

# Meeting

IBIM-CNR STEBICEF-UNIPA



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO



## LIBRO degli ABSTRACT

**Bio**  
TECNOLOGIE  
RICERCA DI BASE  
INTERDISCIPLINARE  
TRASLAZIONALE  
IN AMBITO BIOMEDICO



**ELGA**

**eppendorf**



**PALERMO 27-28 GIUGNO 2013**

Area della Ricerca di Palermo Via Ugo La Malfa 153



**Bio**  
**TECNOLOGIE**  
RICERCA DI BASE  
INTERDISCIPLINARE  
TRASLAZIONALE  
IN AMBITO BIOMEDICO

Comitato Scientifico

Marta Di Carlo (IBIM)  
Vincenzo Cavalieri (STEBICEF)  
Mirella Ciaccio (IBIM)  
Maria Assunta Costa (IBIM)

Segreteria Scientifica

Francesca Costantini (IBIM)  
Luca Caruana (IBIM)  
Domenico Nuzzo (IBIM)  
Pasquale Picone (IBIM)  
Anna Bonomolo (IBIM)

[www.ibim.cnr.it](http://www.ibim.cnr.it)

[www.unipa.it](http://www.unipa.it)



aumenta nelle cellule A375 stimulate per 24h e 48h, suggerendo un ruolo non secondario delle molecole di classe II nella migrazione cellulare e nella diffusione metastatica. In entrambe le linee cellulari di melanoma stimulate per 24h e 48h, la quantità di esosomi secreti e in proporzione la quantità delle molecole di classe II e dei recettori di adesione come MCAM e ICAM localizzate in queste vescicole, sono superiori alla quantità rilasciata dalle cellule non stimulate. I risultati ottenuti forniscono alcune interessanti informazioni sulle conseguenze dell'associazione tra il TCR e le molecole MHC di classe II mimato da uno specifico anticorpo anti-MHC di classe II. In particolare, questo studio suggerisce che il signalling mediato dalle molecole di classe II potrebbe influire sull'adesione del melanoma alla matrice extracellulare, sull'interazione cellula-cellula, sul ruolo degli esosomi nel microambiente cellulare e quindi sulla diffusione metastatica del melanoma.

### **Attività antitumorale del nuovo inibitore di Akt, SC66, in cellule di epatocarcinoma.**

**A. Cusimano e M. Cervello.**

*Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare "Alberto Monroy", CNR, Palermo, Italia.*

Il tumore epatico è uno dei tumori più diffusi ed è la quinta causa di morte al mondo, con un'incidenza in aumento. Sebbene i più importanti fattori di rischio del carcinoma epatico siano noti, i meccanismi molecolari che portano alla trasformazione tumorale degli epatociti risultano ancora poco chiari. Unico trattamento parzialmente efficace del tumore al fegato è la resezione chirurgica ma solo quando la malattia è colta nelle fasi precoci. Tutti gli altri trattamenti ad oggi sperimentati, come il trattamento con i chemioterapici classici, risultano inefficaci. Di fondamentale importanza si rivela, quindi, la comprensione degli eventi molecolari che portano allo sviluppo dell'epatocarcinoma (HCC), sia al fine di individuare nuovi elementi utili per una diagnosi precoce sia per lo sviluppo di terapie target specifici efficaci nel trattamento del tumore. Il pathway di PI3K/Akt riveste un ruolo chiave nella regolazione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare. Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi farmaci specifici per il signaling di PI3K/Akt, tra questi il nuovo inibitore di Akt, SC66. Questo inibitore ha un'attività duale: interferisce direttamente con il dominio PH di Akt responsabile dell'interazione con PIP3 e facilita l'ubiquitinazione di Akt, inibendone in entrambi i casi l'attività. In diversi tipi di tumore, incluso l'HCC, sono state riscontrate alterazioni della via di segnalazione di Akt. Abbiamo, quindi, investigato gli effetti di SC66 in cellule di HCC. Saggi MTS mostrano che l'SC66 inibisce la vitalità cellulare in maniera dose- e tempo-dipendente. La linea cellulare maggiormente resistente al trattamento con SC66 è la linea di HCC Huh7, con una  $IC_{50}$  di 3.1 e 2.8  $\mu\text{g/ml}$  rispettivamente a 48 e 72 ore, mentre la più sensibile è la linea cellulare Hep3B con una  $IC_{50}$  di 0.75 e 0.5  $\mu\text{g/ml}$  rispettivamente a 48 e 72 ore. Dopo il trattamento con SC66 le cellule Hep3B perdono i contatti cellula-matrice e assumono una forma arrotondata; inoltre, la diminuzione dei livelli di caderina-E, e  $\beta$ -catenina, l'inibizione di fosfo-Fak e la redistribuzione di Vimentina indicano che il trattamento con SC66 induce Anoikis, una forma di apoptosi conseguente alla perdita dei segnali di sopravvivenza ancoraggio dipendenti. L'induzione di apoptosi è confermata anche da saggio Tunnel, dalla diminuzione dei livelli delle proteine anti-apoptotiche Bcl2 e survivina e dalla digestione di PARP1, osservati attraverso analisi di Western blot. Poiché è stato dimostrato che alterazioni del metabolismo ed una alta produzione di ROS causano anoikis, sono stati valutati i livelli di ROS dopo trattamento con SC66. Il trattamento con SC66 induce una forte produzione di ROS, il co-trattamento con l'antiossidante N-acetil cisteina (NAC) reverte l'effetto dell'SC66 e le cellule rimangono vitali ed adese alla matrice extracellulare. In conclusione, l'SC66 inibisce la proliferazione e induce apoptosi in linee cellulari di HCC sia inibendo Akt, quindi attraverso una diretta azione di inibizione di un pathway di proliferazione, sia tramite induzione di stress ossidativo. L'SC66 ha, quindi, una forte attività antitumorale che ne suggerisce un possibile impiego nelle trattamenti dell'epatocarcinoma.

