

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

DOTTORATO DI RICERCA IN

**Scienze biomediche: progetto n. 3 “Fisiologia Applicata e Fisiopatologia”**

Ciclo XXIV

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/A2**

**Settore Scientifico disciplinare: MED/04**

**L’inibizione della lattico deidrogenasi : una possibile strategia per migliorare il trattamento farmacologico del carcinoma epatocellulare**

Presentata da: Dott. Marcella Manerba

**Coordinatore Dottorato  
Prof. Lucio Cocco**

**Relatore  
Prof. Giuseppina Di Stefano**

Esame finale anno 2012

# INDICE

<b>1. Introduzione</b>	<b>4</b>
<i>1.1 La glicolisi e la glicolisi aerobia</i>	<b>6</b>
<i>1.2 La lattico deidrogenasi</i>	<b>9</b>
<i>1.3 Il carcinoma epatocellulare</i>	<b>11</b>
<b>2. Sintesi del progetto di ricerca</b>	<b>14</b>
<b>3. Materiali e Metodi</b>	<b>17</b>
<i>3.1 Composti</i>	<b>17</b>
<i>3.2 Colture cellulari</i>	<b>17</b>
<i>3.3 Inibizione della LDH mediante acido ossamico (OXA)</i>	<b>18</b>
<i>3.4 Inibizione della produzione di lattato</i>	<b>19</b>
<i>3.5 Misura dei livelli di ATP</i>	<b>20</b>
<i>3.6 Saggio di vitalità cellulare</i>	<b>20</b>
<i>3.7 Osservazione morfologica delle cellule trattate</i>	<b>21</b>
<i>3.8 Analisi dell'espressione di PUMA</i>	<b>21</b>
<i>3.9 Analisi della fosforilazione di ERK 1/2</i>	<b>21</b>
<i>3.10 Saggio sulla respirazione cellulare</i>	<b>23</b>
<i>3.11 Valutazione dei potenziali inibitori della LDH identificati mediante la procedura di virtual screening</i>	<b>23</b>

<i>3.12 Meccanismo di morte cellulare</i>	<b>25</b>
<i>3.13 Analisi statistica</i>	<b>25</b>
<b>4. Risultati e discussione</b>	<b>24</b>
<i>4.1 Studio dell'inibizione della glicolisi aerobia prodotta dall'inibizione della LDH in linee cellulari di epatocarcinoma umano</i>	<b>26</b>
4.1.1 Inibizione della LDH e della glicolisi aerobia da parte dell'OXA	<b>26</b>
4.1.2 Effetto di OXA sulla vitalità cellulare	<b>25</b>
4.1.3 Analisi dell'espressione di PUMA	<b>30</b>
<i>4.2 Studio dell'associazione di OXA con gli inibitori delle proteine chinasi</i>	<b>31</b>
4.2.1 Effetto degli inibitori di chinasi e della loro associazione con OXA sulla vitalità delle cellule PLC/PRF/5.	<b>31</b>
4.2.2 Effetti provocati dal sorafenib e dalla sua associazione con OXA sulla morfologia delle cellule PLC/PRF/5	<b>33</b>
4.2.3 Analisi della fosforilazione di ERK 1/2 in cellule trattate con sorafenib e con l'associazione di OXA e sorafenib	<b>35</b>
4.2.4 Effetti metabolici del sorafenib	<b>36</b>
<i>4.3 Caratterizzazione di nuovi inibitori dell'enzima lattico deidrogenasi</i>	<b>40</b>

4.3.1 Galloflavina	44
4.3.2 Studio del meccanismo di inibizione della galloflavina	45
4.3.3 Effetto della galloflavina su colture cellulari	47
<b>4. Conclusione ed esperimenti futuri</b>	<b>49</b>
<b>5. Bibliografia</b>	<b>51</b>

## 1. Introduzione

La glicolisi aerobia (o effetto Warburg) è una via metabolica caratteristica dei tessuti tumorali ed è stata descritta quasi un secolo fa da Warburg, il quale dimostrò che le cellule tumorali metabolizzano il glucosio in maniera diversa rispetto alle cellule normali (Warburg, 1926). Warburg attribuì questa caratteristica metabolica ad un difetto della respirazione cellulare, con un conseguente aumento della glicolisi a cui le cellule neoplastiche devono ricorrere per far fronte alle loro esigenze energetiche. Egli propose una teoria che vedeva nella compromissione della respirazione cellulare la prima causa della trasformazione tumorale, tuttavia, questa ipotesi fu considerata troppo semplicistica, in quanto non riusciva a collegare direttamente il meccanismo molecolare della crescita cellulare incontrollata con il deficit della respirazione.

Con il passare del tempo la visione del cancro come patologia legata ad alterazioni metaboliche è stata gradualmente sostituita dalla visione della trasformazione tumorale come patologia genetica. Recentemente, l'interesse verso il metabolismo delle cellule tumorali è nuovamente rifiorito in quanto è diventato evidente che i prodotti degli oncogeni e degli oncosoppressori non controllano solo la divisione cellulare, ma intervengono anche nella regolazione delle vie metaboliche.

Secondo un'ipotesi sempre più accreditata nella comunità scientifica, la compromissione della respirazione cellulare potrebbe essere il fattore che, causando instabilità genomica, accompagna la trasformazione tumorale. Una volta generatasi, l'instabilità genomica può ulteriormente contribuire ad aggravare il deficit respiratorio, alla comparsa di nuove mutazioni e, in definitiva, alla progressione neoplastica. (Seyfried e Shelton, 2010).

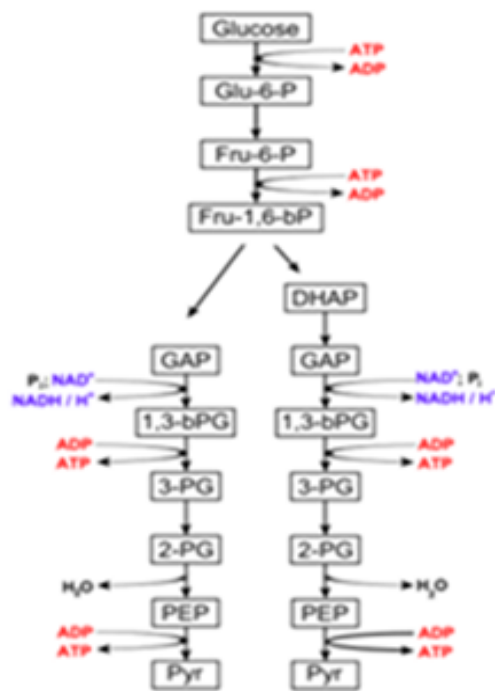
Diversi sono i meccanismi proposti per spiegare come alterazioni del metabolismo cellulare possano contribuire alla glicolisi aerobica e all'instabilità genomica:

- Il DNA mitocondriale (mtDNA) che codifica per diversi importanti componenti proteiche della catena respiratoria, è soggetto ad alti tassi di mutazione (Pelicano et al., 2006). Queste mutazioni possono generare effetti negativi sull'efficienza della catena respiratoria forzando così le cellule alla generazione di ATP per via glicolitica. Anche una riduzione del potenziale di membrana interna mitocondriale, spesso conseguenza di un danno al mtDNA, può alterare la funzione di numerosi enzimi di riparazione del DNA, facilitando così il manifestarsi di mutazioni a livello del genoma. (Veatch et al., 2009).
- Esistono inoltre molti studi che documentano come le mutazioni di alcuni oncogeni possano influenzare le vie metaboliche cellulari favorendo l'instaurarsi di un fenotipo glicolitico. Per esempio in cellule di roditore transfettate con gli oncogeni RAS o SRC è stato osservato un notevole aumento della penetrazione cellulare di glucosio, dovuto ad una aumentata espressione del suo trasportatore di membrana, rilevata sia a livello della proteina che del suo mRNA. (Flier et al., 1987). Un ulteriore esempio viene dall'osservazione che l'iperattivazione di AKT, una delle mutazioni più frequentemente osservate nei tumori umani, è in grado di contribuire sia all'aumentata proliferazione delle cellule neoplastiche, sia al manifestarsi di un fenotipo altamente glicolizzante. (Robey e Hay, 2009).

## 1.1 Glicolisi e “glicolisi aerobia”

Il metabolismo del glucosio può essere diviso in 2 fasi.

La prima fase, simile nelle cellule normali ed in quelle tumorali, è la glicolisi, un processo metabolico nel quale da una molecola di glucosio vengono generati 2 residui di NAD ridotto e 2 di piruvato con concomitante produzione di 2 molecole di ATP. È un processo che può avvenire anche in assenza di ossigeno ed è per questo molto sfruttato in natura per la produzione di energia.



**Da 1 mole di GLC si ottengono  
2 moli NADH e 2 di PYR, con  
guadagno netto di 2 moli di ATP**

Figura 1. Fase iniziale del metabolismo glucidico.

In una seconda fase l'acido piruvico, decarbossilato ad acetil-coA entra nel ciclo di Krebs e viene demolito fino a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O mentre il NADH viene riossidato dalla catena respiratoria mitocondriale. In questo caso, da una singola molecola di glucosio tramite glicolisi, ciclo di Krebs e catena respiratoria si ottengono circa 36 molecole di ATP.

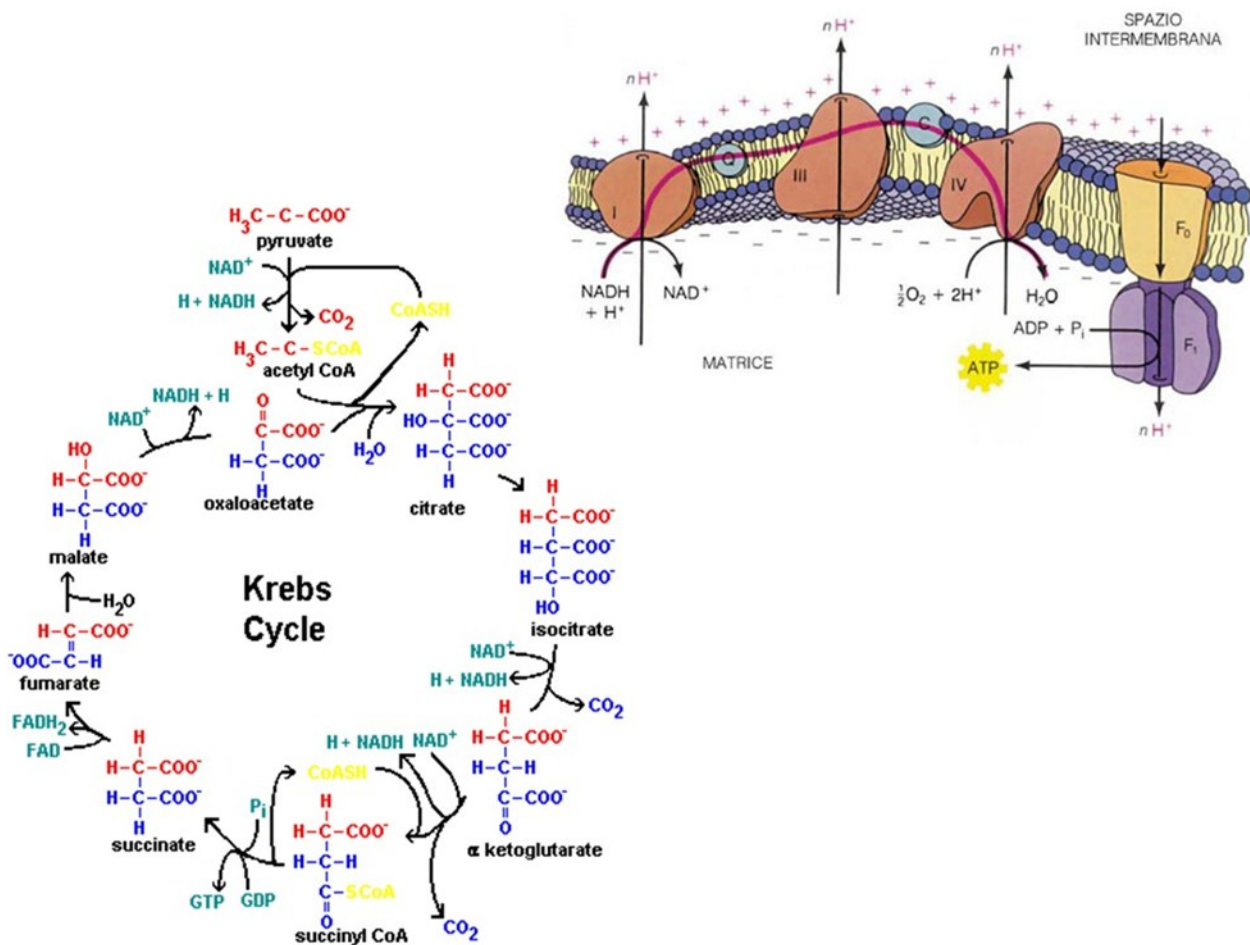


Figura 2.Ciclo di Krebs e catena respiratoria mitocondriale.

In alcuni casi però la carenza di ossigeno fa sì che il piruvato prodotto dalla glicolisi non possa essere indirizzato a queste vie metaboliche, per questo motivo viene convertito dall'enzima lattico deidrogenasi (LDH) in acido lattico con la contemporanea ri-generazione di NAD permettendo così il continuo flusso della prima fase della reazione di glicolisi (che necessita di NAD) e portando ad un accumulo di acido lattico nell'ambiente extracellulare.



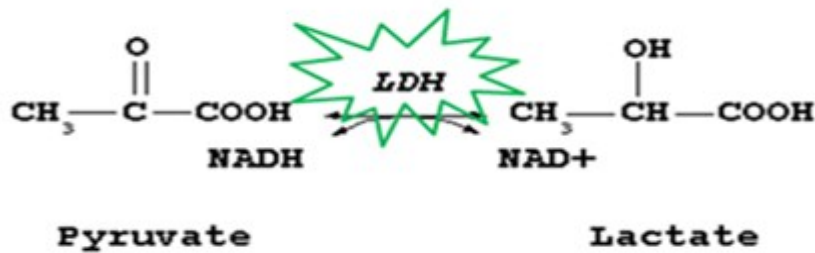


Figura 3. Reazione catalizzata dalla lattico deidrogenasi.

Attraverso questa via si ottengono 2 moli di ATP per mole di glucosio metabolizzato. Nelle cellule normali questa via è attiva solo in particolari condizioni come lo sviluppo embrionale, oppure in condizioni di insufficiente apporto di ossigeno, ad esempio nel muscolo in iper-lavoro.

Nelle cellule tumorali, al contrario, questo processo metabolico è attivo anche in condizioni di buona ossigenazione ed è per questo chiamato glicolisi aerobia.

