono stati trasferiti in un terzo tubo per essere utilizzati come controllo. A quest'ultimo campione, infatti, si sono aggiunti direttamente GLB+ e 5X protein sample buffer ed è stato conservato a -20°C fino al momento della SDS-PAGE. A ciascuno degli altri due campioni si sono aggiunti 25 µl di Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e 200 µl di GLB+ e il tutto è stato posto in camera fredda e in rotazione per due ore. Questa fase aveva lo scopo di immunoprecipitare le proteine cellulari in grado di formare legami aspecifici con le proteine A/G. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 13200 r.p.m. a 4°C per 1 min e i surnatanti sono stati trasferiti in due nuovi tubi ai quali si sono aggiunti per ciascun campione 5 µL degl'anticorpi di interesse e 25 µL di Protein A/G PLUS-agarose

Entrambi i campioni sono stati incubati O.N. a 4°C in rotazione. Il giorno successivo, i complessi antigene-anticorpo sono stati precipitati mediante centrifugazione a 13200 r.p.m. per 1 min a 4°C. I pellet così ottenuti hanno subito 4 lavaggi con 500 µl di GLB+ al termine dei quali ogni pellet è stato risospeso in 20 µl di GLB+ e addizionato di 5X protein sample buffer. I campioni dell'immunoprecipitazione ed il controllo sono stati bolliti 5 min, centrifugati e analizzati mediante

SDS-PAGE seguita da immunoblotting. I blots del controllo e dei campioni immunoprecipitati con gli anticorpi sono stati incubati con gli anticorpi primari. Per entrambi gli anticorpi primari si sono utilizzate diluizioni di 1:1000 in 5% BSA in PBS/T, mentre il secondario anti-rabbit:HRP è stato diluito 1:2000 in 5% latte scremato in PBS/T.

3.14. Frazionamento mitocondriale

Almeno 20×10^6 cellule sono state seminate in fiasche. In seguito al trattamento, le cellule sono state raccolte, centrifugate, lavate in PBS e risospese in una soluzione di lisi composta da:

- Hepes-KOH pH 7.5 20 mM
- MgCl_2 1.5 mM
- KCl 10 mM
- EDTA 1mM
- EGTA 1 Mm
- PMSF 1mM
- Leupeptina $10 \mu\text{g/mL}$
- Aprotinina $10 \mu\text{g/mL}$
- Saccarosio 0.25 M

Sono stati effettuati 6 passaggi in siringa da 20G e l'omogenato è stato centrifugato a 750g per 10 min. Il surnatante è stato raccolto e centrifugato nuovamente a 10000 g per 25 minuti a 4°C ; il pellet mitocondriale è stato risospeso in $50 \mu\text{L}$ di tampone di lisi composto da:

- Tris-HCl pH 7.4 20 mM
- NaCl 100 mM
- Triton-X 100
- PMSF 1 mM
- Leupeptina $10 \mu\text{g/mL}$
- Aprotinina $10 \mu\text{g/mL}$

Il surnatante è stato utilizzato per la preparazione della frazione citosolica concentrata attraverso l'utilizzo di Microcon YM-10 Centrifugation Filter Device Millipore (Millipore Corporation) ed è stato centrifugato a 14000 g per 30 minuti a temperatura ambiente. La concentrazione proteica è stata quantificata con il metodo di Lowry.

3.15. Silenziamento genico con small interfering RNA (siRNA)

Le cellule sono state trasfettate con il metodo della nucleofezione (Amaxa Inc.), ed è stato utilizzato il kit C ed il programma X-001, seguendo le istruzioni della ditta produttrice. 5×10^6 cellule/campione sono state trasfettate con $2 \mu\text{g}$ di JNK small interfering RNA (siRNA) (sc-29380; Santa Cruz Biotechnology) o di controllo aspecifico (siCONTROL riscfree no. 1; Dharmacon).

Dopo 72 h, le cellule sono state in parte utilizzate per l'analisi in Real-Time PCR ed in parte lisate per l'analisi in western blotting al fine di valutare i livelli di espressione di JNK.

3.16. Estrazione dell'RNA e sintesi del cDNA

L'RNA totale è stato isolato dalle linee cellulari CEM-R e CEM-S, usando il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen Ltd) secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. Le tracce di DNA genomico sono state eliminate trattando i campioni con DNAsi I (Qiagen Ltd). Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 500 ng di RNA totale usando 200U di M-MLV retrotrascrittasi, 0.5 µg di Primers oligodT, 25U di inibitore delle ribonucleasi, dNTPs alla concentrazione di 10 mM per 1 h a 42°C.

3.17. Real-Time PCR con sonde TaqMan

L'espressione genica è stata quantificata attraverso un metodo di Real-Time PCR e l'uso di sonde TaqMan specifiche per il gene di MDR1 (Hs00184491_m1 Applied Biosystems). Inoltre, è necessario avere un gene di riferimento, la cui espressione deve essere il più possibile stabile e non variare in seguito al trattamento. Quindi, per stabilire quale fosse il gene *housekeeping* più adatto, è stata eseguita una reazione utilizzando una piastra fornita dalla ditta Applied Biosystems che contiene 11 geni comunemente usati come riferimento. Da tale indagine è risultato che il gene più adatto ad essere usato come riferimento fosse quello che codifica per la gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH, Assay n°Hs99999905_m1, Applied Biosystems). La linea cellulare CEM-S è stata invece utilizzata come ulteriore controllo per l'affidabilità e riproducibilità del metodo, dato che è noto che tale linea cellulare non esprime il gene di interesse. L'amplificazione è stata condotta caricando ogni campione su una piastra da 96 pozzetti (MicroAmp Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems) con volume totale di reazione di 25 µl. La corsa di Real-Time PCR è stata effettuata su uno strumento ABI Prism 7300 SDS (Applied Biosystems) impostando le seguenti condizioni di amplificazione: 50°C 2 minuti, 95°C 10 minuti seguiti da 40 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto. L'analisi quantitativa è stata eseguita tramite il metodo $\Delta\Delta Ct$, mentre il software GraphPad Prism (v. 3.0) ha permesso di effettuare un'analisi statistica sui risultati ottenuti.

3.18 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Come sonda per il saggio è stato usato un oligonucleotide sintetico contenente la sequenza di legame per AP1, 5' – CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA – 3' (Santa Cruz Biotechnology). La sonda è stata marcata con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer) usando la T4 polinucleotide chinasi. Dieci µg di estratto nucleare sono stati utilizzati per ogni reazione di legame e la reazione

è stata fatta avvenire in una miscela contenente 10 nmol di oligo AP1 marcato, 1 µg di poly(dI-dC), 10 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 5% glicerolo, 1 mM DTT, 1 mM EDTA per 30 min a temperatura ambiente. Dove indicato, gli estratti venivano preincubati con 0.7 pmol di competitore aspecifico E2F1 o con 0.7 pmol di sonda per AP1 non marcata, per 10 min a temperatura ambiente. I complessi DNA-proteina sono stati separati su un gel di poliacrilammide non denaturante al 4% e visualizzati tramite autoradiografia.

RISULTATI

4.1. Inibizione AKT-specifica con Perifosina

4.1.1. La Perifosina riduce l'attività metabolica e induce apoptosi caspasi-dipendente in cellule di LAL-T CEM

Le cellule CEM mostrano un elevato stato di fosforilazione di AKT, in quanto sono caratterizzate dall'assenza di PTEN. Al fine di determinare se il trattamento con Perifosina fosse efficace nell'indurre una diminuzione della sopravvivenza ed un aumento dell'apoptosi, le cellule CEM-R e CEM-S sono state incubate con concentrazioni crescenti del farmaco per 24. Come mostrato in Figura 4.1, la Perifosina ha causato una diminuzione dose dipendente dell'attività metabolica in entrambe le linee cellulari analizzate, con IC₅₀ di 6.8 μ M per le CEM-S e 19.3 μ M per le CEM-R. Questa differenza potrebbe essere dovuta al diverso livello di fosforilazione di AKT. Analisi in seguito è stato poi verificato se la diminuzione della sopravvivenza fosse in relazione ad un aumento dell'apoptosi: in seguito al trattamento con Perifosina (7 μ M per le CEM-S, 20 μ M per le CEM-R) per 6 h, circa il 50% delle cellule risultava positivo alla colorazione con Annessina-V/PI.

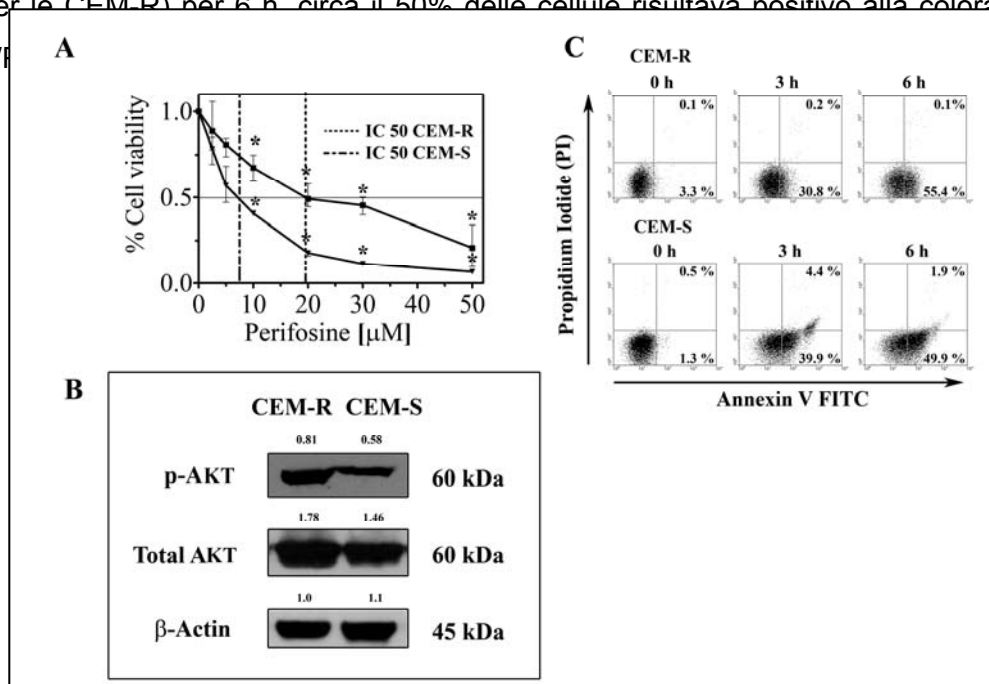


Figura 4.1. La Perifosina induce citotossicità ed apoptosi in cellule CEM. A: saggio MTT su CEM-R e CEM-S dopo 24 h di trattamento con Perifosina. I risultati sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti \pm Deviazione Standard (SD). L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p < 0.005$) rispetto alle cellule non trattate. B: analisi in western blot di Ser473 p-AKT e Akt totale nelle linee cellulari CEM-R e CEM-S. I numeri sono il risultato dell'analisi densitometrica. C: colorazione con Annessina V FITC/PI: le cellule sono state trattate con Perifosina (20 μ M e 7 μ M rispettivamente per CEM-R e CEM-S) per i tempi indicati.

L'effetto della Perifosina sulla proliferazione è stato analizzato anche a lungo termine, eseguendo delle curve di crescita a 72 h. Come mostrato in figura 4.2, se il farmaco non veniva somministrato nuovamente dopo 24 h di incubazione, si verificava un lieve aumento della proliferazione in entrambe le linee cellulari analizzate, al contrario, se il farmaco veniva somministrato nuovamente, era in grado di inibire completamente la proliferazione di entrambe le linee cellulari fino a 72 h (Figura 4.2).

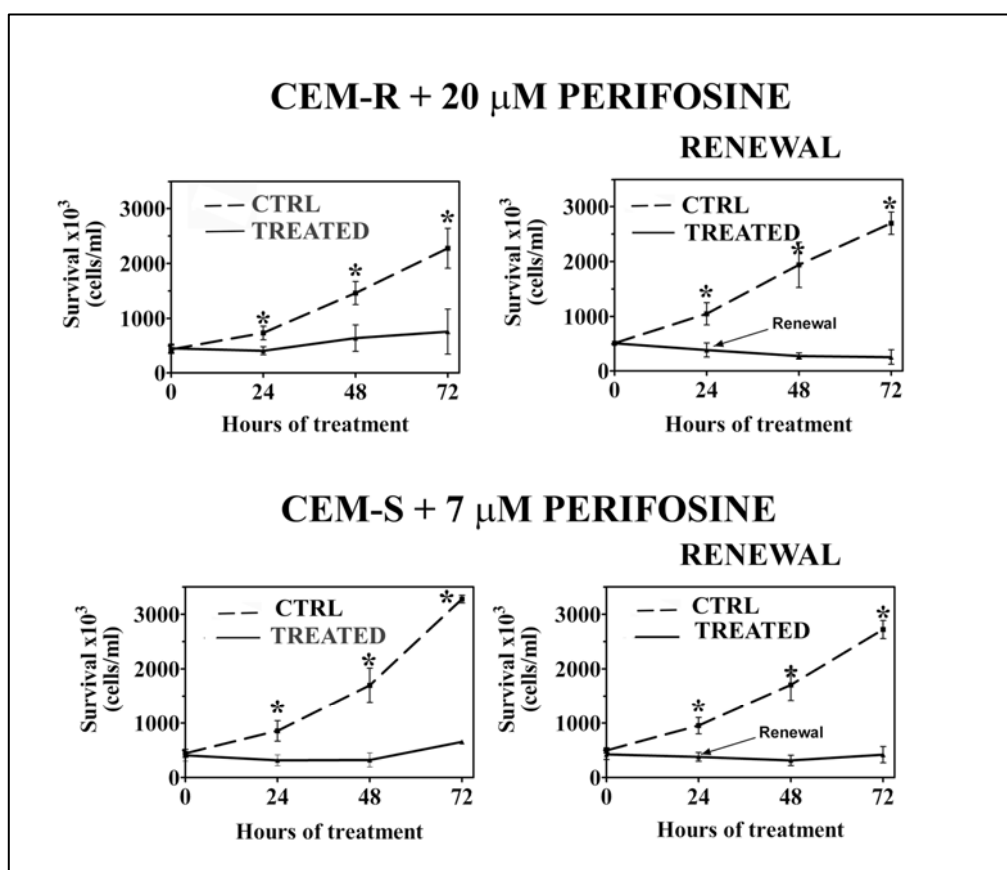


Figura 4.2. La Perifosina influenza negativamente la velocità di crescita delle linee cellulari CEM. 3×10^5 cellule sono state seminate in fiasche da 25 cm^2 ; le curve di crescita sono state determinate attraverso la conta diretta delle cellule in presenza di Trypan Blue, dopo 5 giorni di trattamento. I risultati sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti \pm SD. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p < 0.005$) rispetto alle cellule non trattate (CTRL).

Recenti studi hanno mostrato come la Perifosina sia stata in grado di indurre apoptosi caspasi-dipendente in cellule di LAL-T Jurkat. Tuttavia è noto come cellule che overesprimono la P-gp, abbiano una minore attivazione delle caspasi. Abbiamo quindi voluto valutare l'effetto della Perifosina sulle cellule CEM-R, che overesprimono la P-gp. Come mostrato in Figura 4.3, analisi in western blotting hanno evidenziato un clivaggio nei caratteristici frammenti di 43/41 kDa della procaspasi apicale 8 ed inoltre l'attivazione della caspasi 9 e della caspasi 3, e questo effetto era

evidente già dopo 3 h ore di trattamento con 20 μ M Perifosina. L'attivazione della caspasi 3 è risultata anche nel clivaggio dei suoi substrati PARP e Bid ed è stata confermata da analisi in immunocitochimica (Figura 4.3).

