



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA

- XXII ciclo -

STUDIO DEI MECCANISMI DI RESISTENZA A FARMACI ANTI-ANGIOGENICI IN MODELLI TUMORALI

Direttore della Scuola : *Ch.ma Prof.ssa Paola Zanovello*

Supervisore : *Dott. Stefano Indraccolo*

Dottoranda : *Giorgia Nardo*

| | |
|---|-----------|
| RIASSUNTO | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1. INTRODUZIONE | 5 |
| 1.1 NEOPLASIE E METABOLISMO GLICOLITICO | 5 |
| 1.2 EFFETTO WARBURG: MECCANISMI MOLECOLARI | 9 |
| 1.3 IPOSSIA E TUMORI | 11 |
| 1.4 L'ANGIOGENESI NEI TUMORI | 13 |
| 1.5 RUOLO DELL'AMPK NEI TUMORI | 23 |
| 2. SCOPO DELLA TESI | 29 |
| 3. MATERIALI E METODI | 31 |
| 3.1 COLTURE CELLULARI | 31 |
| 3.2 CONDIZIONI DI COLTURA | 31 |
| 3.3 MISURA DELLE CONCENTRAZIONI DI GLUCOSIO E DI LATTATO | 32 |
| 3.4 QUANTIFICAZIONE DELL' APOPTOSI TRAMITE ANNESSINA V | 32 |
| 3.5 IN CELL WESTERN BLOT | 32 |
| 3.6 PRC E REAZIONE DI SEQUENZA | 33 |
| 3.7 ESTRAZIONE DELL'RNA, RT-PCR E REAL-TIME PCR CON SYBR GREEN | 36 |
| 3.8 WESTERN BLOT | 38 |
| 3.9 MISURA DEI LIVELLI DI ATP | 40 |
| 3.10 ANALISI DEL CICLO CELLULARE CON IODURO DI PROPIDIO | 40 |
| 3.11 STUDI IN VIVO | 40 |
| 3.12 TRASDUZIONE IN VITRO DELLE CELLULE OC316 E IGROV-1 MEDIANTE VETTORI LENTIVIRALI | 42 |
| 3.13 IMAGING OTTICO DEI TUMORI | 42 |
| 3.14 ANALISI ISTOLOGICA | 42 |
| 3.15 ANALISI AL MICROSCOPIO CONFOCALE | 43 |
| 3.16 IMAGING METABOLICO | 44 |
| 3.17 ANALISI STATISTICHE | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 4. RISULTATI | 47 |
| 4.1 CORRELAZIONE TRA FENOTIPO GLICOLITICO E SENSIBILITÀ ALL'IPOSSIA | 47 |
| 4.2 MANTENIMENTO DEL FENOTIPO GLICOLITICO IN VIVO | 51 |
| 4.3 CORRELAZIONE TRA IPOSSIA E DEPRIVAZIONE DI GLUCOSIO | 52 |
| 4.4 STUDI IN VIVO: TRATTAMENTO A BREVE TERMINE DI TUMORI SPERIMENTALI CON FARMACI ANTI-ANGIOGENICI | 53 |
| 4.4 IMAGING METABOLICO DOPO TRATTAMENTO CON L'ANTICORPO ANTI-VEGF | 58 |
| 4.5 TRATTAMENTI A LUNGO TERMINE CON L'ANTICORPO ANTI-VEGF | 59 |
| 4.6 ATTIVAZIONE DELLA VIA DI AMPK | 62 |
| 4.7 DIVERSA PROLIFERAZIONE CELLULARE NELLE LINEE IGROV-1 E OC316 IN CONDIZIONI DI STRESS | 67 |
| 5. DISCUSSIONE | 69 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 77 |

RIASSUNTO

Il processo di angiogenesi è fondamentale per favorire lo sviluppo dei tumori e la loro disseminazione metastatica. Per tali motivi, la terapia anti-angiogenica è recentemente entrata a far parte delle terapie utilizzate contro il cancro. In modelli pre-clinici e nei pazienti, gli inibitori dell'angiogenesi ed in particolare la neutralizzazione del VEGF hanno dimostrato tuttavia di avere benefici generalmente di breve durata. Sebbene alcuni meccanismi di resistenza siano stati dimostrati, i parametri responsabili delle diverse risposte dei tumori alla terapia anti-angiogenica rimangono ancora ampiamente sconosciuti. Le terapie anti-angiogeniche, colpendo la vascolatura, inducono nel tumore un aumento dell'ipossia ed una riduzione dei nutrienti. La valutazione degli effetti dell'ipossia sulle cellule tumorali è dunque fondamentale per consentire di comprendere meglio come i tumori reagiscano e si adattino al blocco dell'angiogenesi, con lo scopo finale di migliorare la risposta terapeutica.

In uno studio precedente avevamo osservato come linee di carcinoma ovarico rispondessero in maniera eterogenea in termini di sopravvivenza a condizioni di ipossia. In questo progetto abbiamo esteso tali osservazioni ad altre linee tumorali andando a correlare le risposte ai trattamenti in condizioni ipossiche ad aspetti metabolici delle cellule tumorali ed in particolare al loro fenotipo glicolitico.

Abbiamo dimostrato come la tossicità da ipossia dipenda almeno in parte dall'esaurimento del glucosio nel terreno di coltura e sia dunque maggiore nel caso di cellule tumorali metabolicamente dipendenti dal glucosio - quali le cellule OC316 - rispetto a cellule dipendenti da altri substrati per la produzione di ATP, quali le cellule IGROV-1. Tali linee tumorali sono state quindi utilizzate come prototipi per investigare come tumori con diverso fenotipo glicolitico rispondano alla terapia con un anticorpo neutralizzante il VEGF.

Abbiamo osservato che nei tumori trattati con un breve ciclo di anti-VEGF si ha una marcata riduzione dei livelli di glucosio e di ATP ed un aumento di ipossia rispetto ai tumori di controllo. Nei tumori altamente glicolitici tale trattamento causa una riduzione delle dimensioni e un aumento delle aree di necrosi, a differenza dei tumori scarsamente glicolitici, la cui vitalità non viene inizialmente compromessa. Quando i tumori vengono trattati cronicamente con anti-VEGF, i tumori altamente glicolitici diventano

tuttavia resistenti alla terapia mentre i tumori scarsamente glicolitici vanno incontro a progressiva regressione. Per approfondire le basi molecolari di tale fenomeno, abbiamo indagato l'attivazione di AMPK in questi tumori. AMPK è una chinasi che agisce come sensore dei livelli di ATP nelle cellule ed era dunque probabile che intervenisse nelle risposte cellulari alla terapia anti-angiogenica, viste le conseguenze metaboliche di tale trattamento. Quest'ultima parte del progetto ha consentito di scoprire un'anomalia a livello della via di AMPK nelle cellule OC316, rivelata da esperimenti *in vitro* in condizioni di stress quali l'ipossia e la deprivazione di glucosio. Tale difetto di attivazione di AMPK ha conseguenze su importanti vie metaboliche controllate da AMPK quali mTOR, il metabolismo dei lipidi e sulla proliferazione cellulare, e secondo la nostra ipotesi di lavoro, potrebbe spiegare i diversi comportamenti dei tumori ai trattamenti anti-angiogenici.

In conclusione, questo studio ha dimostrato come il metabolismo glicolitico delle cellule tumorali - valutabile anche nei pazienti con metodiche quali la ^{18}F FDG-PET - sia rilevante per predire la risposta dei tumori ad anticorpi anti-VEGF ed ha consentito di identificare il ruolo della via dell'AMPK nella risposta a tali farmaci.

ABSTRACT

Angiogenesis is fundamental for tumour growth and metastasis. Anti-angiogenic therapy has recently been added to the panel of cancer therapeutics. In pre-clinical models and patients, however, benefits from angiogenesis inhibitors, mainly targeting the VEGF pathway, have generally been short-term. Although several mechanisms have been postulated, mechanisms of resistance to anti-angiogenic drugs remain largely unknown. Anti-angiogenic therapies by hitting the vasculature increase hypoxia and cut nutrients availability in tumors. Understanding the complex effects of hypoxia on tumour cells is indeed necessary to unravel how tumours react and adapt to angiogenesis blockade, with the final aim to improve the therapeutic response.

In this project, we investigated the heterogeneous responses of tumor cells to severe hypoxia *in vitro* and correlated them to the outcome of anti-VEGF therapy *in vivo*.

By using a panel of cancer cell lines with different metabolic profiles, we demonstrated that cell toxicity under hypoxic conditions depends at least in part by exhaustion of glucose in the culture medium and it is enhanced in tumour cells metabolically dependent to glucose compared to cells dependent from other substrates for ATP production. Hypoxia resistant/highly glycolytic and hypoxia sensitive/poorly glycolytic cells have been identified and used to investigate how tumours with different metabolic features respond to anti-VEGF therapy.

We observed a marked reduction in glucose and ATP levels and an increase in hypoxia in tumours following treatment with an anti-VEGF antibody. In highly glycolytic tumours treatment caused reduction in tumour volume and increased areas of necrosis, whereas in poorly glycolytic tumours only minor changes were observed. After long-term administration of the anti-VEGF antibody, however, highly glycolytic tumours become resistant to the therapy, while poorly glycolytic tumours shrank. To investigate the molecular basis of this phenomenon, we analyzed AMPK activation in these tumours. AMPK is a kinase which acts like a sensor of the intracellular ATP levels and we hypothesize that it may coordinate cellular responses to anti-VEGF therapy, considering the metabolic consequences of this treatment. By *in vitro* experiments under hypoxia and glucose starvation, two conditions which mimic those found in the tumor microenvironment, we discovered a defect in the AMPK pathway in tumor cells

resistant to chronic anti-VEGF therapy. Poor activation of the AMPK pathway has important consequences on metabolic pathways governed by AMPK - including mTOR and the metabolism of lipids - and on cellular proliferation.

In conclusion this study demonstrated that the glycolytic phenotype of tumors - evaluable also in patients by techniques such as ¹⁸FDG-PET - and determination of the activity of the AMPK pathway are helpful parameters to predict tumor response to anti-VEGF treatment in experimental tumor models.

1. INTRODUZIONE

1.1 Neoplasie e metabolismo glicolitico

Le cellule dell'organismo utilizzano il glucosio per produrre energia, sotto forma di ATP, utile per sostenere le proprie funzioni fisiologiche. Il glucosio viene captato dalle cellule attraverso specifici trasportatori di membrana e dopo essere stato fosforilato dall'enzima esochinasi viene convertito a piruvato attraverso il processo della glicolisi. Il guadagno netto in termini energetici per molecola di glucosio è di due molecole di ATP per molecola di glucosio. Il piruvato poi, in assenza di ossigeno, viene ridotto a lattato che viene esportato all'esterno della cellula. In molte cellule di mammifero la glicolisi è inibita dalla presenza di ossigeno, che induce l'ossidazione del piruvato a CO_2 e H_2O a livello dei mitocondri nel processo della respirazione ossidativa con produzione netta di 38 molecole di ATP per molecola di glucosio. Tale fenomeno viene denominato "effetto Pasteur", dal nome di chi per primo lo ha intuito (Racker E, 1974). Vengono inoltre rilasciati idrogenioni (H^+) da entrambe le vie metaboliche, che acidificano l'ambiente extracellulare (Figura 1.1).

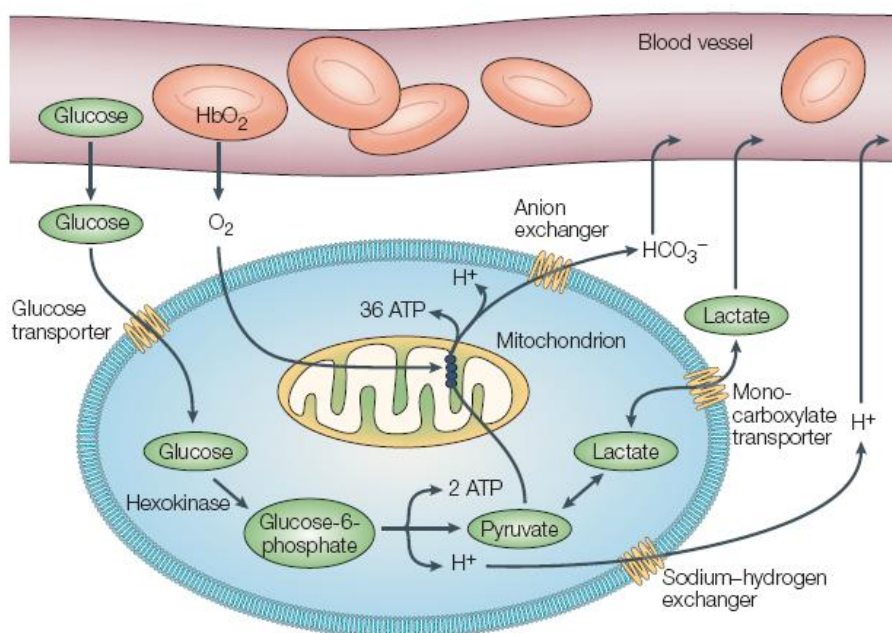


Figura 1.1: Metabolismo del glucosio in cellule di mammifero (immagine da *Gatenby RA and Gillies RJ, 2004*).

Questa versatilità del metabolismo, tipica delle cellule normali, risulta alterata nelle cellule tumorali. In queste, infatti, compare il fenomeno denominato “effetto Warburg” noto anche come glicolisi aerobica (*Warburg O, 1956*), che consiste nella tendenza delle cellule cancerose a convertire il glucosio ad acido lattico anche in presenza di ossigeno, conferendo loro un fenotipo glicolitico più marcato.

A prima vista potrebbe apparire controverso e svantaggioso questo adattamento acquisito dalle cellule tumorali, considerando che la glicolisi produce solo 2 molecole di ATP per glucosio, a fronte delle 38 molecole di ATP con la completa ossidazione. E' stato tuttavia dimostrato che tale fenomeno è fondamentale per favorire la sopravvivenza delle cellule tumorali sia durante la carcinogenesi, sia nelle fasi più avanzate del tumore metastatico. La carcinogenesi precoce, infatti, avviene in un ambiente non vascolarizzato, poiché l'epitelio iperplastico è fisicamente separato dallo stroma vascolarizzato dalla membrana basale. I substrati metabolici, l'ossigeno e il glucosio, devono perciò diffondere dai vasi attraverso la membrana basale e gli strati di cellule tumorali, ed il limite di diffusione dell'ossigeno risulta 100-150 μm . Le cellule neoplastiche, avendo acquisito delle mutazioni geniche che fanno perdere loro i normali controlli sulla proliferazione, continuano a riprodursi e la popolazione di cellule si allontana sempre di più dalle riserve di sangue. Tali cellule si trovano ripetutamente vicino al limite di diffusione dell'ossigeno in seguito alle fluttuazioni nell'emodinamica dei vasi sanguigni e vengono, così, a trovarsi a contatto con cicli di ipossia. L'ipossia periodica sembra avere un ruolo importante nel selezionare cellule nelle quali il metabolismo glicolitico anaerobico è regolato positivamente, poiché esse possono sopravvivere in assenza di ossigeno.

Le cellule tumorali devono inoltre fronteggiare l'acidità dell'ambiente intracellulare conseguente all'aumento della glicolisi. Esse si adattano al pH acido sovra-esprimendo trasportatori di membrana che hanno la funzione di riportare il pH intracellulare a valori fisiologici, a spese del pH extracellulare (*Pouyssegur J et al, 2006*). L'acquisizione del fenotipo glicolitico, inoltre, favorisce la progressione tumorale, poiché l'acidità extracellulare che ne risulta è mutagena per le cellule attigue al tumore (*Morita T, 1992*). Questo comportamento amplifica l'evoluzione della popolazione tumorale promuovendo la progressione maligna e l'adattamento alle strategie terapeutiche.

Come conseguenza di tali effetti, l'aumento della glicolisi è spesso associato allo sviluppo di metastasi (*Brizel DM, 2001; Walenta S, 2000*). Le cellule che migrano in

tessuti distanti viaggiano in capillari e arteriole precapillari e durante il loro percorso vanno incontro a episodi di ipossia o anossia, poiché proliferando possono occludere lo spazio intravascolare. Per questo motivo il processo di metastatizzazione tende a selezionare cellule capaci di sopravvivere anche in assenza di ossigeno, quindi quelle più glicolitiche e resistenti all'apoptosi indotta da ipossia e da acidità (Figura 1.2).

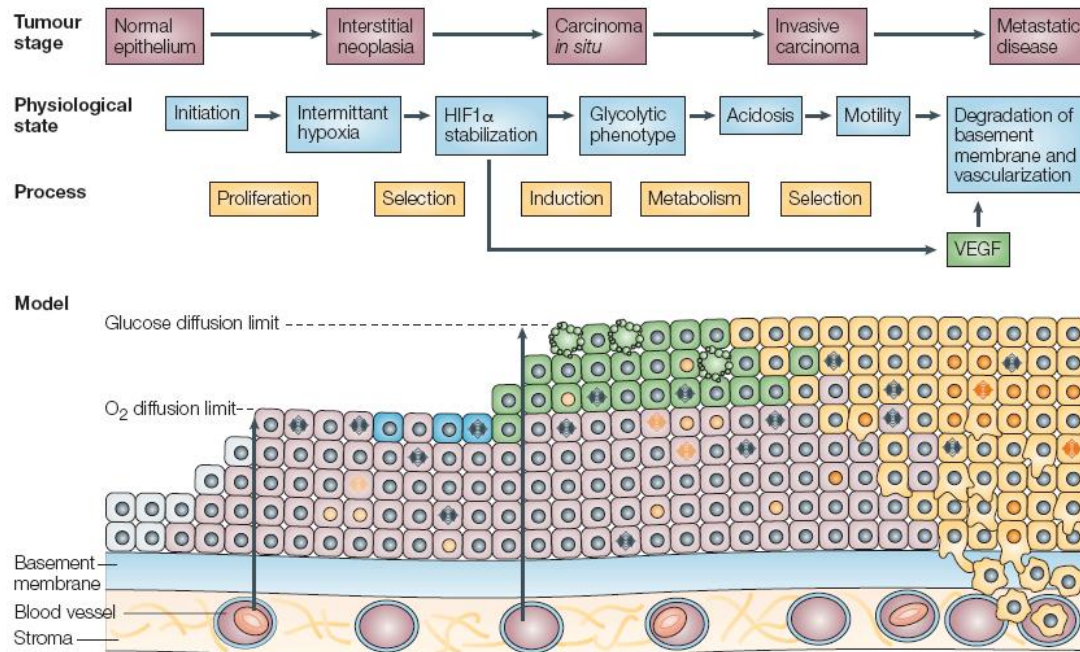


Figura 1.2: Modello delle interazioni cellula-ambiente durante la carcinogenesi (immagine da Gatenby RA and Gillies RJ, 2004).

Sebbene si possa regolare la velocità del processo glicolitico a vari livelli, molti studi sostengono l'ipotesi che il controllo del flusso glicolitico *in primis* risiede negli step del trasporto all'interno della cellula e nella successiva fosforilazione del glucosio (Rivenzon-Segal D et al, 2003; Mathupala SP et al, 1997).

I tumori caratterizzati da un sostenuta glicolisi mostrano, infatti, una più rapida captazione del glucosio dall'ambiente extracellulare. Su questo principio si basa l'applicazione clinica della PET (*positron-emission tomography*), che utilizza come tracciante l'analogo del glucosio ¹⁸fluorodeossiglucosio (FdG). Quest'ultimo viene catturato dai tumori grazie alla regolazione positiva dei trasportatori del glucosio. Tale tecnica consente l'individuazione di lesioni primarie e metastatiche con una sensibilità vicina al 90% (Czernin J and Phelps ME, 2002) e perciò viene utilizzata per diagnosticare e seguire l'evoluzione di molti tipi di tumore nei pazienti.

La recente osservazione del ruolo che assume la glicolisi nei tumori, sia durante la carcinogenesi sia nello stadio avanzato metastatico, ha suggerito la possibilità di considerarla un bersaglio terapeutico ed ha condotto all'individuazione di utili bersagli farmacologici :

- l'inibizione dell'esochinasi, l'enzima che converte il glucosio a glucosio-6-fosfato, da parte del 3-Bromopiruvato (3-BrPA) e della Lonidamina risulta ridurre la concentrazione intracellulare dell'ATP esercitando un effetto citotossico sulle cellule tumorali (*Xu RH et al, 2005*).
- la lattato deidrogenasi-A (LDH-A) è l'enzima in coda alla glicolisi, che converte il piruvato ad acido lattico. Risulta sovraespresso nelle cellule tumorali e studi preclinici *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato la stretta dipendenza della proliferazione cellulare dall'LDH-A, candidandolo come buon target farmacologico (*Fantin VR et al, 2006*);
- la piruvato deidrogenasi (PDH) converte il piruvato in acetil-CoA, il quale una volta metabolizzato nel ciclo di Krebs produce i donatori di elettroni NADH e FADH₂ coinvolti nella respirazione ossidativa mitocondriale. La PDH è inibita una volta fosforilata dalla piruvato deidrogenasi chinasi (PDK). Si è dimostrato che l'inibizione della PDK da parte del dicloroacetato (DCA) inverte il metabolismo delle cellule tumorali dalla glicolisi all'ossidazione del glucosio nei mitocondri. Questo fenomeno è associato a valle ad un aumento dell'apoptosi dipendente dai mitocondri (*Bonnet S et al, 2007*);
- molti studi, inoltre, sono stati svolti usando l'analogo del glucosio 2-desossiglucosio (2-DG), sfruttandone la capacità di ridurre l'*uptake* del glucosio con un meccanismo di competizione. Si è dimostrato che il 2-DG riduce le riserve di ATP intracellulare, promuovendo la morte cellulare *in vitro* (*Zhang XD et al, 2006*).

Tutti questi studi sostengono l'idea di poter associare alle terapie tradizionali nuovi farmaci che inibiscano la glicolisi tumorale.

E' stato inoltre osservato che i tumori possono presentare una diversa intensità del fenotipo glicolitico, come dimostrato anche dal diverso grado di captazione del ¹⁸FdG in pazienti con diverse neoplasie che si sono sottoposti ad una PET (*Bos R et al, 2002*).

1.2 Effetto Warburg: meccanismi molecolari

I meccanismi molecolari che portano all'attivazione costitutiva della glicolisi aerobica non sono ancora del tutto ben definiti ma negli ultimi anni diversi studi hanno evidenziato come questo fenomeno possa essere legato all'attivazione di alcuni oncogeni o inibizione di particolari oncosoppressori (Figura 1.3).

Un fattore responsabile dell'effetto Warburg è la proteina HIF-1 α (Hypoxia-Inducibile Factor-1 α). HIF-1 α è una delle due sub-unità, l'altra è la proteina HIF-1 β , che costituiscono il fattore di trascrizione HIF-1. HIF-1 α è una proteina che viene stabilizzata ed è funzionale solo in condizioni di ipossia; in condizioni di normossia tale proteina viene degradata via proteosoma tramite la proteina VHL (Von Hippel Lindau). HIF-1 controlla più di 100 geni la cui attivazione è in parte dipendente dal tipo di cellula coinvolta e dalle interazioni funzionali di HIF-1 con altri fattori trascrizionali.

HIF-1 regola diversi geni codificanti enzimi coinvolti nella glicolisi come ad esempio aldolasi A e C, Enolasi 1, esochinasi 1 e 3, lattato deidrogenasi A, fosfofruttochinasi L, fosfoglicerato chinasi 1 e la Gliceraldeide-3-fosfo-deidrogenasi. Si ha così una modificazione del metabolismo cellulare ed un potenziamento del catabolismo anaerobico (*Semenza GL, 2002*); sono regolati anche geni implicati nel ristabilire i livelli d'energia nelle cellule, come i trasportatori di glucosio GLUT-1 e GLUT-2. HIF-1 reprime inoltre la fosforilazione ossidativa inibendo la conversione del piruvato in AcetilCoA, tramite l'induzione della piruvato deidrogenasi chinasi (PDK1). PDK1 fosforila ed inibisce il complesso piruvato deidrogenasi (PDH) comportando così una riduzione del metabolismo del piruvato attraverso il ciclo dell'acido citrico (*Papandreou I et al, 2006*). In condizioni di normossia tale proteina può essere stabilizzata, ad esempio a causa di mutazioni a livello del gene codificante per la proteina VHL, come avviene nel carcinoma renale (*Semenza G, 2007*), comportando un aumento della glicolisi aerobia. HIF-1 α può inoltre essere stabilizzato in condizioni di normossia da diversi fattori come l'amplificazione dei recettori della famiglia HER (ERBB2 e EGFR), dall'attivazione degli oncogeni *src* e *K-Ras*, o dall'attivazione delle vie di segnale delle MAPK o della via di PI3K-AKT (*Semenza GL, 2003*).

Un altro fattore implicato nell'effetto Warburg è le serin-treonin chinasi AKT. AKT si attiva dopo fosforilazione dei residui di treonina, presente nel dominio catalitico da parte della PDK1, e di serina, posta nel dominio carbossi-terminale da parte di mTORC2. AKT è in grado di aumentare l'assorbimento di glucosio e di aumentare la

glicolisi aerobica sia aumentando l'espressione di HIF-1 α tramite l'attivazione di mTORC1 sia in maniera indipendente da HIF-1 α . L'attivazione della via di AKT nelle cellule tumorali comporta un aumento dell'espressione di trasportatori di glucosio, una maggiore espressione, attività ed interazione mitocondriale dell'esochinasi II (Robey RB and Hay N, 2009) ed una maggiore attività della fosfofruttochinasi II (Vander Heiden MG et al, 2009). AKT, inoltre, aumenta la glicolisi e la produzione di lattato e la sua attivazione è stata dimostrata essere sufficiente ad indurre l'effetto Warburg in cellule tumorali (Elstrom RL et al, 2004).

