



Università degli Studi di Ferrara

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
"Scienze Biomediche"  
Ciclo XXIII**

Coordinatore Prof. Silvano Capitani

*MicroRNA e il recettore adenosinico A<sub>3</sub> come biomarcatori del  
mesotelioma maligno della pleura*

Settore Scientifico Disciplinare BIO/13

**Dottoranda  
Dott.ssa Stefania Maniero**

**Tutore  
Prof. Mauro Tognon**

**Anni 2008/2010**

# ***INDICE***

## ***✓ ABBREVIAZIONI***

<b><i>1. INTRODUZIONE</i></b>	<b><i>pag. 6</i></b>
<b><i>2. SCOPO DELLA TESI</i></b>	<b><i>pag. 21</i></b>
<b><i>3. MATERIALI E METODI</i></b>	<b><i>pag. 23</i></b>
<b><i>4. RISULTATI</i></b>	<b><i>pag. 35</i></b>
<b><i>5. DISCUSSIONE</i></b>	<b><i>pag. 53</i></b>
<b><i>BIBLIOGRAFIA</i></b>	<b><i>pag. 64</i></b>
<b><i>LISTA DELLE PUBBLICAZIONI</i></b>	<b><i>pag. 79</i></b>

# ***ABBREVIAZIONI***

<b>Abbreviazione</b>	<b>Significato</b>
HMC	Cellule mesoteliali sane
MPM	Mesotelioma maligno della pleura
μm	Micrometro
PDGF-A	Fattore di crescita di tipo A derivato dalle piastrine
SV40	Simian virus 40
agT	Antigene T grande
miRNA o miR	microRNA
RNA	Acido ribonucleico
nt	Nucleotidi
dsRNA	RNA doppio filamento
RISC	RNA-induced silencing complex
UTR	Un-translated region
PPP6C	Pro-survival phosphatase PPP6C
kb	Kilobase
AMP	Adenosina monofosfato ciclico
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
TM	Dominio transmembrana
kDa	kiloDalton
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
RT-qPCR	Real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction
RT-PCR	Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction

HMP	Tessuto pleurico sano
MMP	Tessuto derivato da mesotelioma
MMC	Cellule mesoteliali derivate da mesotelioma
ATCC	American Type Culture Collection
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
DNA	Acido deossiribonucleico
ng	Nanogrammo
$\mu$ l	Microlitro
$^{\circ}$ C	Gradi centigradi
min	Minuti
ARs	Recettori adenisinici
h	Ore
mM	Millimolare
g	Giri
ml	Millilitro
IU	International unit
PBS	Phosphate buffered saline
BSA	Bovine serum albumin
nM	Nanomolare
$\mu$ Ci	Microcurie
LDH	Lattato deidrogenasi
$\mu$ M	Micromolare
M	Molare
cm	Centimetro
CDKN <sub>1</sub> A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
A <sub>3</sub> ARs	Recettori adenosinici A <sub>3</sub>

$K_D$	Costante di affinità
Bmax	Densità recettoriale
fmol	Fentomole
mg	Milligrammo
EC <sub>50</sub>	Concentrazione efficace centrale
IC <sub>50</sub>	Concentrazione inibente
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
E2F	Fattori di trascrizione
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CCND	G1/S-specific cyclin-D
CDK	Cyclin-dependent kinase
pRB	Proteina del retinoblastoma
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
mRNA	RNA messaggero
AMO	Anti-miRNA oligonucleotide

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 IL MESOTELIO ED IL MESOTELIOMA MALIGNO DELLA PLEURA**

### **1.1.1 Derivazione embriologica e caratteristiche morfo-isto-citologiche del mesotelio.**

Il mesotelio è un tessuto pavimentoso semplice che riveste e protegge gli organi interni.<sup>1</sup> Si tratta di un tessuto formato da uno strato di cellule altamente specializzate, denominate mesoteliali (HMC). Le HMC poggiano su una lamina connettivale fibrosa e rivestono l'intera superficie delle tre cavità sierose del corpo: la cavità pleurica che riveste i polmoni, quella pericardica che riveste il cuore, ed infine quella peritoneale che riveste gli organi interni della cavità addominale fissandoli alle pareti dell'addome e contribuendo a mantenerli nella loro posizione naturale.<sup>2</sup>

L'origine embriologica e le caratteristiche delle cellule che compongono il mesotelio, rendono questo tessuto di riferimento molto particolare. Infatti, a differenza di tutti gli altri tessuti di rivestimento, esso non deriva dall'ectoderma, ma dal mesoderma.<sup>1</sup>

Questa peculiarità si riflette nel fatto che le cellule mesoteliali presentano sia caratteristiche tipiche delle cellule di derivazione mesenchimale che caratteristiche

tipiche delle cellule di derivazione ectodermica, come la contemporanea presenza di filamenti intermedi ricchi di citocheratine, marcatori tipicamente epiteliali, e di filamenti intermedi ricchi di vimentina, un marcatore tipicamente mesodermico. Inoltre, il fenotipo misto di queste cellule, un po' epiteliale e mesenchimale, favorisce numerosi processi fisiologici, come il ripristino del tessuto in seguito ad una lesione. Nella fisiopatologia il mesotelio interviene nella risposta all'inflammatione e nella trasformazione neoplastica.<sup>1</sup> Infine, un'altra caratteristica del tessuto mesoteliale è la modalità di risposta allo stimolo mitogeno in seguito a lesione. Infatti, il mesotelio si rinnova molto lentamente ma se danneggiato il suo indice mitotico aumenta considerevolmente mentre le sue cellule multipotenti migrano attraverso la cavità sierosa verso la sede della lesione per aderirvi e rigenerare il tessuto stesso.<sup>1</sup>

Le cellule mesoteliali hanno una forma poligonale allungata che può variare fino a divenire cuboide o cilindrica a seconda della localizzazione. Le cellule sono collegate tra loro sia con giunzioni strette ed aderenti, che sono responsabili della caratteristica semipermeabilità del mesotelio, sia con desmosomi e giunzioni di tipo gap, che permettono la comunicazione intercellulare. La superficie apicale di queste cellule è ricoperta da numerosi microvilli ed il citoplasma contiene soprattutto microtubuli, microfilamenti sparsi e fasci di filamenti intermedi ricchi di actina, vimentina e citocheratine.<sup>3</sup> Queste caratteristiche citologiche, permettono alle cellule mesoteliali di svolgere un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi degli organi interni, partecipando attivamente al trasporto di fluidi e di cellule attraverso la cavità sierosa, alla presentazione di antigeni, alla risposta infiammatoria, al ripristino dei tessuti circostanti danneggiati, alla coagulazione ed alla fibrinolisi, ed infine all'adesione di

cellule tumorali.<sup>1</sup> In studi pregressi è stato dimostrato che la superficie mesoteliale compromessa rappresenta un sito preferenziale di adesione per cellule tumorali.<sup>4</sup>

Le cellule mesoteliali, infine, hanno anche la capacità di endocitare sostanze estranee.

