

Università degli Studi di Napoli Federico II

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**



**Dottorato di Ricerca**

in

**FISIOPATOLOGIA CLINICA  
E MEDICINA SPERIMENTALE**

XXVII Ciclo

Indirizzo: SCIENZE CADIOVASCOLARI

**SM13 REGOLA L'INTERAZIONE MDM2 – P53:  
EFFETTI SUL CANCRO  
E SUL DANNO VASCOLARE**

Relatore

Ch.mo Prof.

Bruno Trimarco

Candidato

Dr. Carmine Del Giudice

*ai miei genitori*

---

*per un uomo dotato di logica, tutte le cose andrebbero viste esattamente come sono,  
e sottovalutare se stessi significa allontanarsi dalla verità  
almeno quanto sopravvalutare le proprie doti.  
(Arthur Conan Doyle – Sherlock Holmes)*

La presente tesi è stata svolta presso i Laboratori di Ricerca

di CARDIOLOGIA del **Prof. Bruno Trimarco**

**D**ipartimento **S**cienze **B**iomediche **A**vanzate

Ed. 2 – PT AOU “Policlinico Federico II”

**U**niversità degli **S**tudi di **N**apoli

I risultati in essa contenuti sono stati pubblicati sulla rivista

British Journal of Cancer (2015) 112, 77–85. doi:10.1038/bjc.2014.577

[www.bjcancer.com](http://www.bjcancer.com)

New small molecules, ISA27 and SM13, inhibit tumour growth inducing mitochondrial effects of p53

D Sorriento, C Del Giudice, A Bertamino, M Ciccarelli, I Gomez-Monterrey, P Campiglia, E Novellino, M Illario, B Trimarco, N De Luca and G Iaccarino.

# INDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>I - INTRODUZIONE .....</b>	<b>2</b>
I - 1. La proteina p53: relazioni struttura - funzioni.....	2
I - 2. Le funzioni di p53 in risposta a stress.....	3
I - 3. p53 e le patologie correlate in campo oncologico e cardiovascolare .....	4
I - 4. MDM2 e p53 .....	5
<b>II - SCOPO DELLO STUDIO.....</b>	<b>7</b>
<b>III - MATERIALI E METODI .....</b>	<b>8</b>
A - Studi in vitro .....	8
III – 1A. Colture cellulari .....	8
III – 2A. Composti .....	8
III – 3A. Immunoprecipitazione e Western Blot .....	8
III – 4A. La proliferazione cellulare ed il test della sintesi del DNA .....	9
III - 5A. Tunel Assay .....	9
B - Studi in vivo .....	9
III - 1B. Modello animale.....	9
C - Studi in ex vivo .....	10
III – 1C. Real-Time PCR.....	10
III – 2C. Istologia ed Immunocitochimica .....	11
D - Analisi Statistica .....	11
<b>IV – RISULTATI.....</b>	<b>12</b>
IV – 1. Effetti di ISA 27 in differenti linee cellulari tumorali.....	12
IV – 2. Effetti di ISA 27 sulla proliferazione in vivo delle cellule KAT-4.....	13
IV – 3. Effetti di SM13 sulla proliferazione cellulare in vitro delle KAT-4.....	13
IV – 4. Effetti di SM13 sulla crescita delle cellule KAT-4 in vivo .....	15
IV – 5. Valutazione degli effetti collaterali del trattamento con ISA27 e con SM13.	16
IV – 6. Valutazione degli effetti del trattamento con SM13 nella proliferazione delle cellule VSMC .....	17
<b>V – DISCUSSIONE.....</b>	<b>18</b>
<b>VI - CONCLUSIONI .....</b>	<b>20</b>
<b>ABSTRACT IN ENGLISH.....</b>	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>A</b>

<b>ALLEGATI</b> .....	<b>I</b>
TABELLE .....	I
FIGURE & LEGENDE.....	III
FIG. 1 Effetti di ISA27 sulla crescita cellulare in vitro .....	III
FIG.2 Effetti di ISA27 sull'apoptosi p53 dipendente .....	III
FIG.3 Effetti di ISA27 sulla crescita tumorale in vivo .....	III
FIG.4 Analisi istologica dei tumori trattati con ISA27 .....	IV
FIG.5 Effetti di SM13 sull'apoptosi p53 dipendente.....	IV
FIG.6 Effetti di SM13 sulla crescita di cellule tumorali in vitro.....	V
FIG.7 Effetti di SM13 sulla crescita tumorale in vivo.....	V
FIG.8 Analisi istologica dei tumori trattati con SM13.....	VI
FIG.9 Real-time PCR, analisi dell'infiammazione e dell'angiogenesi nei tumori trattati .....	VI
FIG.10 Valutazione della tossicità del composto in vivo.....	VI
FIG.11 Effetti di SM13 sulla crescita di cellule muscolari lisce vascolari .....	VII
FIG.12 Effetti di SM13 sull'apoptosi p53 dipendente in VSMC .....	VII
<b>PUBBLICAZIONI DEL CANDIDATO (2012-2015)</b> .....	<b>a</b>
<b>PARTECIPAZIONE A CONGRESSI SCIENTIFICI (2012-2015)</b> .....	<b>c</b>

# ABSTRACT

**Background:** p53 è un noto soppressore tumorale che agisce regolando l'apoptosi in risposta al danno cellulare, regolando diversi meccanismi all'interno della cellula, come l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi mitocondriale indipendentemente dalla sua attività trascrizionale. Recentemente sono stati sintetizzati due nuovi composti (ISA27 e SM13), che bloccano l'interazione MDM2-p53 e sono in grado di indurre apoptosi in cellule tumorali p53 *wild-type* (wt). Inoltre è noto che p53 è attivo nelle lesioni iperplastiche vascolari, nelle quali induce l'apoptosi delle cellule muscolari lisce (VSMC). Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare l'efficacia di questi composti in tumori generati da una forma mutata del gene p53 senza attività trascrizionale (p53mt), e se p53 possa essere un *target* terapeutico per il trattamento di malattie vascolari, alla base delle quali vi è una iperproliferazione delle cellule vascolari lisce.

**Metodi:** *in vitro* è stata valutata l'efficacia dei peptidi in linee cellulari tumorali con il gene p53wt, p53 mutato (p53mt) e p53 knock out (p53ko), e nella linea cellulare VSMC. Lo studio *in vivo* è stato eseguito in topi nudi Balb/c.

**Risultati:** Sia ISA27 che SM13 riducono la proliferazione cellulare ed inducono apoptosi *in vitro* in cellule p53wt e p53mt, suggerendo che il meccanismo d'azione è p53 dipendente, non avendo alcun effetto nella linea tumorale p53ko, ma è indipendente dall'attività trascrizionale di p53. In vivo, ISA27 e SM13 inducono morte cellulare in maniera dose dipendente attraverso l'attivazione della via apoptotica mitocondriale. In particolare SM13 è più efficace di ISA27 nel ridurre la crescita del tumore. Nelle VSMC, il trattamento con SM13 è risultato efficace nel ridurre l'interazione p53/MDM2 ed aumentare i livelli di p53. Inoltre, in queste cellule SM13 inibisce la proliferazione cellulare e la sintesi del DNA ed è in grado *in vitro*, di indurre apoptosi p53 – dipendente.

**Conclusione:** Il nostro studio propone SM13 come composto anti-tumorale da utilizzare per il trattamento di tumori p53 dipendenti, anche in assenza di attività trascrizionale p53, e dimostra l'efficacia di SM13 nel ridurre la proliferazione delle VSMC, attraverso l'attivazione di un *pathway* apoptotico p53-dipendente, suggerendo il suo impiego in malattie vascolari iperproliferative, quali aterosclerosi e restenosi.

# I - INTRODUZIONE

La capacità di p53 di rispondere ai segnali di *stress* innescando fenomeni di arresto del ciclo cellulare e la morte cellulare per apoptosi è essenziale per inibire lo sviluppo di alcune patologie alla base delle quali ci sono fenomeni di iperproliferazione cellulare, quali il tumore e la formazione di stenosi vascolare dovute ad iperplasia della tonaca (Vogelstein, et al Nature 2000; Vousden, et al Nat. Rev. Cancer 2002; Levine, A. J. et al Cell 1997).

Il gene p53 e il suo prodotto proteico sono diventati il centro di intenso studio da quando è diventato chiaro che poco più del 50% dei tumori umani contengono mutazioni in questo gene.

## I - 1. La proteina p53: relazioni struttura - funzioni

p53 è un fattore di trascrizione che aumenta il tasso di trascrizione di sei o sette geni noti che svolgono, almeno in parte, le funzioni p53-dipendente nelle cellule (Tabella 1). La proteina p53 contiene 393 aminoacidi ed è stato suddiviso strutturalmente e funzionalmente in tre domini. I primi 42 aminoacidi all'estremità N-terminale costituiscono un dominio di attivazione trascrizionale che interagisce nella regolazione dell'espressione genica positivamente. La sequenza di p53 che lega il DNA (*DNA-binding protein-specific sequence*) è localizzata tra i residui amminoacidici 102 e 292. E' un dominio resistente alle proteasi e contiene uno ione  $Zn^{2+}$  che è necessario per la sua attività di legame al DNA. Questo dominio strutturato in un foglietto  $\beta$  antiparallelo che a sua volta si struttura in due  $\alpha$ -elica che interagiscono direttamente con il DNA (Cho et al. 1994). Il dominio C-terminale, costituito da 26 aminoacidi, lega il DNA e l'RNA (Lee et al. 1995). La delezione di questo dominio, la fosforilazione del residuo S378 ad opera della *protein kinase C*, la fosforilazione del residuo S392 ad opera della *Casein kinase II* o ancora il legame con l'anticorpo PAb421 (ai residui 370–378) attivano il sito di legame al DNA, del dominio centrale (residui 102–292) di p53 (Hupp and Lane 1994).

Recentemente, il dominio N-terminale di MDM2 è stato co-cristallizzato con un peptide contenente residui amminoacidi 13-29 di p53, per valutare l'interazione di MDM2 con p53.

Il dominio MDM2 forma una tasca idrofoba profonda, ed il peptide 13-29 di p53 forma un'elica anfipatica con la sua superficie idrofoba. Gli aminoacidi F19, W23, e L26 di p53 stabilizzano l'interazione con MDM2 (Kussie et al. 1996).

Gli aminoacidi 13-23 della proteina p53 sono identici in un numero di specie diverse. Gli aminoacidi F19, L22, W23 di p53 sono risultati essenziali per l'attivazione trascrizionale dalla proteina *in vivo* (Lin et al. 1995). L'attività trascrizionale di p53 è regolata negativamente invece dall'adenovirus E1B-55Kd e dalla proteina MDM2 umana. In entrambi i casi, i residui aminoacidici L22 e W23 svolgono un ruolo fondamentale nel legame di p53 ad E1B-55Kd e ad MDM2 (Lin et al. 1995). Pertanto, inibitori della trascrizione p53-mediata hanno come bersaglio questi stessi aminoacidi.

La proteina p53 è tetramerica (è un dimero di un dimero) e si lega a quattro ripetizioni di una sequenza consenso DNA 5'-PuPuPuC (A/T) -3', e questa sequenza viene ripetuta in due coppie, ciascuna disposta come ripetizioni invertite. Più del 90% delle mutazioni *missense* nel gene di p53 risiedono in questo dominio di legame al DNA, e queste mutazioni si dividono in due gruppi. Un primo gruppo di mutazioni in residui di aminoacidi quali R248 e R273, che impediscono il legame di p53 al DNA e comportano quindi la perdita della capacità di p53 di agire come fattore di trascrizione. Un secondo gruppo di mutazioni altera la struttura del foglio  $\beta$  ed il motivo *helix loop* di p53., inducendo il legame della proteina con l'anticorpo monoclonale PAb240 per essere eliminata. Più del 40% delle mutazioni *missense* sono localizzate nei residui di R175, G245, R248, R249, R273, R282 e causano alterazione dell'integrità strutturale del dominio di legame con il DNA (Jeffrey et al. 1995).

## **I - 2. Le funzioni di p53 in risposta a stress**

Un cambiamento allosterico consente il legame di p53 con una specifica sequenza di DNA che regola la trascrizione di diversi geni, coinvolti nella regolazione dell'apoptosi e della proliferazione cellulare (p21, MDM2, GADD45, Bax, IGF-BP, e la ciclina G). possono essere attivate due *signaling* per l'apoptosi cellulare: una che richiede la trascrizione di geni apoptotici e quindi attività nucleare; ed un *pathway* trascrizione indipendente. A conferma di questo meccanismo di induzione dell'apoptosi da parte di p53 in maniera indipendente dalla trascrizione, è stato dimostrato che l'overespressione di un mutante di p53, che non è in grado di legare il DNA e quindi

completamente carente della funzione di transattivazione, può efficacemente indurre l'apoptosi nelle cellule umane (Haupt et al, 1997; Kakudo et al, 2005). Nel secondo caso p53 si sposta rapidamente ai mitocondri dove induce la permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale (MOMP), innescando in tal modo il rilascio di fattori proapoptotici dallo spazio intermembrana mitocondriale (Kroemer et al, 2007).

### **I - 3. p53 e le patologie correlate in campo oncologico e cardiovascolare**

p53 è un noto soppressore tumorale che agisce regolando eventi apoptotici in risposta al danno cellulare nelle cellule tumorali. Il gene p53 è il gene più frequentemente alterato in tumori umani, infatti circa il 50% dei tumori maligni porta una mutazione nel gene di p53. Nella trasformazione neoplastica il gene di p53 può andare incontro ad un duplice destino: subire la delezione dei suoi due alleli con impossibilità della sintesi del prodotto da esso codificato che di conseguenza risulta mancante nella popolazione cellulare del tumore, in questo caso si comporta da gene oncosoppressore recessivo; andare incontro a mutazione in un solo allele e codificare con la copia indenne per una p53 non mutata e con la copia mutata per una p53 abnorme che, entrando a far parte del tetramero insieme a molecole di p53 *wild type*, induce l'incapacità funzionale di quest'ultimo. In tal caso p53 si comporta da dominante. Inoltre recenti studi indicano che p53 possa essere coinvolta nella patogenesi cardiovascolare, tuttavia, il ruolo di p53 nella patologia aterosclerotica non è ancora chiaro. L'aterosclerosi è la causa principale di malattie cardiovascolari, tra cui infarto acuto del miocardico ed *ictus* acuto. In particolare, nella placca aterosclerotica, p53 viene attivato da un danno del DNA all'interno della lesione e induce apoptosi delle Cellule Muscolari Lisce Vascolari (VSMC), che sono coinvolte nella progressione della lesione. In modelli murini dislipidemici, con overespressione di p53 aumenta la rottura della placca aterosclerotica (von der Thüsen JH, et al 2002). Inoltre MDM2 è overespresso nei tessuti aterosclerotici umani (Ihling C, et al 1998) e nelle cellule VSMC di pazienti con iperaldosteronismo primario (Nakamura Y, et al 2006), ciò ad indicare che MDM2 partecipa al rimodellamento patologico vascolare. Questo ha portato a studiare gli effetti di Nutlin-3 anche sul processo di rimodellamento vascolare, compresa la proliferazione delle VSMC. Nutlin-3 inibisce la produzione del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) ed indotto dalla proliferazione delle

VSMC, ed attenua l'iperplasia neointimale dopo la lesione arteriosa nei topi (Toru Hashimoto, et al Cardiovascular Research 2011).