Nonostante la sua bassa resa energetica, questa via metabolica può risultare vantaggiosa alle cellule tumorali. Come tutte le cellule in attiva replicazione, infatti anche le cellule tumorali devono poter riprodurre i loro acidi nucleici. I precursori indispensabili per questa sintesi si ottengono da intermedi della glicolisi, attraverso una via metabolica denominata “shunt dei pentosi” (Vander Heiden et al., 2009).

Inoltre, l’alto livello di enzimi glicolitici può conferire alle cellule tumorali la capacità di resistere in stato d’ipossia, una condizione molto frequentemente riscontrata nei tumori solidi, in cui l’ossigenazione del tessuto è generalmente incompleta a causa dell’inefficiente formazione della rete vascolare (Pelicano et al., 2006). In tal situazione la glicolisi può essere ulteriormente potenziata al fine di compensare il ridotto apporto di ossigeno.

Infine, l’acidificazione del microambiente, dovuta all’accumulo di acido lattico prodotto dalla glicolisi aerobia, potrebbe facilitare l’invasione tumorale, agevolando la degradazione della matrice extracellulare e l’angiogenesi. (Gatenby e Gillies, 2004).

La maggiore dipendenza delle cellule tumorali dalla glicolisi aerobia è unanimemente considerata una utile base biochimica per lo sviluppo di strategie antitumorali.

Nel corso del mio dottorato ho studiato l'effetto della inibizione della glicolisi aerobia indirizzandomi specificamente all'inibizione dell'enzima lattico deidrogenasi. La LDH sembra essere l'unico enzima la cui inibizione può portare ad un blocco della glicolisi aerobia delle cellule tumorali senza però danneggiare le cellule sane le quali, in condizione di normale attività e di sufficiente apporto di ossigeno, non necessitano di questo enzima.

A supportare la validità di questo tentativo terapeutico esistono studi che mostrano che pazienti con un insufficienza ereditaria di LDH-A (l'isoforma presente nel muscolo e nel fegato) (Kanno et al., 1988) o LDH-B (l'isoforma presente nel cuore) (Okumura et al., 1999) non mostrano sintomi di particolare rilievo. Inoltre è stato osservato che cellule tumorali con ridotta attività di LDH ottenuta mediante shRNA (Fantin et al., 2006) o si-RNA (Le et al., 2010) mostrano una riduzione della cancerogenicità.

## ***1.2 Lattico deidrogenasi (LDH)***

La lattico deidrogenasi è un enzima presente in quasi tutti i tessuti animali, nei microorganismi, nei lieviti e nelle piante. Grazie al crescente interesse nei confronti di questo enzima nel campo della terapia antitumorale, la LDH è stata ben caratterizzata e recentemente sono state rese note le strutture delle diverse isoforme dell'enzima umano. Numerosi studi sono stati eseguiti anche per caratterizzare la LDH del *Plasmodium falciparum*, allo scopo di identificare inibitori utili nella terapia antimalarica.

Le isoforme umane sono 5, tutte tetrameriche. I tetrameri sono formati dalla combinazioni di due differenti tipi di subunità, M e H codificate da due diversi geni *ldh-a* e *ldh-b*. Grazie alla combinazione di questi monomeri si ottengono due isoforme omotetrameriche chiamate LDH-A (M<sub>4</sub>) e LDH-B (H<sub>4</sub>) e tre isoforme eterotetrameriche LDH-2 (M<sub>1</sub>H<sub>3</sub>), LDH-3(M<sub>2</sub>H<sub>2</sub>), LDH-4(M<sub>3</sub>H<sub>1</sub>). Nell'uomo esiste inoltre un'altra isoforma LDH-X (C<sub>4</sub>) il cui monomero viene codificato dal gene *ldh-c*; questa proteina sembra essere coinvolta nella fertilità maschile in quanto viene espressa principalmente nei testicoli e negli spermatozoi (Yu Yet al.,2001; Hogrefe HH et al., 1987). Le cinque isoforme della LDH hanno una struttura molto simile ma presentano delle differenze a livello della distribuzione tissutale (e cellulare), della cinetica enzimatica e della regolazione.

La LDH-A (o LDH-5) e la LDH-4, composte principalmente da subunità M, sembrano essere maggiormente espresse in tessuti che possono essere soggetti a condizioni di anaerobiosi, come i muscoli scheletrici, il fegato e i tessuti neoplastici. La LDH-B (o LDH-1) e la LDH-2, formate per la maggior parte da subunità H, sono distribuite principalmente in tessuti con un elevato metabolismo aerobico, ad esempio il cuore, la milza, il rene e il cervello. La LDH-3, con caratteristiche intermedie fra le altre isoforme, si ritrova principalmente nei tessuti linfatici o in alcuni tessuti tumorali maligni. Anche la distribuzione all'interno della cellula è diversa in base al tipo di isoforma. Nel cuore, ad esempio, la LDH-B è concentrata all'interno del mitocondrio, mentre, nel muscolo, la LDH-A è presente in ugual misura sia nella matrice mitocondriale che nel citosol. La stessa isoforma A, nel caso del fegato, è più abbondante all'interno del mitocondrio.

È stato ipotizzato che la differente distribuzione cellulare sia collegata al ruolo fondamentale della LDH nel meccanismo di “Navetta del lattato intracellulare”, soprattutto presente nei tessuti muscolari ed epatici umani. Secondo questa ipotesi, il lattato prodotto nel citosol dalla glicolisi viene trasportato nello spazio intermembrana mitocondriale dove viene ossidato a piruvato, da una LDH

mitocondriale, e rilasciato perciò all'interno della matrice mitocondriale per poter entrare nel ciclo di Krebs (Brooks et al., 1999)

La differente distribuzione tissutale e cellulare è probabilmente anche legata alla differente affinità delle varie isoforme col substrato. Le isoforme composte prevalentemente da subunità M hanno un'affinità maggiore per il piruvato e tendono perciò a catalizzare preferibilmente la reazione di conversione del piruvato in lattato, mentre le isoforme costituite in maggior parte da monomeri H sono più efficienti nella trasformazione del lattato in piruvato. Ciò conferma la teoria di Kaplan (Kaplan et al., 1960) secondo cui la LDH-A, che produce maggiormente lattato, è favorita soprattutto in tessuti con un basso livello di ossigenazione, mentre la LDH-B, che porta preferibilmente alla formazione di piruvato, è invece favorita nei tessuti con un forte metabolismo aerobico (Everse et al., 1973)

Come accennato in precedenza, l'isoforma LDH-A è sovra-espressa nei tessuti tumorali. Questo giustifica la ricerca di inibitori selettivi per la LDH da valutare come potenziali inibitori della proliferazione tumorale.

### ***1.3 Il carcinoma epatocellulare***

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è il più comune tumore maligno primario del fegato e uno dei più frequenti tumori nel mondo (Llovet et al., 2003). I fattori di rischio per la comparsa di questo tumore sono l'epatite cronica di tipo B o C, l'esposizione all'aflatossina, il consumo di alcool ed elevati livelli di ferro nel fegato. Nei Paesi Occidentali l'HCC è comunemente associato all'epatite cronica e alla cirrosi. Gli HCCs iniziano da lesioni precancerose che portano a HCCs ben differenziati (WD HCCs), i quali riproducono la morfologia degli epatociti e l'architettura del parenchima epatico, e possono progredire a forme non differenziate

(PD HCCs), costituite da cellule anaplastiche, voluminose, spesso multinucleate, addossate le une alle altre. I PD HCCs possono però iniziare come tali senza originarsi da tumori ben differenziati. Gli esami ecografici hanno un ruolo chiave nella diagnosi dell'HCC, e sempre più spesso questo tumore viene diagnosticato quando è ancora asintomatico, in pazienti portatori di cirrosi epatica e soggetti a controlli frequenti (Befeler et al., 2002). L'uso della tomografia computerizzata e macchinari per la risonanza magnetica sempre più sofisticati hanno portato ad una maggiore sensibilità e specificità delle tecniche diagnostiche dell'HCC. La diagnosi precoce rimane un punto chiave per migliorare la prognosi di questo tumore. Identificare la patologia quando sono presenti tumori ancora piccoli e asintomatici comporta migliori possibilità di trattamento. Determinare accuratamente lo stadio dell'HCC è importante per formulare le prognosi e per decidere la terapia migliore. Fattori importanti da considerare per il trattamento del tumore sono la grandezza, la multifocalità, la gravità di altre patologie epatiche presenti e lo stato di salute generale del paziente.

I trattamenti curativi per l'HCC comprendono la resezione chirurgica, il trapianto di fegato e l'ablazione percutanea. Perché sia possibile una resezione chirurgica il paziente deve avere una buona funzionalità epatica mentre il trapianto è indicato quando le funzioni epatiche sono danneggiate e il tumore non ha raggiunto i vasi sanguigni con probabilità di aver dato metastasi extraepatiche. In caso questi trattamenti non siano attuabili, una possibile terapia per gli HCCs precoci è l'ablazione percutanea con la quale si ottiene la necrosi del tumore tramite l'iniezione di agenti chimici, come l'alcool o l'acido acetico, o mediante l'uso di mezzi fisici come la radiofrequenza (El-Serag, 2011). Teoricamente il trapianto è il miglior trattamento per l'HCC poiché permette la rimozione, non solo del tratto epatico invasivo, ma anche del tessuto circostante che è a rischio di sviluppare un altro cancro. Purtroppo il numero di trapianti possibili è limitato dall'alta frequenza degli HCCs e dalla mancanza di un sufficiente numero di donatori, il che allunga notevolmente i tempi di attesa. Durante questi ritardi, la progressione del tumore spesso fa sì che si

esca dai parametri richiesti per il trattamento rendendo il paziente non più idoneo per il trapianto. Quando lo stadio del tumore è troppo avanzato perché gli interventi curativi siano efficaci si ricorre a trattamenti palliativi, tra cui la chemoembolizzazione delle masse neoplastiche (El-Serag, 2011). L'ostruzione dell'arteria che nutre la zona del fegato sede della massa tumorale, ottenuta con l'iniezione di agenti come la gelatina, arresta il flusso ematico nei capillari del tumore, portandolo a necrosi. L'associazione a questi agenti di chemioterapici, quali la doxorubicina, aumenta l'azione antitumorale. La chemioterapia sistemica è risultata poco efficace e causa pesanti effetti tossici collaterali.

L'unico farmaco approvato dalla FDA per una terapia sistemica degli HCCs è il sorafenib tosilato (Llovet et al., 2008). Questo composto inibisce la proliferazione delle cellule neoplastiche e l'angiogenesi tumorale in un ampio spettro di modelli di tumori. Agisce inibendo le chinasi Raf1 e B-Raf, le chinasi dei recettori 1,2,3 del fattore di accrescimento endoteliale (VEGF) e la chinasi del recettore del fattore di crescita di origine piastrinica (PDGF). In studi clinici di fase III il sorafenib ha prodotto in pazienti con HCCs in stadio avanzato un assai modesto aumento del tempo di sopravvivenza (3 mesi) rispetto ai pazienti trattati con placebo. La scarsa efficacia della chemioterapia sistemica degli HCCs con i farmaci attualmente a disposizione sprona un'attiva ricerca di nuovi agenti più efficaci.

## 2 Sintesi del progetto di ricerca

Lo scopo del lavoro svolto in questi anni di dottorato è stato quello di studiare gli effetti causati dalla inibizione della lattato deidrogenasi su cellule di epatocarcinoma.

In una fase preliminare dei nostri studi abbiamo cercato di valutare se l'inibizione della LDH, riducendo la glicolisi aerobia e la sintesi di ATP, potesse inibire la replicazione di linee cellulari provenienti da epatocarcinomi umani, forme tumorali generalmente molto resistenti agli attuali farmaci chemioterapici. Per farlo abbiamo utilizzato due linee cellulari: le Hep G2 (una linea di epatoma ben differenziato) e le PLC/PRF5 (una linea di carcinoma epatocellulare non differenziato). In queste cellule abbiamo inibito l'attività della lattato deidrogenasi usando acido ossamico (OXA) che compete con il piruvato per il sito attivo delle molecole di enzima. Nel corso di questi primi esperimenti è stato osservato che l'inibizione della LDH causata da OXA è in grado di innescare nelle cellule trattate segnali che portano alla morte cellulare.

Sulla base dei precedenti risultati, abbiamo deciso di valutare se, riducendo i livelli di ATP cellulare, OXA potesse inoltre aumentare l'efficacia farmacologica di agenti antitumorali somministrati in associazione. Il mio lavoro si è concentrato principalmente sullo studio dell'associazione di OXA con inibitori delle proteina chinasi. Molti di questi inibitori sono piccole molecole che competono con l'ATP per il legame nel sito della proteina chinasi bersaglio (Sebolt-Leopold et al., 2006). È stata considerata la possibilità che la diminuzione dei livelli di ATP potesse ridurre la competizione per lo stesso sito enzimatico, aumentando così l'efficacia degli inibitori delle chinasi.

Questi esperimenti hanno confermato la nostra ipotesi mostrando che l'associazione tra OXA ed il sorafenib, l'unico farmaco approvato dalla FDA per il trattamento del carcinoma epatocellulare, determina un forte potenziamento dell'azione farmacologica di questo composto.

Questi risultati hanno inoltre confermato che la LDH può essere un buon bersaglio per sviluppare inibitori da testare in nuove strategie terapeutiche antitumorali. OXA, l'unico inibitore noto per questo enzima, è una molecola dotata di bassa tossicità: negli animali da laboratorio si è dimostrato privo di effetti nocivi fino alla dose di 3 g/kg (Papacostantinou et al., 1961). Tuttavia, nelle cellule coltivate in vitro inibisce la LDH solo a concentrazioni elevate (da 40 a 80 mM circa), che non possono essere raggiunte in vivo. Abbiamo quindi avviato una collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Bologna allo scopo di identificare nuovi inibitori della LDH, potenzialmente utilizzabili anche in vivo. Per cercare queste molecole si è fatto ricorso alla tecnologia del "virtual screening". (vedi paragrafo 3.11)

Questa procedura ha portato all'identificazione di una ventina di molecole, che ci sono state tutte fornite dal National Cancer Institute (NCI). Ottenute le molecole, come primo passo abbiamo verificato usando la LDH-A purificata la loro capacità di inibire l'enzima; solo 5 sono risultate effettivamente attive a concentrazioni micromolari. Queste 5 molecole sono state ulteriormente studiate su colture di cellule PLC/PRF/5. Per ottenere una caratterizzazione preliminare, abbiamo studiato il loro effetto sulla riduzione della produzione di lattato, di ATP, sulla crescita cellulare e sulla respirazione. Abbiamo usato quest'ultimo parametro (la respirazione cellulare) per avere un'indicazione sulla specificità di azione di questi composti. Un inibitore specifico della LDH non deve interferire con le funzioni mitocondriali e il consumo di ossigeno; questa interferenza starebbe a indicare non solo una mancata specificità, ma sarebbe anche un segno di potenziale tossicità per i tessuti normali, che producono ATP attraverso la respirazione.