Questa caratteristica è alla base della loro predisposizione alla trasformazione neoplastica mediata dalle fibre di asbesto o amianto.<sup>5</sup>

### **1.1.2 Epidemiologia, caratteristiche morfo-isto-citologiche, decorso clinico e terapia del mesotelioma.**

Il mesotelioma maligno della pleura (MPM) è un tumore molto aggressivo e dalla prognosi infausta. MPM deriva dalla trasformazione neoplastica delle cellule mesoteliali, ed è epidemiologicamente correlato all'esposizione alle fibre di asbesto.

L'amianto ha avuto un largo utilizzo durante gli anni '70 - '80. Perciò, una frazione considerevole di lavoratori sono stati esposti alle fibre di amianto, però l'insorgenza dell'MPM avviene dopo un lunghissimo periodo di latenza successivo all'inalazione delle fibre del minerale. Nonostante in Italia l'amianto sia stato bandito nel 1992, si stima che l'incidenza sia in Italia che a livello mondiale del MPM aumenterà fortemente nel prossimo ventennio.<sup>6-9</sup> Per questo motivo numerosi studi sono stati intrapresi per individuare i meccanismi patogenetici che portano all'insorgenza di questa malattia. Allo stesso tempo diverse indagini sono state eseguite per comprendere, da una parte come migliorare la qualità della vita dei pazienti che ne sono affetti e dall'altra per cercare di individuare nuove terapie.<sup>10,11</sup>

Istologicamente, esistono tre diversi tipi di mesotelioma maligno della pleura. Essi differiscono non solo per la morfologia delle cellule ma anche per la prognosi.<sup>12</sup> I tre

istotipi, identificati in base alla morfologia delle cellule che si osservano al microscopio ottico, sono:

1. **Epitelioide**, associato alla prognosi meno grave, che rappresenta il 50% dei casi di MPM diagnosticati ed è caratterizzato dalla presenza di sole cellule dalla morfologia epitelioide.
2. **Sarcomatoide**, associato ad una prognosi più grave del precedente e caratterizzato dalla presenza di sole cellule dalla morfologia sarcomatoide.
3. **Misto**, caratterizzato dalla contemporanea presenza di entrambi i tipi cellulari in proporzione variabile. E' il più raro ed aggressivo dei tre istotipi.

Il decorso clinico della malattia è molto rapido e raramente giunge alla metastatizzazione. Esso è caratterizzato dalla crescita della massa tumorale ed induce la morte del paziente a causa della compressione da essa esercitata sugli organi interni, in particolare cuore e polmoni.<sup>13</sup> Il mesotelio pleurico può andare incontro a diversi tipi di lesioni, le quali possono simulare il mesotelioma rendendone molto complessa la diagnosi istopatologica che, infatti, richiede numerosi saggi di immunoistochimica con un ampio pannello di anticorpi. Le terapie convenzionali utilizzate in caso di diagnosi positiva per il MPM includono la resezione chirurgica seguita da chemio- e radio-terapia. Tuttavia la prognosi resta infausta in quanto per questo tipo di tumore l'efficacia delle cure attuali comporta una breve sopravvivenza che di norma è a circa 1-2 anni dalla diagnosi ed in alcuni casi arriva fino a 5 anni.<sup>9,13</sup>

### **1.1.3 I principali fattori di rischio coinvolti nell'insorgenza e nella progressione del mesotelioma maligno della pleura.**

Il MPM, come la maggior parte dei tumori, è una malattia genetica delle cellule somatiche, che insorge a causa di numerose mutazioni che si accumulano sul genoma e che portano fenotipicamente allo sviluppo del tumore.<sup>14</sup> Studi pregressi hanno dimostrato che le cellule del mesotelio sono molto sensibili alle fibre di asbesto le quali, dopo essere state endocitate dalla cellula, interagiscono direttamente con la cromatina destabilizzandone la struttura e provocando mutazioni principalmente su geni oncosoppressori ed oncogeni.<sup>15,16</sup>

L'asbesto è un minerale che fu largamente utilizzato nell'industria per la sua capacità di isolante termico e acustico. Il prodotto industriale impiegava principalmente tre diversi tipi di minerale. Infatti l'amianto si trova composto in natura da fibre diverse ed è denominato: crocidolite, crisolite, e amosite. La capacità dell'amianto di interagire coi sistemi biologici dipende dalla dimensione delle fibre che lo compongono. Ve ne sono alcune con un diametro medio di 3 µm e una lunghezza media compresa tra 5 e 100 µm. Queste fibre hanno il maggior potere cancerogeno e la più comune è la crocidolite. Inoltre, le fibre di asbesto hanno un forte potere immunosoppressivo. Questa caratteristica svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo del tumore poichè limita e/o inibisce il sistema immunitario nel controllare/eliminare le cellule trasformate.<sup>17,18</sup>

L'asbesto induce nelle cellule umane aberrazioni cromosomiche non casuali. Infatti, frequenti sono ad esempio i casi di polisomia del cromosoma 7, sul quale si trovano i geni che codificano per il recettore del fattore di crescita di tipo A derivato dalle

piastrine (PDGF-A).<sup>19-21</sup> Inoltre, sono stati osservati casi di delezione o di monosomia dei cromosomi 1 e 3 che contengono rispettivamente geni coinvolti nel processo di senescenza cellulare e geni oncosoppressori.<sup>22-24</sup> Il suo meccanismo tumorigenico è legato all'attivazione di citochine pro-infiammatorie e di NF- $\kappa$ B<sup>25,26</sup> ma perché avvenga la trasformazione maligna delle cellule mesoteliali è necessario che si verifichi anche l'attivazione di Akt.<sup>27-28</sup> L'induzione del tumore, d'altra parte, sembra correlata alla cooperazione tra il danno prodotto dall'asbesto ed altri agenti trasformanti, come il virus oncogeno SV40.<sup>28</sup> Infatti, è stato osservato che circa il 50% dei campioni di tessuto derivati da MPM presenta sequenze genomiche del virus SV40 e l'espressione del suo oncogene antigene T grande (agT).<sup>29</sup> Questi dati nell'insieme suggeriscono che l'infezione da SV40 potrebbe rappresentare un co-fattore nello sviluppo e nella progressione del mesotelioma maligno della pleura.<sup>30</sup> A supporto di questa ipotesi, esperimenti eseguiti su cellule di mesotelioma esposte sia alle fibre d'asbesto che ad SV40 dimostrano che le cellule trasformate da questi due co-fattori sono più resistenti ai farmaci citotossici ed ai chemioterapici.<sup>28,31</sup>