#### I - 4. MDM2 e p53

p53 lega MDM2, un ubiquitina ligasi che provoca l' inattivazione, l'esportazione nucleare, e la degradazione di p53 (Geyer et al, 2000; Haupt et al, 1997; Momand et al, 1992). A sua volta, p53 aumenta l'espressione di MDM2 anche se i livelli di MDM2 possono essere regolati anche tramite un *pathway* da p53 indipendente (Phelps et al, 2003). Pertanto, l'induzione di MDM2 è il principale circuito di *feedback* negativo volto a bloccare la funzione proapoptotica di p53, consentendo così la sopravvivenza delle cellule (Malaguarnera et al, 2007). Poiché la maggior parte dei tumori umani sono p53 dipendente; a causa di mutazioni inattivanti il gene p53, overespressione dei suoi inibitori, riduzione dei suoi attivatori, e inattivazione dei suoi bersagli a valle (Green & Kroemer, 2009), la possibilità di bloccare l'interazione MDM2-p53 per aumentare l'attività proapoptotica di p53 è diventato un obiettivo principale per la terapia di patologie iperproliferative quali il cancro (Brown et al, 2009). La regione di interazione MDM2-p53 è stata oggetto di interesse per progettare *small molecule* in grado di imitare i contatti e gli orientamenti di amminoacidi essenziali, così da interrompere l'interazione MDM2-p53. Le prima molecole, potenti e selettive, identificate come antagoniste del legame MDM2-p53, sia *in vitro* che *in vivo*, sono state le *cis-imidazolidines nutlins*. Queste molecole inibiscono la crescita del tumore in modelli murini senza effetti collaterali. In particolare Nutlin-3, è entrata in studi clinici di fase precoce per il cancro (Shangary & Wang, 2009). In collaborazione con l'Università degli Studi di Salerno, sono stati recentemente sintetizzati due nuovi *compounds* basati sullo spiro-oxindole *core* che mima l'azione della Nutlina ed interferiscono con il legame MDM2-p53:

1. (3R,7aR)-6-(4-chlorobenzyl)-1H-spiro[imidazo[1,5-c]thiazole-3,3'-indoline]-2',5,7(6H,7aH)-trione (denominato ISA27 - Gomez-Monterrey et al, 2010);
2. 5-bromo-3'-(cyclohexane-carbonyl)-1-methyl-2-oxospiro[indoline-3,2'-thiazolidine] (denominato SM13 Bertamino et al, 2013).

Questi composti sono in grado di indurre l'apoptosi di linee cellulari tumorali umane sia *in vitro* che *in vivo* (Bertamino et al, 2013; Costa et al, 2013; Gomez-Monterrey et al, 2010). SM13, in particolare, è un composto promettente, che ha dimostrato di essere più efficace di Nutlin a dosi inferiori in diverse linee cellulari tumorali (Bertamino et al, 2013). E' stato dimostrato che SM13 inibisce la degradazione di p53 indotta da MDM2 ed è in grado di attivare eventi apoptotici *in vitro* in cellule tumorali umane che hanno un gene p53 *wild type* (Bertamino et al, 2013). Finora, la sua efficacia non è mai stata testata *in vivo*. Inoltre, l'efficacia di questi composti non è mai stata testata in tumori recanti una variante di p53 priva di attività trascrizionale.

## **II - SCOPO DELLO STUDIO**

Il presente studio è stato quindi intrapreso per verificare se SM13 e ISA27 conservano la loro efficacia e possano trovare applicazioni terapeutiche sia in campo oncologico in cellule tumorali con p53 mutato, che in campo cardiovascolare, inibendo la proliferazione delle Cellule Muscolari Vascolari Lisce (VSMC).

## **III - MATERIALI E METODI**

### **A - Studi in vitro**

#### **III – 1A. Colture cellulari**

Sono state utilizzate diverse linee cellulari:

1. le cellule MCF7 derivanti da adenocarcinoma mammario e che esprimono una variante *wild type* di p53;
2. le cellule KAT-4 derivanti dal carcinoma anaplastico della tiroide, che portano una variante p53 mutato (p53mt) nel codone 273 (CGT → CAT; Arg → His);
3. le cellule BHT-101 derivanti dal carcinoma tiroideo, che esprimono una mutazione p53 nel codone 251 (p53mt) (ATC → ACC; Ile → Thr);
4. le cellule tumorali FRO che non esprimono il gene p53 (p53null).
5. Le cellule muscolari vascolari lisce (VSMC)

Tutte le linee cellulari sono state coltivate in terreno minimo essenziale di Dulbecco (DMEM) supplementato con il 10% di siero bovino fetale (FBS), ad una temperatura di 37°C, in un sistema di incubazione al 95% di ossigeno ed al 5% di anidride carbonica.

#### **III – 2A. Composti**

I composti liofilizzati di ISA27 e di SM13 sono stati sciolti in dimetilsolfossido (DMSO) assoluto. Le iniezioni intraperitoneale e intratumorale di DMSO assoluto sono state utilizzate per il trattamento di topi di controllo.

#### **III – 3A. Immunoprecipitazione e Western Blot**

I protocolli di Immunoprecipitazione e di *Western Blot* (WB) sono stati eseguiti come descritto in precedenza secondo le tecniche del laboratorio (Iaccarino et al, 2006; Sorriento et al, 2008, 2009). Descrivendo in breve, le cellule e/o i tessuti sono stati lisate in RIPA – SDS buffer (50mM Tris – HCL pH 7.5, 150mM NaCL, 1% NP-40, 0.25% deossicolato, 9.4mg/50ml di sodio ortovanadato, 20% di sodio dodecil solfato) o in *lysis*

*buffer* (75mM Tris – HCL pH 7.5; 12.5mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM EDTA). Le proteine di membrana sono state separate dal citosol come precedentemente descritto. Le proteine sono state separate mediante elettroforesi su SDS/PAGE e trasferite su nitrocellulosa. Sono stati utilizzati anticorpi anti-p53, anti-MDM2, anti-Bax, anti-Citocromo C, anti-Caspase 9 ed actina della Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Germania); ed anticorpi anti-Caspasi 3 Clivata della Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

### **III – 4A. La proliferazione cellulare ed il test della sintesi del DNA**

I saggi di proliferazione cellulare e di sintesi del DNA sono stati eseguiti come precedentemente descritto (Santulli et al, 2011).

### **III - 5A. Tunel Assay**

L'apoptosi è stata valutata nelle cellule KAT-4 dopo trattamento con SM13, utilizzando il *DeadEnd Colorimetric Tunel System* della Promega (Madison, WI, USA), seguendo le istruzioni del produttore. I risultati sono espressi come media ± deviazione standard (d.s.) dei nuclei apoptotici.

## **B - Studi in vivo**

Tutte le procedure *in vivo* sono state approvate dal Comitato Etico locale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", ed in conformità con le *NIH guidelines for Animal Investigation*.

### **III - 1B. Modello animale**

Sono stati utilizzati topi nudi BALB/c *nude* di 6 settimane della Charles River Italia (Calco, Italia), che hanno avuto accesso a cibo ed acqua *ad libitum*. Per la formazione del tumore è stata iniettata per via sottocutanea, una sospensione contenente 2×10<sup>6</sup> cellule della linea KAT-4 in 200µl di DMEM, nella parte dorsale dei topi, come precedentemente descritto (Sorriento et al, 2009).

Gli animali sono stati anestetizzati con una miscela di Isoflurano al 2% ed il restante ossigeno.

Dopo 2 settimane dall'inoculo, sono stati arruolati come abili agli esperimenti, animali che hanno sviluppato tumori di circa 6 mm di diametro. I topi sono stati divisi in quattro gruppi (n=5 per ogni gruppo).

Il trattamento è stato somministrato due volte alla settimana e per due settimane con iniezioni intratumorale o iniezioni intraperitoneale (IP) del trattamento specifico (ISA27 e SM13). In particolare, due gruppi hanno ricevuto l'iniezione intratumorale di ISA27 o di SM13 sia ad un basso dosaggio (*low*: 1 mg/kg<sup>-1</sup>) che ad un dosaggio elevato (*high*: 3 mg/kg<sup>-1</sup>); un altro gruppo ha ricevuto un trattamento IP di 5 mg/kg<sup>-1</sup> dei composti; ed il gruppo di controllo ha ricevuto un'iniezione intratumorale o IP di DMSO assoluto. L'IP di DMSO non ha modificato la crescita tumorale rispetto all'iniezione intratumorale, quindi nei risultati sono riportate le figure delle iniezioni intratumorale di DMSO come controllo dei tumori trattati. La crescita tumorale è stata misurata con apposito calibro due volte a settimana ed espresse come volumi tumorali in mm<sup>3</sup> secondo la formula:  $Volume=(width)^2 \times length/2$ .

Al termine del trattamento, i topi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale, ed i tumori sono stati espianati per analisi biochimiche ed istologiche.

## **C - Studi in ex vivo**

### **III – 1C. Real-Time PCR**

L'RNA è stato isolato dai tumori espianati utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) ed il cDNA è stato sintetizzato utilizzando la *Thermo-Script real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) System* (Invitrogen, Life Technologies), seguendo le istruzioni del produttore.

Dopo la reazione di trascrittasi inversa, la RT-PCR quantitativa è stata effettuata con il *kit master mix SYBR Green RT-PCR* (Applied Biosystems, Life Technologies), come descritto in precedenza (Ciccarelli et al, 2011). I *primers* per l'analisi dei geni delle citochine sono riportati nella tabella II.

Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati ai valori ottenuti con i *primers* 18S. I risultati sono espressi come intensità integrata relativa.

### III – 2C. Istologia ed Immunocitochimica

Sezioni di tumore sono state incluse in paraffina e tagliati al microtomo (5 $\mu$ m) e processate secondo la metodica *triple-layered immunocytochemical peroxidase antiperoxidase method* (Sorriento et al, 2012). Sono stati utilizzati anticorpi anti-PCNA (Sigma Aldrich, Milano, Italia) e anti-Caspasi 3 Clivata (Abcam, Cambridge, UK) per analizzare rispettivamente la proliferazione e la morte cellulare. La perossidasi è stata rivelata in presenza di 0,03% di perossido di idrogeno e di un donatore di elettroni, 2,5% di diaminobenzidina, che diventa visibile come un precipitato marrone. Per i controlli negativi, l'anticorpo primario è stato omesso. Le sezioni sono state quindi visualizzate con un microscopio Eclipse E1000 a fluorescenza (Nikon, Milano, Italia) ed acquisite con il *software* Pro Sigma Scan (Jandel), come descritto in precedenza (Cittadini et al, 2009). Per i *test* di tossicità, è stata eseguita una colorazione tricromica Masson, in sezioni di paraffina del fegato, e del rene di topi trattati con IP di ISA27 o di SM13 e di topi di controllo, come precedentemente descritto (Santulli et al, 2012).

### D - Analisi Statistica

I dati relativi alle caratteristiche quantitative sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard (e.s.). I dati relativi invece alle variabili qualitative sono stati espressi come valori percentuali o assoluti. Le differenze statistiche sono state determinate mediante analisi della varianza (ANOVA) ad una o a due vie, seguite da un'analisi *post hoc* secondo Bonferroni quando applicabile. Un valore della p inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

I dati sono stati analizzati utilizzando i *software* Statistical Package for Social Sciences, versione 16.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## IV – RISULTATI

### IV – 1. Effetti di ISA 27 in differenti linee cellulari tumorali

E' stato valutato l'effetto di ISA 27 sui livelli di p53 e sull'attivazione di Caspasi 3 nelle cellule MCF7 (p53wt), e nelle linee cellulari BHT-101 e KAT-4 (p53mt). In tutte queste linee cellulari, il trattamento con ISA27, aumenta sia i livelli di p53 che i livelli di Caspasi 3 Clivata, (Figura 1A), suggerendo che ISA27 inibisca la degradazione di p53 MDM2-dipendente ed aumenti i fenomeni apoptotici in tutte le linee cellulari. ISA27 ha lo stesso effetto sia su p53wt, sia su p53mt. La mutazione di p53 risiede nel suo sito di legame con il DNA, sia nelle KAT-4, sia nelle BHT-101, e determina l'inibizione della sua attività trascrizionale (Blagosklonny et al, 1998), quindi gli effetti di ISA27, nel regolare l'apoptosi, sono indipendenti dall'attività trascrizionale di p53.

E' stato quindi continuato lo studio utilizzando le cellule KAT-4, che rappresentano un modello consolidato per gli studi sul cancro nel nostro laboratorio (Sorriento et al, 2009). In primo luogo è stata confermata l'efficacia di ISA27 per inibire il legame MDM2-p53 nelle cellule KAT-4, mediante saggio di Co-Immunoprecipitazione. La figura 2A mostra che il trattamento con ISA27 determina una riduzione del legame tra MDM2 e p53, con aumento dei livelli di p53 rispetto al campione di controllo. i livelli di espressione genica di p53, valutati mediante RT-PCR, sono rimasti invariati in cellule trattate con ISA27, rispetto ai controlli (Figura 2B), questo ha dimostrato che l'aumento dei livelli di p53 è dovuto alla inibizione della degradazione proteica di p53 piuttosto che all'induzione dell'espressione del gene p53. Per valutare l'effetto di ISA27 sulla proliferazione delle cellule tumorali, sono stati valutati *in vitro* gli indicatori di proliferazione cellulare come il numero di cellule e la sintesi del DNA. Il trattamento con ISA27 inibisce sia la proliferazione cellulare (Figura 1B), sia la sintesi del DNA (Figura 1C) in maniera dipendente dal tempo. Questi dati suggeriscono che ISA27 è in grado di indurre apoptosi p53-dipendente anche nelle cellule KAT-4 con un corredo genetico p53mt.

#### **IV – 2. Effetti di ISA 27 sulla proliferazione in vivo delle cellule KAT-4**

Per confermare i dati *in vitro*, è stato studiato l'effetto di ISA27 *in vivo*, in topi nudi BALB/c *nude*, nei quali sono state inoculate  $2 \times 10^6$  di cellule KAT-4 nella regione dorso-laterale, che ha determinato lo sviluppo di un tumore del diametro di circa 6 mm dopo 2 settimane, in circa il 70% dei topi. I tumori sono stati trattati con diverse dosi di ISA27 tramite IP o iniezione intratumorale, come descritto nella sezione materiali e metodi. L'effetto del trattamento con ISA27 sulla crescita tumorale sembra essere dose-dipendente. Infatti, l'iniezione intratumorale di dosi elevate ( $3 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) determina una regressione tumorale progressiva, mentre il trattamento a basse dosi ( $1 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) ed il trattamento IP ( $5 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) determina solamente un ritardo nello sviluppo della massa tumorale (Figura 3A). Al termine del trattamento, i topi sono stati sacrificati ed i tumori sono stati espianati per l'analisi biochimica ed istologica. In primo luogo sono stati valutati i livelli di p53 e di MDM2 mediante wb per confermare l'efficacia del trattamento *in vivo*. I livelli di p53 sono aumentati in tutti i tumori trattati (Figura 3B). Inoltre, i livelli di MDM2 sono aumentati in tutti i tumori trattati rispetto al controllo (Figura 3B), probabilmente come risposta compensativa all'aumento dei livelli di p53. E' stato poi valutata l'apoptosi e la proliferazione dei tumori mediante wb. I dati (Figura 3B) mostrano che il trattamento con ISA27 aumenta i livelli di Caspasi 3 Clivata e riduce la fosforilazione di RB in modo dose-dipendente. Questi risultati sono stati confermati mediante analisi Immunoistochimica in sezioni di tumore inclusi in paraffina (Figura 4A e 4B). I tumori trattati con ISA27 mostrano un aumento dose-dipendente dei livelli di Caspasi 3 Clivata (Figura 4A) ed una riduzione dell'espressione di PCNA, *marker* della proliferazione cellulare (Figura 4B). Questi dati confermano che il trattamento con ISA27 induce l'apoptosi anche *in vivo* in maniera dose-dipendente.