Siamo infine giunti all'identificazione di una molecola (galloflavina) che inibisce la glicolisi e la produzione di ATP senza interferire con la respirazione cellulare ed è attiva a concentrazioni micromolari. L'ultima parte della tesi è dedicata alla



caratterizzazione degli effetti di questo inibitore sulle colture di carcinoma epatocellulare.

## **3 Materiali e metodi**

### ***3.1 Composti***

Le isoforme A e B della LDH umana purificata sono state ottenute da Lee Biosolutions (St Louis, Missouri, USA)

Il sodio ossamato (OXA) è stato acquistato da Sigma-Aldrich. Per gli esperimenti, è stato sciolto in Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) senza piruvato di sodio.

Il sorafenib p-toluensolfonato, il sunitinib malato e l'imatinib metan-solfonato sono stati acquistati da LC Laboratories (USA). Per gli esperimenti, il sorafenib e il sunitinib sono stati sciolti in 100% dimetilsulfossido (DMSO) (Sigma-Aldrich) e diluiti con DMEM fino alle concentrazioni desiderate. Per tutti i dosaggi testati, la concentrazione finale di DMSO è stata mantenuta allo 0.05%; la stessa quantità di DMSO è stata anche aggiunta alle colture delle cellule non trattate (controlli). L'imatinib è stato sciolto in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) e diluito alla concentrazione desiderata con DMEM.

I potenziali nuovi inibitori della LDH identificati mediante la procedura di virtual screening (vedi paragrafo 3.11) sono stati forniti dal National Cancer Institute; la galloflavina (l'unico inibitore caratterizzato) è stata sintetizzata e fornita per gli studi successivi dal Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Bologna.

### ***3.2 Colture cellulari***

Le cellule PLC/PRF/5, HepG2 e SNU-449 sono state coltivate in DMEM con 25 mM di glucosio, integrato con siero fetale bovino al 10%, aminoacidi non essenziali, 100 UI/mL di penicillina, streptomina 100 mg/mL, glutamina 2mM e privo di

piruvato di sodio. Tutti i prodotti sono stati ottenuti da Bio-Wyttacker. Le cellule sono state incubate in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>, 95% di aria a 37°C. In una serie di esperimenti le cellule (PLC/PRF/5, HepG2) sono state coltivate in un terreno privo di glucosio, per impedire la glicolisi e forzare il metabolismo cellulare verso l'ossidazione della glutammina (Reitzer et al., 1979; Rossignol et al., 2004). In questi esperimenti il terreno DMEM è stato modificato sostituendo il glucosio 25 mM con galattosio 10 mM ed è stato integrato con siero fetale bovino dializzato.

### ***3.3 Inibizione della LDH mediante acido ossamico (OXA)***

OXA è un noto inibitore della LDH, che compete con il piruvato per il suo sito di legame sulla molecola enzimatica. Come primo passo, abbiamo valutato la costante d'inibizione (K<sub>i</sub>) di OXA per l'enzima LDH delle cellule PLC/PRF/5. Cellule provenienti da due fiasche semi-confluenti da 75 cm<sup>2</sup> sono state raccolte, centrifugate e risospese in 3 vol. di PBS. La sospensione cellulare è stata poi lisata mediante ultrasuoni e centrifugata (1600g, 30 minuti a 4°C) per eliminare i detriti cellulari. Il surnatante è stato utilizzato per misurare l'attività della LDH, come segue. È stato diluito 1:1000 in tampone fosfato 100 mM, pH 7.5 contenente nicotinamide adenina dinucleotide (NADH) 0.12 mM (forma ridotta) e piruvato. L'attività enzimatica è stata misurata registrando per 5 minuti la diminuzione di assorbanza a  $\lambda_{340\text{nm}}$  prodotta dall'ossidazione del NADH in presenza di concentrazioni scalari di piruvato (0.1 - 1 mM). L'effetto di OXA è stato valutato in un saggio competitivo aggiungendo alla miscela di reazione una quantità di composto variabile da 0 a 0.5 mM, in presenza delle concentrazioni scalari di piruvato. La K<sub>i</sub> è stata calcolata utilizzando il software Prism 5 (GraphPad). Un test simile è stato effettuato anche sull'enzima purificato di origine bovina (tipo M), ottenuto da Sigma-Aldrich.

### ***3.4 Inibizione della produzione di lattato***

Sono state seminate  $5 \times 10^5$  cellule per ogni pozzetto di una piastra Nunclon a 6 pozzetti e lasciate aderire per 16 h. Le colture sono state poi trattate con gli inibitori (testati in triplicato). La quantità di lattato è stata misurata all'inizio dell'esperimento in 3 pozzetti non trattati (valore di base) e successivamente dopo 3 ore di incubazione a 37°C. In ogni pozzetto è stato misurato contemporaneamente il lattato intracellulare e il lattato rilasciato nel terreno, usando il seguente procedimento: alla fine dell'incubazione sono stati aggiunti 100 µL di acido tricloroacetico 100% (TCA); il lisato cellulare è stato raccolto e i pozzetti sono stati lavati con 1 mL di TCA 10%. Dopo centrifugazione, il lattato nel supernatante è stato misurato col metodo di Barker e Summerson (1941). È stata preparata una curva standard con soluzioni contenenti 12, 24 e 48 µg di acido lattico disciolte in acqua per ottenere un volume finale di 2.5 mL, partendo da una soluzione madre di acido lattico 0.3 mg/mL. Per la preparazione dei campioni, 200 µL del supernatante raccolto precedentemente dai pozzetti trattati sono stati aggiunti ad acqua per raggiungere un volume finale di 2.5 mL. In tutti i campioni (compreso la Curva Standard) sono stati aggiunti 500 µL di solfato di rame al 20% ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) e in seguito, 0.5 g di idrossido di calcio. Le provette sono state incubate 30 minuti a temperatura ambiente agitandole di tanto in tanto. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 5 minuti per precipitare i detriti cellulari e 1 mL di supernatante è stato trasferito in tubi mantenuti in ghiaccio nei quali erano stati dispensati precedentemente 5 mL di acido solforico. I campioni sono stati bolliti a 100°C per 5 minuti, nuovamente riposti in ghiaccio e in ogni tubo è stata aggiunta una goccia di solfato di rame 4% e una di reattivo (4-fenilfenolo disciolto in una soluzione di NaOH 5% fino a una concentrazione finale di 15 mg/mL). I campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti in agitazione e poi sono stati mantenuti per 90 secondi a 100°C. La lettura è stata fatta allo spettrofotometro a  $\lambda = 660 \text{ nm}$ .

### ***3.5 Misura dei livelli di ATP***

I livelli di ATP sono stati misurati utilizzando il test Promega CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay. Per questi esperimenti,  $2 \times 10^4$  cellule in 200  $\mu$ L di terreno di coltura sono state seminate in ogni pozzetto di una piastra a 96 pozzetti e lasciate aderire per 16 ore. Sono stati aggiunti i trattamenti e dopo 3, 6 o 24 ore di incubazione a 37°C sono stati misurati i livelli di ATP. Ogni dose d'inibitore è stata testata in triplicato. Dopo l'incubazione, la piastra è stata lasciata a temperatura ambiente per 30 min e, come indicato dalla ditta fornitrice, a ciascun pozzetto è stato aggiunto direttamente il reattivo CellTiter-Glo. La piastra è stata tenuta in un agitatore per 10 minuti per indurre la lisi cellulare e ne è stata quindi misurata la luminescenza utilizzando un lettore Fluoroskan Ascent FL (Labsystems).

### ***3.6 Saggio di vitalità cellulare.***

La crescita cellulare è stata valutata mediante il test del rosso neutro, che dà una misura del numero di cellule vitali che attivamente assumono per endocitosi questo composto (Fotakis e Timbrell, 2006). Questo saggio è stato preferito a quello più comunemente usato, basato sulla riduzione del MTT, poiché quest'ultimo reagente viene ridotto anche dal NADH citosolico, la cui concentrazione può essere alterata dagli inibitori della LDH. (Berridge et al., 2005).

Le cellule ( $10^5$  per pozzetto) sono state seminate in piastre da 24 pozzetti e lasciate aderire per 16 ore. A partire dal giorno successivo sono state trattate per 24 ore a 37°C con il composto in esame (OXA, inibitori di chinasi o loro associazione). Ogni dose di composto è stata testata in quadruplicato e ogni esperimento è stato replicato per tre volte. Dopo i trattamenti, le cellule sono state incubate 3 ore a 37°C con il colorante rosso neutro sciolto in DMEM alla concentrazione finale di 30 mg/mL. Trascorso questo tempo, il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state solubilizzate con 1 mL di acido acetico 1% in etanolo 50%. Da ogni pozzetto sono stati poi

prelevati 200  $\mu\text{L}$  della soluzione e trasferiti in una piastra a 96 pozzetti per leggere l'assorbanza a  $\lambda_{540}$ . La lettura è stata eseguita usando il lettore di micropiastre Multiskan Ascent FL, Labsystems.

### ***3.7 Osservazione morfologica delle cellule trattate***

Le cellule sono state fatte aderire su vetrini copri-oggetto al 70-80% della confluenza. Sono state quindi trattate per 6 ore a 37°C con sorafenib 16  $\mu\text{M}$  e OXA 80 mM aggiunti al terreno singolarmente o in associazione. Dopo il trattamento sono state fissate con paraformaldeide al 2% in PBS per 5 min a 4°C, lavate 2 volte in PBS e in acqua distillata e incubate con la soluzione Giemsa (Sigma-Aldrich) per 3 min a temperatura ambiente. I vetrini sono stati quindi lavati con acqua distillata per eliminare l'eccesso di colorante, disidratati con alcol etilico, chiarificati con xilene e montati usando il balsamo di Canada.

### ***3.8 Analisi dell'espressione di PUMA***

Colture cellulari di PLC/PRF/5 ed HepG2 ( $1.5 \times 10^6$  cellule, seminate in fiasche da 25  $\text{cm}^2$ ) sono state trattate con OXA 80mM per 3 giorni. Alla fine del trattamento le cellule trattate e le cellule di controllo sono state lisate con 100  $\mu\text{L}$  di tampone potassio fosfato (100 mmol/L), pH7.5, contenente 1% di NP40 e inibitori delle proteasi (Sigma). L'omogenato cellulare è stato lasciato per 30 minuti in ghiaccio, quindi centrifugato per 15 minuti a 10000g. In seguito 20  $\mu\text{g}$  di proteine (misurate con il metodo di Lowry) sono state caricate su un gel da elettroforesi al 12% di poliacrilammide. Al termine della corsa le proteine sono state trasferite su una membrana di PVDF a bassa fluorescenza (GE Lifescience), applicando un campo elettrico di 300 mA per 2 ore. La membrana, bloccata con BSA al 5% in TBS Tween, è stata incubata con un anticorpo policlonale di coniglio anti-PUMA (Abcam) Il

legame è stato rilevato usando un anticorpo secondario marcato con il fluoroforo Cy5 (GE Lifescience). Tutte le fasi dell'incubazione sono state eseguite seguendo le indicazioni della ditta fornitrice. La fluorescenza della membrana è stata rilevata con uno scanner Pharos FX (BioRad) alla risoluzione di 100  $\mu\text{m}$ , utilizzando il software Quantity One (BioRad).

### ***3.9 Analisi della fosforilazione di ERK 1/2***

Colture cellulari di PLC/PRF/5 ( $1.5 \times 10^6$  cellule, seminate in fiasche da 25  $\text{cm}^2$ ) sono state trattate con OXA 80mM, sorafenib 16 $\mu\text{M}$  o con la loro associazione. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C, le cellule trattate e le cellule di controllo sono state lisate con 150  $\mu\text{L}$  di tampone M-PER (Pierce) contenente inibitori delle proteasi (Roche) e una miscela di inibitori delle fosfatasi (Pierce). L'omogenato cellulare è stato lasciato per 30 minuti in ghiaccio, quindi centrifugato per 15 minuti a 10000 g. 20  $\mu\text{g}$  di proteine (misurate con il metodo di Lowry) sono state caricate su un gel da elettroforesi al 8% di poliaccrilammide. Al termine della corsa le proteine sono state trasferite su una membrana di PVDF a bassa fluorescenza (GE Lifescience), applicando un campo elettrico di 300 mA per 2 ore. La membrana, bloccata con BSA al 5% in TBS Tween, è stata incubata con un anticorpo monoclonale di coniglio anti-ERK1/2 (Cell Signaling Technology) o con un anticorpo monoclonale di coniglio anti fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology). Il legame è stato rilevato usando un anticorpo secondario marcato con il fluoroforo Cy5 (GE Lifescience). Tutte le fasi dell'incubazione sono state eseguite seguendo le indicazioni della ditta fornitrice. La fluorescenza della membrana è stata rilevata con uno scanner Pharos FX (BioRad) alla risoluzione di 100  $\mu\text{m}$ , utilizzando il software Quantity One (BioRad).

### ***3.10 Saggio sulla respirazione cellulare***

Il saggio è stato effettuato usando una sonda fosforescente sensibile all'ossigeno (MitoXpress) fornita da Luxcel Biosciences. Le cellule PLC/PRF/5 sono state seminate ( $5 \times 10^4$  cellule per pozzetto) in una piastra da 96 pozzetti con fondo nero e lasciate aderire overnight. Dopo l'aggiunta della sonda fosforescente (10 pmol/pozzetto), le piastre sono state poste nel lettore di fluorescenza Victor™ (Perkin Elmer) a 30°C e sono state monitorate per circa 20 minuti per far equilibrare la temperatura e la concentrazione dei gas disciolti nel terreno e per ottenere il segnale di base. Gli inibitori da testare sono stati aggiunti rapidamente, i pozzetti sono stati sigillati con olio minerale e il segnale è stato monitorato per altri 60 minuti. Durante questo intervallo, l'aumento di fluorescenza, che indica il consumo di ossigeno, è stato misurato ogni 60 secondi usando filtri di eccitazione/emissione a 340/642 nm. Tutti le fasi della procedura sono state effettuate a 30°C con soluzioni pre-riscaldate. In questo esperimento sono state testate le stesse dosi dei composti usate nel saggio di inibizione della produzione di lattato; ogni dose è stata testata in quadruplicato. Per valutare la respirazione cellulare, il profilo del segnale di fluorescenza ottenuto nel tempo da ogni pozzetto è stato elaborato applicando la regressione lineare, allo scopo di determinarne la pendenza, che è indicativa della entità del consumo di ossigeno.

