



**SOCIETÀ ITALIANA DI BIOCHIMICA
E BIOLOGIA MOLECOLARE**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA



**24^a RIUNIONE NAZIONALE
“A. Castellani”
DEI DOTTORANDI DI RICERCA
IN DISCIPLINE BIOCHIMICHE**

RIASSUNTI

BRALLO DI PREGOLA (PAVIA)

11 - 15 giugno 2012

RIASSUNTI delle RELAZIONI dei DOTTORANDI

SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE AS AN AUTOCRINE SURVIVAL FACTOR FOR HUMAN GLIOBLASTOMA STEM CELLS

Elena Riccitelli, P. Giussani, L. Riboni, Department of Medical Chemistry, Biochemistry and Biotechnology, University of Milan. E-mail: elena.riccitelli@unimi.it

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is an intermediate of sphingolipid catabolism formed from sphingosine by the action of sphingosine kinases (SphK). S1P represents a key regulator of crucial processes in different cells and several lines of evidence support its implication as an onco-promoter signal favouring growth, invasivity and survival of different cancer cells. S1P appears to be involved as an important mediator also in human glioblastomas, the most frequent and aggressive intracranial cancers. The use of the alkylating agent temozolomide in glioblastoma therapy has improved patient survival, but drug resistance mechanisms limit its benefits. Recent evidence indicates that glioblastoma stem-like cells (GSCs), a subpopulation of cells with the exclusive ability to self-renew and maintain the tumor, might contribute to glioblastomas aggressiveness and resistance to therapy.

The aim of this study was to investigate the possible role of S1P in GSCs survival properties. To this purpose we established a GSC line derived from the human U87 glioblastoma cell line (U-SC). As cell model we also used GSCs isolated from primary cultures of human glioblastomas (L0627-SC) which appear to reproduce the genotypic and phenotypic characteristics of glioblastomas more faithfully than standard glioma cell lines. We found that both GSC models efficiently form neurospheres in mitogen-defined medium, and express high levels of recognized neural-stem cell markers CD133, nestin and CD15. Moreover, GSCs exhibited resistance to clinically relevant concentrations of the chemotherapeutic agent temozolomide, and this resistance was not related to the expression of the DNA repair protein MGMT, a major contributor to temozolomide resistance. Intriguingly, concomitant treatment with temozolomide plus a SphK inhibitor induced GSCs sensitivity to drug toxicity. Furthermore S1P administration promoted cell survival after this co-treatment. Altogether these results strongly support a role of S1P as drug resistance mediator in GSCs. Further analyses revealed the presence of S1P not only inside the cells, but also in the culture medium from both GSCs and parental U87 cells. Notably the extracellular S1P level was found much higher in GSC models than in the parental one. In particular the ratio between extracellular and intracellular S1P was 1:10 and 1:1 in U87 and U-SC respectively. Of relevance also L0627-SC can efficiently produce S1P and the ratio between its extracellular and intracellular level is 1:1, thus involving GSCs as a potential important source of extracellular S1P. S1P presence in GSCs medium could be consequent to SphK secretion, as it occurs in some cell types. However, enzyme activity assays excluded this possibility, suggesting that an efficient transport mechanism is involved in S1P export from GSCs. Future studies will verify this hypothesis.

Altogether our data implicate GSCs as an important S1P source in the extracellular microenvironment, which acts as an autocrine factor contributing to their drug-resistant properties.