## **1.2 I MICRORNA**

### **1.2.1 I microRNA: biogenesi, meccanismo e funzione.**

Nel settore dell'oncologia sperimentale, uno degli approcci più utilizzati di recente nello studio di numerose patologie tumorali umane è rappresentato dai microRNA (miRNA o miR). I miRNA rappresentano una famiglia di piccoli RNA non codificanti a singolo filamento, costituiti da circa 21-25 nt, espressi in molti organismi.<sup>32</sup> Essi svolgono diverse funzioni ma la più nota, attualmente, è la loro

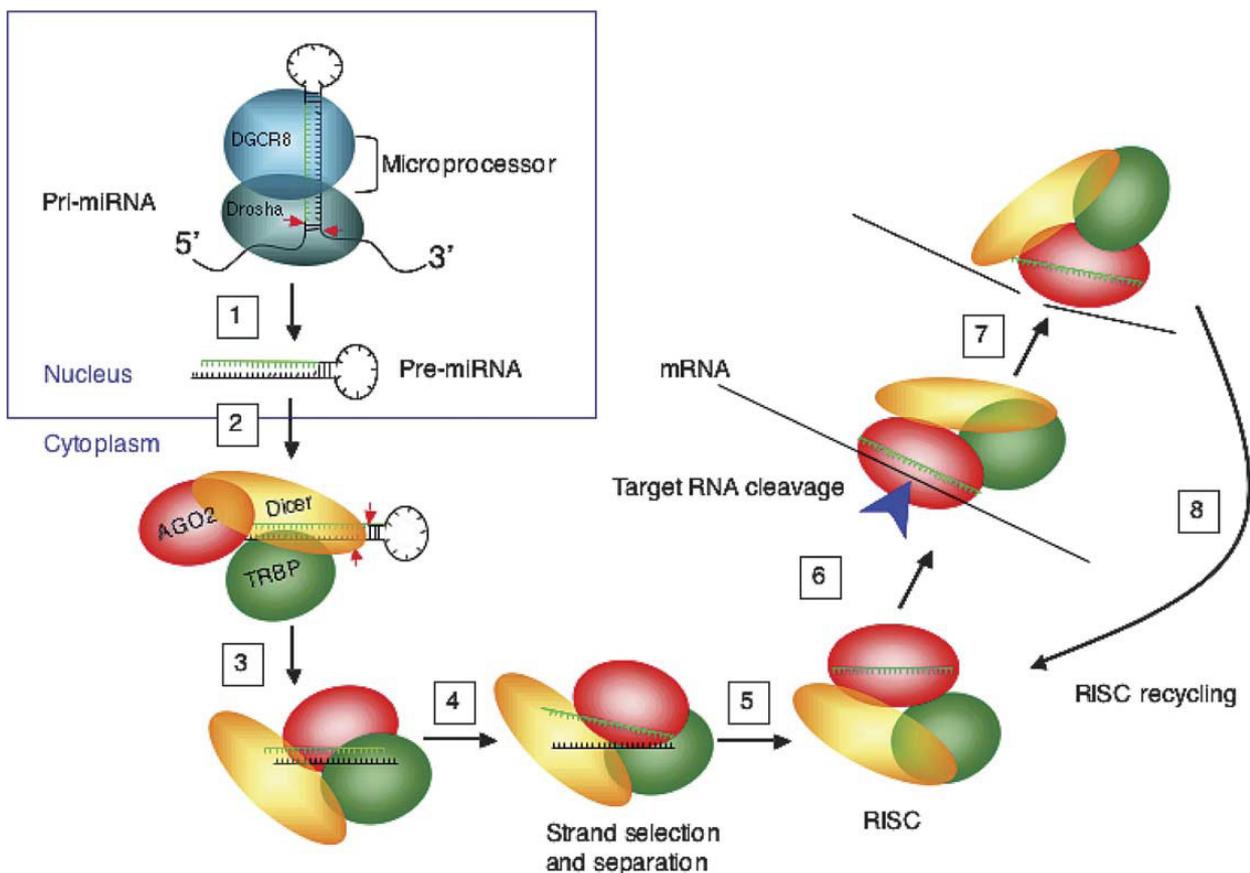
capacità di regolare l'espressione genica a livello trascrizionale. Infatti, la regolano negativamente agendo sull'mRNA bersaglio e sono coinvolti in numerosi processi cellulari inclusi lo sviluppo, il differenziamento, la proliferazione, l'apoptosi e la risposta agli stress.<sup>33</sup>

Si suddividono in tre classi:

1. **short interfering RNA o siRNA**: possono derivare da trascritti di RNA a doppio filamento (dsRNA) come ad esempio RNA virali, RNA hairpin, trasposoni, centromeri, ect;
2. **microRNA o miRNA**: derivano da trascritti di sequenze specifiche;
3. **piwiRNA o piRNA**: sono molto presenti negli animali e sembrano derivare da precursori a singolo filamento, anche se di questi piccoli RNA non si hanno a tutt'oggi molte informazioni.

I microRNA derivano da trascritti di sequenze specifiche che si presentano come sequenze di dsRNA con struttura secondaria (stem-loop) chiamate *pri-miRNA*, generati dalla trascrizione di alcuni geni ad opera della RNA polimerasi II. I *pri-miRNA* sono molecole grandi anche migliaia di nucleotidi che subiscono poliadenilazione, capping e presumibilmente splicing degli introni. Successivamente vengono processati da un complesso microprocessore formato dalla RNAsi di tipo III, Drosha, e dalla proteina DGCR8 che presenta un dominio per il riconoscimento dell'RNA a doppio filamento. Si formano così i *pre-miRNA*, lunghe molecole di circa 70-80 nt, che presentano una forma a forcina senza estremità libere se non la porzione 3' protrudente. I *pre-mirna* vengono trasportati dal nucleo al citoplasma grazie all'azione di una proteina localizzata sulla membrana cellulare, l'esportina 5, dove

avviene la recisione dell'ansa e quindi la maturazione.<sup>34</sup> Infatti, nel citoplasma, i *pre-miRNA* vengono riconosciuti e processati dall'endonucleasi di tipo III, detta Dicer, che porta alla formazione di molecole a doppio filamento lunghe circa 21-25 nt. Dicer assieme alla proteina TRBP ed alla proteina argonata AGO, formerà il complesso ribonucleoproteico RISC (*RNA-induced silencing complex*) responsabile del silenziamento genico. Dicer e TRBP riconosceranno il filamento guida, miRNA, che legato alla proteina AGO riconoscerà l'mRNA bersaglio e lo silenzierà (**Figura 1**).<sup>35</sup> I complessi miRNA-RISC, così formati, possono legare lo stesso mRNA bersaglio e più mRNA bersaglio possono essere riconosciuti dallo stesso complesso miRNA-RISC.