### ***3.11 Valutazione dei potenziali inibitori della LDH identificati mediante la procedura di virtual screening***

Per identificare un nuovo potenziale inibitore dell'enzima LDH, il gruppo del Professor Recanatini del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche ha messo a punto una procedura di screening virtuale basata sulla struttura cristallografica della forma A della LDH. Questa forma è stata scelta perché è quella generalmente più espressa dalle cellule tumorali. La struttura cristallografica della LDH-A umana è stata



ottenuta dalla Protein Data Bank. Usando come riferimento questa struttura, sono state esplorate, con un apposito software, le molecole disponibili nell'Open Chemical Repository del National Cancer Institute, per identificare composti potenzialmente capaci di legarsi al sito attivo della LDH. I 20 composti identificati con questa tecnica sono stati in seguito testati per la loro capacità di inibire la LDH-A umana purificata.

Per ogni composto è stata preparata la soluzione madre 500 mM in DMSO. Queste soluzioni sono state aggiunte in quantità scalari (concentrazione finale 0 - 500  $\mu$ M) a una miscela di reazione contenente tampone fosfato 100 mM a pH=7.5, LDH 0.015 U/mL, piruvato 1 mM e NADH 150  $\mu$ M. Per tutti i campioni (inclusi i controlli senza inibitore) la percentuale di DMSO finale nel pozzetto è stata mantenuta allo 0.6%. L'attività enzimatica è stata misurata monitorando l'ossidazione del NADH per un periodo di 3 minuti. Siccome la maggior parte dei composti interferiva con la lettura dell'ossidazione del NADH agli UV, per la valutazione dell'attività della LDH è stata utilizzata un'altra procedura (Moran et al., 1996) che registra la diminuzione della fluorescenza del NADH dovuta all'ossidazione di questa molecola. Alla lunghezza d'onda usata per la determinazione del NADH ( $\lambda_{\text{ecc}} = 340$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm) i composti testati non hanno mostrato una fluorescenza rilevante. Il saggio è stato eseguito su una piastra a fondo bianco da 96 pozzetti, usando un lettore Fluoroskan Ascent FL (Labsystems). Partendo dai dati sperimentali ottenuti e usando il software Prism 5 GraphPad è stata calcolata la concentrazione minima dei composti che causa un'inibizione del 100% dell'attività della LDH ( $\text{IC}_{100}$ ). Dei 20 composti di partenza, solo 5 hanno effettivamente inibito la LDH e sono stati successivamente testati su colture cellulari di PLC/PRF/5 per valutare, secondo le procedure precedentemente descritte, il loro effetto sulla produzione di acido lattico, la sintesi di ATP, il consumo di ossigeno e la vitalità cellulare. A seguito dei risultati ottenuti sulle cellule, è stato selezionato un solo composto, la galloflavina, che è risultato l'unico in grado di inibire la sintesi di ATP senza interferire con il consumo di ossigeno. Sulla galloflavina è stato ripetuto uno studio più dettagliato utilizzando entrambe le

isoforme (A e B) della LDH umana purificata, allo scopo di accertarne il meccanismo di inibizione. La galloflavina è stata testata in presenza di concentrazioni scalari di piruvato (0 - 2 mM) o NADH (20 - 150  $\mu$ M). Nel primo caso, il NADH nella miscela di reazione è stato mantenuto a una concentrazione costante di 150  $\mu$ M, mentre nel secondo caso era mantenuto costante il Piruvato, alla concentrazione di 2 mM. I due gruppi di dati sperimentali ottenuti sono stati analizzati usando il software Prism 5 GraphPad, applicando un modello di calcolo definito “Modello Misto”. Il “Modello Misto” è definito da un sistema di equazioni che include i parametri dei tre tipi di inibizione enzimatica (competitiva, non-competitiva e in-competitiva).

### ***3.12 Meccanismo di morte cellulare***

Le informazioni sul meccanismo di morte cellulare causata dalla Galloflavina sono state ottenute grazie al saggio ApoTox-Glo™ Triplex (Promega), che misura la vitalità, la citotossicità e l'attivazione delle caspasi 3/7 nello stesso campione. Il test è stato eseguito su cellule PLC/PRF/5 seminate in una piastra da 96 pozzetti con fondo bianco ( $2 \times 10^4$  cellule/pozzetto) dopo 24 ore di esposizione a differenti concentrazioni di galloflavina, seguendo le istruzioni del fornitore.

### ***3.13 Analisi Statistica***

La significatività dei dati è stata calcolata utilizzando i software GraphPad InStat versione 3.10 e GraphPad Prism versione 5. Quando il software ha segnalato una distribuzione gaussiana dei dati sperimentali, questi sono stati analizzati usando l'ANOVA seguita dal post-test di Bonferroni. Altrimenti, l'analisi è stata effettuata utilizzando i tests di Kruskal-Wallis e Dunn .

## 4 Risultati

### 4.1 Studio dell'inibizione della glicolisi aerobia prodotta dall'inibizione della LDH in linee cellulari di epatocarcinoma umano

#### 4.1.1 Inibizione della LDH e della glicolisi aerobia da parte dell'OXA

L'inibizione della LDH causata da OXA misurata negli estratti di cellule PLC/PRF/5 è riportata in Figura 4. Il valore di  $K_i$  riferito al piruvato è risultato  $81.4 \mu\text{M}$ , simile a quello determinato con la LDH purificata da muscolo di bovino ( $K_i=99 \mu\text{M}$ ).

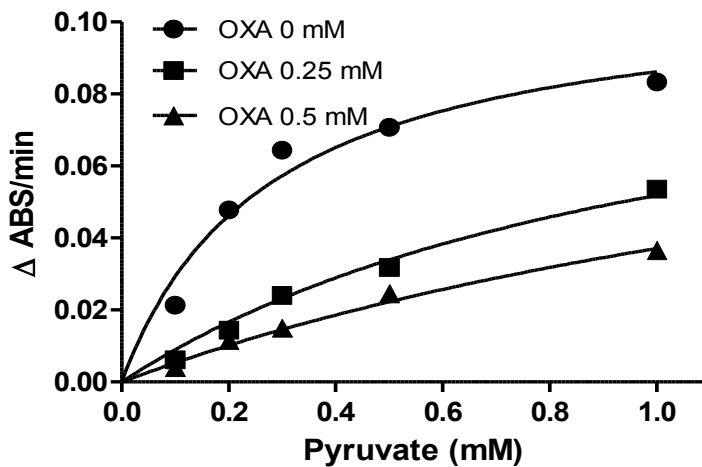


Figura 4. Effetto dell'acido ossamico (OXA) sulla lattico deidrogenasi (LDH) di cellule PLC/PRF/5. Il saggio enzimatico è stato eseguito come descritto nella sezione "Materiali e Metodi".

Abbiamo in seguito valutato gli effetti di OXA sulla glicolisi aerobia di entrambe le linee cellulari misurando la formazione di acido lattico (Fig. 5).

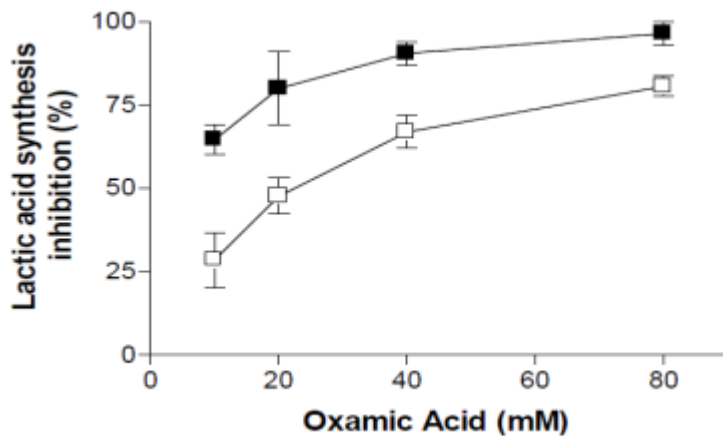


Figura 5 Acido lattico prodotto da HepG2 (■) e PLC/PRF5 (□) durante 3h di incubazione in presenza di concentrazioni scalari di acido ossamico (OXA). Ogni voce è il valore medio  $\pm$  errore standard di risultati di due esperimenti, eseguiti come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”.

Come si può notare in entrambe le linee cellulari OXA ha portato ad un’inibizione dose-dipendente della sintesi di acido lattico (maggiore nel caso delle HepG2) indicando così un’inibizione della glicolisi aerobia.

#### 4.1.2 Effetto di OXA sulla vitalità cellulare

Per approfondire le conseguenze di un blocco della LDH abbiamo valutato gli effetti di OXA a concentrazioni inibenti la glicolisi aerobia, sulla crescita di cellulare dopo 72 ore di trattamento. I dati ottenuti sono riportati nella Figura 6:

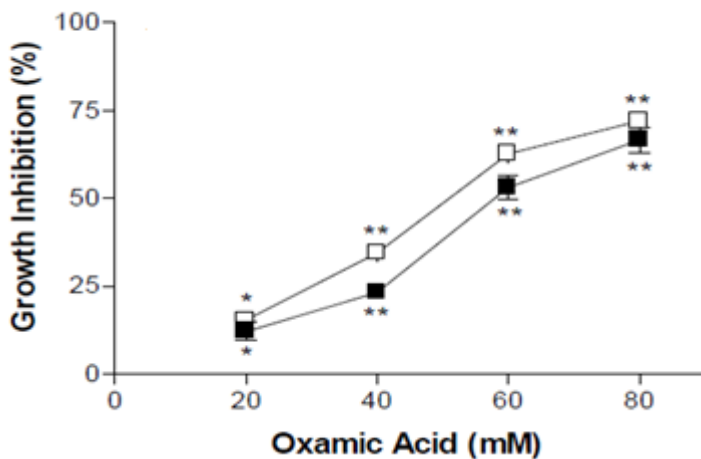


Figura 6. Inibizione della proliferazione di cellule HepG2 (■) e PLC/PRF5 (□) in presenza di concentrazioni scalari di acido ossamico (OXA). Ogni voce è il valore medio  $\pm$  errore standard di risultati di tre esperimenti, eseguiti come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”.

OXA ha prodotto un effetto simile su entrambe le linee cellulari. La dose che inibisce del 50% la crescita cellulare ( $GI_{50}$ ) è stata calcolata dalla regressione polinomiale di secondo ordine dei dati sperimentali ottenuti ed è risultata 62.3 mmol/L per le HepG2 (■) e 50.3 mmol/L per le PLC/PRF5 (□). Da questi dati ottenuti sulle colture in vitro è evidente la forte discrepanza tra le dosi di OXA attive (nell'ordine delle  $\mu$ moli) sull'enzima purificato, e quelle attive (nell'ordine delle mmoli) sulle cellule. Questa differenza è spiegabile dal fatto che l'acido ossamico essendo carico negativamente, non possiede una buona capacità di penetrare la membrana cellulare. In esperimenti successivi abbiamo cercato di valutare se l'azione dell'acido ossamico sulla proliferazione cellulare fosse dovuta ad un'inibizione specifica della glicolisi aerobia, studiandone l'effetto sulla crescita cellulare e sulla produzione di ATP in cellule coltivate in assenza di glucosio (Fig. 7). In queste condizioni le cellule per sopravvivere e crescere ricavano la maggior parte delle loro energie non più dalla glicolisi aerobia ma dall'ossidazione della glutammina tramite il ciclo di Krebs (Reitzer et al., 1979).

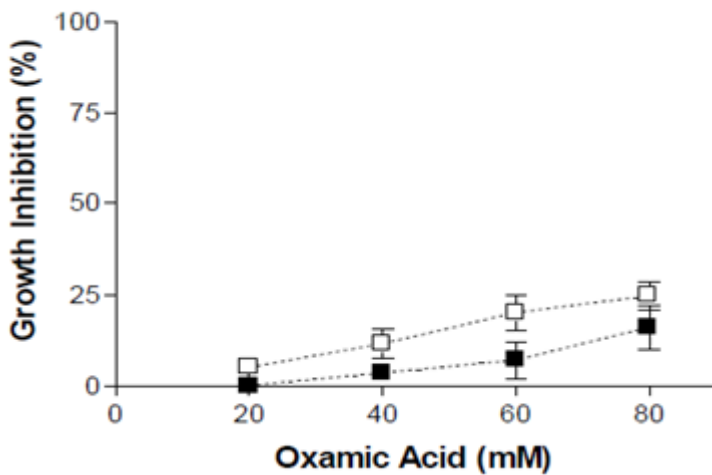


Figura. 7 Effetti dell'OXA sulla vitalità di cellule HepG2 (■) e PLC/PRF5 (□) in coltura in un mezzo privo di Glucosio.

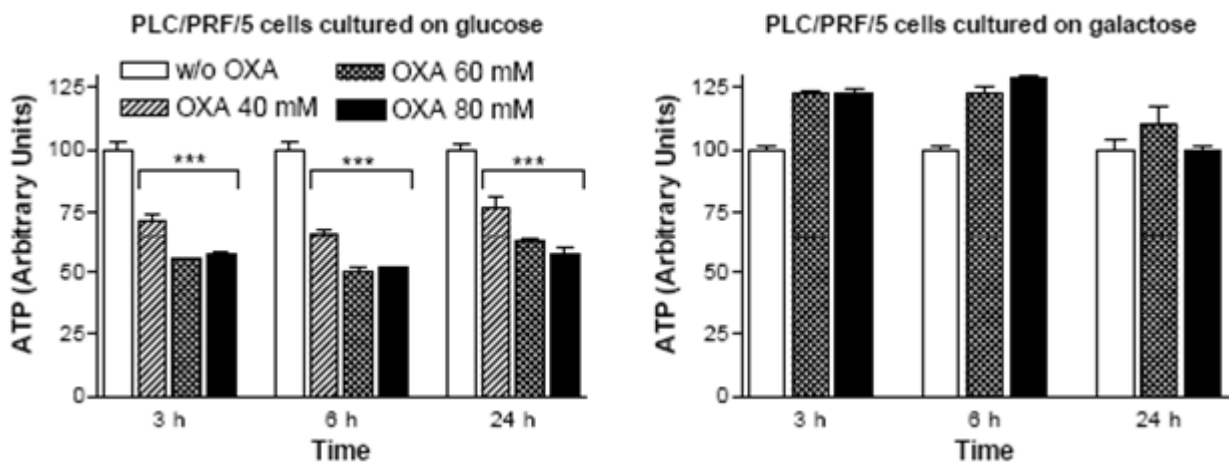


Figura 8. Riduzione dei livelli di ATP causate da OXA nelle cellule PLC/PRF/5 coltivate in DMEM standard (a sinistra) o in mezzo privo di glucosio (a destra) (vedi Materiali e Metodi). \*\*\* Riduzione statisticamente significativa rispetto ai controlli, con  $p < 0.001$ .

