

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in BIOLOGIA e PATOLOGIA
MOLECOLARE

Ciclo XXVI

La Nutlin-3 potenzia l'effetto citotossico
del trattamento combinato con gli
inibitori di MEK1 e l'arsenico triossido
in cellule di Leucemia Acuta

Coordinatore:

Chiar.mo Prof.ssa Valeria Dall'Asta

Tutor:

Chiar.mo Prof. Antonio Bonati

Dottoranda: Dott.ssa Manuela Abeltino

Esame finale anno 2014

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Leucemia Acuta Mieloide	3
1.2 La via delle MAPK	6
1.3 Il triossido di Arsenico	8
1.4 La Nutlin-3	11
2. MATERIALI E METODI	13
2.1 Reagenti	13
2.2 Colture cellulari	14
2.3 Analisi citofluorimetrica per la valutazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare	15
2.4 La trasfezione	16
2.5 Analisi molecolari	17
2.6 Analisi statistiche	18
3. RISULTATI	19
3.1 La Nutlin-3 aumenta l'effetto citotossico della combinazione PD+ATO in cellule leucemiche.	19
3.2 L'effetto citotossico del trattamento combinato NUT/PD/ATO è caspasi dipendente.	26
3.3 Modulazione dei livelli delle proteine della famiglia di p53 dopo trattamento combinato con PD/ATO in cellule AML.	28
3.4 Studi funzionali di p53 e p73.	29
3.5 La Nutlin-3 potenzia l'espressione dei geni target della famiglia p53	32
4. DISCUSSIONE	36
5. RIASSUNTO	38
6. BIBLIOGRAFIA	42

1. INTRODUZIONE

1.1 Leucemia Acuta Mieloide

La leucemia acuta mieloide (LAM) è un ampio ed eterogeneo gruppo di neoplasie ematologiche maligne di tipo clonale a caratteristiche fenotipiche mieloidi. È determinata da un meccanismo patogenetico acquisito insorto in un progenitore emopoietico non ancora orientato (cellula staminale multipotente) o parzialmente orientato verso una linea cellulare mieloide¹, ed è caratterizzata da un abnorme accumulo, soprattutto nel midollo osseo e poi in altri tessuti ed organi, di precursori o blasti mieloidi (mieloblasti, monoblasti, megacarioblasti, proeritroblasti), la cui maturazione è abortiva².

Questo porta di conseguenza ad una difettiva produzione delle rispettive cellule mature (granulociti, monociti, piastrine ed eritrociti) che può sfociare in un quadro clinico caratterizzato prevalentemente da:

Insufficienza midollare, con difettiva produzione di cellule ematiche mature, con suscettibilità ad anemie nel caso di deficit eritrocitario, ad infezioni per deficit di granulociti neutrofilici e ad emorragie per deficit di piastrine;

Infiltrazione di tessuti e organi non emopoietici da parte delle cellule leucemiche con conseguente epatomegalia, splenomegalia, cute leucemica, linfadenopatia e danno funzionale;

Liberazione dalle stesse cellule leucemiche e dalle cellule del sistema linfatico e monocitomacrofagico di mediatori chimici dell'infiammazione e della risposta immune (febbre, dolori, calo ponderale, sudorazioni profuse).

Le LAM possono essere classificate in diversi modi. Sul piano biologico, clinico e prognostico si distinguono 3 grandi categorie:

LAM primarie o de novo; senza la presenza di una causa scatenante; spesso associate a specifiche lesioni citogenetiche.

LAM secondarie all'esposizione di agenti leucemogeni (t-LAM); agenti fisici (radiazioni ionizzanti) e chimici (sostanze alchilanti e mielotossiche come agenti chemioterapici, o sostanze tossiche di uso professionale);

LAM secondarie all'evoluzione di una sindrome mieloproliferativa subacuta o mielodisplasica.

Il metodo più comunemente utilizzato è il sistema FAB (Franco-Americano-Britannico), che divide le LAM in 9 sottotipi in base a specifici caratteri fenotipici, morfologici, citochimici di tipo mieloide e la percentuale di blasti leucemici presenti nell'aspirato midollare.

Un'analisi citogenetica più approfondita ha permesso di identificare delle aberrazioni cromosomiche clonali non random in una larga percentuale di pazienti con LAM che sono correlate ad uno specifico sottotipo FAB³ (Tabella 1).

FAB	NOME	FQ	MORFOLOGIA	RIARRANGIAMENTO	GENI COINVOLTI
M0	MIELOBLASTICA Con differenziazione minima	3%	Blasti>30%, senza granulazioni e con elevato rapporto nucleo/citoplasma	inv(3) t(3;3)	EVII
M1	MIELOBLASTICA Senza maturazione	15-20%	Blasti>90%, con elevato rapporto nucleo/citoplasma e corpi di Auer. Cellule mieloidi e monolitiche normomaturanti<10%.		
M2	MIELOBLASTICA Con maturazione	25-30%	Blasti<90% Elementi granuloblastici normomaturanti>10% Monociti<20%	t(8;21) 40% t(6;9) 1%	AML1-ETO DEK-CAN
M3	PROMIELOCITICA	5-10%	Blasti: promielociti atipici ipergranulari con bastoncelli e corpi di Auer.	t(15;17)98% t(11;17)1% t(5;17)1%	PML-RARa PLZF-RARa NPM-RARa
M4	MIELOMONOBLASTICA	20%	Blasti e granulociti più maturi <80%	11q23 20% inv(3) t(3;3) 3% t(6;9) 1%	MLL EVII DEK-CAN
M4E0	MIELOMONOBLASTICA Con eosinofili anormali	5-10%		inv(16)e t(16;16) 80%	CBFb-MYH11
M5	MIELOBLASTICA	2-9%	Monoblasti, promonociti, monoliti >80%	11q23 20% t(8;16) 2%	MLL MOZ-CBP
M6	ERITROBLASTICA	3-5%	Eritroblasti>50% Blasti non eritroidi>30%		
M7	MEGACARIOBLASTICA	3-12%	Blasti>30% marcata mielofibrosi	t(1;22) 5%	sconosciuti

Tabella 1: **Classificazione FAB.** Per ogni gruppo è indicata la frequenza, la morfologia dei blasti, i riarrangiamenti e le mutazioni. Negli ultimi venti anni un gran numero di ricerche cliniche e biologiche ha contribuito a dimostrare l'eterogeneità delle LAM ed è stato la base per definire la probabilità di risposta al trattamento. Le diverse alterazioni citogenetiche sono perciò state suddivise in 3 gruppi sulla base di criteri prognostici.

I diversi fenotipi identificati con la classificazione FAB danno origine a differenti quadri clinici e di laboratorio e presentano particolari alterazioni cromosomiche e genomiche.

Anche le diverse lesioni citogenetiche possono quindi essere utilizzate per identificare sottogruppi di pazienti con distinte caratteristiche risposte terapeutiche^{4,5} (tabella 2).

Citogenetica	Frequenza	Anormalità citogenetiche
Favorevole (21%)	Più frequenti nei bambini e giovani adulti e costituiscono la minor percentuale di LAM.	t(8;21)
		inv(16)
		t(15;17)
Intermedia (55%)	Comprende pazienti con rischio di ricaduta standard.	+8
		Cariotipo normale
		+6; -Y
Sfavorevole (32%)	Più frequenti negli anziani (>65 anni) e in pazienti con LAM secondaria associata anche a fenotipo farmaco-resistente (MDR1).	11q23
		t(6;9)
		-5;-7; cariotipo complesso

Tabella 2: **Classificazione citogenetica per gruppi di rischio con relativa frequenza e anomalie citogenetiche.**

Mentre trials clinici hanno dimostrato che le anomalie citogenetiche forniscono importanti informazioni di significato prognostico, nelle LAM con stesso profilo citogenetico sono state osservate differenze nella risposta terapeutica e nell'esito, implicando anche altre anomalie citogenetiche e di attivazione o inattivazione di pathways cellulari critici che hanno un impatto sulla risposta biologica e terapeutica, tra cui la trasduzione del segnale, apoptosi, resistenza a farmaci, angiogenesi, regolazione del ciclo cellulare e DNA repair⁶.

La terapia più utilizzata nel trattamento delle LAM è la terapia convenzionale. Questa è basata sulla somministrazione di agenti citotossici con lo scopo di ridurre ed eradicare la popolazione leucemica. Si articola in tre fasi principali: la terapia di induzione, che ha lo scopo di ridurre la popolazione leucemica totale da circa 10^{12} a 10^9 cellule, soglia di rivelazione citogenetica (Daunomicina, citosina arabinoside (Ara-C), Idarubicina, mitoxantrone, 6-tioguanina, etoposide)⁶; la terapia di consolidamento o intensificazione, che ha lo scopo di ridurre al minimo la Minima Malattia Residua; la terapia post-remissione, per la prevenzione della ricaduta (polichemioterapia di mantenimento, trapianto di midollo autologo, trapianto di midollo allogenico)².

La targeted therapy prevede invece l'utilizzo di farmaci diretti contro specifici target cellulari relativi al clone cellulare leucemico, escludendo dalla terapia tossica le cellule

sane. La terapia è indirizzata contro specifici pathways molecolari coinvolti nella genesi e nel mantenimento del fenotipo neoplastico⁷.

Nonostante i successi raggiunti dalla ricerca di base, questo tipo di terapia ha avuto un modesto impatto nella scelta terapeutica e nell'impiego di programmi mirati. La LAM promielocitica (APL) è l'unica per la quale sia utilizzato un protocollo terapeutico mirato, con la somministrazione di acido *all-trans-retinoico* (ATRA) a dosi elevate associato alla chemioterapia convenzionale.

Nuovi agenti in studio per il trattamento delle LAM sono:

Agenti ipometilanti: nel caso il silenziamento di geni oncosoppressori sia dovuto a metilazione dei promotori;

Modulatori MDR: nel caso di espressione della P-glicoproteina che conferisce fenotipo resistente.

Agenti biologici: anticorpi monoclonali anti-CD-33, anticorpi coniugati ad immunotossine, inibitori dell'istone deacetilasi.

Modulatori del pathway di segnalazione intracellulare, con conseguente alterazione degli eventi cellulari, come la proliferazione, differenziamento ed apoptosi come le proteine coinvolte nella via Jak-Stat, Ras/Raf/MAPK e PI3K ma anche come i fattori coinvolti direttamente nella regolazione dell'apoptosi (BCL-2, NFkB, caspasi, cicline, inibitori delle cicline, fattori di trascrizione) ^{6,8}.

1.2 La via delle MAPK

Le MAP-Kinasi (mitogen-activated protein kinasi) sono enzimi ad attività serin-treonin chinasi, che vengono rapidamente attivate in seguito alla stimolazione di una varietà di recettori di superficie cellulare. La loro funzione è quella di convertire stimoli extracellulari in segnali intra-cellulari che controllano l'espressione di geni essenziali per molti processi cellulari, inclusi la proliferazione, la differenziazione cellulare e l'apoptosi. Esistono diversi tipi di MAPK: ERKs (ERK1 p44, ERK2 p42 extracellular signal-regulated kinases), JNKs (JNK1 p46, JNK2 p54 c-Jun NH₂-terminal Kinases chiamate anche SAPK stress activated protein Kinases) e p38⁹.

Mentre ERK1/2 sono attivati da stimoli mitogenici e/o differenziativi gli altri due tipi di MAPKinasi JNK1/2 e p38 sono efficacemente attivate da segnali che promuovono uno

stress cellulare come citochine infiammatorie (TNF-alpha, IL1 attivando la via di Rac, Rho GTP binding protein), inibitori della sintesi proteica (anisomicina, arsenite), raggi UV-C e stress osmotici. La via MAPKinasica presa in esame da noi è quella mediata da ERK1/2. Queste proteine vengono attivate in seguito a legame di particolari fattori mitogenici¹⁰, come fattori di crescita, ormoni e citochine con specifici recettori di membrana. Il legame con il recettore porta poi all'attivazione di Ras, Raf e MEK1/2 tramite trasferimento del gruppo fosfato. MEK1/2 attiva ERK1/2 fosforilandolo in Thr 202 e Tyr 204. Una volta attivato ERK1/2 migra dal citosol al nucleo e lega particolari fattori di trascrizione come c-Myc, Elk1, Stat3 promuovendo così la trascrizione di geni per la proliferazione o il differenziamento. Diversi studi hanno confermato che l'inibizione dell'attività chinastica di ERK1/2 ad opera di specifici inibitori (PD184352) (Figura 1) ostacola la proliferazione cellulare in risposta a numerosi fattori di crescita, mentre la loro attivazione costitutiva ad opera di proteine aberranti situate a monte di questa via MAPKinsica è sufficiente per indurre tumorigenesi. La via Ras/Raf/MEK/ERK si è visto essere costitutivamente attivata nelle LAM nel 75% dei casi. L'aberrante attivazione di questa via è in grado di conferire al basto leucemico un vantaggio proliferativo rispetto ai precursori ematopoietici normali e recenti studi hanno dimostrato che LAM con ERK1/2 fortemente attivato hanno un fenotipo aggressivo e resistente all'apoptosi^{9, 10,11,12,13}.

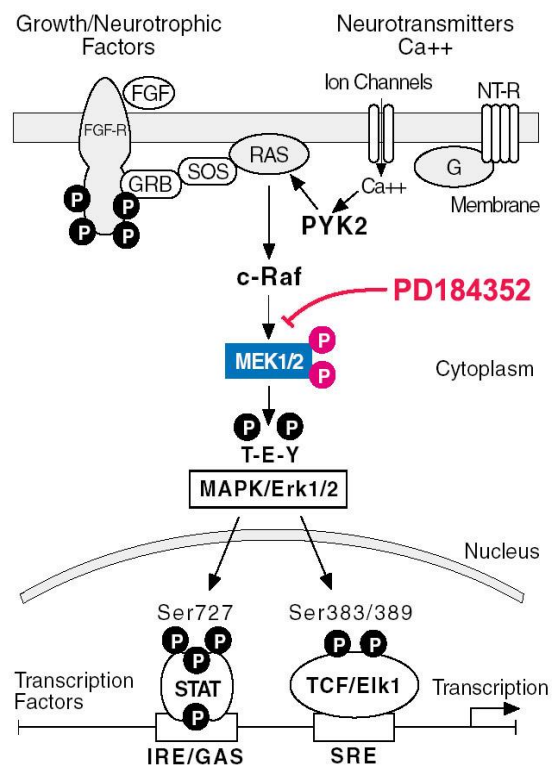


Figura 1: Schema dell'attivazione della via Ras-MAPK

1.3 Il triossido di Arsenico

L'utilizzo del triossido di arsenico (ATO) come medicamento risale a 2000 anni fa. Nonostante la sua tossicità l'ATO è rimasto un farmaco tradizionale in alcune aree, specialmente nell'Asia centrale e meridionale¹⁴.

Per la sua efficacia sono stati effettuati degli studi per il trattamento di malattie ematologiche maligne come LAM, sindrome mielodisplasica, linfoma non-Hodgkin, leucemia cronica linfoide e mieloide, leucemia acuta a cellule T e mieloma multiplo^{15,16}.