**FIGURA 1.** Modello dell'assemblamento e della funzione del complesso RISC.

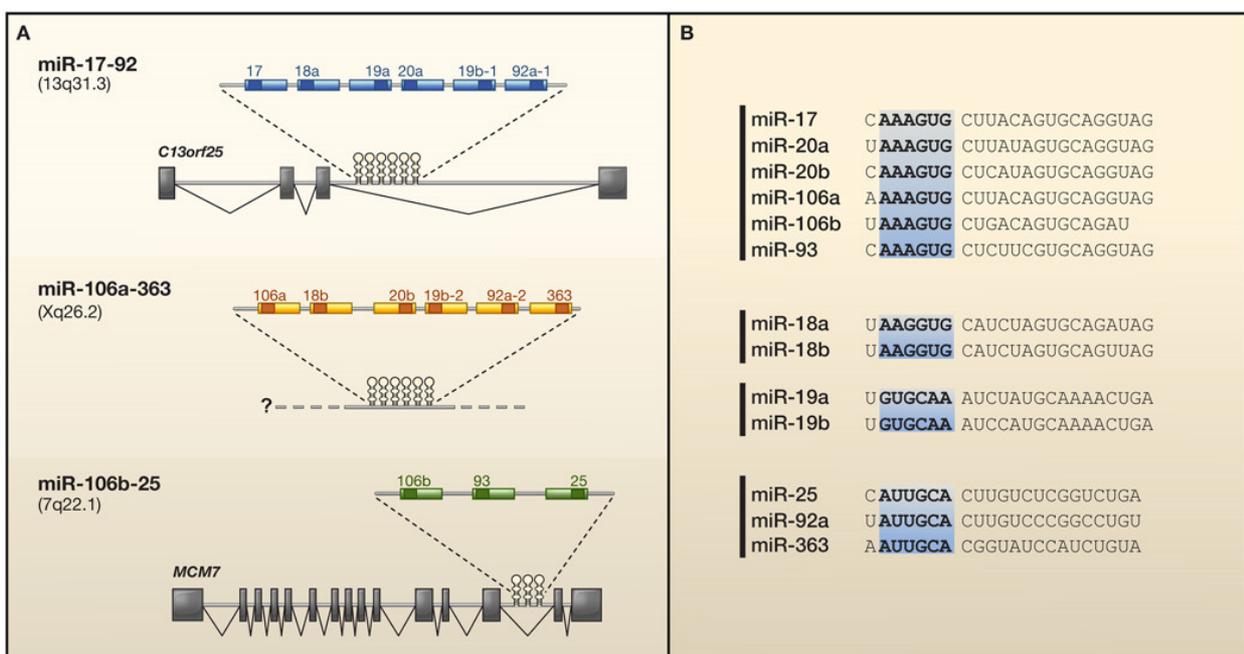
I meccanismi di silenziamento operati dal complesso RISC sono molteplici e possono essere riassunti come segue:

1. *miRNA cleavage or Slicing*. L'mRNA bersaglio viene riconosciuto e di conseguenza idrolizzato. Ciò può rompere la *reading frame* della proteina codificata e provocare la degradazione completa dell'mRNA bersaglio da parte di alcune esonucleasi cellulari.<sup>36</sup> Perché possa avvenire lo slicing sono necessari due requisiti: (i) la presenza nel complesso RISC di una proteina Argonata cataliticamente attiva (ad es. *AGO2*) e (ii) la perfetta complementarità fra il miRNA guida e l'mRNA bersaglio.<sup>37,38</sup>
2. *Translational Repression*. Il processo di repressione della traduzione è causato dall'imperfetta complementarità fra il miRNA e la regione 3' UTR dell'mRNA bersaglio. Infatti, non è richiesto il perfetto appaiamento fra i due filamenti ma la sola complementarità di 2-7 nt.<sup>34</sup> Questo processo blocca la traduzione dell'mRNA bersaglio come conseguenza ad un impossibile svolgimento dello stesso, da parte di elicasi associate ai ribosomi, ed alla sua catalisi.

### **1.2.2 I microRNA e la tumorigenesi umana.**

Molti ricercatori, negli ultimi anni, hanno identificato un'anomala espressione dei miRNA in diversi tipi di neoplasie suggerendone un potenziale ruolo come oncogeni o geni oncosoppressori.<sup>39,40</sup> Inizialmente, particolare interesse è stato destato dall'oncomirna miR-17-92, noto in letteratura per essere associato a numerose patologie tumorali. Nell'uomo, questo cluster codifica per sei miRNA (miR-17, miR-

18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 e miR-92-1), strettamente raggruppati all'interno di una regione di 800 paia di basi sul cromosoma 13, più precisamente localizzato nel terzo introne del trascritto primario, di circa 7 kb, denominato C13orf25.<sup>41</sup> Il cluster miR-17-92 possiede, nell'uomo, due cluster paraloghi: il cluster miR-106b-25, localizzato sul cromosoma 7, e il cluster miR-106a-363, localizzato sul cromosoma X (Figura 2).



**FIGURA 2.** Organizzazione del cluster miR-17-92 e dei suoi paraloghi.

(A) Organizzazione genomica e struttura del trascritto primario dei cluster miR-17-92, miR-106b-25 e miR-106a-363. La struttura del trascritto primario del cluster miR-106a-363 non è stata determinata; (B) Sulla base delle loro sequenze è evidenziata in blu la regione (2-7 nt) considerata più importante per il riconoscimento del target.

Questi miRNA sono implicati nel normale sviluppo del cuore, del polmone e del sistema immunitario così come nella tumorigenesi. Una delle prime evidenze che il cluster miR-17-92 fosse funzionalmente integrato nella via oncogenica centrale della tumorigenesi è stata la scoperta che esso è direttamente transattivato da c-Myc, un

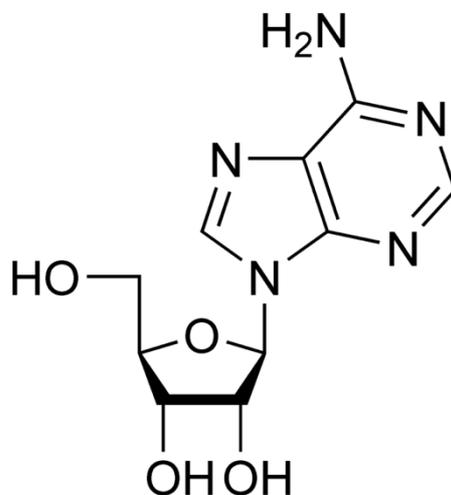
fattore di trascrizione frequentemente iperattivo in cellule tumorali. Studi successivi hanno avvalorato questa ipotesi evidenziando una diffusa sovraespressione di questi miRNA in diverse patologie tumorali inclusi sia i tumori solidi, come i carcinoma della mammella, del colon, del polmone, del pancreas, dello stomaco e della prostata, che neoplasie ematopoietiche.<sup>39,40</sup>