Il gene *myc* codifica per un fattore di trascrizione che dimerizza con la proteina Max e lega specifiche sequenze nel DNA trans-attivando geni implicati nella biogenesi mitocondriale e ribosomiale, nel metabolismo energetico e nella regolazione del ciclo cellulare (Dang CV et al, 2009). Esso si trova spesso alterato da traslocazioni cromosomiali o amplificazioni geniche che comportano una de-regolazione della proteina MYC in diversi tumori umani. Tale gene è anch'esso implicato nell'attivazione diretta della glicolisi aerobica in quanto induce la trascrizione di numerosi geni legati alla glicolisi come HK2, l'enolasi 1, GLUT-1 e l'LDHA. (Kim JW and Dang CV, 2005). L'oncosoppressore p53, che è frequentemente mutato in numerosi tumori umani, stimola la respirazione mitocondriale tramite la diretta attivazione del gene SCO2. La proteina SCO2 è richiesta nell'assemblaggio della sub-unità COXII nel complesso del citocromo c ossidasi. La perdita di p53 o di SCO2 comporta uno *switch* dalla respirazione mitocondriale alla glicolisi aerobica, suggerendo che l'inattivazione di p53 nei tumori umani possa contribuire direttamente all'effetto Warburg (Matoba S et al, 2006). Un altro gene modulato da p53 è TIGAR (TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator) il quale inibisce la glicolisi riducendo i livelli del Fruttosio -2,6-bifosfato (Fru-2,6-P₂) un potente stimolatore della glicolisi ed inibitore della gluconeogenesi (Bensaad et al, 2006).

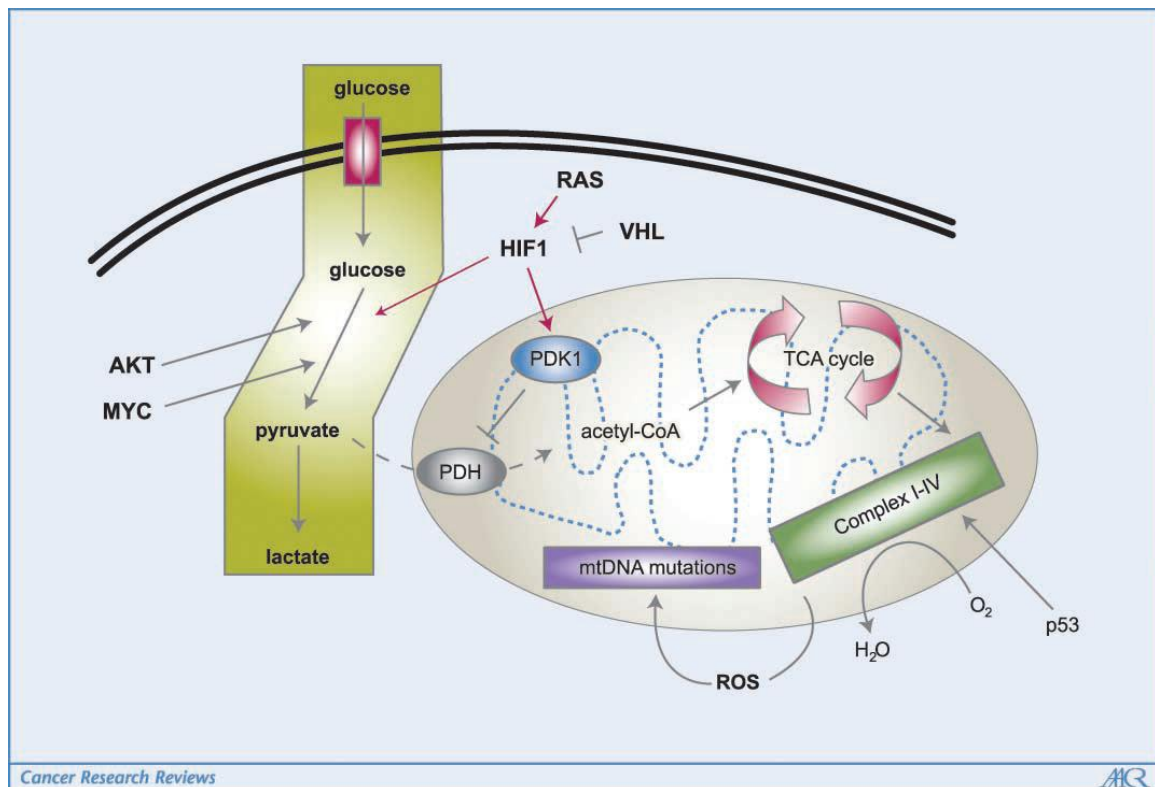


Figura 1.3: Figura rappresentativa delle principali vie molecolari coinvolte nell'effetto Warburg (immagine da Kim JW and Dang CV, 2006).

1.3 Ipossia e tumori

E' verosimilmente che l'esposizione ripetuta all'ipossia selezionerà le cellule con metabolismo glicolitico più accentuato sia durante la carcinogenesi, sia nella fase avanzata metastatica. L'ipossia dunque gioca un ruolo fondamentale nel fenotipo glicolitico e in generale è una caratteristica comune nei tumori.

* Ruolo dell'ipossia nei tumori

L'ossigeno è essenziale per lo sviluppo e la crescita degli organismi multicellulari.

I mammiferi, uomo compreso, hanno sviluppato un sofisticato meccanismo fisiologico per regolare finemente l'omeostasi dell'ossigeno attraverso la modulazione dell'espressione e dell'attività di determinate proteine. L'ipossia, intesa come una riduzione della pressione parziale di ossigeno rispetto ai livelli normali, è la più frequente tra le alterazioni di questa omeostasi ed è coinvolta in diverse situazioni fisiologiche come lo sviluppo embrionale, la guarigione delle ferite, nonché in svariate patologie umane tra cui quelle polmonari, quelle vascolari (sia acute che croniche) ed il cancro (Giaccia AJ et al, 2004).

Nei tessuti normali, la tensione d'ossigeno varia tra 20 e 100 mmHg, con una media di 50 mmHg, che corrisponde al 7% d'ossigeno. Nelle aree ipossiche dei tumori solidi la tensione d'ossigeno può scendere fino a 0 mmHg. In media però la tensione d'ossigeno in queste aree è di 10 mmHg, che corrisponde all'1.5%.

Le cellule rispondono tempestivamente ad una condizione ipossica avvertendo le variazioni di concentrazione dell'ossigeno. Questa risposta è mediata dall'attivazione di meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali che comportano l'espressione di numerosi geni. Per rispondere a questa condizione si attivano quindi numerosi fattori di trascrizione tra cui HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*).

Da tempo si è visto come la presenza di aree ipossiche nei tumori sia correlata ad una maggiore resistenza a radio- e chemioterapia; queste aree determinano un maggior potere invasivo, metastatico e comportano una maggior mortalità. Anche la sovraespressione di HIF-1, che si ritrova in numerosi tumori umani, è correlata ad una maggiore mortalità; è stata trovata una significativa associazione fra sovraespressione di HIF-1 α e mortalità dei pazienti in tumori cerebrali, della prostata, della cervice, dell'orofaringe, dell'ovaio e dell'utero (*Semenza GL, 2003*).

Recenti studi hanno evidenziato come HIF-1 medi una maggior resistenza a chemioterapici e radiazioni (*Semenza GL, 2002 ; Zhou J et al, 2006*). L'ipossia mediata da HIF-1 α fa sì che le cellule tumorali rispondano meno a terapie che comportano un danneggiamento del DNA perché provoca un rallentamento del ciclo cellulare ed una selezione di cloni resistenti all'apoptosi. Inoltre i chemioterapici hanno un'azione ridotta dovuta a:

- un'anormale rete vascolare che porta ad una ridotta diffusione del farmaco;
- la presenza di un ambiente acido che può alterare la struttura e l'attività dei farmaci basici;
- un aumento dell'espressione di trasportatori di membrana in grado di detossificare le cellule, di proteine leganti metalli pesanti e di enzimi deputati alla riparazione del DNA.

Si ha anche una resistenza alla radioterapia dovuta alla mancanza d'ossigeno e di radicali liberi che danneggiano il DNA e alla secrezione di citochine e fattori di crescita indotti da HIF-1, come VEGF e FGF, in grado di proteggere le cellule endoteliali del tumore.

* *Ipossia indotta da farmaci antiangiogenici*

L'ipossia e il conseguente aumento di HIF-1 α nei tumori possono anche essere indotti da una particolare modalità terapeutica di recente introduzione in oncologia, quale la terapia anti-angiogenica.

Il meccanismo d'azione degli agenti anti-angiogenici, che prevede l'inibizione della crescita di nuovi vasi sanguigni associati al tumore e la regressione della neovascolatura appena formata, suggerisce che la terapia riduca i livelli di ossigeno e di nutrienti all'interno del tumore.

Alcuni studi *in vivo* hanno peraltro dimostrato l'effettivo aumento dell'ipossia nei tumori trattati con inibitori dell'angiogenesi (Franco M *et al*, 2006). Questa variazione della concentrazione locale di ossigeno ha importanti implicazioni biologiche e quindi terapeutiche.

Ci si aspetterebbe che l'aumentata ipossia nel tumore riduca l'efficacia della combinazione con radioterapia o chemioterapia, rendendo controindicata l'associazione di questi due tipi di terapie tradizionali con quella anti-angiogenica. Paradossalmente, invece, si è visto che l'associazione di farmaci anti-angiogenici a radiazione e chemioterapia amplifica, piuttosto che diminuire l'attività dei più recenti trattamenti antitumorali sia in studi preclinici (Man S *et al*, 2002; Winkler F *et al*, 2004), sia in pazienti arruolati in *trial* clinici (Hurwitz HI *et al*, 2004).

Per comprendere meglio queste evidenze è utile riassumere i meccanismi molecolari e fisiologici alla base del processo dell'angiogenesi nei tumori e i meccanismi d'azione degli agenti attualmente proposti per contrastarlo.

1.4 L'angiogenesi nei tumori

* *Definizione di angiogenesi*

I vasi sanguigni costituiscono il veicolo tramite il quale l'ossigeno e i vari nutrienti raggiungono i tessuti. L'angiogenesi è un processo multifasico, che promuove la formazione di nuovi vasi sanguigni dalla rete vascolare preesistente. Tale fenomeno prevede l'attivazione, la proliferazione e la migrazione di cellule endoteliali (EC), la distruzione della membrana basale vascolare, il rimodellamento della matrice extracellulare dei tessuti, la formazione di vasi e di una rete vascolare, il reclutamento di

cellule di supporto, come le cellule muscolari lisce e i periciti e, infine, la connessione con il *network* vascolare preesistente.

Durante lo sviluppo embrionale i vasi sanguigni svolgono una duplice funzione: da una parte, grazie al loro apporto di nutrienti, consentono la crescita degli organi; dall'altra, inviando segnali trofici, promuovono la morfogenesi degli organi stessi. Nell'embrione, durante la vasculogenesi, i precursori delle cellule endoteliali danno origine ad una rete vascolare primitiva, che successivamente, durante l'angiogenesi, si espande e si sviluppa in un *network* vascolare altamente organizzato (Carmeliet P, 2005).

L'angiogenesi è un fenomeno che, oltre allo sviluppo embrionale, compare in altri processi fisiologici nell'adulto, come il ciclo ovarico, la gravidanza o durante i normali processi di riparazione, come la guarigione di ferite e la ricrescita dell'endometrio (Folkman J, 1995). Spesso l'angiogenesi insorge in risposta ad eventi fisio-patologici come l'infiammazione o è secondaria a situazioni di ipossia, ad esempio nell'infarto o nei tumori ed in malattie come artrite reumatoide, aterosclerosi, psoriasi, degenerazione maculare e retinopatia diabetica (Folkman J, 2007).

In condizioni normali l'angiogenesi è un processo altamente ordinato, sotto stretta regolazione da parte di fattori endogeni che la inducono e di altri fattori che la inibiscono (Tabella 1.1).

Tra i fattori che sostengono l'angiogenesi sono di rilievo:

- fattori di crescita solubili, come il VEGF, l'angiopoietina (Ang), il fattore di crescita dei fibroblasti basico (bFGF), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), il fattore- β di crescita trasformante (TGF- β), le metalloproteasi (MMPs);
- molecole associate alla membrana, come le integrine e le caderine;
- alcune chemochine, come l'interleuchina-8 (IL-8), il cui ruolo nell'angiogenesi normale non è ben stabilito, ma è documentato nell'angiogenesi tumorale (Yuan A et al, 2000);
- forze meccaniche mediate dal flusso del sangue sull'endotelio vascolare (Papetti M and Herman IM, 2002).

| Stimolatori | Inibitori |
|---|---|
| Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) | Angiostatina |
| Basic fibroblast growth factor (bFGF) | Endostatina |
| Fattore di crescita di epatociti (HGF) | Vasostatina |
| Fattore di crescita delle cellule endoteliali derivato dalle piastrine (PDGF) | Canstatina |
| Fattore di crescita trasformante- β (TGF- β) | Tumstatina |
| Fattore di crescita della placenta (PIGF) | Recettore solubile del VEGF |
| Interleuchina-8 | Inibitori delle metalloproteasi della matrice |
| Angiogenina | Frammento della prolattina 16-kDa |
| Angiopoietina | Interferoni (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) |
| Leptina | Interleuchine(IL-4, IL-12, IL-18) |
| Fattore stimolante colonie di granulociti (G-CSF) | Arrestina |
| Folistatina | Fattore piastrinico-4 |
| Fattore di necrosi tumorale (TNF- α) | Restina |
| Pleiotrofina | Fattore derivato dall'epitelio del pigmento (PEDF) |

Tabella 1.1: Fattori endogeni stimolatori e inibitori dell'angiogenesi

*** Ruolo dell'angiogenesi nei tumori**

Il 95% dei carcinomi umani origina come una lesione *in situ* in uno strato di epitelio separato dalla riserva di sangue offerta dalla vascolatura nello stroma. Questi tumori microscopici possono crescere solo in seguito ad adeguata vascolarizzazione (*Folkman J, 1971*).

La risposta angiogenica è determinata da un equilibrio tra fattori pro- e anti-angiogenici, secreti sia dalle cellule tumorali, sia dai componenti dello stroma. La prevalenza dei primi determina lo "switch angiogenico" (*Hanahan D and Folkman J, 1996*), che dà inizio al processo dell'angiogenesi e di conseguenza alla crescita del tumore.

Tre meccanismi possono contribuire allo "switch angiogenico" (Figura 1.6):

1. Molti tumori approfittano della vascolatura già esistente. La crescita del tumore attorno ai vasi sanguigni è seguita da apoptosi delle cellule endoteliali e dalla perdita dell'integrità dei vasi, mediata dalla regolazione positiva dell'angiopoietina2 (Ang2). A questo punto il tumore induce la formazione di germogli neovascolari dai vasi confinanti (*Holash J et al, 1999*). Questo processo è generalmente guidato da varie proteine pro-

angiogeniche (come VEGF, bFGF, PDGF e Ang2), rilasciate dalle cellule tumorali e che agiscono sulle cellule endoteliali locali.

2. Precursori ematopoietici circolanti possono contribuire alla regolazione dell'angiogenesi nei tumori. I recettori del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR-1 e VEGFR-2), infatti, sono espressi sia in cellule staminali ematopoietiche, sia in cellule progenitrici endoteliali. Questi rari sottotipi cellulari sono mobilizzati da citochine e chemochine come VEGF e SDF-1 α , rilasciate dai tumori nella circolazione, e possono essere reclutati nel letto vascolare di certi tipi di tumore (Lyden D et al, 2001) o localizzarsi in posizione perivascolare (Rafii S and Lyden D, 2008).
3. Alcuni tumori possono stabilire una sorta di comunicazione con il midollo osseo, attraverso la secrezione di chemochine, capaci di attrarre cellule ematopoietiche differenziate tra cui i mastociti e varie popolazioni mieloidi (Murdoch C et al, 2008). Queste cellule, poi, possono promuovere l'angiogenesi rilasciando molecole pro-angiogeniche o metalloproteasi che permettono di aumentare la mobilità delle cellule endoteliali (Bergers G et al, 2000; Scott KA et al, 2000).

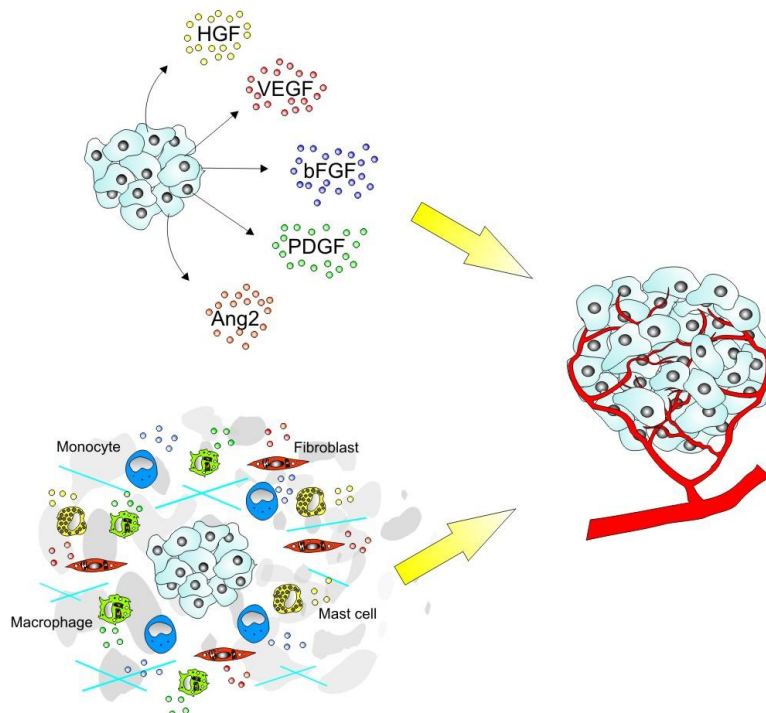


Figura 1.4: Illustrazione dei meccanismi che possono contribuire allo “switch angiogenico”.

* L'angiogenesi come bersaglio terapeutico

L'intuizione di Folkman (1971) della stretta dipendenza della crescita del tumore dallo sviluppo di una nuova rete vascolare ha permesso di ipotizzare che l'inibizione dell'angiogenesi potesse essere una strategia terapeutica efficace.

Molti sforzi sperimentali sono volti ad interferire sullo switch angiogenico, riducendo l'attivazione ed il reclutamento delle cellule endoteliali intratumorali, aumentando la produzione di fattori anti-angiogenici o neutralizzando fattori pro-angiogenici biologicamente attivi.

Alcune strategie recenti, inoltre, mirano a contrastare il reclutamento di cellule-precursori circolanti o a sfruttare l'attivazione selettiva di promotori indotti dall'angiogenesi per esprimere fattori terapeutici nel microambiente del tumore.

* Panoramica sugli attuali inibitori dell'angiogenesi

Ci sono molti bersagli potenziali per gli inibitori dell'angiogenesi e una classificazione completa risulta difficile. Comunque, basandosi sul meccanismo d'azione, si può proporre la seguente classificazione (*Madhusudan S and Harris AL, 2002*):

- I. Farmaci direzionati verso gli enzimi di degradazione della matrice;
- II. Inibitori dei fattori angiogenici;
- III. Agenti direzionati verso i vasi tumorali;
- IV. Anti-angiogenici miscelanei;
- V. Agenti convenzionali citotossici e citostatici.

Attualmente ci sono diversi inibitori dell'angiogenesi al vaglio di studi clinici avanzati (Tabella 1.2).

| Farmaci che bloccano gli attivatori dell'angiogenesi | | | | | | | | |
|---|------------------------------------|-----------------|-------------|-----------|---------------|------------|-----------|------------------------|
| Farmaco | Clinical trials in atto (n) | Fase (n) | | | | | | |
| | | I | I-II | II | II-III | III | IV | Non specificati |
| Bevacizumab (Avastin™) | 223 | 14 | 20 | 159 | 2 | 20 | 5 | 3 |
| Bay 43-9006 (Sorafenib tosylate) | 63 | 19 | 9 | 32 | | 3 | | |
| SU011248 (Sunitinib malate) | 54 | 8 | 4 | 34 | | 7 | | 1 |
| RAD001 (Everolimus) | 28 | 7 | 9 | 9 | 1 | 2 | | |
| AZD2171 | 23 | 4 | | 16 | 2 | 1 | | |
| PTK787/ZK 222584 (Vatalanib) | 15 | 3 | 5 | 7 | | | | |
| GW786034 (Pazopanib) | 14 | 7 | | 5 | | 2 | | |
| ZD6474 | 13 | 2 | 1 | 6 | | 4 | | |
| AMG-706 | 8 | 4 | 2 | 2 | | | | |
| AG-013736 | 3 | | | 3 | | | | |
| BMS-582664 | 3 | 2 | | 1 | | | | |
| PI-88 | 2 | | | 2 | | | | |
| Suramin | 2 | 1 | 1 | | | | | |
| ADH-1 (Exherin™) | 1 | 1 | | | | | | |
| CHIR-265 | 1 | 1 | | | | | | |
| XL184 | 1 | 1 | | | | | | |

| Farmaci che inibiscono direttamente le cellule endoteliali | | | | | | | | |
|---|------------------------------------|-----------------|-------------|-----------|---------------|------------|-----------|------------------------|
| Farmaco | Clinical trials in atto (n) | Fase (n) | | | | | | |
| | | I | I-II | II | II-III | III | IV | Non specificati |
| Thalidomide | 74 | 3 | 5 | 44 | 2 | 17 | | 3 |
| Lenalidomide | 38 | 7 | 3 | 18 | 1 | 7 | 1 | 1 |
| Tamoxifen | 28 | 1 | | 11 | | 14 | 1 | 1 |

| | | | | | | | | |
|--|------------|----|----|-----|---|----|---|---|
| citrato LY317615 (Enzastaurina) | 16 | 2 | 1 | 11 | | 2 | | |
| Soy Isoflavone | 6 | | | 6 | | | | |
| ABT-510 | 2 | 1 | 1 | | | | | |
| Combretastati na | 2 | 1 | | 1 | | | | |
| A4 Fosfato NGR-TNF | 1 | 1 | | | | | | |
| Acido Acetico Dimetilxanten one | 1 | | | 1 | | | | |
| TOTALE | 622 | 90 | 61 | 368 | 8 | 79 | 7 | 9 |

Tabella 1.2: Farmaci antiangiogenici in studi clinici.

Gli agenti anti-angiogenici meglio conosciuti sono quelli che appartengono alla classe degli inibitori del VEGF. Questa classe di composti non solo arresta la proliferazione delle EC e previene la crescita dei vasi, ma induce anche la regressione di vasi preesistenti aumentando la morte delle cellule endoteliali. Inoltre gli inibitori del VEGF sopprimono la mobilizzazione di cellule progenitrici endoteliali dal midollo osseo. Il trattamento anti-VEGF migliora inoltre il *delivery* di farmaci citotossici normalizzando il *pattern* caotico e l'architettura anormale dei vasi tumorali, e riducendo la permeabilità vascolare e la pressione del fluido interstiziale, rendendo conto del perché questi agenti possano agire come chemiosensibilizzanti e possono aumentare l'efficacia dei chemioterapici (Jain RK, 2005).

Tra gli inibitori dell'attività di VEGF il primo anti-angiogenico ad essere approvato dall'FDA nel 2004 è stato il Bevacizumab (Avastin).

L'Avastin è un anticorpo monoclonale umanizzato ottenuto mediante la tecnologia del DNA ricombinante che lega in modo selettivo VEGF-A, prevenendo quindi il suo legame con i recettori VEGFR-1 e VEGFR-2.

Nel 1997 l'anticorpo monoclonale murino A4.6.1, inibitore di VEGF, è stato umanizzato: per mezzo di mutagenesi sito-diretta della sequenza di un anticorpo umano, i residui coinvolti nelle 6 regioni che determinano la complementarità insieme ad altri residui della sequenza sono stati mutati nei corrispondenti residui murini.

Attualmente Avastin è utilizzato in associazione con la chemioterapia basata su 5-fluorouracile (5-FU)-irinotecan come prima linea di trattamento in pazienti con cancro colon-rettale metastatico (*Hurwitz HI et al, 2005*). Ci sono diversi studi clinici che hanno arruolato un cospicuo numero di pazienti con cancro colon-rettale che hanno dimostrato l'efficacia di Avastin in associazione anche ad altri chemioterapici, come 5-FU/LV(5-Fluorouracile/Leucovorina) (*Hurwitz HI et al,2005*) o FOLFOX4 (*Giantonio BJ et al, 2007*).

Non tutti i tumori, però, rispondono a Bevacizumab, come ad esempio il carcinoma mammario metastatico o il carcinoma renale a cellule chiare. Questi risultati indicano chiaramente la necessità di ulteriori studi utili a delineare quale sottotipo di pazienti possa beneficiare di tale terapia.

Nel nostro studio è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale murino A4.6.1, somministrato i.p. in topi SCID portatori di tumore ovarico al fine di valutarne l'efficacia in relazione al diverso metabolismo del tumore.

* Resistenza alla terapia antiangiogenica

In molti pazienti trattati con farmaci anti-VEGF in combinazione con chemioterapici si sono osservate una risposta alla terapia ed un aumento della sopravvivenza. Tuttavia, il meccanismo coinvolto nella risposta terapeutica risulta ancora da chiarire nei dettagli e in molti casi si è osservata comunque una progressione della malattia. Queste evidenze hanno suggerito che esistono dei meccanismi di resistenza intrinseci o eventualmente sviluppati nei pazienti (*Herbst RS et al, 2005; Miller KD et al, 2005 ; Yang JC et al, 2003*).

Il fenomeno della resistenza alla terapia anti-angiogenica è stato verificato anche in diversi studi su modelli murini. Ci sono state alcune evidenze di insorgenza di resistenza laddove il farmaco anti-VEGF veniva somministrato cronicamente e qualora il farmaco fosse somministrato in tumori in fase avanzata, piuttosto che in quelli in fase precoce (*Klement G et al, 2000; Gerber HP et al, 2000*).

I meccanismi principali alla base dell'acquisizione di resistenza alla terapia antiangiogenica possono essere schematizzati in tre gruppi (*Carmeliet P, 2005; Bergers G and Hanahan D, 2008; Favaro E et al, 2008*) (Figura 1.5):

1) *Meccanismi relativi alle cellule tumorali*

Ci sono almeno tre meccanismi attraverso i quali le cellule tumorali possono contribuire alla resistenza:

- I. Fenomeno della ‘ridondanza’: nonostante con la terapia si inattivi un particolare fattore angiogenico, la formazione di nuovi vasi avviene comunque perché sostenuta da altre vie alternative potenziate in seguito ad un aumento dell’espressione dei fattori coinvolti in tali vie. Questa osservazione suggerisce l’opportunità di disegnare terapie che interferiscano simultaneamente con più vie pro-angiogeniche;
- II. Resistenza ‘intrinseca’ di un tumore ad alcuni farmaci anti-angiogenici. Ciascun tumore, infatti, potrebbe essere sostenuto da un particolare insieme di fattori anti-angiogenici differente da quello di altri tumori, oppure tale insieme potrebbe variare in funzione dello stadio di progressione. Questo implicherebbe la possibilità di ottenere una migliore efficacia somministrando il farmaco in specifici stadi della malattia;
- III. La terapia anti-angiogenica aumenta i livelli di ipossia intratumorali e può forzare la selezione di quelle cellule tumorali capaci di resistere all’ipossia, provocando così una graduale inefficacia della terapia. Le cellule che presentano un vantaggio selettivo possono essere quelle nelle quali la mancanza di p53 le rende meno suscettibili all’apoptosi indotta da ipossia, oppure cellule nelle quali c’è una disfunzione nella via di HIF-1 α , o una regolazione positiva di geni anti-apoptotici. Questo suggerisce la possibilità di proporre una combinazione di una terapia anti-angiogenica con inibitori dei segnali di sopravvivenza allo stress ipossico.