#### **IV – 3. Effetti di SM13 sulla proliferazione cellulare in vitro delle KAT-4**

L'efficacia di SM13 nella regolazione del segnale apoptotico in una linea di cellule tumorali p53wt è già stata dimostrata. Quindi sono stati valutati gli effetti anche in una linea cellulare p53mt (KAT-4). In primo luogo è stata confermata l'efficacia di SM13 nell'inibire l'interazione MDM2/p53 mediante saggio di Co-Immunoprecipitazione. I dati mostrano che la precipitazione di MDM2 riduce i livelli di

p53 in cellule non trattate, viceversa, l'utilizzo di SM13 riduce questo fenomeno mantenendo più alti i livelli di p53 (Figura 5A). Successivamente è stato testato l'effetto di SM13 sulla crescita delle cellule tumorali *in vitro*. SM13 riduce la proliferazione cellulare delle KAT-4 sia a 24 che a 48 ore dal trattamento iniziale (Figura 6A). Le cellule KAT-4, come detto in precedenza, hanno una mutazione del gene p53, che inibisce l'attività trascrizionale. E' stato dunque valutato l'effetto del trattamento sul segnale apoptotico mitocondriale-dipendente. Infatti, recenti studi hanno dimostrato che le interazioni di p53 con i vari membri della famiglia di proteine Bcl-2 determina apoptosi mitocondriale trascrizione-indipendente (Speidel 2010; Ha et al, 2013). Di conseguenza, i nostri dati hanno mostrato che SM13, determinando l'aumento dei livelli di p53, aumenta anche l'espressione della proteina proapoptica Bax, inducendo il rilascio del Citocromo C (Figura 6B). Questo evento porta all'attivazione di Caspasi 9 e Caspasi 3, inducendo pertanto morte cellulare (Figura 6B). Di conseguenza, anche i livelli di Citocromo C in estratti citosolici risultano essere aumentati dal trattamento (Figura 5B). E' stato dimostrato che ISA27 induce un aumento dei livelli di p53 inibendo la degradazione delle proteine senza modificare i suoi livelli di espressione genica (cap. IV-I). Ripetendo l'esperimento di Real Time, con cellule trattate con SM13, è stato dimostrato che anche quest'ultimo non ha modificato l'espressione genica di p53 (figura 5C), confermando in tal modo che SM13 inibisce la degradazione di p53. Per confermare l'effetto apoptotico di SM13, è stata valutata la frammentazione del DNA attraverso la metodica Tunel. I dati mostrano che il trattamento con SM13 induce eventi apoptotici nelle cellule tumorali (Figura 6C). Tutti insieme, questi dati suggeriscono che SM13 è in grado di indurre l'apoptosi nelle cellule tumorali attivando il segnale apoptotico mitocondriale. Infine, per valutare la specificità dell'efficacia di SM13 nella regolazione dell'apoptosi indotta da p53, sono stati valutati i suoi effetti, in una linea cellulare tumorale, FRO, p53null (Wolf e Rotter, 1985; Namba et al, 1995). I dati ottenuti, indicano che SM13 aumenta i livelli di Caspasi 3 Clivata nelle cellule KAT-4, ma non nelle cellule FRO. Questo conferma la capacità del trattamento con SM13 di indurre apoptosi strettamente attraverso il *pathway* di p53. Inoltre, per confermare che gli effetti di SM13 siano indipendenti dalla trascrizione di p53, è stata valutata l'espressione genica di alcuni geni target di p53, quali p21 e Gadd45. Nella linea cellulare tumorale p53wt, le MCF7, il trattamento con SM13 induce l'aumento dell'espressione genica di p21 e Gadd45, mentre nella linea cellulare p53mt, le KAT-4, tale fenomeno è ridotto (figura 6E), a conferma che gli effetti del trattamento con SM13

sono strettamente dipendenti da p53, ma data la mancanza di attività trascrizionale di p53 (Figura 6E) nelle cellule KAT-4, i fenomeni verificati sono dovuti all'attivazione della via apoptotica mitocondriale p53-dipendente.

#### **IV – 4. Effetti di SM13 sulla crescita delle cellule KAT-4 in vivo**

Per confermare i dati *in vitro*, è stato valutato l'effetto di SM13 sulla crescita tumorale *in vivo* in topi nudi Balb/C. I tumori sono stati trattati con iniezioni IP ed iniezioni intratumorale di SM13. I dati hanno mostrato che SM13 è un potente inibitore della crescita tumorale in maniera dose dipendente (Figura 7A). Infatti, l'iniezione intratumorale di SM13 inibisce la crescita tumorale già a bassi dosaggi, ed è ancora più efficiente a dosi elevate. Inoltre, il trattamento IP ritarda fortemente la crescita tumorale (Figura 7A). Confrontando i dati di ISA27 e di SM13 sulla crescita tumorale è evidente che a dosi uguali, il trattamento con SM13 è più efficace del trattamento con ISA27 per inibire la progressione del tumore (Figura 7B). Infatti, quando si confrontano gli effetti sulla crescita del tumore, i tre differenti regimi di trattamento hanno mostrato costantemente il vantaggio in termini di efficacia di SM13 rispetto al trattamento con ISA27. Il trattamento IP con SM13 ( $5 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) ritarda la crescita tumorale più efficientemente rispetto ad ISA27 ( $-77 \pm 2,6\%$  vs  $-56 \pm 2\%$  dopo 14 giorni,  $P < 0,05$ ). Allo stesso modo, l'iniezione intratumorale a basse dosi di SM13 ( $1 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) è più efficace del trattamento con basse dosi di ISA27 (SM13:  $-85 \pm 2\%$ ; ISA27:  $-68 \pm 3,4\%$  dopo 14 giorni,  $P < 0,05$ ). Infine, l'iniezione intratumorale ad alti dosaggi di SM13 ( $3 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) induce la regressione del tumore in modo più efficiente rispetto ISA27 ( $-98 \pm 1,6\%$  vs  $-80 \pm 1,6\%$  dopo 14 giorni,  $P < 0,05$ ). E' già stato evidenziato che ISA27 ed SM13 mostrato una diversa Concentrazione Minima Inibente (IC50), (SM13:  $0,03 \text{ micron} \pm 0,01$ ; ISA27:  $0,40 \text{ micron} \pm 0,02$ ) (Gomez-Monterrey et al, 2010; Bertamino et al, 2013), questo dato assieme a quelli rilevati durante la comparazione dell'effetto sulla crescita del tumore alle stesse dosi, mostrano che SM13 è circa dieci volte più potente di ISA27. Così, oltre alle buone proprietà antitumorali di ISA27, i dati mostrano che SM13 è anche più efficiente, rispetto al suo precursore, per inibire la crescita tumorale *in vivo*.

Per confermare il meccanismo con cui SM13 induce apoptosi, è stato valutato il suo effetto sul *pathway* mitocondriale nei tumori prelevati dai topi trattati e di controllo. Secondo i dati *in vitro*, l'iniezione intratumorale a basse e ad alte dosi di SM13 aumenta significativamente i livelli di p53, di Bax, del Citocromo C, della Caspasi 9 nella forma attiva e della Caspasi 3 Clivata, in modo dose-dipendente (Figura 7B). La morte cellulare e la proliferazione sono state valutate mediante analisi di Immunoistochimica utilizzando gli anticorpi per la Caspasi 3 e PCNA, e valutandone i livelli nei tumori prelevati dal controllo e dai trattati. I tumori trattati con SM13, mostrano una riduzione dose-dipendente della proliferazione cellulare (PCNA: Figura 8A) ed un aumento dell'apoptosi (Caspasi 3 Clivata: Figura 8B). Infine, per confermare ulteriormente l'effetto di SM13 sulla crescita tumorale, è stata analizzata l'espressione genica dei geni chiave nella progressione tumorale, e nella metastatizzazione, mediante tecnica di RT PCR. Il gene per l'espressione del *Vascular Endothelial Growth Factor* ( VEGF: Figura 9A); il gene per l'espressione della *Matrix Metalloproteinase 9* ( MMP-9: Figura 9B), il gene per l'espressione del *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF $\alpha$  :Figura 9C) ed il gene per l'espressione dell' Interleuchina 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ : Figura 9D), nelle cellule tumorali, sono tutti geni solitamente overespressione nel tumore, mentre il trattamento con SM13, diminuisce significativamente la loro espressione genica di questi *probe* nei tumori trattati rispetto a quelli di controllo, in maniera dose-dipendente, confermando l'efficacia del trattamento nel ridurre la crescita tumorale.

#### **IV – 5. Valutazione degli effetti collaterali del trattamento con ISA27 e con SM13**

In ultima analisi è stata testata la tossicità di SM13 *in vivo* in topi nudi sani, nei quali non sono state inoculate cellule tumorali. Nessuna variazione significativa è stata osservata tra i gruppi trattati e i gruppi di controllo, per quanto concerne il peso (i dati non sono riportati). Inoltre è stata effettuata l'analisi morfologica degli organi interni, in particolare fegato e reni, raccolti dai topi di controlli e dai topi trattati, con colorazione tricromica di Masson delle sezioni in paraffina. In nessuno dei topi trattati, si sono evidenziate differenze morfologiche dei tessuti, rispetto ai controlli (Figura 10). Questi dati indicano quindi che i trattamenti con ISA27 ed SM13 non hanno avuto effetti collaterali sulla salute dei topi alle dosi ed ai tempi di trattamento che sono stati utilizzati in questo studio.

#### **IV – 6. Valutazione degli effetti del trattamento con SM13 nella proliferazione delle cellule VSMC**

Sono stati valutati gli effetti di SM13 nelle VSMC, valutando la proliferazione a 24 e a 48 ore dopo la stimolazione con FBS al 5% per indurre stimolo proliferativo. Il trattamento con SM13 inibisce la proliferazione cellulare in maniera dose-dipendente sia in condizioni basali sia in risposta allo stimolo proliferativo (Figura 11A). Questi dati suggeriscono che anche nelle VSMC, SM13 è in grado di regolare la proliferazione cellulare. Per confermare la capacità di SM13 di inibire la proliferazione cellulare, è stato effettuato il *Tritiated Thymidine Incorporation Assay* per valutare la sintesi del DNA. La sintesi del DNA è aumentata con la stimolazione con FBS al 5%, ed il trattamento con SM13 riduce questo fenomeno sia in condizioni basali, sia in risposta allo stimolo con FBS, in modo dose dipendente (Figura 11B). Inoltre questi dati sono stati confermati attraverso il test MTT, che ha indicato una riduzione della vitalità dopo il trattamento con SM13, in entrambe le condizioni ed in maniera dose dipendente (Figura 11C). Al fine di valutare il meccanismo di azione di SM13 nelle VSMC, è stato valutato l'effetto della degradazione di p53 MDM2 dipendente. Sono stati valutati i livelli di p53 mediante wb, ed effettivamente il trattamento con SM13 aumenta i livelli di p53, in condizioni basali ed in risposta allo stimolo con FBS. Questo dato è associato con un aumento dei livelli di Caspasi 3 Clivata. Questi risultati suggeriscono che SM13 è in grado di regolare la proliferazione delle VSMC attivando il *pathway* apoptotico p53 dipendente (Figura 12).

Per confermare l'effetto di SM13 sulla regolazione della proliferazione delle cellule VSMC, sono stati valutati i livelli di fosforilazione di RB, *marker* della progressione del ciclo cellulare. La fosforilazione di RB è ridotta nelle cellule trattate con SM13, confermandone l'efficienza nella riduzione della proliferazione cellulare.

## V – DISCUSSIONE

Questi risultati mostrano per la prima volta che ISA 27 ed SM13 sono due efficaci inibitori della proliferazione delle cellule tumorali, anche in linee tumorali con mutazione del gene di p53, e delle cellule vascolari muscolari lisce.

p53 è un soppressore tumorale in grado di regolare diversi precessi cellulari come il ciclo cellulare, la senescenza e l'apoptosi, in risposta ad un danno cellulare (Levine, 1997; Wu and Levine, 1997). In condizioni basali, p53 è poco espresso nelle cellule, a causa della sua continua degradazione indotta da MDM2 (Levine, 1997; Wu and Levine, 1997). La rapida attivazione dei livelli proteici di p53 indotta da diversi tipi di *stress*, previene l'inappropriata proliferazione delle cellule, che presentano un danno al DNA (Moll and Petrenko, 2003). p53 svolge effetti proapoptotici in maniera dipendente dalla trascrizione nel nucleo, ed in maniera indipendente dalla trascrizione nel mitocondrio (Chen *et al*, 1996; Vousden and Lu, 2002; Mihara *et al*, 2003). Recentemente è stato dimostrato che MDM2 è il principale regolatore di p53 mediante l'inibizione della sua funzione di soppressore tumorale (Momand *et al*, 1992; Finlay, 1993; Chen *et al*, 1996). Infatti, negli ultimi anni, sono state sviluppate delle *small molecule* in grado di inibire il legame di MDM2 con p53, e che sono state proposte come farmaci terapeutici antitumorali (Shangary and Wang, 2009). Sono state disegnate e sintetizzate una serie di *small molecule* che sono analoghe dello spirooxindolepyrrolidine core, ed inibiscono la degradazione di p53 dipendente da MDM2, mediante l'inibizione del legame MDM2/p53 (Gomez-Monterrey *et al*, 2010). Tra questi ISA27 è risultato il composto più potente nel regolare l'attività di p53. E' stato recentemente dimostrato che ISA27 induce apoptosi dipendente da p53 in linee tumorali umane (Costa *et al*, 2013). In questo lavoro è stato dimostrato che questo effetto è riproducibile anche in linee cellulari tumorali, che presentano una mutazione nel gene di p53, che inattiva la sua attività trascrizionale. Basandoci sulla struttura di ISA27, sono state disegnate e sintetizzate una serie di nuovi composti modificati, che dovrebbero essere più selettivi ed efficaci di ISA27. Questi analoghi di ISA27, sono stati preparati per valutare l'effetto di modificazioni strutturali al dominio di *thiazolidine*, sull'attività *anti*-proliferativa e sulla modulazione di p53. Tra questi SM13 è risultato il composto più efficace, in grado di inibire la crescita cellulare in differenti linee cellulari tumorali umane, a concentrazioni molto basse (Bertamino *et al*, 2013).