Inoltre, studi recenti indicano che i miRNA possono essere utilizzati come marcatori diagnostici dei tumori, incluso l'MPM,<sup>42,43</sup> e correlati con la sopravvivenza dei pazienti e con fattori clinico-patologici,<sup>44</sup> ad esempio il miR-29c\* e il miR-31. E' stato, infatti, dimostrato che il miR-29c\* è un fattore prognostico indipendente nel MPM sia per il tempo di progressione che per la sopravvivenza dopo la citoriduzione chirurgica. Alti livelli di questo miR sono stati, infatti, riscontrati in forme epiteliali di mesotelioma e associati ad una miglior sopravvivenza del paziente poiché esso agisce sulla metilazione genica e altre pathway sovregolate nel MPM.<sup>45</sup> Il miR-31, invece, possiede un'attività onco-soppressiva e potrebbe essere utilizzato per lo sviluppo di potenziali terapie innovative contro il MPM. E' stato dimostrato che la re-introduzione del miR-31, in linee cellulari derivate da MPM incapaci di esprimere il miR-31 a causa della perdita della porzione genica 9p21.3, è in grado di sopprimere il ciclo cellulare e inibire l'espressione di molteplici fattori coinvolti nella replicazione del DNA e nella progressione del ciclo cellulare, inclusa la fosfatasi PPP6C, associata in precedenza con la resistenza chemio- e radio-terapica ed il mantenimento della stabilità cromosomiale.<sup>46</sup>

## 1.3 I RECETTORI ADENOSINICI ED IL RECETTORE A<sub>3</sub>

### 1.3.1 L'adenosina ed i recettori adenosinici.

L'adenosina è una molecola ubiquitaria che può agire come modulatore di funzioni fisiologiche in vari organi e tessuti attraverso la sua interazione con recettori cellulari di superficie.<sup>47</sup> Svolge la propria azione modulatrice nel sistema nervoso centrale ed in quello periferico, a livello degli apparati cardiovascolare, respiratorio, renale, gastrointestinale e nel tessuto adiposo.<sup>48</sup> Essa influenza l'azione di neurotrasmettitori e neuromodulatori comportandosi come un "modulatore di modulatori", svolge funzioni proprie degli ormoni pur non essendo tale e utilizza vie molto sofisticate per partecipare a questi controlli. L'adenosina è un nucleoside costituito da un anello purinico sostituito in N<sup>6</sup> da un gruppo amminico primario e in N<sup>9</sup> da un anello D-ribosidico per mezzo di un legame β-glicosidico (**Figura 3**). L'adenosina è presente nel citoplasma principalmente nelle sue forme fosforilate AMP, ADP, ATP. In normali condizioni fisiologiche viene continuamente prodotta sia a livello intracellulare che extracellulare.



**FIGURA 3.** Struttura chimica dell'adenosina.

Essa esercita i suoi effetti interagendo con specifici recettori di membrana accoppiati a proteine G. I recettori adenosinici appartengono alla famiglia dei recettori purinergici che si dividono in due classi denominate  $P_1$  e  $P_2$  in base alla loro selettività e al diverso ordine di potenza dei nucleotidi/nucleoside purinici.<sup>49</sup> La classe  $P_1$  è più sensibile all'adenosina, mentre la classe  $P_2$  è più sensibile all'ATP ed ai suoi correlati. I recettori adenosinici appartenenti alla classe dei  $P_1$  sono stati inizialmente distinti in  $A_1$  e  $A_2$  in base alla capacità dell'adenosina di inibire o di stimolare rispettivamente l'adenilato ciclasi.<sup>50</sup> Tecniche di clonaggio molecolare e la sintesi di agonisti ed antagonisti più affini e selettivi, non solo hanno confermato la presenza dei due recettori, ma hanno ulteriormente suddiviso i recettori adenosinici secondo la nomenclatura IUPHAR in 4 distinti sottotipi:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ .<sup>51</sup> Tutti i recettori adenosinici clonati possiedono la tipica struttura dei recettori accoppiati alla proteina G, costituita da sette domini transmembrana ad  $\alpha$ -elica, ognuno dei quali formato da 21-28 amminoacidi idrofobici;<sup>52</sup> la regione N-terminale che sporge nello spazio extracellulare e la regione C-terminale nel citoplasma che interagisce con le proteine G. I domini transmembrana sono legati da tre anelli extracellulari e da tre anelli citosolici idrofili di diversa grandezza; solitamente l'anello extracellulare tra il TM4 e il TM5, e l'anello citoplasmatico tra il TM5 e il TM6 sono estesi. Le regioni transmembrana sono generalmente le più conservate, con la presenza di un'evidente omologia tra gli amminoacidi nei domini TM2, TM3 e TM5. I recettori dell'adenosina differiscono tra loro per la diversa affinità per agonisti endogeni e per la loro diversa specificità farmacologica.

### 1.3.2 Il recettore adenosinico A<sub>3</sub>.

Il recettore A<sub>3</sub> è stato l'ultimo sottotipo recettoriale adenosinico ad essere clonato, prima dal ratto<sup>53</sup> e successivamente dall'uomo.<sup>54</sup> Il recettore A<sub>3</sub> è costituito da 320 amminoacidi con una massa molecolare di 36 kDa, ed il suo gene è stato localizzato sul cromosoma 1 umano.<sup>55</sup> I recettori A<sub>3</sub> sono coinvolti nell'inibizione dell'adenilato ciclasi attraverso l'accoppiamento con proteine G<sub>i</sub> o G<sub>o</sub> e nella stimolazione della fosfolipasi C attraverso proteine G<sub>q</sub>. La sequenza amminoacidica del recettore A<sub>3</sub> è per il 50%, 43% e 40% identica a quella dei recettori A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>, rispettivamente, ma al contrario degli altri sottotipi recettoriali presenta una bassa omologia di specie. La farmacologia e la distribuzione del recettore A<sub>3</sub> differiscono a seconda della specie investigate, infatti nel ratto è stato trovato nei polmoni, reni, cuore e cervello; nella capra nei polmoni, milza, ghiandola pineale, reni, cervello, mentre nell'uomo è stato identificato prevalentemente nel fegato, nei polmoni e nel cuore.