### **Clivaggio e shuttling nucleo-citoplasmatico della proteina Sirt1, in cellule di carcinoma mammario MDA-MB231.**

**A. De Blasio, M. Montalbano, R. Di Fiore, M. Marcatti e R. Vento.**

*Laboratorio di Biochimica, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Università degli studi di Palermo, plesso Policlinico, Via del Vespro n° 129, 90127 Palermo.*

Sirt1 è una proteina nota per il suo ruolo di istone deacetilasi  $\text{NAD}^+$  dipendente che sembra essere coinvolta in una ampia gamma di processi cellulari, quali regolazione genica, controllo dello stato metabolico, meccanismi di sopravvivenza allo stress. Dalla letteratura emergono dati contrastanti concernenti la funzione di Sirt1 nei tumori, le vengono infatti attribuiti ruoli sia di oncogene che di soppressore tumorale, argomento fortemente dibattuto. A conferma di ciò, la localizzazione subcellulare e la funzione di Sirt1 variano nei differenti tipi cellulari [1]. E' anche noto che Sirt1 risulta frequentemente clivata in varie linee cellulari grazie ad attività proteolitiche nucleari [2]. Questo studio ha lo scopo di identificare lo stato della proteina Sirt1 in cellule di carcinoma mammario MDA-MB231. I nostri risultati dimostrano che Sirt1 risulta espressa a bassi livelli nella forma "full length", mentre si riscontrano alti livelli di sue forme clivate sia nucleari che citoplasmatiche. Sulla base di analisi bioinformatiche sui possibili siti di clivaggio di Sirt1 (Peptide Cutter Prediction-ExPASy), abbiamo ipotizzato che alcune delle forme di clivaggio da noi osservate, possano essere attribuite all'azione della caspasi-8. Abbiamo evidenziato all'interno del nucleo di cellule MDA MB231,

la forma procaspasica (55 kDa) accompagnata dalla presenza di frammenti attivi (48-18 kDa). Abbiamo, anche evidenziato una ulteriore forma della caspasi-8 a maggior peso molecolare (75 kDa) che, secondo dati bibliografici, potrebbe essere attribuita ad una forma di sumoilazione, da alcuni indicata come segnale di import nucleare [3]. Abbiamo pertanto effettuato analisi su immunoprecipitati della caspasi-8 sviluppati contro anticorpo anti-SUMO1, dimostrando che nel nucleo di cellule MDA-MB231, la caspasi-8 è anche in forma sumoilata. Allo scopo di dimostrare che i frammenti di Sirt1 da noi osservati, sono effettivamente frutto dell'azione della caspasi-8, abbiamo trattato le cellule MDA-MB231 con un inibitore generico delle caspasi (Z-VAD-FMK). I risultati dimostrano il decremento nella frazione nucleare dei livelli di una delle forme di clivaggio di Sirt1, un frammento c-terminale di 65 kDa (p65-Sirt1). Dati preliminari sembrano indicare che il frammento p65-Sirt1 possa essere esportato nel citosol. In cellule MDA-MB231 trattate con Leptomomicina B (inibitore dell'export nucleare), analisi di immunofluorescenza e analisi di western blotting effettuate su frazioni citosolico-nucleari, hanno evidenziato che il frammento p65-Sirt1 decrementa nella frazione citosolica e si accumula nel nucleo. E' stato suggerito che frammenti della proteina Sirt1 possano sequestrare il citocromo c svolgendo così un ruolo anti-apoptotico [2]. Nostrì studi futuri avranno l'obiettivo di verificare tale aspetto. **Bibliografia:** [1] Houtkooper RH et al. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; [2] Oppenheimer H et al. *Arthritis Rheum.* 2012; [3] Besnault-Mascard L et al. *Oncogene.* 2005.