2) *Meccanismi relativi alle cellule endoteliali*

Una possibile spiegazione delle risposte eterogenee dei tumori ai farmaci anti-angiogenici può essere attribuita a modificazioni qualitative acquisite dalla vascolatura angiogenica durante tutta la progressione del tumore. Tale ipotesi è avvalorata da tre evidenze:

- I. Durante il “*Tumor vascular remodelling*” la neovascolatura si sviluppa in modo da formare vasi maturi e stabili, ricoperti da periciti. Poiché questi ultimi danno un contributo critico nel processo dell’angiogenesi, sono stati considerati come potenziali bersagli farmacologici. In alcuni studi in cui al trattamento antiangiogenico anti-VEGF o contro le EC è stato associato un agente diretto ad inibire l’attività del recettore PDGFR espresso dai periciti si è osservata una risposta migliore.

- II. Il “mimetismo vasculogenico” è un fenomeno nel quale le cellule tumorali vanno incontro ad un adattamento fenotipico e funzionale, che consente loro di acquisire caratteristiche tipiche delle cellule endoteliali e di contribuire, perciò, alla formazione di vasi perfusi. Tuttavia tali cellule trans-differenziate non sono suscettibili agli inibitori dell’angiogenesi.
- III. In alcuni cancro umani le cellule endoteliali mostrano anomalie citogenetiche e non sono geneticamente stabili, rappresentando così un potenziale ulteriore meccanismo di resistenza.

3) *Meccanismi relativi alle cellule dello stroma*

L’ischemia, il danno vascolare e le chemochine e citochine come SDF-1, VEGF, IL-1, GM-CSF e G-CSF secrete dalle cellule tumorali e dai fibroblasti associati al tumore (TAF) stimolano il reclutamento di cellule derivate dal midollo osseo (BMDC: *bone marrow-derived cells*). Queste possono permanere nel microambiente del tumore e possono contribuire all’angiogenesi contribuendo, così, ad instaurare un meccanismo di fuga dal trattamento antiangiogenico. Le BMDC risultano essere un valido target potenziale per il trattamento anti-angiogenico.

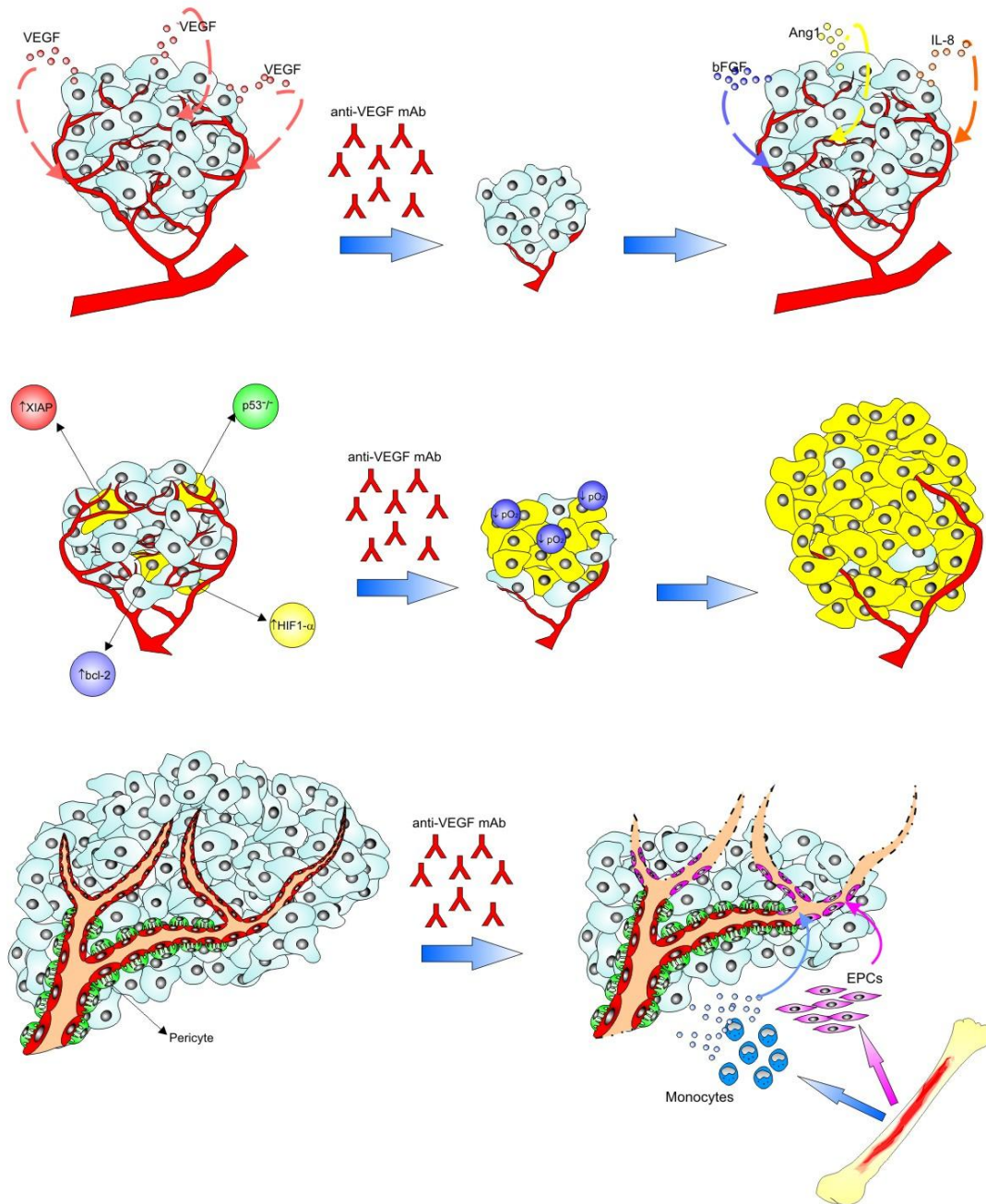


Figura 1.5: Meccanismi alla base della resistenza alla terapia antiangiogenica.

1.5 Ruolo dell'AMPK nei tumori

La proteina AMPK (AMP-activated Protein Kinase) è una serin-treonin chinasi presente in tutti gli eucarioti. A livello cellulare l'AMPK è attivata da stress metabolici, quali possono essere l'esercizio fisico, l'ipossia o la deprivazione di glucosio, che comportano una riduzione dei livelli di ATP ed un aumento di quelli di AMP. Per tali motivi

l'AMPK è denominata "*sensore dell'ATP*" e svolge un ruolo cruciale nel mantenere l'omeostasi energetica all'interno della cellula, inducendo una cascata di eventi che portano la cellula a rallentare il consumo di ATP ed ad aumentarne la produzione.

* *Struttura e regolazione dell'AMPK*

L'AMPK è un enzima trimetrico costituito da una sub-unità catalitica denominata α e da due sub-unità definite β e γ . La sub-unità α contiene nella porzione N-terminale un dominio catalitico serin-treonin chinasi e lega le altre due sub-unità tramite la porzione C-terminale. La sub-unità β contiene un dominio conservato di legame con il glicogeno (GBD) e la sub-unità γ contiene dei domini di cistationina- β -sintasi (CBS) che permettono il legame con le molecole di AMP. L'AMPK si attiva in presenza di un elevato rapporto AMP:ATP, tramite un cambiamento conformazionale nella sub-unità γ che permette la fosforilazione della proteina nella sub-unità α a livello della treonina 172 (T¹⁷²) e la sua successiva attivazione.

Un meccanismo di attivazione dell'AMPK si ha attraverso la chinasi Ca²⁺- Calmodulina dipendente denominata CaMKK2. Tale proteina fosforila ed attiva l'AMPK in seguito ad un aumento intracellulare di Ca²⁺. L'espressione della proteina CaMKK β si ritrova principalmente nel cervello e in minor misura in altri tessuti. Poiché l'aumento del rilascio di Ca²⁺ intracellulare comporta la successiva richiesta di ATP, l'attivazione dell'AMPK tramite questa via è un meccanismo che le cellule adottano per anticipare un imminente fabbisogno di ATP (Xiao B et al, 2007).

L'attivazione principale dell'AMPK, in seguito a stress che comportano un calo nei livelli di ATP necessita principalmente della serin-treonin chinasi LKB1 (o STK11) la quale, a differenza della proteina CaMKK2, si trova espressa in numerosi tessuti. LKB1 è codificata dall'oncosoppressore *lkb1* le cui mutazioni sono responsabili della sindrome di Peutz-Jeghers (PJS). Le persone colpite da tale sindrome hanno un elevato rischio di sviluppare tumori intestinali ed ovarici e mutazioni di tale gene si riscontrano in circa il 30 % dei tumori non a piccole cellule del polmone (NSCLC) e nel 20 % dei tumori alla cervice uterina (Sanchez-Cespedes M, 2007). Nonostante AMPK possa essere attivato anche da CaMKK2, LKB1 è l'unica chinasi che media un' attivazione prolungata e adattativa a condizioni di stress energetico (Shackelford DB and Shaw RJ, 2009).

* Proteine regolate da AMPK

Le proteine regolate da AMPK sono principalmente legate al metabolismo del glucosio e dei lipidi, all'espressione genica e alla sintesi proteica. Tali proteine servono generalmente ad inibire i processi cellulari che inducono il consumo di ATP o ad aumentarne la produzione. L'attivazione fisiologica di questa via avviene principalmente a livello del pancreas, del fegato, del tessuto adiposo, del cuore e del muscolo scheletrico. Negli ultimi anni si è osservato comunque come AMPK possa venire deregolata in numerosi tumori, come il tumore del polmone, della prostata dello stomaco e del fegato. In particolare si è osservato come le condizioni di ipossia e deprivazione di glucosio, condizioni che normalmente si possono riscontrare in all'interno di tumori solidi, comportano una riduzione dei livelli di ATP e la successiva attivazione di AMPK (*Laderoute KR et al, 2006*).

L'AMPK regola diversi vie che hanno come fine una riduzione dell'ATP all'interno della cellula ed aumento della sua produzione (Figura 1.6). Le proteine attivate da AMPK sono:

- proteine legate alla via di mTOR: mTOR è una molecola che regola principalmente la sintesi proteica e la crescita cellulare ed è alterata in numerosi tumori. AMPK fosforila TSC2 attivandolo ed assieme alla proteina TSC1 agisce inibendo il complesso di mTORC1 (*Sarbassov DD et al, 2005*). AMPK nei tumori fosforila direttamente anche RAPTOR, un'altra proteina associata a mTORC1, comportando una down-regolazione di mTOR e riduzione della fase S (*Gwinn DM et al, 2008*). In generale AMPK agisce inibendo l'attività di mTOR, comportando una riduzione della sintesi proteica e della proliferazione cellulare.
- proteine regolatrici del ciclo cellulare: AMPK è in grado di fosforilare p53 a livello della serina 15, inducendo così un arresto delle cellule in fase G1/S in fibroblasti embrionali di topo (MEFs) coltivati in deprivazione di glucosio (*Jones RG et al, 2005*). AMPK è in grado di fosforilare anche il fattore di trascrizione FOXO3a, il quale è target anche della via di PI3K-Akt ed è coinvolto nella crescita cellulare e nel metabolismo. Anche l'inibitore della chinasi ciclina dipendente p27 è un target di AMPK. Questa proteina viene fosforilata a livello della treonina 198, si stabilizza e permette alle linee tumorali di carcinoma mammario di sopravvivere in condizioni di deprivazione di nutrienti tramite l'induzione dell'autofagia (*Linag J et al, 2007*). AMPK sembra

infine essere coinvolto nella down regolazione della Ciclina D1, in linee di carcinoma mammario, comportando un rallentamento della proliferazione cellulare e un blocco in fase G1/S (*Zhuan Y and Miskiminis WK, 2008*).

- proteine legate al metabolismo del glucosio e dei lipidi: le due isoforme dell'Acetil-CoA carbossilasi, ACC1 e ACC2, sono fra i target principali di AMPK. Queste due proteine vengono fosforilate ed inattivate da AMPK e ciò comporta una riduzione dei livelli di malonil-CoA con un successivo aumento della β -ossidazione ed una riduzione della sintesi degli acidi grassi. Un altro target è la 3-idrossi-3metilglutaril-CoA riduttasi (HGM-CR), proteina coinvolta nella sintesi del colesterolo che viene fosforilata ed inibita da AMPK. L'inibizione di queste due vie comporta nelle cellule una riduzione della lipogenesi, con un successivo rallentamento nella proliferazione cellulare di cellule di glioblastoma (*Guo D. et Al., 2009*). Uno degli enzimi fosforilati ed attivati da AMPK è la fosfofruttochinasi 2 (PFK2). Il prodotto di tale enzima, il fruttosio 2,6 bi-fosfato, è un potente regolatore del flusso della glicolisi e della gluconeogenesi.
- proteine legate alla polarità cellulare: AMPK sembra modulare la polarità cellulare in cellule di mammifero oltre che in *D. Melanogaster* tramite la modulazione delle chinasi MLC chinasi e la miosin fosfatasi che regolano la fosforilazione della catena leggera della miosina (*Shackelford DB and Shaw RJ, 2009*).

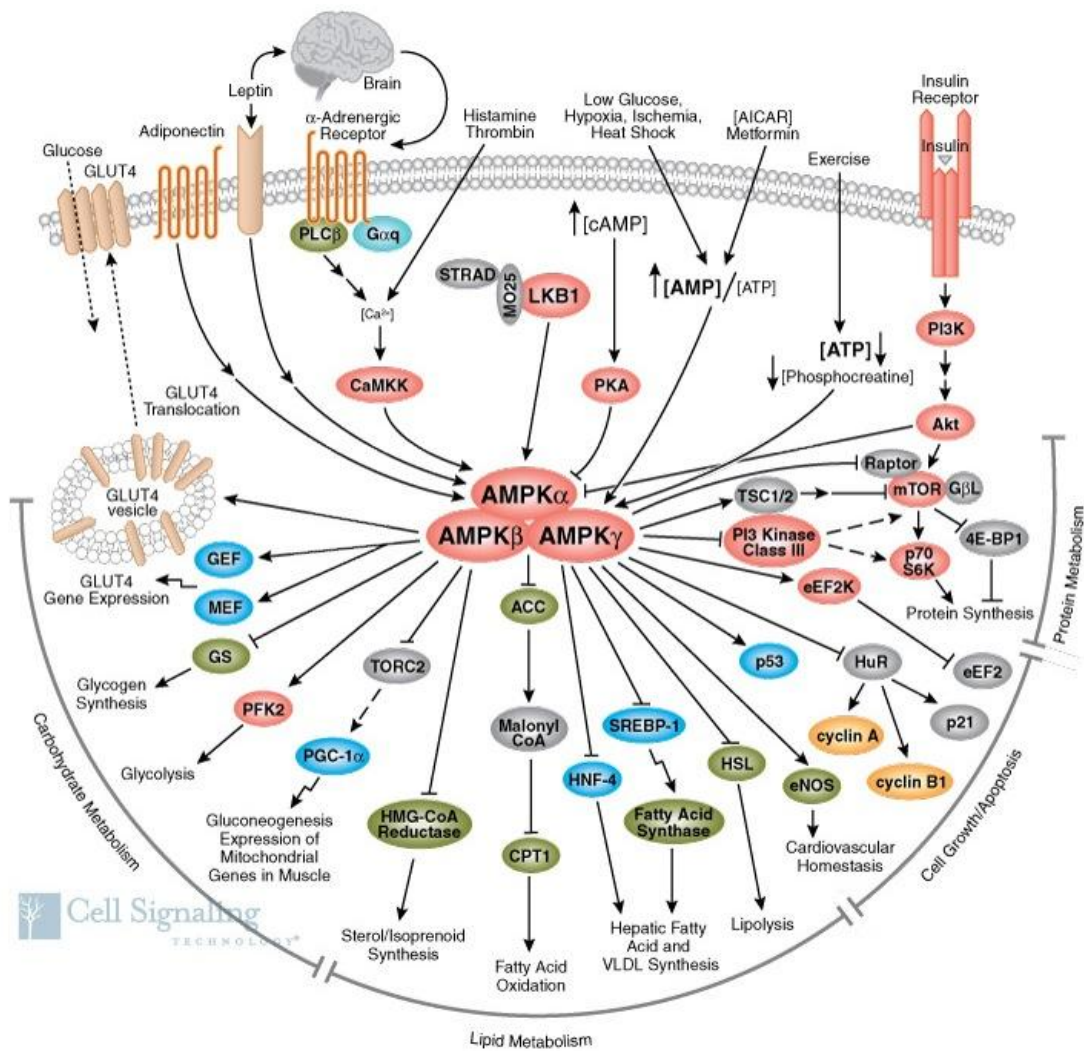


Figura 1.6: Immagine rappresentante le vie di trasduzione del segnale regolate da AMPK.

* AMPK come target nella terapia anti-tumorale

Il ruolo dell'AMPK nella regolazione del metabolismo ha comportato che tale chinasi venisse inizialmente utilizzata come target terapeutico nel trattamento del diabete di tipo 2. Questo ha portato alla sintesi di farmaci come la metformina e il suo analogo fenformina, utilizzati attualmente in clinica per la cura di questa patologia, i quali riducendo i livelli cellulari di ATP, comportano un'attivazione di AMPK via LKB1. Poiché AMPK non agisce solo a livello metabolico, ma anche a livello di proliferazione cellulare, sintesi proteica e polarità cellulare attraverso vie di segnale come quelle di p53 e mTORC, si è pensato di utilizzare questi farmaci anche nelle terapie contro il cancro.

Dati epidemiologici ottenuti analizzando i pazienti affetti da diabete di tipo 2 hanno evidenziato che i pazienti trattati con metformina hanno un'incidenza minore di sviluppare cancro rispetto ai pazienti trattati con altri farmaci ipoglicemizzanti (*Evans J et al, 2005*). In un altro studio, condotto in pazienti diabetiche con carcinoma mammario, ha evidenziato che le pazienti trattate con metformina avevano una percentuale di risposta completa alla chemioterapia significativamente maggiore rispetto alle pazienti che non avevano assunto tale farmaco (*Jiralerspong S et al, 2009*). Alla base di questi risultati potrebbe essere l'attivazione da parte della metformina dell'AMPK. La metformina, infatti, risulta inibire la crescita *in vitro* di numerose cellule tumorali attraverso l'attivazione diretta di AMPK, che agendo su proteine a valle come p53 e la ciclina D1, induce un blocco nella proliferazione di queste cellule (*Zakikhani M et al, 2008; Zhuang Y and Miskminis K, 2008*). E' stato inoltre osservato che in tumori impiantanti sotto cute nel topo l'attivazione di AMPK tramite questo farmaco ha dimostrato una riduzione significativa nella crescita tumorale rispetto ai controlli (*Buzzai M et al, 2007*). La fenformina è un farmaco analogo alla metformina, il quale agisce inattivando il complesso mitocondriale I della catena respiratoria ed attiva l'AMPK. Anche questo farmaco ha un effetto anti-tumorale in linfomi sviluppati in topi *Pten*^{+/-} e tale effetto è stato associato alla soppressione di mTORC1 tramite l'attivazione di AMPK (*Huang X et al, 2008*).

Effetti analoghi a quelli osservati con la metformina e la fenformina si sono verificati anche utilizzando il ribonucleotide AICAR che nelle cellule viene fosforilato e convertito in un analogo dell'AMP, lo ZMP, mimando così un accumulo di AMP a seguito di uno stress energetico. L'attivazione dell'AMPK da parte di AICAR è, a differenza della metformina e fenformina, indipendente dallo status di LKB1 (*Fay JR et al, 2009*). Tale molecola è in grado di attivare direttamente l'AMPK, comportando un arresto proliferativo in fase G1 in cellule coltivate *in vitro* (*Gwinn DM et al, 2008*). A seguito del trattamento con AICAR, si è osservata inoltre una riduzione nella crescita tumorale di glioblastomi impiantanti in topi ed una riduzione del consumo di glucosio, osservato tramite PET-CT, ed entrambi i fenomeni sono stati ricondotti all'attivazione di AMPK (*Guo D et al, 2009*).

2. SCOPO DELLA TESI

Il processo di angiogenesi è fondamentale per lo sviluppo tumorale e negli ultimi anni si è avuto un notevole incremento della messa a punto di terapie mirate a bloccare tale fenomeno. La terapia anti-angiogenica riduce l'apporto di sangue, determinando un aumento dell'ipossia nel microambiente tumorale ed una carenza di nutrienti, che possono determinare l'arresto proliferativo o la morte delle cellule tumorali. Nel 2004 il Bevacizumab, anticorpo monoclonale anti-VEGF, è stato approvato per il trattamento del carcinoma metastatico del colon in combinazione alla chemioterapia ed il suo impiego clinico è stato successivamente esteso a molte altre neoplasie. I dati clinici hanno tuttavia evidenziato come la neutralizzazione del VEGF abbia per i pazienti benefici generalmente di breve durata. Partendo da tale evidenza, si è ipotizzato che nel tumore vengano ad instaurarsi meccanismi di resistenza alla terapia, che rimangono tuttavia poco conosciuti.

Questo studio si inserisce in questo ambito di ricerche ed è stato concepito per analizzare il possibile ruolo del metabolismo glicolitico delle cellule tumorali nella risposta a farmaci anti-angiogenici. L'ipotesi di lavoro, dimostrata dai risultati ottenuti, era che la neutralizzazione del VEGF comportasse non solo un aumento dell'ipossia ma anche una marcata deprivazione di glucosio nel microambiente tumorale e che le conseguenze di tali variazioni metaboliche fossero diverse a seconda della dipendenza o meno delle cellule tumorali dal glucosio quale substrato energetico per la produzione di ATP. La ricerca è stata inoltre mirata a caratterizzare il contributo di AMPK, una chinasi che si attiva in situazioni di stress energetico, nei fenomeni di adattamento delle cellule tumorali ai cambiamenti metabolici imposti dalla terapia anti-angiogenica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

In questo lavoro sono state utilizzate le seguenti linee cellulari umane:

- le linee cellulari di carcinoma ovarico IGROV-1 (ATCC, Manassas, VA) e OC316 (donate dal Dr. S. Ferrini, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genoa, Italy)
- le linee cellulari di carcinoma esofageo KYSE-30 e OE19 (ECACC, Salisbury, UK),
- le linee cellulari di carcinoma pancreatico MIA PaCa-2 e BxPC3 (ATCC, Manassas, VA)
- Le linee di T-ALL MOLT 3 e Jurkat (ATCC, Manassas, VA).

Le linee cellulari IGROV-1, OC316, OE19, BxPC3, MOLT 3 e Jurkat, sono state coltivate in RPMI 1640 (Euroclone, Leeds, UK) supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS, Life Technologies, Gaithersburg, MD), 10 mmol/L di Hepes (Cambrex Bioscience, Verviers, Belgium), 2 mmol/L di L-glutamina e 1% di mix antibiotico-antimicotico (Gibco-BRL, Grand Island, NY). La linea KYSE-30 è stata coltivata in terreno RPMI 1640 + Ham's F12 (1:1) supplementato con 2% di FBS, 2 mmol/L di L-glutamina e 1% di mix antibiotico-antimicotico. La linea cellulare MIA PaCAa-2 è stata coltivata in terreno DMEM (Sigma-Aldrich, U.S.A.) supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), 10mmol/L di Hepes, 2 mmol/L di L-glutamina e 1% di mix antibiotico-antimicotico.

3.2 Condizioni di coltura

Le cellule sono state incubate sia in condizioni di normossia che di ipossia.

La condizione di normossia è stata ottenuta ponendo le cellule in incubatore ad una temperatura di 37°C, in atmosfera umidificata ed in presenza del 5% di CO₂.

La condizione di ipossia è stata ottenuta coltivando le cellule in un incubatore ipossico (Ruskin, IN VIVO 300, Bridgend, UK) alla pressione parziale di ossigeno di 0,5 %, ad una temperatura di 37°C, atmosfera umidificata ed in presenza del 5% di CO₂.

3.3 Misura delle concentrazioni di glucosio e di lattato

Per poter caratterizzare il metabolismo glicolitico delle diverse linee cellulari in esame, le cellule sono state piastrate ed incubate per 24 ore in condizioni di normossia. Al termine dell'incubazione, il terreno raccolto da ciascun pozzetto è stato centrifugato a 3000 g per 10 minuti e si è recuperato 1 ml di surnatante.

Le concentrazioni di glucosio e lattato presenti nei surnatanti raccolti sono state misurate mediante un saggio colorimetrico con un analizzatore automatico (Dimension RxL, Dade Behring, Milan, Italy) e si è risaliti alle variazioni di tali metaboliti, considerando i rispettivi valori basali presenti nel terreno di crescita da solo. I valori sono stati infine normalizzati in funzione del numero di cellule presenti al termine del periodo di incubazione.

3.4 Quantificazione dell'apoptosi tramite Annessina V

Per la quantificazione dell'apoptosi è stato utilizzato il kit Annexin-V-Fluos Staining Kit (Roche Applied Science, Germania).

Dopo un'incubazione di 72 ore in condizioni di normossia o di ipossia, l'analisi dell'apoptosi è stata effettuata tramite marcatura delle cellule con Annessina V e Ioduro di Propidio (PI) in buffer HEPES.

Per ogni campione da analizzare, il mix di marcatura prevede 2 µl di Annessina V e 2 µl di PI diluiti in 100 µl di buffer HEPES. Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente, le cellule marcate, a cui sono stati aggiunti altri 200 µl di buffer HEPES, sono state analizzate con un citofluorimetro EPICS-XL usando il software Expo32 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

3.5 In Cell Western Blot

Le cellule IGROV-1 e OC316 sono state coltivate in un piastra da 96 pozzetti a fondo piatto (Greiner Bio-One, Fckenhausen, Germany) nel loro terreno di coltura. Quando le

cellule si trovavano al 90-100% della confluenza, sono state fissate con metanolo 100% e bloccate con Roti®-Block (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). Le cellule sono state successivamente ibridate con l'anticorpo primario secondo le indicazioni dell'anticorpo e successivamente incubate con l'anticorpo secondario legato alla perossidasi. La rilevazione del legame con l'anticorpo è avvenuta dopo l'aggiunta del substrato 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) leggendo la piastra ad una lunghezza d'onda di 655 nm (Microplate Reader, BiRad Laboratories GmbH, Munich, Germany).