I recettori A<sub>3</sub> sono coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e negli effetti sia pro- che anti-apoptotici strettamente associati ai livelli di attivazione del recettore.<sup>56,57</sup>

E' stato dimostrato che essi risultano sovraespressi in cellule tumorali e giocano un ruolo importante nella tumorigenesi.<sup>58-62</sup> Studi farmacologici hanno dimostrato, infatti, che agonisti del recettore A<sub>3</sub> inibiscono la proliferazione cellulare nel melanoma mentre promuovono la crescita cellulare nel midollo osseo, riducono la vitalità cellulare nel tumore al seno ed inducono l'arresto del ciclo cellulare in cellule umane di cancro al polmone.<sup>63-65</sup> Inoltre, questi agonisti sono in grado di indurre apoptosi cellulare attraverso la modulazione della via di segnale NF-kB in cellule derivate dal cancro alla tiroide e di ridurre la capacità delle cellule del cancro alla

prostata di migrare in vitro e di dare metastasi in vivo.<sup>66,67</sup> Infine, studi pre-clinici e di Fase I hanno dimostrato che questi agonisti dei recettori A<sub>3</sub> sono sicuri e ben tollerati negli esseri umani e quindi possono essere considerati possibili agenti terapeutici per le malattie tumorali.<sup>68</sup>

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Il mesotelioma maligno della pleura (MPM) è un tumore molto aggressivo che si sviluppa dalla trasformazione delle cellule mesoteliali. Ad oggi, per questa neoplasia non ci sono cure adeguate e la prognosi di sopravvivenza per il paziente è di un anno dalla diagnosi. Per il trattamento di questo tumore è di fondamentale importanza definire nuovi bersagli attraverso una maggiore conoscenza e comprensione delle vie di segnalazione molecolari coinvolte nella sua insorgenza/progressione. I microRNA regolano negativamente l'espressione genica a livello trascrizionale e sono coinvolti in numerosi processi incluso il ciclo cellulare. Recentemente per i miRNA è stata identificata un'anomala espressione in differenti patologie tumorali sia solide che ematopoietiche. Anche i recettori adenosinici  $A_3$  sono coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare ed è stato dimostrato che sono sovraespressi in cellule tumorali.

L'obiettivo di questa mia tesi di dottorato è stato quello di valutare l'espressione dei miRNA e del recettore  $A_3$  nel MPM. Per questo scopo nelle mie indagini ho verificato la differenza del profilo d'espressione dei miRNA e del recettore  $A_3$ , fra cellule e tessuti derivati da pleura sana e da mesotelioma. Le finalità delle mie

indagini sono state focalizzate sulla conoscenza di nuove informazioni (i) sull'insorgenza/progressione di questa malattia, (ii) su possibili nuovi marcatori molecolari specifici e (iii) per eventuali terapie innovative. La mia fase sperimentale si è avvalsa in un primo momento di esperimenti di analisi d'espressione dei microRNA mediante microarray, real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) e western blotting. Poi, per lo studio del recettore adenosinico  $A_3$  sono stati eseguiti esperimenti di binding recettoriale, western blotting, immunofluorescenza e real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). I dati da me ottenuti mi hanno consentito di dimostrare che alcuni microRNA sono fortemente deregolati in maniera specifica nel MPM e che il recettore adenosinico  $A_3$  è sovraespresso. Ritengo che i nuovi miRNA trovati deregolati potrebbero rappresentare nuovi bersagli terapeutici mentre gli agonisti del recettore  $A_3$  potrebbero essere impiegati come terapia innovativa.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Campioni e colture cellulari.

I tessuti biotici, derivati da tessuto pleurico sano (HMP) e da mesotelioma (MMP) utilizzati in questa ricerca, ci sono stati forniti dalla Clinica Chirurgica, Azienda Università/Ospedale S. Anna di Ferrara. Alcuni di questi tessuti biotici sono stati utilizzati per allestire colture cellulari primarie definite HMC, se derivate da cellule mesoteliali normali, e MMC, se derivate da mesotelioma. Le cinque linee di mesotelioma, utilizzate nell'analisi d'espressione dei microRNA, denominate MPP-89, IST-MES2, MSTO-211H, NCI-H2052 e NCI-H28, invece, sono state acquistate dalla "American Type Culture Collection" (ATCC). La linea cellulare TP53<sup>wild-type</sup> SKW6.4, trattata con Nutlin, e la linea cellulare HeLa, anch'esse della ATCC, sono state usate come controllo nell'analisi di western blotting per p21 e GAPDH, rispettivamente. Tutte le linee cellulari sono state mantenute in appropriate condizioni di crescita: le HMC, MMC, MSTO-211H, NCI-H2052, NCI-H28 e TP53<sup>wild-type</sup> SKW6.4 in RPMI 1640, 10% di siero fetale bovino (FBS) e 2mM di L-Glutamina, mentre IST-MES2, MPP89 e HeLa in D-MEM Ham's F12, 10% di FBS.

### **3.2 Estrazione di RNA totale.**

L'RNA totale è stato isolato dalle linee cellulari e dai tessuti in esame. In breve, i campioni sono stati sospesi in 1 ml di soluzione Trizol (Invitrogen, Milano, IT) e l'RNA totale è stato precipitato con isopropanolo e risospeso in acqua DEPC. Prima dell'ibridazione per l'analisi di microarray, gli RNA sono stati analizzati con lo strumento Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) al fine di determinarne la concentrazione e la purezza.

### **3.3 Ibridazione dei micro-RNA (miRNA) microarray.**

I profili d'espressione dei miRNA, per 5 campioni di HMC e 5 campioni di MPM, sono stati analizzati attraverso l'Agilent Human microRNA microarray (G4470A Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Questo microarray è costituito da sonde di DNA 60-mer sintetizzato in situ, che rappresentano 470 microRNA umani e 64 microRNA virali umani presi dal database Sanger (release 9.1). L'analisi colorimetrica, l'ibridazione e il lavaggio sono stati eseguiti secondo le istruzioni fornite dalla ditta Agilent. Gli RNA degli stessi 10 campioni sono stati ibridati su un Agilent whole human genome microarray (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) costituito da sonde di DNA 60-mer sintetizzato in situ che rappresentano 41.000 trascritti umani. L'analisi colorimetrica, l'ibridazione e il lavaggio sono stati eseguiti secondo le istruzioni fornite dalla ditta. In breve, una frazione di RNA totale è stato ottenuto dai campioni utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen, Milano, IT). La qualità dell'RNA estratto è stata valutata utilizzando lo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Gli RNA con una bassa qualità

(numero integrità RNA<7) sono stati esclusi dall'analisi di microarray. cRNA marcati sono stati ottenuti da 500 ng di RNA totale usando il Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent Technologies) in presenza di cianina 3-CTP (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA). Le ibridazioni sono state eseguite a 65°C per 17 h. Le immagini, a 5 µm di risoluzione, sono state generate dallo scanner Agilent e analizzate dal software Feature Extraction 9.5 (Agilent Technologies) per ottenere i dati grezzi di microarray.

