



Unione Europea



*Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca*



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE E BIOMEDICHE

Dottorato di ricerca in
Biochimica e patologia dell'azione dei farmaci
IX ciclo
2011-2012

Tesi di dottorato in: Il sistema adenosinico: principali targets molecolari ad attività anti-tumorale

Dottorando	Giovanni Forte
Tutor	Ch.mo Prof. Aldo Pinto
Coordinatore	Ch.ma Prof. Antonietta Leone

L'Adenosina (Ado) è una molecola segnale di origine purinica che esplica le sue funzioni metaboliche mediante quattro recettori metabotropici (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3). L'Ado è un autacoide ad attività pleiotropica, che regola numerosi processi fisiopatologici, inclusi i processi a carattere infiammatorio/immunitario come il cancro (Ramkumar et al., 1993). L'Ado è prodotta da due enzimi, il CD39 e il CD73, la cui attività aumenta in condizioni ipossiche determinando un accumulo di Ado ad elevate concentrazioni, nel tessuto interessato dall'ipossia, come quello tumorale. In tali condizioni, l'Ado esercita complessivamente potenti effetti immuno-soppressivi, mediati dal recettore A_{2A} , che favoriscono la crescita tumorale. Tuttavia, in ragione della sua *signaling pathway* il recettore A_3 può presentare effetti opposti a quelli dell' A_{2A} . Studi clinici hanno evidenziato che il recettore A_3 dell'Ado, la cui espressione aumenta significativamente nei tessuti cancerosi rispetto a quelli "normali", potrebbe essere considerato un importante marker tumorale. Inoltre, agonisti selettivi del recettore A_3 dimostrano potenziali effetti antitumorali sia *in vitro* che *in vivo*.

Recenti studi hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di Ado generata dal CD73 nel tumore può rappresentare un'altra importante strategia terapeutica per limitare la crescita tumorale.

Alla luce di ciò, lo scopo del presente progetto di ricerca, è stato quello di studiare il ruolo di potenziali *targets* molecolari ad attività anti-tumorale del sistema adenosinico, individuati nelle vie di trasduzione del segnale come il recettore A_3 , o nei processi metabolici di sintesi e di degradazione dell'Ado, come il CD73. I risultati ottenuti durante i quattro anni di dottorato sono stati ripartiti, nei seguenti obiettivi:

1. nella prima parte del progetto è stata valutata l'attività anti-tumorale di un agonista selettivo del recettore A_3 , il 2-chloro- N^6 -(3-iodobenzyl)adenosine-5'- N -methylcarboxamide (CI-IB-MECA), in un modello *in vitro* di carcinoma tiroideo, utilizzando una linea cellulare di carcinoma papillare differenziato (NPA), in quanto, statisticamente, è la forma più comune di carcinoma della tiroide. Dai nostri esperimenti è emerso che il CI-IB-MECA è in grado di ridurre significativamente la proliferazione delle NPA attraverso un blocco del ciclo cellulare nelle fasi G_0/G_1 .

2. alla luce dei dati ottenuti *in vitro* dai precedenti esperimenti, è stato studiato l'effetto del CI-IB-MECA in associazione con il TRAIL, attualmente in *clinical trial* per il trattamento del carcinoma tiroideo, ampiamente studiato anche in ragione della sua elevata selettività farmacologica. Gli esperimenti sono stati effettuati su linee cellulari di carcinoma tiroideo follicolare (FRO) e anaplastico (ARO), considerati i due isotipi più aggressivi nell'uomo, che difatti, come già riportato in letteratura, evidenziano una diversa resistenza al trattamento con TRAIL. Sebbene il CI-IB-MECA non influenzi la proliferazione di nessuna delle due linee cellulari di carcinoma tiroideo, somministrato in associazione con TRAIL è in grado di incrementarne significativamente gli effetti apoptotici osservati nelle FRO rispetto alla somministrazione di solo TRAIL, attraverso un meccanismo NF- κ B-dipendente.