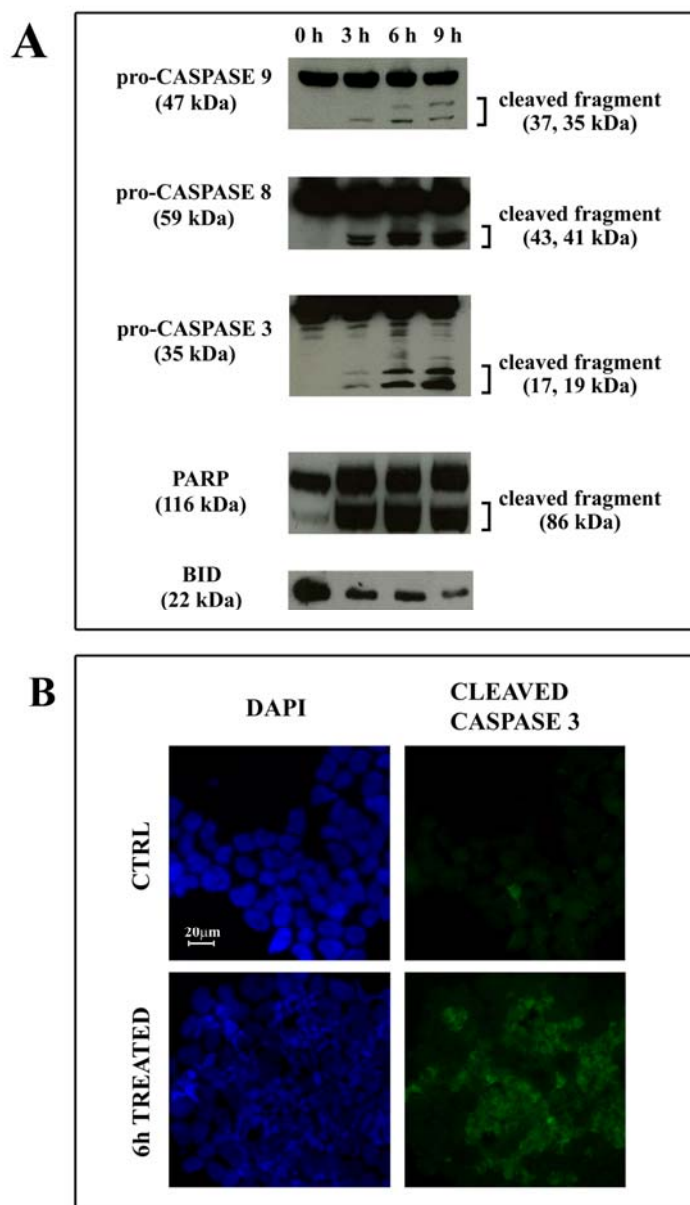


Figura 4.3. Il trattamento con Perifosina induce attivazione dell'apoptosi estrinseca ed intrinseca attraverso il clivaggio delle caspasi, di PARP e di BID in cellule CEM-R. A: analisi in western blot mostrano il clivaggio della caspasi-8, caspasi-9, caspasi-3, Bid and PARP in risposta a 20 μ M Perifosina. B: analisi in immunofluorescenza mostrano il clivaggio della caspasi-3 in cellule CEM-R, trattate 6 h con 20 μ M Perifosina. Le cellule sono state incubate con un anticorpo specifico per la caspasi-3 clivata sul residuo Asp175, poi rilevato tramite un anticorpo secondario coniugato con FITC. I nuclei sono stati colorati con DAPI.

La Perifosina ha indotto in cellule CEM-R l'attivazione del pathway intrinseco mitocondriale, attraverso il clivaggio della caspasi 9 e di Bid (Figura 4.3). Ciò è stato anche dimostrato attraverso una doppia marcatura in immunocitochimica nella quale è stato marcato il citocromo c ed il complesso V, localizzato a livello mitocondriale. Nelle cellule non trattate i 2 marcatori co-localizzavano, mentre in seguito al trattamento con il farmaco, le fluorescenze verde e rossa erano completamente separate, indicando la fuoriuscita del citocromo c dal mitocondrio. Analisi in western blotting sulla frazione mitocondriale isolata, hanno confermato l'effetto del farmaco nell'indurre l'attivazione dell'apoptosi intrinseca. Infatti si otteneva una forte diminuzione del citocromo c, mentre il marcatore mitocondriale utilizzato, COX IV, non mostrava variazioni di espressione (Figura 4.4)

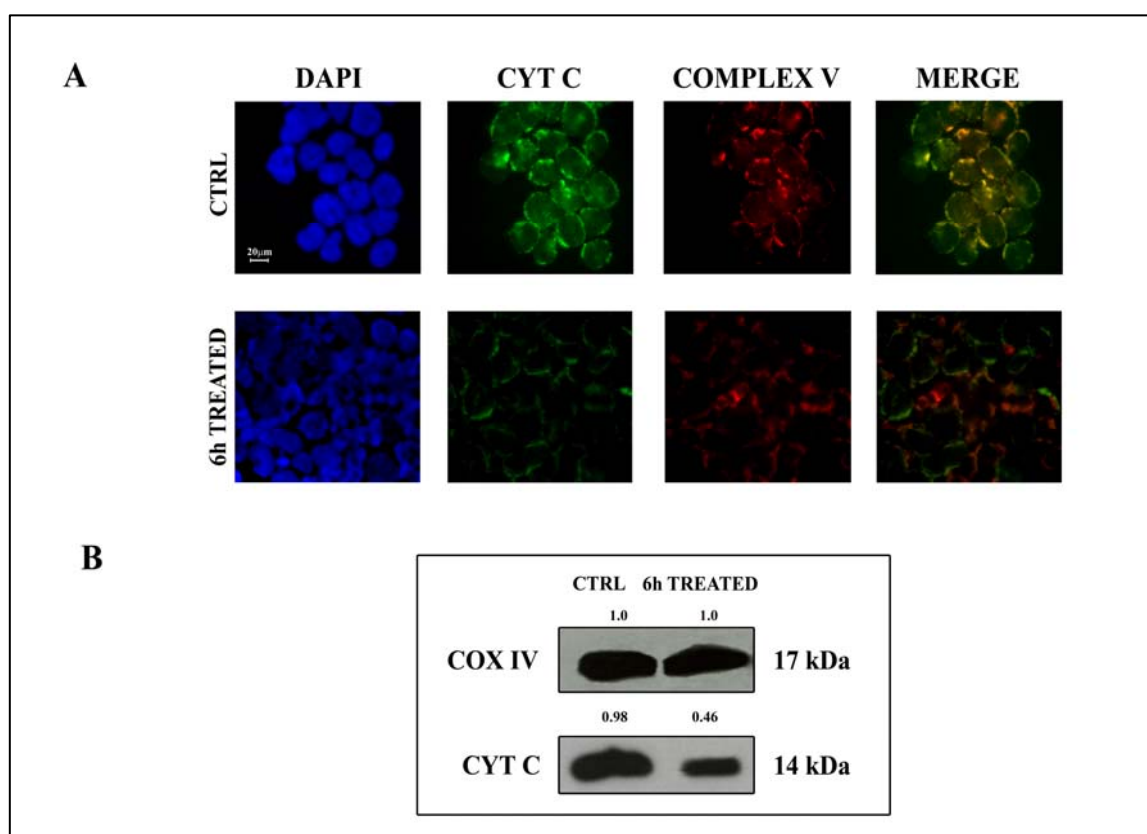


Figura 4.4. Il trattamento con Perifosina induce il rilascio del citocromo C dai mitocondri. A: analisi in doppia immunofluorescenza: le cellule CEM-R controllo (CTRL) e trattate con Perifosina (6 h con 20 μ M) sono state fissate, permeabilizzate e incubate con un anticorpo contro il citocromo C (cyt. c, verde) e un anticorpo contro il complesso V mitocondriale (rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI. B: analisi in western blot effettuate sulla frazione mitocondriale. Le membrane sono state incubate con un anticorpo contro il complesso IV, marcatore mitocondriale, e contro il citocromo C.

4.1.2. La citotossicità causata dalla Perifosina nelle cellule CEM-R dipende dall'integrità dei lipid rafts e dal legame FasL/Fas

Recenti studi hanno evidenziato che, nelle cellule di MM, l'apoptosi indotta dalla Perifosina dipende dal reclutamento del recettore Fas/CD95, della proteina FADD e della procaspasi 8 nei lipid rafts, portando alla formazione del complesso DISC (death inducing signaling complex). Attraverso analisi immunocitochimiche (Figura 4.5), abbiamo dimostrato che, in risposta al trattamento con Perifosina, nelle cellule CEM-R si otteneva un aumento della co-localizzazione della tossina colerica (che si lega al ganglioside GM1, localizzato prettamente a livello dei lipid rafts), con Fas. Inoltre, bloccando il recettore di Fas con un anticorpo monoclonale, si otteneva una diminuzione dell'apoptosi indotta dalla Perifosina, come dimostrato dalle analisi con Annessina V/PI (Figura 4.5). E' stato analizzato l'effetto della disgregazione dei lipid rafts sull'apoptosi mediata dalla Perifosina, attraverso il trattamento delle cellule con MCD, una molecola in grado di indurre una deplezione di colesterolo nei lipid rafts. Il trattamento è risultato nella disgregazione dei lipid rafts, come mostrato nelle analisi immunocitochimiche. Ciò ha suggerito che nelle CEM-R, la morte cellulare sia almeno in parte dipendente dall'integrità dei lipid rafts e dall'interazione Fas/FasL.

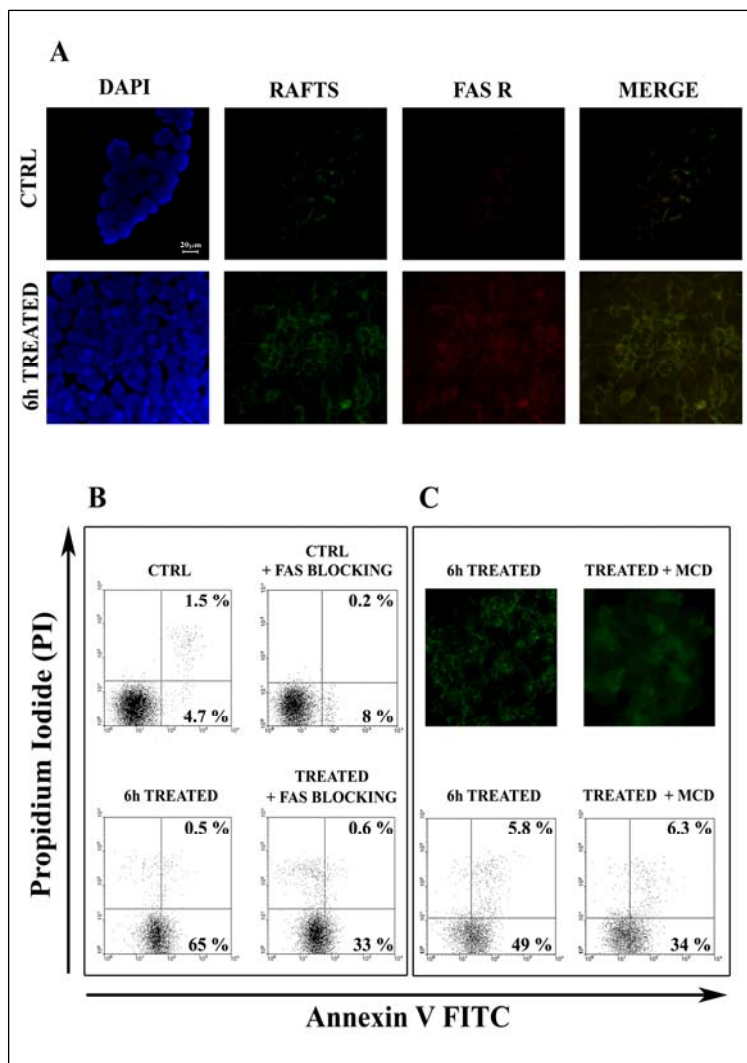


Figura 4.5. Il trattamento con Perifosina è almeno in parte dipendente dall'interazione Fas/FasL e dall'integrità dei lipid rafts. A: analisi in immunofluorescenza di cellule CEM-R, controllo (CTRL) e trattate con Perifosina (20 μ M per 6 h). I campioni sono stati incubati con FITC-CTx B (FITC-labeled cholera toxin-B, verde) ed un anticorpo monoclonale contro Fas (SM1/1) IgG2a, poi rivelato con un anticorpo secondario coniugato con CY3 (rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI. B: colorazione con Annessina V FITC/PI di cellule CEM-R, controllo (CTRL) e trattate con Perifosina (20 μ M per 6 h) in presenza/assenza di un anticorpo monoclonale che blocca di Fas. C: analisi in immunofluorescenza della disgregazione dei lipid rafts in cellule trattate con Perifosina in presenza/assenza di MCD.

4.1.3. Il trattamento con Perifosina induce una diminuzione dei livelli di pAKT in cellule CEM-R

L'analisi proteica in western blotting con anticorpi fosfo-AKT specifici, ha dimostrato nelle cellule CEM-R una completa defosforilazione della Ser473 di AKT, già dopo 6 h di incubazione. Invece si è riscontrata ancora una lieve fosforilazione della Thr308, dopo 24 h ore di incubazione, mentre l'attivazione della via di sopravvivenza di ERK 1/2 (p44/42) chinasi non sembrava variare in misura significativa in seguito al trattamento (Figura 4.6).

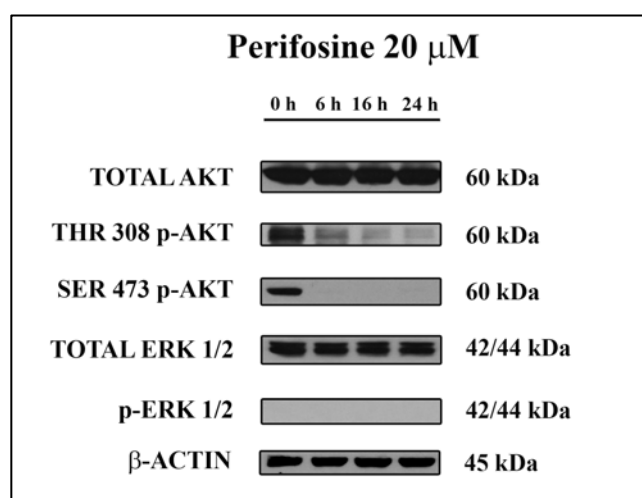


Figura 4.6. Il trattamento con Perifosina induce una defosforilazione di AKT in cellule CEM-R.

Analisi in western blot di cellule CEM-R trattate a diversi tempi crescenti con 20 μ M Perifosina. I lisati cellulari totali sono stati analizzati in SDS-PAGE, trasferiti su membrane di nitrocellulosa e successivamente sono stati testati i vari anticorpi indicati. I pesi molecolari degli antigeni sono indicati sulla destra.

4.1.4. La Perifosina attiva JNK e c-Jun nelle cellule CEM-R

Dati di letteratura avevano messo in evidenza come JNK fosse un altro mediatore importante nel processo apoptotico mediato dalla Perifosina in cellule di MM. Quindi è stato investigato se ciò avvenisse anche nel nostro modello cellulare. Quando le cellule venivano preincubate con un inibitore di JNK (SP600125) e poi trattate per 6 h con Perifosina, si riscontrava una marcata diminuzione dell'apoptosi nelle cellule CEM-R (Figura 4.7). Inoltre la Perifosina causava un forte incremento della fosforilazione di JNK sui residui Thr 183/Tyr 185, come mostrato dalle analisi in western blot, specialmente dopo 6 h di trattamento. La fosforilazione di JNK portava alla fosforilazione di c-Jun sulla Ser63, come mostrato dalle analisi in citometria a flusso (Figura 4.7).

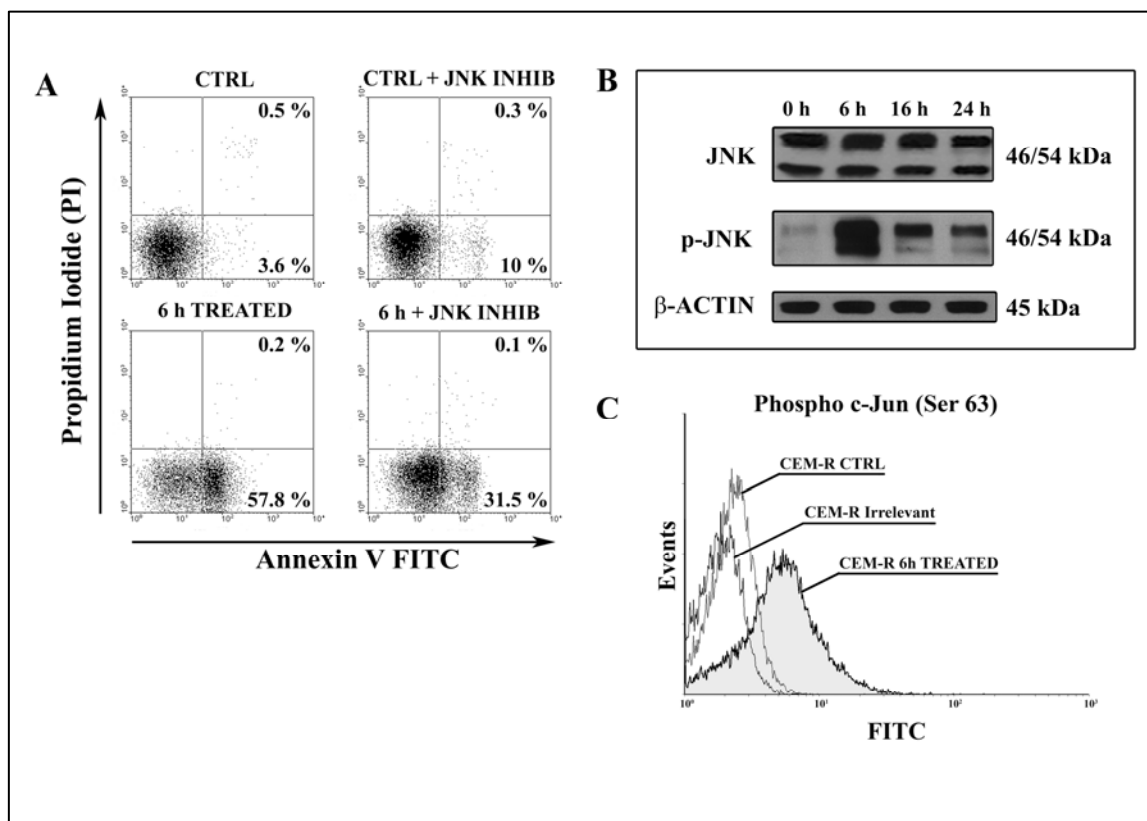


Figura 4.7. La citotossicità della Perifosina è dipendente dall'attivazione di JNK e di c-Jun in cellule CEM-R. A: colorazione con Annessina V FITC/PI di cellule CEM-R, trattate con Perifosina (20 μ M per 6 h) in presenza/assenza dell'inibitore di JNK (SP600125, 10 μ M). B: analisi in western blot dell'espressione di JNK totale e fosforilato (Thr183/ Tyr185 p-JNK) in cellule CEM-R, trattate con Perifosina (20 μ M) per i tempi indicati. C: analisi citofluorimetriche dell'espressione di Ser63 p-c-Jun. Le cellule CEM-R sono state trattate con Perifosina per 6 h, incubate con un anticorpo primario contro p-c-Jun (Ser63) e rivelato con un anticorpo secondario coniugato con FITC. Almeno 15000 eventi sono stati analizzati.