### **3.4 Analisi dei dati di microarray.**

I dati grezzi di microarray sono stati analizzati dal Gene-Spring GX software (Agilent Technologies) e pre-processati con il GeneSpring plug-in per Agilent Feature Extraction software results. I dati vengono così normalizzati in base alla media del chip e del gene. L'utilizzo di un filtro permette che solo le sonde, che si esprimono in modo differente in almeno un campione, vengano prese in considerazione nell'analisi. I campioni, a questo punto, vengono analizzati, raggruppati e comparati. Da questa analisi vengono selezionati i geni che hanno una differenza d'espressione statisticamente significativa con un p-value (<0.05), seguendo l'applicazione di correzione di Benjamini e Hochberg per la riduzione dei falsi positivi.

I geni differentemente espressi sono stati utilizzati per l'analisi di Cluster dei campioni, utilizzando la correlazione di Pearson come misura di similarità.

### 3.5 Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

Per validare i dati ottenuti nell'analisi di microarray sono stati eseguiti saggi di RT-qPCR (Real-Time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction) per quattro miRNA, miR-17-5p, miR-20a, miR-92 e miR-497. TaqMan MicroRNA Assay Kits sono stati acquistati dalla ditta Applied Biosystems (Applied Biosystems Foster City, CA). Come controllo endogeno di riferimento è stato considerato l'U6 RNA (Applied Biosystems Foster City, CA). I kit sono stati utilizzati seguendo le indicazioni della ditta fornitrice. Gli RNA sono stati diluiti in acqua DEPC alla concentrazione di 2 ng/μl e 10 ng sono stati utilizzati come template in ogni reazione di trascrittasi inversa. Successivamente è stata eseguita una RT-qPCR in triplicato per ogni campione sia per il controllo U6 che per ognuno dei miRNA considerati. Per le reazioni è stato impiegato lo strumento Applied Biosystem 7500 real time thermal cycler, nelle seguenti condizioni: 10 min a 95°C per l'attivazione dell'enzima, 15 sec a 95°C per 40 cicli e 1 min a 60°C. L'espressione dei miRNA è stata misurata con il metodo del  $\Delta\Delta Ct$ , dove Ct corrisponde al numero di cicli in cui la fluorescenza di ogni campione passa un ciclo soglia fissato e  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR} - Ct_{RNU6B})_{campione} - (Ct_{miR} - Ct_{RNU6B})_{controllo}$ . Il relativo fold-change dei miRNA è stato determinato con il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Inoltre, per l'analisi quantitativa degli mRNA dei recettori adenosinici (ARs) A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, rispettivamente, sono state utilizzate sonde gene-specifiche TaqMan MGB (minor groove binder) fluorescenti.<sup>69</sup> ed è stato impiegato lo strumento Applied Biosystem Prism 7700 Sequence Detection System. Come controllo

endogeno di riferimento è stato utilizzato lo Human  $\beta$ -actina kit (Applied Biosystems Foster City, CA).

### **3.6 Western blotting.**

Le linee cellulari e i tessuti in esame sono stati lisati utilizzando un buffer di lisi. Le proteine (40  $\mu$ g) di ogni linea sono state caricate e corse su un gel di poliacrilammide al 12%, trasferite poi su membrane di nitrocellulosa e bloccate per 1 h a temperatura ambiente con TBS-MT (10 ml Tris-Buffered Saline 10X, 5 gr di latte magro in polvere, 90 ml H<sub>2</sub>O, 100  $\mu$ l Tween). Le membrane sono state incubate con gli anticorpi primari contro p21 (diluito 1:200, clone DCS-60, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA) e gli ARs (diluiti 1  $\mu$ g/ml, Alpha Diagnostics Inc, San Antonio, TX),<sup>69</sup> a 4°C overnight, e successivamente con l'anticorpo secondario coniugato a perossidasi per 1 h a temperatura ambiente. La rivelazione dell'immunocomplesso avviene per reazione chemio luminescente utilizzando una soluzione ECL (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) seguendo le indicazioni della casa produttrice. Nell'analisi della proteina p21, i campioni sono stati normalizzati con Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH (1:1.000, Santa Cruz, CA)).

### **3.7 Preparazione delle membrane cellulari.**

Le membrane sono state preparate a partire da tessuti pleurici umani (HMP e MMP) e linee cellulari (HMC e MMC). I tessuti e i pellet cellulari sono stati omogeneizzati in un tampone Tris-HCl 50 mM a pH 7.4 mediante l'utilizzo di un Polytron (Kinematica

Inc, Bohemua, NY). Successivamente, sono stati centrifugati a 48.000 g per 30 min a 4°C per ottenere un pellet. Per studiare l'espressione dei recettori adenosinici mediante saggi di binding, il pellet è stato risospeso nei seguenti buffer: a) 50 mM Tris HCl, pH 7,4 per i recettori A<sub>1</sub>; b) 50 mM Tris HCl, pH 7.4 contenente 10 mM MgCl<sub>2</sub> per i recettori A<sub>2A</sub>; c) 50 mM Tris HCl, pH 7.4 contenente 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA per i recettori A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>. Le sospensioni sono state incubate con adenosina deaminasi alla concentrazione di 2 IU/ml per 30 min a 37°C e utilizzate per saggi di binding in presenza di radioligandi.<sup>70</sup>

### **3.8 Preparazione dell'amianto.**

Le fibre d'amianto del tipo crocidolite sono state ottenute dalla Union Internationale Contre le Cancer. Le fibre hanno una lunghezza ed un diametro medio di  $3.2 \pm 1.0$  micron e  $0.22 \pm 0.01$  micron, rispettivamente. Esse sono state cotte in forno a 150°C per 18 h, sospese in una soluzione salina, triturate e autoclavate. Queste fibre, caratterizzate in precedenza, presentano effetti cancerogeni e causano il rilascio di specie reattive dell'ossigeno e danni al DNA.<sup>71</sup>

### **3.9 Immunoistochimica.**

HMC e MMC cresciute su vetrini in piastre multi-well sono state fissate con formalina al 4% in PBS, pH 7.4 per 15 min a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi in PBS ghiacciato, i vetrini sono stati incubati con BSA all'1% per 30 min per bloccare i siti di legame aspecifici per gli anticorpi utilizzati. Le cellule sono state poi incubate con anticorpi primari policlonali specifici per gli ARs, diluiti 1:50,

overnight a 4°C.<sup>72</sup> Successivamente, è stata eseguita un'incubazione con anticorpi secondari anti-rabbit IgG coniugato a fluoresceina isotiocianato (FITC) per 1 h a temperatura ambiente ed il marcatore nucleare, DAPI (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 4',6-diamidino-2-phenylindole, alla concentrazione di 1mg/ml per 20 min. Dopo un lavaggio in PBS, i vetrini sono stati montati per la microscopia con DABSCO (1,4-diazabicyclo (2.2.2) ottano, Sigma) e visualizzati mediante l'utilizzo di un microscopio Nikon Eclipse 50i.