Nelle LAM l'ATO induce arresto del ciclo cellulare, apoptosi e in alcune condizioni anche il differenziamento delle cellule neoplastiche. Il trattamento con ATO è risultato essere molto efficace in pazienti con leucemia acuta promielocitica (APL), in particolare in pazienti refrattari al trattamento con l'acido tutto-trans-retinoico (ATRA) o in pazienti ricaduti dopo trattamento con ATRA¹⁷, mentre studi preclinici e trials clinici hanno dimostrato scarsa efficacia dell'ATO nei casi di LAM non-APL. Nonostante la ben documentata efficacia dell'ATO nelle APL, il meccanismo di regolazione dell'apoptosi ATO-dipendente non è stato ancora delucidato. Studi dicono che ATO ad elevate concentrazioni (5 μM e 50 μM) può portare all'induzione della trascrizione genica alterando lo stato di fosforilazione delle proteine di trasduzione del segnale, come le tirosine chinasi. L'ATO colpisce la fosforilazione attivando specifiche chinasi, inibendo le fosfatasi tiolo-dipendenti o interferendo con la reazione di fosfotransferasi. L'effetto protettivo dei tioli, come il glutatione, cys e ditioli contro l'effetto tossico dell'ATO suggerisce che l'ATO manifesta la sua tossicità formando legami reversibili con i gruppi tiolici di proteine regolatorie. Sono stati proposti molti target molecolari come PML ed altre proteine dei corpi nucleari, NF-kB, recettori nucleari per i glucocorticoidi, radicali dell'ossigeno e componenti della cascata MAPKinasica tra cui JNK e p38; inoltre anche il pathway mediato da p53-MDM2 sembra essere target di ATO¹⁴.

Recenti studi hanno evidenziato il coinvolgimento delle MAPKinasasi pro-survival ERK1/2 in risposta al trattamento con ATO; infatti è stato dimostrato che le cellule leucemiche si servono della via Ras/Raf/MEK/ERK per fosforilare in Ser112 e quindi inattivare la proteina proapoptotica Bad ritardando in questo modo l'apoptosi indotta dall'ATO. La funzione di Bad è quella di eterodimerizzare con Bcl-2 e Bcl-x_L bloccandone la loro funzione antiapoptotica, che è quella di legare e inattivare le proteine proapoptotiche Bax e Bak. L'attività proapoptotica di Bad è determinata dal suo stato di fosforilazione, e

solamente Bad non fosforilato è in grado di eterodimerizzare con Bcl-2 o Bcl-x_L neutralizzando così il loro effetto pro-survival e abbassando la soglia apoptotica^{18,19}. La fosforilazione in Ser 112, Ser 136 o Ser 155 causa l'inattivazione della proteina Bad e dunque impedisce il legame di Bad con le proteine antiapoptotiche Bcl-2 e Bcl-x_L. Questi stessi studi hanno dimostrato che il trattamento con uno specifico inibitore di MEK1 (PD184352) era in grado di down-regolare l'attività di ERK1/2 e di impedire di conseguenza la fosforilazione ATO-mediata di Bad in Ser 112 aumentando così il processo apoptotico indotto dall'ATO in linee cellulari leucemiche (K562 e NB4) e ristabilendo completamente la sensibilità all'ATO nella linea cellulare resistente all'ATO (NB4-As^R) (Figura 2)^{20,21}.

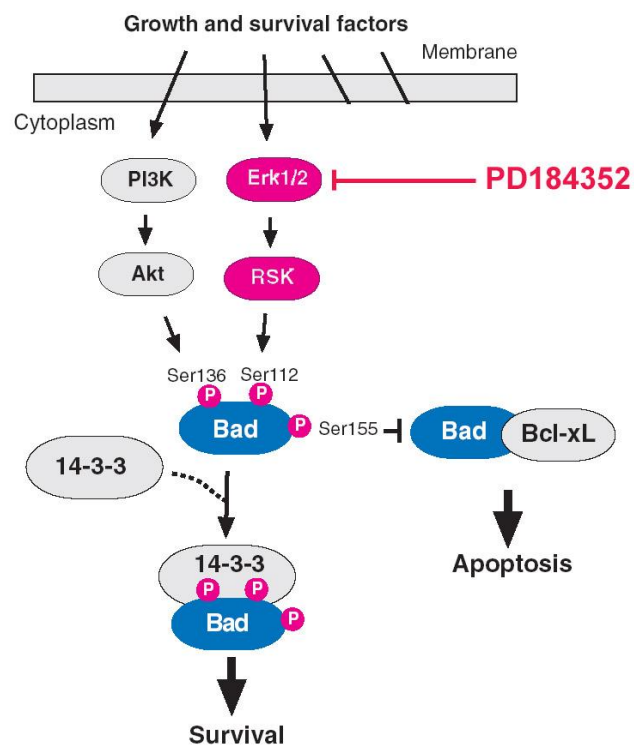


Figura 2. **Effetto della via Ras-MAPK sul pathway di Bad.** Il PD184352 inibisce la fosforilazione di Bad abbassando la soglia apoptotica.

Recenti studi hanno dimostrato il coinvolgimento della proteina p73 nell'apoptosi indotta dall'ATO. La p73 è una proteina con struttura e funzionalità omologhe alla p53/p63 ed è in grado di regolare diversi geni target della p53^{22,23,24}, come p21, Bax, PUMA (p53 up-regulated Modulator of Apoptosis) e P53AIP1 (p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1). La p73 è presente in due isoforme trascritte da due promotori alternativi (Figura 3): TAp73 (contenente il dominio di trans-attivazione e può essere ulteriormente presente in diverse forme di splicing α , β , γ , δ , ϵ , ζ) che ha una funzione proapoptotica e

antiproliferativa; le due isoforme più studiate sono la TAp73 α e TAp73 β ;

Δ Np73 (forma mancante il dominio di trans-attivazione all'NH-terminale) che ha un'attività antiapoptotica e pro-proliferativa. La Δ Np73 ha un effetto dominante negativo sulla regolazione della TAp73. Agisce come trans-repressore sulla trascrizione della p73 e p63, sequestra la TAp73 inattivandola e compete con la p53/p73 sui loro promotori target^{23,25,26,27,28}.



Figura 3: **Omologia di struttura tra le proteine p53, p63 e p73.**

Strutture della p53, p63, p73 che sono conservate in alcuni domini. (acidic N-terminal transactivation (TA) domain D the prolin-rich domain (PRD); BD: DNA-binding domain; OD: oligomerization domain; SAM: steril α motif domain)²⁹.

La p73 viene attivata in seguito a danno al DNA e da sola è sufficiente a indurre l'apoptosi indipendentemente dallo stato della p53 che, al contrario, necessita dell'azione di p73/p63 per indurre morte cellulare³⁰.

Una aumentata espressione di Δ N-p73, piuttosto che mutazioni inattivanti la TA-p73 è stata associata allo sviluppo tumorale. Recentemente è stato dimostrato che l'inibizione di MEK1 (PD) causa una diminuzione dei livelli di Δ Np73 e contemporaneamente porta ad un accumulo della TAp73 sia per aumento della trascrizione sia per fosforilazione in Tyr 99 della proteina, con conseguente aumento della stabilità e una maggior attivazione²¹.

Questo si traduce in una up-regolazione di p21, nel blocco del ciclo cellulare e dunque nell'inibizione della proliferazione (p21 è un inibitore di CDK).

Il trattamento singolo con ATO diminuisce anch'esso il livello di Δ Np73 ma in più aumenta l'acetilazione mediata dall'acetyl-transferase p300 della TAp73 endogena amplificandone le sue funzionalità proapoptotiche. Infatti la TAp73 acetilata è in grado di

up-regolare Bax, oltre che p21, con conseguente induzione dell'apoptosi²¹.

Il trattamento combinato PD+ATO causa una drastica riduzione della $\Delta Np73$ e porta ad un accumulo di TAp73 fosfo-acetilata. La TAp73 fosfo-acetilata aumenta l'affinità per il promotore di p53AIP1 che viene up-regolato²⁰.

P53AIP1, un gene target della p53 e TAp73, si localizza nel mitocondrio e la sua espressione induce una massiva morte cellulare attraverso la perdita del potenziale di membrana $\Delta\Psi_m$ ^{31,32}.

1.4 La Nutlin-3

La p53 impedisce la replicazione di cellule che presentano danni irreparabili al DNA.

Molti tumori esprimono una p53 mutata oppure non funzionante, quest'ultimo caso può essere dovuto ad una sovra-espressione o amplificazione della proteina MDM2.

MDM2 è un inibitore biologico di p53 ed in circostanze normali è presente nella cellula a basse concentrazioni.

MDM2 porta alla soppressione di p53 attraverso tre meccanismi. In primo luogo, MDM2 può legare p53 al suo dominio di transattivazione, bloccando la sua capacità di attivare la trascrizione di geni codificanti per proteine che riparano il DNA o portano ad apoptosi.

In secondo luogo, è coinvolta nel trasferimento verso il nucleo di p53.

In terzo luogo, MDM2 può agire come ubiquitina-ligasi che trasporta p53 verso la degradazione da parte del proteasoma.

Quando il DNA viene danneggiato, p53 è indirettamente attivata da molteplici proteine chinasi, quali ATM (Ataxia-telangiectasia mutated), che fosforilano p53 nei residui di serina e treonina. La fosforilazione di p53 impedisce MDM2 di legarsi, causando la dissociazione del complesso p53-MDM2 e determinando l'aumento dei livelli di p53 nella cellula. Tuttavia, una volta che il danno al DNA è stato riparato le proteine chinasi non sono più attive e la fosforilazione di p53 cessa. Di conseguenza, la p53 viene rapidamente defosforilata e il complesso p53 - MDM2 si riforma.

L' inibizione dell'interazione p53-MDM2 con molecole sintetiche come la Nutlin-3 porta all'accumulo di p53 attiva con conseguente morte delle cellule tumorali per apoptosi.

MDM2 contiene un sito specifico a cui si lega p53 in vivo.

La sovra-espressione di MDM2 inibisce p53 wild-type nel rispondere a danno del DNA.

Tuttavia, se il sito in cui MDM2 lega p53 viene bloccato, legandosi ad un analogo di p53 come la Nutlin-3, questo disturba l'effetto inibitorio di MDM2 su p53.

La Nutlin-3, inoltre, visto che è specifica per l'interazione MDM2-p53, potrebbe diminuire il potenziale di tossicità sistemica, dato che sarebbe specifica per il trattamento dei tumori con un'alta concentrazione del complesso p53-MDM2.

La Nutlin-3 fa parte della classe degli antagonisti che inibiscono il complesso p53-MDM2, questi antagonisti appartengono ad un gruppo di *cis*imidazoline analoghi.

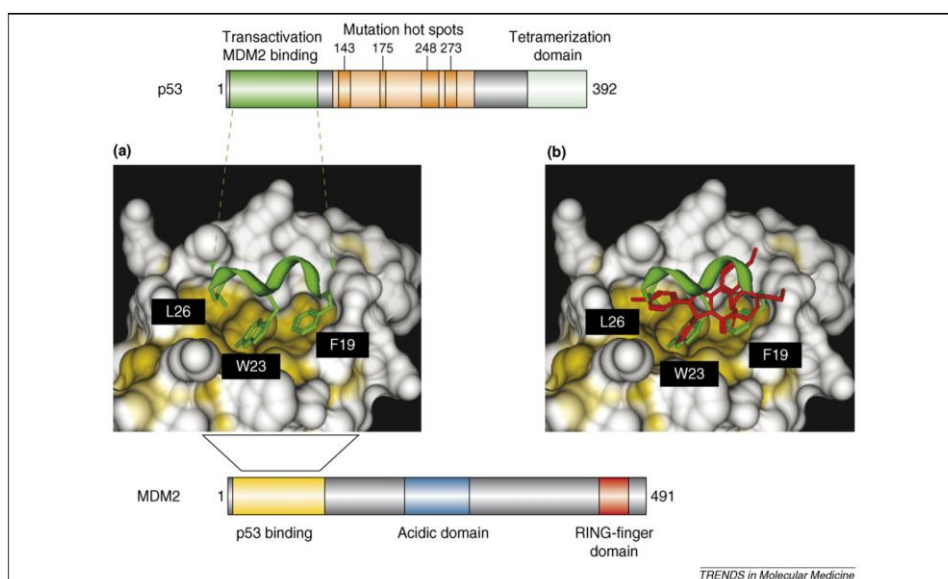
Attraverso l'analisi della cristallografia a raggi X del complesso MDM2-p53 è stato individuato un sito di legame idrofobo che rappresenta il sito di legame per la p53.

Inoltre, lo studio della struttura ha rivelato che questa fessura veniva riempita solo dalle tre catene laterali della regione elicoidale di p53: Phe19, Leu26 e Trp23.

Questa scoperta ha portato ad ipotizzare la creazione di una piccola molecola inibitoria come la Nutlin-3 in grado di imitare questi tre aminoacidi e il loro orientamento. La Nutlin-3 quindi va a disturbare l'interazione MDM2-p53, legandosi in particolare in questa fessura idrofoba di MDM-2, liberando la p53, rendendola così funzionale.

La modalità di legame di questi composti con MDM2 è stata determinata attraverso studi di cristallizzazione che hanno descritto le strutture tridimensionali di entrambe le molecole. Ed è stato osservato che la Nutlin-3 imita il legame alla regione elicoidale di p53, interagendo con la tasca idrofoba di MDM2.

E' stato osservato che la Nutlin-3, impedendo l'interazione MDM2-p53, determina un aumento di p53, p21 e MDM2, presumibilmente attraverso la attivazione della via p53.



TRENDS in Molecular Medicine Vol.13 No.1

Figura 4: Immagine tridimensionale del legame tra p53 e MDM2³³.

L'ATO è un efficace trattamento per i pazienti con APL che sono ricaduti o refrattari alla terapia con ATRA^{15,16,17,20,21}. Purtroppo studi preclinici e diversi trials clinici hanno dimostrato un effetto limitato dell'ATO nelle LAM non-APL³⁴. È stato dimostrato che il PD era in grado di aumentare le potenzialità antileucemiche dell'ATO nelle LAM non-APL³⁴ attribuendo un importante ruolo all'attivazione delle proteine pro-apoptotiche p73, mentre poco si è indagato sugli effetti che la combinazione PD+ATO induceva sul pathway p53. Poiché a causa di una iper-espressione di MDM2, il pathway p53 è frequentemente non funzionale nelle LAM, il razionale di questo lavoro è stato quello di valutare se lo sblocco di questo pathway, attraverso l'utilizzo della Nutlin-3, fosse in grado di potenziare l'effetto citotossico di PD+ATO mediato dalla p73.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Reagenti

ATO è stato acquistato da Sigma (St. Lous, Mo).

La soluzione stock 1 mM è stata ottenuta dissolvendo ATO in buffer salino fosfato (PBS): la soluzione è stata diluita alla concentrazione di lavoro (1-2 microM).

Una soluzione stock 100mM di inibitore di MEK-1, PD184352 (2-[cloro-4-iodo-fenilamina]-N-ciclopropilmetossi-3,4-difluoro-benzamide), gentilmente fornito dal Dr. J.S. Sebolt Leopold (Cancer Molecular Sciences, Pfizer Global Research & Development, Ann Arbor, MI) è stato preparato in dimetilsolfossido (DMSO). Questo reagente è un inibitore altamente selettivo della fosforilazione ed attivazione di MEK-1^{35,36}.

La Nutlin-3 è stata acquistata da Sigma (St. Lous, Mo).

La soluzione stock 40 mM è stata ottenuta dissolvendo la Nutlin-3 in DMSO

Le dosi utilizzate di 1 µM per PD184352 sono state dimostrate efficaci su cellule leucemiche in vitro come documentato sia da noi che da altri autori^{10, 21,34,37}.