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati:

- anticorpo anti- α Tubulina prodotto in coniglio (Abcam, Cambridge, UK)
- anticorpo anti-PFK-2 prodotto in coniglio (Abcam, Cambridge, UK)
- anticorpo anti-HK-II prodotto in coniglio (Abcam, Cambridge, UK)
- anticorpo anti-PK prodotto in coniglio (Abcam, Cambridge, UK)
- anticorpo anti-LDH-A prodotto in coniglio (Abcam, Cambridge, UK)
- anticorpo anti-GLUT-1 prodotto in pecora (Biomol GmbH, Hamburg, Germany).

Gli anticorpi secondari coniugati con la peridossidasi utilizzati sono stati prodotti in scimmia e riconoscono la specie dell'anticorpo primario (Dianova, Hamburg, Germany). Tutte le valutazioni sono state eseguite in quadruplicato. I valori medi dei controlli negativi (i campioni in cui non è stato aggiunto l'anticorpo primario) sono stati sottratti alla media dei campioni d'interesse ($=\Delta E$). Il ΔE della proteina di interesse è stato normalizzato verso il ΔE della proteina α -Tubulina, la quale è stata inserita in quadruplicato in ogni esperimento per ciascuna linea. I valori ottenuti delle cellule OC316 sono stati rapportati ai valori delle IGROV-1, che sono stati posti uguale a 100, e sono stati espressi come % di espressione relativa di proteina.

3.6 PRC e reazione di sequenza

La reazione polimerasica a catena (PCR) è stata utilizzata per l'amplificazione dei campioni di DNA estratti dalle linee cellulari OC316, IGROV-1, KYSE-30, OE19, MOLT 3 e Jurkat. Sono stati amplificati tramite PCR gli esoni 4-5-6-7-8-9-10 del gene p53 usando le seguenti coppie di primers:

- **Esone 4**

primer forward: 5'- TTC ACC CAT CTA CAG TCC CC -3'

primer reverse: 5'- TCA GGG CAA CTG ACC GTG CA -3'

- **Esone 5**

primer forward: 5'- TTC CTC TTC CTG CAG TAC TC -3'

primer reverse: 5'- ACC CTG GGC AAC CAG CCC TGT -3'

- **Esone 6**

primer forward: 5'- ACA GGG CTG GTT GCC CAG GGT -3'

primer reverse: 5'- AGT TGC AAA CCA GAC CTC AG -3'

- **Esone 7**

primer forward: 5'- GTG TTG TCT CCT AGG TTG G -3'

primer reverse: 5'- CAA GTG GCT CCT GAC CTG GA -3'

- **Esone 8**

primer forward: 5'- TAT CCT GAG TAG TGG TAA TC -3'

primer reverse: 5'- AAG TGA ATC TGA GGC ATA -3'

- **Esone 9**

primer forward: 5'- TTG CCT CTT TCC TAG CA -3'

primer reverse: 5'- CCC AAG ACT TAG TAC CTG -3'

- **Esone 10**

primer forward: 5'- CTC TGT TGC TGC AGA TC -3'

primer reverse: 5'- GCT GAG GTC ACT CAC CT -3'

Per tale reazione è stato utilizzato l'enzima AmpliTaq® Gold 5 U/ml (Applied Biosystem, Branchburg, New Jersey USA). Per ogni campione da amplificare si è preparato un mix contenente:

- PCR buffer 10X
- MgCl₂ 1,5-1,75 mM (concentrazione variabile a seconda dell'esone, Tabella 3.1)
- dNTPs 200mM
- Taq Gold 1U
- H₂O portare a volume
- DNA genomico 100-200 ng
- Volume Finale 25 µl

Le condizioni di amplificazione sono state:

- 95°C 10 minuti
- 95°C 30 secondi, T °C di annealing (variabile a seconda dell'esone, Tabella 3.1) 90 secondi, 72°C 60 secondi per 35 cicli
- 72°C 5 minuti

| ESONE | MgCl₂ | T° di annealing |
|--------------|-------------------------|------------------------|
| 4 | 1,5 mM | 62° C |
| 5 | 1,5 mM | 59° C |
| 6 | 1,5 mM | 59° C |
| 7 | 1,75 mM | 62° C |
| 8 | 1,75 mM | 52° C |
| 9 | 1,75 mM | 50° C |
| 10 | 1,5 mM | 58° C |

Tabella 3.1: Concentrazioni di MgCl₂ e temperature di annealing suddivise per esone.

Per il gene K-Ras è stato amplificato l'esone12:

- **Esone 12**

primer forward: 5'- GGTGGAGTATTTGATAGTTGATTAACC -3'

primer reverse: 5'- AGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3'

Per ogni campione da amplificare si è preparato un mix contenente:

- PCR buffer 10X
- MgCl₂ 2 mM
- dNTPs 200mM
- Taq Gold 1U
- H₂O portare a volume
- DNA genomico 100-200 ng
- Volume Finale 25 µl

Le condizioni di amplificazione sono state:

- 95°C 10 minuti
- 95°C 60 secondi, 56°C 90 secondi, 72°C 90 secondi per 35 cicli
- 72°C 5 minuti

Per entrambi i geni 5 µl di amplificato di PCR sono stati purificati tramite reazione enzimatica aggiungendo 2 µl di ExoSap (Roche, Germany) e posti a 37° C per 15 minuti e successivamente a 80° C per 15 minuti.

Gli amplificati vengono quindi sequenziati utilizzando il kit Big Die Terminator v1.1 (Applied Biosystem, Branchburg, New Jersey USA). Il mix contiene per ogni campione:

- 4 µl Buffer 10X
- 2 µl Big Die Terminator v1.1
- 2 µl Primer (3,2 pmol)
- 3 µl prodotto di PCR purificato
- H₂O portare a volume
- Volume finale 20 µl

Il programma di sequenziamento utilizzato è stato:

- 95° C 10 secondi, 55° C 5 secondi, 60° C 4 minuti per 25 cicli

Ogni campione è stato sequenziato utilizzando sia il primer forward che reverse. Terminata la reazione di sequenza si è eseguita la purificazione di ciascun campione tramite l'utilizzo delle colonne AutoSeqTM (Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). Per l'analisi della sequenza si è utilizzato ABI prism 3110 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Branchburg, New Jersey USA).

3.7 Estrazione dell'RNA, RT-PCR e real-time PCR con SYBR Green

L' RNA totale è stato estratto dai pellet ottenuti dai lisati delle masse tumorali, usando il kit "RNAspin Mini RNA isolation kit" (GE Healthcare, UK) seguendo le istruzioni del produttore.

La qualità dell'RNA estratto è stata valutata mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1.2%, mentre la concentrazione è stata determinata mediante spettrofotometro, applicando la seguente formula:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260\text{nm}} \cdot \text{fattore diluizione} \cdot \text{fattore conversione dell'RNA (40)}$$

dove per $A_{260\text{nm}}$ si intende il valore dell'assorbanza a 260 nm, fornito dallo spettrofotometro.

Successivamente, l'RNA (0.5-1 µg) è stato retro-trascritto usando 200 U di SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 0.5 µg di random primers per 50' a 42 °C.

Si è proceduto ad eseguire la Real-Time PCR utilizzando la sonda SYBR Green come sistema di rilevamento. Il mix di reazione ha previsto 2 µl di cDNA, 10 µl di 2X Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) e primers ad una concentrazione variabile da 0.5 a 2 µM, in un volume finale di 20 µl. Ogni singola reazione di PCR è stata eseguita in duplicato usando piastre ottiche da 96 pozzetti (Applied Biosystems). Lo strumento utilizzato è l'ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, California, USA) ed il programma ha previsto 10' a 95°C, 95°C 15" / 60°C 1' x 40 cicli.

Per ovviare ad eventuali differenze tra campioni nella quantità di RNA utilizzato e nell'efficienza di retrotrascrizione, il valore di espressione dei geni bersaglio è stato normalizzato rispetto al valore di un gene "housekeeping" (β₂-microglobulina umana). Ciò è stato fatto con il metodo comparativo dei Ct (metodo ΔΔCt) basato sulla formula:

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{target}/l.d'interesse}} - C_{t_{\text{housek./l.d'interesse}}}) - (C_{t_{\text{target}/l.riferimento}} - C_{t_{\text{housek./l.riferimento}}})$$

Ciclo soglia del gene target nella linea da testare
Ciclo soglia del gene housekeeping nella linea da testare
Ciclo soglia del gene target nella linea di riferimento
Ciclo soglia del gene housekeeping nella linea di riferimento

Il rapporto tra l'espressione del gene bersaglio nella linea cellulare di interesse e l'espressione dello stesso nella linea di riferimento è ricavabile dalla formula:

$$(\text{espressione nella linea d'interesse del gene target}) = 2^{-\Delta\Delta C_t} \times (\text{espressione in linea di riferimento})$$

Per poter usare questa formula, l'efficienza di reazione per i due geni ("target" ed "housekeeping") deve essere simile e vicina al 100% (95-105%). Tale valore si ricava dalla formula:

$$E = (10^{-1/\text{pendenza}} - 1)$$

dove E è l'efficienza di reazione e la pendenza è quella della retta di regressione costruita interpolando i valori di Ct ottenuti per diluizioni seriali del cDNA target con i valori di diluizione stessi.

Primers utilizzati (Sigma-Aldrich):

- β_2 -microglobulina umana forward: 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3'
- β_2 -microglobulina umana reverse: 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'
- HKII umano forward: 5'-GAAGATGCTGCCACCTTTG-3'
- HKII umano reverse: 5'-CACCCAAAGCACACGGAAGT-3'
- GADPH umano forward: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'
- GADPH umano reverse: 5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3'
- LDH-A umano forward: 5'-GATTCAGCCCGATTCCGTTAC-3'
- LDH-A umano reverse: 5'-ACTCCATACAGGCACACTGG-3'

3.8 Western Blot

L'analisi di Western Blot è stata eseguita su estratti cellulari e su masse tumorali omogeneizzate.

Preparazione dei campioni, corsa elettroforetica e trasferimento

Le masse sono state omogeneizzate per attrito con trapano (IKA T18 basic, ULTRA TURREX, Stufen, Germany) in PBS. Le masse omogeneizzate ed i pellet cellulari sono stati lisati in SDS 2X gel-loading buffer (100 mM tris-HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% blu di bromofenolo e 20% glicerolo Sigma-Aldrich, U.S.A.), fatti bollire per 5 minuti e caricati nei pozzetti di un gel di poliacrilamide al 10% e al 4-12% (Invitrogen). Una volta caricato il gel, è stata effettuata una corsa elettroforetica a 200 Volts per 50 minuti in una cella per elettroforesi Xcell *SureLock* Mini-Cell (Invitrogen). Terminata la corsa, le proteine separate sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Amersham, Buckinghamshire, UK) mediante trasferimento per 1 ora a 30 Volts.

Ibridazione ed analisi finale

Il filtro è stato messo a saturare per 1 ora in agitazione in PBS-0.1% Tween₂₀-5% milk (Sigma). Dopo due rapidi lavaggi con PBS-0.1% Tween₂₀ la membrana è stata

ibridizzata in agitazione con l'anticorpo primario secondo le istruzioni dell'anticorpo. Sono seguiti poi tre lavaggi da 15 minuti in PBS-0.1% Tween₂₀, ed il filtro è stato quindi messo in incubazione con l'anticorpo secondario opportuno, coniugato all'HRP (Horse Radish Peroxidase; Amersham), e diluito 1:5000 in PBS-0.1% Tween₂₀-1% milk. Dopo altri tre lavaggi da 15 minuti con PBS-0.1% Tween₂₀, gli antigeni sono stati identificati mediante chemiluminescenza utilizzando i reagenti di rivelazione SuperSignal kit (Pierce, Rockford, IL) ed il sistema d'acquisizione d'immagini ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA). Per tutti gli anticorpi fosforilati i lavaggi dopo ibridazione con l'anticorpo primario e secondario sono stati di 5 minuti anziché di 15 minuti.

Anticorpi primari utilizzati:

- anticorpo monoclonale anti-HIF-1 α prodotto in topo, diluito 1:250 (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY)
- anti-c-myc prodotto in topo, diluito 1:500 (Oncogene)
- anti- α -tubulina prodotto in topo, diluito 1:4000 (Sigma)
- anti-AMPK prodotto in coniglio, diluito 1:1000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)
- anti-pAMPK α^{Thr172} prodotto in coniglio, diluito 1:1000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)
- anti-ACC 1-2 prodotto in coniglio, diluito 1:750 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)
- anti-pACC 1-2 prodotto in topo, diluito 1:1000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)
- anti-p4E-BP1 prodotto in coniglio, diluito 1:1000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)
- anti-AKT1/2/3, prodotto in coniglio, diluito 1:500 (Santa Cruz,)
- anti-pAKT $^{\text{Ser473}}$, prodotto in topo, diluito 1:1000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)
- anti-pAKT $^{\text{Thr308}}$, prodotto in coniglio, diluito 1:500 (Santa Cruz)

3.9 Misura dei livelli di ATP

Per la misurazione dei livelli di ATP intracellulari, le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti in 100 µl di terreno a diverse densità (10-25 x 10³ cellule/pozzetto) e successivamente incubate per 24 ore in condizioni di normossia, normossia senza glucosio, ipossia ed ipossia senza glucosio. I livelli di ATP sono stati determinati mediante il kit ViaLight HS Kit (Cambrex Bioscience) che utilizza l'enzima luciferasi, seguendo le istruzioni del produttore e normalizzati rispetto al contenuto proteico dei lisati corrispondenti. In ogni lettura è stata introdotta una curva standard dell'ATP. I livelli di luminescenza emessi da ogni pozzetto al termine della reazione sono stati rilevati da un Top Scintillation Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

3.10 Analisi del ciclo cellulare con Ioduro di Propidio

Per analizzare il profilo del ciclo cellulare, 3-5 x 10⁵ di cellule OC316 e IGROV-1 sono state incubate per 24 ore in condizioni di normossia o di ipossia in 2 ml di terreno RPMI completo in presenza o meno di glucosio (2g/L). Terminata l'incubazione, le cellule sono state staccate, lavate con PBS, risospese in 1 ml di soluzione GM (glucosio 1.1 mM, NaCl 0.14 M, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 1.5 mM, KH₂PO₄ 1.1 mM, EDTA 0.5 mM) e fissate con l'aggiunta goccia a goccia di 3 ml di etanolo al 100%. Le cellule sono state quindi centrifugate per 10 minuti a 1200 rpm, lavate con PBS 1X, ed infine risospese in 500 µl di PI (100µg/ml), contenente RNasi priva di Dnasi (12 µg/ml) (Sigma).

Dopo un'ora di incubazione a temperatura ambiente le cellule sono state analizzate al citofluorimetro usando un laser Argon di lunghezza d'onda di 488 nm e una linea di rivelazione FL2-A. Gli istogrammi relativi al contenuto di DNA sono stati ottenuti usando il software ModFit LT3.0 (Verity Software House).

3.11 Studi in vivo

Gli studi *in vivo* sono stati condotti in topi immunodeficienti SCID femmina (Charles River, Wilmington, MA), mantenuti nel nostro stabulario in condizioni specific-pathogen-free (SPF). Le procedure concernenti gli animali ed il loro trattamento adottate in questo studio sono state conformi alle leggi ed alle linee guida nazionali ed internazionali in materia (EEC Council directive 86/609, OJ L 358, 12 Dicembre 1987).

Prima dell'inoculo, le cellule sono state mescolate a 4°C con Matrigel liquido (Becton-Dickinson; volume finale 400 µl/inoculo).

Per valutare l'effetto della terapia anti-angiogenica su linee con diverso profilo metabolico, sono state inoculate s.c. le seguenti cellule (volume finale 200 µl/inoculo in PBS) a livello di entrambi i fianchi dell'animale (n = 10/gruppo):

- cellule OC316 (3×10^5 cellule/inoculo)
- cellule IGROV-1 (4×10^5 cellule/inoculo)

Dal giorno dell'inoculo gli animali sono stati osservati due volte a settimana e i tumori sono stati misurati attraverso un calibro e il volume dei tumori è stato calcolato mediante la formula: $\text{Volume} = [\text{lunghezza} \times (\text{larghezza})^2] / 2$.

Quando il volume medio dei tumori ha raggiunto il valore di $150 \pm 100 \text{ mm}^3$, gli animali sono stati trattati con dei farmaci anti-angiogenici o con PBS.

Per la terapia a breve termine sono state effettuate tre somministrazioni intraperitoneo a distanza di due giorni l'una dall'altra di PBS o mAb A.4.6.1 (mAb anti-VEGF umano, Genentech, San Francisco, CA) alla dose di 100 µg/dose a due gruppi distinti di animali per ciascun tipo di tumore. Il trattamento con il farmaco ZD6474 (inibitore del recettore tirosin chinasi VEGF-R2, Astrazeneca) è stato somministrato per tre volte tramite oral gavage a distanza di due giorni l'una dall'altra alla dose di 50 mg/Kg/topo.

Il trattamento a lungo termine ha previsto che gli animali venissero trattati la prima settimana con tre somministrazioni intraperitoneo di PBS o A.4.6.1 (mAb anti-VEGF umano, Genentech, San Francisco, CA) alla dose di 100 µg/dose a distanza l'una dall'altra di due giorni, e per le tre settimane successive con due somministrazioni a settimana distanziate quattro giorni l'una dall'altra. La stessa procedura è stata adottata per il trattamento a lungo termine con il farmaco B20-4.1.1. (mAb anti-VEGF umano e murino, Genentech, San Francisco, CA) alla dose di 100 µg/dose.

Al termine degli esperimenti i topi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale e le masse tumorali sono state recuperate e in alcuni casi congelate in O.C.T. (Tissue-Teck O.C.T. Compound, Miles Inc. Diagnostic Division, Elkhart, IN) e conservati a -80°C, in altri casi invece fissati utilizzando un fissativo a base di zinco (Zinc Fixative, BD-Bioscience) ed inclusi in blocchetti di paraffina per successive analisi di immunohistochimica e di immunofluorescenza.

3.12 Trasduzione in vitro delle cellule OC316 e IGROV-1 mediante vettori lentivirali

Le cellule OC316 ed IGROV-1 sono state trasdotte *in vitro* con vettori lentivirali codificanti per il gene reporter *firefly luciferase*.

Le cellule sono state seminate ad una concentrazione di 10^6 cellule/fiasca in una fiasca di coltura a T25 (25cm²). Il giorno seguente sono state incubate per 6 ore con la preparazione virale ottenuta dalla trasfezione in presenza di solfato di protamina ad una concentrazione di 8 µg/ml per facilitare l'infezione (Indraccolo S et al, 2002). Avvenuta la trasduzione, le cellule sono state piastrate ad una concentrazione di 500000 cellule/pozzetto in una piastra nera p96 (OpicPlate-96F) in un volume di 50 µl di PBS 1X. Sono stati aggiunti 50 µl di D-luciferina (Biosynth AG, Staad, Switzerland; 150 mg/kg) e le cellule sono state osservate tramite IVISTM Imaging System (Xenogen Corporation, Alameda, CA) per osservare intensità del segnale di luciferasi.

3.13 Imaging ottico dei tumori

Per effettuare l'imaging ottico dei tumori, le cellule tumorali sono state trasdotte con un vettore lentivirale codificante per il gene reporter *firefly luciferase* e poi sono state inoculate s.c. in topi SCID. Immediatamente dopo l'inoculo ed a successivi intervalli di tempo, sono state acquisite delle immagini usando l'IVISTM Imaging System (Xenogen Corporation, Alameda, CA). Gli animali 10 minuti prima dell'acquisizione tramite imaging, sono stati anestetizzati e sono stati inoculati tramite inoculo intra-peritoneo con D-Luciferina (Biosynth AG, Staad, Switzerland; 150 mg/kg). L'intensità di segnale è stata quantificata come la somma della conta di tutti i fotoni (total flux; Photons/s) all'interno della regione di interesse (ROI, Region Of Interest) disegnata attorno all'area del tumore utilizzando il software LivingImage (Xenogen).

3.14 Analisi istologica

Le masse sono state processate in modo tale da ottenere delle sezioni spesse 4 µm. Alcune sezioni sono state reidratate e poi colorate con Ematossilina di Mayer ed Eosina alcolica al 95% seguendo l'opportuno protocollo.

Il colorante basico ematossilina colora le strutture acide di blu violaceo, quindi il nucleo che contiene il DNA, mentre l'eosina è un colorante acido, che colora le strutture basiche in rosso o rosa, quindi il citoplasma ricco di proteine basiche.

In seguito a colorazione con Ematossilina ed Eosina la porzione di tessuto vitale mostra i nuclei colorati di blu e il citoplasma di rosa, mentre la porzione necrotica presenta una colorazione irregolare e comunque priva di nuclei blu.

La quantificazione della necrosi è stata condotta ad un ingrandimento X 1,25, usando il microscopio LEICADM 2000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). I campioni sono stati fotografati comprendo l'intera sezione tramite una fotocamera Leica DCF 295 collegata al microscopio. In ogni foto l'area totale del tumore e l'area di necrosi sono state misurate da un particolare software (Leica Application Suite v3, Wetzlar, Germany) ed espresse come μm^2 . Infine per calcolare la percentuale dell'area di necrosi si è divisa la somma dell'area necrotica per l'area totale del campione.

3.15 Analisi al microscopio confocale

Per identificare le cellule ipossiche nei tumori, è stato utilizzato pimonidazolo cloridrato (Hypoxiprobe-1; Chemicon International, Temecula, CA), che è stato somministrato intraperitonealmente ai topi un'ora e mezzo prima del sacrificio, alla dose di 100 mg/Kg. Questa molecola è un marker dell'ipossia, poiché a $p\text{O}_2 < 10$ mmHg forma degli addotti stabili con i gruppi tiolici presenti nelle proteine, nei peptidi e negli amminoacidi.

Al momento del sacrificio le masse sono state prelevate, congelate in O.C.T. e conservate a -80°C . Le sezioni dello spessore di $5 \mu\text{m}$ su vetrini polilisinati sono state fissate in paraformaldeide all'1% per 20 minuti a temperatura ambiente, lavate con PBS e incubate con il 5% di siero preimmune di capra in PBS 1% BSA, 0.1% Triton (Normal Goat Serum, Triton X-100, Sigma). L'anticorpo primario di topo anti-Hypoxiprobe-1 utilizzato, è stato diluito 1:50 ed incubato per 1 ora a temperatura ambiente, seguito da incubazione con anticorpo secondario di capra anti-topo diluito 1:500 e coniugato con Alexa 488 (Molecular Probes). Per la controcolorazione dei nuclei è stato usato TO-PRO-3 (Invitrogen) diluito 1:1000, incubato per 15 minuti a temperatura ambiente. Alla fine in seguito a lavaggio in PBS e H_2O si è proceduto con il montaggio dei coprivetrini sui vetrini per l'analisi al microscopio. Le sezioni sono state quindi analizzate al

microscopio confocale a scansione laser (Zeiss LSM 510) utilizzando le sorgenti laser ad Argon (488 nm), ad Elio-Neon (543 nm) e ad Elio-Neon (633 nm).

Di ciascun tumore, trattato e non, sono state recuperate 10 sezioni sulle quali è stato seguito il protocollo per l'immunofluorescenza per poter vedere al microscopio confocale la distribuzione degli addotti del pimonidazolo nelle aree ipossiche. Per avere una valutazione quantitativa, per ogni sezione è stato misurato il rapporto tra l'area ipossica e quella totale, avendo analizzato 10 campi per ogni sezione.

Per la determinazione della "microvessel density" (MVD), i vasi tumorali sono stati marcati con l'anticorpo primario di ratto anti-CD31 (Becton-Dickinson) diluito 1:50 incubato over-night a 4°C, seguito da incubazione con anticorpo secondario di capra anti-ratto diluito 1:500 e coniugato con Alexa 546 (Molecular Probes). Per la controcolorazione dei nuclei è stato usato TO-PRO-3 (Invitrogen) diluito 1:1000, incubato per 15 minuti a temperatura ambiente. La proteina CD31 è un membro della superfamiglia delle immunoglobuline che risulta costitutivamente espresso sulla superficie delle cellule endoteliali dei vasi. L'MVD è stata calcolata nelle aree di maggior vascolarizzazione.

Per la determinazione dell'MVD e della proliferazione, sono stati contati 10 campi rappresentativi per ciascun tumore, all'ingrandimento x400 (*Weidner N et al, 1991*).

3.16 Imaging metabolico

Per la misura quantitativa del lattato e dell'ATP nelle sezioni di tumori derivati da cellule OC316 e IGROV-1 è stata utilizzata la tecnica della bioluminescenza (*Walenta S et al, 2002; Walenta S et al, 2004*). Sopra le sezioni congelate, è stata applicata una soluzione di reazione contenente enzimi specifici che legano il glucosio, il lattato e l'ATP alla luciferasi di *Photobacterium fischeri* e *Photinus pyralis*, rispettivamente. L'emissione di luce è stata poi indotta a 20°C in una cameretta che è stata posta sotto un microscopio (Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Germany) connesso con una 16-bit CCD camera (C2400, Hamamatsu, Herrsching, Germany). Le immagini della distribuzione spaziale delle intensità di luce sono state calibrate usando standards appropriati. Le concentrazioni di glucosio, di lattato e di ATP sono state analizzate solo nelle aree vitali.

3.17 Analisi statistiche

I risultati sono stati espressi come valore medio \pm DS (Deviazione Standard). Le analisi statistiche sono state effettuate usando il test t di Student ed il test non parametrico Mann-Whitney Wilcoxon. Le differenze sono state considerate statisticamente significative con $P < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Correlazione tra fenotipo glicolitico e sensibilità all'ipossia

Tale progetto prosegue uno studio recentemente pubblicato dal nostro laboratorio (Favaro E. *et al.*, 2008) in cui avevamo descritto una correlazione tra fenotipo glicolitico e sensibilità all'ipossia in linee di carcinoma ovarico.