Mediante tecnica di *Docking* molecolare è stato confermato che SM13 interagisce appropriatamente con le *clefts* di Trp23 e Phe19, spiegando il motivo della sua affinità di legame per MDM2. SM13 è in grado di indurre, a basse dosi, l'accumulo della proteina p53 e di causare apoptosi (Costa *et al*, 2013). In questo studio è stato dimostrato che SM13, in maniera più efficace rispetto al suo precursore ISA27, è un potente inibitore della crescita tumorale, in cellule che portano la mutazione del gene di p53, ed è efficace a bassi dosaggi. E' noto che p53 induce apoptosi attraverso la regolazione della trascrizione genica nel nucleo. Recentemente è stato dimostrato che questa proteina è anche in grado di indurre apoptosi in maniera indipendente dalla trascrizione (fig. 8A), basandosi sull'attivazione dell'apoptosi per via mitocondriale (Arima *et al*, 2005). Infatti, p53 induce direttamente la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna formando un complesso con le proteine *anti*-apoptotiche, Bcl-XL e Bcl2, inducendo il rilascio di Citocromo C nel *citofasi*. Inoltre è stato dimostrato che la traslocazione di p53 nel mitocondrio avviene a tempi brevi con la stimolazione con TPA, e questo induce disfunzione mitocondriale (Zhao *et al*, 2005). Lo specifico segnale intracellulare attraverso il quale p53 attiva l'apoptosi in maniera indipendente dalla trascrizione non è ancora stato chiarito. E' stato dimostrato che il blocco trascrizionale di p53, mediante stimolazione con *alpha*-amanitina, induce la localizzazione mitocondriale di p53 e accumulo ed attivazione mitocondriale di Bax. In accordo con questi dati, in questo studio, SM13 induce apoptosi delle cellule KAT-4, che esprimono una forma mutata di p53, che perde l'attività trascrizionale, mediante la regolazione dei *pathway* mitocondriali dipendenti da p53 (fig. 8B). Infatti l'aumento dei livelli di p53, indotti da SM13 nelle cellule KAT-4, si associa con un aumento di Bax, il rilascio del Citocromo C, l'aumento dei livelli di Caspasi 3 Clivata, ed infine morte cellulare. La conferma che questo meccanismo dipenda strettamente da p53, deriva dalla dimostrazione che SM13 non ha effetti sulle cellule FRO, una linea cellulare tumorale che non esprime p53 (Wolf and Rotter, 1985). Questo potrebbe essere una risposta compensatoria in quelle condizioni, come il cancro, in cui p53 non può attivare la trascrizione genica ma deve indurre la morte cellulare per inibire l'aumento patologico della proliferazione cellulare.

## VI - CONCLUSIONI

In questo studio è stato dimostrato che sia ISA27 che SM13 sono regolatori efficaci della crescita tumorale in cellule KAT-4. Tra questi SM13 sembra essere il più efficace, in quanto in grado di indurre una progressiva regressione del tumore a basse dosi e di inibire la proliferazione nelle cellule muscolari vascolari lisce. Nel trattamento dei tumori umani, la combinazione di più farmaci, con diversi meccanismi di azione ed un basso grado di tossicità, è preferita rispetto ad una monoterapia. In questo contesto, SM13 potrebbe essere un buon farmaco antitumorale da usare in combinazione con altri chemioterapici, essendo selettivo e non causando effetti collaterali, ed in campo cardiologico, data la capacità di ridurre la proliferazione delle VSMC attraverso il pathway apoptotico p53-dipendente, potrebbe essere proposto come molecola di partenza per lo sviluppo di un farmaco per la terapia per il trattamento delle malattie vascolari. In questo studio abbiamo dimostrato che SM13 ha effetti proapoptotici mediante la regolazione del turnover di p53 nella cellula e quindi potrebbe essere utilizzato come prototipo per la generazione di una small molecule per la terapia antitumorale. In conclusione questo studio propone SM13 come farmaco antitumorale da utilizzare da solo o in combinazione con i comuni farmaci antitumorali, per migliorare la risposta alla chemioterapia in diversi tipi di tumore, caratterizzati da elevati livelli di MDM2 e bassi livelli di p53 e come molecola di partenza per sviluppare nuovi farmaci, per il trattamento di patologie caratterizzate da iperproliferazione delle cellule muscolari vascolari lisce.

## ABSTRACT IN ENGLISH

**Background:** p53 is a transcription factor with tumor suppressor properties able to induce mitochondrial apoptosis independently from its transcriptional activity. Moreover p53 is active also in vascular hyperplastic lesions, where it regulates apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cell (VSMC). Targeting p53 may be, therefore, a novel therapeutic approach for the treatment of vascular proliferation and restenosis. We have recently synthesized two new compounds (ISA27 and SM13), which block MDM2-p53 interaction and induce apoptosis in p53 wild-type (wt) tumor cells. The aim of this study was to verify the effectiveness of these compounds in tumors carrying a mutated form of p53 gene with no transcriptional activity, and whether p53 can be a therapeutic target for the treatment of hyperproliferative vascular diseases.

**Methods:** the effectiveness of the peptides was evaluated *in vitro* in tumor cell lines with p53wt, p53mt and p53ko, and in the VSMC cell. The *in vivo* study was performed in BALB/c nude mice.

**Results:** Both ISA27 and SM13 reduced cell proliferation and induced apoptosis *in vitro* in cells carrying either p53wt or mutated gene suggesting that its effect is independent from p53 transcriptional activity. SM13 had no effect in a p53 null cell line. *In vivo*, ISA27 and SM13 induced cancer cell death in a dose dependent manner through the activation of the mitochondrial-dependent death signaling in p53-mutated cells. *In vivo*, SM13 reduced tumor growth. In VSMC, the treatment with SM13 was effective to reduce the interaction p53/MDM2 and to increase the levels of p53. Furthermore in this cells SM13 inhibits cell proliferation and the synthesis of DNA and is able *in vitro* to induce p53 - dependent apoptosis.

**Conclusion:** This study proposes SM13 as anti-cancer compound to be used for the treatment of tumors p53 dependent, even in the absence of p53 transcriptional activity, and demonstrate the effectiveness of SM13 in reducing the proliferation of VSMCs, through the activation of p53-dependent apoptosis, suggesting its use in hyperproliferative vascular diseases such as atherosclerosis and restenosis.

## BIBLIOGRAFIA

- Arima Y, Nitta M, Kuninaka S, Zhang D, Fujiwara T, Taya Y, Nakao M, Saya H (2005) Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 280(19): 19166-76
- Bertamino A, Soprano M, Musella S, Rusciano MR, Sala M, Vernieri E, Di Sarno V, Limatola A, Carotenuto A, Cosconati S, Grieco P, Novellino E, Illario M, Campiglia P, Gomez-Monterrey I (2013) Synthesis, in Vitro, and in Cell Studies of a New Series of [Indoline-3,2'-thiazolidine]-Based p53 Modulators. *J Med Chem*
- Blagosklonny MV, Giannakakou P, Wojtowicz M, Romanova LY, Ain KB, Bates SE, Fojo T (1998) Effects of p53-expressing adenovirus on the chemosensitivity and differentiation of anaplastic thyroid cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83(7): 2516-22
- Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 19(18): 2122-37
- Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP (2009) Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* 9(12): 862-73
- Chen J, Wu X, Lin J, Levine AJ (1996) mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 16(5): 2445-52
- Y Cho, S Gorina, P.D Jeffrey, N.P Pavletich Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations *Science*, 265 (1994), pp. 346–355
- Ciccarelli M, Sorriento D, Cipolletta E, Santulli G, Fusco A, Zhou RH, Eckhart AD, Peppel K, Koch WJ, Trimarco B, Iaccarino G (2011) Impaired neoangiogenesis in beta(2)-adrenoceptor gene-deficient mice: restoration by intravascular human beta(2)-adrenoceptor gene transfer and role of NFkappaB and CREB transcription factors. *Br J Pharmacol* 162(3): 712-21
- Cittadini A, Monti MG, Castiello MC, D'Arco E, Galasso G, Sorriento D, Saldamarco L, De Paulis A, Napoli R, Iaccarino G, Sacca L (2009) Insulin-like

growth factor-1 protects from vascular stenosis and accelerates re-endothelialization in a rat model of carotid artery injury. *J Thromb Haemost* 7(11): 1920-8

Costa B, Bendinelli S, Gabelloni P, Da Pozzo E, Daniele S, Scatena F, Vanacore R, Campiglia P, Bertamino A, Gomez-Monterrey I, Sorriento D, Del Giudice C, Iaccarino G, Novellino E, Martini C (2013) Human glioblastoma multiforme: p53 reactivation by a novel MDM2 inhibitor. *PloS one* 8(8): e72281

Finlay CA (1993) The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Mol Cell Biol* 13(1): 301-6

Geyer RK, Yu ZK, Maki CG (2000) The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat Cell Biol* 2(9): 569-73

Gomez-Monterrey I, Bertamino A, Porta A, Carotenuto A, Musella S, Aquino C, Granata I, Sala M, Brancaccio D, Picone D, Ercole C, Stiuso P, Campiglia P, Grieco P, Ianelli P, Maresca B, Novellino E (2010) Identification of the Spiro(oxindole-3,3'-thiazolidine)-Based Derivatives as Potential p53 Activity Modulators. *J Med Chem*

Green DR, Kroemer G (2009) Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458(7242): 1127-30

Ha JH, Shin JS, Yoon MK, Lee MS, He F, Bae KH, Yoon HS, Lee CK, Park SG, Muto Y, Chi SW (2013) Dual-site interactions of p53 protein transactivation domain with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins reveal a highly convergent mechanism of divergent p53 pathways. *The Journal of biological chemistry* 288(10): 7387-98

Harms K, Nozell S, Chen X (2004) The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 61(7-8): 822-42

Harms KL, Chen X (2005) The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Mol Cell Biol* 25(5): 2014-30

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387(6630): 296-9

Hainaut, P.; Hollstein, M. P53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations *Adv. Cancer Res.* 2000, 77, 81– 137 - Olivier, M.; Eeles, R.; Hollstein, M.; Khan, M. A.; Harris, C. C.; Hainaut, P. The IARC TP53

Database: New Online Mutation Analysis and Recommendations to Users *Hum. Mutat.* 2002, 19, 607

T.R Hupp, D.P Lane Allosteric activation of latent p53 tetramers *Curr. Biol*, 4 (1994), pp. 865–875

Iaccarino G, Izzo R, Trimarco V, Cipolletta E, Lanni F, Sorriento D, Iovino GL, Rozza F, De Luca N, Priante O, Di Renzo G, Trimarco B (2006) Beta2-adrenergic receptor polymorphisms and treatment-induced regression of left ventricular hypertrophy in hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 80(6): 633-45

hling C, Haendeler J, Menzel G, Hess RD, Fraedrich G, Schaefer HE, Zeiher AM. Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions. *J Pathol.* 1998 Jul;185(3):303-12.

P.D Jeffrey, S Gorina, N.P Pavletich. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, 267 (1995), pp. 1498–1502

Kakudo Y, Shibata H, Otsuka K, Kato S, Ishioka C (2005) Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce

apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res* 65(6): 2108-14

Kim SS, Chae HS, Bach JH, Lee MW, Kim KY, Lee WB, Jung YM, Bonventre JV, Suh YH (2002) P53 mediates ceramide-induced apoptosis in SKN-SH cells. *Oncogene* 21(13): 2020-8

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87(1): 99-163

P.H Kussie, S Gorina, V Marechal, B Elenbaas, J Moreau, A.J Levine, N.P Pavletich. Crystal structure of the MDM2 oncoprotein bound to the transactivation domain of the p53 tumor suppressor. *Science*, 274 (1996), pp. 948–953

Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3): 323-31

J Lin, X Wu, J Chen, A Chang, A.J Levine Functions of the p53 protein in growth regulation and tumor suppression, <Conference>Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology LIX (1995), pp. 215–223

Malaguarnera R, Vella V, Vigneri R, Frasca F (2007) p53 family proteins in

thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 14(1): 43-60

Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11(3): 577-90

Moll UM, Petrenko O (2003) The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* 1(14): 1001-8

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69(7): 1237-45

Nakamura Y, et al 2006

Namba H, Hara T, Tukazaki T, Migita K, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S, Yamashita S (1995) Radiation-induced G1 arrest is selectively mediated by the p53-WAF1/Cip1 pathway in human thyroid cells. *Cancer Res* 55(10): 2075-80

Phelps M, Darley M, Primrose JN, Blydes JP (2003) p53-independent activation of the hdm2-P2 promoter through multiple transcription factor response elements results in elevated hdm2 expression in estrogen receptor

alpha-positive breast cancer cells. *Cancer Res* 63(10): 2616-23

Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5): 402-12

Santulli G, Basilicata MF, De Simone M, Del Giudice C, Anastasio A, Sorriento D, Saviano M, Del Gatto A, Trimarco B, Pedone C, Zaccaro L, Iaccarino G (2011) Evaluation of the anti-angiogenic properties of the new selective alphaVbeta3 integrin antagonist RGDechiHCit. *J Transl Med* 9: 7

Santulli G, Cipolletta E, Sorriento D, Del Giudice C, Anastasio A, Monaco S, Maione AS, Condorelli G, Puca A, Trimarco B, Illario M, Iaccarino G (2012) CaMK4 Gene Deletion Induces Hypertension. *J Am Heart Assoc* 1(4): e001081

Shangary S, Wang S (2009) Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49: 223-41

Sorriento D, Campanile A, Santulli G, Leggiero E, Pastore L, Trimarco B, Iaccarino G (2009) A new synthetic

protein, TAT-RH, inhibits tumor growth through the regulation of NFkappaB activity. *Mol Cancer* 8: 97

Sorriento D, Ciccarelli M, Santulli G, Campanile A, Altobelli GG, Cimini V, Galasso G, Astone D, Piscione F, Pastore L, Trimarco B, Iaccarino G (2008) The G-protein-coupled receptor kinase 5 inhibits NFkappaB transcriptional activity by inducing nuclear accumulation of IkappaB alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(46): 17818-23

Sorriento D, Santulli G, Del Giudice C, Anastasio A, Trimarco B, Iaccarino G (2012) Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension* 60(1): 129-36

Speidel D (2010) Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in cell biology* 20(1): 14-24

Toru Hashimoto, Toshihiro Ichiki, Jiro Ikeda, Eriko Narabayashi, Hirohide Matsuura, Ryohei Miyazaki, Keita Inanaga, Kotaro Takeda. *Cardiovascular Research* (2011) 91, 711–719

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000

Nov 16;408(6810):307-10.

Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2(8): 594-604

Wolf D, Rotter V (1985) Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82(3): 790-4

Wu L, Levine AJ (1997) Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol Med* 3(7): 441-51

Zhao Y, Chaiswing L, Velez JM, Batinic-Haberle I, Colburn NH, Oberley TD, St Clair DK (2005) p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 65(9): 3745-50

# ALLEGATI

## TABELLE

**Tab. I – Funzione dei geni che interagiscono con l'attività trascrizionale di p53**

p21, WAF1, Cip1	inibitori cyclin–cyclin-dependent kinases;  legano cdk's, e PCNA;  sono coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare.
MDM2	Prodotto proteico dell'omonimo oncogene; inattiva la trascrizione p53-mediata e quindi forma un ciclo di autoregolazione con l'attività di p53.
GADD45	La sua espressione genica è indotta da un danno al DNA; lega PCNA e può arrestare il ciclo cellulare; coinvolto direttamente nella riparazione del DNA per escissione dei nucleotidi
Cyclin G	Una nuova ciclina (che non è coinvolta nel ciclo di divisione cellulare) di funzione sconosciuta e non nota chinasi ciclina-dipendente.
Bax	Membro della famiglia delle proteine BCL2 che promuovono l'apoptosi; non è indotta da p53 in tutte le cellule
IGF-BP3	Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3; inibisce il signaling del fattore di crescita mitogenico.

**Tab II – Primers utilizzati per l'esecuzione delle Real Time**

<p>TNF</p> <p>forward, 5'-CCAGGAGAAAGTCAGCCTCCT-3'</p> <p>reverse, 5'-CGATAAAGGGGTCAGAGTAAT-3';</p>
<p>VEGF:</p> <p>forward, 5'-CAGGCTGTCGTAACGATGAA-3'</p> <p>reverse, 5'-TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT-3';</p>
<p>MMP-9:</p> <p>forward, 5'-CGTCGTGATCCCCACTTACT-3'</p> <p>reverse, 5'-AACACACAGGGTTTGCCTTC-3 ';</p>
<p>IL-1<math>\beta</math>:</p> <p>forward, 5'-GCCTTGGGCCTCAAAGGAAAGAAT-3'</p> <p>reverse, 5'-GGAAGACACAGATTCCATGGTGAAG-3';</p>
<p>p53:</p> <p>forward, 5'-TGAACCGGAGGCCATCCTC-3'</p> <p>reverse, 5'-GGCACAAACACGCACCTCAAA-3';</p>
<p>p21:</p> <p>forward, 5'-CCTGGGACCTCACCTGCTCTGCTG-3'</p> <p>reverse, 5'-GCAGAAGATGTAGAGCGGGCCTTT-3';</p>
<p>GADD45:</p> <p>forward, 5'-TGCTCAGCAAAGCCCTGAGT-3'</p> <p>reverse, 5'-GCAGGCACAACACCACGTTA-3'.</p>

## **FIGURE & LEGENDE**

### **FIG. 1 Effetti di ISA27 sulla crescita cellulare in vitro**

(A) Gli effetti di ISA27 su p53 e Caspasi 3 Clivata sono stati valutati in lisati totali da differenti linee cellulari tumorali tramite western blot. Sia nelle MCF-7, che nelle BHT-101 e KAT-4, il trattamento con ISA27 aumenta i livelli di p53 e conseguentemente comporta un aumento dei signaling apoptotico. L'acrina è stata usata come loading control. La figura rappresenta tre esperimenti indipendenti. (B, C) Le cellule KAT-4 sono state trattate con ISA27 per 24 e 48 ore, ed è stata analizzata la proliferazione cellulare. ISA27 riduce la proliferazione cellulare in maniera tempo dipendente. I risultati sono la media di 5 esperimenti indipendenti e sono presentati come la media  $\pm$ s.e.m. Questo effetto è stato confermato dal test di Timidina Triziata per la sintesi del DNA (C). La sintesi del DNA è stata ridotta dal trattamento con ISA27 (\*P<0.05 vs control 24H; \*\*P<0.05 vs control 48H). I risultati sono la media di 5 esperimenti indipendenti e sono rappresentati come media  $\pm$ s.e.m.

### **FIG.2 Effetti di ISA27 sull'apoptosi p53 dipendente**

(A) Per valutare l'efficienza di ISA27 di interferire nel legame MDM2/p53 è stato eseguito un saggio di Co-Immunoprecipitazione. MDM2 precipita p53 ed il trattamento con ISA27 inibisce il loro legame. Lisati totali sono stati usati come controllo positivo. Come controllo negativo, il saggio è stato eseguito usando un anticorpo non specifico, della stessa specie dell'anticorpo usato nell' Co-IP. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti. (B) Per dimostrare la specificità del meccanismo di azione di ISA27 nell'inibire la degradazione di p53, e non nel regolare l'espressione genica di p53, è stata eseguita una Real Time PCR. I dati mostrano che non c'è una differenza significativa tra le cellule trattate e quelle di controllo. I risultati sono la media di cinque esperimenti indipendenti (\*p < 0.05 vs controllo).

### **FIG.3 Effetti di ISA27 sulla crescita tumorale in vivo**

(A) Per convalidare i dati in vitro è stato studiato l'effetto di ISA27 in un modello tumorale in vivo. La crescita tumorale è stata misurata due volte a settimana con un calibro durante tutta la durata del trattamento (14 giorni). Il trattamento intraperitoneale (IP: 5 mg/Kg<sup>-1</sup>) ed il trattamento a basse dosi (LOW: 1.5 mg/Kg<sup>-1</sup>) di ISA27 ritarda la

crescita tumorale rispetto al controllo. Alte dosi (HIGH: 35 mg/Kg<sup>-1</sup>) sono più efficienti, e riducono significativamente la grandezza del tumore. I risultati sono la media di misurazioni fatte su 5 animali per gruppo (\*P<0.05 vs control). Il pannello superiore mostra un'immagine rappresentativa dei tumori al termine del trattamento. (B) I tumori sono stati omogenizzati e sono stati analizzati i livelli di: MDM2, p53, Caspasi 3 Clivata ed RB. L'Actina è stata utilizzata come controllo. ISA27 induce un aumento dei livelli di p53 e Caspasi 3 Clivata, ed una riduzione dell'espressione di p-RB nei tumori trattati comparati ai controlli. I livelli di MDM2 non sono stati modificati dal trattamento rispetto al controllo. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

#### **FIG.4 Analisi istologica dei tumori trattati con ISA27**

(A, B) Dopo 14 giorni dall'inizio del trattamento, i topi sono stati sacrificati ed i tumori sono stati espianati per l'analisi istologica. L'apoptosi e la proliferazione sono state valutate analizzando rispettivamente i livelli di Caspasi 3 Clivata e PCNA mediante Immunoistochimica, in sezioni di tumore incluse in paraffina. I tumori trattati con ISA27 mostrano un aumento dose dipendente dei livelli di Caspasi 3 Clivata, (B) ed una riduzione della proliferazione cellulare (A). Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

#### **FIG.5 Effetti di SM13 sull'apoptosi p53 dipendente**

(A) Per valutare l'efficienza di SM13 di interferire nel legame MDM2/p53 è stato eseguito un saggio di Co-Immunoprecipitazione. MDM2 precipita p53 ed il trattamento con SM13 inibisce il loro legame. Lisati totali sono stati usati come controllo positivo. Come controllo negativo, il saggio è stato eseguito usando un anticorpo non specifico, della stessa specie dell'anticorpo usato nell' Co-IP. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti. (B) Per confermare gli effetti proapoptotici di SM13 è stato valutato il livello di Citocromo C rilasciato dal mitocondrio nel citosol, mediante analisi di western blot. Nell'estratto citosolico i livelli di Citocromo C sono stati aumentati dal trattamento rispetto al controllo. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti (\*p < 0.05 vs controllo). (C) Per dimostrare la specificità del meccanismo di azione di SM13 nell'inibire la degradazione di p53, è stata eseguita una Real Time PCR per valutare l'espressione genica di p53. I dati mostrano che non c'è una differenza significativa tra i controlli e le cellule trattate. I risultati sono la media di

cinque esperimenti indipendenti (\* $p < 0.05$  vs controllo).

### **FIG.6 Effetti di SM13 sulla crescita di cellule tumorali in vitro**

(A) Le cellule KAT-4 sono state trattate con SM13 per 24 e 48 ore, ed è stata analizzata la proliferazione cellulare. SM13 riduce la proliferazione cellulare in maniera dipendente dal tempo di trattamento. (\* $P < 0.05$  vs controllo 24H; \*\* $P < 0.05$  vs controllo 48H). I risultati sono rappresentativi di cinque esperimenti e sono presentati come la media  $\pm$ s.e.m. (B) Per valutare il meccanismo d'azione di SM13 sono stati valutati gli effetti del trattamento sul pathway apoptotico mitocondriale, mediante western blot. SM13 aumenta i livelli di p53, ed induce l'attivazione di Bax, il rilascio di Citocromo C dal mitocondrio e l'attivazione di Caspasi 9 e Caspasi 3. Le immagini sono la media di tre esperimenti indipendenti. (C) Per confermare l'effetto proapoptotico di SM13, è stata valutata la frammentazione del DNA, mediante TUNEL assay. I nuclei positivi sono stati contati e i risultati sono espressi nel grafico come media  $\pm$ s.d. SM13 è in grado di indurre apoptosi nelle cellule tumorali. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti. (D) La capacità di SM13 di indurre apoptosi è stata valutata in cellule FRO, una linea cellulare tumorale, che non esprime p53. I livelli di p53 e di Caspasi 3 Clivata sono stati valutati mediante western blot. SM13 non è stato in grado di regolare i livelli di Caspasi 3 Clivata nelle FRO rispetto alle cellule KAT-4. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (E) Per confermare gli effetti di SM13, indipendenti dall'attività trascrizionale di p53, è stata valutata l'espressione genica di geni target di p53, p21 e Gadd45. Nelle MCF7, la linea cellulare p53WT, il trattamento con SM13 induce l'espressione genica di p21 e Gadd45, mentre nelle cellule KAT-4 p53 mutato, lo stesso fenomeno è ridotto (\* $P < 0.05$  vs controllo). I risultati sono la media di cinque esperimenti indipendenti e rappresentati come media  $\pm$ s.e.m.

### **FIG.7 Effetti di SM13 sulla crescita tumorale in vivo**

(A) Per validare i dati in vitro sono stati studiati gli effetti di SM13 in topi nudi Balb/c. La crescita del tumore è stata misurata due volte a settimana con un calibro durante tutto il trattamento (14 giorni di trattamento). Il trattamento intraperitoneale (IP: 5 mg/Kg<sup>-1</sup>) ed il trattamento a basse dosi (low: 1 mg/Kg<sup>-1</sup>) di SM13 rallenta la crescita tumorale comparato ai controlli ed è più efficace rispetto allo stesso dosaggio di ISA27. Alte

dosi di SM13 (high: 3 mg/Kg<sup>-1</sup>) riducono il volume del tumore riportandolo alla grandezza iniziale. I risultati sono la media delle misurazioni di 5 topi per gruppo (\*P<0.05 vs controllo). La figura mostra un'immagine rappresentativa dei tumori al termine del trattamento. (B) La grandezza dei tumori è stata misurata alla fine del trattamento e la percentuale di riduzione del tumore è stata calcolata nei tumori trattati con ISA27 ed SM13 con i rispettivi controlli. SM13 è in grado di inibire la crescita tumorale in modo più efficiente rispetto ad ISA27 (\*P<0.05 vs ISA27). (C) I tumori sono stati omogenizzati per confermare, mediante western blot gli effetti di SM13 sul signalling apoptotico mitocondriale. Nei tumori trattati, SM13 aumenta i livelli proteici di Bax e Citocromo C, ed attiva sia Caspasi 9 che Caspasi 3. Le immagini sono la media di cinque esperimenti indipendenti.

### **FIG.8 Analisi istologica dei tumori trattati con SM13**

(A, B) Dopo 14 giorni dall'inizio del trattamento, i topi sono stati sacrificati ed i tumori espuntati per l'analisi istologica. days from starting treatment, mice were killed and tumours were taken for histological analysis. L'apoptosi e la proliferazione sono state valutate analizzando rispettivamente i livelli di Caspasi 3 Clivata e PCNA mediante Immunoistochimica, in sezioni di tumore incluse in paraffina. I tumori trattati con SM13 mostrano un aumento dose dipendente dei livelli di Caspasi 3 Clivata, marker di apoptosi (B), ed una riduzione dei livelli di PCNA, marker della proliferazione cellulare (A). Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

### **FIG.9 Real-time PCR, analisi dell'infiammazione e dell'angiogenesi nei tumori trattati**

(A, D) L'espressione genica di VEGF, MMP9, TNF $\alpha$  ed IL-1 $\beta$  è stata valutata mediante real-time PCR, per confermare la capacità di ISA27 di regolare fattori proapoptotici nelle cellule cancerogene. A due settimane dall'inizio del trattamento, l'espressione genica di VEGF (A), MMP9 (B), TNF $\alpha$  (C) and IL-1 $\beta$  (D) è sensibilmente inibita in maniera dose dipendente (\*P<0.05 vs controllo). I risultati sono la media di cinque esperimenti indipendenti e presentati come la media $\pm$ s.e.m.

### **FIG.10 Valutazione della tossicità del composto in vivo**

Sono stati testati in vivo gli effetti tossici dei nostri composti. Organi interni (fegato e

reni) di topi trattati con IP di SM13 ( $5\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ ) sono stati analizzati mediante colorazione tricromica di Masson. Nessuna differenza morfologica è stata riscontrata nei topi trattati rispetto ai controlli. Le immagini sono la media di cinque esperimenti indipendenti.

#### **FIG.11 Effetti di SM13 sulla crescita di cellule muscolari lisce vascolari**

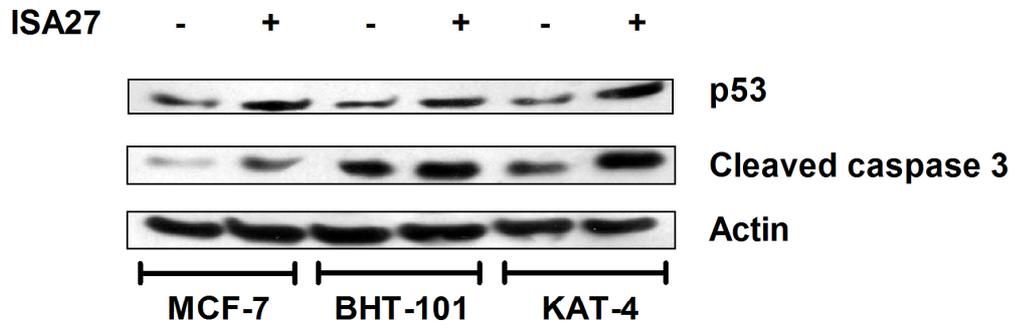
(A) Le VSMC sono state trattate con SM13 e stimulate con FBS 5% per 24 e 48 ore. SM13 riduce la proliferazione indotta dall'FBS, in maniera tempo dipendente. I risultati sono la media di cinque esperimenti indipendenti e sono presentati come la media $\pm$ s.e.m. (B) Per confermare il dato, è stato eseguito un saggio con Timidina Triziata nelle cellule trattate con SM13 e stimulate con FBS 5%. La sintesi del DNA è ridotta dal trattamento con SM13 ( $*p < 0.05$  vs controllo) in maniera dose dipendente. I risultati sono la media di cinque esperimenti indipendenti. Infine il MTT assay è stato eseguito per valutare la vitalità cellulare in risposta al trattamento con SM13. Il trattamento riduce la vitalità cellulare, sia in condizioni basali, sia in risposta allo stimolo proliferativo dell'FBS.