4.1.5. La Perifosina causa una diminuzione dell'espressione genica di MDR-1 e promuove l'attività di legame al DNA di AP1, attraverso l'attivazione di JNK

Abbiamo determinato se il trattamento con Perifosina influenzasse l'espressione della P-gp. Analisi in RT-PCR hanno mostrato che la trascrizione del gene di MDR-1 (o ABCB1) era significativamente ridotta in seguito a trattamento con il farmaco a 6 h (Figura 4.8). Al contrario, il trattamento con l'inibitore di JNK SP600125, contrastava la modulazione negativa della trascrizione di MDR-1. Cellule in cui veniva silenziato il gene che codificava per JNK, attraverso l'utilizzo di uno small interference RNA (siRNA), non mostravano la diminuzione dei livelli di mRNA di MDR-1 indotta dalla Perifosina (Figura 4.8).

Il promotore del gene di MDR-1 contiene un sito di legame per AP1, che funziona come elemento negativo nella regolazione dell'espressione genica.

Attraverso un saggio EMSA, è stata valutata l'attivazione di AP1, in seguito al trattamento con Perifosina in cellule CEM-R. Come mostrato in figura, dopo 6 h di trattamento, l'attività di legame di AP1 aumentava rispetto alle cellule non trattate, mentre in cellule pretrattate con l'inibitore di JNK si perdeva l'aumento della attività di AP1, indotto dal trattamento. Attraverso un supershift assay è stato dimostrato come l'aggiunta dell'anticorpo contro c-Jun facesse scomparire totalmente la banda di AP1 (Figura 4.8). La specificità è stata inoltre dimostrata attraverso la preincubazione con la sonda per AP1 non marcata.

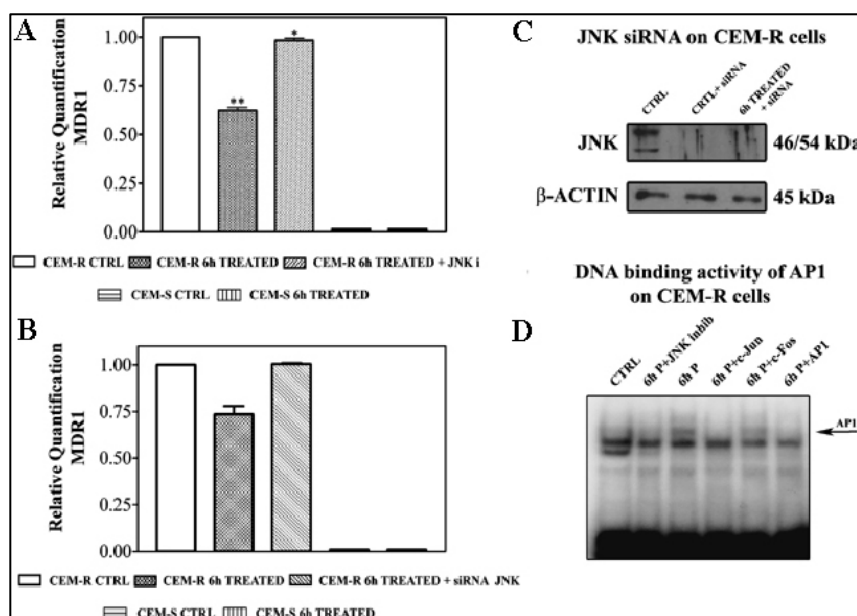


Figura 4.8. La Perifosina modula negativamente l'espressione genica di MDR1 e promuove l'attività di legame al DNA di AP1, attraverso l'attivazione di JNK. A: Real time (RT) PCR di cellule trattate con l'inibitore di JNK (SP600125). Un asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p < 0.001$) rispetto alle cellule non trattate. Due asterischi indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0.001$) rispetto a cellule trattate con Perifosina da sola. B: RT PCR di cellule CEM-R, trattate con siRNA di JNK. CEM-R CTRL e CEM-R 6 h TREATED sono state trasfettate con 2 μ g di siRNA controllo. C: analisi in western blot della modulazione di JNK, in seguito al silenziamento genico di JNK. Le cellule sono state trasfettate per 72 h, poi trattate con Perifosina (20 μ M per 6 h) ed infine lisate per l'analisi proteica. D: valutazione dell'attivazione di AP1, in seguito al trattamento con Perifosina in cellule CEM-R tramite saggio EMSA.

4.1.6. La Perifosina modula negativamente l'espressione e l'attività della P-gp

Nelle cellule CEM-R, l'espressione proteica della P-gp ha subito un forte calo in seguito al trattamento con Perifosina. Analisi dell'espressione dell'antigene in membrana, mostravano un calo soprattutto dopo 16 h di trattamento (Figura 4.9, B). Infine, mediante un saggio di funzionalità della pompa di membrana, si è visto come già a 6 h di trattamento con Perifosina vi fosse una marcata diminuzione dell'attività di estrusione della pompa. Tutti questi dati mostrano come il farmaco sia stato in grado di agire modulando sia l'espressione genica, l'espressione proteica e la funzionalità della pompa AP1 (Figura 4.9).

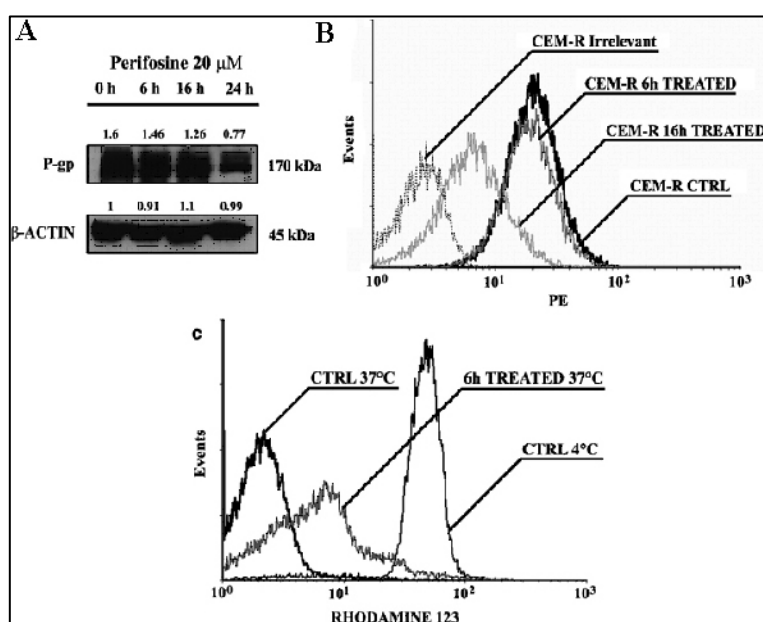


Figura 4.9. La Perifosina modula negativamente l'espressione proteica e la funzionalità della P-gp. A: analisi in western blot dell'espressione della P-gp in cellule CEM-R, trattate con Perifosina. B: analisi citofluorimetriche della funzionalità della pompa. Il saggio è basato sull'estrusione della Rodamina 123, un substrato fluorescente della pompa. L'attività di efflusso è fortemente inibita a basse temperature. Cellule preincubate con Rodamina 123 e incubate a 4°C trattengono all'interno della cellula il colorante, mostrando un'alta fluorescenza. In cellule incubate a 37°C invece si ha l'efflusso del colorante. Cellule CEM-R, trattate con Perifosina (6 h a 37°C) hanno mostrato una forte diminuzione dell'attività di efflusso della pompa.

4.2. Doppia inibizione di PI3K/mTOR: PI-103

4.2.1. Il PI-103 doppio inibitore di PI3K/mTOR ha un effetto citotossico e proapoptotico su cellule di LAL-T

L'effetto del doppio inibitore di PI3K/mTOR PI-103 è stato studiato su linee cellulari caratterizzate dall'attivazione costitutiva dell'asse di PI3K/AKT/mTOR, dovuta alla mancanza di PTEN. Tutte queste linee di LAL-T non hanno un pathway di p53 funzionale. Inoltre, le Jurkat e le Molt-4 mostrano un'attivazione aberrante di Notch1. Come mostrato in Figura 4.10, le linee cellulari sono state trattate con concentrazioni crescenti di PI-103 e dopo 24 e 48 h è stata valutata l'attività citotossica attraverso un saggio MTT. L'IC₅₀ ottenuto era compreso in un intervallo tra 0.35 μ M-1 μ M a 24 h di trattamento. Il trattamento risultava efficace anche sulle cellule CEM-R, caratterizzate dalla iperespressione della P-gp (Figura 4.10)

Il confronto tra il PI-103, un inibitore specifico di mTOR, la Rapamicina, e 2 inibitori di PI3K, Wortmannin ed LY294002, mostrava come il PI-103 fosse significativamente più efficace nell'indurre una diminuzione dell'attività metabolica (Figura 4.10, B) a 24 h di trattamento.

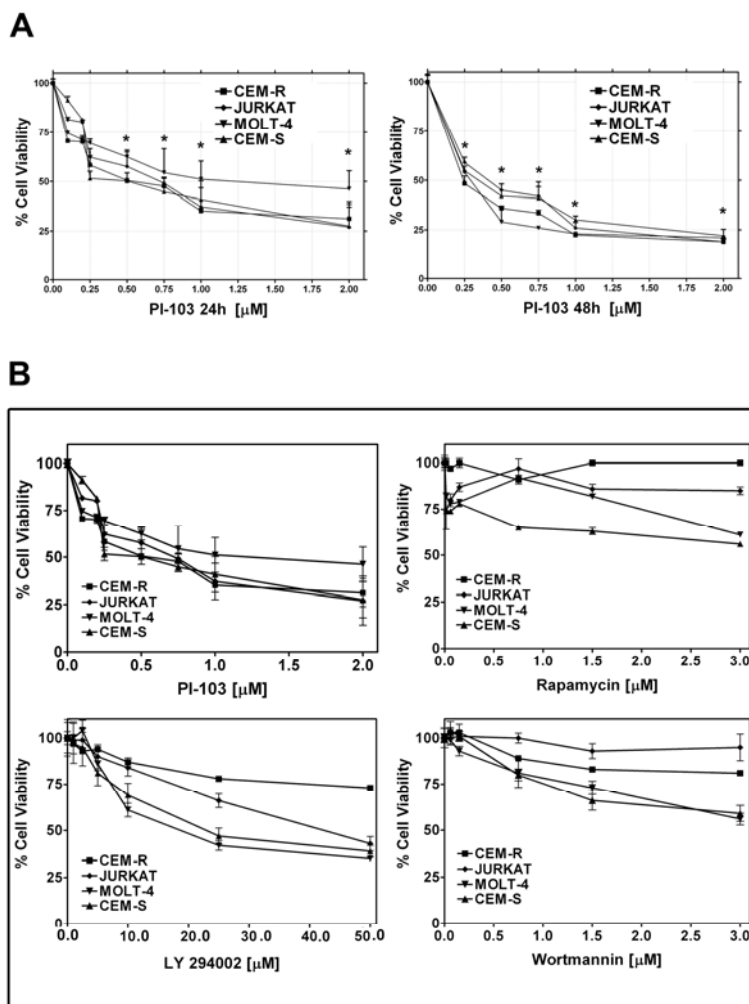


Figura 4.10. Il PI-103 induce citotossicità in linee cellulari di LAL-T. A: saggio MTT su cellule di LAL-T, in seguito a 24 e 48 h di trattamento. I risultati sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti \pm SD. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p < 0.001$) rispetto alle cellule non trattate. B: effetto degli inibitori di mTOR (Rapamicina) e PI3K (Wortmannin, LY294002). Saggi MTT sono stati effettuati in seguito a 24 h di trattamento. I risultati sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti \pm SD.

Inoltre, il PI-103 si è dimostrato un potente induttore dell' apoptosi di tipo caspasi-dipendente, già dopo 8 h di trattamento con 0.75 μ M. Il trattamento con Rapamicina non è stato in grado di indurre l'attivazione delle caspasi nelle cellule CEM-R, mentre nelle Molt-4 induceva una lieve attivazione della caspasi 9 e della caspasi 3 (Figura 4.11), ma a tempi più lunghi.

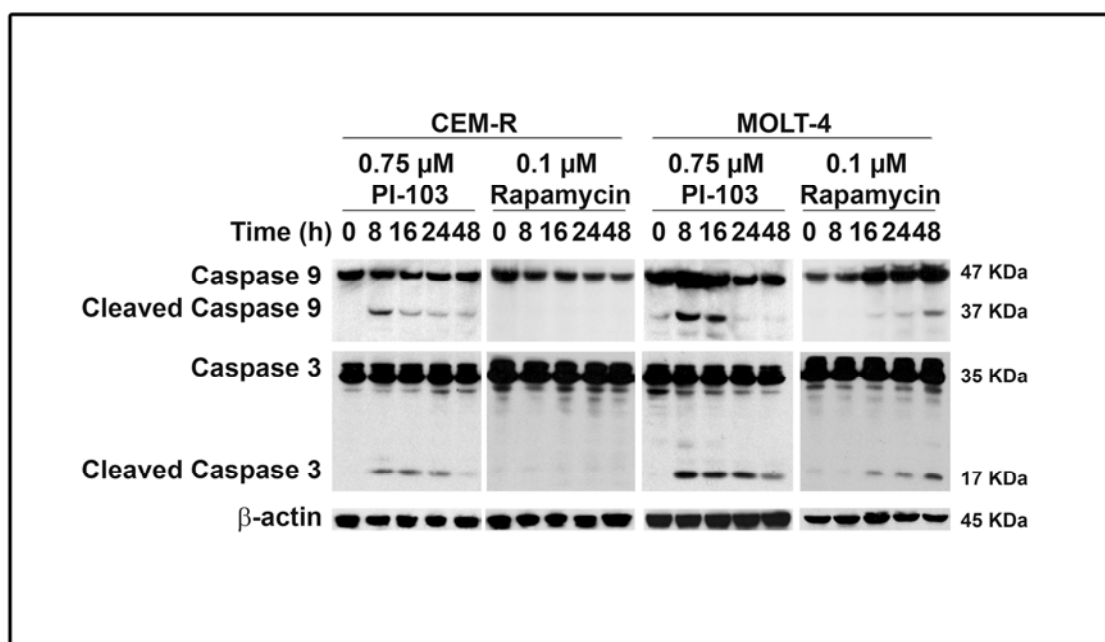


Figura 4.11. Il PI-103 attiva le caspasi-9 e -3 in cellule CEM-R e MOLT-4, mentre la Rapamicina attiva le caspasi-9 e -3 solo nelle cellule MOLT-4. Analisi in western blot di cellule CEM-R e MOLT-4 trattate con PI-103 (0.75 μ M) o Rapamycin (0.1 μ M) per i tempi indicati.

4.2.2. Il PI-103 modula l'asse di sopravvivenza di PI3K/Akt/mTOR nelle linee cellulari di LAL-T

Analisi in western blot con anticorpi contro la Ser473 pAKT hanno dimostrato una marcata diminuzione di questa forma fosforilata in risposta a 0.75 μ M di PI-103, già in seguito a 8 h di trattamento, nelle linee cellulari analizzate, e ciò era dovuto alla capacità del PI-103 di inibire il complesso mTORC2, che è responsabile della fosforilazione sulla Ser473 di AKT (Figura 4.12).

Il trattamento con Rapamicina (0.1 μ M) invece, era in grado di attivare in modo transiente la forma fosforilata di AKT sulla Ser473 a 8h. In seguito, la fosforilazione di AKT calava fino alle 48h, oltre le quali si otteneva di nuovo un aumento. I livelli di AKT totale non subivano variazioni né con PI-103, né con Rapamicina. L'inibizione di AKT con PI-103 aveva conseguenze funzionali, in quanto uno dei principali bersagli a valle di AKT, la proteina GSK3 β , veniva defosforilata a livello della Ser9,

mentre la forma totale non subiva variazioni. Il trattamento con Rapamicina induceva un andamento della p-GSK3 β analogo a quello di p-AKT.