Abbiamo esteso tale osservazione ad altre linee tumorali derivate da leucemie linfoblastiche acute T (MOLT3 e JURKAT), carcinoma esofageo (OE19 e KYSE30), ovarico (IGROV-1 e OC316) e pancreatico (BXPC3 e MiaPaca2). Abbiamo misurato il consumo di glucosio e la produzione di lattato di tali linee dopo 24 ore *in vitro* in condizioni di normossia (21% O₂) ed abbiamo osservato che alcune linee cellulari - definite altamente glicolitiche - tra cui le OC316, JURKAT, KYSE30 e MiaPaca2 presentano livelli di consumo di glucosio e produzione di lattato decisamente maggiori rispetto alle linee IGROV-1, MOLT4, OE19 e BXPC3 (Figura 4.1-A), definite poco glicolitiche.

Abbiamo quindi indagato quale fosse l'effetto dell'ipossia sulla vitalità cellulare. A tal fine abbiamo incubato le cellule per 72 ore in condizioni di normossia o ipossia (0,5 % O₂) ed abbiamo valutato la percentuale di apoptosi dopo marcatura con Annessina V/PI. Tutte e 4 le linee altamente glicolitiche hanno evidenziato un aumento significativo dell'apoptosi in condizioni di ipossia rispetto alle stesse linee coltivate in normossia. Le linee scarsamente glicolitiche d'altra parte non hanno subito variazioni significative nella vitalità (Figura 4.1-B).

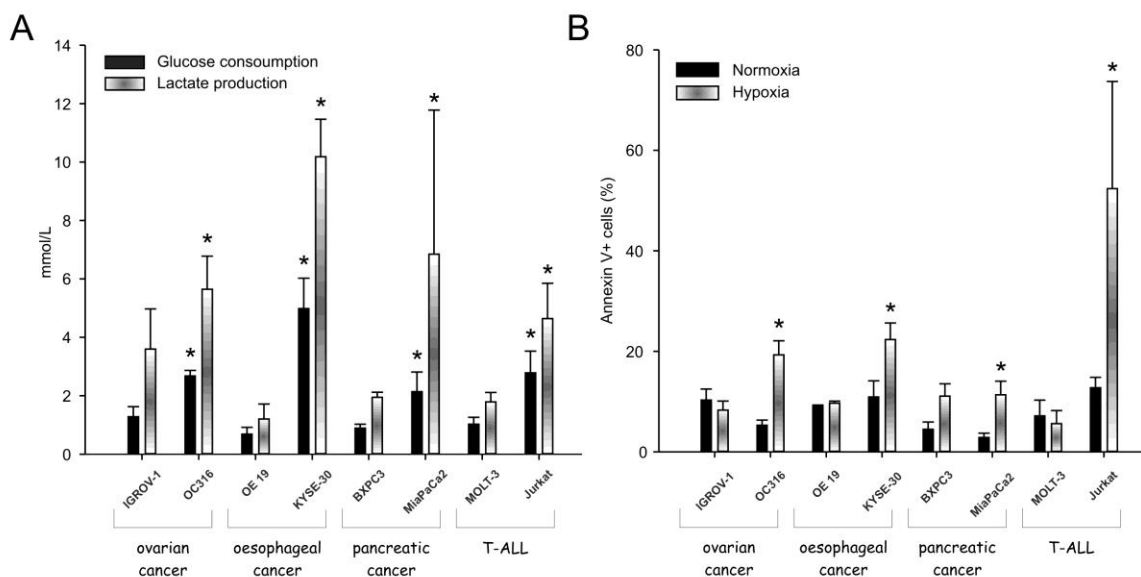


Figura 4.1: Identificazione di linee tumorali con diverso fenotipo glicolitico e correlazione con la sopravvivenza in condizioni ipossiche. A: i valori di glucosio e lattato rappresentano la media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. I dosaggi sono stati effettuati in sovrantanti raccolti 24 ore dalla semina delle cellule (300000 cellule/9,6 cm²). Le linee OC316, KYSE-30, MiaPaca2 e Jurkat hanno livelli di consumo di glucosio e produzione di lattato maggiori rispetto alle corrispondenti linee IGROV-1, OE 19, BXPC3, MOLT-3 (*). B: le percentuali di cellule apoptotiche rappresentano la media \pm DS di quattro esperimenti indipendenti eseguiti coltivando le cellule alla densità di 300000 cellule/9,6 cm² per 72 ore in normossia o allo 0,5% di O₂. Le linee OC316, KYSE-30, MiaPaca2 e Jurkat presentano livelli di apoptosi superiori in ipossia rispetto alla normossia. (*), p<0.05, test t di Student e Mann-Whitney Wilcoxon.

Per le linee IGROV-1 ed OC316, che sono le linee con cui abbiamo condotto la maggior parte degli esperimenti successivi, abbiamo voluto indagare ulteriormente la diversa capacità glicolitica attraverso la metodica In Cell Western Blot. Quest'analisi effettuata in condizioni di normossia ha permesso di misurare l'espressione relativa di alcune proteine coinvolte nel processo di glicolisi:

- * GLUT-1, un trasportatore di membrana coinvolto nella captazione del glucosio extracellulare;
- * l'esochinasi II (HKII), coinvolta nella prima reazione di fosforilazione del glucosio a glucosio 6-fosfato;
- * la fosfofruttochinasi (PFK-2), coinvolta nella reazione in cui il fruttosio 6-fosfato viene convertito in fruttosio 1,6-bifosfato. Dai livelli di attività di questo enzima dipende la velocità dell'intero processo di glicolisi;
- * la piruvatochinasi (PK), coinvolta nell'ultima reazione del processo di glicolisi, converte il fosfoenolpiruvato in piruvato con produzione di ATP;

- * la lattato deidrogenasi A (LDH-A), enzima in coda alla glicolisi, che catalizza la trasformazione del piruvato in lattato usando come cofattore il NADH.

I livelli relativi di espressione proteica di quattro proteine su cinque analizzate sono risultati significativamente maggiori nella linea OC316 rispetto alla linea IGROV-1. L'espressione della proteina LDH-A non è risultata essere diversa in modo significativo tra le due linee (Figura 4.2). Questo saggio conferma che le cellule OC316 possiedono un metabolismo glicolitico maggiore rispetto alle IGROV-1.

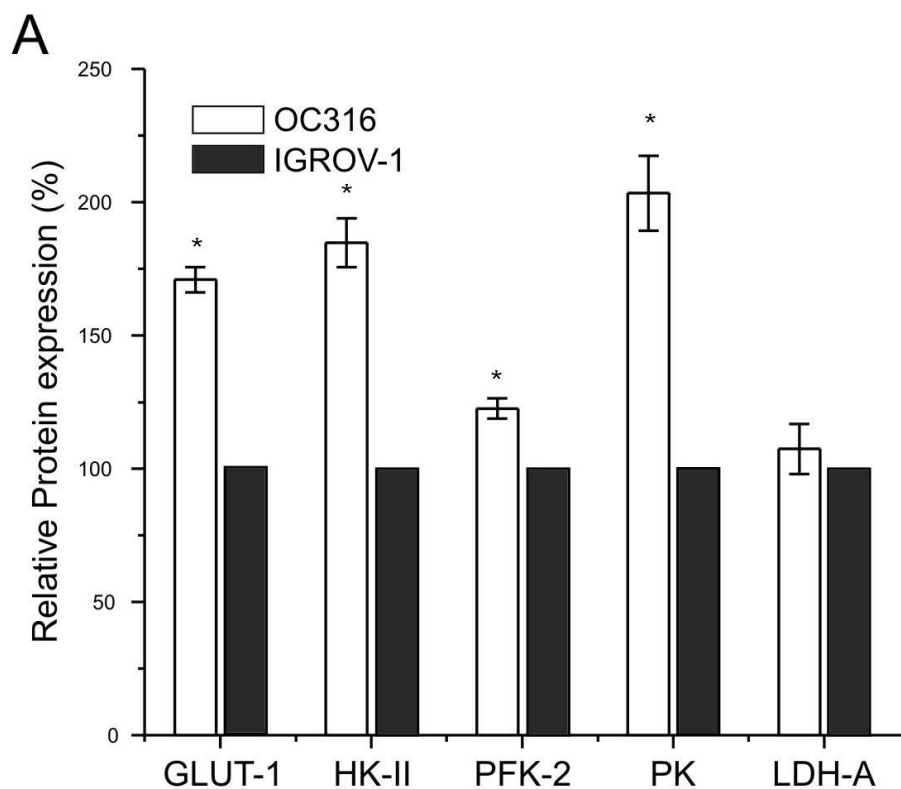


Figura 4.2: Analisi mediante In Cell Western Blot dell'espressione relativa di proteine della glicolisi in due linee cellulari di carcinoma ovarico. I livelli di espressione nelle IGROV-1 sono stati posti uguali ad 100, e sono stati poi calcolati i livelli di espressione relativa per ciascun enzima nelle OC316. I valori mostrati rappresentano le medie \pm DS di tre prove indipendenti. (*), $p < 0.05$, test t di Student.

Una volta dimostrato che all'interno di uno stesso istotipo tumorale vi possono essere marcate differenze in termini di fenotipo glicolitico, siamo andati ad analizzare l'espressione di alcuni fattori trascrizionali che sono implicati nell'effetto Warburg (Yeung SJ et al, 2008). Abbiamo quindi coltivato alcune delle linee tumorali analizzate in Figura 4.1 in condizioni di normossia e tramite Western Blot abbiamo analizzato l'espressione dei fattori HIF-1 α e c-Myc, e lo stato di attivazione di Akt tramite l'analisi

della fosforilazione dei siti Ser 473 e Thr 308 (Figura 4.3). In nessuna delle linee analizzate si sono trovati livelli detectabili di HIF-1 α in condizioni di normossia. Nell'ambito delle diverse coppie di linee cellulari non c'è inoltre una diversa espressione di c-Myc, anche se tale fattore è espresso a livelli maggiori nelle linee di leucemia rispetto a quelle derivate da carcinomi. La fosforilazione di Akt è risultata inaspettatamente maggiore nelle linee meno glicolitiche rispetto a quelle maggiormente glicolitiche. Questo dato, pur in contrasto con quanto si ritrova in letteratura a proposito di Akt (*Elstrom RL et al, 2004*), dimostra che il fenotipo glicolitico non è legato ad iperattivazione di Akt nel nostro sistema sperimentale.

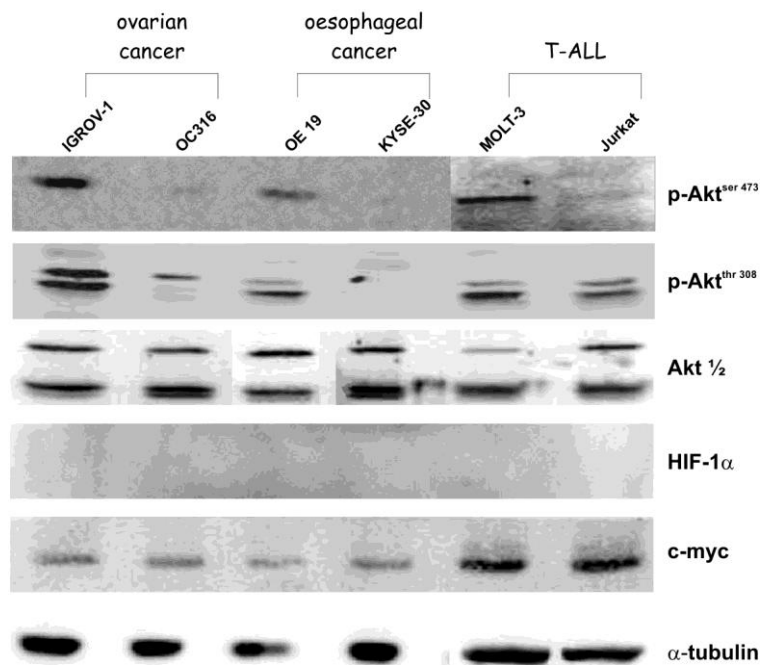


Figura 4.3: Analisi tramite Western Blot di proteine collegate all'effetto Warburg. Analisi dell'espressione di pAkt^{ser473}, pAkt^{thr308}, Akt, c-Myc e HIF-1 α ottenuti dai lisati di 6 linee cellulari mantenute per 24 ore in condizione di normossia (21% O₂). L'anticorpo anti- α -tubulina è stato utilizzato come controllo di normalizzazione della carica dei pozzetti.

Successivamente abbiamo valutato, tramite reazione di sequenza, le possibili mutazioni a livello degli oncogeni p53 e K-Ras, in quanto mutazioni a carico di questi due oncogeni sono state associate ad un incremento della glicolisi aerobia (*Matoba et al, 2006; Noguchi Y et al, 2000*). In nessuna delle linee è stata tuttavia riscontrata una mutazione a carico del gene K-Ras. Le linee derivanti dal carcinoma ovarico e da T-ALL hanno evidenziato una differenza nello stato mutazionale di p53; le linee meno glicolitiche (IGROV-1 e MOLT-3) non hanno mutazioni in p53, mentre le linee

maggiormente glicolitiche (OC316 e Jurkat) presentano una mutazione inattivante in tale gene, da cui potrebbero dipendere le differenze metaboliche (Tabella 4.1). Non si è riscontrata tuttavia tale differenza nelle linee derivanti da carcinoma esofageo, in quanto entrambe presentano una mutazione inattivante in p53. Nel loro insieme, questi risultati indicano che il fenotipo glicolitico può essere determinato da varie alterazioni genetiche nelle cellule tumorali, tra cui alcune non ancora determinate.

| <i>Mutations</i> | p53 | K-Ras |
|------------------|------------------|--------------|
| IGROV-1 | wt | wt |
| OC316 | R273H | wt |
| OE19 | 310 AAG-Ins | wt |
| KYSE-30 | R110L; E326K | wt |
| MOLT-3 | wt | wt |
| Jurkat | R196 <u>Stop</u> | wt |

Tabella 4.4: Tabella delle mutazioni riscontrate nei geni p53 e K-Ras. Nella colonna relativa a p53 sono indicati i codoni in cui le mutazioni sono state riscontrate; per questo gene sono stati sequenziati gli esoni 4-5-6-7-8-9. Nessuna mutazione è stata riscontrata in K-Ras, tutte le linee risultano avere sequenze normali (wt); per tale gene sono state sequenziati i codoni 12 e 13.

4.2 Mantenimento del fenotipo glicolitico *in vivo*

Avendo osservato che linee di diverso istotipo tumorale presentano rilevanti differenze in termini di metabolismo *in vitro*, abbiamo voluto indagare se tali differenze si mantengono anche nei tumori derivati da queste linee. A tal fine, abbiamo inoculato le linee IGROV-1 e OC316 sotto cute (s.c.) in topi SCID. Quando il tumore aveva raggiunto il volume di circa 100 mm³ gli animali sono stati sacrificati e i tumori analizzati tramite metodica di imaging metabolico. Sono stati determinati i valori di glucosio, di lattato e di ATP all'interno delle regioni vitali del tumore (Figura 4.4 A). I tumori OC316 hanno evidenziato un consumo di glucosio, una produzione di lattato e di ATP superiori rispetto ai tumori IGROV-1, confermando i dati *in vitro* secondo cui le cellule OC316 utilizzano la glicolisi maggiormente rispetto alle cellule IGROV-1.

I dati di imaging metabolico venivano rinforzati anche dall'analisi tramite Real Time PCR di espressione di tre geni, che codificano per enzimi coinvolti nella glicolisi. Abbiamo analizzato l'espressione dei geni HKII, GADPH e LDH-A, ed in tutti e tre i casi c'è un aumento significativo dell'espressione relativa dell'mRNA nei tumori OC316 rispetto ai tumori IGROV-1 (Figura 4.4 B).

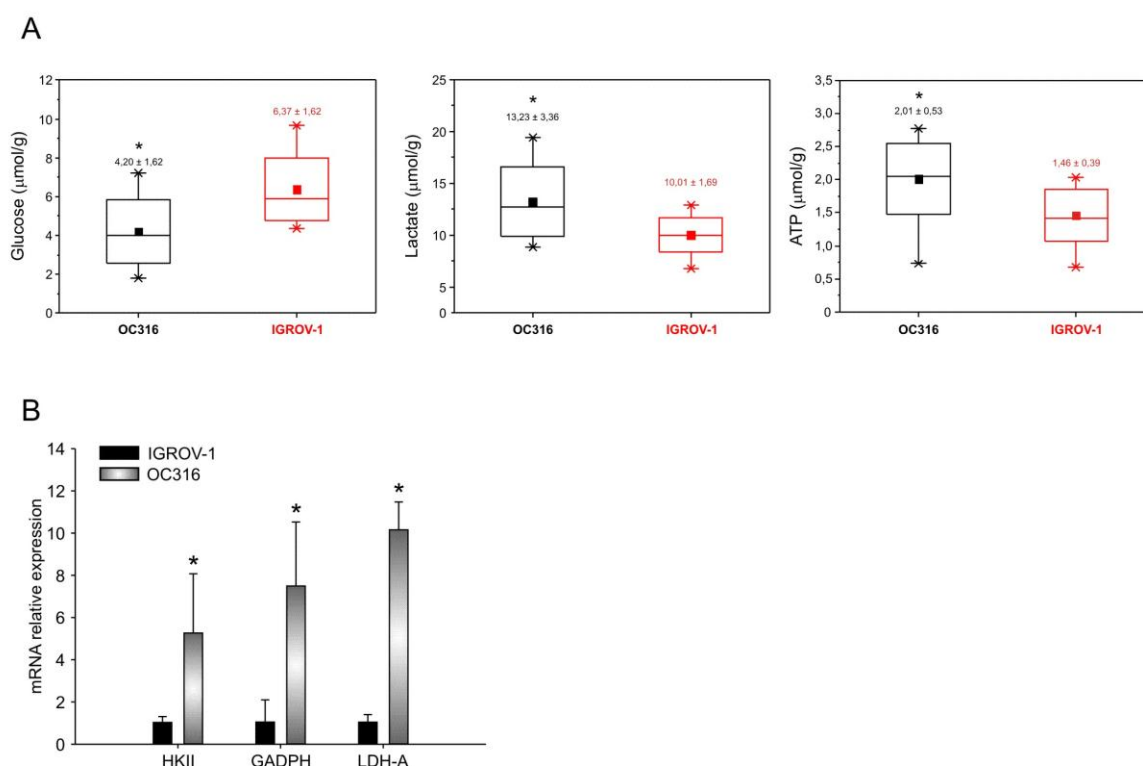


Figura 4.4: Analisi del fenotipo glicolitico in tumori IGROV-1 ed OC316. A: Analisi tramite imaging metabolico di glucosio, lattato e di ATP nelle regioni vitali in 15 sezioni diverse per tipo di tumore. Sono rappresentate le concentrazioni medie \pm DS; (*), $p < 0.05$, test t di Student. B: Analisi mediante PCR quantitativa dell'espressione di geni della glicolisi nei di tumori. L'espressione relativa è stata calcolata ponendo uguale ad uno i livelli d'espressione in un tumore della serie IGROV-1. Gli istogrammi rappresentano medie \pm DS di 5 tumori per ciascuna linea. (*), $p < 0.05$, test Mann-Whitney Wilcoxon.

4.3 Correlazione tra ipossia e deprivazione di glucosio

Una possibile spiegazione del fatto che cellule altamente glicolitiche muoiano in condizioni di ipossia maggiormente rispetto a cellule scarsamente glicolitiche, è che le prime consumino prima le riserve di glucosio presenti nel terreno. Infatti i nostri risultati precedenti indicavano che l'aggiunta di glucosio al terreno di coltura standard (5g/L *versus* 2g/L) annullava completamente la tossicità da ipossia (Favaro *et al.* 2008). Per validare ulteriormente tale ipotesi abbiamo coltivato le IGROV-1 e le OC316 in condizioni di normossia e deprivazione di glucosio per 48 ore. Abbiamo quindi analizzato la percentuale di cellule apoptotiche tramite saggio dell'annessina V ed abbiamo osservato un aumento maggiore della morte cellulare delle OC316 rispetto alle IGROV-1 (Figura 4.5-A).

Successivamente abbiamo coltivato tali cellule in condizioni di normossia ed in terreno completo in presenza di:

- * un inibitore della fosforilazione ossidativa, l'oligomicina (0,2µg/ml) che blocca l'ATP sintasi e la respirazione, così da spingere maggiormente le cellule ad utilizzare la glicolisi;
- * un inibitore della glicolisi, il 2DeossiGlucosio (2DG) (6g/L), il quale è un analogo del glucosio e viene convertito dall'enzima HKII a 2 deossiglucosio 6-fosfato, che non viene ulteriormente metabolizzato bloccando così la glicolisi.

Abbiamo osservato una mortalità maggiore delle cellule OC316 trattate con entrambi i composti rispetto alle cellule non trattate. Nella linea IGROV-1 non si misura alcuna differenza nella mortalità cellulare a seguito dei due trattamenti. Nel caso dell'oligomicina, l'aggiunta di glucosio al terreno preserva dalla morte le cellule OC316, ad indicare che essa è correlata all'esaurirsi del glucosio nel terreno, e non ad altri effetti del farmaco (Figura 4.5 B-C).

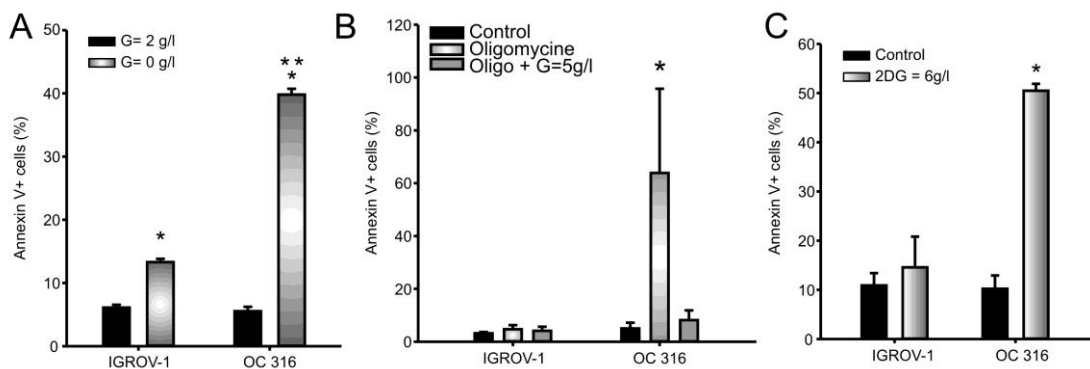


Figura 4.5: Valutazione della morte cellulare in varie condizioni sperimentali *in vitro*. A: Valutazione dell'apoptosi di colture cellulari in terreno privo di glucosio rispetto alle cellule coltivate in terreno con glucosio alla concentrazione standard (2g/L). B: Valutazione dell'apoptosi dopo trattamento con oligomicina (0,2 µg/ml) in terreno standard o supplementato di glucosio (5g/L). C: Valutazione dell'apoptosi dopo trattamento con 2DG (6g/L). Gli istogrammi rappresentano media ±DS di tre prove indipendenti. (*; **) $p < 0,05$ test Mann-Whitney Wilcoxon.

4.4 Studi in vivo: trattamento a breve termine di tumori sperimentali con farmaci anti-angiogenici

Avendo osservato che i tumori derivanti dalle linee OC316 e IGROV-1 mantengono il fenotipo glicolitico proprio delle stesse cellule *in vitro* e che la morte delle cellule OC316 in condizioni di ipossia è legata all'esaurirsi del glucosio nel terreno di coltura, abbiamo voluto analizzare la risposta di questi tumori al trattamento con farmaci anti-

angiogenici. Abbiamo quindi inoculato s.c. queste 2 linee in topi SCID ed a tumore stabilizzato (volume = $300 \pm 50 \text{ mm}^3$) abbiamo somministrato l'anticorpo monoclonale anti-VEGF A.4.6.1. (Genentech). Gli animali sono stati trattati a breve termine con 3 inoculi intraperitoneali di A.4.6.1. o PBS (gruppo controllo) a tre giorni di distanza l'uno dall'altro e dopo il terzo inoculo sono stati sacrificati. Abbiamo misurato i volumi medi delle masse e generato la curva di crescita dei due tipi di tumore.

I tumori derivanti dalla linea altamente glicolitica (OC316) hanno risposto alla terapia anti-angiogenica con una riduzione significativa del volume mentre i tumori derivanti dalla linea scarsamente glicolitica (IGROV-1) non hanno subito variazioni di volume significative (Figura 4.6).

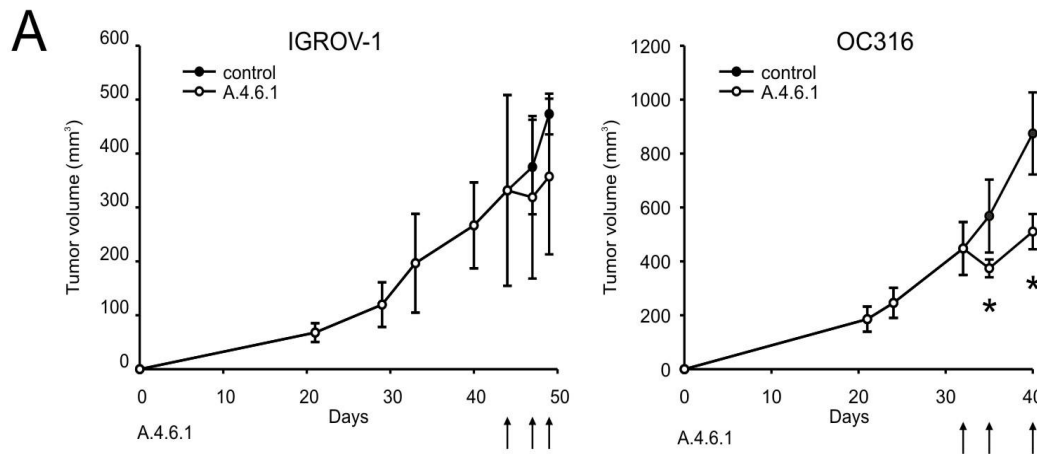


Figura 4.6: Effetti della terapia a breve termine con l'anticorpo anti-VEGF (A.4.6.1) su xenotrapianti di carcinoma ovarico. Le curve di crescita riportano la media di 10 tumori per ciascun gruppo sperimentale. Le frecce indicano i giorni in cui è stato somministrato il farmaco (100µg/dose). (*) $p < 0,05$ test Mann-Whitney Wilcoxon.