#### **FIG.12 Effetti di SM13 sull'apoptosi p53 dipendente in VSMC**

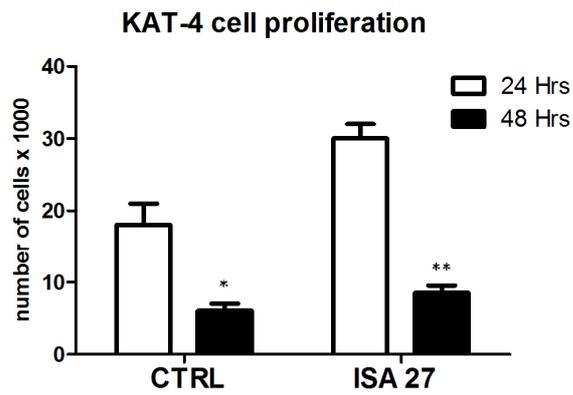
Per confermare gli effetti di SM13, sull'apoptosi e la proliferazione cellulare nelle VSMC, sono stati studiati i livelli di pRB, p53 e Caspasi 3 Clivata in estratti totali cellulari. Sono state trattate con SM13 per 24 ore, ed i livelli proteici sono stati analizzati mediante tecnica di western blot. I livelli SM13 aumentano i livelli di p53 e Caspasi 3 Clivata, e contemporaneamente riduce i livelli di pRB sia in condizioni basali, che dopo stimolazione con FBS5%. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti. ( $*p < 0.05$  vs controllo).

# FIGURA 1

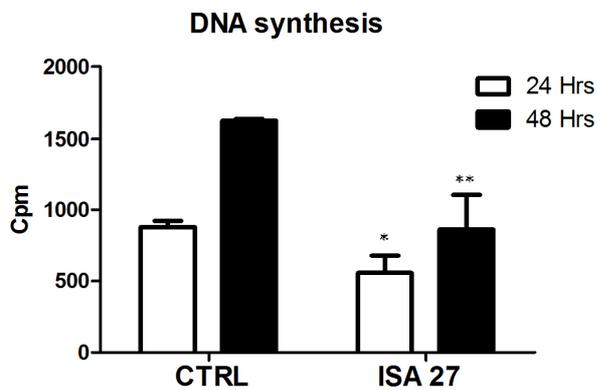
**A**



**B**

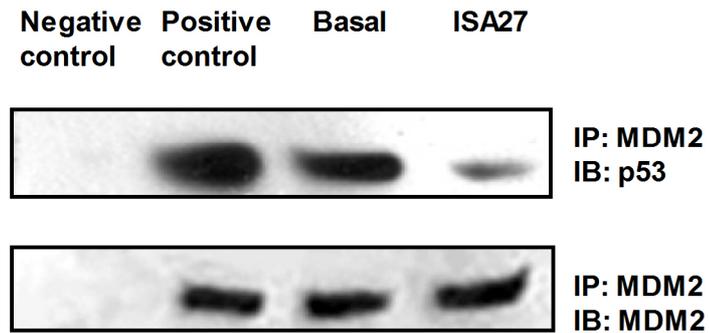


**C**



## FIGURA 2

**A**



**B**

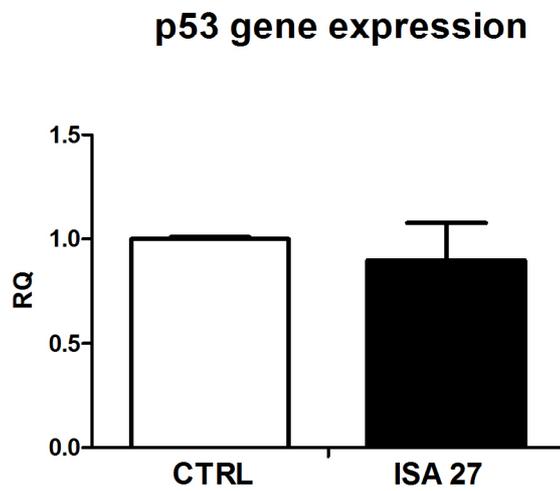
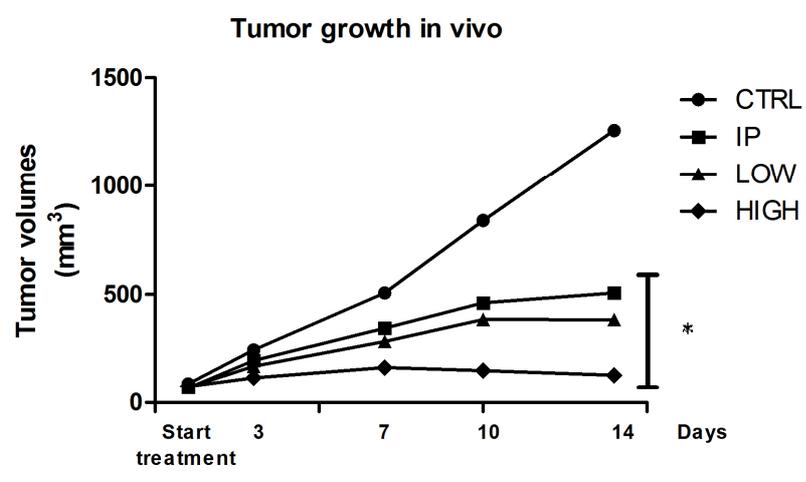
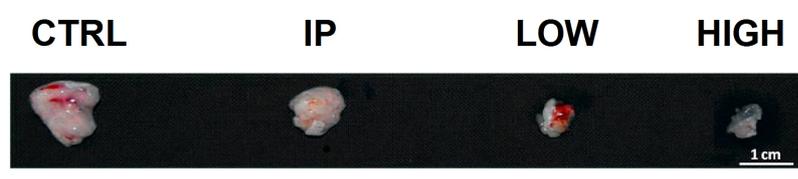
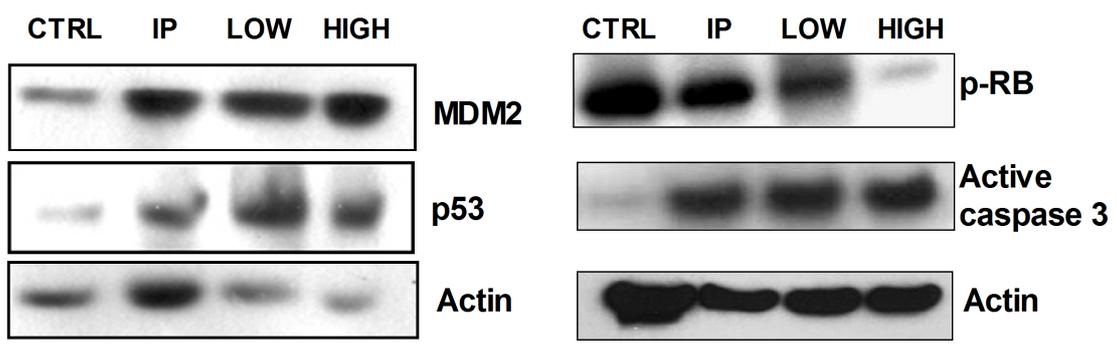