Le dosi di ATO dichiarate nei lavori sono state selezionate sulla base delle prove che ATO, a partire da concentrazioni da 0.5 - 2 µM in su, ha la capacità di indurre apoptosi. Queste concentrazioni in vitro sono all'interno dei range trovati nel plasma di pazienti che hanno ricevuto il trattamento con ATO per leucemia promielocitica acuta (APL)^{38,39}.

L'inibitore delle caspasi è stato disciolto in dimetilsolfossido (DMSO), stoccato in aliquote a -20°C e usato alla concentrazione finale di 30 µM. Il peptide di controllo Z-FA-FMK (Cbz-Phe-Ala-Fluorometil chetone) e l'inibitore della pancaspasi Z-VAD-FMK

(Cbz-Val-Ala-Asp(Ome)-fluorometil chetone) sono stati forniti da Calbiochem (La Jolla, CA).

2.2 Colture cellulari

Linee cellulari: linee cellulari leucemiche OCI-AML-3 (AML FAB M4) e MOLM-13 (FAB M5a) disponibili in commercio (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany) sono state seminate ad una concentrazione di 10^5 cellule su ml di terreno RPMI 1640 (Gibco) addizionato con siero fetale bovino al 10% (FBS; Gibco), 1- Glutammina all'1% (Gibco) e l'1% di penicillina-streptomicina (PS; Gibco), incubate a 37°C con 5% di CO₂. Le cellule al microscopio ottico invertito presentano una morfologia rotondeggiante e crescono come singole cellule in sospensione.

Campioni primari: I blasti leucemici sono stati prelevati mediante aspirato midollare dopo consenso del paziente. Dopo separazione in gradiente di densità i blasti sono stati seminati in terreno RPMI nelle stesse condizioni riportate per le linee cellulari. Per ogni campione sono stati forniti età, classificazione FAB e citogenetica.

Separazione su gradiente di densità

Il campione pervenuto viene processato subito per mantenere il più possibile le cellule vitali. Il processamento consiste nella separazione dei blasti mediante centrifugazione in gradiente di densità col reagente Ficoll Lymphoprep (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) dopo averlo diluito con PBS fresco in rapporto 1:1. Sono stati utilizzati 3ml di Ficoll per 8ml di campione; i campioni sono stati poi centrifugati per 15min a 1800 rpm senza freno. Il contenuto della provetta appare così stratificato con i globuli rossi precipitati in fondo alla provetta e i blasti a metà altezza all'interfaccia tra Ficoll e plasma. L'anello di mononucleati è stato prelevato poi con una pipetta e lavato più volte in PBS per eliminare eventuali residui di Ficoll e plasma. Dopo l'ultimo lavaggio le cellule sono state risospese in PBS e contate con e senza trypan blu (colorante di mortalità).

Condizioni di coltura

Le condizioni di coltura per le linee cellulari e i campioni primari sono le medesime. Le linee cellulari sono state seminate a una concentrazione di 10^5 cellule per ml mentre i blasti primari ad una concentrazione di 2.5×10^5 . Prima del trattamento con ATO le cellule sono state sottoposte ad una prestimolazione di 3h con PD 1 μ M, Nutlin-3 1 μ M o

DMSO (veicolo) e per ogni campione le condizioni finali erano: controllo, PD, ATO 1 μM , PD+ATO1 μM , ATO2 μM , PD+ATO2 μM con e senza Nutlin-3. Le concentrazioni di ATO utilizzate *in vitro* sono comprese nel range di concentrazione riscontrata nel plasma dei pazienti APL trattati con ATO. Le cellule sono state incubate a 37°C con il 5% di CO₂.

2.3 Analisi citofluorimetrica per la valutazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare

Saggi di apoptosi

Il saggio di citometria a flusso per valutare il ciclo cellulare, il contenuto in DNA sub-G1, il potenziale transmembrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$), la marcatura AnnexinaV/PI sono state eseguite come precedentemente descritto^{20,21,34}.

E' stato utilizzato l'apparecchio FACSCalibur (Fluorescence-activated cell sorting, Becton Dickinson). I dati sono stati analizzati utilizzando FlowJo 3.4 software (Tree Star, San Carlos, California).

Ciclo cellulare e apoptosi: Propidio Iodido

Le cellule trattate con i diversi composti sono state valutate a 48 o 72h dalla stimolazione. Le cellule sono state raccolte e centrifugate a 1500 rpm per 5 min a 4°C e risospese in PBS freddo. Il lavaggio in PBS è stato ripetuto per altre due volte.

Dopo l'ultimo lavaggio le cellule sono state risospese in una soluzione di Propidio Iodido (50 $\mu\text{g/ml}$) (per 1ml di Propidio sono state aggiunte 100U/ml di RNasi (Sigma) e 0.1% di Nonidet P-40) e incubate 1h al buio a 4°C. Dopo l'incubazione è stata effettuata la lettura al citofluorimetro FACS (Fluorescence-activated cell sorting, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). I dati sono stati poi analizzati mediante il programma Flow-jo 3.4 (Tree star, San Carlos, CA). Dato che il Propidio Iodido è un intercalante fotosensibile della doppia elica del DNA, permette di valutare il contenuto di DNA di ogni cellula e quindi la fase cellulare in cui si trova. Cellule che presentavano un contenuto ipodiploide di DNA (<2n o >0.2n) (fase sub-G1) sono state contate come apoptotiche. Si possono distinguere le fasi del ciclo cellulare individuando e quantificando i picchi corrispondenti alla fase G1, S e G2.

Apoptosi: Annessina V e Propidio Iodido

Le cellule trattate sono state raccolte come sopra descritto e risospese in una soluzione di Annessina V e Propidio Iodido, utilizzando un Kit di rilevazione apoptotica (PharMingen, Becton Dickinson). L'annessina V lega in maniera Ca^{2+} dipendente i residui di fosfatidil-serina carichi negativamente ed esposti all'esterno della membrana plasmatica delle cellule in apoptosi. L'annessina V coniugata con fluoresceina isotiocianato (FITC) permette l'identificazione diretta delle cellule marcate mediante FACS analisi. La doppia marcatura con Propidio Iodido permette la discriminazione di cellule vive, in apoptosi precoce (positive solo per l'annessina V) e tardiva (positive per Propidio Iodido e Annessina V).

Potenziale di membrana mitocondriale

Le cellule raccolte vengono centrifugate e risospese in una soluzione di colorante mitocondriale (MitoLight apoptosis detection kit -Chemicon International Inc. Temecula, CA, USA-) e incubate a 37°C per 20 minuti. Dopo l'incubazione vengono centrifugate, risospese in buffer e lette al FACS. Il MitoLight è un colorante mitocondriale che permette di discriminare le cellule in apoptosi precoce mediante l'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\psi_m$. Emette una fluorescenza rossa (aggregati di MitoLight, elevato $\Delta\psi_m$) quando viene sequestrato nella membrana mitocondriale delle cellule vive ed è rilevabile nel canale del Propidio Iodido (PI); in cellule con membrana mitocondriale alterata il colorante è presente in forma monomerica libera nel citoplasma ed emette una fluorescenza verde (monomeri di MitoLight, basso $\Delta\psi_m$) ed è rilevabile nel canale della fluoresceina isotiocianato (FITC).

2.4 La trasfezione

La trasfezione consiste nel trasferimento di molecole di DNA esogeno in cellule riceventi. Il DNA, una volta trasfettato, verrà mantenuto nel citoplasma da molte cellule per un determinato periodo di tempo, in genere 2-3 giorni (trasfezione transiente) mentre, solo in pochi casi, verrà integrato nel genoma cellulare (trasfezione stabile). L'isolamento di questi ultimi tipi cellulari e della loro progenie richiede la selezione di un gene marcatore presente nel DNA esogeno, che consente alle cellule trasformate di crescere in un terreno selettivo. Durante le 48h successive alla trasfezione, i geni esogeni sono soggetti a molte delle attività regolative che controllano l'espressione del materiale

cromosomico della cellula. Nel periodo successivo, invece verranno progressivamente persi dalla maggior parte delle cellule per combinazione di fenomeni di degradazione e diluizione, giacchè il DNA non integrato, non è solitamente duplicato con il materiale cromosomico della cellula ospite. Tra le metodiche di transfezione noi abbiamo preferito l'elettroporazione.

L'elettroporazione

Le cellule, poste in una soluzione contenente il DNA, sono sottoposte ad un breve impulso elettrico che produce pori transitori nelle membrane, attraverso cui il DNA esogeno può entrare. Tale tecnica richiede però un numero molto elevato di cellule di partenza, a causa dell'elevato tasso di morte cellulare che si osserva nel corso degli esperimenti. Occorre quindi bilanciare l'efficienza di trasfezione con la percentuale di morte cellulare.

Transfezione di siRNA

Prima dell'elettroporazione, le cellule sono state lavate due volte con terreno RPMI 1640 serum-free e risospese alla concentrazione finale di 24×10^6 cellule/ml in Opti-MEM (Gibco BRL Paisley, United Kingdom). Successivamente, 0.4 ml di sospensione cellulare è stata miscelata sia con 1 nmol di uno smart pool di siRNA a doppio filamento contro p73 (003331) o un siRNA di controllo non specifico (001206) (tutti ottenuti da Dharmacon Tech, Lafayette, Co), ed elettroporata in una cuvetta da 0.4 cm e con un elettroporatore Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) usando il protocollo single-pulse (voltage 250 V e capacità 1050 μ F). 48 ore dopo la transfezione le cellule sono state trattate con PD 1 μ M e/o ATO 2 μ M per 24 ore e poi raccolte per l'immunoblotting, $\Delta\psi_m$, annessina V, contenuto di DNAsub-G1.

2.5 Analisi molecolari

La lisi cellulare in buffer CHAP-lysis e l'immunoblotting sono stati effettuati come precedentemente descritto^{20,21,34}.

Immunoblotting

Le cellule trattate vengono subito lisate in tampone di lisi CHAP così composto: 50 mM Tris-HCl pH8, 1.5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA pH7.5, 5% (v/v) glicerolo,

1% (v/v) TritonX-100 a cui vengono aggiunti al momento inibitori delle proteasi 2 µg/ml Aprotinina, 2 µg/ml Leupeptina, 1 µg/ml Pepstatina, 1mM fenilmetil-sulfonil-fluoride, 1 mM ortovanadato di sodio, 50 mM NaF.

Il materiale insolubile viene rimosso tramite centrifugazione per 10 minuti a 12000g a 4°C e la concentrazione del lisato è determinata mediante saggio proteico Bio-Rad. Le proteine (100µg) sono state poi caricate su gel SDS-PAGE (15%) per la corsa elettroforetica. Dopo l'elettroforesi le proteine vengono trasferite su filtro PVDF (Polyvinilidene difluoride) (Millipore Intertech, Bedford, MA, USA) e marcato con gli anticorpi specifici.

Per l'immunoblotting sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: policlonale di coniglio anti-PUMA, fornito da Cell Signaling Tecnhnology; monoclonale di topo anti-p73 (clone 5B429), monoclonale di topo anti-ΔN-p73 (clone 38C674), (Imgenex); monoclonale di topo anti-p53 (DO-1), monoclonale di topo anti-MDM2, Policlonale di capra anti-actina umana (Santa Cruz Biotechnology), policlonale di coniglio anti-p53AIP1 (Anaspec); IgG anti-topo di capra (H+L)-HRP coniugato (Bio-Rad); IgG anti-coniglio di capra (H+L)-HRP coniugato (Bio-Rad); IgG anti-capra di asino (H+L)-HRP coniugato (Santa Cruz Biotechnology).

2.6 Analisi statistiche

E' stata effettuata un'analisi statistica per il confronto multiplo mediante l'analisi della varianza di misurazioni ripetute seguita dal Test MCB di Hsu o Dunnet post-test mediante il software JMP.

Il metodo Chou-Talalay e il software Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO) sono stati utilizzati per valutare effetti additivi, sinergici o antagonisti del trattamento combinato. sono state seminate alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml in presenza di dosi scalari di Nutlin-3, PD e ATO (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, o 10) usando una fixed ratio (1:1:1) per le OCI-AML-3 e una fixed ratio (1:2:4) per le MOLM-13. L'apoptosi è stata valutata dopo 24 e 48 ore di trattamento, attraverso la misurazione del contenuto di DNA sub-G1 ed è stata determinata la curva dose-risposta per ogni composto da solo o in combinazione usando il principio della mediana. Per ogni combinazione è stato calcolato l'Indice di Combinazione (CI) con la seguente equazione: $CI = (Ac)/(As) + (Bc)/(Bs) + (Ac)*(Bc)/(As)*(Bs)$ con (Ac) e (Bc) che corrispondono alle concentrazioni dei composti A e B che hanno un effetto x quando usati in combinazione e (As) e (Bs) corrispondono

alle concentrazioni dei composti A e B capaci di produrre da soli lo stesso effetto x . Con un $CI < 1.0$ si ha un effetto sinergico nell'induzione dell'apoptosi, con un CI di 1.0 si ha un effetto additivo e con un $CI > 1$ si ha un effetto antagonista.

Le curve di sopravvivenza sono derivate attraverso il metodo Kaplan-Meier e confrontate usando il log-rank test, seguito da correzione di Bonferroni per i confronti multipli.

3. RISULTATI

3.1 La Nutlin-3 aumenta l'effetto citotossico della combinazione PD+ATO in cellule leucemiche.

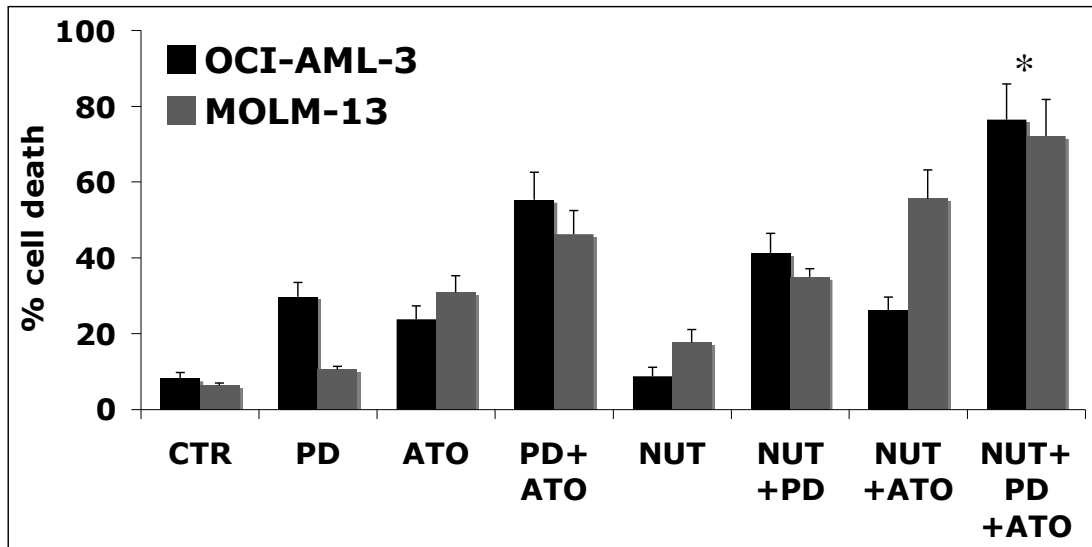
Per prima cosa abbiamo analizzato se la Nutlin-3 aumentava l'effetto citotossico della combinazione PD+ATO in linee cellulari leucemiche che avevano una p53 wild-type inibita da una overespressione di MDM-2.