I tumori sono stati quindi analizzati mediante immunofluorescenza per valutare gli effetti della terapia anti-angiogenica a livello della vascolatura tramite conta dei vasi dopo marcatura con CD31. Gli animali poco prima del sacrificio sono stati inoltre inoculati con pimonidazolo, un marcatore di ipossia. Grazie a questo è stato possibile analizzare anche il grado di ipossia dei tumori tramite immunofluorescenza. Infine abbiamo valutato anche le aree di necrosi tramite colorazione con ematossilina-eosina. La terapia ha causato una significativa riduzione nel numero dei vasi (MVD) ed un aumento delle zone ipossiche (pimonidazolo) in entrambi i tipi di tumore (Figura 4.7 B-C). La riduzione del numero di vasi in entrambi i tipi di tumore è un'indicazione che la terapia ha funzionato. L'analisi del pimonidazolo ci ha permesso inoltre di dimostrare che la terapia anti-angiogenica aumentava l'ipossia all'interno del microambiente

tumorale. Tale analisi è supportata anche dal riscontro di livelli maggiori di HIF-1 α , che si stabilizza in condizioni ipossiche, nei lisati derivati dalle masse trattate con A.4.6.1. rispetto ai controlli (Figura 4.8).

Per quanto riguarda la necrosi, i tumori derivanti dalla linea OC316 trattati con A.4.6.1. presentavano un aumento significativo delle aree di necrosi rispetto ai controlli; tale differenza non si osservava invece nei tumori IGROV-1 (Figura 4.7 D). La terapia sembra quindi avere un effetto diverso nei tumori altamente glicolitici rispetto a tumori scarsamente glicolitici.

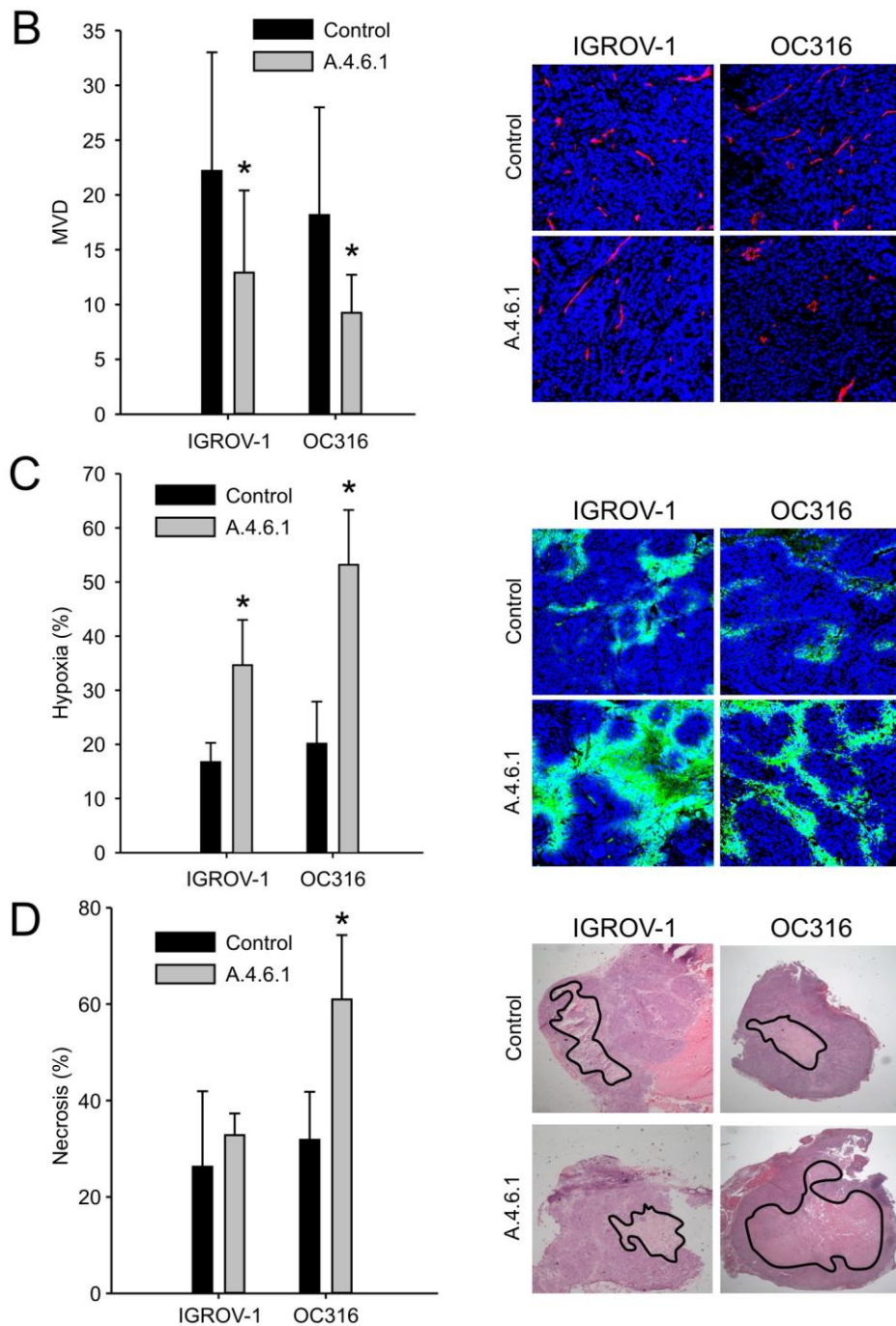


Figura 4.7: Valutazione degli effetti della terapia a breve termine con l'anticorpo anti-VEGF A.4.6.1, nei tumori IGROV-1 e OC316. A: immagini rappresentative ed analisi quantitativa della densità micro-vascolare (Micro Vessel Density; MVD) nelle sezioni trattate con A.4.6.1. o con PBS dopo conta dei vasi positivi alla marcatura per CD31. B: Immagini rappresentative e analisi quantitativa delle aree ipossiche, positive alla marcatura per pimonidazolo, rispetto all'area totale della sezione nei tumori trattati con A.4.6.1. rispetto ai controlli. C: Immagini rappresentative e analisi quantitativa delle aree di necrosi presenti nei tumori trattati o meno con A.4.6.1. In tutti i casi gli istogrammi rappresentano media \pm DS dell'analisi di 5 tumori per gruppo. (*) $p < 0,05$ test Mann-Whitney Wilcox

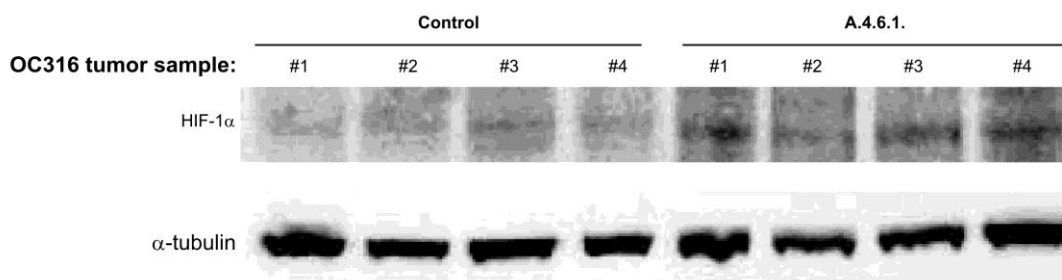


Figura 4.8: Espressione di HIF-1 α nei tumori OC316 trattati o meno con A.4.6.1 Analisi mediante western blot dell'espressione di HIF-1 α in alcuni campioni rappresentativi. α Tubulina è stato utilizzata per normalizzare la carica dei pozzetti.

Effetti simili sono stati osservati trattando i tumori IGROV-1 ed OC316 con un altro farmaco anti-angiogenico, lo ZD6474. Questo farmaco agisce bloccando il recettore per VEGF (VEGFR2) ed ha inoltre attività sul recettore per EGF. Bloccando il recettore per VEGF riusciamo ad inibire sia l'effetto del VEGF umano che quello murino presente nel microambiente tumorale. I tumori sono stati trattati con 3 inoculi di ZD6474 a 2 giorni di distanza e dopo il terzo inoculo gli animali sono stati sacrificati ed i tumori analizzati. Come per il trattamento con l'A.4.6.1, i tumori OC316 a differenza dei tumori IGROV-1 hanno risposto al trattamento con ZD6474 con una riduzione significativa in termine di volume rispetto ai controlli (Figura 4.9 A).

La valutazione dell'MVD ha evidenziato anche nel caso dello ZD6474 una riduzione del numero di vasi a seguito del trattamento (Figura 4.9 B). L'immunofluorescenza per pimonidazolo indica un aumento significativo delle aree ipossiche a seguito del trattamento con ZD6474 in entrambi i tumori. Il trattamento a breve termine con lo ZD6474 conferma dunque il risultato ottenuto con l'A.4.6.1.

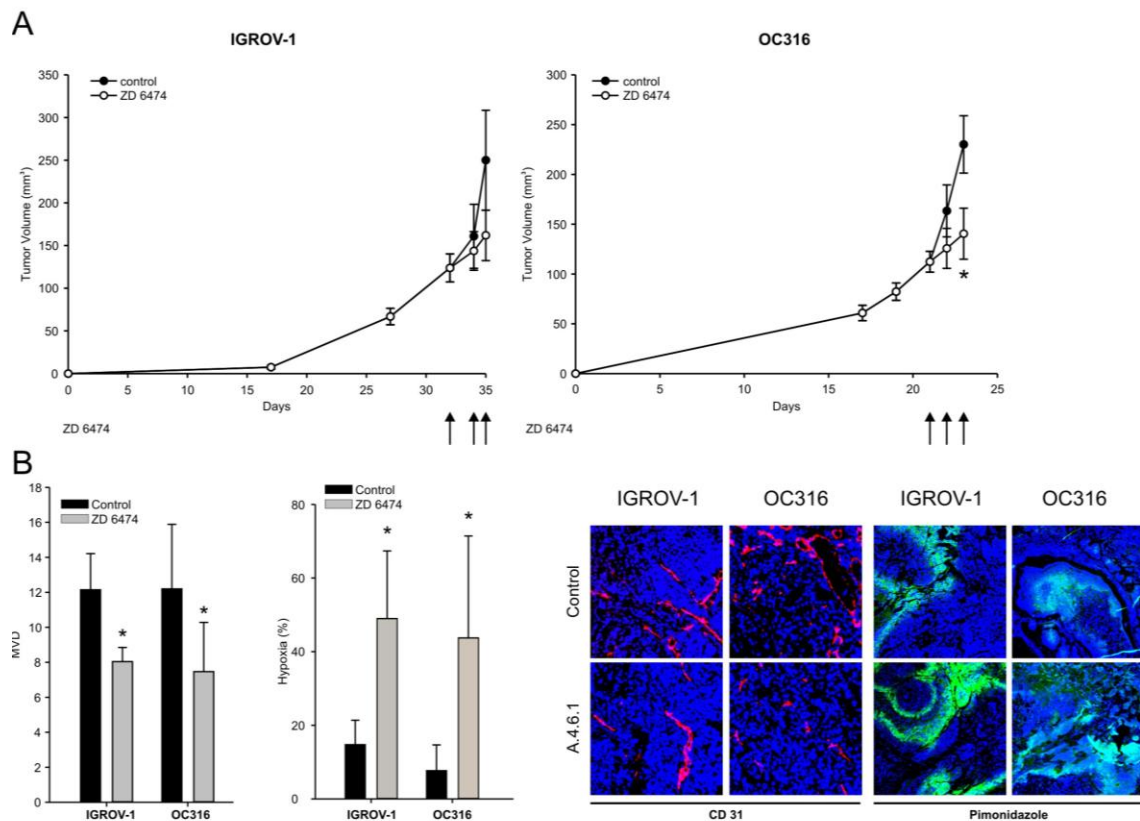


Figura 4.9: Effetti dell'inibitore tirosinchinasico ZD6474 nei tumori IGROV-1 ed OC316. A: Le curve di crescita riportate derivano dalla media dei volumi di 10 masse per ciascun gruppo. Le frecce indicano i giorni in cui è stato somministrato il farmaco. B: Immagini rappresentative e analisi quantitativa della densità micro-vascolare (MVD) e delle aree ipossiche positive per pimonidazolo nei tumori trattati o meno con ZD6474. Gli istogrammi rappresentano media \pm DS delle analisi effettuate su 6 tumori per gruppo. (*) $p < 0,05$ test Mann-Whitney Wilcoxon.

4.4 Imaging metabolico dopo trattamento con l'anticorpo anti-VEGF

Grazie alla collaborazione con il gruppo del Prof. W. Mueller-Klieser (Mainz, Germania) abbiamo potuto analizzare i livelli di ATP e di glucosio nelle sezioni di tumori OC316 ed IGROV-1 trattati con A.4.6.1 per valutare se la terapia anti-angiogenica potesse creare una perturbazione a livello di tali metaboliti. Tale valutazione è stata eseguita tramite imaging metabolico delle regioni vitali dei tumori. Quello che si osserva sia nelle masse OC316 che nelle masse IGROV-1 è che la terapia comporta una diminuzione significativa sia nei livelli di ATP che nei livelli di glucosio nei tumori trattati con A.4.6.1. rispetto ai tumori controllo (Figura 4.10). La terapia anti-angiogenica comporta non solo un aumento dell'ipossia all'interno dei tumori, ma provoca anche una riduzione significativa dell'apporto di glucosio, provocando così una riduzione dei livelli di ATP nelle cellule tumorali.

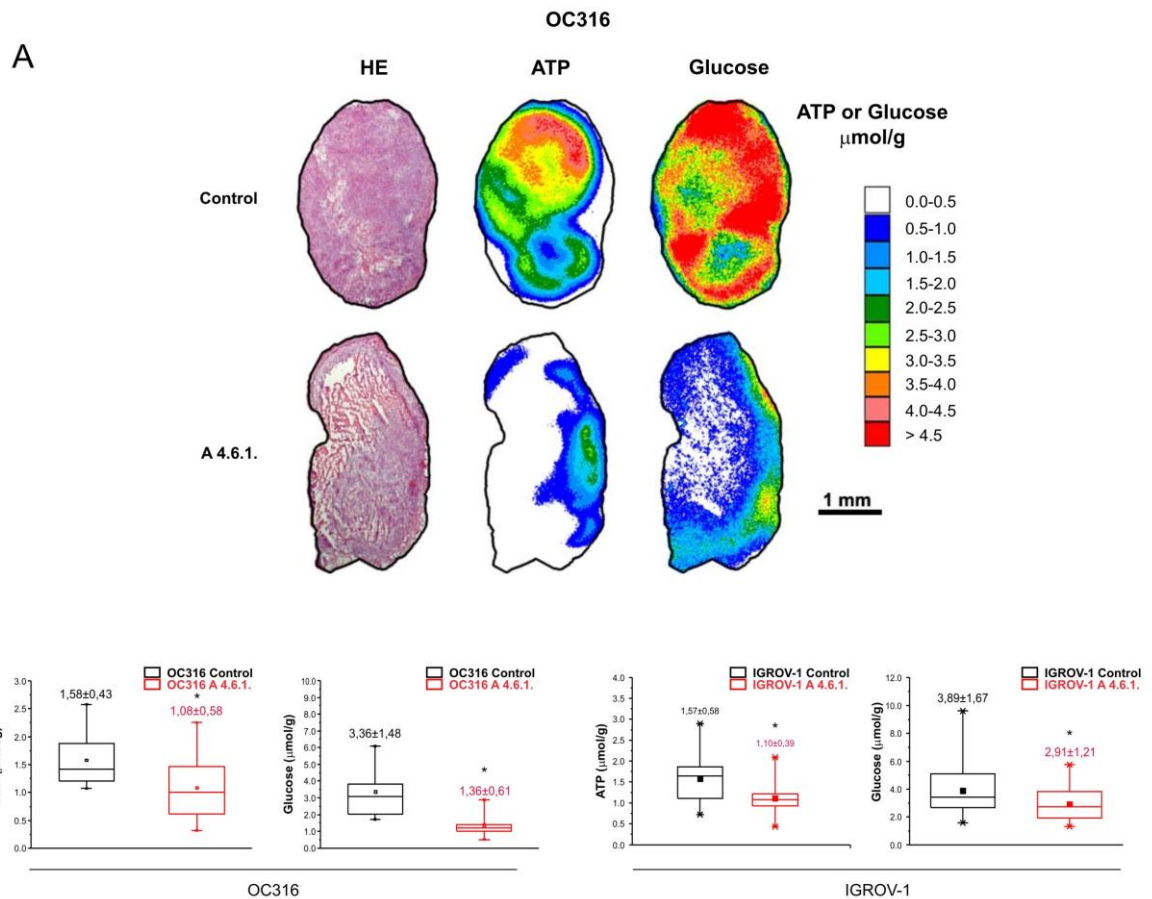


Figura 4.10: Imaging metabolico dei tumori OC316 e IGROV-1 a seguito della terapia con A4.6.1. Immagine rappresentativa di imaging metabolico sui tumori OC316 e analisi quantitativa effettuata sui tumori OC316 e IGROV-1 dei livelli di ATP e glucosio presenti nei tumori. Le concentrazioni medie \pm DS di glucosio e di ATP sono ottenute dall'analisi delle regioni vitali in 12 sezioni diverse per il glucosio per tipo di tumore e in 21 sezioni diverse per l'ATP per tipo di tumore. (*), $p < 0.05$, test t di Student.

4.5 Trattamenti a lungo termine con l'anticorpo anti-VEGF

Abbiamo quindi iniziato a studiare la risposta di questi tumori alla terapia anti-angiogenica protratta nel tempo per 4-5 settimane. Topi SCID portatori di tumori IGROV-1 o OC316 stabilizzati ($150 \pm 50 \text{ mm}^3$) sono stati trattati con A.4.6.1 la prima settimana 3 volte e nelle successive settimane 2 volte a settimana.

Abbiamo osservato che i tumori OC316 trattati con A.4.6.1. hanno una risposta iniziale rapida, come già riscontrato nell'esperimento a breve termine, ma successivamente il loro volume si stabilizza e quindi tornano a crescere, sebbene rimangano sempre di volume inferiore rispetto al gruppo di controllo. I tumori IGROV-1 invece hanno una risposta alla terapia anti-VEGF inizialmente più lenta rispetto ai tumori OC316, ma vengono controllati in maniera più efficace nel lungo termine continuando a diminuire di volume (Figura 4.11 A). In questi stessi tumori siamo andati anche ad valutare

tramite colorazione con ematossilina-eosina le aree di necrosi (Figura 4.11 B). La differenza significativa che si era osservata nei tumori OC316 in termini di aumento della necrosi a seguito del breve trattamento non si osserva più nel lungo termine. La spiegazione di questo fatto potrebbe essere legata ad una maggiore percentuale di necrosi nel gruppo controllo rispetto all'esperimento a breve termine (31% nell'esperimento a breve termine rispetto al 55% in questo esperimento), riferibile all'aumento delle dimensioni di tali tumori. Misurando la necrosi nei tumori IGROV-1 si osserva invece che si ha un aumento considerevole delle aree di necrosi rispetto all'esperimento a breve termine (da 33% nell'esperimento a breve termine ad un 58% nel lungo termine).

Le cellule tumorali inoculate s.c. per l'esperimento a lungo termine erano state precedentemente trasdotte con un gene reporter per la luciferasi. Questo ci ha permesso di seguire la crescita dei tumori anche tramite una macchina per l'imaging (Xenogen) in grado di captare il segnale generato dalla luciferasi presente nelle cellule tumorali. Tale metodica ha confermato i risultati ottenuti dalla misurazione delle masse s.c., e cioè che entrambi i tipi di tumori hanno una riduzione significativa nei livelli di luciferasi a seguito del trattamento con A.4.6.1. ma che le cinetiche di risposta sono diverse (Figura 4.11 C).

Abbiamo inoltre ripetuto l'esperimento a lungo termine utilizzando come anti-angiogenico un secondo anticorpo monoclonale anti-VEGF denominato B20-4.1.1. (Genentech) che a differenza dell'A.4.6.1. blocca sia il VEGF umano che quello murino. Tale anticorpo ci permette di verificare se la differenza nella risposta alla terapia anti-angiogenica possa essere dovuta alla presenza di diverse quantità di VEGF murino nel microambiente tumorale nei due tipi di tumore. Abbiamo inoculato s.c. le cellule ed a tumori impiantati (50 mm^3) abbiamo iniziato a trattare gli animali con B20-4.1.1. o PBS (gruppo controllo). La somministrazione del farmaco è stata uguale a quella dell'esperimento precedente. Anche in questo caso il tumore OC316 ha una risposta iniziale alla terapia più rapida ma nelle fasi successive si stabilizza. I tumori IGROV-1 dopo i primi tre inoculi non sembrano rispondere alla terapia ma successivamente iniziano a ridurre il loro volume fino quasi a regredire (Figura 4.12).

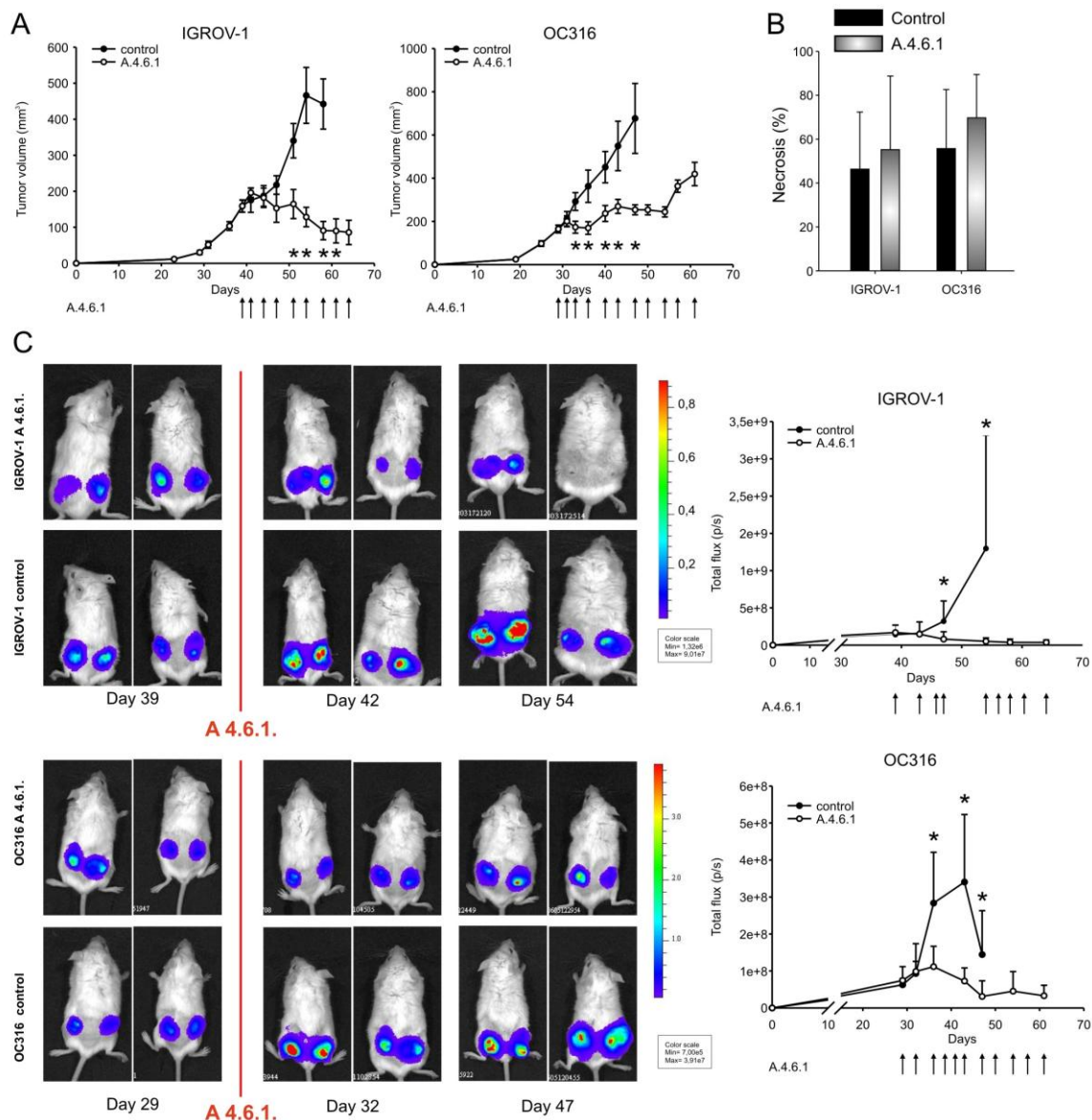


Figura 4.11: Effetti della terapia a lungo termine con l'anticorpo anti-VEGF A.4.6.1, sulla crescita tumorale. A: Le curve di crescita rappresentate riportano la media \pm DS del volume di 10 masse per ciascun gruppo. Le frecce indicano i giorni in cui è stato somministrato il farmaco al gruppo A.4.6.1, o PBS al gruppo Control. B: Analisi quantitativa dell'area di necrosi presente nei tumori OC316 e IGROV-1 trattati o meno con A.4.6.1. Gli istogrammi rappresentano le medie \pm DS di 10 tumori analizzati. C: immagine rappresentativa e analisi quantitativa dell'intensità di segnale nei tumori derivati dalle cellule IGROV-1 e OC316 trasdotte con il gene reporter della Luciferasi e trattati o meno con A.4.6.1. Le curve rappresentano media \pm DS di 10 tumori per gruppo e le frecce in ascissa indicano l'inizio del trattamento farmacologico. (*) $p < 0,05$ test Mann-Whitney Wilcoxon.