IL PARTENOLIDE INDUCE MORTE IN CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG-63 MEDIANTE UN MECCANISMO CASPASI-INDIPENDENTE, MEDIATO DA AIF

Roberta Martinez, A. D'Anneo, D. Carlisi, M. Lauricella e G. Tesoriere, Università degli Studi di Palermo, Dpt di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche. E-mail: roberta.martinez@unipa.it

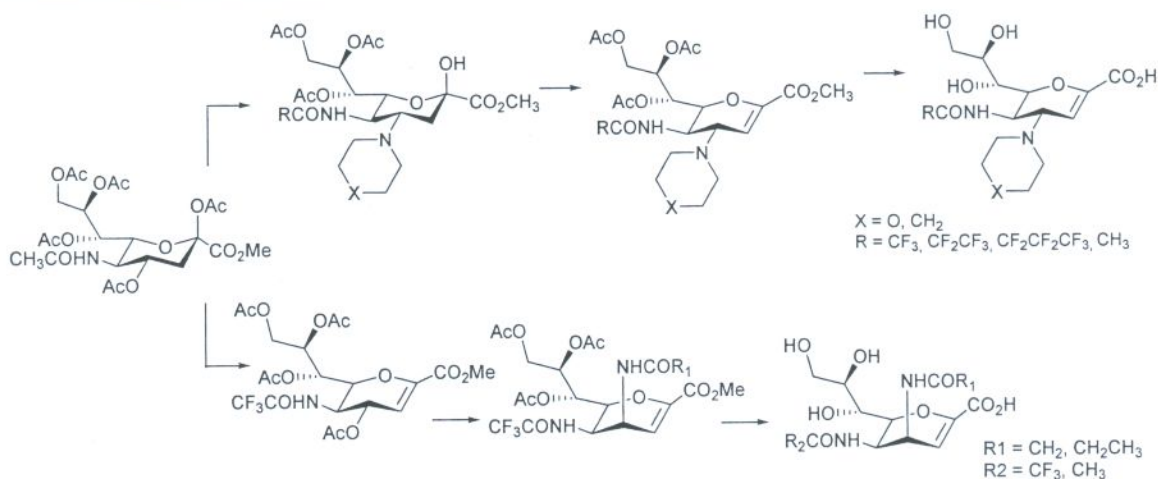
Il Partenolide (PN) è un composto di origine naturale, estratto dall'erba medicinale *Tanacetum Parthenium*, noto per le sue proprietà antinfiammatorie. Negli ultimi anni questa molecola ha suscitato un notevole interesse in campo oncologico per la sua tossicità selettiva nei confronti delle cellule tumorali. Il meccanismo tramite il quale il PN determina morte nelle cellule cancerose non è stato ancora chiarito in dettaglio. I nostri studi hanno lo scopo di definire il meccanismo d'azione del PN in cellule di osteosarcoma umano MG-63, scelte per la loro particolare sensibilità all'azione del composto. I risultati ottenuti indicano che, già dopo 3-5 ore di trattamento con il PN, un'alta percentuale di cellule presenta condensazione e frammentazione della cromatina, evidenziata mediante colorazione con Hoechst 33342, mentre soltanto poche cellule presentano un danno di membrana, evidenziato mediante colorazione con ioduro di propidio (PI). Prolungando il tempo di trattamento (5-14 ore) il contenuto di ATP decrementa, mentre aumenta la percentuale di cellule positive al PI, indicando la presenza di eventi necrotici. Questi effetti non sono prevenuti dallo z-VAD-fmk o da altri inibitori delle caspasi, suggerendo che il PN determina nelle cellule MG-63 un evento di morte caspasi-indipendente. Di particolare interesse è l'incremento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che si osserva già dopo poche ore di trattamento. La produzione dei ROS prevede il coinvolgimento dell'enzima NADPH ossidasi e della chinasi ERK1/2; infatti impiegando inibitori della NADPH ossidasi, quali apocinina e DPI, e l' U0126, un inibitore di ERK1/2, si