Abbiamo trattato le linee cellulari OCI-AML-3 (AML FAB M4) e MOLM-13 (FAB M5a), con l'inibitore specifico di MEK, PD18352 (1 μ M), ATO (1-2 μ M) o Nutlin-3 (0.5-1 μ M) come singoli trattamenti ed in combinazione.

Abbiamo monitorato l'effetto citotossico dei diversi trattamenti a 24, 48 e 72 ore, andando a valutare la percentuale di cellule positive all'annexina V binding e la percentuale di cellule con DNA sub-G1 (propidio iodido).

Come descritto in figura 5 abbiamo dimostrato che la Nutlin-3 potenzia significativamente l'effetto citotossico indotto dalla combinazione PD+ATO nelle linee cellulari OCI-AML-3 e MOLM-13.

(a)



(b)

OCI-AML-3

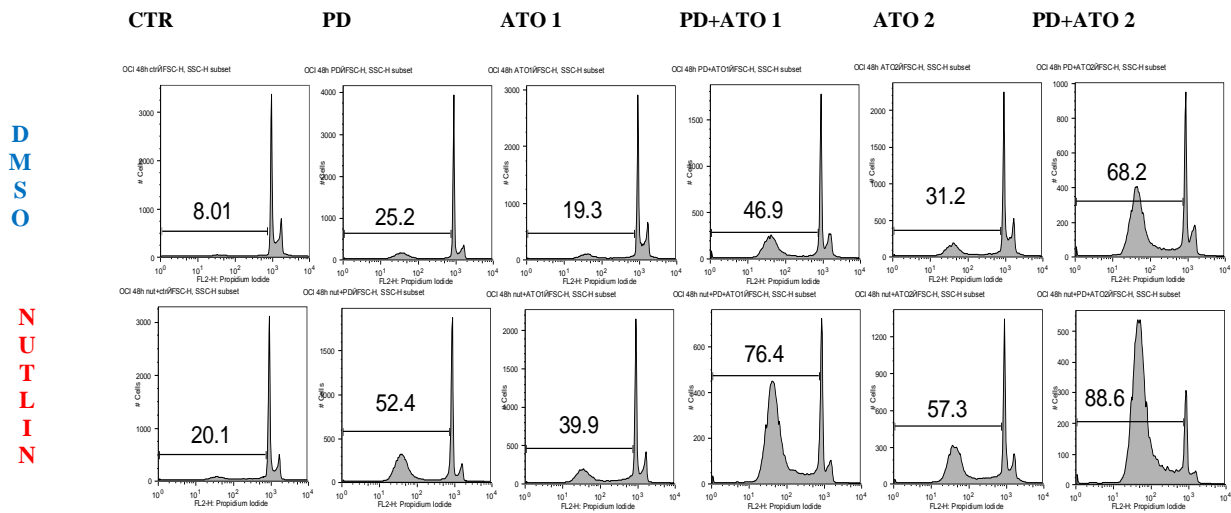


Figura 5: La Nutlin-3 aumenta l'apoptosi indotta dal PD+ATO.

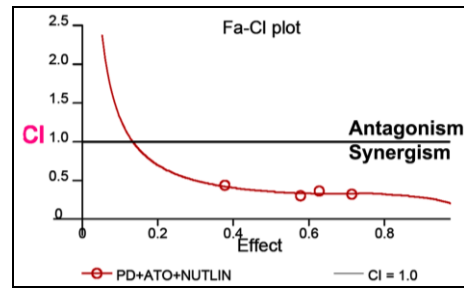
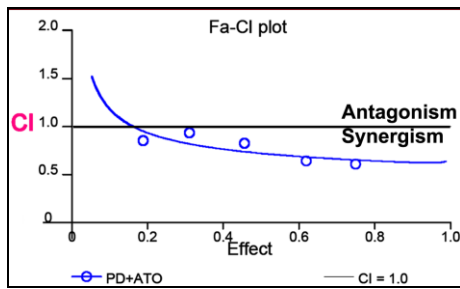
Le cellule leucemiche sono state trattate con PD e/o ATO in presenza ed assenza di Nutlin-3 1 μ M per 48 ore; (a) l'effetto citotossico dei vari trattamenti è stato valutato tramite il metodo dell'annexina V. I valori rappresentano la media \pm la SD dei risultati ottenuti da tre esperimenti indipendenti (*P < 0.01, Test di Dunnett, software JMP).

(b) Esperimento rappresentativo dell'effetto apoptotico (% DNA sub-G1) indotto dai vari trattamenti nella linea OCI-AML-3. (CTR) Controllo. (PD) PD184352 1 μ M. (ATO) Triossido d'arsenico 1-2 μ M.

Inoltre, utilizzando il metodo descritto da T-C Chou and P. Talalay (Trends Pharmacol. Sci. 4, 450-454) che analizza le interazioni farmacologiche tra 2 o più farmaci ed è in grado di quantificare fenomeni quali il sinergismo, l'additività o antagonismo, abbiamo valutato le diverse interazioni farmacologiche tra PD, ATO e Nutlin-3, (fixed ratio 1:1:1 e 1:2:4) ed abbiamo dimostrato che la Nutlin-3 era in grado di aumentare il sinergismo indotto dalla combinazione PD+ATO nelle linee cellulari OCI-AML-3 e MOLM-13. Specificatamente abbiamo dimostrato che l'indice di combinazione medio (CI) calcolati dall'ED50 (50% effective dose), ED75 e ED90, con NUT+PD+ATO rispetto alle cellule trattate con PD+ATO è 0.36 ± 0.03 versus 0.72 ± 0.02 (CI con valori compresi tra 0.85 e 0.7 indicano moderato sinergismo, valori compresi tra 0.7 e 0.3 indicano sinergismo) per le OCI-AML-3 e con NUT+PD+ATO rispetto a cellule trattate con PD+ATO è 0.28 ± 0.11 e 0.50 ± 0.15 rispettivamente per le MOLM-13.

In figura 6 sono rappresentati gli isobologrammi delle OCI-AML-3 e delle MOLM-13.

(a)



(b)

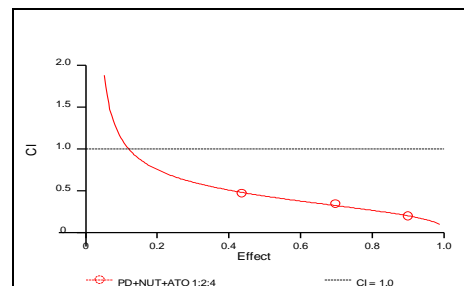
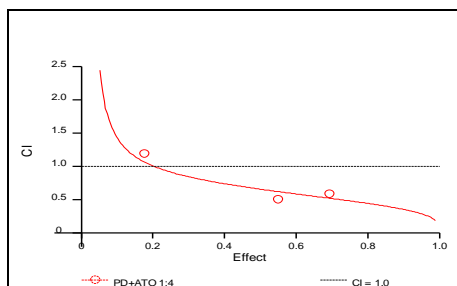


Figura 6: Interazione farmacologica tra PD, ATO e Nutlin-3 nelle linee cellulari OCI-AML-3 e MOLM-13.

Le cellule OCI-AML-3 (a) e MOLM-13 (b) sono state seminate alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml in presenza di dosi scalari di Nutlin-3, PD e ATO (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, o 10) usando una fixed ratio (1:1:1) per le OCI-AML-3 e una fixed ratio (1:2:4) per le MOLM-13. L'apoptosi è stata valutata dopo 24 e 48 ore di trattamento, attraverso la misurazione del contenuto di DNA sub-G1. L'isobologramma è stato ottenuto usando il software Calcsyn. CI minore di 1 significa sinergismo, CI=1 indica effetto additivo, CI maggiore di 1 indica effetto antagonista. Sono visibili le curve dose-effetto dei singoli farmaci e dell'associazione farmacologica, che risulta avere un $CI < 1$.

Come evidenziato dalla tabella 3 si nota come dal trattamento con PD+ATO a quello con PD+ATO+Nutlin-3, si passa da un moderato sinergismo ad un sinergismo per OCI-AML-3 e da un sinergismo ad un forte sinergismo nelle MOLM-13. L'indice di combinazione è stato generato usando il Calcsyn Software. L'indice di combinazione inferiore a 1 indica sinergismo, uguale a 1 indica effetto additivo.

Range of Combination Index (CI)	Description
<0.1	Very strong synergism
0.1-0.3	Strong synergism
0.3-0.7	Synergism
0.7-0.85	Moderate synergism
0.85-0.90	Slight synergism
0.90-1.10	Nearly additive
1.10-1.20	Slight antagonism
1.20-1.45	Moderate antagonism
1.45-3.3	Antagonism
3.3-10	Strong antagonism
>10	Very strong antagonism

Tabella 3: **Valori indice di combinazione.**

Abbiamo inoltre analizzato l'effetto citotossico della combinazione Nutlin-3 /PD/ATO in blasti primari provenienti da diversi campioni di leucemia con diverse caratteristiche cliniche (tabella 4).

Casi	Età	FAB	Anomalie citogenetiche	% Blasti	$\Delta\%$ Nutlin-3 +MEKinhib+ATO vs MEKinhib+ATO
1	65	M2	46, XY FISH:assenza riarrangiamenti MLL	(BM 31/07/12) Blasti 72% CD33+ CD34+ CD117+	20,6759443
2	43	M4	46, XX	(BM 06/08/12) Blasti 90% CD33+ CD4+/- CD11c+CD11b+ CD64+ CD13+/- CD117+/- CD34-	73,313783
3	78	M4	45,X,-Y	(BM 04/09/12) Blasti 45% CD33+ CD13+ CD34+ CD117+ CD4+ CD64+/-	27,5862069
4	30	MPN/M DS	46, XY,t(8;9)(p22;p24)	No blasti, mai tipizzato	4,27046263
5	55	M5	46,XY[4]/45,XY, add(6q),- 10,dm[9]/45,XY,-6,dm[3]	(BM 03/01/13) Blasti 45% CD33+ CD13+ CD117+ CD64+ CD4+ CD15+ CD34-	60,6694561
6	42	M4	46XY	(BM 19/12/12) Blasti 70% CD33+ CD13+ CD117+ MPO+	59,0560246
7	61	M4	46XX	(BM 19/12/12) Blasti 70% CD33+ CD13+ CD117+ MPO+	22,2972973
8	69	M4	46,XY[2]/44,XY,- 5,der(11)del(11)(q23),+der(11)dup(11)(q 23;q25),+der(11)del(11)(p11)dup(11)(q2 3;q25),del(12)(q11),-16, 17,der(17)del(17)(p21),-18,- 22,+mar[13]/43,XY,idem,- der(17)(del(17)(p21).	(BM 27/11/12): Blasti 30% CD34+ CD117+ CD33+ CD13+ CD64+/- MPO-	53,2544379
10	69		46XX	(PB 29/01/08) Blasti 50% CD34+ CD33+ CD117+ CD13+/- CD11a+ CD11b+/- CD2+ CD7+/-	80,9090909
11	74	M1	46XY FISH: assenza Bcr-Abl FISH:assenza riarrangiamenti MLL monosomia AML1 positivo 94%	(BM 23/10/07) CD34+ CD33+ CD117+ CD13+ CD15+/- MPO+/- TdT+/-	36,4552709
12	55		46XX, inv(16)	(BM 07/01/08)	50,7241712
13	52		46XX FISH: assenza Bcr-Abl FISH:assenza riarrangiamenti MLL	(BM 05/10/07)	35,988004
14	61		46XX[4]/47,XX,+8[16]	(BM 12/03/08)	94,3396226

Tabella 4: La Nutlin-3 potenzia l'effetto citotossico indotto dal PD+ATO nei blasti di leucemia acuta mieloide.

Sono riportate le caratteristiche dei pazienti analizzati: età, la classificazione FAB, anomalie citogenetiche, % e caratterizzazione dei blasti leucemici. I blasti primari ottenuti da sangue periferico o aspirati di midollo osseo di 14 pazienti che sono stati trattati con PD (1microM) e/o ATO (2 microM) in presenza ed assenza di Nutlin-3 (1microM). Dopo 48 e 72 ore di trattamento, è stata eseguita l'analisi citofluorimetrica per valutare la percentuale di cellule apoptotiche attraverso la misurazione del contenuto di DNA sub-G1 e mediante il metodo dell'annexina V. Il $\Delta\%$ è la differenza in percentuale di cellule apoptotiche tra quelle trattate con Nutlin-3 + MEKinhib + ATO e quelle trattate con MEKinhib + ATO e viene calcolato con la formula $\Delta\% = (B-A) / A * 100$. Dove A= MEKinhib + ATO e B= Nutlin-3 + MEKinhib + ATO.

Sono stati analizzati 14 campioni di leucemia acuta ottenuti da pazienti e abbiamo potuto dimostrare, in accordo con precedenti studi³⁴, che il PD nella maggior parte dei campioni analizzati, era in grado di aumentare significativamente l'effetto citotossico dell'ATO e che la Nutlin-3 potenziava significativamente l'effetto citotossico indotto dalla combinazione PD+ATO (figura 7).

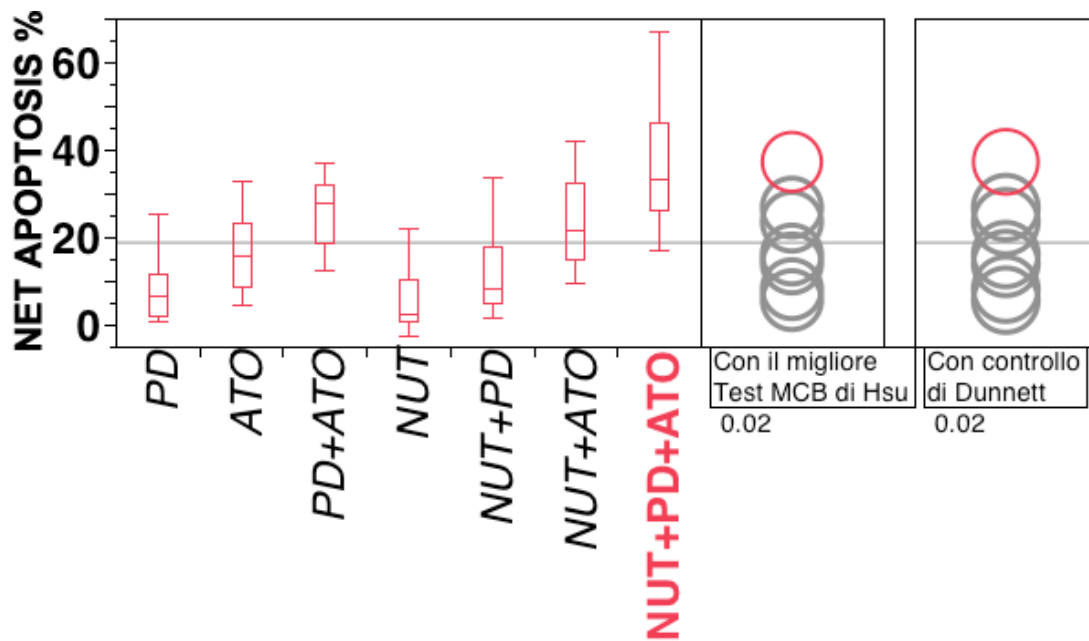


Figura 7: Effetto del triplo trattamento su blasti primari di AML.