Questi esperimenti hanno mostrato che OXA, in assenza di glucosio nel terreno di coltura, inibisce la crescita cellulare solo dello 0-16% per le (HepG2) (■) e del 5-24% per le (PLC/PRF/5) (□), indicando così una minima interferenza con le vie metaboliche del ciclo di Krebs. Inoltre le cellule glicolizzanti, coltivate in presenza di glucosio e di OXA mostrano una significativa diminuzione dei livelli di ATP

prodotta dal blocco della glicolisi aerobia, non presente invece nelle cellule coltivate in assenza di glucosio (Fig. 8). Questi dati confermano l'inibizione specifica della glicolisi aerobia da parte di questo inibitore della lattico deidrogenasi.

#### 4.1.3 Analisi dell'espressione di PUMA

Infine abbiamo indagato se l'effetto di OXA sulla proliferazione cellulare fosse dovuto ad un'azione citotossica o ad un effetto anti proliferativo e per farlo abbiamo studiato l'espressione di PUMA. Questa è una piccola proteina citoplasmatica, con una massa di circa 20kDa, ritenuta un segnale generico di morte cellulare (Yu et al., 2008). Normalmente è poco espressa ma può essere velocemente indotta in risposta ad una serie di stimoli che inducono sia apoptosi che necrosi (Toth et al., 2006). I risultati ottenuti con tecniche di Western Blotting sono riportati in Figura 9.

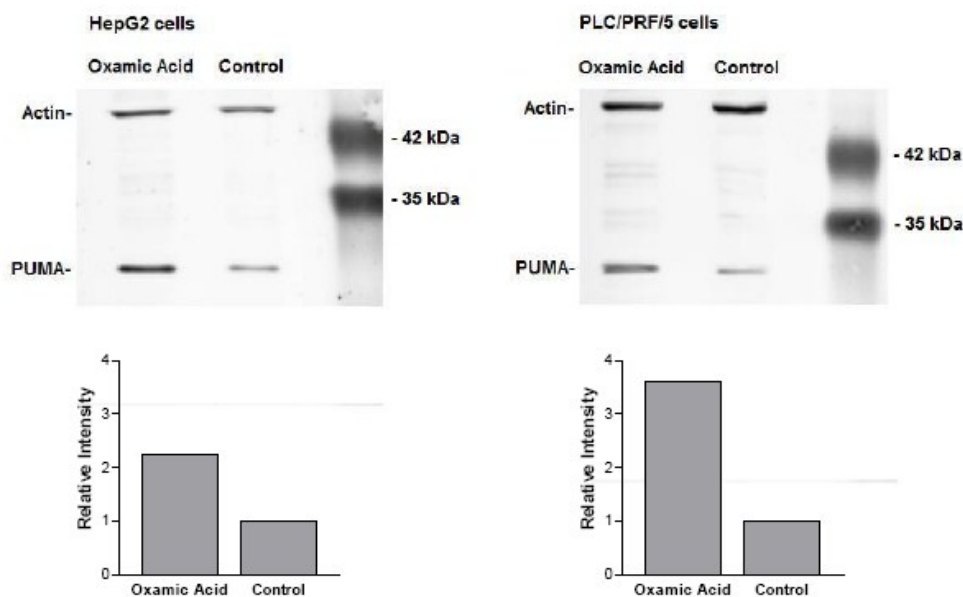


Figura .9 Effetti dell'ossamato sull'espressione di PUMA ottenuti con Western Blot

Come si nota dalle figure il trattamento con OXA ha portato ad un incremento dell'espressione di PUMA di 2.2 volte per le HepG2 e di 3.6 volte per le PLC/PRF5

indicando così come l'inibizione della crescita in cellule trattate con acido ossamico dipenda almeno in parte dalla morte delle cellule e non da un effetto citostatico.

## ***4.2 Studio dell'associazione di OXA con gli inibitori delle proteine chinasi***

### *4.2.1 Effetto degli inibitori di chinasi e della loro associazione con OXA sulla vitalità delle cellule PLC/PRF/5.*

La Figura 10 mostra l'effetto di sorafenib, di sunitinib e di imatinib sulla vitalità delle cellule PLC/PRF/5, misurata con il test del rosso neutro dopo 24 ore di esposizione ai composti. Allo scopo di testare l'effetto di ciascuno dei tre farmaci somministrati in combinazione con OXA, per ognuno di essi sono state scelte dosi che determinano un'inibizione statisticamente significativa della proliferazione cellulare non superiore al 30%, al fine di mettere più facilmente in evidenza un eventuale effetto di potenziamento esercitato da OXA (le dosi scelte sono state evidenziate da una zona ombreggiata). Quando somministrato in associazione con gli inibitori di chinasi, OXA è stato utilizzato alle dosi di 60 e 80 mM, che producono una quasi completa inibizione della glicolisi aerobia e una riduzione del 50% dell'ATP cellulare dopo 24 ore (Fig. 5 e 8).



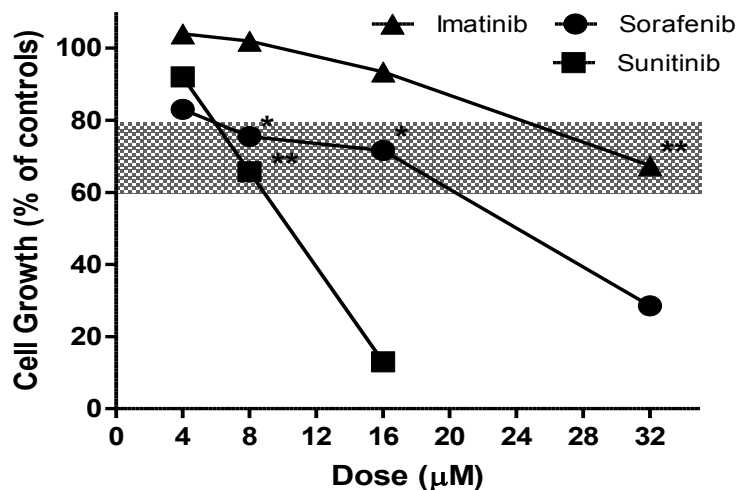


Figura 10. Effetto degli inibitori di chinasi sulla crescita delle cellule PLC/PRF/5, misurato con il test del rosso neutro dopo 24 ore di incubazione con i composti. L'area ombreggiata indica le dosi scelte per studiare l'effetto di associazione con l'acido ossamico (OXA). \* e \*\* indicano una differenza statisticamente significativa con  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , rispettivamente.

Queste dosi di OXA somministrate per 24h non hanno alcun effetto sulla vitalità delle cellule PLC/PRF/5. La Figura 11 mostra l'effetto di sorafenib (8 e 16 µM), sunitinib (8 µM) e imatinib (32 µM) e della loro associazione con OXA sulla crescita delle cellule PLC/PRF/5, valutato mediante il saggio del rosso neutro. I grafici riportano, inoltre, anche l'effetto di OXA e degli inibitori di chinasi somministrati singolarmente nello stesso esperimento in cui è stata studiata la combinazione. In tutti i saggi eseguiti OXA ha causato un'inibizione della proliferazione cellulare molto ridotta, compresa tra il 9 ed il 20%, che non è mai risultata statisticamente significativa.

Quando questi composti sono stati somministrati in associazione con OXA, si è osservato un potenziamento dell'azione antiproliferativa che, con la dose 80 mM di OXA, è sempre risultato statisticamente significativo se confrontato con l'effetto causato dal composto somministrato singolarmente. L'effetto di potenziamento più marcato è stato osservato con il sorafenib 16 µM in associazione ad OXA 80 mM;

questa combinazione ha causato la quasi completa inibizione della crescita cellulare (> 97%) nelle 24 ore.

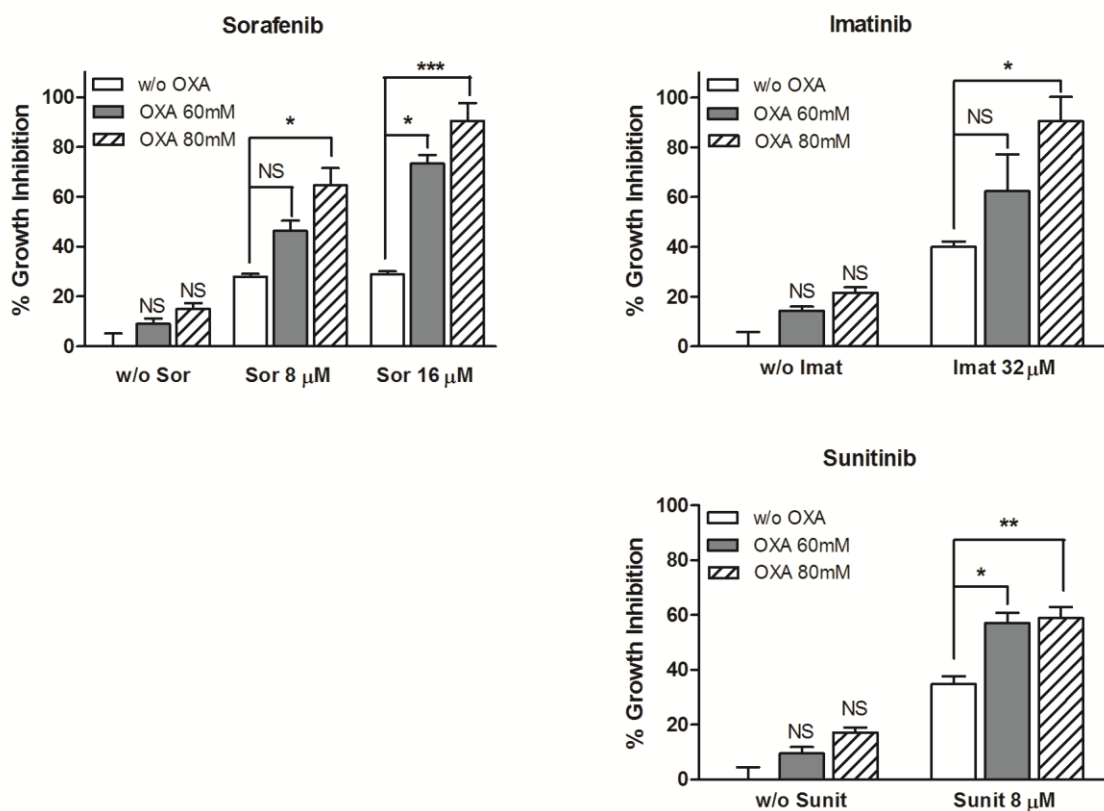


Figura 11. Effetto dell'acido ossamico (OXA) in associazione con gli inibitori delle chinasi sulla crescita di PLC/PRF/5, misurato con il test del rosso neutro dopo 24 ore di incubazione con i composti. \*, \*\* e \*\*\* indicano una differenza statisticamente significativa con  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , rispettivamente. NS, non significativo

#### 4.2.2 Effetti provocati dal sorafenib e dalla sua associazione con OXA sulla morfologia delle cellule PLC/PRF/5

L'esame morfologico delle cellule trattate ha confermato il forte effetto di potenziamento provocato dall'associazione dei farmaci. Questo esperimento è stato eseguito solo sulle cellule trattate con il sorafenib perché per questo composto l'aumento di efficacia osservato nella associazione con OXA è risultato più evidente (vedi Fig. 11). Le cellule PLC/PRF/5 sono state fissate e colorate 6 ore dopo l'esposizione al sorafenib e ad OXA, somministrati singolarmente o in combinazione.

La Figura 12B mostra che l'unico effetto causato da OXA è stato una modesta vacuolizzazione del citoplasma delle cellule trattate. La morfologia dei nuclei di queste cellule è risultata simile a quella delle cellule controllo, incubate con soluzione fisiologica (Fig. 12A). Al contrario, dopo il trattamento con sorafenib (Fig. 12C) la maggior parte dei nuclei cellulari appariva di dimensioni ridotte e con la cromatina condensata; alcuni di essi erano chiaramente picnotici. L'associazione dei due composti (Fig. 12D) ha peggiorato in maniera molto evidente le alterazioni già causate dal sorafenib: quasi tutte le cellule mostravano nuclei condensati in cui i nucleoli non erano più visibili e citoplasma gravemente vacuolizzato. Nella fotografia sono anche visibili molti nuclei picnotici.