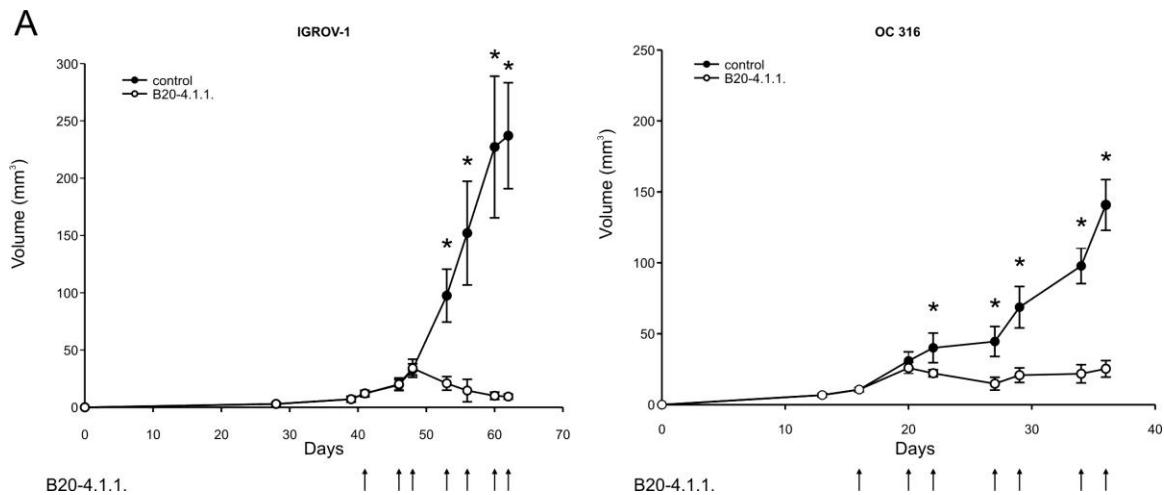


Figura 4.12: Effetti della terapia a lungo termine con l'anticorpo B20-4.1.1. sulla crescita tumorale. A: Le curve di crescita riportano la media \pm DS del volume di 10 masse per ciascun gruppo, B20-4.1.1. o controllo. Le frecce in ascissa indicano i giorni in cui è stato somministrato il farmaco al gruppo B20-4.1.1. o PBS al gruppo Control. (*) $p < 0,05$ test Mann-Whitney Wilcoxon.

4.6 Attivazione della via di AMPK

Nei tumori trattati con A.4.6.1 l'imaging metabolico ha evidenziato una riduzione significativa dei livelli di ATP rispetto ai tumori di controllo. In seguito a questa osservazione abbiamo voluto analizzare nelle linee cellulari in esame l'attivazione della chinasi AMPK. Tale chinasi è considerata un "sensore dell'ATP" e si attiva fosforilandosi quando all'interno della cellula c'è un calo dell'ATP, con relativo aumento del rapporto AMP:ATP.

Abbiamo studiato tale proteina *in vitro* nelle cellule IGROV-1 ed OC316 ponendoci nelle condizioni di normossia (21% O₂) ed ipossia (0,5% O₂) in presenza (2g/L) o assenza (0g/L) di glucosio nel terreno di coltura. Con le condizioni estreme di ipossia e deprivazione di glucosio abbiamo voluto mimare quella che può essere la condizione tumorale a seguito della terapia anti-angiogenica, in quanto abbiamo dimostrato che tale terapia comporta un aumento dell'ipossia e una diminuzione del glucosio all'interno dei tumori.

Per prima cosa abbiamo studiato i livelli di ATP intracellulari nelle due linee tumorale dopo coltura di 24 ore in tali condizioni (Figura 4.13). Abbiamo osservato che entrambe le linee, sia in normossia che in ipossia, hanno una marcata riduzione dei livelli di ATP intracellulari, in condizioni di deprivazione di glucosio, rispetto alla condizione di normossia in presenza di glucosio (*). Nella condizione di ipossia e deprivazione di

glucosio tale riduzione è superiore rispetto a tutte le altre condizioni. L'ipossia da sola dopo 24 ore non sembra dare delle variazioni significative nei livelli di ATP.

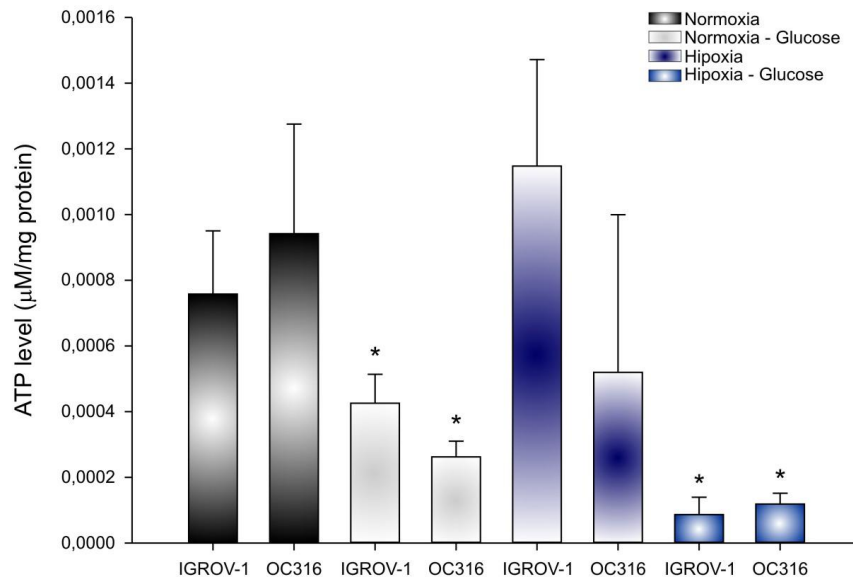


Figura 4.13: Analisi dei livelli di ATP intracellulari. Sono stati analizzati i livelli di ATP nelle cellule IGROV-1 e OC316 in condizioni di normossia (21% O₂), normossia senza glucosio, ipossia (0,5% O₂) ed ipossia senza glucosio. Vengono rappresentate le concentrazioni di ATP (medie ± DS) di tre esperimenti indipendenti (*) p<0,05 test Mann-Whitney Wilcoxon.

Avendo osservato che *in vitro* entrambe le linee cellulari in condizioni estreme presentano una riduzione dei livelli di ATP così come accade *in vivo*, abbiamo quindi analizzato l'attivazione della proteina AMPK andando a determinare la fosforilazione delle sub-unità α in Thr¹⁷², presente nel dominio di attivazione della proteina, e la fosforilazione di proteine attivate dall'AMPK.

In particolare abbiamo valutato la fosforilazione delle proteine:

- * ACC 1-2: sono due isoforme della proteina Acetil-CoA carbossilasi, che vengono fosforilate da AMPK con conseguente inibizione. ACC normalmente inibisce la β -ossidazione degli acidi grassi. In situazioni di stress, quando AMPK si attiva, ACC viene inibito portando così ad un aumento della β -ossidazione con successiva produzione di ATP.
- * 4E-BP1: proteina regolatrice della traslazione dell'mRNA. 4E-BP1 è uno dei target di mTOR e la sua fosforilazione viene utilizzata come marcatore dell'attività di mTOR. AMPK attiva la proteina TSC2, la quale

a sua volta inibisce mTOR. AMPK, quindi, quando si attiva, inibisce la via di mTOR e riduce i livelli di p4E-BP1.

Quello che è emerso è che le cellule IGROV-1 in condizioni di deprivazione di glucosio, sia in normossia che in ipossia, attivano la via dell'AMPK, in quanto aumenta notevolmente sia la fosforilazione della proteina AMPK che del suo target ACC. L'ipossia da sola non sembra invece essere uno stimolo sufficiente per attivare tale via. Le cellule OC316 non sembrano avere nelle stesse condizioni alcuna attivazione dell'AMPK. La fosforilazione di ACC aumenta leggermente in condizioni di deprivazione di glucosio, ma rimane comunque inferiore a quella osservata nelle cellule IGROV-1. Sembra quindi esserci una differenza nell'attivazione di questa proteina da parte delle due linee cellulari in esame, differenza che sembra aumentare in condizioni di ipossia e deprivazione di glucosio. In particolare, se si osserva la fosforilazione della proteina 4E-BP1 nelle condizioni di stress estremo, nelle cellule IGROV-1 si osserva una forte riduzione della fosforilazione di questa proteina, mentre nelle cellule OC316 tale riduzione è molto minore (Figura 4.14).

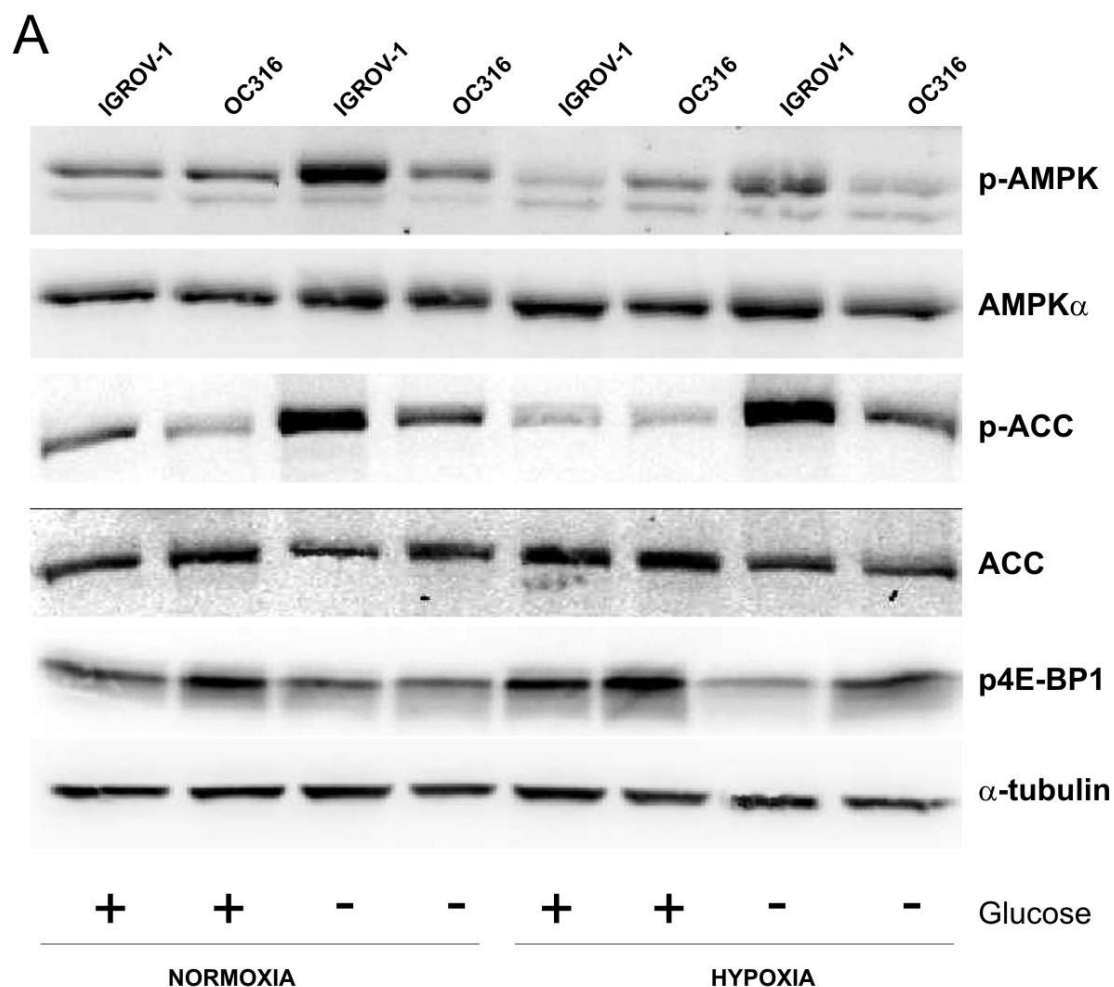


Figura 4.14: Diversa attivazione di AMPK nelle linee cellulari IGROV-1 e OC316 sottoposte a condizioni di stress. Immagine rappresentativa in cui si sono analizzate le proteine pAMPK (Thr¹⁷²), AMPK totale, pACC1-2, ACC1-2 totale, p4E-BP1 nei lisati delle linee cellulari IGROV-1 e OC316 poste per 24 ore in condizioni di normossia (21% O₂), normossia senza glucosio, ipossia (0,5% O₂), ed ipossia senza glucosio. α -Tubulina è stata utilizzata per normalizzare la carica dei pozzetti.

Le cellule OC316 non sembrano quindi essere in grado di attivare la via dell'AMPK. Per rinforzare tale ipotesi abbiamo voluto trattare tali cellule con due farmaci in grado di attivare l'AMPK, quali la metformina e l'AICAR. A tal fine, abbiamo coltivato le cellule IGROV-1 e OC316 in condizioni di normossia con concentrazioni diverse di AICAR e di metformina per 24 ore.

Le cellule IGROV-1 trattate con AICAR alle concentrazioni di 1, 2 e 4 mM, attivano AMPK già alla concentrazione più bassa, aumentando anche la fosforilazione del suo target ACC1-2. Le cellule OC316 sembrano attivare debolmente questa via solo alla dose maggiore di AICAR (Figura 4.15). Un simile effetto si osserva anche con le cellule trattate con metformina alle concentrazioni di 0,25, 0,5 e 1 mM. In questo caso abbiamo osservato che le cellule IGROV-1 hanno un'attivazione di AMPK maggiore

all'aumentare della concentrazione di metformina utilizzata, mentre non si osserva alcuna attivazione nelle cellule OC316 (Figura 4.16).

Il trattamento con questi farmaci conferma dunque che le due linee cellulari hanno una attivazione diversa di AMPK e dei suoi bersagli.

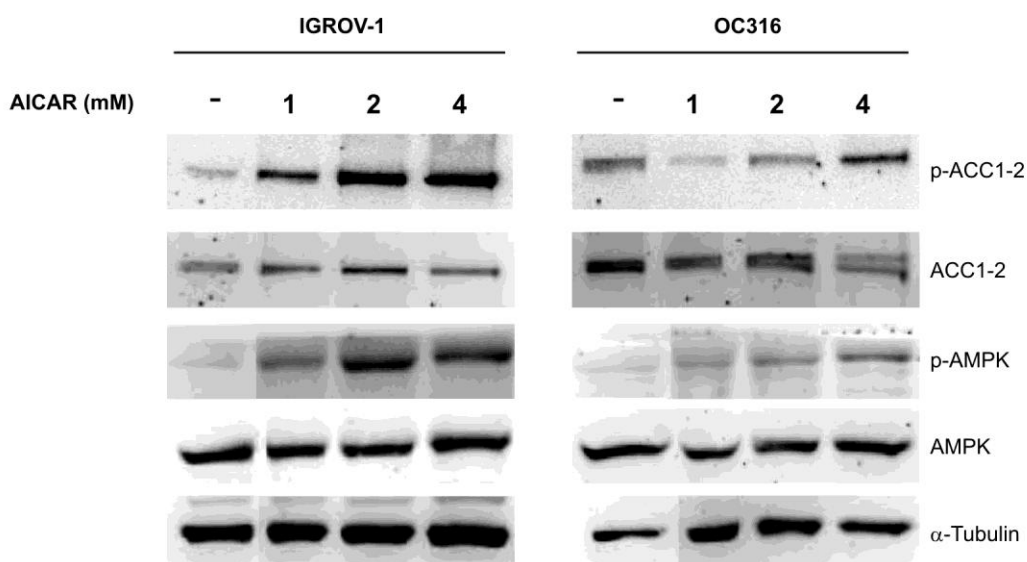


Figura 4.15: Attivazione di AMPK nelle linee cellulari IGROV-1 e OC316 trattate con AICAR. Immagine rappresentativa in cui si sono analizzate le proteine pAMPK (Thr¹⁷²), AMPK totale, pACC1-2, ACC1-2 totale, nei lisati delle linee cellulari IGROV-1 e OC316 coltivate per 24 ore in condizioni di normossia (21%O₂) con concentrazioni di AICAR di 1, 2 e 4 mM. α -Tubulina è stata utilizzata come controllo.

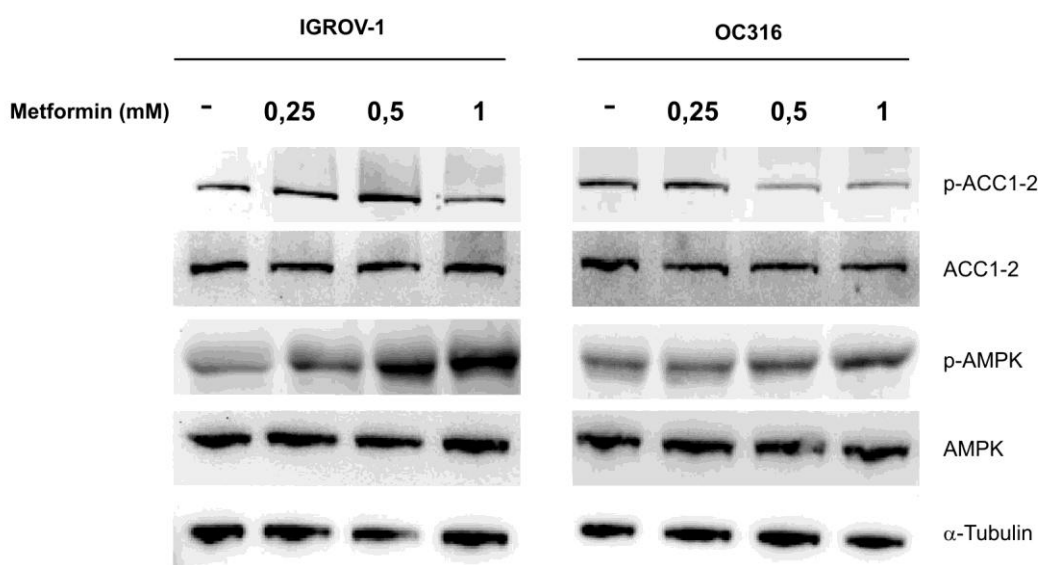


Figura 4.16: Attivazione di AMPK nelle linee cellulari IGROV-1 e OC316 trattate con Metformina. Immagine rappresentativa in cui si sono analizzate le proteine pAMPK (Thr¹⁷²), AMPK totale, pACC1-2, ACC1-2 totale, nei lisati delle linee cellulari IGROV-1 e OC316 coltivate per 24 ore in condizioni di normossia (21%O₂) con concentrazioni di metformina di 0,25, 0,5 e 1 mM. α -Tubulina è stata utilizzata come controllo.

4.7 Diversa proliferazione cellulare nelle linee IGROV-1 e OC316 in condizioni di stress

Una delle vie regolate da AMPK che in condizioni di stress sembra essere diversamente attivata tra cellule IGROV-1 e OC316 è quella di mTOR. La proteina mTOR regola diverse funzioni cellulari, tra cui la proliferazione cellulare, andando a controllare la traslazione dell'mRNA, la biogenesi ribosomiale, l'autofagia e il metabolismo (*Guertin D and Sabatini D, 2005*). Per questo motivo siamo andati ad indagare come fosse la proliferazione delle linee cellulari IGROV-1 e OC316 dopo 24 ore di coltura nelle varie condizioni. Il ciclo cellulare è stato analizzato tramite citofluorimetria dopo marcatura con Ioduro di Propidio. Dopo 24 ore di incubazione in condizioni di ipossia e deprivazione di glucosio le cellule IGROV-1 hanno evidenziato un significativo aumento della fase G_0-G_1 ed una riduzione della fase S rispetto alle stesse cellule coltivate in ipossia. Le cellule OC316 invece non evidenziano in condizioni estreme di stress un aumento significativo della fase G_0-G_1 . Sembra dunque che le cellule OC316 in queste condizioni di coltura rallentino meno rispetto alle cellule IGROV-1 e che non si blocchino in fase G_0-G_1 (Figura 4.17); tale aspetto funzionale potrebbe influire sulla modalità peculiare di risposta dei tumori formati da tali cellule alla terapia anti-angiogenica.

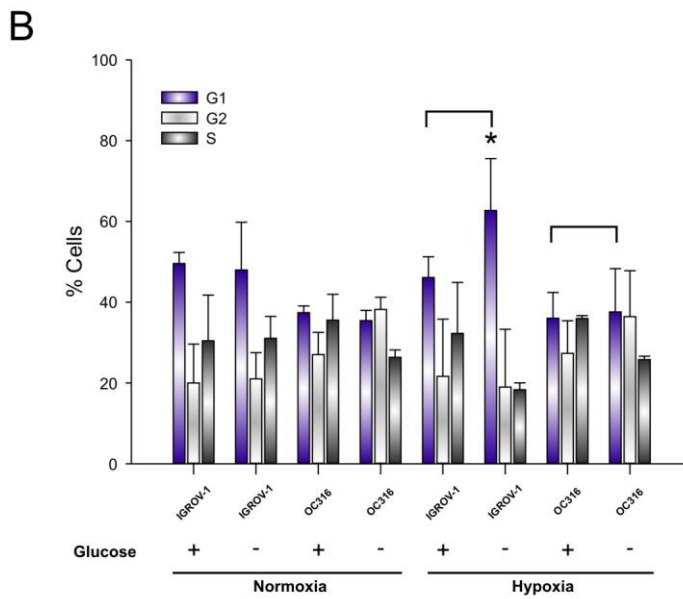
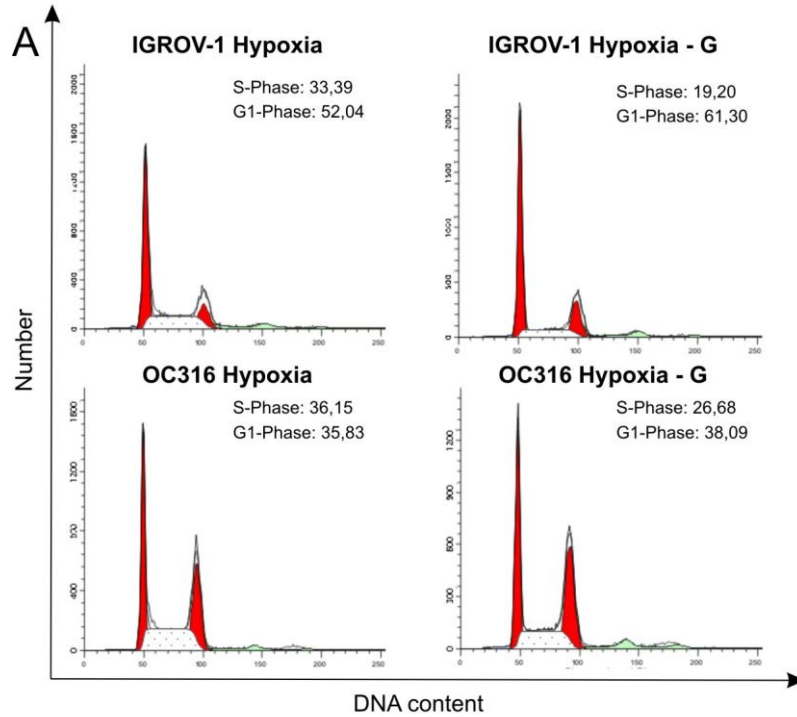


Figura 4.17: Analisi del ciclo cellulare nelle cellule IGROV-1 ed OC316 in condizioni di stress. A: Sono riportati i cicli cellulari delle cellule IGROV-1 e OC316 poste in condizioni di ipossia ed ipossia e deprivazione di glucosio. B: Sono riportate in istogramma le medie \pm DS delle tre fasi del ciclo cellulare (G1, G2, S) di quattro prove indipendenti in cui le cellule IGROV-1 e OC316 sono state coltivate per 24 ore in condizioni di normossia (21% O₂), normossia senza glucosio, ipossia (0,5% O₂) e ipossia senza glucosio. (*) p<0,05 test Mann-Whitney Wilcoxon.

5. DISCUSSIONE

Nei tumori l'aumento dell'attività metabolica e la rapida proliferazione cellulare rendono inadeguato l'apporto di ossigeno e nutrienti da parte della vascolatura e questo determina il frequente instaurarsi di aree ipossiche nella massa tumorale (*Harris AL, 2002*). Tali aree sono associate a necrosi, tratto morfologico piuttosto comune nei carcinomi, specie in lesioni di grandi dimensioni. Per poter sopravvivere in condizioni ipossiche le cellule tumorali vanno incontro a svariati meccanismi adattativi, tra cui il passaggio da un metabolismo ossidativo ad uno glicolitico, che conferisce loro un vantaggio selettivo durante le varie fasi della progressione neoplastica (*Ganteby RA and Gillies RJ, 2004*). Nel 1930 Otto Warburg riportò che il fenotipo glicolitico delle cellule tumorali veniva mantenuto anche in presenza di ossigeno e tale fenomeno venne rinominato "effetto Warburg" o "glicolisi aerobia" (*Warburg O, 1956*).

Nel nostro laboratorio, avevamo precedentemente dimostrato che linee cellulari di carcinoma ovarico altamente glicolitiche erano maggiormente sensibili all'ipossia rispetto a linee scarsamente glicolitiche (*Favaro E et al, 2008*). In questa tesi è stata approfondita questa evidenza, dimostrando che la correlazione tra fenotipo glicolitico e morte indotta dall'ipossia è mantenuta anche in linee di carcinoma esofageo, pancreatico e di T-ALL. La morte cellulare in condizioni ipossiche nelle linee analizzate dipende principalmente dall'esaurimento del glucosio nel terreno ed è associata ad un drammatico calo nei livelli di ATP, come osservato anche in precedenti studi (*Steinbach JP et al, 2003; Biju MP et al, 2005; Malhotra R and Brosius FC, 1999*). La dipendenza del fenomeno dal glucosio viene inoltre ribadita dai risultati degli esperimenti condotti in condizioni normossiche ma in deprivazione di glucosio od utilizzando composti chimici in grado di bloccare la glicolisi - quali 2DG - o la respirazione - quali oligomicina - condizioni sperimentali che forzano le cellule ad utilizzare la glicolisi. L'elevata captazione di glucosio da parte dei tumori è stata sfruttata in clinica con l'utilizzo della PET la quale utilizza il ¹⁸fluorodeossiglucosio (¹⁸FDG) come tracciante. Tale metodica permette di individuare lesioni primarie e metastatiche con una specificità e sensibilità attorno al 90% (*Weber W et al, 1999*) e potrebbe rappresentare un'indagine utile per caratterizzare dal punto di vista metabolico i tumori umani.

Con l'ausilio della PET si è inoltre osservato che l'elevata captazione di ^{18}F FDG è frequentemente correlata ad una prognosi più infausta per i pazienti (*Kunkel M et al, 2003; Mochiki E et Al 2004*). Nel nostro sistema sperimentale abbiamo finora potuto eseguire imaging metabolico solo su sezioni tumorali, in collaborazione con il gruppo del Prof. Muller-Klieser, che ha dimostrato come i tumori derivanti dalle linee cellulari in esame mantengano le differenze metaboliche osservate *in vitro*.