Cellule AML provenienti da 14 pazienti differenti sono state seminate alla concentrazione di 2.5×10^5 /ml, sono state trattate con PD (1microM) e/o ATO (2 microM) in presenza ed assenza di Nutlin-3 (1microM) per 48 -72 ore; l'apoptosi è stata valutata attraverso la misurazione del contenuto di DNA sub-G1 e il metodo dell'annexina V. Complessivamente la Nutlin-3 potenzia significativamente (* $P < .02$, Test MCB di Hsu e Test di Dunnett, software JMP) la citotossicità indotta dal PD+ATO. I risultati sono stati calcolati al net di apoptosi (percentuale di cellule trattate in apoptosi – percentuale di cellule in apoptosi trattate con il veicolo (DMSO) e rappresentano la media \pm la SD dei risultati ottenuti da 14 diversi campioni ottenuti da pazienti.

La figura 8 mostra un esperimento rappresentativo dell'effetto apoptotico (% DNA sub-G1) indotto dai vari trattamenti nelle cellule AML ottenute da un paziente.

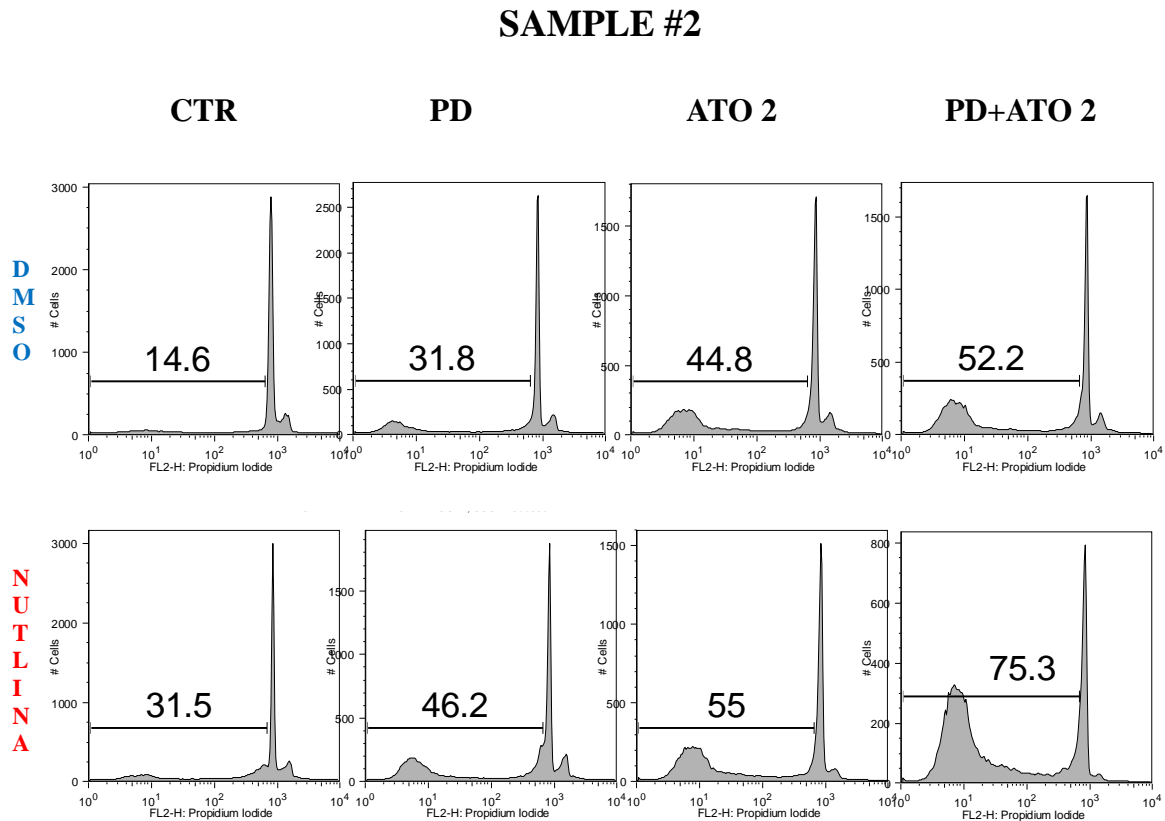


Figura 8: L'effetto del triplo trattamento su blasti primari di AML.

Cellule AML provenienti dal paziente #2 sono state seminate alla concentrazione di 2.5×10^5 /ml, sono state trattate con PD (1microM) e/o ATO (2 microM) in presenza ed assenza di Nutlin-3 (1microM) per 72 ore; l'apoptosi è stata valutata attraverso la misurazione del contenuto di DNA sub-G1. (CTR) Controllo. (PD) PD184352 1 μ M. (ATO) Triossido d'arsenico 2 μ M.

3.2 L'effetto citotossico del trattamento combinato NUT/PD/ATO è caspasi-dipendente.

Ulteriori studi per investigate se le caspasi fossero responsabili nell'indurre l'apoptosi in seguito al trattamento PD/ATO/NUT hanno riguardato l'utilizzo di uno specifico peptide inibitore delle caspasi (pancaspasi inibitore Z-VAD-FMK): le LAM sono state seminate con NUT e/o PD e/o ATO per 24 h in assenza o presenza di Z-VAD-FMK e l'effetto citotossico è stato monitorato mediante i saggi dell'annexina V binding e valutazione del contenuto di DNA sub-G1.

Come illustrato in figura 9 l'inibitore pancaspasi Z-VAD-FMK proteggeva le cellule

leucemiche dall'apoptosi indotta da NUT/PD/ATO, confermando che l'attività caspasi era indispensabile per indurre la morte cellulare in seguito al trattamento farmacologico.

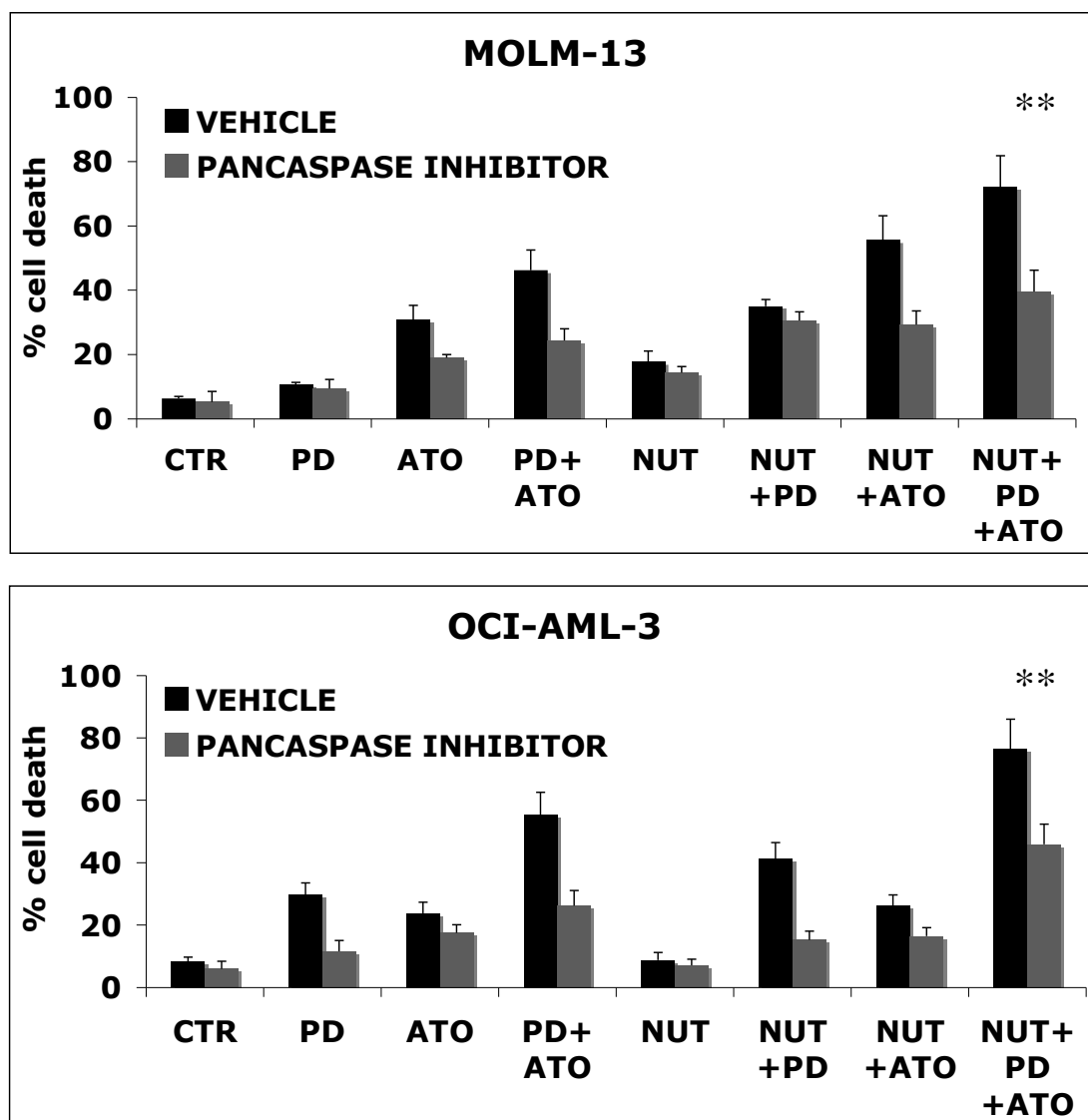


Figura 9: L'effetto citotossico del triplo trattamento è caspasi dipendente.

Le cellule MOLM-13 e OCI-AML-3 sono state trattate con PD e/o ATO e/o Nutlin-3 in presenza ed assenza dell'inibitore pancaspasi alla concentrazione di 30 μ M per 24 ore, dopo di che è stato determinato con il metodo dell'annexina V la percentuale di cellule in apoptosi. (** $P < .001$ NUT /PD/ATO/ Z-FA-FMK (vehicle) vs NUT/PD/ATO/ Z-VAD-FMK ; Dunnet test). CTR indica il controllo; PD, PD184352 (1 μ M); ATO, triossido d'arsenico (2 μ M); Z-FA-FMK, peptide di controllo; Z-VAD-FMK, inibitore pancaspasi.

3.3 Modulazione dei livelli delle proteine della famiglia di p53 dopo trattamento combinato con PD/ATO in cellule AML.

Recentemente è stato dimostrato che la combinazione PD/ATO modula l'espressione delle proteine della famiglia p73, nelle cellule di leucemia acuta promielocitica, leucemia mieloide cronica, di mieloma^{20,34,40} e nei blasti provenienti da pazienti con leucemia acuta mieloide.

Inoltre è stato dimostrato che l'ATO era in grado di indurre un accumulo di p53 nel 52% dei blasti leucemici provenienti dai pazienti di LAM (11 pazienti su 21)³⁴ solamente quando ATO era utilizzato ad alte dosi (2 μ M); ed inoltre in questi pazienti non si osservava un ulteriore accumulo di p53 dopo trattamento combinato PD/ATO³⁴.

Per definire meglio il contributo delle proteine della famiglia p53 nella citotossicità indotta dalla combinazione PD+ATO abbiamo studiato il comportamento delle proteine p73 e p53 in due linee cellulari di leucemia acuta mieloide, OCI-AML-3 e MOLM-13.

Abbiamo per prima cosa valutato l'espressione delle proteine della famiglia p73 nelle linee OCI-AML-3 e MOLM-13, che presentano un'iperespressione di MDM2 che impedisce un accumulo di p53 e abbiamo osservato che la combinazione era in grado di modulare l'espressione delle proteine p73, aumentando l'isoforma proapoptotica TAp73 e riducendo l'isoforma antiapoptotica Δ Np73, in accordo a quanto precedentemente dimostrato^{20,34}.

Lo studio molecolare di queste proteine ha evidenziato che il PD riduce i livelli dell'isoforma Δ Np73, che l'ATO promuove l'aumento dell'espressione di entrambe le isoforme (TAp73 e Δ Np73) non influenzando sulla ratio TAp73/ Δ Np73, mentre il trattamento combinato aumenta la ratio TAp73/ Δ Np73 in maniera dose dipendente (figura 10).

Al contrario, in queste due linee che overesprimono MDM2, non si osservavano modulazioni significative dei livelli proteici di p53 dopo i vari trattamenti.

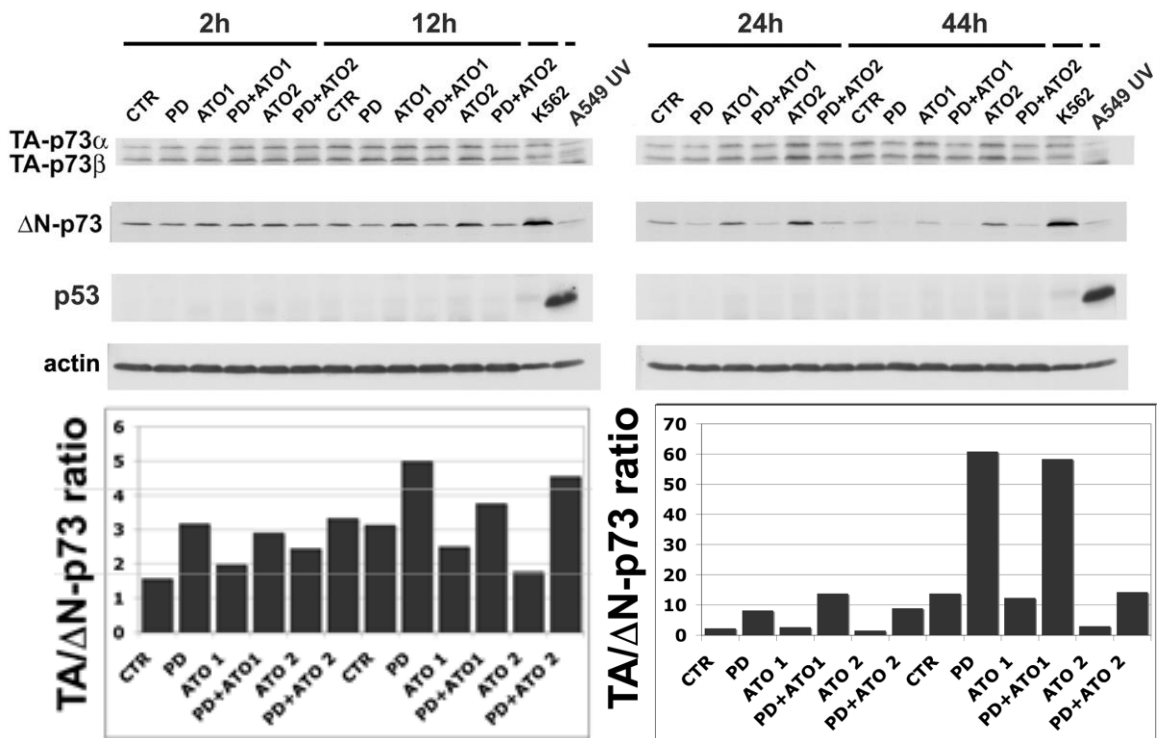


Figura 10: **La combinazione PD+ATO influenza la ratio TAp73/ ΔNp73.**

Le OCI-AML-3 sono state seminate 1×10^5 cellule/ml in presenza di DMSO (veicolo) o PD184352 ($1 \mu\text{M}$) per 3 ore e incubate per 2, 12, 24, e 48 ore con ATO alla concentrazione di 1 o $2 \mu\text{M}$. Le proteine TAp73, ΔNp73 e p53 sono state rilevate tramite western blot. Le bande di TAp73α, TAp73β, ΔNp73 e β-actina sono state analizzate tramite studio densitometrico usando software TINA2 per calcolare la ratio TA-(p73α+p73β)/ ΔNp73. K562 controllo negativo; A549 U.V. treated controllo positivo.