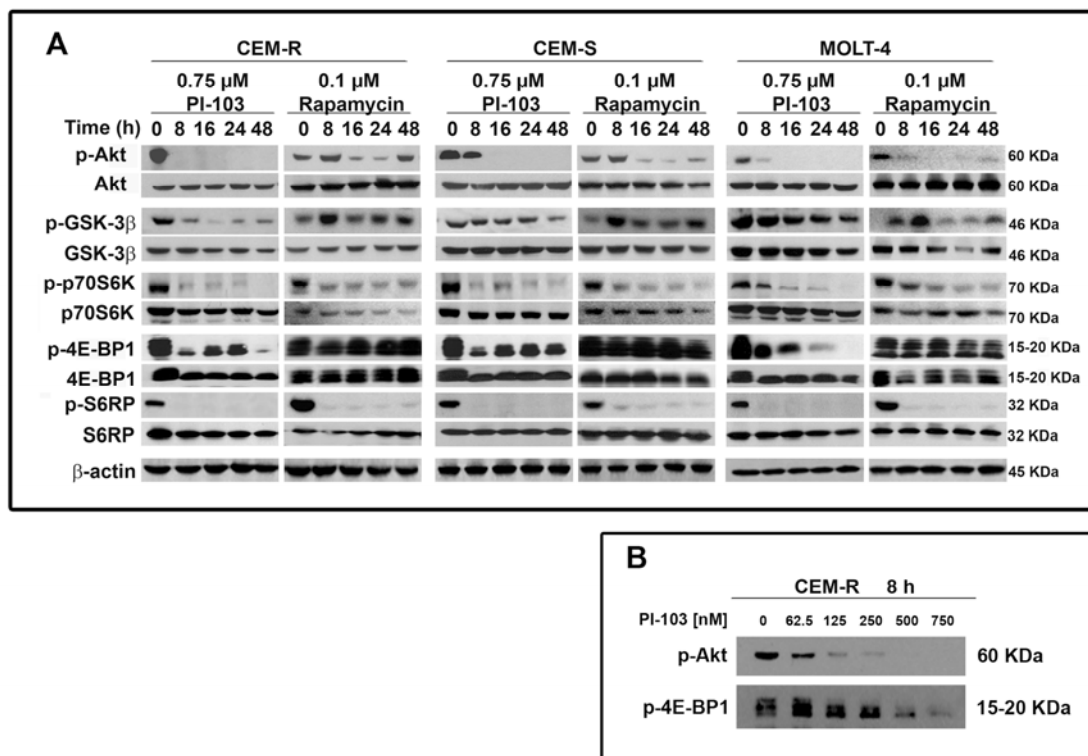


Figura 4.12. Il PI-103 modula l'asse di sopravvivenza di PI3K/Akt/mTOR nelle linee cellulari di LAL-T.

A: analisi in western blot di cellule trattate con PI-103 (0.75 μ M) o Rapamicina (0.1 μ M). B: analisi in western blot della defosforilazione concentrazione-dipendente di AKT e 4E-BP1 in cellule CEM-R (8 h di trattamento).

I bersagli a valle di mTOR (p70S6K, 4E-BP1, e S6RP) erano defosforilati sia dal PI-103 che dalla Rapamicina, ad eccezione di 4E-BP1, che risultava del tutto resistente al trattamento con Rapamicina (Figura 4.12).

Uno studio dose dipendente, condotto su cellule CEM-R, ha dimostrato che il PI-103 induceva una considerevole defosforilazione di Akt già a 125 nM, mentre induceva la defosforilazione di 4E-BP1 a 250 nM.

4.2.3. Caratterizzazione dell'asse di sopravvivenza PI3K/Akt/mTOR nelle cellule di LAL-T

A tutt'oggi non sono disponibili informazioni riguardo alle isoforme di PI3K e di AKT, che sono attive in linee cellulari di LAL-T, caratterizzate dall'assenza di PTEN. Ciò, tuttavia, è rilevante nella terapia mirata, in quanto inibitori specifici delle isoforme di AKT sono in via di sviluppo ed inibitori selettivi per le subunità catalitica delle PI3K di classe I sono entrati in trials clinici.

Esperimenti di immunoprecipitazione sono stati condotti su lisati totali di linee cellulari di LAL-T, usando anticorpi specifici per AKT1 e AKT2. Le linee cellulari di LAL-T esprimevano sia AKT1 che AKT2 fosforilati (Figura 4.13)

Tutte le linee cellulari analizzate esprimevano le isoforme p110 α , p110 β , p110 γ , e p110 δ della PI3K, come dimostrato da analisi in western blot (Figura 4.13). E' stato poi analizzato l'effetto di inibitori selettivi delle isoforme di PI3K, al fine di stabilire quali fossero quelle maggiormente coinvolte nella sopravvivenza. Sono stati utilizzati il composto 15e, inibitore di p110 α (IC₅₀ di 0.58 μ M), il TGX-221 (IC₅₀ di circa 40 nM), che inibisce la p110 β e il 5-(2,2-Difluoro-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-thiazolidine-2,4-dione (IC₅₀ di 250 nM), inibitore della p110 γ . In seguito a 24h di trattamento con l'inibitore selettivo per l'isoforma p110 α si otteneva una diminuzione dose dipendente della proliferazione cellulare, mentre non si otteneva alcun effetto significativo sulla proliferazione, utilizzando gli inibitori di p110 β e p110 γ . L'utilizzo dell'inibitore della p110 α (2 μ M) provocava una defosforilazione a livello della Ser473 di AKT (Figura 4.13).

In cellule Jurkat, analisi condotte sugli immunoprecipitati hanno dimostrato che l'inibitore della p110 α ed il PI-103 defosforilavano entrambi sia AKT1 che AKT2.

Quindi questi esperimenti hanno mostrato come nelle linee cellulari di LAL-T analizzate, siano espresse le isoforme di AKT1 e AKT2 e come la subunità p110 α della PI3K sia l'isoforma maggiormente coinvolta nella proliferazione cellulare.

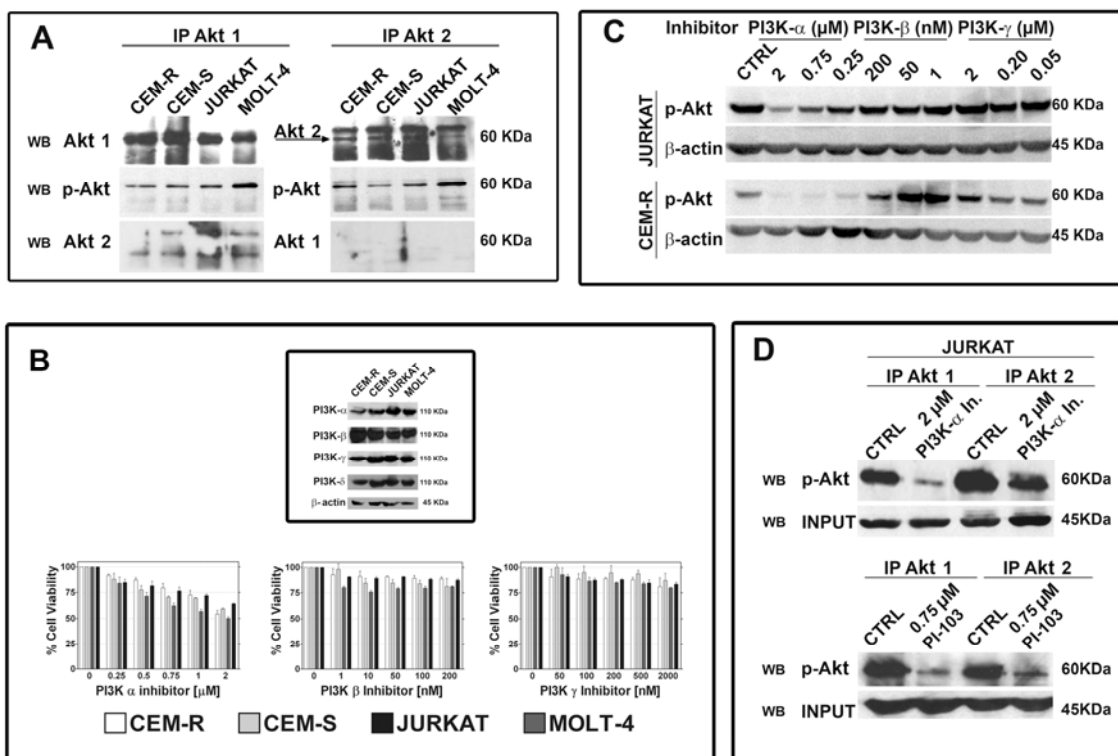


Figura 4.13. Espressione di AKT1 e AKT2 e coinvolgimento delle isoforme della PI3K nella sopravvivenza di linee cellulari di LAL-T. A: analisi condotte su immunoprecipitati (IP) utilizzando anticorpi specifici per AKT1 e AKT2. B: analisi in western blot dell'espressione delle isoforme di PI3K in linee cellulari di LAL-T e saggio MTT con inibitori delle isoforme p110 α PI3K, p110 β PI3K, p110 γ PI3K. C: analisi in western blot mostranti l'effetto dell'inibizione della p110 α PI3K con il composto 15e sulla defosforilazione di AKT in cellule Jurkat e CEM-R. D: analisi condotte su immunoprecipitati di cellule Jurkat, mostrano come l'inibitore della p110 α ed il PI-103 defosforilino entrambi sia AKT1 che AKT2.

4.2.4. Il PI-103 sinergizza con la Vincristina

Precedenti studi hanno messo in evidenza come l'attivazione di mTOR possa conferire chemioresistenza ai farmaci che hanno come bersaglio i microtubuli, come gli alcaloidi della Vinca (Vinblastina, Vincristina). Le linee cellulari di LAL-T CEM-S, Jurkat e Molt-4 sono state incubate per 24 h ore o con PI-103 da solo, o con Vincristina da sola, o con entrambi i farmaci in combinazione in un rapporto costante. Il trattamento combinato è risultato significativamente più citotossico, con valori di Combination Index minori di 0.3, rispetto ai singoli trattamenti (Figura 4.14).

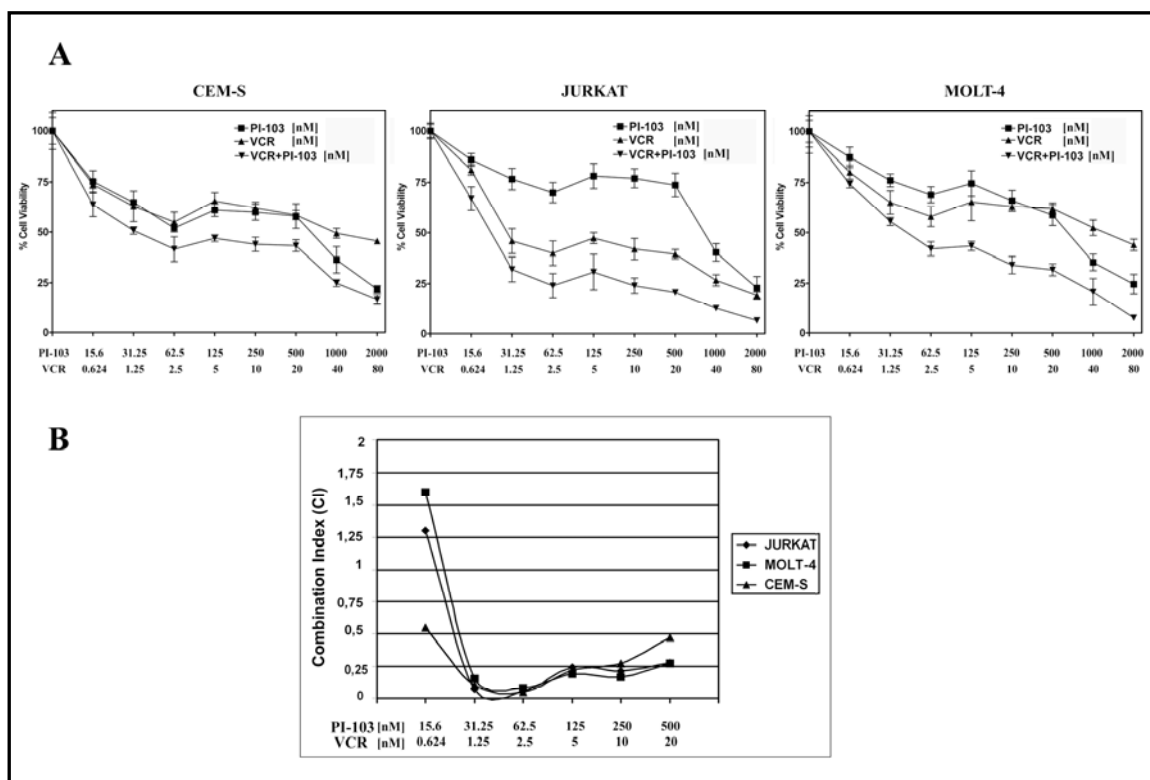


Figura 4.14. La combinazione di PI-103 e Vincristina è sinergica in cellule MOLT-4, JURKAT, and CEM-S. A: saggio MTT in presenza di Vincristina (VCR) e PI-103 somministrati singolarmente, o in combinazione in rapporto costante (1:25). B: I valori di combination index (CI) sono stati ottenuti tramite il software di analisi per gli effetti combinati Calcsyn.

4.2.5. I blasti leucemici di pazienti pediatrici affetti da LAL-T sono sensibili al trattamento con PI-103

L'effetto del PI-103 su blasti leucemici di pazienti pediatrici affetti da LAL-T, isolati dal midollo osseo o dal sangue periferico, è stato valutato tramite un saggio di citotossicità MTT.

I pazienti avevano mostrato attivazione dell'asse di PI3K/AKT/mTOR, valutata attraverso analisi fenotipica dei blasti per la Ser473 di Akt e la Thr37/46 di 4E-BP1 (Figura 4.15). Tutti i pazienti (7/7) avevano mostrato un'espressione di pAKT e p4E-BP1 più alta rispetto ai donatori sani. Trattando i blasti con PI-103, si è ottenuta una riduzione dei livelli di fosforilazione di AKT ed un'attivazione della caspasi 3 maggiori rispetto al trattamento con Rapamicina (Figura 4.15).

I blasti sono stati inoltre trattati con dosi crescenti di PI-103 per 96 h al fine di valutare l'attività citotossica del farmaco. Dall'analisi effettuata è emerso che il PI-103 è stato capace di indurre una forte riduzione della attività metabolica, con un IC_{50} compresa tra 0.18-0.63 μ M.

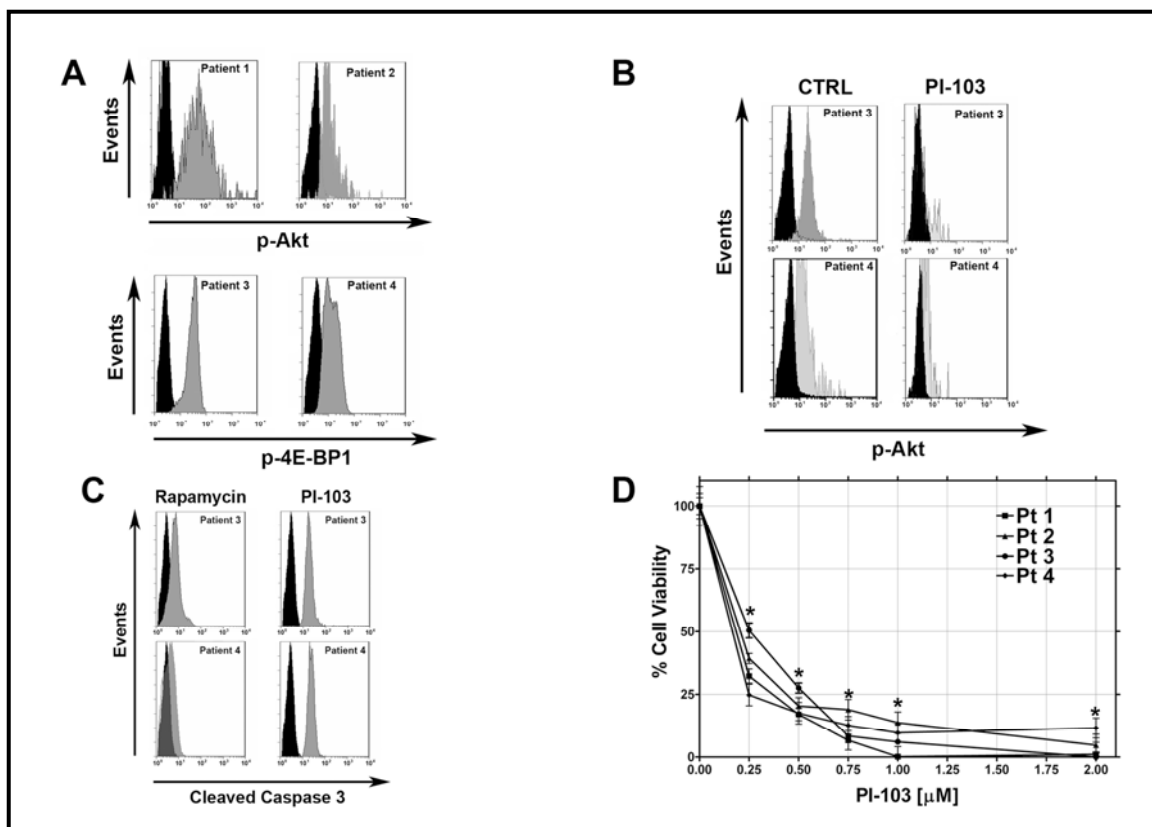


Figura 4.15. Il PI-103 induce citotossicità in blasti leucemici di pazienti pediatrici affetti da LAL-T, con fosforilazione costitutiva di AKT e 4E-BP1 e induce attivazione della caspasi-3. A: analisi citofluorimetrica di campioni di LAL-T per i livelli di fosforilazione di Ser473 p-Akt and Thr 37/46 p-4E-BP1. Quattro pazienti rappresentativi sono mostrati. B: analisi citofluorimetrica di campioni di LAL-T per i livelli di fosforilazione di Ser473 p-Akt, in seguito a trattamento con PI-103 (0.5 μM for 72 h). C: analisi citofluorimetrica dell'attivazione della caspasi-3 in campioni di LAL-T trattati con Rapamicina (0.1 μM) o PI-103 (0.5 μM) per 72h. D: saggio MTT su blasti trattati con PI-103 a concentrazioni crescenti per 96 h. I risultati sono la media di 2 esperimenti indipendenti \pm SD. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p < 0.001$) rispetto alle cellule non trattate. Quattro pazienti rappresentativi sono mostrati.