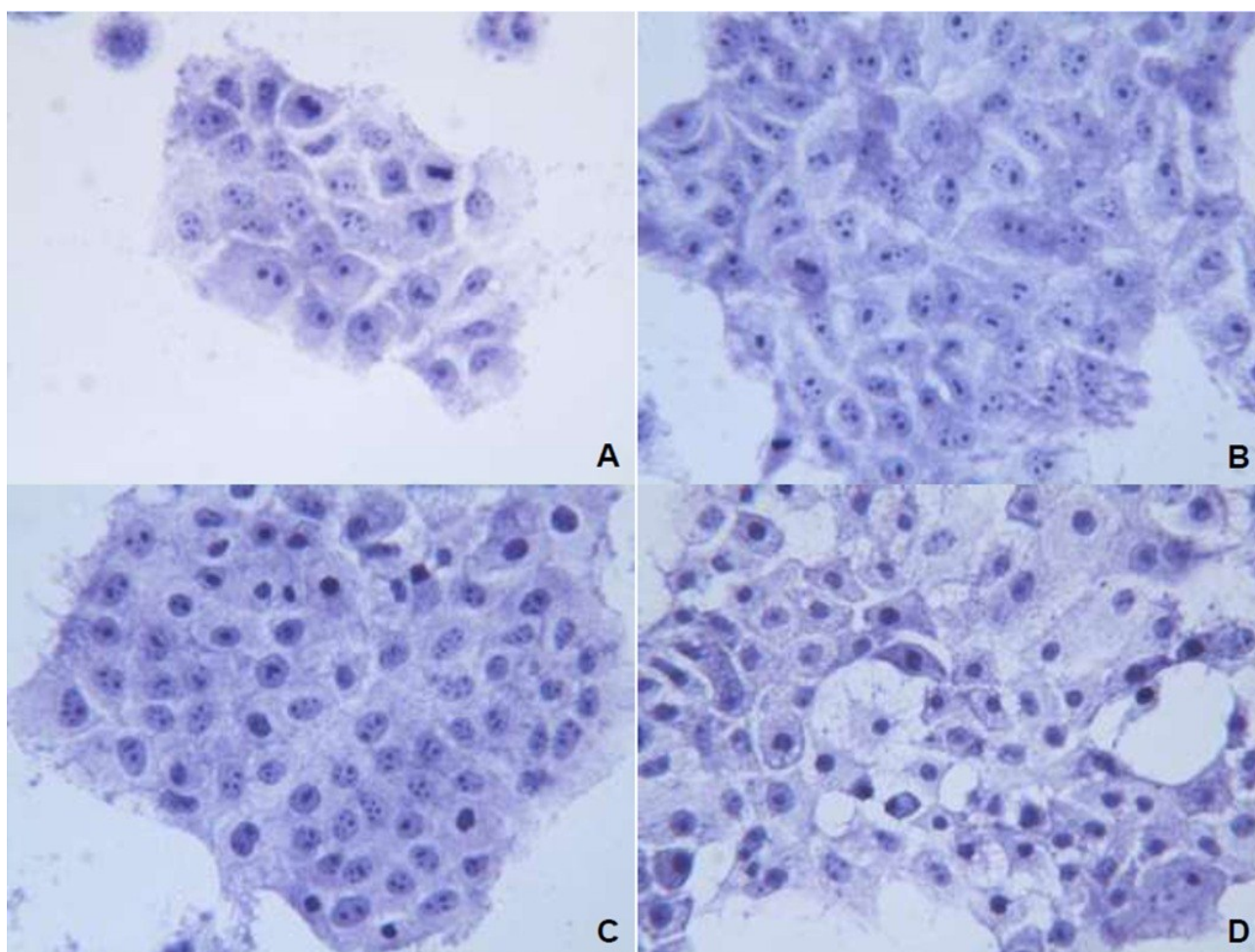


Figura 12. Cellule di controllo incubate con soluzione fisiologica (fig. 11A), cellule trattate con OXA (fig. 11B), cellule trattate con sorafenib (fig. 11C), cellule trattate con associazione l'associazione di OXA e sorafenib.

#### *4.2.3 Analisi della fosforilazione di ERK 1/2 in cellule trattate con sorafenib e con l'associazione di OXA e sorafenib.*

Questo esperimento è stato eseguito solo nelle cellule PLC/PRF/5 trattate con sorafenib. Uno dei bersagli principali del sorafenib è la chinasi RAF (primo elemento della via di trasmissione del segnale delle MAP-chinasi), che ha un ruolo essenziale nella proliferazione delle cellule dei HCC. Il blocco di RAF causa la riduzione della fosforilazione di MEK ed ERK, con conseguente inibizione della proliferazione cellulare. La Figura 13 mostra che, in accordo con dati precedentemente pubblicati (Liu et al., 2006), 1 ora di trattamento con sorafenib 16  $\mu$ M riduce la fosforilazione di ERK 1/2. Il grafico a barre (che riporta il rapporto tra i segnali di fluorescenza di fosfo-ERK ed ERK) mostra che un'ora di trattamento con OXA alla concentrazione di 80 mM, non ha alcun effetto sulla fosforilazione di ERK. Al contrario, nelle colture trattate con sorafenib 16  $\mu$ M in associazione con OXA 80 mM, la fluorescenza delle proteine fosforilate risulta fortemente ridotta ed una delle due bande in queste colture cellulari non è più rilevabile. La riduzione più marcata della fosforilazione di ERK osservata in queste cellule rispetto a quelle trattate con il solo sorafenib è stata una conferma dell'effetto potenziante di OXA sulla inibizione di segnali intracellulari che sono uno dei bersagli principali del sorafenib.

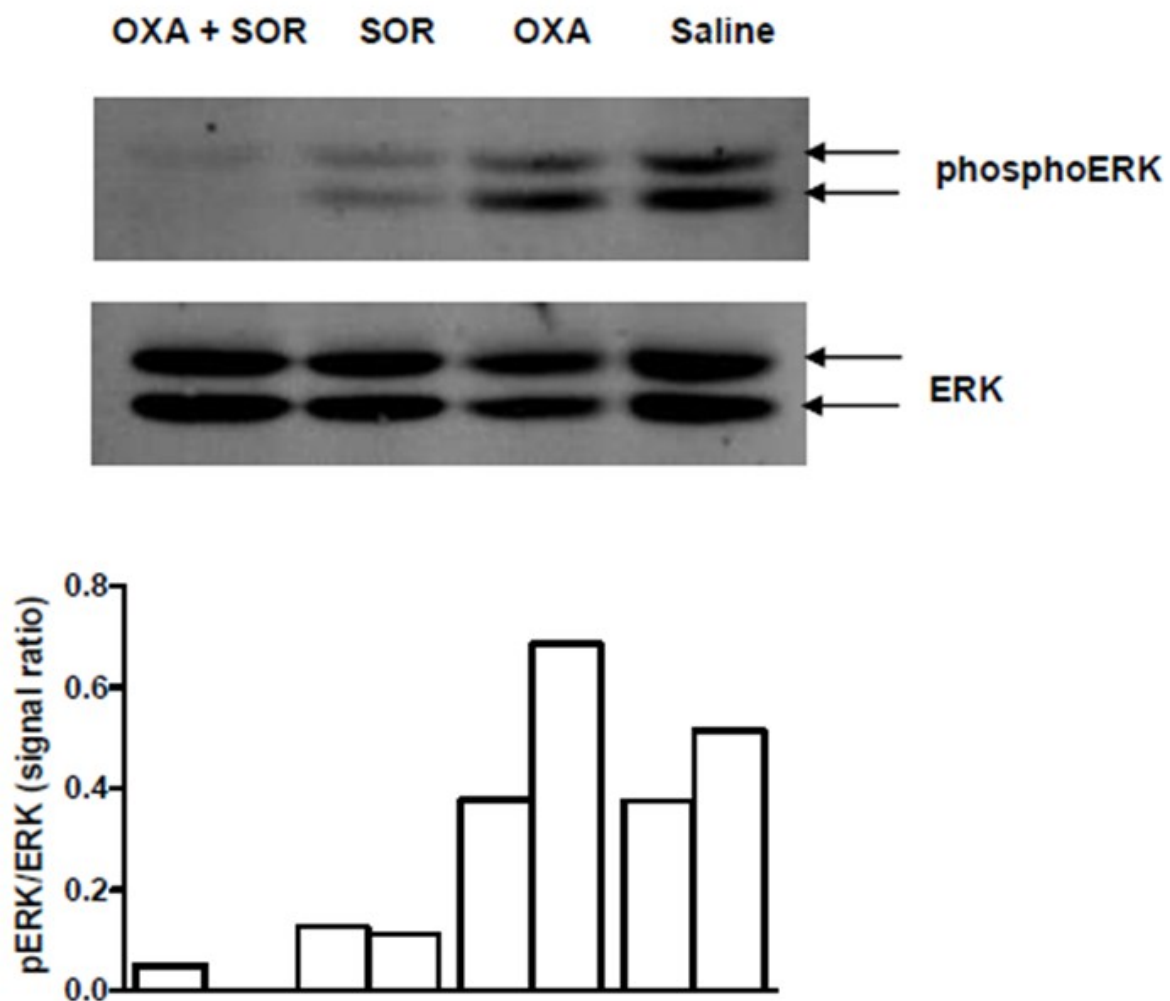


Figura 13. Analisi della fosforilazione di ERK 1/2 tramite immunoblot in colture cellulari di PLC/PRF/5 esposte a soluzione fisiologica, acido ossamico (OXA), sorafenib (SOR) e alla loro associazione (OXA+SOR). Per entrambe le bande di proteine, è stato calcolato il rapporto tra i segnali di fluorescenza di fosfo-ERK e di ERK; questo rapporto è stato riportato nel grafico a barre.

#### 4.2.4 Effetti metabolici del sorafenib

Il forte effetto di potenziamento osservato nella associazione del sorafenib con OXA è un risultato particolarmente interessante perché ad oggi il sorafenib è l'unico farmaco approvato per il trattamento dei carcinomi epatocellulari, la cui efficacia clinica è però piuttosto modesta. Abbiamo cercato di capire il motivo per cui, rispetto agli altri inibitori di chinasi studiati, il sorafenib sembra beneficiare molto di più della

associazione con OXA. Dalla letteratura siamo venuti a conoscenza che questo farmaco, alle concentrazioni in uso nella pratica clinica, inibisce la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) di una linea cellulare di mioblasti di ratto (H9c2) (Will et al., 2008). Abbiamo ipotizzato che questo effetto potesse manifestarsi anche nelle cellule di epatocarcinoma e contribuire all'azione terapeutica del sorafenib su queste cellule.

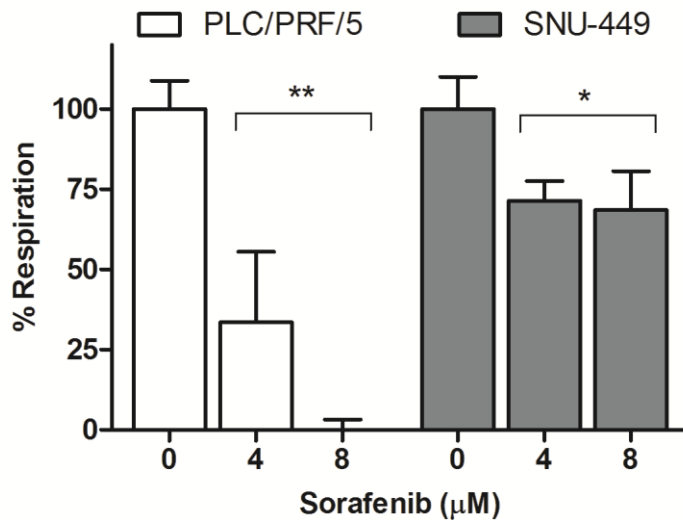


Figura14 Effetto del sorafenib sulla respirazione cellulare .Ogni dose è stata in quadruplicato. ). \* e \*\* indicano una differenza statisticamente significativa con  $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ , rispettivamente.

Abbiamo infatti osservato (Fig. 14) che alle concentrazioni raggiunte nel plasma dei pazienti (4-8  $\mu\text{M}$ ) il sorafenib riduce il consumo di ossigeno delle cellule PLC/PRF/5. Lo stesso effetto, sebbene meno marcato, è stato osservato in cellule SNU-449, un'altra linea derivata da un carcinoma epatocellulare umano.

Essendo le vie metaboliche che portano alla sintesi dell'ATP strettamente correlate, l'inibizione del consumo di ossigeno causata dal sorafenib induce nelle cellule un aumento della glicolisi, per compensare la riduzione di ATP di origine mitocondriale. L'aumento della glicolisi si traduce in una aumentata produzione di acido lattico (Fig. 15).

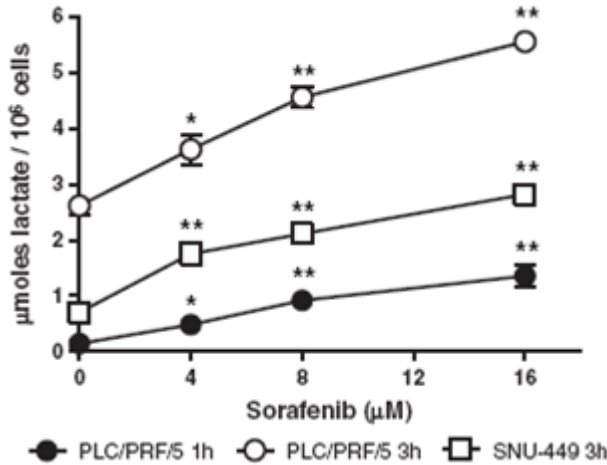


Figura 15 Acido lattico prodotto da cellule PLC/PRF/5 e SNU-449 esposte a concentrazioni scalari di sorafenib. \*, \*\* indicano una differenza statisticamente significativa con  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , rispettivamente.

Quando le colture cellulari sono trattate con la associazione OXA / sorafenib sia la glicolisi che la respirazione cellulare risultano inibite e di conseguenza, in tempi già molto precoci si può osservare una drastica riduzione delle riserve cellulari di ATP (Fig. 16).

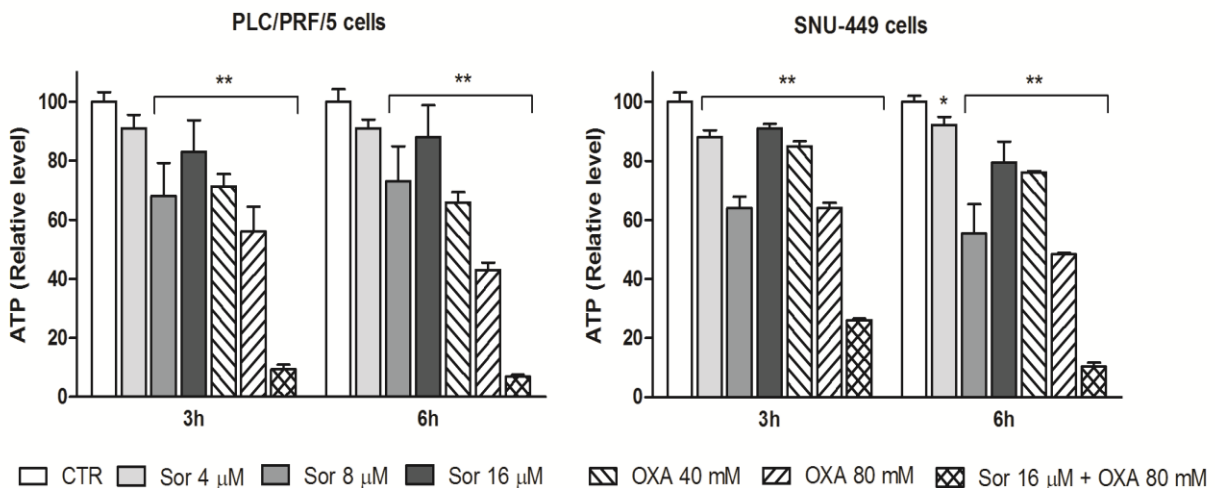


Figura 16. Riduzione dei livelli di ATP causate dall'acido ossamico (OXA), sorafenib (SOR) e dalla loro associazione (OXA+SOR) nelle cellule PLC/PRF/5 e Snu-449. \*, \*\* indicano una differenza statisticamente significativa con  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , rispettivamente.

In conclusione gli effetti metabolici causati dal sorafenib possono giustificare il forte aumento dell'efficacia del farmaco osservato nella sua associazione con OXA e presumibilmente contribuiscono alla sua azione terapeutica nelle cellule di epatocarcinoma.