3.4 Studi funzionali di p53 e p73.

Dato che il trattamento combinato modula l'espressione delle isoforme della p73 ma non modula l'espressione della p53 e che la p53 può giocare un ruolo importante nell'effetto citotossico indotto da PD+ATO nelle cellule di mieloma⁴⁰ abbiamo osservato la rilevanza biologica della p73 e della p53 su OCI-AML-3 e MOLM13 in seguito al trattamento combinato PD/ATO.

Per prima cosa abbiamo provato ad indurre l'accumulo di p53 in queste linee cellulari trattandole con la Nutlin-3, un inibitore di MDM2.

Come dimostrato dai blots in figura 11a e 11b il trattamento con Nutlin-3 induceva un accumulo di p53 in entrambe le linee analizzate.

Inoltre si osservava che il triplo trattamento riduceva in maniera marcata l'espressione di MDM2 e induceva un maggiore accumulo di p53 (figura 11b).

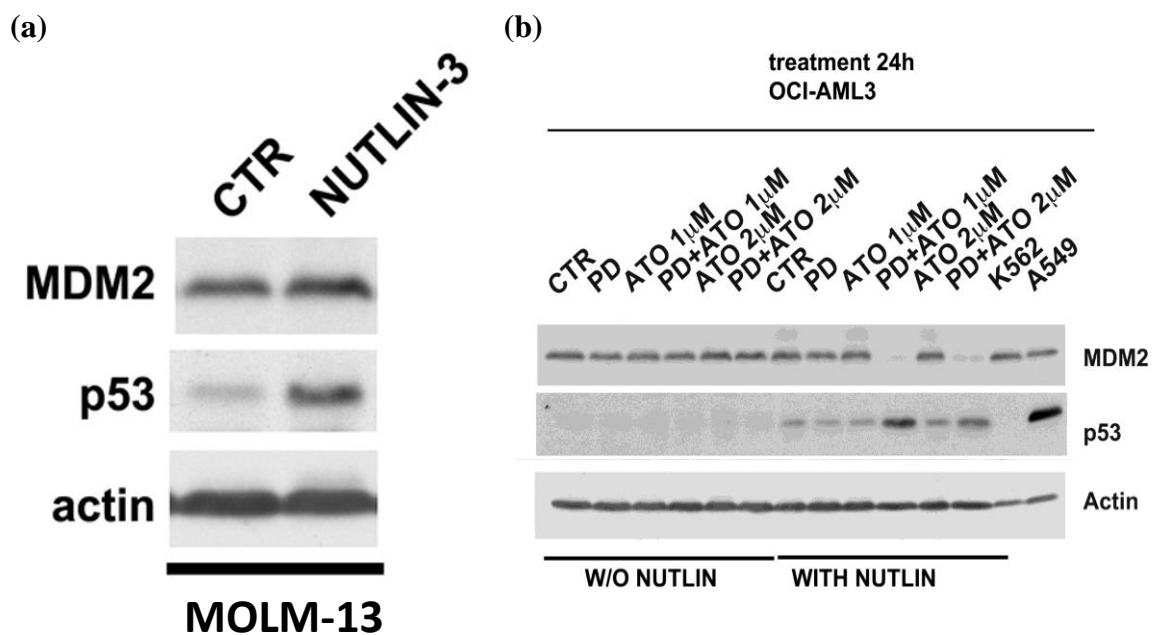


FIGURA 11: La Nutlin-3 sblocca il pathway p53.

(a) Le cellule MOLM-13 sono state seminate alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml in presenza di DMSO (veicolo, W/O NUTLIN) o Nutlin-3 1 μM (WITH NUTLIN) per 24h, successivamente le cellule sono state lisate e sottoposte a Western blot per monitorare l'espressione di MDM2 e p53. K562 controllo negativo; A549 U.V. treated controllo positivo. (b) Le cellule OCI-AML-3 sono state seminate alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml in presenza di DMSO (veicolo) o PD (1 μM) per 3 ore e poi incubate con ATO (1-2 μM) in presenza ed assenza di Nutlin-3 (1 μM) per 24h, successivamente le cellule sono state lisate e sottoposte a Western blot per monitorare l'espressione di MDM2 e p53. K562 controllo negativo; A549 U.V. treated controllo positivo.

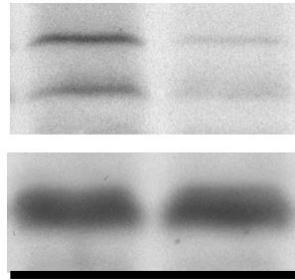
Al fine di valutare il ruolo biologico della p73 in linee cellulari in cui è stato sbloccato il pathway p53 mediante il trattamento con Nutlin-3 sono stati utilizzati dei siRNA specifici contro l'isoforma proapoptotica TAp73; come dimostrato in figura 12a, il p73siRNA riduceva efficacemente i livelli proteici di p73 α/β e la loro riduzione proteggeva sensibilmente dall'effetto apoptotico indotto dalla combinazione PD+ATO dimostrando che la p73 mantiene una rilevanza biologica nell'effetto citotossico della combinazione PD+ATO anche quando il pathway p53 è sbloccato e la p53 si accumula. Questi risultati indicano che entrambi i pathways p53 e p73 possono cooperare contribuendo significativamente all'effetto citotossico indotto da PD+ATO+NUT⁴⁰.

(a) Cont siRNA p73 siRNA

TA-p73 α

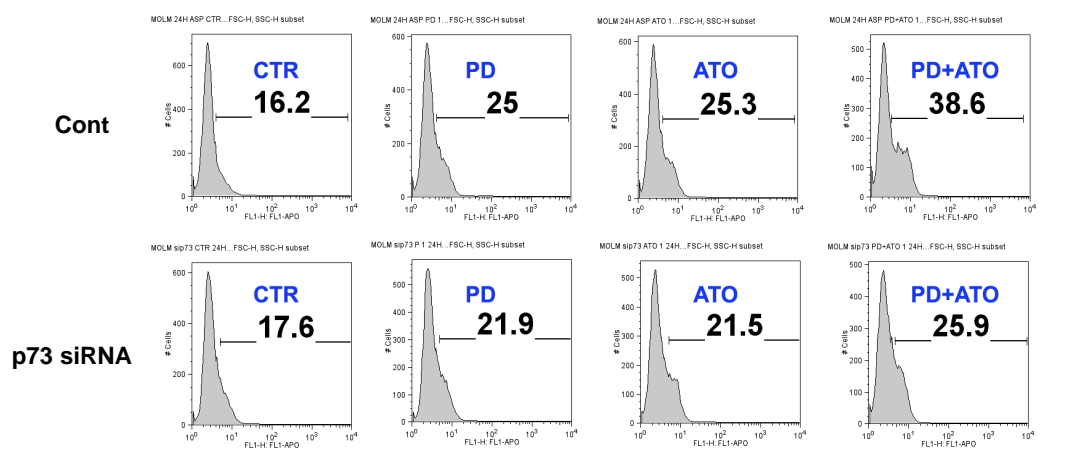
TA-p73 β

actin



(b) OCI-AML-3

DMSO



NUTLIN-3 1 μ M

32,9% inhibizione

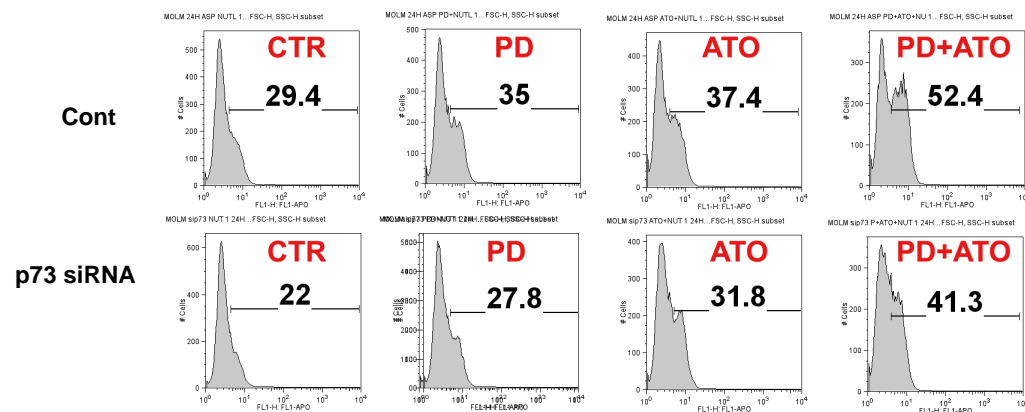


Figura 12: La perdita di TAp73 protegge dalla citotossicità indotta dal trattamento PD+ATO+NUTLIN-3

(a) La trasfezione delle OCI-AML-3 con il siRNA TAp73, ma non del controllo siRNA specifico (CONT), diminuiva l'espressione dei livelli della proteina TAp73, senza incidere sui livelli di espressione dell'actina. (b) Le cellule OCI-AML-3 trasfettate con siRNA TAp73 e siRNA specifico sono state seminate alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml in presenza di DMSO (veicolo) o PD (1micromM) per 3 ore e poi incubate con ATO (1micromM) in presenza ed assenza di Nutlin-3 (1micromM) per 24h, successivamente è stata valutata la perdita del potenziale di membrana mitocondriale mediante saggio MitoLight. I valori indicati in figura indicano in percentuale la perdita del potenziale di membrane mitocondriale.

Poiché l'isoforma $\Delta Np73$ si comporta da dominante negativo sia per la TAp73 che per la p53, e che la $\Delta Np73$ protegge le cellule leucemiche dall'effetto citotossico indotto dall'ATO³⁴, siamo andati a vedere gli effetti che il triplo trattamento PD+NUT+ATO aveva su questa proteina. Abbiamo osservato che il PD+ATO riduceva l'espressione dell'isoforma $\Delta Np73$, ma che questa riduzione veniva significativamente incrementata dal triplo trattamento NUT+PD+ATO (figura 13).

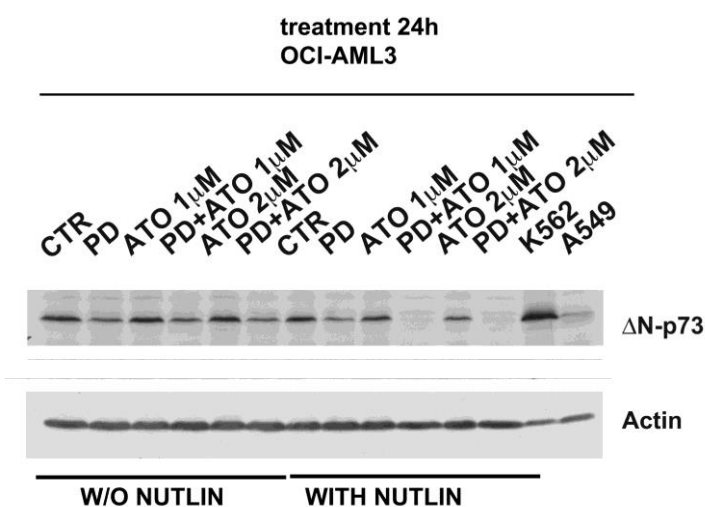


Figura 13: **Il triplo trattamento riduce significativamente l'espressione dell'isoforma $\Delta Np73$.** Le cellule OCI-AML-3 sono state seminate alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml in presenza di DMSO (veicolo) o PD (1microM) per 3 ore e poi incubate con ATO (1-2 microM) in presenza ed assenza di Nutlin-3 (1microM) per 24h, successivamente le cellule sono state lisate e sottoposte a Western blot per monitorare l'espressione di $\Delta Np73$ K562 controllo negativo; A549 U.V. treated controllo positivo.

3.5 La Nutlin-3 potenzia l'espressione dei geni target della famiglia p53

Poiché abbiamo osservato che il trattamento NUT+PD+ATO attivava entrambi i pathways p53 e p73 siamo andati in seguito a valutare come questo si rifletteva sull'espressione proteica di Puma e P53AIP1, due importanti geni target della famiglia p53. Abbiamo osservato che la Nutlin-3 aumentava, anche se debolmente, l'espressione proteica dei livelli basali di Puma e P53AIP1 mentre nelle cellule trattate con PD+ATO il pretrattamento con Nutlin-3 aumentava fortemente l'espressione di queste due proteine proapoptotiche (figura 14).

In stretta correlazione con questi dati (aumento di espressione di proteine pro-apoptotiche che attivano la via apoptotica mitocondriale) si osservava che la Nutlin-3 aumentava la

perdita del potenziale di membrana mitocondriale indotta dal PD+ATO, sia nelle linee cellulari leucemiche (figura 15) che nei blasti primari di leucemia acuta (figura 16, casi rappresentativi #6 e #1).

Questi risultati indicano che tutte le proteine della famiglia p53 possono cooperare nella citotossicità indotta dal PD+ATO in quanto determinano la up-regolazione di proteine pro-apoptotiche quali Puma e P53AIP1 forti induttori della apoptosi intrinseca mitocondriale.

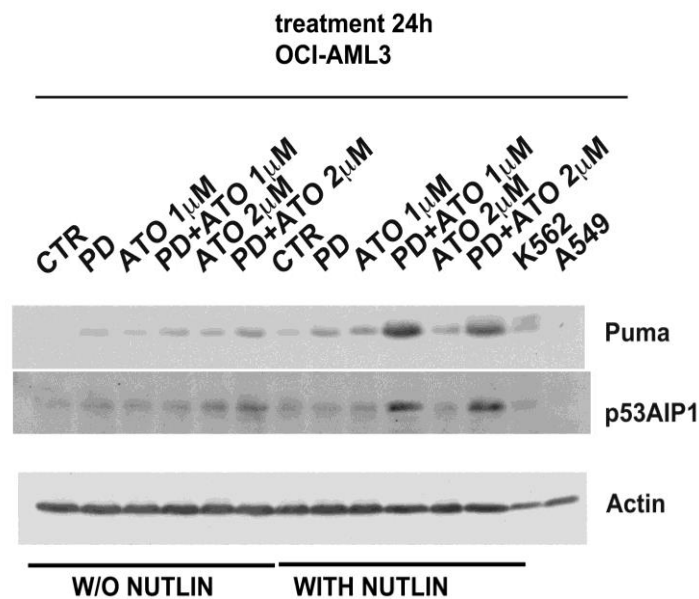


Figura 14: La Nutlin-3 amplifica l'espressione di Puma e P53AIP1 indotti dalla combinazione PD+ATO .

Le cellule OCI-AML-3 sono state seminate alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml in presenza di DMSO (veicolo) o PD (1microM) per 3 ore e poi incubate con ATO (1-2 microM) in presenza ed assenza di Nutlin-3 (1microM) per 24h, successivamente le cellule sono state lisate e sottoposte a Western blot per monitorare l'espressione di Puma e P53AIP1. K562 controllo negativo; A549 U.V. treated controllo positivo.