4.3. Doppia inibizione di PI3K/mTOR: NVP-BE2235

4.3.1. L'NVP-BE2235 doppio inibitore di PI3K/mTOR ha un effetto proapoptotico e induce un accumulo nella fase G0/G1 del ciclo cellulare in cellule di leucemia linfoblastica acuta T (LAL-T)

L'effetto del doppio inibitore di PI3K/mTOR NVP-BE2235 è stato testato su sei linee cellulari di LAL-T che mostravano attivazione dell'asse di sopravvivenza. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti del farmaco e dopo 24 h di trattamento è stato analizzato l'effetto citotossico. Analisi attraverso saggi MTT hanno mostrato che il farmaco era in grado di diminuire la proliferazione in modo significativo in tutte le linee analizzate con un IC_{50} da 150 a 300 nM. Le BE-13, caratterizzate dall'assenza della fosforilazione sulla Ser473 di AKT, ma con attivazione di

mTORC1, hanno un IC₅₀ maggiore. Un confronto fra PI-103 ed NVP-BE2235 ha dimostrato come quest'ultimo sia stato significativamente più efficace nel causare citotossicità quando utilizzato a concentrazioni equimolari (Figura 4.16 B)

Attraverso l'analisi con Annessina V-FITC e PI, è stato valutato se la diminuzione della proliferazione fosse correlata all'apoptosi. Come mostrato in (Figura 4.16 C), già dopo 6h di trattamento si otteneva un aumento delle cellule positive alla colorazione con Annessina/PI.

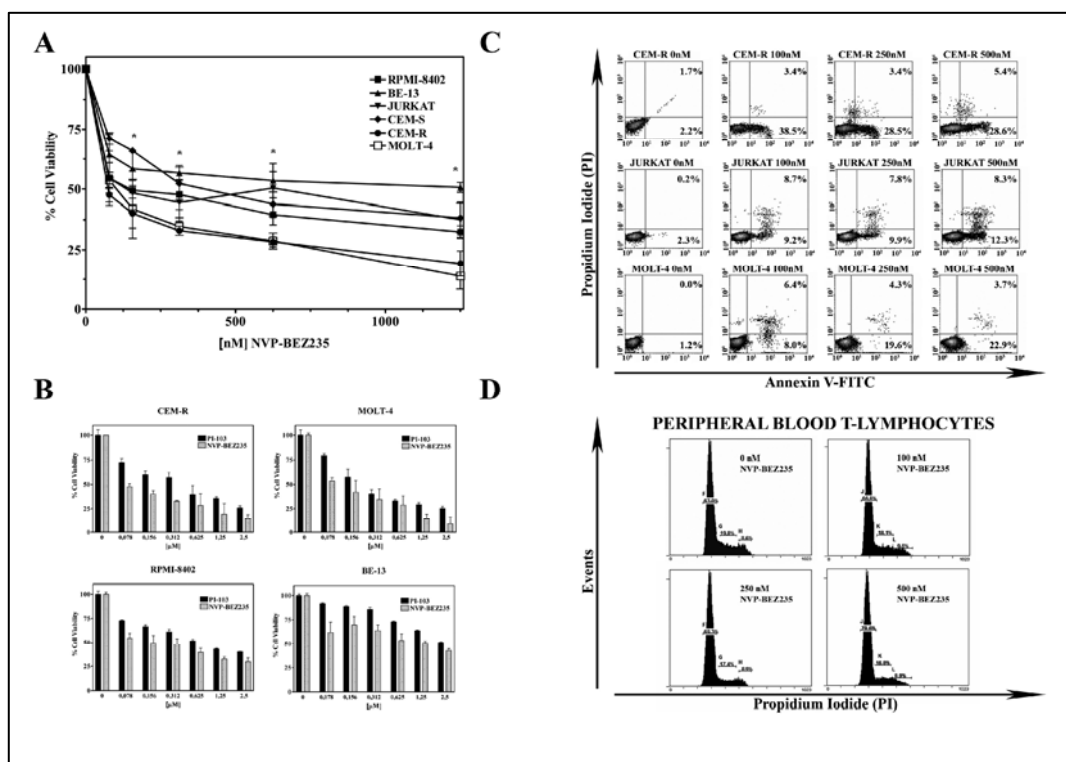


Figura 4.16. L'NVP-BE2235 induce citotossicità ed apoptosi in cellule di LAL-T. A: saggio MTT su linee cellulari trattate NVP-BE2235 per 24 h. I risultati sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti \pm Deviazione Standard (SD). L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p < 0.005$) rispetto alle cellule non trattate. B: confronto dell'effetto dell' NVP-BE2235 e del PI-103 in linee cellulari di LAL-T. tramite saggi MTT. C: colorazione con Annessina V FITC/PI: le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di NVP-BE2235 per 6 h. D: analisi del ciclo cellulare tramite colorazione con PI di linfociti T CD4⁺, isolati dal sangue periferico di donatori sani e stimolati con fitoemoagglutina e interleuchina 2.

L'analisi del ciclo cellulare ha mostrato inoltre come il trattamento con concentrazioni crescenti di NVP-BE2235 causasse un forte accumulo di cellule in fase G0/G1, già dopo 16 h ore di trattamento, sia in cellule Molt-4, sia in cellule CEM-R, accompagnato da una defosforilazione della proteina del Retinoblastoma (pRB, Figura 4.17). Le cellule Jurkat, invece, erano caratterizzate da una maggiore presenza di cellule in subG1, e non mostravano una defosforilazione significativa

della pRB. (Figura 4.17). Linfociti T CD4⁺, isolati dal sangue periferico di donatori sani e stimolati con fitoemoagglutinina e interleuchina 2 si sono dimostrati molto meno sensibili all’NVP-BE235 a concentrazioni pari a 500 nM (Figura 4.16 D). Infatti, l’analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso non ha mostrato un significativo accumulo di cellule in fase G0/G1 o un aumento dell’apoptosi. Nel loro complesso questi risultati indicano come l’NVP-BE235 riduca considerevolmente la proliferazione delle linee cellulari di LAL-T analizzate e questo effetto è dovuto sia all’arresto del ciclo cellulare che all’apoptosi. Inoltre, il farmaco potrebbe avere un utilizzo terapeutico favorevole in quanto non influenza la proliferazione dei linfociti T CD4⁺ normali.

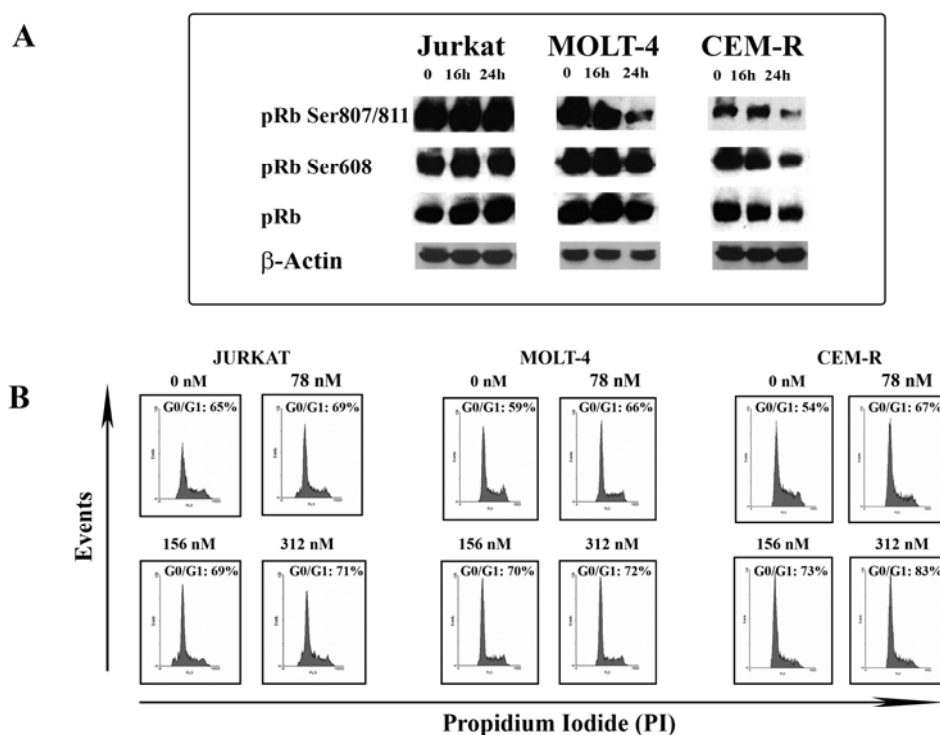


Figura 4.17. L’NVP-BE235 induce accumulo di cellule in fase G0/G1 del ciclo cellulare accompagnato dalla defosforilazione della proteina pRb. A: analisi in western blot della fosforilazione della proteina Rb in Jurkat, Molt-4 e CEM-R. in seguito a trattamento con NVP-BE235 (200 nM). B: analisi del ciclo cellulare tramite colorazione con PI in Jurkat, Molt-4 e CEM-R trattate con NVP-BE235 per 16 h.

4.3.2. L'NVP-BEZ235 induce attivazione delle caspasi

Una caratteristica tipica delle cellule apoptotiche è l'attivazione di una famiglia di proteasi definite caspasi, responsabili per la maggior parte dei cambiamenti biochimici e morfologici che caratterizzano l'apoptosi. Analisi condotte in western blotting su estratti proteici di CEM-R, Molt-4, Jurkat ed RPMI 84-02, trattate con NVP-BEZ235, hanno documentato il clivaggio delle procaspasi 8, 9 e 3, già dopo 3 h di trattamento (Figura 4.18)

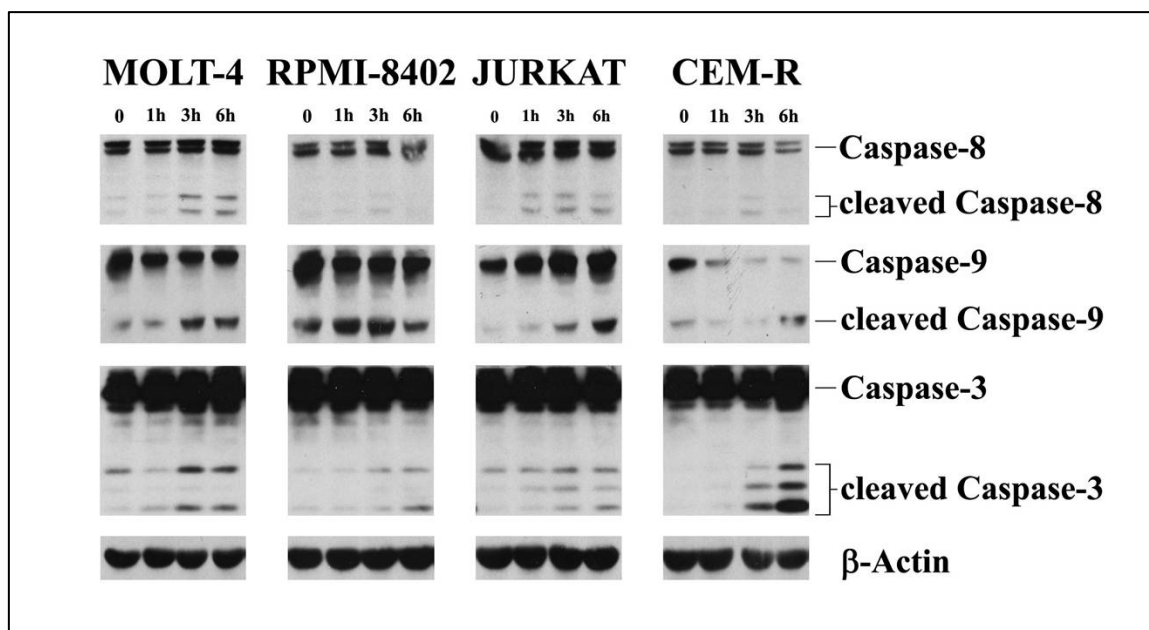


Figura 4.18. Il trattamento con NVP-BEZ235 induce attivazione dell'apoptosi attraverso il clivaggio della caspasi-8 della caspasi-9 e della caspasi-3. Analisi in western blot di cellule Molt-4, RPMI-8402, Jurkat e CEM-R trattate con NVP-BEZ235 (200 nM) per i tempi indicati.

4.3.3. Effetto dell' NVP-BEZ235 sui componenti critici dell'asse di sopravvivenza di PI3K/Akt/mTOR nelle cellule di LAL-T

Analisi in western blot mostravano una diminuzione concentrazione-dipendente della fosforilazione di AKT (Ser473) in risposta al trattamento con NVP-BEZ235 per 24 h (Figura 4.19). Inoltre il farmaco era in grado di indurre una defosforilazione anche sui bersagli a valle di mTOR (p70S6K, 4E-BP1, and S6RP).