FIGURA 3

A



B

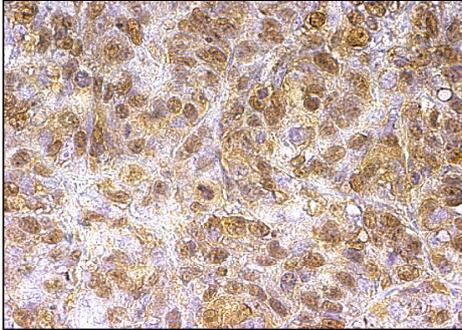


# FIGURA 4

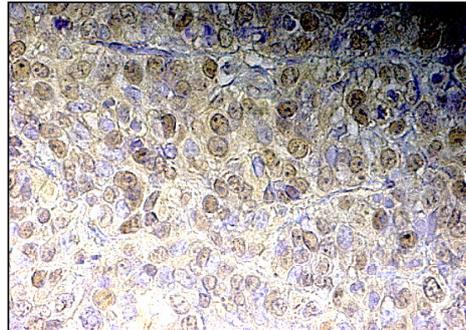
**A**

**IHC: PCNA**

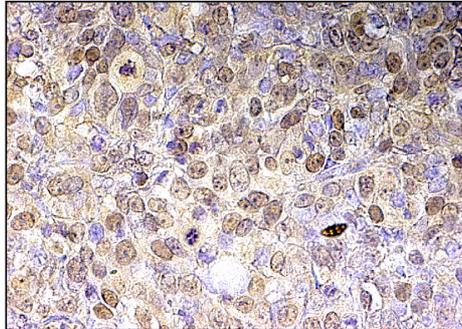
**CTRL**



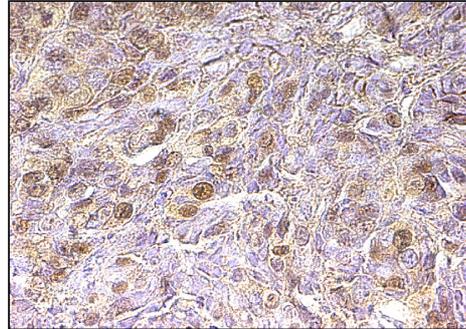
**IP**



**LOW**



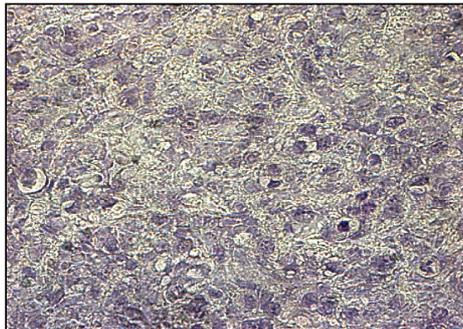
**HIGH**



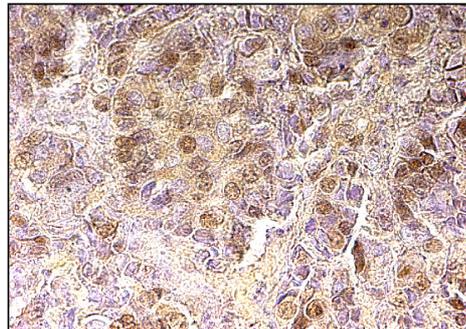
**B**

**IHC: Active caspase 3**

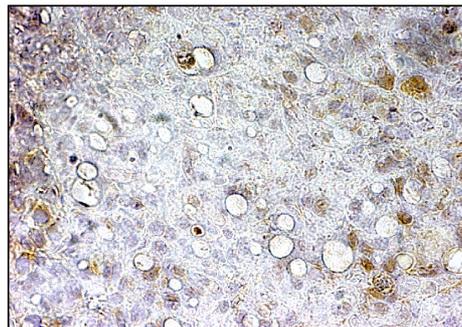
**CTRL**



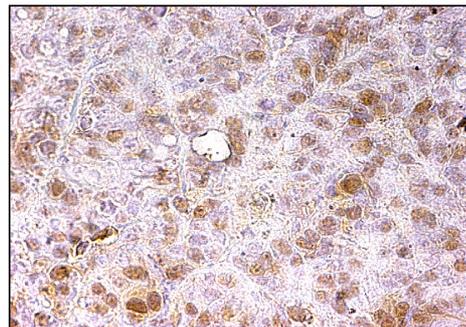
**IP**



**LOW**

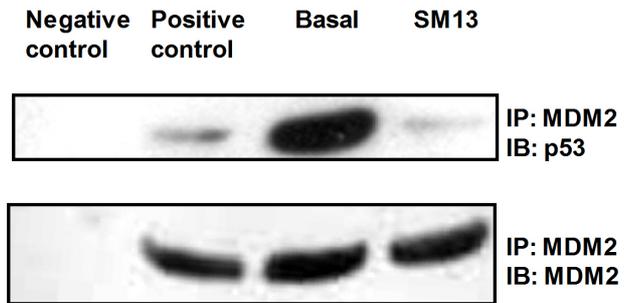


**HIGH**



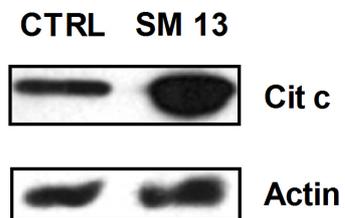
# FIGURA 5

**A**

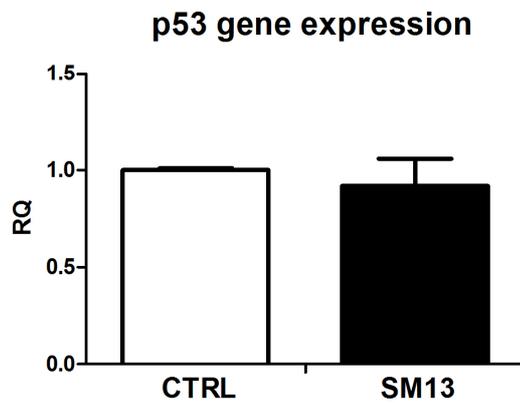


**B**

**Cytosolic extracts**

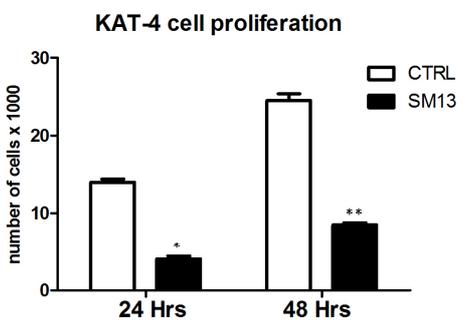


**C**

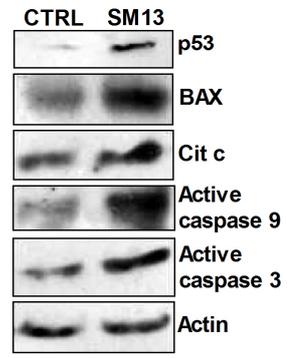


# FIGURA 6

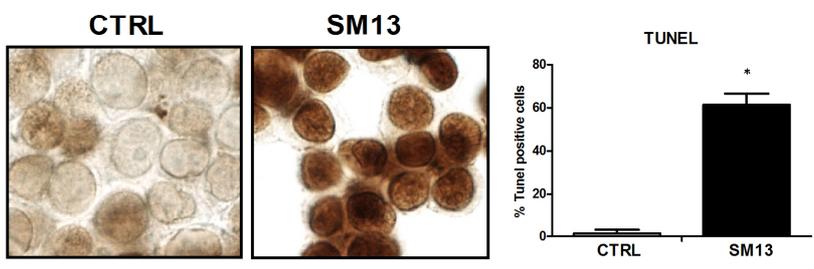
**A**



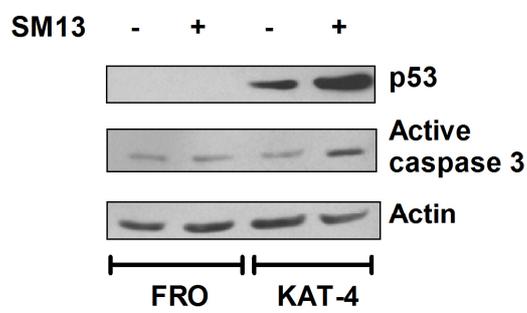
**B**



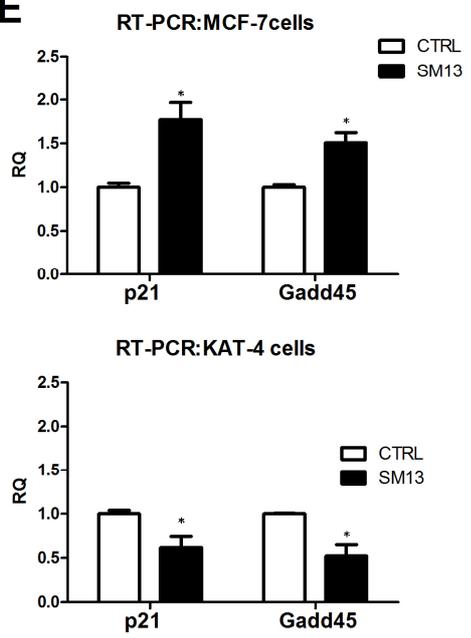
**C**



**D**

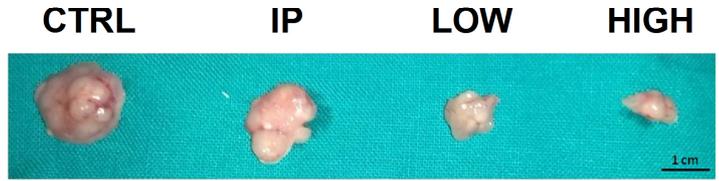


**E**

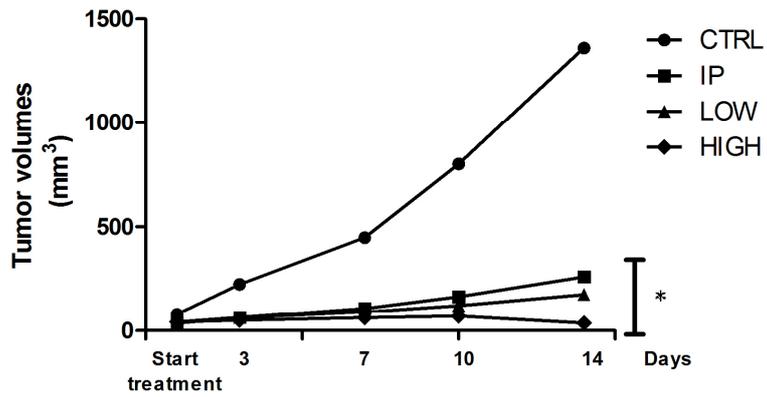


**FIGURA 7**

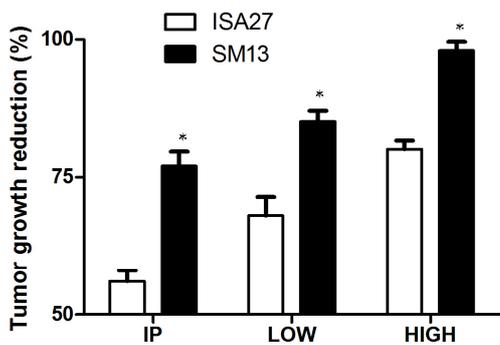
**A**



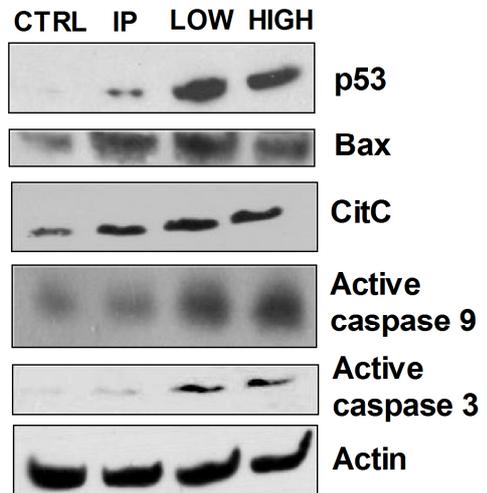
**Tumor growth in vivo**



**B**



**C**

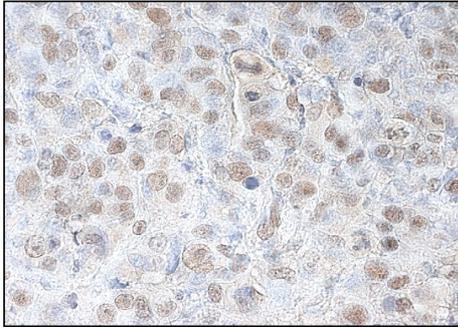


# FIGURA 8

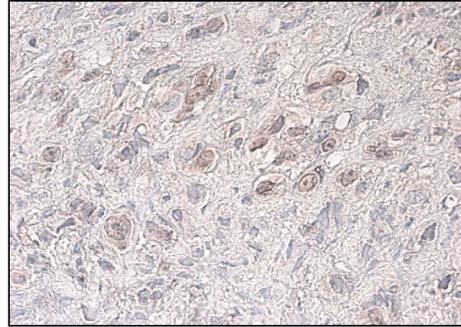
**A**

**IHC: PCNA**

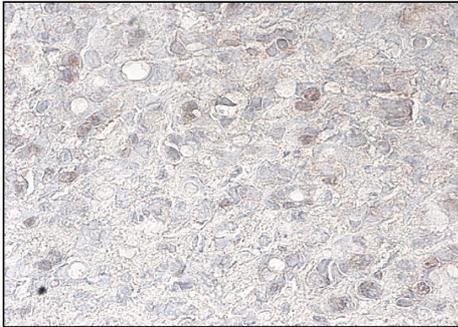
**CTRL**



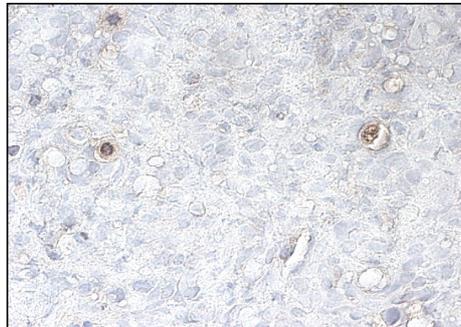
**IP**



**LOW**



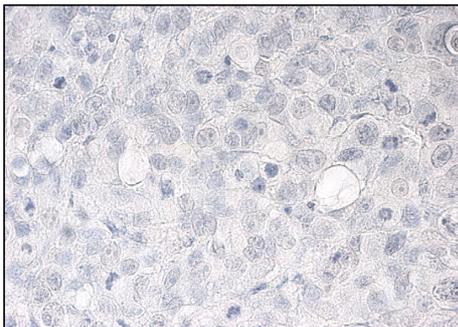
**HIGH**



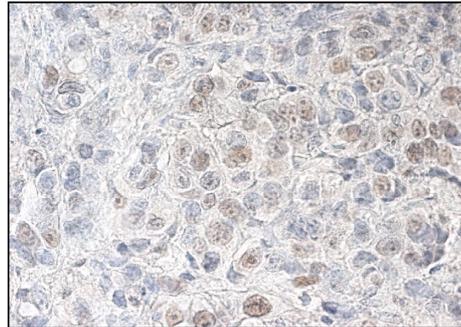
**B**

**IHC: Active caspase 3**

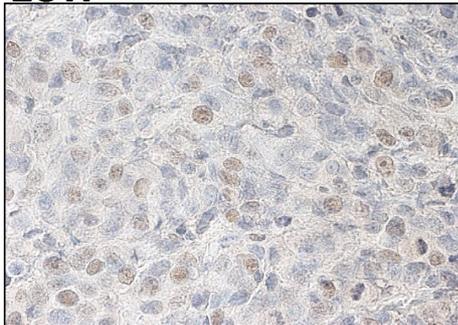
**CTRL**



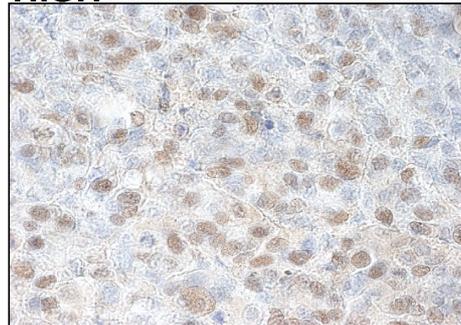
**IP**



**LOW**

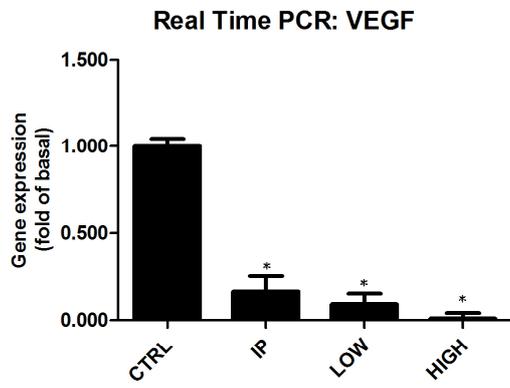


**HIGH**

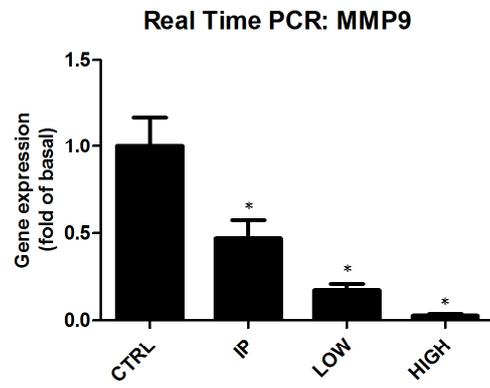


**FIGURA 9**

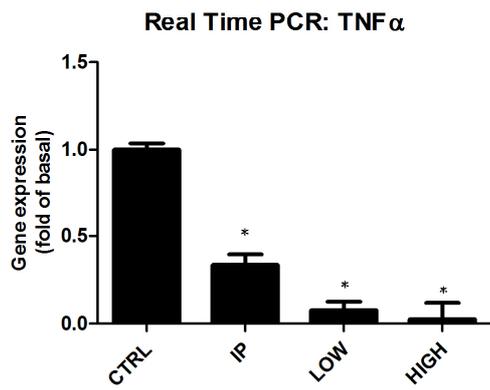
**A**



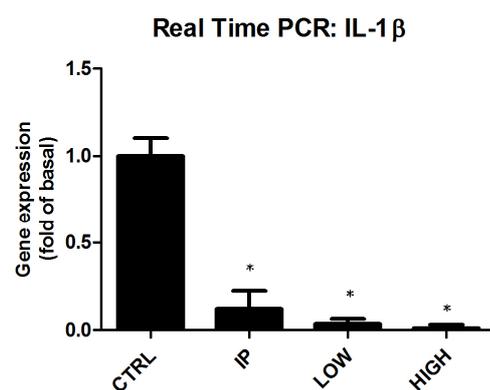
**B**



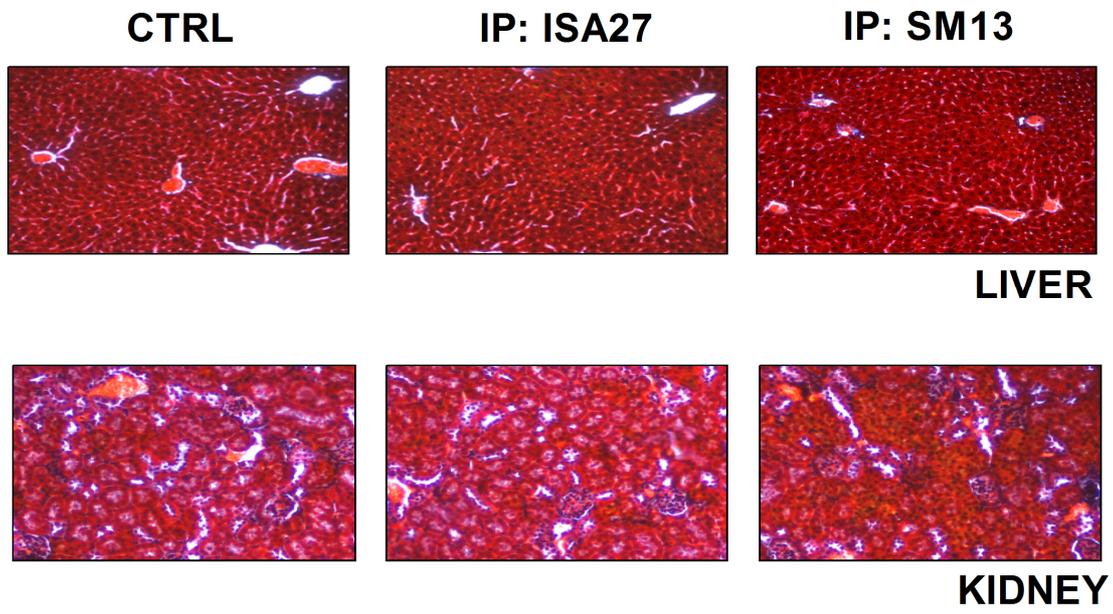
**C**



**D**

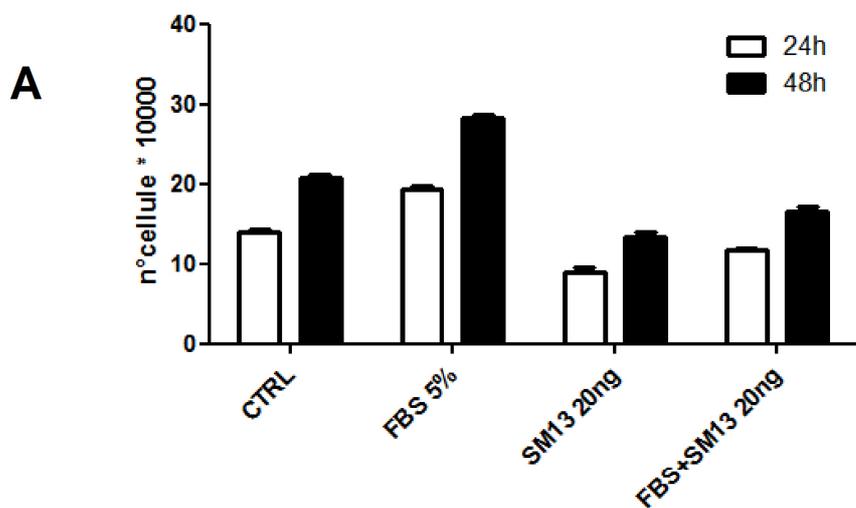


**FIGURA 10**

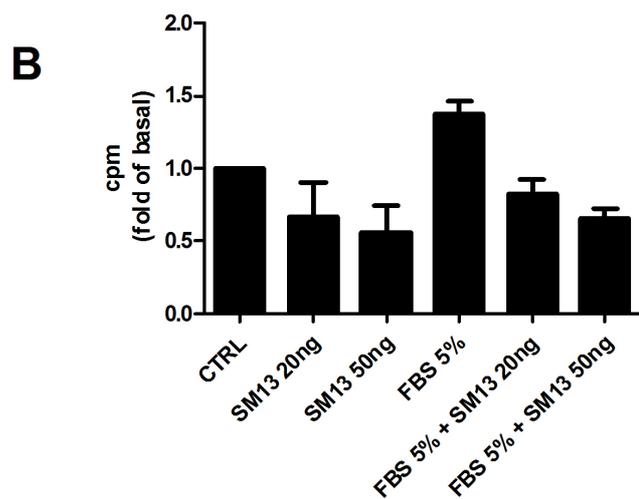


# FIGURA 11

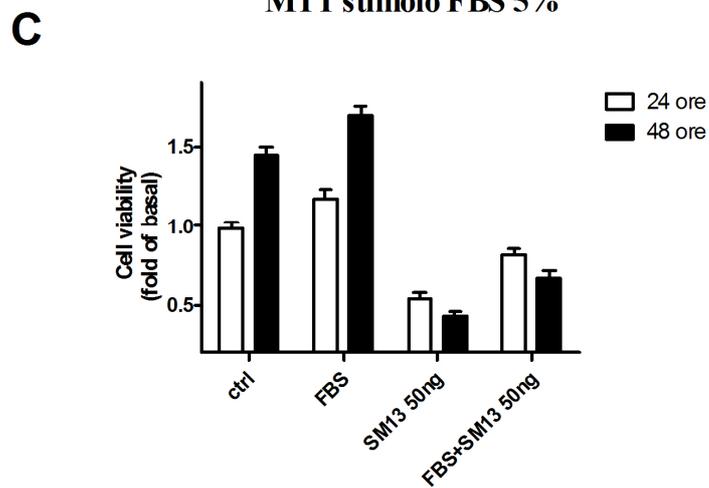
## PROLIFERAZIONE VSMC stimolo FBS 5%



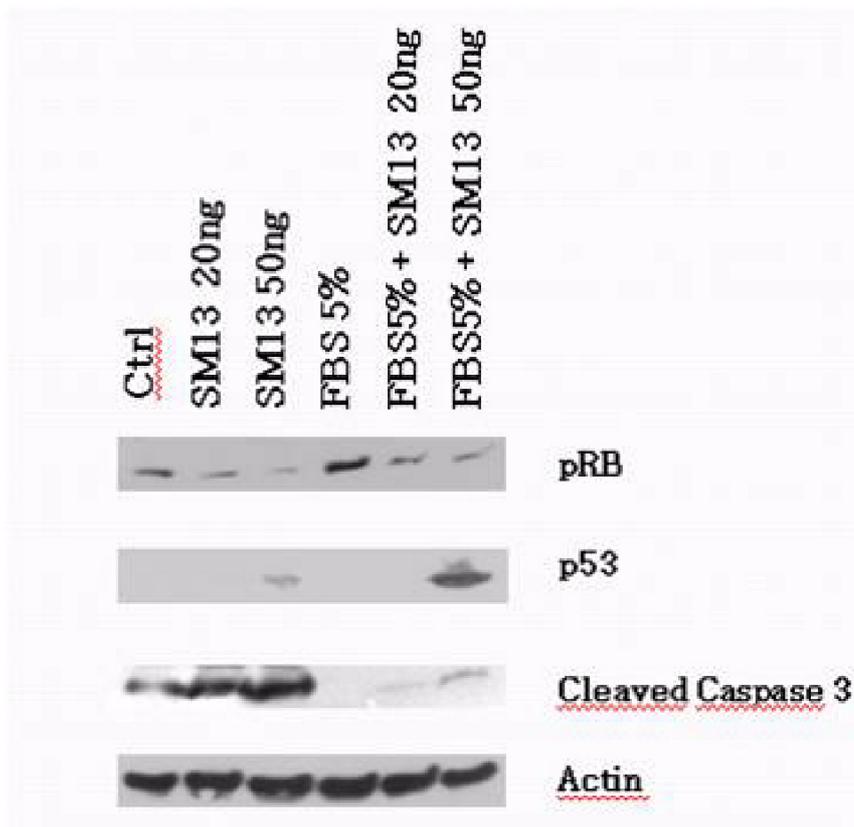
## H3-Thymidine Test



## MTT stimolo FBS 5%



## FIGURA 12



## **PUBBLICAZIONI DEL CANDIDATO (2012-2015)**

**I. Endothelial Cells Are Able to Synthesize and Release Catecholamines Both In Vitro and In Vivo. HYPERTENSION**

Sorriento D, Santulli G, **Del Giudice C**, Anastasio A, Trimarco B, Iaccarino G (2012). vol. 60, p. 129-136

**II. CaMK4 Gene Deletion Induces Hypertension. JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION. CARDIOVASCULAR AND CEREBROVASCULAR DISEASE**

Santulli G, Cipolletta E, Sorriento D, **Del Giudice C**, Anastasio A, Monaco S, Maione AS, Condorelli G, Puca A, Trimarco B, Illario M, Iaccarino G (2012). vol. 1

**III. Age-Related Impairment in Insulin Release The Essential Role of beta(2)-Adrenergic Receptor. DIABETES**

Santulli G, Lombardi A, Sorriento D, Anastasio A, **Del Giudice C**, Formisano P, Beguinot F, Trimarco B, Miele C, Iaccarino G (2012), vol. 61, p. 692-701

**IV. beta(2)-Adrenergic Receptor Stimulation Improves Endothelial Progenitor Cell-Mediated Ischemic Neovascularization. CIRCULATION RESEARCH**

Galasso G, De Rosa R, Ciccarelli M, Sorriento D, **Del Giudice C**, Strisciuglio T, De Biase C, Luciano R, Piccolo R, Pierri A, Di Gioia G, Prevete N, Trimarco B, Piscione F, Iaccarino G (2013), vol. 112, p. 1026-U122

**V. Human Glioblastoma Multiforme: p53 Reactivation by a Novel MDM2 inhibitor. PLOS ONE**

Costa B, Bendinelli S, Gabelloni P, Da Pozzo E, Daniele S, Scatena F, Vanacore R, Campiglia P, Bertamino A, Gomez-Monterrey I, Sorriento D, **Del Giudice C**, Iaccarino G, Novellino E, Martini C (2013), vol. 8

**VI. Endothelial G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 Regulates Vascular Homeostasis Through the Control of Free Radical Oxygen Species. ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY**

Ciccarelli M, Sorriento D, Franco A, Fusco A, **Del Giudice C**, Annunziata R, Cipolletta E, Monti MG, Dorn GW, Trimarco B, Iaccarino G (2013), vol. 33, p. 2415-2424

**VII. New small molecules, ISA27 and SM13, inhibit tumour growth inducing mitochondrial effects of p53. BRITISH JOURNAL OF CANCER**

D Sorriento, **C Del Giudice**, A Bertamino, M Ciccarelli, I Gomez-Monterrey, P Campiglia, E Novellino, M Illario, B Trimarco, N De Luca, G Iaccarino (2014).

**VIII. Pentraxin 3 Induces Vascular Endothelial Dysfunction Through a P-selectin/MMP-1 Pathway. CIRCULATION**

Carrizzo A, Lenzi P, Procaccini C, Damato A, Biagioni F, Mariateresa A, Amodio G, Remondelli P, **Del Giudice C**, Izzo R, Malovini A, Formisano L, Gigantino V, Madonna M, Puca AA, Trimarco B, Matarese G, Fornai F, Vecchione C. (2014)

## **CONGRESSI SCIENTIFICI (2012-2015)**

- I. Frontiers in CardioVascular Biology 2012.** London, 30 Marzo - 1 Aprile 2012
- II. XXIX Congresso Nazionale SIIA.** Roma, 4 – 6 ottobre 2012
- III. 73° Congresso Nazionale SIC.** Roma, 15 – 17dicembre 2012
- IV. XXX Congresso Nazionale SIIA.** Roma, 3 – 5 ottobre 2013
- V. Convegno Scientifico SIIA-SIC “La ricerca cardiologica in Campania”.**  
Salerno 5 – aprile 2014
- VI. Frontiers in CardioVascular Biology 2014.** Barcellona, 4-6 Luglio 2014
- VII. XXXI Congresso Nazionale SIIA.** Bologna, 9-11 Ottobre 2014
- VIII. II Convegno Scientifico SIIA-SIC “I percorsi della ricerca cardiovascolare in Campania”.** Napoli 18 – aprile 2015
- IX. Myocardial Function&Cellular Biology Meeting 2015.** Varenna 30 Aprile –  
03 Maggio 2015

# RINGRAZIAMENTI

\*\*\*

Non è facile citare e ringraziare, in poche righe, tutte le persone che hanno contribuito alla nascita e allo sviluppo di questo lavoro, con una collaborazione costante, con un supporto morale o materiale, con consigli e suggerimenti o solo con parole di incoraggiamento.

La mia gratitudine va innanzitutto al prof. Bruno Trimarco, per avermi ospitato nei suoi laboratori dandomi la possibilità di accedere ad un percorso formativo che mi ha permesso di crescere professionalmente.