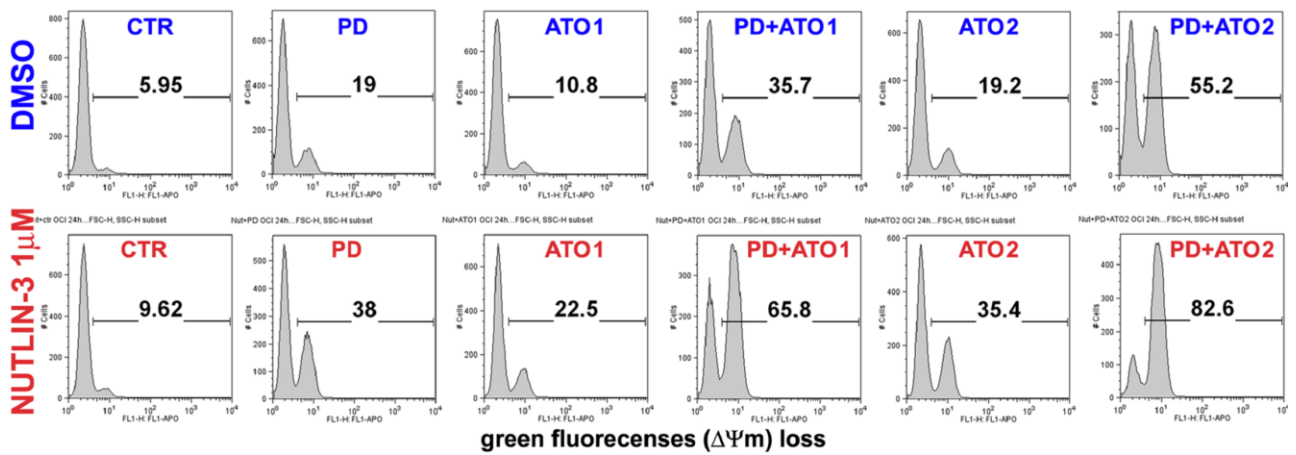
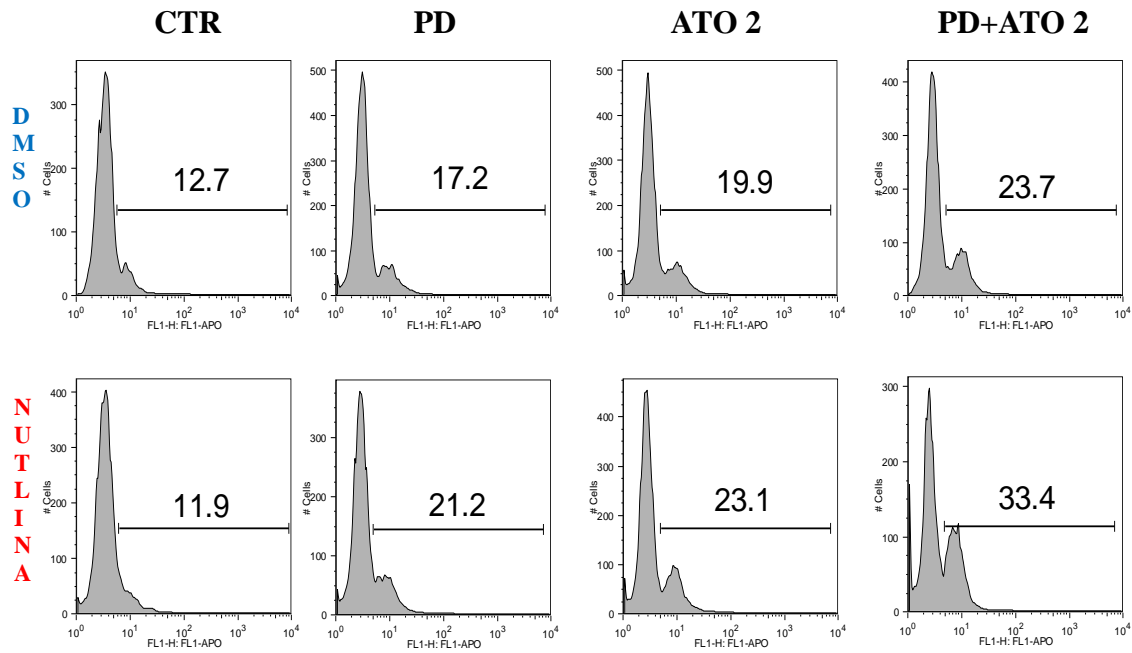


Figura 15: La Nutlin-3 potenzia la perdita del potenziale di membrana mitocondriale indotto dal PD+ATO.

Le cellule OCI-AML-3 sono state seminate alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml in presenza di DMSO (veicolo) o PD (1microM) per 3 ore e poi incubate con ATO (1-2 microM) in presenza ed assenza di Nutlin-3 (1microM) per 24h, successivamente è stata comparata la perdita del potenziale di membrana mitocondriale tra le cellule trattate con ATO e PD+ATO in presenza o assenza di Nutlin-3 (1microM) utilizzando il saggio MitoLight che mostra lo spostamento dello spettro da verde a rosso in proporzione alla perdita del potenziale di membrana mitocondriale.

SAMPLE #6



SAMPLE #1

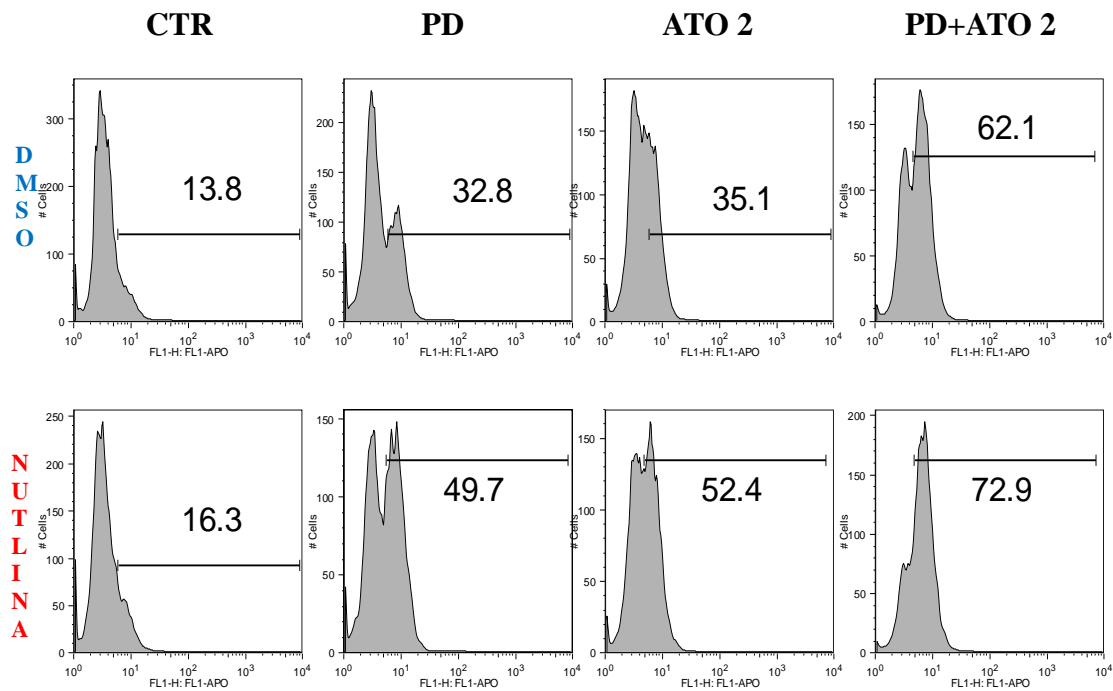


Figura 16: La Nutlin-3 potenzia la perdita del potenziale di membrana mitocondriale indotto dal PD+ATO su blasti primari AML.

Cellule AML provenienti dai pazienti #6 e #1 sono state seminate alla concentrazione di 2.5×10^5 /ml, sono state trattate con PD (1microM) e/o ATO (2 microM) in presenza ed assenza di Nutlin-3 (1microM) per 24 ore, successivamente è stata comparata la perdita del potenziale di membrana mitocondriale tra le cellule trattate con ATO e PD+ATO in presenza o assenza di Nutlin-3 (1microM) utilizzando il saggio MitoLight che mostra lo spostamento dello spettro da verde a rosso in proporzione alla perdita del potenziale di membrana mitocondriale.

4. DISCUSSIONE

Nella maggior parte dei casi di AML si è osservato che la via Raf/MEK/ERK è costitutivamente attiva. Recenti studi hanno dimostrato che questa via può agire influenzando negativamente la stabilizzazione, localizzazione ed attività delle proteine della famiglia p53. Infatti il blocco di questa via attraverso l'utilizzo di specifici inibitori di MEK1 (PD184352, PD98059, PD325901) promuove una stabilizzazione delle funzioni pro-apoptotiche delle proteine p53 e p73^{20,34,40,41}.

Nello specifico è stato osservato che questi inibitori non solo inducono una degradazione della proteina MDM2, ma bloccano anche l'accumulo di MDM2 indotto dalla Nutlin-3, favorendo così l'accumulo, la localizzazione e l'attivazione di p53 nel nucleo e l'up-regolazione dei geni target di p53⁴¹.

E' stato inoltre dimostrato che questi inibitori di MEK1 sono in grado di promuovere la trascrizione, accumulo e attivazione delle isoforme pro-apoptotiche di p73 e di degradare l'isoforma anti-apoptotica Δ Np73 che si comporta da dominante negativo di p53 e p73^{20,34}.

Anche l'arsenico triossido è in grado di promuovere l'accumulo e l'attivazione di p53 e p73 ed il trattamento combinato degli inibitori di MEK1 con l'ATO induce un potenziamento dell'attività di queste proteine. Infatti è stato dimostrato che il trattamento combinato induce una fosfo-acetilazione delle forme pro-apoptotiche di p73 che porta ad una selettività di questo fattore trascrizionale per il promotore del gene P53AIP1 e la sua conseguente trascrizione²⁰.

Inoltre è stato dimostrato che gli inibitori di MEK1 aumentano l'accumulo di p53 indotto dall'ATO in cellule di mieloma multiplo esprimenti una p53 wilde-type⁴⁰.

Poiché l'overespressione di MDM2, frequente nelle LAM (nel 50% dei casi), può compromettere l'accumulo di p53 indotto dall'arsenico triossido^{41,42,43} e/o un eventuale potenziamento indotto dagli inibitori di MEK1³⁴, in questo lavoro è stato valutato se la combinazione inibitore di MEK1 con arsenico triossido potesse essere rafforzata utilizzando un inibitore di MDM2 come la Nutlin-3.

I dati molto interessanti emersi in questo lavoro sono che in presenza di Nutlin-3 il trattamento combinato PD+ATO induceva un maggiore accumulo di p53 e questo accumulo correlava con una forte degradazione di MDM2 e Δ Np73, entrambi forti inibitori del pathway p53, infatti a conferma di questi dati è stato dimostrato che la Δ Np73 è in grado di contrastare l'apoptosi indotta dall'ATO nelle cellule leucemiche^{34,44}.

Questa forte down-regolazione della $\Delta Np73$ e l'up-regolazione di p53 si traduceva in un aumento dell'espressione di geni pro-apoptotici come Puma e P53AIP1 ed in un significativo aumento dell'apoptosi sia nelle linee cellulari di LAM sia nella maggior parte dei pazienti di leucemia acuta mieloide analizzati.

P53AIP1, è un gene target della p53 e TAp73 che si localizza nel mitocondrio e la sua espressione induce una massiva morte cellulare attraverso la perdita del potenziale di membrana mitocondriale, indice di un'attivazione della via apoptotica intrinseca³¹.

La resistenza all'ATO delle leucemie mieloide acute non promielocitiche è stata ampiamente dimostrata ed attribuita a diversi meccanismi molecolari, tra cui l'elevata espressione di glutatione⁴⁵, l'iperattivazione del pathway di Ras/Raf/MEK/ERK²¹, e l'espressione di $\Delta Np73$ ^{34,44}; e l'utilizzo di agenti che riducono l'attività di questi pathways, tra cui il Trolox⁴⁶, l'acido ascorbico^{45,47}, e gli inibitori di MEK1, si sono dimostrati essere efficaci nel potenziare l'effetto terapeutico dell'ATO nelle LAM non APL³⁴ ed in altre neoplasie ematologiche⁴⁰.

Poiché nelle LAM il pathway p53 risulta essere frequentemente inattivato più che da mutazioni che colpiscono la p53 (estremamente rare per questo tipo di neoplasia), da una iper-espressione del suo regolatore negativo MDM-2 abbiamo cercato di sfruttare le potenzialità di questo pathway sbloccando la p53 con un inibitore specifico di MDM2 (la Nutlin-3) nel contesto del trattamento combinato con gli inibitori di MEK e ATO. Dallo studio dei pazienti analizzati è stato osservato che la Nutlin-3 rafforzava l'effetto citotossico della combinazione PD+ATO e questo correla fortemente con i dati precedentemente descritti in letteratura che dimostrano una frequente overespressione di MDM2 nei campioni di LAM.

Abbiamo potuto dimostrare che l'attivazione di p53 mediata dalla Nutlin-3 incrementava significativamente l'effetto citotossico di PD+ATO e che p53 poteva cooperare con p73 nell'induzione di geni proapoptotici come Puma e P53AIP1.

Inoltre studi funzionali hanno evidenziato che sia p53 che p73 hanno un ruolo importante nell'apoptosi indotta dalla combinazione PD+ATO.

I potenti effetti anti-leucemici della combinazione NUT/PD/ATO osservati sia in linee cellulari che in blasti primari provenienti da pazienti affetti da LAM, da confermare in studi pre-clinici in vivo, forniscono il razionale per un'effettiva e specifica strategia terapeutica per la LAM.

5. RIASSUNTO

La Nutlin-3 potenzia l'effetto citotossico del trattamento combinato con gli inibitori di MEK1 e l'arsenico triossido in cellule di Leucemia Acuta.

Nelle cellule primarie di Leucemia Mieloide Acuta (AML), il pathway Ras/Raf/MAPK è spesso costitutivamente attivato, conferendo alle cellule vantaggi in termini di sopravvivenza e proliferazione; il blocco di MEK inibisce crescita e proliferazione cellulare e down-regola l'espressione di numerosi fattori anti-apoptotici, riducendo così la soglia apoptotica; tuttavia il blocco di MEK rende le cellule leucemiche sensibili, in maniera efficiente e selettiva, a dosi sub-ottimali di numerosi agenti anticancro, sia convenzionali che innovativi. Proprio in questo contesto è stato dimostrato che inibitori di MEK (PD184352, PD98059, PD325901) sensibilizzano blasti primari AML all'apoptosi indotta da Triossido di Arsenico (ATO) via p73, paralogo di p53, e l'attivazione del pathway pro-apoptotico di Bad³⁴. Inoltre è stato anche dimostrato che alte dosi di ATO (2microM) inducono l'accumulo di p53, con un incremento di più del doppio rispetto al controllo, in 11 su 21 pazienti (52%), indicando un possibile contributo del pathway di p53 nell'induzione dell'apoptosi in seguito al trattamento combinato PD+ATO sui blasti³⁴.