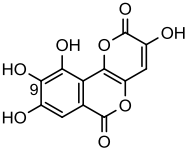
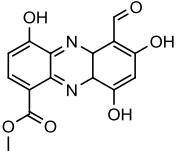
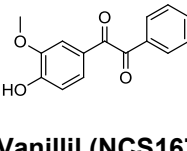
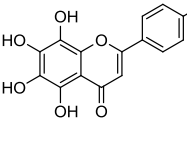
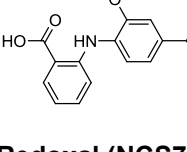
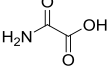


### ***4.3 Caratterizzazione di nuovi inibitori dell'enzima lattico deidrogenasi***

Come accennato nel capitolo 2 dopo i primi incoraggianti risultati abbiamo avviato una collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Bologna allo scopo di identificare nuovi inibitori della LDH, potenzialmente utilizzabili anche in vivo. Per cercare queste molecole si è fatto ricorso alla tecnologia del “virtual screening”. (vedi paragrafo 3.11). Campioni dei composti selezionati con questa procedura sono stati ottenuti dal NCI e testati sulle LDH-A e LDH-B umana purificata. Solo 5 di questi sono risultati attivi a concentrazioni micromolari e sono riportati in Tabella 1.

Una ricerca sul sito di PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) ha permesso di controllare la presenza in letteratura di eventuali dati biologici già pubblicati. I composti sono: galloflavina (NCS107022), lomofungina (NCS156939), redoxal (NCS73735), vanillil (NCS16722) and nortangeretin (NCS76988). Secondo i dati presenti su PubChem, per nessuna di queste molecole è stata precedentemente descritta la capacità di inibire la LDH o altri enzimi della glicolisi. Per ciascuna di queste molecole abbiamo ottenuto un diagramma dose/risposta per l'inibizione della LDH. I dati sperimentali sono stati elaborati mediante la regressione polinomiale di secondo ordine per calcolare la minima dose di composto capace di inibire al 100% l'attività dell'enzima ( $IC_{100}$ ) (Tabella 1). Sebbene meno usuale della consueta determinazione della dose  $IC_{50}$ , questo tipo di calcolo è stato preferito allo scopo di identificare una dose di inibitore pienamente attiva, da testare sulle cellule coltivate in vitro per una valutazione preliminare delle proprietà biologiche dei composti. Gli effetti delle dosi  $IC_{100}$  sono stati studiati in colture di cellule PLC/PRF/5, su cui sono stati valutati la produzione di acido lattico, la respirazione cellulare, i livelli di ATP e la proliferazione. Tutti i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 1, che, per confronto, mostra anche gli effetti prodotti da OXA.

**Table 1. Summary of the biological effects of NCI compounds found to inhibit purified LDH**

Compound	$IC_{100}^{a)}$	$IC_{100}$	% Inhibitory effects in PLC/PRF/5 cells caused by LDH-A $IC_{100}$			
	(human LDH-A) $\mu M$	(human LDH-B) $\mu M$	Lactate production	ATP levels	Cell growth	Respiration
 <b>Galloflavin (NCS107022)</b>	201	200	44.0 $\pm$ 4.1	34.2 $\pm$ 5.2	61.8 $\pm$ 5.0	0.89 $\pm$ 6.7
 <b>Lomofungin (NCS156939)</b>	202	182	24.5 $\pm$ 9.9	28.2 $\pm$ 0.6	> 95%	> 95%
 <b>Vanillil (NCS16722)</b>	205	178	20.0 $\pm$ 5.2	2.53 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 14.4	ND
 <b>Nortangeretin (NCS76988)</b>	270	212	53.3 $\pm$ 0.6	17.3 $\pm$ 0.1	79.5 $\pm$ 25.5	68.3 $\pm$ 7.0
 <b>Redoxal (NCS73735)</b>	177	158	74.6 $\pm$ 20.0	1.63 $\pm$ 0.0	> 95 %	> 95 %
 <b>Oxamic Acid</b>	690	1175	<b>Effects observed at 4 x 10<sup>4</sup> <math>\mu M</math></b>			
			67.0 $\pm$ 2.9	28.7 $\pm$ 2.4	34.5 $\pm$ 0.5	5.71 $\pm$ 2.5
a) Minimal dose causing complete LDH inhibition						

Come si può osservare, OXA causa effetti biologici solo alla concentrazione di  $\sim 4 \times 10^4 \mu\text{M}$  (nessun effetto alla  $\text{IC}_{100}$  determinata sulla LDH-A purificata), poiché ha una limitata capacità di penetrazione cellulare.

Dalla tabella è possibile dedurre che la galloflavina possiede, al contrario, una buona capacità di penetrare le cellule, infatti, la dose in grado di inibire la LDHA ( $201 \mu\text{M}$ ), provoca anche forte effetto sulla produzione di lattato da parte delle cellule PLC/PRF/5 in coltura. Inoltre, la riduzione dei livelli di ATP appare in buona correlazione con la diminuzione della produzione di lattato, come ci si attenderebbe considerando che il blocco della glicolisi aerobia dovrebbe portare alla riduzione delle riserve energetiche della cellula. Una simile correlazione tra inibizione della produzione di acido lattico e riduzione dei livelli di ATP era già stata osservata nelle cellule PLC/PRF/5 in seguito a trattamento con OXA (Fig. 8). Nelle colture trattate con galloflavina il blocco della glicolisi e la caduta di ATP riducono la proliferazione cellulare, ma non viene inibita la respirazione, in quanto il consumo di ossigeno rimane inalterato. La galloflavina dovrebbe dunque inibire la glicolisi aerobia senza interferire con gli enzimi della respirazione cellulare.

Tra gli altri composti studiati il vanillil (NCS16722) presenta un buon effetto inibitorio sull'enzima purificato, tuttavia è stato scartato perché dai dati ottenuti sembra avere una bassa capacità di penetrazione cellulare, come evidenziato dal ridotto effetto causato nelle cellule sulla sintesi di acido lattico e ATP. Per questo composto non è stato possibile studiare l'effetto sulla respirazione cellulare poiché interferisce con il segnale della sonda che lega l'ossigeno durante il saggio MitoXpress.

Per quanto riguarda gli altri tre composti, redoxal (NCS73735), lomofungin (NCS156939) e nortangeretin (NCS76988), i dati sul consumo di ossigeno mostrano che queste tre molecole inibiscono la respirazione cellulare, indicando perciò un meccanismo d'azione non specifico per la LDH. Ad eccezione del nortangeretin, per gli altri due composti sono già stati descritti in letteratura effetti biologici. Il redoxal

inibisce la sintesi delle pirimidine perché blocca l'enzima di-idro-orotato deidrogenasi (Knecht et al., 2000); la lomofungina è un antibiotico che inibisce la sintesi degli acidi nucleici nei lieviti (Cannon et al., 1974).

Nel loro insieme questi saggi biologici hanno portato a selezionare un unico composto potenzialmente interessante, la galloflavina. Questo composto è un derivato dell'acido gallico, una molecola di origine vegetale che veniva usata in passato come colorante per tessuti di origine naturale. Non è disponibile in commercio e per poter proseguire lo studio, il gruppo della Professoressa Roberti del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche ha messo a punto un procedimento di sintesi.

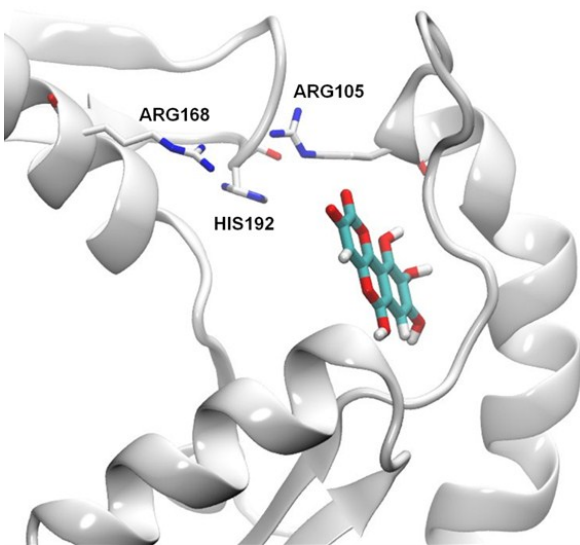
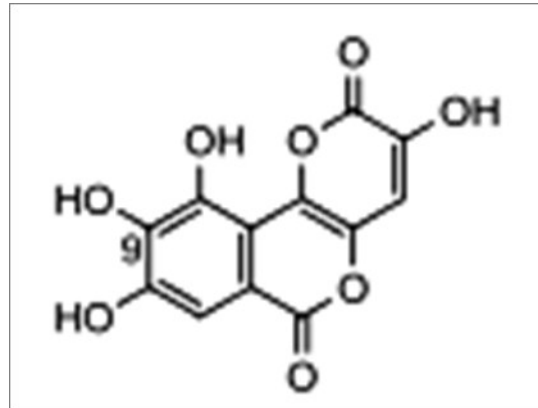


Figura 17 Possibile meccanismo di interazione fra la LDH-A e la galloflavina.

### 4.3.1 Galloflavina



La galloflavina, unica sostanza ritenuta potenzialmente interessante, è stata, caratterizzata in modo più dettagliato sia usando LDH purificata (isoforme A e B di origine umana), sia sulle colture di PLC/PRF/5.

Come si può notare dalle Figure 17 e 18 la galloflavina dovrebbe interagire con l'enzima LDH-A attraverso legami H. L'ossigeno dei gruppi carbonili della galloflavina può funzionare da accettore degli atomi di H della THR247 e della GLN99, mentre i gruppi idrossilici possono formare ponti idrogeno con ASN137 e ALA95. Infine il gruppo 9-OH potrebbe stabilire legami con ALA97 o ASN112 e con l'atomo di azoto peptidico di ASN137. Considerata l'elevata omologia (75% circa) delle sequenze del sito attivo delle due isoforme dell'enzima, la galloflavina dovrebbe interagire in maniera simile anche con la LDH-B.

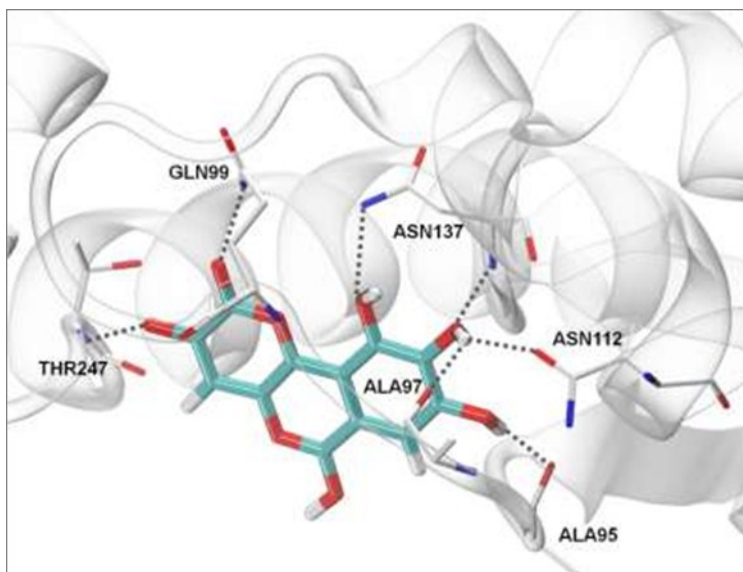


Figura.18 Meccanismo di interazione della galloflavina con il sito di legame della LDH-A umana. Gli atomi coinvolti nei legami idrogeno sono collegati dalle linee tratteggiate grigie.

#### 4.3.2 Studio del meccanismo di inibizione della galloflavina

Per cercare di definire il meccanismo di inibizione della galloflavina sono stati eseguiti dei saggi enzimatici utilizzando LDH-A e LDH-B purificata di origine umana in presenza di concentrazioni scalari di piruvato e di NADH. Come controllo, gli stessi saggi sono stati eseguiti con OXA, che inibisce la LDH mediante competizione con il piruvato (Novoa et al., 1959). I dati di inibizione della LDH ottenuti con la galloflavina e OXA sono stati valutati usando un software (GraphPad Prism 5.0) specifico per l'analisi della cinetica enzimatica.

Sono state raccolte serie di dati di attività LDH in presenza di diverse concentrazioni di inibitore, partendo dalla dose 0. Questi dati sono stati riportati in grafico, elaborati usando la regressione polinomiale di secondo ordine e analizzati usando il metodo di calcolo definito "Modello Misto". Questo modello fornisce come risultato un parametro ("alfa") che è un indice del grado con cui il legame dell'inibitore cambia l'affinità dell'enzima per il substrato. Se alfa è 1, l'inibitore si lega ugualmente sia all'enzima che al complesso enzima/substrato; se  $> 1$  si lega preferenzialmente all'enzima libero; se  $< 1$  l'inibitore ha maggiore affinità per il complesso

enzima/substrato. Un valore di alfa molto elevato suggerisce un'inibizione competitiva perché indica che l'inibitore impedisce il legame del substrato. I risultati della valutazione eseguita con la galloflavina sono riportati in Tabella 2.

<b>Table 2. LDH inhibition data obtained with galloflavin in competition experiments with pyruvate and NADH</b>					
		<i>Human LDH-A</i>		<i>Human LDH-B</i>	
		<i>Pyr.</i>	<i>NADH</i>	<i>Pyr.</i>	<i>NADH</i>
	<i>K<sub>i</sub> (μM)</i>	5.46	56.0	15.1	23.2
<b>Galloflavin</b>	<i>Alpha</i> <sup>a)</sup>	9.94	0.59	3.36	4.44
	<i>Goodness of fit (r<sup>2</sup>)</i>	0.989	0.983	0.963	0.961
	<i>K<sub>i</sub> (μM)</i>	61.4		5.76	
<b>Oxamic Acid</b> <sup>b)</sup>	<i>Alpha</i> <sup>a)</sup>	2.44 · 10 <sup>16</sup>		2.66 · 10 <sup>3</sup>	
	<i>Goodness of fit (r<sup>2</sup>)</i>	0.987		0.978	
a) This value is indicative of the mechanism of inhibition. For explanation, see text.					
b) For comparison, table also reports the inhibition data obtained with oxamic acid, a LDH inhibitor which competes with pyruvate.					