osserva una marcata riduzione dei ROS. Il ruolo centrale svolto dai ROS nel meccanismo d'azione del PN è documentato dall'osservazione che l'antiossidante N-acetilcisteina previene gli effetti indotti dal composto, consistenti in: distacco delle cellule dal substrato, arrotondamento della cellula e riduzione del suo volume; condensazione e frammentazione della cromatina e danni di membrana. Inoltre i ROS causano deplezione dei tioli, inibizione dell'attività del fattore di trascrizione NF- κ B e attivazione della chinasi JNK. L'incremento dei ROS e l'accumulo dello ione calcio determinano l'apertura del "poro di transizione della permeabilità mitocondriale" (PTP), situato nella membrana mitocondriale interna, con conseguente caduta del potenziale di membrana ($\Delta\psi$ m). La caduta del $\Delta\psi$ m è annullata dall'impiego di inibitori delle componenti proteiche del PTP, quali la ciclosporina A e il DIDS. Un ruolo di particolare rilievo nel meccanismo di morte è esercitato da AIF (Apoptosis Inducing Factor), il quale, nella prima fase di trattamento, è rilasciato dal mitocondrio e trasloca nel nucleo, determinando condensazione e frammentazione della cromatina. È interessante notare che il silenziamento di AIF annulla tanto i segni apoptotici, quali condensazione e frammentazione della cromatina, che i segni necrotici determinati dal PN. Complessivamente i nostri studi evidenziano una modalità d'azione del PN, al momento sconosciuta, secondo la quale il composto si avvale, nelle cellule MG-63, di un meccanismo indipendente dalle caspasi, mediato da AIF.

SYNTHESIS OF C-4 AND C-5 MODIFIED NEURAMINIC ACID GLYCAL DERIVATIVES POTENTIALLY USEFUL AS NEURAMINIDASES INHIBITORS

Irene Sofia Agnolin, Rota, P.; Gregorio, A.; Anastasia, M; Allevi, P., Department of Chemistry, Biochemistry and Biotechnology for the Medicine, University of Milan. E-mail: irene.agnolin@unimi.it

Sialic acids, in particular N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), play an important role in a series of biochemical and biological processes, including molecular recognition, cell adhesion and differentiation phenomena. Moreover, Neu5Ac glycal derivatives have received a considerable attention in these last years due to their potential transition-state inhibitory activity against sialidases (NAs, neuraminidases) of viruses and bacteria. Actually, the clinically used NAs inhibitors (Zanamivir and Oseltamivir) derive from the natural 2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac2en, DANA), and have (oxa)cyclohexene scaffolds to mimic the intermediate of oxonium-like geometry in the enzymatic cleavage of Neu5Ac from the cell surface glycoproteins. In addition, several structure-activity studies reveal that C-4 position of Neu5Ac2en derivatives is one of the most important key spots for the NA-substrate interaction. Furthermore, the position C-5 as well is known to be fundamental for the interaction with NA, indeed replacing the acetamido group of DANA with a trifluoroacetamido, to obtain 5-trifluoroacetamidoNeu5Ac2en (FANA), a great increase of inhibitory activity is observed. For these reasons, object of my PhD work is the synthesis of some 5-N-perfluoroacylated and 5-N-acylated glycals of neuraminic acid with different substituents at C-4 position resulting from the set up of rapid and efficient synthetic procedures.



Scheme 1: Synthetic procedures to afford 4 α , β substituted DANA and FANA derivatives

In particular, we adopt two different pathways: the first one involves the insertion of cyclic amines (morpholine or piperidine) at 4 α position of saturated 5-N-acetylated and 5-N-perfluoroacetylated neuraminic acid derivatives, followed by the glycal formation reaction and the final selective hydrolysis of the esteric functions; the second one consists in the introduction of amido groups at position 4 β , through a driven Ritter reaction. In this case, we perform the reaction on protected FANA, used as key tool to bypass the oxazoline compound, normally formed by acidic treatment of peracetylated DANA. In fact, the oxazoline ring formation, deriving from the intramolecular nucleophilic attack of the C-5 acetamido group to the allylic carbocation at C-4, is contrasted by the presence of the electron withdrawing atoms of fluorine, so the nitrile solvent can attack and