

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SALERNO



DIPARTIMENTO DI FARMACIA



DOTTORATO DI RICERCA INTERNAZIONALE IN
“FISIOPATOLOGIA, DIAGNOSTICA E TERAPIA MOLECOLARE
DELLE MALATTIE METABOLICHE”

Coordinatore: Prof. Maurizio Bifulco

XII cycle NS

2010–2013

**NUOVI APPROFONDIMENTI DEGLI EFFETTI BIOLOGICI DEL
DERIVATO ISOPRENOIDE N6-ISOPENTENILADENOSINA:
COINVOLGIMENTO DEL SENSORE METABOLICO AMPK
NELL'INIBIZIONE DELL'ANGIOGENESI**

Tutor

Prof. Patrizia Gazerro

Dottoranda

Paola Picardi

ABSTRACT

L'N6-isopenteniladenosina (iPA) è un'adenosina modificata caratterizzata da una catena isopentenilica derivante dal dimetilallil pirofosfato (DMAPP), un intermedio del pathway metabolico del mevalonato, noto per essere disregolato nel cancro.

L'iPA è un derivato isoprenoide endogeno presente nelle cellule di mammifero o in forma libera nel citoplasma come nucleoside, o legato al tRNA, e ha pleiotropici effetti biologici ben noti, inclusa un'attività diretta antitumorale contro diversi modelli tumorali. In ogni caso, il preciso meccanismo d'azione con il quale l'iPA esercita la sua azione anti-proliferativa sulle cellule neoplastiche rimane ancora da definire.

In questo lavoro, abbiamo valutato se l'iPA potesse direttamente interferire con il processo angiogenico, fondamentale alla crescita e alla progressione tumorale, e se l'iPA potesse interferire con la crescita e la proliferazione di cellule di melanoma umano, noto per il suo fenotipo altamente angiogenico. Infine, abbiamo analizzato se l'iPA potesse avere effetti immunomodulatori direttamente sulle cellule natural killer umane (NK), componenti dell'immunità innata che partecipano alla risposta immunitaria contro le neoplasie, allo scopo di ottenere un'azione cooperativa e multifattoriale dell'iPA nell'arrestare la crescita tumorale.

Per valutare il potenziale coinvolgimento dell'iPA nel processo angiogenico, abbiamo usato le cellule endoteliali estratte da cordone ombelicale (HUVEC) come modello di angiogenesi *in vitro*, valutando vitalità, proliferazione, migrazione, invasione, formazione dei capillari e i meccanismi molecolari coinvolti.

I dati *in vitro* sono stati corroborati *in vivo* mediante il saggio del matrigel plug. L'iPA è in grado di inibire in modo tempo e dose-dipendente tutte le fasi del processo di neoangiogenesi, con una $IC_{50}=0.98 \mu M$. Abbiamo dimostrato per la prima volta che l'iPA viene monofosforilato in iPA 5'-monofosfato (iPAMP) dall'enzima adenosina chinasi (ADK) all'interno delle cellule. L'iPAMP rappresenta, quindi, la forma attiva dell'iPA in grado di inibire l'angiogenesi attraverso l'attivazione diretta della chinasi di AMP (AMPK). Infatti, tutti gli effetti sono completamente revertiti dal pre-trattamento con la 5-iodotubercidina (5-Itu), inibitore dell'adenosina chinasi. L'intermedio isoprenoide isopentenil pirofosfato (IPP), che condivide il motivo isoprenoide con l'iPA, non ha effetti nell'inibizione dell'angiogenesi, mostrando in tal modo che è la struttura dell'iPA nel suo insieme responsabile degli effetti osservati.

L'iPA può essere dunque considerato un attivatore di AMPK e potrebbe essere un utile strumento farmacologico per il trattamento di patologie caratterizzate da eccessiva angiogenesi.

L'attivazione di AMPK sembra essere il meccanismo responsabile anche degli effetti anti-cancro

nelle cellule di melanoma umano, le cellule A375.

Infatti, allo scopo di valutare se l'iPA potesse essere un'utile molecola capace di inibire l'angiogenesi tumorale, abbiamo testato la capacità dell'iPA di arrestare la proliferazione e la crescita del melanoma *in vitro*, un modello tumorale noto per il suo fenotipo altamente angiogenico. In particolare, abbiamo messo a punto co-culture di HUVEC e A375, e successivamente abbiamo analizzato la vitalità delle cellule di melanoma per chiarire il destino delle cellule tumorali trattate con l'iPA.

Oltretutto, è stato analizzato il meccanismo molecolare esercitato dall'iPA. Parallelamente a quanto succede nelle cellule endoteliali, l'iPA (da 2.5 a 10 μM) è capace di inibire la crescita cellulare, inducendo autofagia e successivamente apoptosi, mediante l'attivazione di AMPK, che agisce come AMP-simile.

Nell'ultima parte di questo lavoro, abbiamo analizzato poi il possibile ruolo dell'iPA nell'immunoregolazione. In analogia ad IPP, che agisce come fosfoantigene sulle cellule T V γ 9V δ 2 umane, riportiamo per la prima volta la capacità dell'iPA di espandere selettivamente e direttamente le cellule umane NK. È interessante notare che in concentrazioni inferiori ad 1 micromolare, l'iPA stimola le cellule NK inattive, agendo in sinergia con l'IL-2 per indurre una forte attivazione *ex vivo* con un aumento della secrezione di CCL5 e CCL3 e aumento della produzione di TNF- α e IFN- γ , rispetto al trattamento della sola citochina IL-2.

Inoltre, l'iPA è capace di attivare la proliferazione delle cellule NK, aumentando l'espressione di specifici recettori attivatori delle cellule NK, come CD69 e CD107a. L'attività citotossica delle cellule NK contro cellule tumorali è dipendente da una selettiva e potente attivazione del pathway delle MAPK a valle del recettore per l'IL-2. Gli effetti risultano almeno in parte derivanti dall'elegante modulazione dell'attività della farnesilpirofosfato sintetasi (FPPS), lo stesso enzima implicato nella stimolazione delle cellule T $\gamma\delta$ umane.

La modulazione di FPPS derivante dall'iPA può causare un aumento della prenilazione post-traduzionale essenziale all'attività biologica di proteine chiave nel signaling delle cellule NK e nelle funzioni effettrici, come Ras. Queste nuove proprietà dell'iPA forniscono nuove evidenze del ruolo immunoregulatorio degli intermedi del pathway del mevalonato e apre nuove prospettive terapeutiche per questa molecola immunomodulatoria.

Visti nell'insieme, questi risultati mettono in luce un meccanismo d'azione sinergico dell'iPA come agente antitumorale, interferendo con la neovascolarizzazione e quindi il rifornimento di ossigeno essenziale a nutrire le cellule tumorale, inducendo autofagia e apoptosi direttamente nelle cellule tumorali e stimolando l'azione citotossica del sistema immunitario contro le cellule neoplastiche.