## Effetti del Trastuzumab sul proteoma di cellule di carcinoma mammario over-esprimenti HER-2.

G. Di Cara<sup>1</sup>, G. Marengo<sup>2</sup>, N.N. Albanese<sup>1,3</sup>, M.R. Marabeti<sup>1</sup>, R. Musso<sup>1</sup>, P. Cancemi<sup>1,4</sup> e I. Pucci-Minafra<sup>1</sup>.

1. Centro di Oncobiologia Sperimentale (C.OB.S.), Casa di Cura di Alta Specialità La Maddalena, Palermo; 2. Dipartimento Oncologico di III livello, Casa di Cura di Alta Specialità La Maddalena, Palermo; 3. Dipartimento di Fisica e Chimica, Università di Palermo; 4. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche, Università di Palermo. [lucadicar@gmail.com](mailto:lucadicar@gmail.com)

La proteina HER-2 appartiene alla superfamiglia dei recettori a tirosina-kinasi codificati dai geni *erbB*. L'attivazione di tale recettore, conseguente alla formazione di omo- o etero-dimeri con gli altri membri della famiglia degli HERs, innesca vie di segnalazione stimolanti la proliferazione, il differenziamento e la sopravvivenza delle cellule. L'over-espressione di HER-2 caratterizza il 30% circa dei carcinomi alla mammella a fenotipo invasivo ed è associata alla resistenza all'apoptosi, alla promozione dell'angiogenesi, all'incremento della motilità, della proliferazione cellulare e della tendenza a formare metastasi da parte delle cellule neoplastiche. Su tali basi HER-2 è considerato un marcatore prognostico e predittivo di neoplasia e, più recentemente, è stato efficacemente utilizzato quale bersaglio terapeutico per un farmaco biotecnologico denominato Trastuzumab, il cui principio attivo, un anticorpo monoclonale di origine murina e umanizzato mediante ingegneria genetica, è diretto contro il segmento extracellulare del recettore HER-2. Tuttavia, entro un anno dall'inizio del trattamento nella maggior parte delle pazienti si verifica l'insorgenza di fenomeni di insensibilità all'azione anti-neoplastica di tale farmaco. A tale proposito il presente studio è stato finalizzato all'analisi degli effetti a breve e a lungo termine del Trastuzumab sulle cellule di carcinoma mammario della linea SKBR-3, over-esprimenti il recettore HER-2. Gli effetti del Trastuzumab sulla proliferazione cellulare sono stati valutati mediante saggi di crescita con dosi crescenti del farmaco. Successivamente, al fine di ottenere cloni sensibili (TS) e resistenti (TR) le cellule SKBR-3 sono state trattate rispettivamente per 7 e 75 giorni con 10ug/ml di Trastuzumab. Gli estratti proteici dei cloni ottenuti sono stati opportunamente purificati, quantificati e sottoposti ad elettroforesi 2D-IPG al fine di tracciare i profili proteomici nelle diverse condizioni sperimentali. Le proteine differenzialmente espresse in risposta alle diverse condizioni sperimentali sono state identificate mediante spettrometria di massa MALDI-TOF e catalogate in gruppi funzionali in accordo con i database proteomici disponibili online. I risultati indicano come la risposta cellulare al trattamento si articola in due fasi: nella fase di sensibilità al Trastuzumab le cellule subiscono un rallentamento del ritmo proliferativo concomitante alla regressione del metabolismo, come si deduce dalla diminuzione di livelli di espressione degli enzimi della glicolisi; il trattamento prolungato sembra indurre nelle cellule l'acquisizione della refrattarietà all'azione del farmaco e la reversione al fenotipo parentale. Inoltre, dall'analisi dei profili proteomici si evince che le proteine differenzialmente espresse appartengono a 12 gruppi funzionali, con un maggiore coinvolgimento degli enzimi del metabolismo, delle proteine del citoscheletro, delle Heat Shock Proteins (HSPs), delle proteine leganti il calcio e delle proteine della detossificazione. I risultati del presente studio rappresentano, a nostro avviso, un deciso passo avanti nella conoscenza dei meccanismi cellulari responsabili della risposta al Trastuzumab, per l'allestimento di panelli terapeutici sempre più mirati per la cura del carcinoma mammario. Il presente studio rappresenta la prosecuzione di una ricerca di recente pubblicata su: *Anticancer Research* 2013 Feb;33(2):489-503.