Mutazioni di TP53 sono piuttosto rare in AML (5-10%) e MDM2 (murine double minute 2), il suo principale gene regolatore, è frequentemente stato trovato overespresso in AML, processo questo che può aumentare attivamente il potenziale tumorigenico e la resistenza all'apoptosi. Dato che, in cellule AML, gli inibitori di MEK possono aumentare la funzione proapoptotica nucleare di p53⁴¹ oltre a quella di p73, lo scopo di questo studio è stato quello di investigare se la Nutlin-3, una piccola molecola antagonista di MDM2, potente e selettiva, poteva potenziare l'effetto apoptotico degli inibitori di MEK in combinazione con ATO, nelle cellule AML che overesprimono MDM2 e con p53 wild type.

L'apoptosi è stata valutata tramite saggi di misurazione del contenuto di DNA Sub-G1, legame con annessina V e valutazione del potenziale mitocondriale transmembrana. Abbiamo prima analizzato le interazioni farmacologiche tra Nutlin-3, PD e ATO (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, or 10 micro M) usando una fixed-ratio (1:1:1 o 1:2:4) su cellule AML OCI-AML-3 e MOLM-13, entrambe con una p53 wild-type. Abbiamo osservato che la combinazione dei tre farmaci (NUT/PD/ATO) ha mostrato un più forte sinergismo citotossico rispetto alla combinazione PD/ATO indicando che l'inibizione dell'interazione tra p53 e MDM2, mediata dalla Nutlin-3, può influenzare positivamente l'effetto pro-apoptotico delle cellule trattate con PD e ATO: l'indice di combinazione medio (CI)

calcolati dall'ED50 (50% effective dose), ED75 e ED90, con NUT/PD/ATO rispetto a cellule trattate con PD/ATO è 0.36 ± 0.03 contro 0.72 ± 0.02 e 0.28 ± 0.11 contro 0.50 ± 0.15 rispettivamente per le OCI-AML-3 e per le MOLM-13.

Al fine di indagare gli effettori molecolari coinvolti nell'apoptosi indotta da Nultina/PD/ATO o da PD/ATO, abbiamo inizialmente studiato la cinetica di p53, p73 a 2, 12, 24, e 48 ore nelle cellule OCI-AML-3 e MOLM-13.

In assenza di Nutlin-3, ATO, anche ad alte dosi, non promuoveva un accumulo di p53 mentre modulava l'espressione genica di p73 attraverso l'induzione del isoforma pro-apoptotica e anti-proliferativa TAp73, e delle isoforma anti-apoptotica e pro-proliferativa Δ Np73, mantenendo in questo modo inalterato il rapporto TA/ Δ Np73. Al contrario, il trattamento con PD riduceva i livelli di Δ Np73 e fermava l'up-regolazione ATO mediata di Δ Np73 causando così un incremento del rapporto TA/ Δ Np73 nelle cellule sottoposte a doppio trattamento (PD/ATO). In particolare, in cellule AML trattate con PD/ATO, l'aggiunta di Nutlin-3 non solo aumenta i livelli della proteina p53 ma anche induceva una forte riduzione di Δ Np73, dominante negativo di p53 wild-type e TAp73, portando ad un aumento di espressione dei geni target di p73/p53 come P53AIP1 e Puma e la perdita del potenziale di membrana mitocondriale.

Infine, abbiamo dimostrato che la Nutlin-3 aumentava significativamente l'attività antileucemica del PD/ATO nella maggior parte dei blasti leucemici provenienti da 14 diversi casi di AML analizzati ex vivo.

Nel complesso questi risultati suggeriscono che il pathway pro-apoptotico p73, coinvolto nell'efficacia del trattamento PD/ATO, può essere potenziato dall'attivazione del pathway p53 in cellule AML che possiedono un pathway p53 funzionale e fornisce una spiegazione razionale per una effettiva e relativamente specifica strategia terapeutica per la AML.

ABSTRACT

Mdm2 Inhibitor Nutlin-3 enhances the cytotoxic synergism induced by the combination of MEK1 inhibitor and arsenic trioxide in AML cells.

In primary acute myelogenous leukemia (AML) cells, the growth-stimulating Ras/Raf/MAPK pathway is frequently constitutively activated conferring to leukemic cells a proliferative and survival advantages; MEK blockade inhibits cell growth and proliferation and downregulates the expression of several anti-apoptotic players, thereby lowering the apoptotic threshold; Nevertheless, MEK blockade efficiently and selectively sensitizes leukemic cells to sub-optimal doses of numerous conventional and investigational anticancer agents. In this context it has been reported that MEK inhibitors (PD184352, PD98059, PD325901) sensitize primary AML blasts to arsenic trioxide (ATO)-induced apoptosis via p73, a p53 paralogue, and Bad pro-apoptotic pathways activation³⁴. It also has been demonstrated that high doses of ATO (2microM) induced p53 accumulation (more than two-fold increase compared with control) in 11 out of 21 patients (52%), indicating a possible contribution of p53 pathway in apoptosis induction of dual treated blasts. TP53 mutations are quite rare in AML (5-10%) and MDM2 (murine double minute 2), its principal negative regulator, has been found to be frequently overexpressed in AML, a process that can actively enhance tumorigenic potential and resistance to apoptosis. Because, in AML cells, MEK inhibitors may enhance nuclear proapoptotic function of p53⁴¹ other than p73 pathway, the aim of this study was to investigate whether Nutlin-3, a potent and selective small-molecule MDM2 antagonist, can potentiate the apoptotic effect of mek inhibitors plus ATO combination in AML cells overexpressing MDM2 and wild type p53. Apoptosis was evaluated, by measurement of sub-G1 DNA content, annexin V binding and mitochondrial transmembrane potential assays. We first analyzed the pharmacologic interactions between Nutlin-3, PD and ATO (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, or 10 micro M) using a fixed-ratio (1:1:1 or 1:2:4) experimental design in OCI-AML-3 and MOLM-13 AML cell lines, both having wild-type p53. We found that the three-drugs combination (NUT/PD/ATO) showed cytotoxic synergism stronger than PD plus ATO combination indicating that the Nutlin-3-mediated inhibition of the p53-MDM2 interaction can positively influence the pro-apoptotic efficacy of dual-treated (PD plus ATO) cells: the averaged Combination Index (CI) values calculated from the ED50 (50% effective dose), ED75 and ED90, in Nutlin-3/PD/ATO versus PD/ATO treated cells were 0.36 ± 0.03 versus 0.72 ± 0.02 and 0.28 ± 0.11 versus 0.50 ± 0.15 in OCI-AML-3 and in MOLM-13 respectively.

In order to investigate the molecular effectors involved in Nutlin-3 -PD-ATO or PD-ATO-induced apoptosis we first studied the kinetics (2h, 12h, 24h and 48h) of p53, in OCI-AML-3 and MOLM-13. In the absence of Nutlin-3 ATO, even at high doses, did not promote a p53 accumulation whereas modulated the expression of the p73 gene by inducing the pro-apoptotic and anti-proliferative TAp73 and the antiapoptotic and proproliferative Δ Np73 isoforms, thereby failing to elevate the TA/ Δ Np73 ratio. Conversely, treatment with PD reduced the level of Δ Np73 and blunted the ATO-mediated up-regulation of Δ Np73 thus causing an increase in the TA/ Δ Np73 ratio of dual-treated cells (PD/ATO). Notably, in AML cells treated with PD/ATO, the addition of Nutlin-3 not only increased p53 protein levels but also induced a strong reduction of the Δ Np73, dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, leading to an enhanced expression of the p73/p53 target genes P53AIP1 and Puma, and loss of mitochondrial membrane potential.

Finally, we found that Nutlin-3 significantly increased the antileukemic activity of PD/ATO in the majority of the primary AML cell samples (n=14) ex vivo analyzed.

Altogether these findings suggest that the pro-apoptotic p73 pathway, involved in PD/ATO efficacy, can be potentiated by the rescue of p53 pathway, involved in PD/ATO efficacy, can be potentiated by the Nutlin-3 mediated rescue of p53 pathway in AML cells that possess a functional p53 pathway and provide a rationale for an effective and relatively specific therapeutic strategy for AML.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1 Petti MC. La leucemia Acuta: dalla Biologia alle terapie. Quaderni di Ematologia, 1996.
- 2 Tura S., Bacarani M. Corso di Malattie del Sangue e degli Organi Emopoietici. Società editrice Esculapio, 2003.
- 3 Löwenberg B., Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. The New England Journal of Medicine, 1999; 341 (14): 1051-1062.
- 4 Bennett JM, Catovsky DM, Daniel MT. Proposals for the classification of acute Leukemias. British Journal of Hematology, 1977; 33: 451-458.
- 5 Rowley JD. Chromosome changes in Acute Leukemia. British Journal of Hematology. 1980; 44: 339-346.
- 6 Rathnasabapathy R, Lancet JE. Management of Acute Myeloid Leukemia in the Elderly. Cancer Control, 2003; 10(6): 469-477.
- 7 Zwaan Ch M, and Kaspers G J L. Possibilities of tailored and targeted therapy in pediatric acute myeloid leukemia. British Journal of Hematology, 2004; 127: 264-279.
- 8 Ravandi F, Kantarjian H, Giles F, et al. New Agents in Acute Myeloid Leukemia and other Myeloid Disorders. Cancer, 2004; 100 (3): 441-454.
- 9 Leonidas CP. MapKinase signaling pathways and hematologic malignancies. Blood. 2003; 101: 4667-4679.
- 10 Milella M, Kornblau SM, Estrov Z, et al. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. J Clin Invest. 2001; 108: 851-859.
- 11 Lee JT Jr, McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. Leukemia. 2002; 16:486-507.

12 Towatari M, Iida H, Tanimoto M et al. Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukaemia cells. *Leukemia* 1997; 11: 479-484.

13 Kim SC, Hahn JS, Min YH, et al. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukaemia: combined role of activation of MEK, hiperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of phosphatase, PAC1. *Blood*. 1999; 93: 3893-3899.

14 Mohamad A, Hussein MD. Trials of Arsenic Trioxide in Multiple Myeloma. *Cancer Control*, 2003; 10(2): 370-374.

15 Zhu J, Chen Z, Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. How acute promyelocytic leukemia revived arsenic. *Nat Cancer Rev*. 2002; 2: 705-713.

16 Ravandi F. Arsenic Trioxide: expanding roles for an ancient drug?. *Leukemia*. 2004; 18: 1457-1459.

17 Tallman MS, Nabhan C, Feusner JH, Rowe JM. Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood*. 2002; 99: 759-767.

18 Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer S. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*. 1995; 80:285-291.

19 Otilie S, Diaz JL, Horne W, Chang J, Wang Y, Wilson G, Chang S, Weeks S, Fritz LC, Oltersdorf T. Dimerization properties of human BAD. *J Biol Chem*. 1997; 272:30866-30872.

20 Lunghi P, Costanzo A, Levrero M, Bonati A. Treatment with arsenic trioxide (ATO) and MEK1 inhibitor activates the p73-p53AIP1 apoptotic pathway in leukemia cells *Blood*. 2004; 104: 519-525.

-
- 21 Lunghi P, Tabilio A, Lo-Coco F, Pelicci PG, Bonati A. Arsenic trioxide (ATO) and MEK1 inhibition synergize to induce apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2005;19: 234-244.
- 22 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997; 90: 809-819.
- 23 Melino G, De Laurenzi V, K.H. Vousden. p73: friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*. 2002; 2: 605–615
- 24 Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet*. 2002. 18:90–95.
- 25 Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, et al. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*. 2000; 289: 304-306.
- 26 Grob TJ, Novak U, Maise C et al. Human Δ Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*. 2001; 8: 1213-1223.
- 27 Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, et al. Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res*. 2002; 62: 636-641.
- 28 Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, et al. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res*. 2002; 62: 3598-3502.
- 29 Lunghi P, Costanzo A, Mazzera L, Rizzoli V, Levrero M, Bonati A. The p53 family protein p73 provides new insights into cancer chemosensitivity and targeting. *Clin Cancer Res*. 2009; 1;15(21):6495-502.
- 30 Flores ER, Tsai KY, Crowley D, et al. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*. 2002; 416: 560-564.

31 Oda K, Arakawa H, Tanaka T et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*. 2000; 102: 849-862.

32 Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, et al. DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell*. 2002; 9: 175-186.

33 Lyubomir T. Vassilev. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Discovery Oncology*, Roche Research Center, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ 07110, USA.

34 Lunghi P, Costanzo A, Salvatore L, et al. MEK1 inhibition sensitizes primary acute myelogenous leukemia to arsenic trioxide-induced apoptosis. *Blood*. 2006; 107: 4549-4553.

35 Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med*. 1999; 5: 810–816.

36 Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 2000; 351: 95–105.

37 Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*. 2006; 439: 358-362.

38 Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, et al. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1341-1348.

39 Shao W, Fanelli M, Ferrara FF et al. Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR α protein in acute promyelocytic leukemia cells. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 124–133.

40 Lunghi P, Giuliani N, Mazzera L, Lombardi G, Ricca M, Corradi A, Cantoni AM, Salvatore L, Riccioni R, Costanzo A, Testa U, Levrero M, Rizzoli V, Bonati A. Targeting MEK/MAPK signal transduction module potentiates ATO-induced apoptosis in multiple myeloma cells through multiple signaling pathways. *Blood*. 2008; 112:2450-2462.

41 Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Ruvolo V, Andreeff M. Mitogen-activated protein kinase inhibition enhances nuclear proapoptotic function of p53 in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res.*2007; 67(7):3210-9.

42 Faderl S, Kantarjian HM, Estey E, et al. The prognostic significance of p16INK4a/p14ARF locus deletion and MDM-2 protein expression in adult acute myelogenous leukemia. *Cancer* 2000;89:1976–82.

43 Bueso-Ramos CE, Yang Y, deLeon E, McCown P, Stass SA, Albitar M. The human MDM-2 oncogene is overexpressed in leukemias. *Blood* 1993;82:2617–23.

44 Rizzo MG, Giombini E, Diverio D, et al. Analysis of p73 expression pattern in acute myeloid leukemias: lack of DeltaN-p73 expression is a frequent feature of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2004;18:1804-1809.

45 Chen SJ, Zhou GB, Zhang XW, Mao JH, de Thè H, Chen Z. From an old remedy to a magic bullet: molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of arsenic in fighting leukemia. *Blood*, 2011, 117(24):6425-37.

46 Diaz Z, Colombo M, Mann KK, et al. Trolox selectively enhances arsenic-mediated oxidative stress and apoptosis in APL and other malignant cell lines. *Blood*. 2005;105:1237-1245.

47. Grad JM, Bahlis NJ, Reis I, Oshiro MM, Dalton WS, Boise LH. Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells *Blood*, 2001 ,98(3):805-13.

Ringraziamenti

Al termine di questi tre anni di dottorato desidero ringraziare tutte le persone che, a vario titolo, mi hanno accompagnato in questo percorso e senza le quali questo lavoro di tesi non si sarebbe potuto realizzare.

Ringrazio il Prof. Antonio Bonati per avermi concesso la possibilità di accedere ad un percorso formativo qualificante quanto stimolante e di crescita personale.

Ringrazio il Dott. Paolo Lunghi non solo per l'assistenza e la direzione nel lavoro, ma soprattutto per il sostegno personale, la fiducia nelle mie potenzialità e non per ultimo per avermi trasmesso parte della sua passione per la ricerca scientifica.

Ringrazio la Dott.ssa Laura Mazzera per essere stata una collega molto capace e disponibile dalla quale ho appreso l'importanza della devozione, della costanza e precisione nel lavoro di ricerca e nella quale ho sempre trovato un amichevole aiuto di fronte ad ogni difficoltà.