Ringrazio inoltre il Professore Guido Iaccarino, per i suoi preziosi insegnamenti, non solo accademici, durante tutto il percorso di studi e per essere stato sempre disponibile, nonostante i molteplici impegni a risolvere i miei dubbi e a metterne altrettanti in testa, così da indurmi sempre a pensare.

Ancora grazie al Dott. Michele Ciccarelli, per tutte le volte che con estrema pazienza ha sorvolato sui miei sbalzi d'umore e le mie prese di posizione, i ritardi e gli inadempimenti, e soprattutto tutte le mie "paraoie", per gli insegnamenti, per le indicazioni e per tutto ciò che ha saputo darmi nei momenti più difficili.

Inoltre ringrazio sentitamente la Dott.ssa Daniela Sorriento sempre disponibile a dirimere le mie problematiche durante tutta l'esecuzione e la stesura di questo lavoro e per aver trovato il tempo per ascoltarmi e consigliarmi, per avermi fornito insegnamenti preziosi per il mio futuro professionale. Grazie per avermi guidato in questi tre anni sempre con giusti suggerimenti e "cazziate", e soprattutto per avermi dato sempre la certezza che alle mie spalle, ci fosse un porto sicuro e tanta professionalità che solo WikiDany può dare, e per la quale mi auguro, si realizzi quanto ha meritato sul campo, sia nell'ambito lavorativo che in quello personale.

Vorrei poi esprimere la mia sincera gratitudine alla Dott.ssa Ersilia Cipolletta, per esserci sempre stata, nella buona ma soprattutto nella cattiva sorte, per i modi con cui mi ha sempre accolto, per tutto ciò che abbiamo condiviso, per il "cambiamento di pelle" che mi ha fatto fare, per avermi inquadrato, per avermi fatto apprendere

l'importanza dell'andatura da "crociera" e quando "scalare la marcia" al momento opportuno, per risolvere tutti i problemi, andando al di là di quelli che erano "tecnicamente" i suoi compiti, per il suo sostegno, diventando un punto di riferimento non solo lavorativo.

Ringrazio la Dott.ssa Antonietta (Tonia) Franco, che oltre che una collega è diventata un'amica, la cui compagnia ha reso più spensierate le lunghe giornate in lab e non, per i numerosi consigli durante l'attività di ricerca, ed i momenti di "goliardia", per la disponibilità e la pazienza, che mi ha dedicato durante questi anni, per l'inizio pessimo con cui abbiamo cominciato a lavorare assieme, che però è servito a smussare in me difetti inconfutabili, trascorrendo alla fine splendide giornate con tante sigarette ed altrettanti caffè, per l'incoraggiamento e gli apprezzamenti, per quanto realizzato e alla quale auguro di poter realizzare tutti i propri progetti.

Grazie alle Dott.sse Antonella Fiordelisi e Jessica Gambardella, per la loro presenza, della quale in questi anni ho potuto beneficiare, apprezzando oltre all'instancabile impegno, la qualità della loro personalità, la grande disponibilità e l'immensa simpatia, ma soprattutto per la giusta critica costruttiva che hanno saputo riservarmi, per il mio percorso lavorativo e non solo, e con le quali sono felice di aver trascorso tutti i momenti del laboratorio.

Per non rischiare di far torto a qualcuno, non mi spingo oltre nel menzionare le altre persone che ho avuto intorno a me, ma ringrazio tutti gli altri colleghi che durante questo triennio sono transitati nello IaccaLab, in particolar modo i Dott. Antonio Anastasio, Roberto Annunziata, Alessandro Beneduce, Gian Marco Maresca e le Dott.sse Anna Lisa Carillo, Diletta Castaldo, Anna Fusco, ed i prossimi Dott.ri Matteo De Rosa e Luigi Napolitano ed assieme a loro anche i membri del gruppo di Geriatria, ed in particolar modo le Dott.sse Pina Gambino e Loreta D'Amico, tutti loro con cortesia, disponibilità e semplicità hanno contribuito ognuno a proprio modo a dar vita a questa oramai mia "seconda famiglia".

Tutto questo è stato realizzato con voi ma soprattutto grazie a voi.

Fuori dal campo lavorativo desidero fare un ringraziamento particolare ai miei amici più cari, Guglielmo e Mariella, che mi onoro di considerare come dei fratelli, che mi sopportano oramai da più di vent'anni, e che tanto hanno contribuito a farmi ritrovare la stabilità e la serenità necessaria per completare questa storia, e che sono sempre stati presenti al momento giusto, quando i veri amici si vedono, indirizzandomi sempre verso la strada giusta da intraprendere. Mi sento di ringraziare di cuore Mina con le sue risate e i suoi "doctoor ch'e cumbinato??", Mary con i suoi "buongiorno" ed i suoi audio-vocali e Rossella con la sua dolcezza e simpatia, che mi sono state vicine in questi mesi, e dalle cui sorprendenti manifestazioni di affetto ho tratto la forza per superare i momenti più difficili, e ho ritrovato gli stimoli per dedicarmi a questo progetto.

Grazie anche a tutti coloro che ci sono stati e che ora non ci sono più, per un motivo o per un altro, ricordarli tutti sarebbe impossibile, ma tutti voi avete contribuito a farmi diventare, intersecando la vostra vita con la mia, la persona che sono ora.

Ed infine ho un enorme desiderio di rivolgere l'ultimo pensiero, e l'ultimo ringraziamento a Lorenza e Nicola, i miei genitori, con amore e ammirazione, per avermi ancora una volta più che "supportato" "sopportato", per il sostegno ed il grande aiuto che mi avete dato ed in particolare per essermi sempre stato vicino in ogni momento, esortandomi ad insistere e perseguire in questo percorso, rendendomi disponibile anche l'indisponibile, e dimostrando sempre massima pazienza, nei momenti più oscuri e per avermi consentito di vivere con serenità quest'avventura nel mondo della ricerca, siete voi i reali artefici di questo traguardo, con la vostra presenza, con i vostri insegnamenti, con le vostre economie e con le vostre esperienze, quando ne ho avuto bisogno e quando avete rispettato tutte le mie scelte, giuste o sbagliate, ed è solo con voi che mi sento di condividere i frutti del mio lavoro.

GRAZIE

~~~~~