Abbiamo anche indagato se le differenze metaboliche osservate potessero essere spiegate da una de-regolazione di alcune vie precedentemente implicate nell'effetto Warburg (*Elstrom RL et al, 2004; Dand CV et al, 2009; Semenza GL 2007; Dang CV and Semnza GL, 1999*), escludendo evidenti differenze nei livelli d'espressione di fattori trascrizionali quali HIF-1 α o c-MYC o nello stato d'attivazione di AKT. Una differenza è stata invece osservata nelle linee OC316 e Jurkat rispetto alle linee IGROV-1 e Molt-3 per quanto riguarda lo *status* di p53. Mutazioni a carico di questo gene comportano un aumento dell'utilizzo della glicolisi in quanto p53 regola direttamente il consumo mitocondriale di ossigeno tramite la proteina SCO2. Cellule che recano mutazioni di p53 o la perdita di SCO2 evidenziano difetti nella respirazione con un aumento compensatorio nella glicolisi al fine di mantenere elevati i livelli di ATP intra-cellulari (*Matoba S. et Al., 2006; Ma W. et Al. 2007*). Le mutazioni di p53 potrebbero spiegare la maggiore capacità glicolitica delle cellule OC316 e Jurkat, mentre non ci vengono in aiuto nel caso di altre linee analizzate. Si può dunque concludere che l'effetto Warburg è un processo che può derivare dall'attivazione e dall'interazione di diversi fattori, alcuni dei quali devono essere ancora identificati.

L'identificazione di linee tumorali fortemente (OC316) o debolmente (IGROV-1) dipendenti dal glucosio ha rappresentato il fondamento per la successiva valutazione di come neoplasie con caratteristiche metaboliche diverse rispondessero alla terapia anti-VEGF, che rappresenta a nostro avviso la parte più originale dello studio. Il trattamento breve dei tumori sperimentali con due farmaci che agiscono bloccando la via del VEGF (A.4.6.1. e ZD6474), ha dimostrato che solo i tumori derivati da linee altamente glicolitiche vanno incontro ad una riduzione di volume significativa, sebbene i farmaci esercitino attività anti-angiogenica in tutti i casi, come indicato dalle determinazioni della MVD e dell'ipossia intratumorale, due parametri normalmente utilizzati in studi simili (*Wedge SR et al, 2002; Franco M et al, 2006*). Il dato nuovo di questo lavoro è la dimostrazione che la terapia anti-angiogenica comporta anche una forte perturbazione

nei livelli di glucosio nei tumori. Questo dato potrebbe spiegare l'osservazione che la necrosi aumenta dopo trattamento solo nei tumori altamente glicolitici, che dipendono fortemente da tale substrato per la produzione di ATP.

La risposta ad una terapia a breve termine potrebbe essere predittiva di risposta a lungo termine? Secondo le nostre valutazioni la risposta a tale domanda cruciale sembra essere negativa. Infatti, trattando cronicamente i tumori abbiamo osservato che i tumori OC316, nonostante una rapida risposta iniziale, diventano successivamente resistenti alla terapia mentre i tumori IGROV-1 hanno una risposta iniziale più lenta ma poi regrediscono. Questo risultato è stato ottenuto utilizzando due diversi anticorpi anti-VEGF tra cui A.4.6.1., che neutralizza il VEGF umano, e successivamente B20-4.1.1, un anticorpo che blocca sia il VEGF umano che murino. B20-4.1.1. è stato introdotto nello studio per escludere la possibilità che la produzione di VEGF murino da parte delle cellule dello stroma potesse spiegare il diverso comportamento dei tumori OC316 ed IGROV-1 dopo neutralizzazione del solo VEGF umano. Era infatti stato osservato in alcune pubblicazioni attinenti che anche il VEGF prodotto da cellule dello stroma poteva contribuire all'angiogenesi tumorale (*Liang WC et al, 2006*). Il fatto che i tumori rispondano in modo simile alla neutralizzazione del solo VEGF prodotto dalle cellule tumorali o di tutto il VEGF presente nel microambiente tumorale fa pensare che il VEGF murino non sia responsabile delle differenze osservate tra tumori OC316 ed IGROV-1.

Nel confrontare i risultati degli esperimenti con anti-VEGF a breve e lungo termine, bisogna peraltro considerare che i meccanismi in gioco potrebbero essere diversi ed ancora in gran parte inesplorati. Vi sono peraltro altre possibili spiegazioni di questi risultati, infatti diversi sono i meccanismi noti mediante i quali le cellule tumorali evadono la terapia anti-angiogenica. Uno di questi è la produzione di segnali pro-angiogenici alternativi al VEGF. In un modello animale transgenico di tumore endocrino del pancreas il blocco del recettore per VEGF (VEGFR2) ha comportato l'iniziale regressione del tumore seguita da una successiva ricrescita e rivascularizzazione del tumore. Le analisi di questi tumori hanno evidenziato come vi fosse un up-regolazione di altri fattori pro-angiogenici diversi da VEGF, in particolare diversi membri della famiglia del FGF, l'efrina-A1 e l'angiopoietina 1 (*Casanovas O et al, 2005*). Un altro meccanismo implicato nella resistenza è il richiamo nella sede tumorale di cellule derivanti dal midollo che hanno la capacità di indurre angiogenesi e crescita tumorale. In questo senso, diversi gruppi hanno focalizzato il loro studio

nell'individuare delle particolari sottopopolazioni cellulari come macrofagi associati al tumore, monociti immaturi esprimenti il recettore TIE2, cellule mieloidi CD11b⁺Gr1⁺ che sono in grado di produrre citochine, fattori di crescita e proteasi promuovendo l'angiogenesi e la progressione tumorale (*Pollard JW, 2004; De Palma et al 2005, Yang L et al, 2004*). Infine, sebbene in letteratura il ruolo dei periciti nella risposta alla terapia anti-angiogenica sia dibattuto (*Xian X et al, 2007*), alcune evidenze indicano che queste cellule abbiano un ruolo nella stabilità vascolare e nella sopravvivenza delle cellule endoteliali. Infatti vasi presenti nel tumore e privi di copertura adeguata di periciti risultano più vulnerabili all'inibizione del VEGF (*Mancuso MR et al 2006; Bergers G et al, 2003*).

Pur non potendo indagare in dettaglio tutti questi meccanismi di resistenza nel nostro modello, ci siamo chiesti se la presenza di uno specifico infiltrato ematopoietico di tipo mieloido (*Shojaei F et al, 2008*) potesse contribuire alle osservazioni fatte. Abbiamo tuttavia verificato che la percentuale di cellule CD11bGr1⁺ è simile e relativamente scarsa (2-5% del totale) in questi tumori. Vi era inoltre la possibilità teorica che le cellule IGROV-1 producessero livelli di VEGF molto maggiori rispetto alle cellule OC316 e che i tumori IGROV-1 fossero inizialmente resistenti alla terapia anti-VEGF in quanto il target non veniva completamente neutralizzato. Il dosaggio ELISA ha tuttavia dimostrato che i livelli di VEGF sono minori nei sovrantanti delle cellule IGROV-1 (159 ± 76 ng/ml) rispetto alle cellule OC316 (471 ± 75 ng/ml). Riteniamo pertanto che questi aspetti non contribuiscano in maniera rilevante ai fenomeni osservati (dato non riportato nei risultati).

Al fenotipo glicolitico viene generalmente associata una maggiore aggressività della neoplasia e si ritiene che esso conferisca un significativo vantaggio proliferativo durante la progressione tumorale (*Gatenby RA and Gillies RJ, 2004*). Nel nostro studio, in relazione alla terapia anti-angiogenica a lungo termine emerge un risultato simile in quanto i tumori maggiormente glicolitici non vengono controllati bene dalla terapia mentre quelli poco glicolitici regrediscono. Risposte simili a quelle da noi osservate sono state riscontrate anche in clinica - pur senza correlati metabolici - specie in pazienti con carcinomi renali con il sunitinib, farmaco anti-angiogenico che agisce come inibitore delle tirosin-chinasi inibendo tra gli altri il recettore VEGFR2. Nelle metastasi polmonari si sono infatti osservate due tipi di risposta: una regressione del tumore in termini di dimensioni o una riduzione della densità cellulare all'interno del

tumore per un aumento della necrosi. Inoltre la ripresa di malattia dopo trattamento con Sunitinib inizia in molti casi proprio dall'area periferica vitale del tumore, come si osserva nel modello animale (*Faivre S et al, 2007*).

Una risultato importante emerso dall'imaging metabolico dei tumori è che l'anticorpo anti-VEGF causa, oltre al calo di glucosio, una riduzione significativa dei livelli di ATP. La riduzione dei livelli di ATP intra-cellulari è il principale meccanismo attraverso cui si attiva la chinasi AMPK, reattiva a situazioni che comportano un aumento del rapporto AMP/ATP, quali l'ipossia e la deprivazione di glucosio. AMPK attiva diverse proteine a valle con il fine ultimo da un lato di inibire i processi cellulari che portano al consumo di ATP (proliferazione cellulare, sintesi degli acidi grassi, sintesi proteica) e dall'altro di aumentare i processi che comportano la produzione di ATP (ossidazione degli acidi grassi, lipolisi) (*Shackelford DB and Shaw RJ, 2009*). AMPK è attivato mediante fosforilazione e nei tumori si ritrova espresso in aree adiacenti alle zone ipossiche e necrotiche (*Jones R.G. et Al. 2005, Laderoute K.R. et Al. 2006, Natsuizaka M. et Al. 2007*). Nelle linee di carcinoma ovarico utilizzate in questo studio abbiamo osservato una diversa attivazione di AMPK in condizioni di deprivazione di glucosio e ipossia, situazione che si riscontra *in vivo* dopo terapia anti-angiogenica. Le cellule OC316 non sono in grado di attivare questa chinasi nemmeno dopo trattamento con due noti attivatori di tale via, quali metformina ed AICAR (*Fay JR et al, 2009*). Un'ipotesi che dovremo valutare è se le cellule OC316 abbiano mutazioni a livello della serin-treonin chinasi LKB1, responsabile della fosforilazione di AMPK. Tale proteina, identificata come oncosoppressore nella sindrome di Peutz-Jeghers (*Hemminki A et al, 1998*) è stata trovata mutata in tumori sporadici polmonari ed in carcinomi della cervice (*Sanchez-Cepedes M, 2007; Shackelford DB and Shaw RJ, 2009*).

Una delle vie regolate negativamente da AMPK è quella di mTOR, ed infatti anche nel nostro sistema si osserva ridotta fosforilazione di 4E-BP1, una proteina fosforilata da mTOR ed utilizzata spesso come indice di attivazione di questa via, dopo coltura delle cellule IGROV-1 ma non delle OC316 in condizioni di stress. La via di mTOR è implicata in generale nel processo di crescita cellulare attraverso la regolazione della sintesi proteica, della biogenesi ribosomiale, del metabolismo dei nutrienti e di progressione del ciclo cellulare (*Sarbassov D.D. et Al., 2005*). La conseguenza principale dell'inattivazione di mTOR è che in condizioni di ipossia e deprivazione di glucosio le cellule IGROV-1 rallentano la proliferazione aumentando in modo

significativo la fase G1. Il blocco delle cellule in fase G1 non avviene invece nelle cellule OC316 che mantengono invariata la proliferazione in condizioni di stress energetico. Alla luce dei dati ottenuti *in vitro* sarà interessante analizzare in dettaglio ciò che accade nei tumori dopo trattamento con anti-VEGF per quanto concerne l'attivazione di AMPK e la regolazione di mTOR e della proliferazione cellulare.

Negli ultimi anni si è iniziato a studiare l'AMPK come possibile fattore implicato nella tumorigenesi. La sua ridotta attivazione a causa di mutazioni di LKB1 è implicata nell'aumento del rischio di incidenza di sviluppare cancro nella sindrome di Peutz-Jeghers (Luo Z. *et Al.*, 2005). È stato riportato che l'attivazione di AMPK comporta un'attività anti-tumorale sia in esperimenti condotti in colture cellulari *in vitro* sia in modelli tumorali. In cellule di linfoma, di carcinoma mammario, di colon e di melanoma l'attivazione dell'AMPK comporta una riduzione della proliferazione cellulare, tramite l'inibizione della via di mTOR o la *downregolazione* della ciclina D1 (Drakos E *et Al.*, 2009; Zhuang Y and Miskimins WK, 2008; Sugiyama M *et al.*, 2008; Guo D *et al.*, 2009). Inoltre tumori sperimentali derivanti da linee di carcinoma del colon e di melanoma cresciuti sotto cute nel topo e trattati con metformina e AICAR rallentano la loro crescita proprio a seguito dell'attivazione di questa chinasi (Buzzai M *et al.*, 2005; Guo D *et al.*, 2009). In un modello animale PTEN^{+/-}, i cui i topi sviluppano spontaneamente tumori, in particolare polipi intestinali e linfomi, l'attivazione di AMPK tramite l'utilizzo di diversi farmaci provoca un ritardo significativo nello sviluppo di tali neoplasie (Huang X *et al.*, 2008).

Nessun dato in letteratura per ora associa l'attivazione della via di AMPK alla terapia anti-angiogenica. Nel nostro studio i farmaci anti-VEGF causano un aumento dell'ipossia ed un calo nei livelli di glucosio con una riduzione dei livelli di ATP. Ciò ci porterebbe a pensare che la terapia anti-angiogenica possa indurre l'attivazione di AMPK. Questa ipotesi rimane da confermare *in vivo* ma se dovesse rivelarsi corretta, potrebbe esserci ancora utile nell'interpretare le diverse risposte dei tumori al trattamento.

Da un punto di vista traslazionale, si potrebbe pensare che l'attivazione della via LKB1/AMPK abbia un ruolo importante nella risposta a terapie anti-VEGF soprattutto in quei tumori, come i NSCLC, in cui si è osservata una elevata percentuale di mutazioni (30% circa) a carico di LKB1 e che attualmente vengono trattati con farmaci anti-angiogenici (Pallis AG *et al.*, 2009). Per quanto concerne il carcinoma ovarico, le donne che presentano la sindrome di Peutz-Jeghers hanno un'elevata frequenza di

sviluppare un raro tumore ovarico (*Sanchez-Chespedes M, 2007*) ma finora nessuna mutazione in LKB1 è stata descritta in linee cellulari derivanti da questo tumore (*Ikediobi et al, 2006*). Non sono ancora molti gli studi che valutano l'attivazione dell'AMPK nel carcinoma ovarico, ma un paio di lavori osservano che l'attivazione di AMPK dopo trattamento con la metformina induce un rallentamento nella proliferazione cellulare tramite riduzione di mTOR o della ciclina D1 (*Gotlieb WH et al, 2008; Rattan R et al, 2009*). Nel proseguimento di questo studio sarà pertanto interessante studiare in modo più approfondito lo status di AMPK nel carcinoma ovarico ed in altri tumori trattati con farmaci anti-angiogenici.

6. BIBLIOGRAFIA

Bensaad K, Tsuruta A, Selek MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 2006; 126: 30-32.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(10):737-44.

Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 2005; 7(4):452-64.

Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(8):592-603.

Biju MP, Akai Y, Shrimanker N, Haase VH. Protection of HIF-1-deficient primary renal tubular epithelial cells from hypoxia-induced cell death is glucose dependent. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289(6):F1217-26.

Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Bonnet S, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell.* 2007; 11(1):37-51.

Bos R, van Der Hoeven JJ, van Der Wall E, van Der Groep P, van Diest PJ, Comans EF, Joshi U, Semenza GL, Hoekstra OS, Lammertsma AA, Molthoff CF. Biologic correlates of (18)fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. *J Clin Oncol.* 2002; 20(2):379-87.

Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW, Mueller-Klieser W. Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 51(2):349-353.

Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, Viollet B, Thompson CB. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.* 2007; 67(14):6745-52.

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005; 438(7070):932-6.

Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 2005; 8(4):299-309.

Czernin J, Phelps ME. Positron emission tomography scanning: current and future applications. *Annu Rev Med.* 2002; 53:89-112.

Dang CV, Lewis BC, Dolde C, Dang G, Shim H. Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr.* 1997; 29(4):345-54.

Dang CV and Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24(2):68-72.

Dang CV, Lee A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res* 2009. 15(21): 6479-6483.

De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, Naldini L. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell.* 2005; 8(3):211-26.

Drakos E, Atsaves V, Li J, Leventaki V, Andreeff M, Medeiros LJ, Rassidakis GZ. Stabilization and activation of p53 downregulates mTOR signaling through AMPK in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2009; 23(4):784-90.

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. AKT stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 2004. 64: 3892-3899.

Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 2005; 330(7503):1304-5.

Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell.* 2006; 9(6):425-434.

Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(9):734-45.

Favaro E, Nardo G, Persano L, Masiero M, Moserle L, Zamarchi R, Rossi E, Esposito G, Plebani M, Sattler U, Mann T, Mueller-Klieser W, Ciminale V, Amadori A, Indraccolo S. Hypoxia inducible factor-1alpha inactivation unveils a link between tumor cell metabolism and hypoxia-induced cell death. *Am J Path.* 2008; 173(4):1186-1201.

Fay JR, Steele V, Crowell JA. Energy homeostasis and cancer prevention: the AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev Res* 2009; 2(4):301-9.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285(21):1182-6.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995; 1(1):27-31.

Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *J Pediatr Surg.* 2007; 42(1):1-11.

Franco M, Man S, Chen L, Emmenegger U, Shaked Y, Cheung AM, Brown AS, Hicklin DJ, Foster FS, Kerbel RS. Targeted anti-vascular endothelial growth factor receptor-2 therapy leads to short-term and long-term impairment of vascular function and increase in tumor hypoxia. *Cancer Res.* 2006; 66(7):3639-48.

Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(11):891-899.

Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N. Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2000; 60(22):6253-8.

Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* 2004; 18(18):2183-94.

Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB 3rd; Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol.* 2007; 25(12):1539-44.

Guo D, Hildebrandt IJ, Prins RM, Soto H, Mazzotta MM, Dang J, Czernin J, Shyy JY, Watson AD, Phelps M, Radu CG, Cloughesy TF, Mischel PS. The AMPK agonist AICAR inhibits the growth of EGFRvIII-expressing glioblastomas by inhibiting lipogenesis. *PNAS* 2009; 106(31):12932-7.

Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp MC, Gu J, Lau S, Pollak MN, Bruchim I. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008 Aug;110(2):246-50. Epub 2008 May 21.

Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008; 30(2):214-26.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86(3):353-64.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Höglund P, Järvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpää M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998; 391(6663):184-7.

Herbst RS, Johnson DH, Mininberg E, Carbone DP, Henderson T, Kim ES, Blumenschein G Jr, Lee JJ, Liu DD, Truong MT, Hong WK, Tran H, Tsao A, Xie D, Ramies DA, Mass R, Seshagiri S, Eberhard DA, Kelley SK, Sandler A. Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody

bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(11):2544-55.

Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*. 1999; 18(38):5356-62.

Huang X, Wullschleger S, Shpiro N, McGuire VA, Sakamoto K, Woods YL, McBurnie W, Fleming S, Alessi DR. Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. *Biochem J*. 2008; 412(2):211-21.

Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, Hambleton J, Novotny WF, Kabbinavar F. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(15):3502-8.

Ikediobi ON, Davies H, Bignell G, Edkins S, Stevens C, O'Meara S, Santarius T, Avis T, Barthorpe S, Brackenbury L, Buck G, Butler A, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Hunter C, Jenkinson A, Jones D, Kosmidou V, Lugg R, Menzies A, Mironenko T, Parker A, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Smith R, Solomon H, Stephens P, Teague J, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Reinhold W, Weinstein JN, Stratton MR, Futreal PA, Wooster R. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(11):2606-12. Epub 2006 Nov 6.

Indraccolo S, Habeler W, Tisato V, Stievano L, Piovan E, Tosello V, Esposito G, Wagner R, Uberla K, Chieco-Bianchi L, Amadori A. Gene transfer in ovarian cancer cells: a comparison between retroviral and lentiviral vectors. *Cancer Res*. 2002; 62(21):6099-107.

Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005; 307(5706):58-62.

Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM, Hsu L, Hung MC, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Onc* 2009; 27(20):3297-302.

Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2005; 18(3):283-93.

Kim JW, Dang CV. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci*. 2005; 30(3):142-150.

Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, Bohlen P, Kerbel RS. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest*. 2000; 105(8):R15-24.

Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr HA, Jeong JH, Wieand S, Bartenstein P, Wagner W, Whiteside TL. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2003; 97(4):1015-24.

Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, Knapp M, Le T, Orduna J, Foretz M, Viollet B. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol* 2006 ; 26(14):5336-47.

Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(2):218-24.

Liang WC, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, Gutierrez J, Fu L, Malik AK, Gerber HP, Ferrara N, Fuh G. Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF)-blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF. *J Biol Chem* 2005; 281(2):951-61. Epub 2005 Nov 7.

Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7(11):1194-201

Luo Z, Saha AK, Xiang X, Ruderman NB. AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trens Pharmacol Sci.* 2005; 26(2):69-76.

Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001; 7(11):1194-201.

Ma W, Sung HJ, Park JY, Matoba S, Hwang PM. A pivotal role for p53: balancing aerobic respiration and glycolysis. *J Bioenerg Biomembr.* 2007; 39(3):243-6.

Madhusudan S, Harris AL. Drug inhibition of angiogenesis. *Curr Opin Pharmacol.* 2002; 2(4):403-14.

Malhotra R, Brosius FC 3rd. Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1999; 274(18):12567-75

Man S, Bocci G, Francia G, Green SK, Jothy S, Hanahan D, Bohlen P, Hicklin DJ, Bergers G, Kerbel RS. Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res.* 2002; 62(10):2731-5.

Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, Yao VJ, Inai T, Brooks P, Freimark B, Shalinsky DR, Hu-Lowe DD, McDonald DM. Rapid vascular

regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest.* 2006; 116(10):2610-21.

Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase. *J Bioenerg Biomembr.* 1997; 29(4):339-43

Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science.* 2006; 312(5780):1650-3.

Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23(4):792-9.

Mochiki E, Kuwano H, Katoh H, Asao T, Oriuchi N, Endo K. Evaluation of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography for gastric cancer. *World J Surg* 2004; 28(3):247-53.

Morita T, Nagaki T, Fukuda I, Okumura K. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutat Res.* 1992; 268(2):297-305.

Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(8):618-31.

Natsuizaka M, Ozasa M, Darmanin S, Miyamoto M, Kondo S, Kamada S, Shindoh M, Higashino F, Suhara W, Koide H, Aita K, Nakagawa K, Kondo T, Asaka M, Okada F, Kobayashi M. Synergistic up-regulation of Hexokinase-2, glucose transporters and angiogenic factors in pancreatic cancer cells by glucose deprivation and hypoxia. *Exp Cell Res* 2007; 313(15):3337-48.

Noguchi Y, Okamoto T, Marat D, Yoshikawa T, Saitoh A, Doi C, Fukuzawa K, Tsuburaya A, Satoh S, Ito T. Expression of facilitative glucose transporter 1 mRNA in colon cancer was not regulated by k-ras. *Cancer Lett.* 2000; 154(2):137-42.

Pallis AG, Serfass L, Dziadziusko R, van Meerbeeck JP, Fennell D, Lacombe D, Welch J, Gridelli C. Targeted therapies in the treatment of advanced/metastatic NSCLC. *Eur J Cancer.* 2009; 45(14):2473-87.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Met.* 2006; 3:187-197.

Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282(5):C947-70.

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004 Jan;4(1):71-8.

- Pouyssegur J**, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006; 441(7092):437-443.
- Racker E**. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem*. 1974; 5:17-23.
- Rafii S**, Lyden D. Cancer. A few to flip the angiogenic switch. *Science*. 2008; 319(5860):163-4.
- Rattan R**, Giri S, Hartmann L, Shridhar V. Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP- kinase dispensable manner. *J Cell Mol Med*. 2009.
- Rivenson-Segal D**, Boldin-Adamsky S, Seger D, Seger R, Degani H. Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer. *Int J Cancer*. 2003; 107(2):177-182.
- Robey RB**, Hay N. Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(1):25-31.
- Sanchez-Cespedes M**. A role for LKB1 gene in human cancer beyond the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene* 2007; 26(57):7825-32.
- Sarbassov DD**, Ali SM, Sabatini DM. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Dec;17(6):596-603. Epub 2005 Oct 13.
- Scott KA**, Holdsworth H, Balkwill FR, Dias S. Exploiting changes in the tumour microenvironment with sequential cytokine and matrix metalloprotease inhibitor treatment in a murine breast cancer model. *Br J Cancer*. 2000; 83(11):1538-43.
- Semanza GL**. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002; 8(4 suppl.): 62-67.
- Semenza GL**. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(10):721-32.
- Semenza GL**. HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J Bioenerg Biomembr*. 2007 39:231-234.
- Shackelford DB**, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(8):563-75.
- Shojaei F**, Zhong C, Wu X, Yu L, Ferrara N. Role of myeloid cells in tumor angiogenesis and growth. *Trens Cell Biol* 2008 Aug;18(8):372-8.
- Steinbach JP**, Wolburg H, Klumpp A, Probst H, Weller M. Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. *Cell Death Differ*. 2003; 10(7):823-32.

Sugiyama M, Takahashi H, Hosono K, Endo H, Kato S, Yoneda K, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Wada K, Nakagama H, Nakajima A. Adiponectin inhibits colorectal cancer cell growth through the AMPK/mTOR pathway. *Int J Oncol.* 2009; 34(2):339-44

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324:1029-1033.

Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfjør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 2000; 60(4):916-921.

Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 1956; 124 :269-270.

Weber WA, Avril N, Schwaiger M. Relevance of positron emission tomography (PET) in oncology. *Strahlenther Oncol.* 1999; 175(8):356-73.

Wedge SR, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Valentine PJ, Curwen JO, Musgrove HL, Graham GA, Hughes GD, Thomas AP, Stokes ES, Curry B, Richmond GH, Wadsworth PF, Bigley AL, Hennequin LF. ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res.* 2002; 62(16):4645-55.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991; 324(1):1-8.

Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I, Xu L, Hicklin DJ, Fukumura D, di Tomaso E, Munn LL, Jain RK. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell.* 2004; 6(6):553-63.

Xian X, Håkansson J, Ståhlberg A, Lindblom P, Betsholtz C, Gerhardt H, Semb H. Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clin Invest.* 2006; 116(3):642-51. Epub 2006 Feb 9.

Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 2007;449(7161):496-500.

Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, Keating MJ, Huang P. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 2005; 65(2):613-621.

Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian LM, Carbone DP, Lin PC. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2004; 6(4):409-21.

Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-

vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349(5):427-34.

Yeung SJ, Pan J, Lee MH. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Dec;65(24):3981-99

Yuan A, Yang PC, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162(5):1957-63.

Zakikhani M, Dowling RJ, Sonenberg N, Pollak MN. The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase. *Cancer Prev Res.* 2008 Oct;1(5):369-75.

Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, Poulain L, Duval M, Gauduchon P, Schwartz L, Icard P. Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro. 2006; 26(5A):3561-6.

Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brüne B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett.* 2006; 237(1):10-21.

Zhuang Y, Miskimins WK. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1. *J Mol Signal.* 2008; 3:18