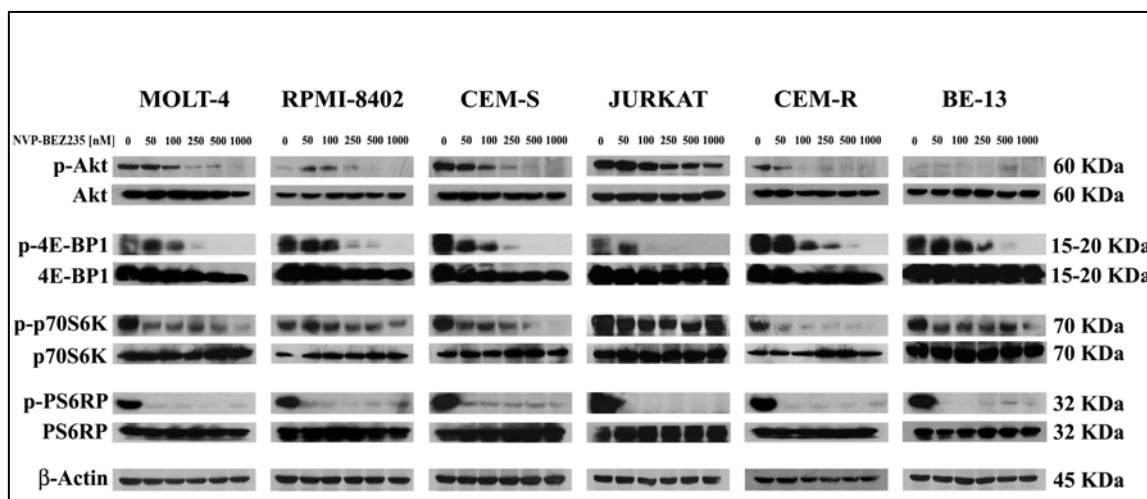


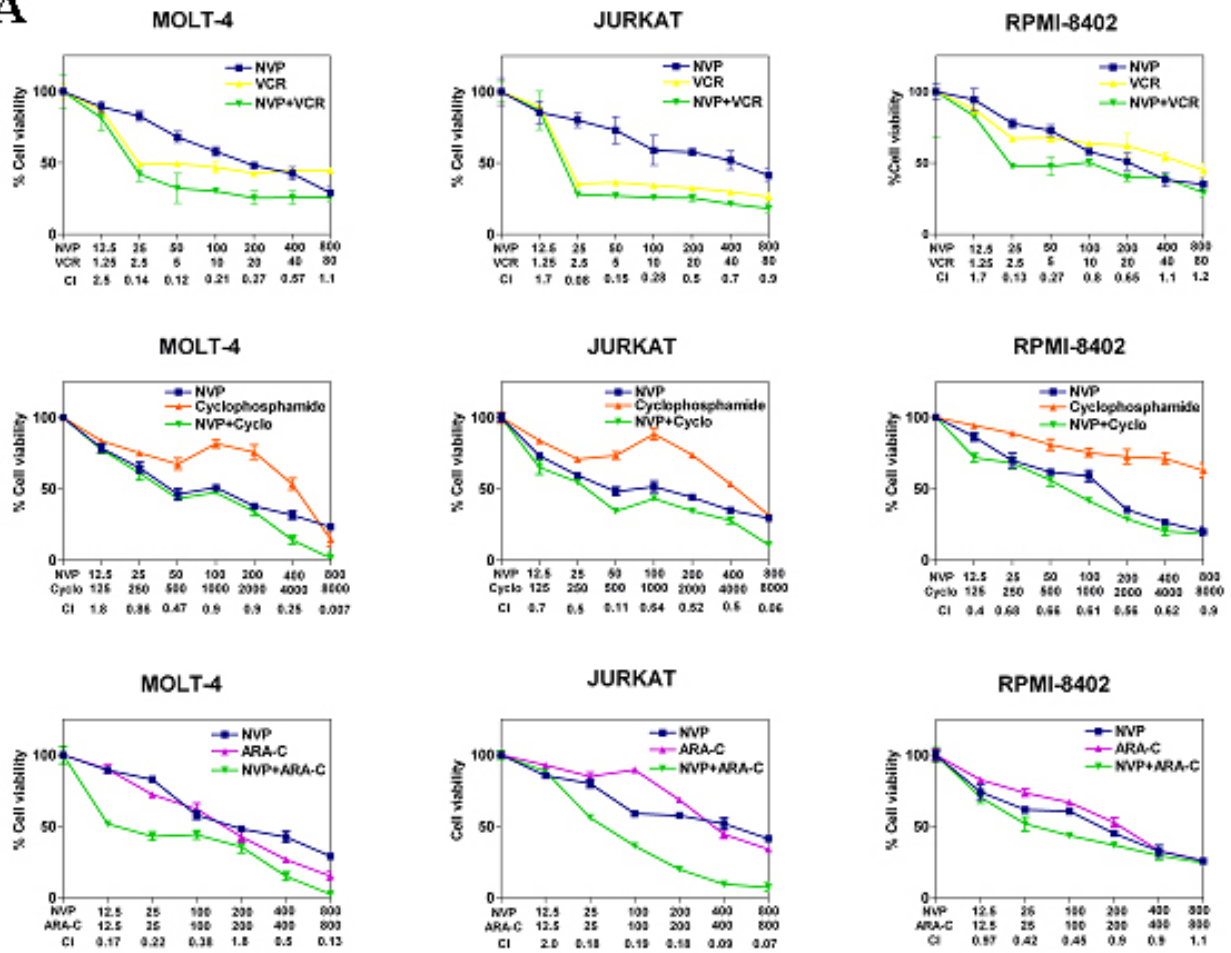
Figura 4.19. L' NVP-BEZ235 modula l'asse di sopravvivenza di PI3K/Akt/mTOR nelle linee cellulari di LAL-T. Analisi in western blot di cellule trattate con NVP-BEZ235 per 24 h.

4.3.4. L'NVP-BEZ235 sinergizza con agenti chemioterapici tradizionali utilizzati per il trattamento delle LAL-T e diminuisce la resistenza alla Vincristina in cellule Jurkat

Le linee cellulari Molt-4, Jurkat ed RPMI-8402 sono state incubate in presenza di Vincristina (VCR), Ciclofosfamida (Cyclo), ARA-C e NVP-BEZ235 singolarmente o in combinazione, in rapporto costante. Il trattamento combinato è risultato essere fortemente citotossico, come dimostrato dal saggio di proliferazione cellulare MTT a 24 h (Figura 4.20 A). Il valore di combination index (CI) per ogni punto è stato calcolato con il software per l'analisi della dose effettiva CalcuSyn. I valori di CI indicano l'esistenza di un forte sinergismo tra l'NVP-BEZ ed i vari agenti chemioterapici, in particolare con l'ARA-C (CI<0.3).

La combinazione dell'NVP-BEZ235 con la Vincristina riduceva inoltre la resistenza alla Vincristina, indotta in cellule Jurkat dalla co-coltura con cellule stromali MS-5, che sono state utilizzate al fine di mimare le interazioni fra cellule leucemiche ed il microambiente midollare [Konopleva et al., 2002]. L'anticorpo contro il CD45 è stato utilizzato per escludere dall'analisi le cellule stromali e le analisi sono state effettuate tramite colorazione con Annessina V-FITC per determinare l'effetto del doppio trattamento (Figura 4.20 B).

A



B

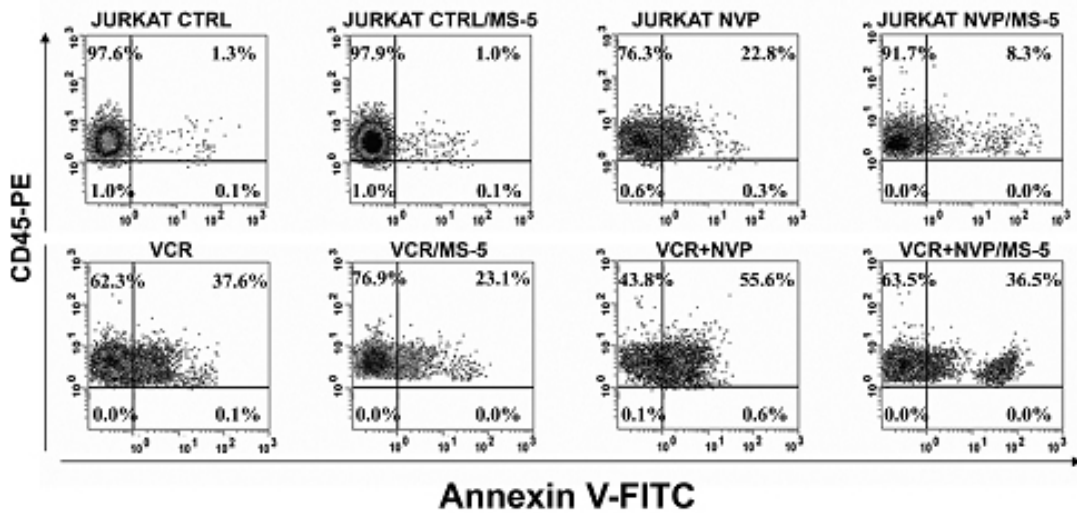


Figura 4.20. La combinazione di NVP-BE235 con vari agenti chemioterapici (Vincristina, Ciclofosfamide, ARA-C) è sinergica in cellule MOLT-4, JURKAT ed RPMI-8402 e riduce la resistenza alla Vincristina indotta dalla co-coltura con cellule stromali. A: saggio MTT in presenza di NVP-BE235 (nM), Vincristina (VCR, nM), Ciclofosfamide (Cyclo, nM) e ARA-C (nM) somministrati singolarmente, o in combinazione in rapporto costante. Sono mostrati i valori di combination index (CI) ottenuti tramite il software di analisi per gli effetti combinati Calcsyn. B: colorazione con Annessina V-FITC e CD45-PE di cellule Jurkat trattate con NVP-BE235 e VCR somministrate singolarmente oppure in combinazione, in presenza/assenza di cellule stromali MS-5.

4.3.5. Effetto dell’NVP-BEZ235 su blasti di pazienti pediatrici affetti da LAL-T con attivazione costitutiva dell’asse di PI3K/AKT/mTOR

L’NVP-BEZ235 è risultato citotossico su blasti provenienti da pazienti pediatrici con LAL-T, che mostravano fosforilazione costitutiva di 4E-BP1 e S6RP e bassa/assente espressione di PTEN, sui quali è stata analizzata l’attività metabolica tramite saggi MTT. I risultati hanno mostrato come il farmaco, in seguito a 96h di trattamento, abbia indotto citotossicità ($IC_{50} < 25$ nM) nei pazienti analizzati. In Figura 4.21 A sono mostrati tre pazienti rappresentativi. Analisi citofluorimetriche ed in western blot mostrano come il trattamento con NVP-BEZ235 (200 nM, 48 h) abbia indotto una defosforilazione sia di 4E-BP1, sia della proteina S6RP, mentre il trattamento con Rapamicina (100 nM, 48h) è stato in grado di indurre una diminuzione solo di p-S6RP (Figura 4.21).

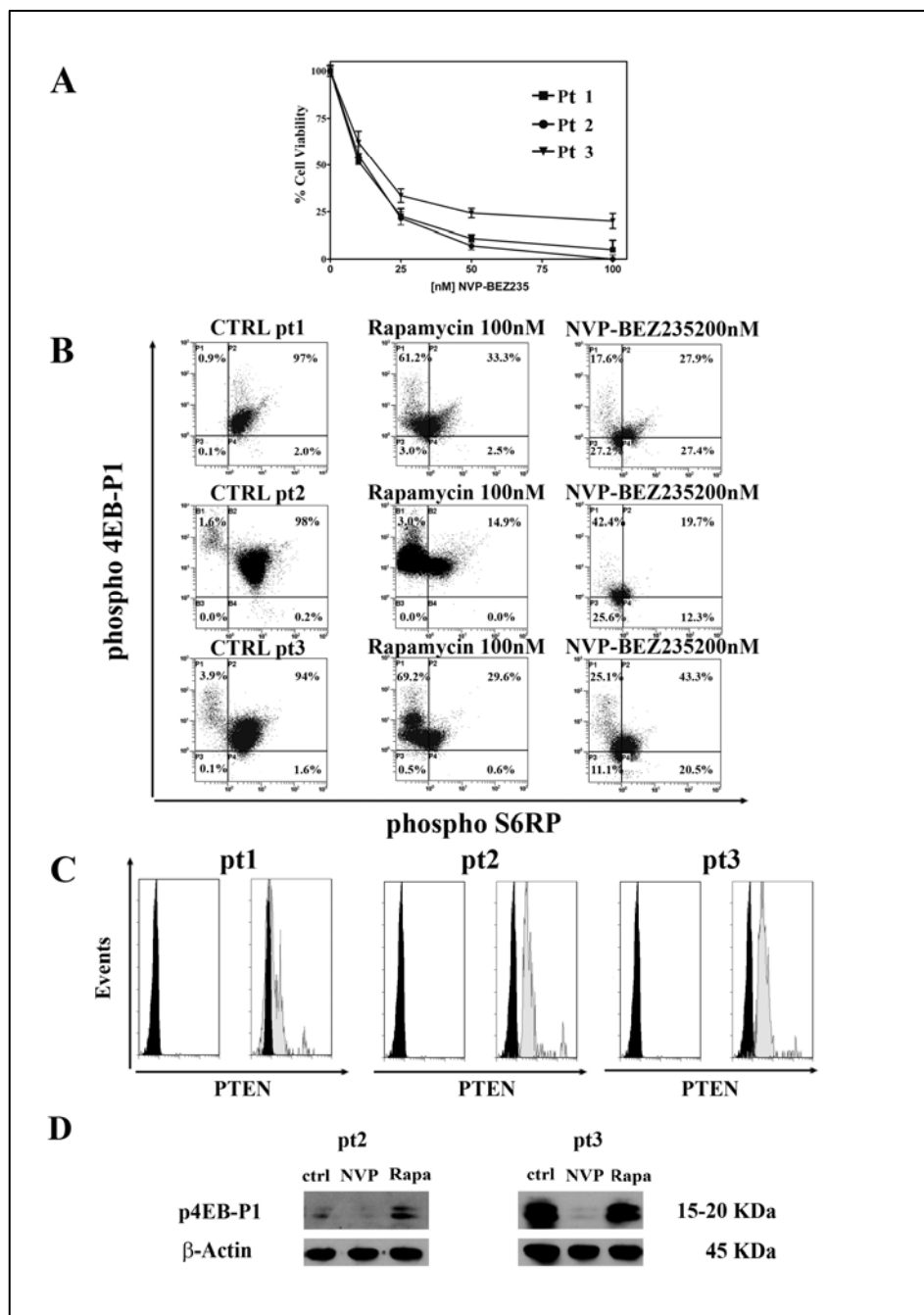


Figura 4.21. L’NVP-BEZ235 induce citotossicità in blasti leucemici provenienti da pazienti pediatrici affetti da LAL-T, con fosforilazione costitutiva di 4E-BP1 e S6RP e bassa/assente espressione di PTEN A: saggio MTT su blasti trattati con NVP-BEZ235 a concentrazioni crescenti per 96 h. I risultati sono la media di 2 esperimenti indipendenti \pm SD. Tre pazienti rappresentativi sono mostrati. B: analisi citofluorimetrica di campioni di LAL-T per i livelli di fosforilazione di Thr 37/46 p-4E-BP1 e Ser 235/236 p-S6RP in seguito a trattamento con NVP-BEZ235 (200 nM) o Rapamicina (100 nM) per 48 h. Tre pazienti rappresentativi sono mostrati. C: analisi citofluorimetrica di tre campioni rappresentativi di LAL-T per l’espressione di PTEN D: analisi in western blot di due campioni di LAL-T trattati con Rapamicina (100 nM) o NVP-BEZ235 (200 nM) per 48 h.

4.3.6. L’NVP-BEZ235 agisce sulle cellule della side population (SP) di cellule di LAL-T

L’NVP-BEZ235 infine è stato efficace anche nel colpire la SP, identificata con Hoechst 33342 e marcatura con ABCG2. Nelle AML e in vari tipi di tumori solidi, le cellule della SP sono fortemente arricchite in cellule staminali leucemiche ed inoltre sono contraddistinte da un’elevata espressione del trasportatore di membrana ABCG2 (BCRP, Breast Cancer Resistance Protein) [Bleau et al., 2009; Ho et al., 2007; Shukla et al., 2008; Wulf et al., 2001]. Le cellule sono state marcate con il colorante vitale Hoechst 33342, in grado di legarsi al DNA e renderle così fluorescenti (Figura 4.22, 4.23). L’Hoechst è una bis-benzimide molto lipofila e quindi in grado di attraversare la membrana cellulare intatta. In seguito al suo legame al DNA, esso emette sia nel blu a 424/44 nm, sia nel rosso a 622/30 nm, una volta eccitato dalle radiazioni ultraviolette (UV 350 nm), ma questo non avviene nelle cellule con caratteristiche di staminalità, che iperesprimono vari trasportatori di membrana che pompano all’esterno il colorante.

Il saggio prevede che un’aliquota della popolazione cellulare che contiene le presunte cellule staminali venga preincubata con fumitremorgina C, farmaco in grado di bloccare in maniera selettiva la pompa ABCG2 che esclude l’Hoechst. Perciò, confrontando la distribuzione nei canali di emissione dell’Hoechst delle cellule trattate rispetto a quelle non trattate con la fumitremorgina C, è possibile identificare la regione delle cellule che costituiscono la SP. I blasti di LAL-T sono stati marcati inoltre con un anticorpo contro ABCG2 coniugato con ficoeritrina (PE). Il trattamento con NVP-BEZ235 e con Rapamicina è stato in grado di indurre la scomparsa o una forte riduzione della SP, sia in linee cellulari come Molt-4, CEM-S e BE-13, sia in blasti di pazienti pediatrici affetti da LAL-T (Figura 4.23).

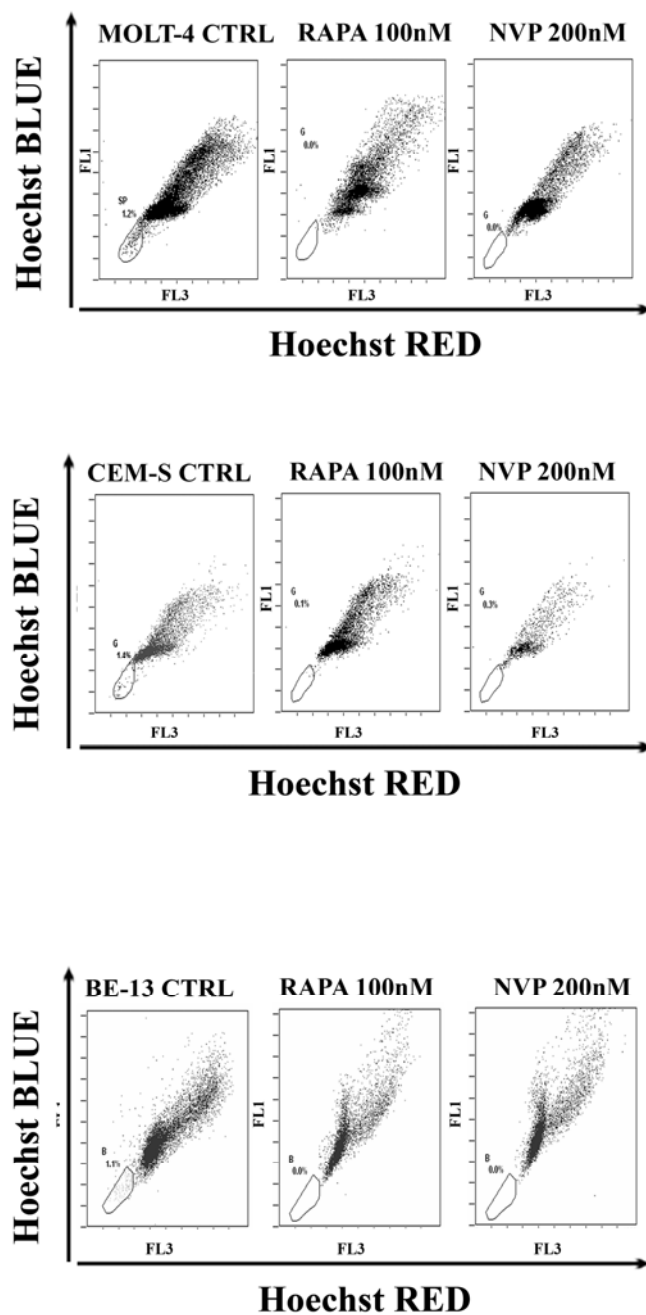


Figura 4.22. L’NVP-BEZ235 riduce la Side Population (SP) in linee cellulari di LAL-T. Le cellule Molt-4, CEM-S e BE-13 sono state trattate con Rapamicina (100 nM) o NVP-BEZ235 (200 nM) per 24 h e in seguito colorate con Hoechst 33342 (5 μ g/mL) e analizzati tramite i citofluorimetria a flusso.