Di particolare interesse è anche il dato dell' inibizione osservata con entrambe le isoforme dell'enzima (vedi anche Tabella 1) in quanto recenti studi riportati in letteratura suggeriscono che la LDH-B potrebbe avere un ruolo cruciale nella tumorigenesi causata dalla iper-attivazione di mTOR (Zha et al., 2008)

### 4.3.3 Effetto della galloflavina su colture cellulari

Per caratterizzare meglio le proprietà biologiche della galloflavina, le cellule PLC/PRF/5 sono state trattate con differenti concentrazioni di questo composto. Al termine del trattamento (vedi Materiali e Metodi) sono stati misurati: la produzione di acido lattico, la respirazione cellulare, la sintesi di ATP e la proliferazione cellulare. I dati ottenuti sono riportati nella figura 19.

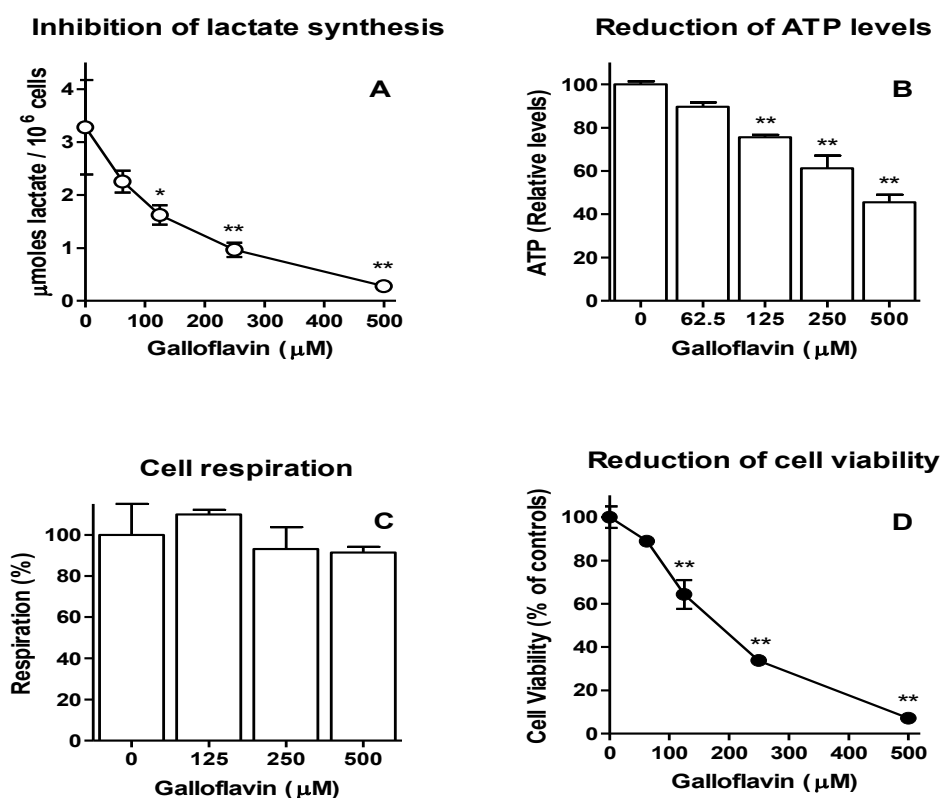


Figura19 Risultati ottenuti dal trattamento delle cellule PLC/PRF/5 con differenti concentrazioni di galloflavina

La figura 19C mostra che la respirazione cellulare non viene sostanzialmente alterata da nessuna delle dosi testate di galloflavina, suggerendo che questo composto non dovrebbe avere effetti tossici sulla funzionalità mitocondriale. Sugli altri parametri studiati gli effetti prodotti dalla galloflavina sono risultati dose-dipendenti, senza nessuna evidenza di una dose soglia. L'inibizione della produzione di acido lattico (Fig. 19A), che è indicativa del blocco della glicolisi aerobia, e la riduzione della sintesi di ATP (Fig. 19B) possono giustificare la riduzione della vitalità cellulare



osservata nelle colture trattate (Fig. 19D). Applicando la regressione polinomiale di secondo ordine ai dati della Fig. 19, si può calcolare che la dose di galloflavina che causa la riduzione del 50% della produzione di lattato è 140  $\mu\text{M}$ . Questa dose è in buona corrispondenza con la concentrazione calcolata di galloflavina che riduce la vitalità cellulare del 50% (184  $\mu\text{M}$ ); questa osservazione suggerisce che nelle cellule PLC/PRF/5, esposte a questo composto, gli effetti sulla vitalità cellulare possono essere giustificati dall'inibizione del metabolismo cellulare prodotta dalla galloflavina. La Fig. 19B mostra anche che le concentrazioni 140-184  $\mu\text{M}$  di galloflavina hanno la capacità di ridurre i livelli di ATP di non oltre il 25-30%. Questo dato può essere facilmente spiegato considerando che, anche nelle cellule che attivamente fanno ricorso alla glicolisi, la funzione mitocondriale non è mai completamente abolita e che la respirazione è molto più produttiva in termini di resa di ATP rispetto alla glicolisi. Questo limitato effetto sui livelli cellulari di ATP ha una conseguenza positiva, poiché studiando il meccanismo di morte indotto dalla galloflavina è stato osservato che questo composto induce apoptosi, senza causare nessuna evidenza di morte per necrosi (Fig. 20). La morte cellulare per necrosi è l'inevitabile conseguenza di una drastica riduzione dei livelli di ATP cellulare e causa l'innesco di una risposta infiammatoria che può essere dannosa perché spesso associata ad un maggior rischio di progressione tumorale.

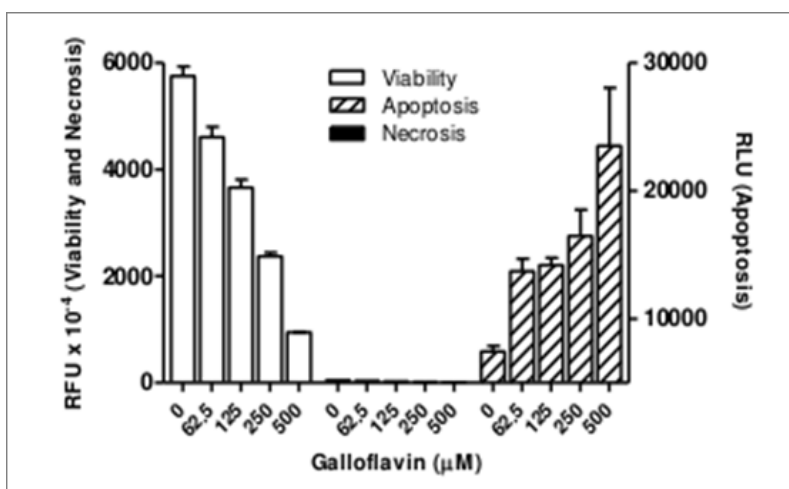


Figura.20 Studio del meccanismo di morte cellulare indotto dalla galloflavina su cellule PLC/PRF/5 a 24 ore dal trattamento

## 5. Conclusioni ed esperimenti futuri

Gli esperimenti eseguiti per questo progetto di ricerca hanno mostrato che l'inibizione della glicolisi aerobia, la principale via metabolica usata dalle cellule tumorali per produrre energia, può essere sfruttata non solo per bloccare la proliferazione delle cellule di epatocarcinoma, ma anche per aumentare l'efficacia terapeutica di altri farmaci somministrati in associazione. L'unico farmaco finora approvato contro il carcinoma epatocellulare è il sorafenib e prima dell'introduzione di questa molecola la chemioterapia sistemica di questa forma tumorale non era effettivamente praticata. Tuttavia questo farmaco produce solo modesti risultati sulla sopravvivenza dei pazienti con HCC (Llovet et al., 2008); la sua scarsa efficacia ha indotto quindi un'attiva ricerca di nuovi agenti più efficaci.

I nostri risultati suggeriscono che una possibile strategia per migliorare gli effetti terapeutici del sorafenib potrebbe essere la sua associazione con inibitori della glicolisi come l'ossamato (OXA), un composto che inibisce la lattato deidrogenasi. Come mostrano i nostri dati, nelle colture cellulari l'associazione sorafenib/OXA causa una forte riduzione dei livelli di ATP. Sfortunatamente OXA ha una scarsa capacità di penetrazione cellulare e di conseguenza inibisce la glicolisi aerobia a concentrazioni che non possono essere raggiunte in vivo. Attualmente la ricerca di nuovi inibitori della glicolisi aerobia è molto attiva (Granchi et al., 2010) e probabilmente presto saranno disponibili nuovi composti per trials clinici. Grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche anche il nostro gruppo di ricerca è arrivato alla identificazione un composto, la galloflavina, che inibisce la LDH con una efficienza circa 1000 volte maggiore dell'acido ossamico. L'inibizione degli isoenzimi della LDH è finora l'unico effetto biochimico descritto per la galloflavina. Sul sito del NCI, l'ente che ci ha fornito questo composto (<http://dtp.nci.nih.gov/>), sono disponibili per questa molecola dei dati preliminari di tossicità che suggeriscono una buona tollerabilità in vivo: iniettata intra-peritoneo nel

topo alla dose di 400 mg/kg la galloflavina non produce effetti letali. Complessivamente i questi dati suggeriscono che la galloflavina potrebbe essere un composto promettente nel campo degli inibitori metabolici tumorali e inducono così a una sua valutazione più approfondita come potenziale farmaco antineoplastico.

I risultati ottenuti con la associazione OXA /sorafenib incoraggiano inoltre studi futuri per valutare gli effetti dell'associazione di questo farmaco con la galloflavina, nel tentativo di migliorare la terapia dell' HCC. A questo scopo un importante aspetto da approfondire dovrebbe essere lo studio dell'inibizione del sorafenib sulla fosforilazione ossidativa (OXPHOS) di cellule normali, una possibilità supportata anche da studi che dimostrano come questo farmaco danneggi mitocondri isolati da tessuti non neoplastici (Will et al., 2008). Le cellule sane dovrebbero però avere una capacità di fosforilazione ossidativa molto maggiore rispetto a quella delle cellule di HCC, che sono caratterizzate da un ridotto contenuto di mitocondri (Cuezva et al., 2002). Di conseguenza, a differenza delle cellule di HCC le cellule normali dovrebbero avere nel compartimento mitocondriale una "riserva energetica" a cui poter far ricorso tutte le volte in cui il loro lavoro fisiologico aumenta e la conseguente riduzione del rapporto ATP/ADP stimola la OXPHOS (Krebs, 1972). Si potrebbe dunque ipotizzare che quando il sorafenib danneggia la funzione mitocondriale nelle cellule normali in realtà non sia in grado di ridurre la quantità di ATP da loro prodotta in condizioni basali, ma semplicemente incida sulla loro "riserva energetica", rendendole meno capaci di far fronte ad una richiesta di energia più elevata.

## Bibliografia

- Barker SB, Summerson WH. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J Biol Chem* 1941; 138: 535-54.
- Befeler AS, Di Bisceglie AM. "Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment". *Gastroenterology* 2002; 122(6): 1609-19.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005; 11: 127-52.
- Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello JP, Butz CE. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 1129-34.
- Cannon M., Jimenez A. Lomofungine as an inhibitor of nucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 1974; 142: 457-63.
- Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaría G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* 2002; 62(22): 6674-81.
- El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365(12): 1118-27.
- Everse J, Kaplan NO. Lactate dehydrogenases: structure and function. *Adv Enzymol* 1973; 37: 61-133.
- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006; 9(6): 425-34.
- Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science* 1987; 235(4795): 1492-5.

- Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006; 160(2): 171-7.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; 4(11): 891-9.
- Granchi C, Bertini S, Macchia M, Minutolo F. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. *Curr Med Chem* 2010; 17(7): 672-97.
- Hogrefe HH, Griffith JP, Rossmann MG, Goldberg E. Characterization of the antigenic sites on the refined 3-A resolution structure of mouse testicular lactate dehydrogenase C4. *J. Biol. Chem.* 1987; 262(27): 13155-62.
- Kanno T, Sudo K, Maekawa M, Nishimura Y, Ukita M, Fukutake K. Lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: a new type of hereditary exertional myopathy. *Clin. Chim. Acta* 1988; 173(1): 89-98.
- Kaplan NO, Ciotti MM, Hamolsky M, Bieber RE. Molecular heterogeneity and evolution of enzymes. *Science* 1960; 131: 392-7.
- Knecht W, Löffler M. Redoxal as a new lead structure for dihydroorotate dehydrogenase inhibitors: a kinetic study of the inhibition mechanism. *FEBS Lett.* 2000; 467: 27-30.
- Krebs HA. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem* 1972; 8:1-34.
- Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5): 2037-42.
- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907–17.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl. J. Med.* 2008; 359(4): 378-90.

- Moran JH, Schnellmann RG. A rapid beta-NADH-linked fluorescence assay for lactate dehydrogenase in cellular death. *J Pharmacol Toxicol Meth* 1996; 36: 41-44.
- Novoa WB, Winer AD, Glaid AJ, Schwert GW. Lactic dehydrogenase. V. Inhibition by oxamate and by oxalate. *J. Biol. Chem.* 1959; 234: 1143-48.
- Okumura N, Terasawa F, Ueno I, Oki K, Yamauchi K, Hidaka H, Tozuka M, Okura M, Katsuyama T. Genetic analyses in homozygous and heterozygous variants of lactate dehydrogenase-B (H) subunit--LD-B Matsumoto I and II (LD-B W323R). *Clin Chim Acta* 1999; 287(1-2): 163-71.
- Papacostantinou J, Colowick SP. The role of glycolysis in the growth of tumor cells. II. The effect of oxamic acid on the growth of HeLa cells in tissue culture. *J Biol Chem* 1961; 236: 285-88.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25(34): 4633-46.
- Robey RB, Hay N. Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009; 19(1): 25-31.
- Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(3): 985-93.
- Sebolt-Leopold JS, English JM. Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature* 2006; 441(7092): 457-62.
- Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7: 7.
- Toth A, Jeffers JR, Nickson P, Min JY, Morgan JP, Zambetti GP, Erhardt P. Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(1): H52-60.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 2009; 324(5930): 1029-33.
- Veatch JR, McMurray MA, Nelson ZW, Gottschling DE. Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell* 2009; 137(7): 1247-58.

- Warburg O: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin, Springer, 1926. [English translation Dickens F (transl): The Metabolism of Tumours. London, Constable, 1930.]
- Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*. 2008; 27 Suppl 1: S71-83.
- Yu Y, Deck JA, Hunsaker LA, Deck LM, Royer RE, Goldberg E, Vander Jagt DL. Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4, and C4 *Biochem. Pharmacol* 2001; 62(1): 81-9.
- Zha X, Wang F, Wang Y, He S, Jing Y, Wu X, Zhang H. Lactate dehydrogenase B is critical for hyperactive mTOR-mediated tumorigenesis. *Cancer Res* 2011; 71(1): 13-8.