3. data la stretta correlazione tra infiammazione e tumore, nonché tra rilascio di Ado, espressione di A_3R e crescita tumorale, abbiamo valutato l'attività del CI-IB-MECA su diverse popolazioni cellulari della risposta immunitaria, tra cui macrofagi ($M\phi$), cellule dendritiche (DCs) e linfociti T, la cui presenza a livello della lesione tumorale aumenta significativamente dopo trattamento con CI-IB-MECA in animali impiantati con cellule di melanoma B16-F10, come dimostrato in uno studio parallelo al presente progetto. Da studi *in vitro* è emerso che il CI-IB-MECA è in grado di incrementare significativamente la produzione delle citochine pro-infiammatorie IL-12 e TNF- α da parte delle suddette popolazioni cellulari, attraverso un meccanismo d'azione dipendente dalla modulazione delle *signaling pathways* dell' cAMP, PI3K/Akt, PKC e NF- κ B.

4. Infine, l'obiettivo ultimo del presente progetto è stato quello di studiare un secondo target molecolare del sistema adenosinico, attualmente di grande interesse scientifico, il CD73, considerato l'enzima limitante la sintesi dell'Ado. A tal proposito lo studio è stato

Abstract

effettuato *in vivo* in un modello murino di melanoma B16F10, utilizzando un inibitore selettivo del CD73, l' α,β -metilene adenosine-5'-diphosphate (APCP). Nel nostro modello sperimentale, l'APCP riduce significativamente la crescita tumorale. L'attività anti-tumorale dell'APCP è associata a un significativo aumento della percentuale di linfociti T CD8⁺ e linfociti B CD19⁺ correlato ad un corrispettivo incremento del rilascio di IFN- γ e IgG2b. Inoltre gli effetti anti-tumoralis dell'APCP sono strettamente dipendenti dai livelli di IL-17 rilasciata nel microambiente tumorale. Nel presente progetto di Dottorato, è stato evidenziato il potenziale terapeutico ottenibile mediante la manipolazione del sistema adenosinergico il quale, alla luce dei risultati ottenuti, potrebbe rappresentare un efficace *tool*/ farmacologico per la terapia anti-neoplastica.

Abstract

Adenosine (Ado) is an endogenous and ubiquitous nucleoside, which synthesis is induced by the activation of two membrane surface ectonucleotidases, CD39 and CD73. Ado exerts many biological functions through the interaction with 4 distinct subtypes of G protein-coupled receptors named A1, A2A, A2B, and A3. Increasing evidence demonstrate that adenosine plays a crucial role in inflammation and tumorigenesis.

In this study, we observed that A3, highly expressed in cancerous tissues, has functional anti-tumor activity by inhibiting tumor cell proliferation and favoring the anti-tumor activity of some immune cells. Indeed, CI-IB-MECA (CIM), a selective A3 adenosine receptor agonist, inhibited proliferation of cancerous thyroid cells and facilitated TRAIL-induced cell death of follicular (FRO) and anaplastic (ARO) thyroid cancer cells. These data suggested a potential activity of CIM as anti-cancer agent. Indeed, in our group we demonstrated that CIM administration reduced tumour growth in a mouse model of melanoma. In support, we observed that macrophages were able to produce more TNF- α , cytotoxic cytokine, when stimulated with CIM and LPS. This effect was NF- κ B dependent and partly explain the anti-tumour activity of CIM in a mouse model of melanoma. Moreover, the stimulation of dendritic cells (DCs) with CIM similarly increased TNF- α levels, supporting the hypothesis that A3 stimulation changes immune cell phenotype to induce a cytotoxic immune response against cancer, as observed in vivo. To confirm the cytotoxic nature of CIM onto tumour cells we observed that CD8+ T cells, isolated from spleen of naïve C57Bl6j mice, were able to produce higher levels of TNF- α . The adoptive transfer of these CIM-stimulated CD8+ T cells facilitated tumor arrest in a mouse model of melanoma.

In the last year of my PhD, I focused on the metabolic activity of CD73, limiting enzyme for the extracellular Ado synthesis. The pharmacological inhibition of CD73, significantly inhibited tumor growth in melanoma-bearing mice. This phenomenon was accompanied by higher recruitment of B, CD4+ Th17-producing and CD8+ T cells into the tumor lesion,. In conclusion, this project highlighted the relevance of two potential molecular targets, A3 and CD73, as good candidates for cancer therapy.