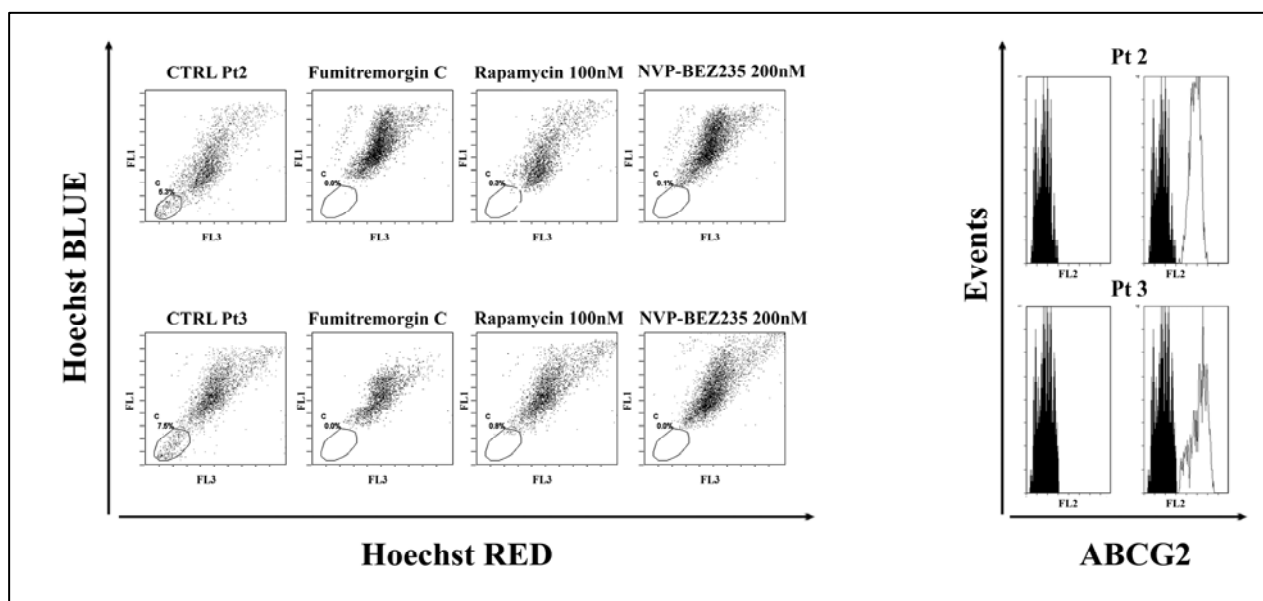


Figura 4.23. L’NVP-BEZ235 riduce la Side Population (SP) in blasti di pazienti pediatrici di LAL-T. Le cellule sono state trattate con Rapamicina (100 nM) o NVP-BEZ235 e in seguito colorate con Hoechst 33342 (5 μ g/mL) in presenza/assenza di Fumitremorgina C ed è stata effettuata una doppia marcatura con un anticorpo monoclonale contro ABCG2 coniugato con PE.

DISCUSSIONE

Data l'importanza dell'asse di sopravvivenza di PI3K/AKT/mTOR in numerose neoplasie, è di grande importanza studiare nuove strategie terapeutiche per modulare negativamente questa attivazione, ponendosi come obiettivo l'arresto della crescita cellulare, l'apoptosi e il miglioramento delle condizioni cliniche del paziente. Anche il modello cellulare utilizzato in queste ricerche (linee cellulari di LAL-T e linfoblasti di pazienti pediatrici affetti da LAL-T) mostrava un'attivazione costitutiva dell'asse di segnalazione della PI3K/AKT/mTOR.

Un esiguo numero di farmaci inibitori dell'asse di PI3K/AKT/mTOR sono a tutt'oggi in via di sviluppo, quindi è importante focalizzarsi sullo sviluppo di ulteriori strategie terapeutiche.

Il razionale della terapia mirata potrebbe essere fondamentalmente quello di testare questi composti in un ampio numero di tumori per identificare in quali forme neoplasiche possano essere efficaci ed inoltre di usare i dati preclinici più interessanti al fine di elaborare trials clinici specifici per il fenotipo dei singoli pazienti.

Le nuove strategie terapeutiche prevedono l'utilizzo di inibitori mirati verso molecole target dell'asse, i quali possono avere come bersaglio un unico target (singoli inibitori specifici) o una doppia inibizione (doppi inibitori specifici) in modo da rendere più robusto l'arresto della crescita cellulare e superare il problema della farmacoresistenza. La limitata efficienza dei singoli inibitori può essere inoltre causata dall'instaurarsi di mutazioni che determinano la resistenza a quel particolare inibitore.

Ad esempio la singola inibizione di mTORC1, tramite il suo inibitore specifico, la Rapamicina, ma non di mTORC2, determina una attivazione del segnale dell'asse attraverso un meccanismo di feedback e ciò spiega ad esempio la limitata efficacia della Rapamicina in tumori epiteliali.

E' importante anche valutare il confronto tra le nuove molecole studiate e i più tradizionali chemioterapici (come ad esempio Vincristina, ARA-C) nel trattamento farmacologico delle LAL-T, per evidenziare eventuali sinergismi che hanno una maggiore efficacia dei singoli trattamenti.

5.1. Inibizione AKT-specifica con Perifosina

La Perifosina è un nuovo farmaco sintetico appartenente alla classe delle alchilfosfolipine, una nuova classe di agenti antitumorali. La Perifosina è un analogo dei fosfolipidi di membrana che presenta un residuo ciclico alifatico alchilico legato al gruppo fosfato. Gli alchilfosfolipidi hanno tre effetti principali che possono spiegare la loro citotossicità. Sono infatti in grado di interferire con il turnover e la sintesi dei fosfolipidi di membrana, con i meccanismi di trasduzione del segnale e sono in grado di bloccare la sopravvivenza delle cellule tumorali attraverso la modulazione di vie di segnalazione come PI3K/Akt and ERK 1/2. Essi inoltre inducono segnali di stress e apoptosi attraverso l'attivazione delle caspasi [Van Ummersen et al., 2004; Vink et al., 2007].

La Perifosina, già in fase di sperimentazione in trials clinici di fase I/II in tumori solidi, non ha causato tossicità a livello ematologico e ciò è in accordo con recenti risultati ottenuti in questo

laboratorio, in cui il farmaco non ha indotto tossicità in cellule emopoietiche CD34⁺ provenienti da donatori sani [Papa et al., 2008]. In modelli murini in vivo di MM, la Perifosina ha indotto invece iperplasia mieloide.

In questo studio è stato testato l'effetto della Perifosina nel diminuire la sopravvivenza di cellule PTEN-negative di LAL-T, CEM, compreso un subclone che overesprime la P-gp (CEM-R).

La Perifosina è stata efficace nell'indurre citotossicità, in maniera concentrazione-dipendente, in cellule CEM-S e CEM-R. Gli IC₅₀ ottenuti per le CEM-S erano inferiori a quelli delle CEM-R (rispettivamente 6.8 μM e 19.3 μM), e ciò potrebbe rispecchiare la maggiore espressione della forma fosforilata sulla Ser473 di AKT nelle CEM-R rispetto alle CEM-S.

La diminuzione della sopravvivenza era dovuta ad un aumento dell'apoptosi, come indicato dalle analisi effettuate tramite colorazione con Annessina V-FITC/PI; inoltre l'analisi in western blotting ha documentato il clivaggio delle caspasi 9, 8 e 3. L'attivazione della caspasi 3 è risultata anche nel clivaggio dei suoi substrati PARP e Bid. Una doppia marcatura in immunocitochimica, nella quale è stato marcato il citocromo C ed il complesso V, localizzato a livello mitocondriale, ha confermato come la Perifosina abbia indotto in cellule CEM-R l'attivazione del pathway intrinseco mitocondriale. Questi dati mostrano quindi che la Perifosina ha attivato sia il pathway apoptotico estrinseco che quello intrinseco.

Nelle cellule CEM-R si osservava inoltre una defosforilazione di AKT sia sulla Ser473, che sulla Thr308. La Perifosina non induceva invece un'attivazione di ERK1/2, come è stato osservato in altri modelli cellulari.

Recenti studi ottenuti su cellule di MM, hanno mostrato che l'apoptosi indotta dalla Perifosina dipende dal reclutamento del recettore Fas/CD95, della proteina FADD e della procaspasi 8 nei lipid rafts, portando alla formazione del complesso DISC. I nostri risultati hanno suggerito che l'integrità dei lipid rafts sia molto importante per indurre apoptosi attraverso l'utilizzo di Perifosina.

In cellule di MM, la citotossicità mediata dalla Perifosina non dipendeva da FasL, mentre nelle cellule CEM-R, l'effetto proapoptotico del farmaco era almeno in parte dovuto a FasL. Infatti l'utilizzo di un anticorpo monoclonale contro Fas causava una diminuzione dell'apoptosi indotta dalla Perifosina.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza come anche JNK sia un altro mediatore importante nel processo apoptotico mediato dalla Perifosina nelle cellule CEM-R. Il trattamento con Perifosina infatti, ha indotto un aumento della fosforilazione di JNK. Quando le cellule venivano preincubate con un inibitore di JNK (SP600125) e poi trattate per 6 h con Perifosina, si riscontrava una marcata diminuzione dell'apoptosi nelle cellule analizzate. I dati mostrati quindi sono risultati in accordo con quelli di Hideshima [Hideshima et al., 2006], che ha dimostrato il ruolo fondamentale dell'attivazione di JNK nell'indurre apoptosi in cellule di MM trattate con Perifosina.

E' stato inoltre dimostrato come la Perifosina sia stata in grado di ridurre l'espressione dell'mRNA e l'espressione proteica della P-gp; al contrario, il trattamento con l'inibitore di JNK SP600125, o il silenziamento genico di JNK contrastava la modulazione negativa della trascrizione di MDR-1.

Nonostante la quantità di mRNA fosse calata dopo 6 h di trattamento con Perifosina, l'espressione proteica cominciava a diminuire in seguito a 16 h di trattamento e fortemente ridotta dopo 24 h. Questo potrebbe dipendere soprattutto dal fatto che l'emivita della P-gp è circa di 15-18 h, come riportato in alcune linee cellulari tumorali, che esprimono MDR1 [Argiris et al., 2006; Miao and Ding, 2003; Zhou et al., 2006].

I nostri risultati sono in accordo con altri studi che mettono in evidenza come nelle linee di tumori solidi e nelle cellule di eritroleucemia K562, la diminuzione dell'espressione dell'mRNA della P-gp necessita dell'attività catalitica di JNK e come ciò sia mediato dal fattore di trascrizione c-jun.

La Perifosina determina una fosforilazione di c-Jun sulla Ser63 e l'attivazione dell'attività trascrizionale di AP1, che può essere contrastata da un inibitore selettivo di JNK. A tutt'oggi come avvenga la regolazione trascrizionale del gene di MDR1 non è ancora del tutto chiarito. E' stato riportato che il promotore del gene contenga un sito di legame negativo per il fattore che attiva la trascrizione AP1. Tuttavia è anche risaputo che in molte linee cellulari tumorali resistenti ai farmaci, l'aumento dell'espressione della P-gp è dovuto ad un aumento dei livelli di mRNA. Oltre ad AP1, altri fattori di trascrizione sono coinvolti nella regolazione della trascrizione genica di MDR1, come HSF1 e MEF1. Anche la proteina p53 sembra essere coinvolta sia positivamente che negativamente nella regolazione della trascrizione di MDR1.

E' noto che la P-gp sia presente a livello dei lipid rafts, anche se presenta una maggiore attività quando è localizzata al di fuori dei lipid rafts. Siccome la Perifosina si accumula nei lipid rafts, potrebbe essere possibile che gli alchilfosfolipidi possano interferire con l'attività della P-gp o localizzarsi nei lipid rafts, portando alla modulazione negativa dell'attività della pompa. Ulteriori indagini dovranno chiarire questo meccanismo.

L'attivazione dell'asse PI3K/Akt è frequentemente osservata nei pazienti affetti da LAL-T (56%) e probabilmente contribuisce alla resistenza farmacologica. In alcuni casi di LAL-T, l'aumento della segnalazione cellulare potrebbe essere dovuto all'ipermetilazione del gene di PTEN, che porta ad una diminuzione dell'espressione del gene.

Anche l'iperespressione della P-gp è una caratteristica comune nei pazienti affetti da LAL-T (24%) e correla negativamente con il raggiungimento di una completa remissione. E' quindi chiaro che alcuni pazienti affetti da LAL-T potrebbero esibire una sovraespressione di PI3K/AKT assieme ad una iperespressione della P-gp. In conclusione questi studi preclinici supportano il fatto che la Perifosina potrebbe essere un farmaco utilizzato per migliorare le condizioni cliniche di pazienti affetti da LAL-T, che mostrano attivazione dell'asse della PI3K/AKT associata ad iperespressione della P-gp.

5.2. Doppia inibizione di PI3K/mTOR

L'asse di sopravvivenza della PI3K/Akt/mTOR è stato recentemente identificato come promettente bersaglio della terapia mirata contro le LAL-T. In questa tesi è stato valutato l'effetto della doppia inibizione di PI3K/mTOR con PI-103 e NVP-BEZ235 su linee cellulari di LAL-T e blasti provenienti da pazienti pediatrici affetti da LAL-T. Entrambi i trattamenti con i doppi inibitori hanno mostrato una forte citotossicità contro le linee cellulari ed i linfoblasti dei pazienti analizzati.

L'effetto antiproliferativo del PI-103 e dell'NVP-BEZ235 è stato documentato in cellule di glioblastoma [Fan et al., 2006; Maira et al., 2008] ed in altri tipi tumorali, come ad esempio le AML [Kojima et al., 2008; Tamburini et al., 2008].

I risultati qui riportati non sono in accordo con quelli ottenuti su linee cellulari di AML, in cui si otteneva un modesto effetto citotossico dovuto al trattamento con PI-103 da solo, mentre la combinazione con un inibitore di MDM2, la Nutlina-3, aumentava l'effetto citotossico [Kojima et al., 2008]. Tuttavia i dati qui riportati sono in accordo con quelli riguardanti le linee cellulari di glioblastoma, dove il PI-103 ha mostrato citotossicità indipendentemente dallo stato di p53.

Entrambi i trattamenti sono stati efficaci contro la linea cellulare CEM-R, che presenta overespressione della 170-kDa glicoproteina-P, implicata nella resistenza ai farmaci. Questa osservazione è molto importante in quanto circa il 24% dei pazienti affetti da LAL-T presentano l'espressione della P-gp e ciò correla negativamente con il raggiungimento della remissione completa [Tafari et al., 2002; Vitale et al., 2006].

Il trattamento con PI-103 ed NVP-BEZ235 ha indotto un accumulo di cellule in fase G_0/G_1 del ciclo cellulare, accompagnato da una defosforilazione della proteina pRB, ed un aumento dell'apoptosi, caratterizzata dall'attivazione delle caspasi nelle linee cellulari di LAL-T analizzate. Inoltre i trattamenti con PI-103 ed NVP-BEZ235 sono stati in grado di causare una forte defosforilazione di AKT sulla Ser473 ed inoltre dei principali bersagli a valle di mTOR: p-p70S6K, p-4E-BP1 e p-S6RP. Il PI-103 e l' NVP-BEZ235 in associazione con Vincristina, hanno mostrato un significativo aumento della citotossicità. Inoltre la combinazione di NVP-BEZ235 e Vincristina ha ridotto la resistenza alla Vincristina, indotta in cellule Jurkat dalla co-coltura con cellule stromali MS-5, che mimavano le interazioni fra cellule leucemiche ed il microambiente midollare.

Il trattamento con entrambi i farmaci, PI-103 ed NVP-BEZ235, è risultato citotossico su blasti provenienti da pazienti pediatrici con LAL-T, che mostravano fosforilazione costitutiva di AKT, 4E-BP1 e S6RP e bassa/assente espressione di PTEN.

Il PI-103 è risultato più efficace rispetto alla Rapamicina, nel ridurre la crescita cellulare delle linee di LAL-T, anche quando utilizzato a concentrazioni equimolari. Il PI-103 è stato inoltre più efficace della Wortmannin, inibitore irreversibile della PI3K e dell'LY294002, inibitore reversibile di PI3K.

Dato che la Rapamicina ed i suoi analoghi sono specifici solo contr mTORC1, ma non mTORC2 (responsabile della fosforilazione sulla Ser473 di AKT) è stato mostrato che l'uso di questi inibitori potrebbe determinare una iperattivazione di AKT. Nel nostro modello cellulare abbiamo osservato

che il trattamento con Rapamicina, sulle linee cellulari di LAL-T è risultato in una iperattivazione di AKT a 8 e 48 h. Anche GSK3 β , substrato di AKT, ha mostrato una iperfosforilazione allo stesso tempo. Al contrario il PI-103, che inibisce sia mTORC1 che mTORC2, non iperattiva AKT nelle cellule di LAL-T, anche a tempi di incubazione più lunghi e questo potrebbe essere correlato all'inibizione di mTORC2. Un precedente lavoro ha sottolineato che in cellule Jurkat, il trattamento prolungato con Rapamicina inibiva mTORC2 a 24 h. Tuttavia questo studio non ha esaminato tempi più lunghi e non sappiamo se l'iperfosforilazione di AKT perduri sia anche dopo 48 h di trattamento con Rapamicina, in quanto il farmaco potrebbe avere una bassa stabilità in vitro.

Di particolare interesse, sia il PI-103, sia L'NVP-BEZ235, ma non la Rapamicina hanno defosforilato 4E-BP1. Ciò potrebbe dipendere dal fatto che nelle cellule di LAL-T, 4E-BP1 è un bersaglio delle chisasi PIM e non di mTORC1 (ref). Si potrebbe quindi ipotizzare che il PI-103 e l'NVP-BEZ235 blocchino l'asse della PI3K/AKT, determinando una modulazione negativa delle chinasi PIM, che sono note essere bersagli a valle di PI3K/AKT (ref). La mancanza della fosforilazione di 4E-BP1, determinata dalla Rapamicina, potrebbe spiegare perché il farmaco è molto meno efficace del PI-103 e dell'NVP-BEZ235 sulle linee cellulari di LAL-T.

Infine, il trattamento con NVP-BEZ235 e con Rapamicina è stato in grado di indurre la scomparsa o una forte riduzione della SP, sia in linee cellulari come Molt-4, CEM-S e BE-13, sia in blasti di pazienti pediatrici affetti da LAL-T L'NVP-BEZ235 infine è stato efficace anche nel colpire la SP, identificata con Hoechst 33342 e marcatura con ABCG2.

E' stato quindi dimostrato che l'NVP-BEZ235 agisce sulla SP delle cellule di LAL-T, le quali overesprimono ABCG2 e altre pompe di membrane della famiglia dei trasportatori ABC. E' ritenuto che in questa popolazione siano presenti le cellule staminali leucemiche, dalle quali si originerebbe il tumore.

Complessivamente i dati riportati in questo studio mostrano come la terapia mirata con singoli inibitori specifici o doppi inibitori dell'asse di sopravvivenza di PI3K/AKT/mTOR possa essere determinante nel bloccare la crescita cellulare di cellule leucemiche di LAL-T di indurre apoptosi.

Questi studi preclinici possono essere determinanti per la caratterizzazione di nuovi bersagli dell'asse e per la migliore conoscenza dei meccanismi d'azione che stanno alla base dei fenomeni di sopravvivenza, ma anche di farmaco-resistenza. E' determinante inoltre capire a che livello della maturazione empoietica avvenga l'attivazione di questi meccanismi, colpendo quel compartimento di cellule da cui si origina la malattia. Ulteriori indagini sono quindi necessarie al fine di comprendere definitivamente il ruolo dell'asse di sopravvivenza basato su PI3K/AKT/mTOR in tutte le fasi della leucemia linfoblastica acuta T.

BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal BB (2004): Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 6:203-8.
- Arden KC, Biggs WH, 3rd (2002): Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Arch Biochem Biophys* 403:292-8.
- Argiris A, Cohen E, Karrison T, Esparaz B, Mauer A, Ansari R, Wong S, Lu Y, Pins M, Dancey J, Vokes E (2006): A phase II trial of perifosine, an oral alkylphospholipid, in recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Biol Ther* 5:766-70.
- Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, Logan TF, Dutcher JP, Hudes GR, Park Y, Liou SH, Marshall B, Boni JP, Dukart G, Sherman ML (2004): Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 22:909-18.
- Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M, Downward J (2003): Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* 11:11-23.
- Birkenkamp KU, Geugien M, Schepers H, Westra J, Lemmink HH, Vellenga E (2004): Constitutive NF-kappaB DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway. *Leukemia* 18:103-12.
- Bleau AM, Huse JT, Holland EC (2009): The ABCG2 resistance network of glioblastoma. *Cell Cycle* 8:2936-44.
- Borgatti P, Martelli AM, Tabellini G, Bellacosa A, Capitani S, Neri LM (2003): Threonine 308 phosphorylated form of Akt translocates to the nucleus of PC12 cells under nerve growth factor stimulation and associates with the nuclear matrix protein nucleolin. *J Cell Physiol* 196:79-88.
- Bortul R, Tazzari PL, Cappellini A, Tabellini G, Billi AM, Bareggi R, Manzoli L, Cocco L, Martelli AM (2003): Constitutively active Akt1 protects HL60 leukemia cells from TRAIL-induced apoptosis through a mechanism involving NF-kappaB activation and cFLIP(L) up-regulation. *Leukemia* 17:379-89.
- Cain RJ, Ridley AJ (2009): Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol Cell* 101:13-29.
- Calzavara E, Chiaramonte R, Cesana D, Basile A, Sherbet GV, Comi P (2008): Reciprocal regulation of Notch and PI3K/Akt signalling in T-ALL cells in vitro. *J Cell Biochem* 103:1405-12.
- Cao P, Maira SM, Garcia-Echeverria C, Hedley DW (2009): Activity of a novel, dual PI3-kinase/mTor inhibitor NVP-BEZ235 against primary human pancreatic cancers grown as orthotopic xenografts. *Br J Cancer* 100:1267-76.

- Chan TO, Rodeck U, Chan AM, Kimmelman AC, Rittenhouse SE, Panayotou G, Tsiichlis PN (2002): Small GTPases and tyrosine kinases coregulate a molecular switch in the phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit. *Cancer Cell* 1:181-91.
- Chiarini F, Del Sole M, Mongiorgi S, Gaboardi GC, Cappellini A, Mantovani I, Follo MY, McCubrey JA, Martelli AM (2008): The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism. *Leukemia* 22:1106-16.
- Choi Y, Zhang J, Murga C, Yu H, Koller E, Monia BP, Gutkind JS, Li W (2002): PTEN, but not SHIP and SHIP2, suppresses the PI3K/Akt pathway and induces growth inhibition and apoptosis of myeloma cells. *Oncogene* 21:5289-300.
- Chou TC, Talalay P (1984): Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22:27-55.
- Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW (2006): Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6:184-92.
- de Vries JF, Wammes LJ, Jedema I, van Dreunen L, Nijmeijer BA, Heemskerk MH, Willemze R, Falkenburg JH, Barge RM (2007): Involvement of caspase-8 in chemotherapy-induced apoptosis of patient derived leukemia cell lines independent of the death receptor pathway and downstream from mitochondria. *Apoptosis* 12:181-93.
- Du K, Tsiichlis PN (2005): Regulation of the Akt kinase by interacting proteins. *Oncogene* 24:7401-9.
- Engelman JA (2009): Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9:550-62.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006): The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7:606-19.
- Faivre S, Kroemer G, Raymond E (2006): Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5:671-88.
- Fan QW, Cheng CK, Nicolaidis TP, Hackett CS, Knight ZA, Shokat KM, Weiss WA (2007): A dual phosphoinositide-3-kinase alpha/mTOR inhibitor cooperates with blockade of epidermal growth factor receptor in PTEN-mutant glioma. *Cancer Res* 67:7960-5.
- Fan QW, Knight ZA, Goldenberg DD, Yu W, Mostov KE, Stokoe D, Shokat KM, Weiss WA (2006): A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell* 9:341-9.

- Feldman ME, Apse B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM (2009): Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 7:e38.
- Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J (2002): Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16:1472-87.
- Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C (2003): PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22:8983-98.
- Gajate C, Mollinedo F (2007): Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* 109:711-9.
- Gao T, Furnari F, Newton AC (2005): PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18:13-24.
- Garcia-Echeverria C, Sellers WR (2008): Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 27:5511-26.
- Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A (2005): PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia* 19:586-94.
- Guertin DA, Sabatini DM (2007): Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12:9-22.
- Guertin DA, Stevens DM, Saitoh M, Kinkel S, Crosby K, Sheen JH, Mullholland DJ, Magnuson MA, Wu H, Sabatini DM (2009): mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell* 15:148-59.
- Hanada M, Feng J, Hemmings BA (2004): Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1697:3-16.
- Hardt SE, Sadoshima J (2002): Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res* 90:1055-63.
- Hay N (2005): The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* 8:179-83.
- Hay N, Sonenberg N (2004): Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926-45.
- Hideshima T, Catley L, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Chauhan D, Richardson PG, Anderson KC (2006): Perifosine, an oral bioactive novel

alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 107:4053-62.

Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY (2007): Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 67:4827-33.

Ihle NT, Lemos R, Jr., Wipf P, Yacoub A, Mitchell C, Siwak D, Mills GB, Dent P, Kirkpatrick DL, Powis G (2009): Mutations in the phosphatidylinositol-3-kinase pathway predict for antitumor activity of the inhibitor PX-866 whereas oncogenic Ras is a dominant predictor for resistance. *Cancer Res* 69:143-50.

Ihle NT, Powis G (2009): Take your PIK: phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors race through the clinic and toward cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 8:1-9.

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN (2004): Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6:1122-8.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2002): mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163-75.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2003): GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11:895-904.

Kojima K, Shimanuki M, Shikami M, Samudio IJ, Ruvolo V, Corn P, Hanaoka N, Konopleva M, Andreeff M, Nakakuma H (2008): The dual PI3 kinase/mTOR inhibitor PI-103 prevents p53 induction by Mdm2 inhibition but enhances p53-mediated mitochondrial apoptosis in p53 wild-type AML. *Leukemia* 22:1728-36.

Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK (2003): Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther* 2:1093-103.

Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M (2002): Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 16:1713-24.

Kops GJ, Medema RH, Glassford J, Essers MA, Dijkers PF, Coffey PJ, Lam EW, Burgering BM (2002): Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol* 22:2025-36.

- Kumar CC, Madison V (2005): AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* 24:7493-501.
- Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL (2004): TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 29:32-8.
- Liu TJ, Koul D, LaFortune T, Tiao N, Shen RJ, Maira SM, Garcia-Echeverria C, Yung WK (2009): NVP-BEZ235, a novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor, elicits multifaceted antitumor activities in human gliomas. *Mol Cancer Ther* 8:2204-10.
- Liu W, Akhand AA, Takeda K, Kawamoto Y, Itoigawa M, Kato M, Suzuki H, Ishikawa N, Nakashima I (2003): Protein phosphatase 2A-linked and -unlinked caspase-dependent pathways for downregulation of Akt kinase triggered by 4-hydroxynonenal. *Cell Death Differ* 10:772-81.
- Maehama T, Dixon JE (1998): The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273:13375-8.
- Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chene P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, Garcia-Echeverria C (2008): Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 7:1851-63.
- Martelli AM, Nyakern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, Cocco L (2006): Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20:911-28.
- Martelli AM, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Cappellini A, Billi AM, Cocco L (2005): Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias. *Histol Histopathol* 20:239-52.
- McMillin DW, Ooi M, Delmore J, Negri J, Hayden P, Mitsiades N, Jakubikova J, Maira SM, Garcia-Echeverria C, Schlossman R, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC, Mitsiades CS (2009): Antimyeloma activity of the orally bioavailable dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res* 69:5835-42.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000): AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404:782-7.

- Miao ZH, Ding J (2003): Transcription factor c-Jun activation represses *mdr-1* gene expression. *Cancer Res* 63:4527-32.
- Nyakern M, Cappellini A, Mantovani I, Martelli AM (2006): Synergistic induction of apoptosis in human leukemia T cells by the Akt inhibitor perifosine and etoposide through activation of intrinsic and Fas-mediated extrinsic cell death pathways. *Mol Cancer Ther* 5:1559-70.
- Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, Caparros E, Buteau J, Brown K, Perkins SL, Bhagat G, Agarwal AM, Basso G, Castillo M, Nagase S, Cordon-Cardo C, Parsons R, Zuniga-Pflucker JC, Dominguez M, Ferrando AA (2007): Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med* 13:1203-10.
- Papa V, Tazzari PL, Chiarini F, Cappellini A, Ricci F, Billi AM, Evangelisti C, Ottaviani E, Martinelli G, Testoni N, McCubrey JA, Martelli AM (2008): Proapoptotic activity and chemosensitizing effect of the novel Akt inhibitor perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia* 22:147-60.
- Patel V, Lahusen T, Sy T, Sausville EA, Gutkind JS, Senderowicz AM (2002): Perifosine, a novel alkylphospholipid, induces p21(WAF1) expression in squamous carcinoma cells through a p53-independent pathway, leading to loss in cyclin-dependent kinase activity and cell cycle arrest. *Cancer Res* 62:1401-9.
- Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR (2002): A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* 2:81-91.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J (1994): Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370:527-32.
- Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M (2003): Anti-cancer alkyllysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs* 14:167-73.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005): Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-101.
- Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompaker R, Kops GJ, Lam EW, Burgering BM, Medema RH (2002): Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* 22:7842-52.

- Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massague J (2004): Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117:211-23.
- Shishodia S, Aggarwal BB (2002): Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol* 35:28-40.
- Shukla S, Sauna ZE, Ambudkar SV (2008): Evidence for the interaction of imatinib at the transport-substrate site(s) of the multidrug-resistance-linked ABC drug transporters ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCG2. *Leukemia* 22:445-7.
- Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M, Nowill AE, Leslie NR, Cardoso AA, Barata JT (2008): PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest* 118:3762-74.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998): Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95:29-39.
- Tabellini G, Cappellini A, Tazzari PL, Fala F, Billi AM, Manzoli L, Cocco L, Martelli AM (2005): Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells. *J Cell Physiol* 202:623-34.
- Tafari A, Gregorj C, Petrucci MT, Ricciardi MR, Mancini M, Cimino G, Mecucci C, Tedeschi A, Fioritoni G, Ferrara F, Di Raimondo F, Gallo E, Liso V, Fabbiano F, Cascavilla N, Pizzolo G, Camera A, Pane F, Lanza F, Cilloni D, Annino L, Vitale A, Vegna ML, Vignetti M, Foa R, Mandelli F (2002): MDR1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100:974-81.
- Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, Park S, Sujobert P, Willems L, Ifrah N, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D (2008): Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood* 111:379-82.
- Thompson JE, Thompson CB (2004): Putting the rap on Akt. *J Clin Oncol* 22:4217-26.
- Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS (2009): An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem* 284:8023-32.

- Thoreen CC, Sabatini DM (2009): Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy* 5:725-6.
- Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP (2004): The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380:297-309.
- Van Ummersen L, Binger K, Volkman J, Marnocha R, Tutsch K, Kolesar J, Arzoomanian R, Alberti D, Wilding G (2004): A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 10:7450-6.
- Vink SR, Schellens JH, van Blitterswijk WJ, Verheij M (2005): Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid. *Invest New Drugs* 23:279-86.
- Vink SR, van Blitterswijk WJ, Schellens JH, Verheij M (2007): Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy. *Cancer Treat Rev* 33:191-202.
- Vitale A, Guarini A, Ariola C, Mancini M, Mecucci C, Cuneo A, Pane F, Saglio G, Cimino G, Tafuri A, Meloni G, Fabbiano F, Recchia A, Kropp MG, Krampera M, Cascavilla N, Ferrara F, Romano A, Mazza P, Fozza C, Paoloni F, Vignetti M, Foa R (2006): Adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: biologic profile at presentation and correlation with response to induction treatment in patients enrolled in the GIMEMA LAL 0496 protocol. *Blood* 107:473-9.
- Vivanco I, Sawyers CL (2002): The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501.
- West KA, Castillo SS, Dennis PA (2002): Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 5:234-48.
- Westhoff MA, Kandenwein JA, Karl S, Vellanki SH, Braun V, Eramo A, Antoniadis G, Debatin KM, Fulda S (2009): The pyridinylfuranopyrimidine inhibitor, PI-103, chemosensitizes glioblastoma cells for apoptosis by inhibiting DNA repair. *Oncogene* 28:3586-96.
- Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, Andreeff M, Goodell MA (2001): A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 98:1166-73.

Bibliografia

Zhao S, Konopleva M, Cabreira-Hansen M, Xie Z, Hu W, Milella M, Estrov Z, Mills GB, Andreeff M (2004): Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias. *Leukemia* 18:267-75.

Zhao WL (2009): Targeted therapy in T-cell malignancies: dysregulation of the cellular signaling pathways. *Leukemia*.

Zhou J, Liu M, Aneja R, Chandra R, Lage H, Joshi HC (2006): Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells by the c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res* 66:445-52.