### **3.10 Saggi di binding recettoriale di saturazione.**

Per lo studio degli ARs mediante saggi di binding di saturazione le membrane, ottenute da HMP e MMP, sono state incubate in presenza di radioligandi a diverse condizioni: a) [<sup>3</sup>H]-1,3-dipropyl-8-cyclopentyl-xanthine ([<sup>3</sup>H]-DPCPX, 0.01-20 nM) per 90 min a 25°C per lo studio del recettore A<sub>1</sub>;<sup>73</sup> b) [<sup>3</sup>H]-4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]-triazolo [2,3-a][1,3,5] triazin-5-ylamino] ethyl) phenol ([<sup>3</sup>H]-ZM 241385, 0.01-20 nM) per 60 min a 4°C per lo studio del recettore A<sub>2A</sub>;<sup>74</sup> c) [<sup>3</sup>H]-N-benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-[5-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-1-methyl-1H-pyrazol-3-yl-oxy] acetamide ([<sup>3</sup>H]-MRE 2029F20, 0.01-30 nM) per 60 min a 4°C per lo studio del recettore A<sub>2B</sub>;<sup>75</sup> d) [<sup>3</sup>H]-5N-(4-methoxyphenylcarbamoyl) amino-8-propyl-2-(2-furyl) pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo [1,5-c]pyrimidine ([<sup>3</sup>H]-MRE 3008F20, 0.01-30 nM) per 150 min a 4°C per lo studio del recettore A<sub>3</sub>.<sup>73</sup> Il binding non specifico è stato determinato in presenza di DPCPX, ZM241385, MRE2029F20 e MRE3008F20, rispettivamente. Al termine del tempo d'incubazione, la radioattività legata è stata misurata con un Perkin Elmer

Tri Carb 2810 TR liquid scintillation counter (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). Anche in HMC e MMC sono stati eseguiti esperimenti a condizioni sperimentali simili per verificare l'affinità e la densità degli ARs.

### **3.11 Saggi di binding recettoriale competitivo.**

Le membrane, ottenute da HMC, non trattate e trattate con crocidolite per 24 h, e MMC, sono state incubate per 150 min a 4°C con 2 nM [<sup>3</sup>H]-MRE3008F20 e diverse concentrazioni di Cl-IB-MECA e MRE3008F20.<sup>73</sup> Il binding non specifico è stato determinato in presenza di MRE3008F20. Al termine del tempo d'incubazione, la radioattività legata è stata misurata con un Perkin Elmer Tri Carb 2810 TR liquid scintillation counter (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA).

### **3.12 Misura dei livelli di cAMP.**

HMC e MMC sono state risospese in un tampone fosfato Krebs Ringer, contenente adenosina deaminasi alla concentrazione di 1.0 IU/ml e pre-incubate a 37°C per 10 min. Per valutare l'attività dell'adenilato ciclasi e la produzione di cAMP, le cellule sono state incubate con forskolin (10 µM) e/o 4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone (Ro 20-1724) (0.5 mM) come inibitore della fosfodiesterasi.<sup>73</sup> Per dimostrare il diretto coinvolgimento dei recettori A<sub>3</sub>, è stato studiato l'effetto di un antagonista selettivo per lo stesso recettore (MRE3008F20). La soluzione finale acquosa è stata testata attraverso un saggio di binding competitivo utilizzando [<sup>3</sup>H]-cyclic AMP, trizma base 0.1 M, aminophylline 8.0 mM, mercaptoethanol 6.0 mM, pH 7.4.

### **3.13 Dosaggi di AKT in HMC e MMC.**

La fosforilazione di Akt è stata valutata utilizzando un kit commerciale FACE AKT (Active Motif, Carlsbad, CA) seguendo le istruzioni del produttore. HMC e MMC sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e trattate per 24 h con fibre di crocidolite e Cl-IB-MECA. Dopo l'incubazione, le cellule sono state fissate con formaldeide al 4% in PBS. Le cellule, a questo punto, sono state incubate con l'anticorpo primario Akt overnight a 4°C e successivamente con l'anticorpo secondario coniugato a perossidasi per 1 h a temperatura ambiente. Dopo un lavaggio, le cellule sono state incubate con una soluzione di sviluppo per 20 min. Successivamente all'aggiunta di una soluzione di bloccaggio, l'assorbanza è stata letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm con una lunghezza di riferimento di 655 nm.<sup>76</sup>

### **3.14 Attivazione di NF-kB in HMC e MMC.**

Estratti nucleari sono stati ottenuti dalle cellule in esame mediante l'utilizzo di un kit d'estrazione nucleare (Active Motif, Carlsbad, CA) seguendo le istruzioni della casa fornitrice. L'attivazione di NF-kB è stata determinata mediante la rilevazione della proteina p65 fosforilata con l'utilizzo di TransAM NF-kB kit (Active Motif, Carlsbad, CA). L'anticorpo primario riconosce un epitopo sulla subunità p65 accessibile solamente quando NF-kB è attivato e legato al suo DNA bersaglio. Un anticorpo secondario, coniugato con una perossidasi, permette una reazione colorimetrica che viene quantificata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm.<sup>69</sup>

### **3.15 Saggi di proliferazione cellulare in HMC e MMC.**

Le HMC sono state trattate con Cl-IB-MECA (1 nM-1  $\mu$ M) in presenza e in assenza di fibre di crocidolite (5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) e/o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). Inoltre, le MMC sono state trattate con Cl-IB-MECA (1 nM-1  $\mu$ M) in assenza o presenza di MRE3008F20 (1  $\mu$ M). Le cellule sono state seminate in Dulbecco's modified Eagle's medium, 10% siero fetale di capra, penicillina (100 units/ml), streptomicina (100  $\mu$ g/ml) con 1  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]-Thymidine per 24 h. Dopo l'incubazione, le cellule vengono tripsinizzate, seminate in quattro pozzetti di una piastra da 96 e filtrate attraverso un filtro Whatman GF/C di fibra di vetro utilizzando l'apparato di filtrazione Micro-Mate 196 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA). La radioattività trattenuta dai filtri viene misurata utilizzando un Top Count Microplate Scintillation Counter with Micro Scint 20.<sup>77</sup>

### **3.16 Saggi di morte cellulare in HMC e MMC.**

I saggi di morte cellulare sono stati effettuati valutando i livelli di attività della caspasi-3 dopo trattamento con Cl-IB-MECA (1 nM-1  $\mu$ M) per 24 h in presenza e in assenza di fibre di crocidolite (5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) e/o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). Inoltre, l'effetto di Cl-IB-MECA è stato anche investigato in presenza di MRE3008F20 (1  $\mu$ M). Dopo 24 h, le cellule sono state trattate con un inibitore della biotina-ZVKD-FMK (10  $\mu$ M) per 1 h a temperatura ambiente. Successivamente 100  $\mu$ l di ogni estratto cellulare, ottenuti dall'aggiunta di un tampone d'estrazione per 2 h a temperatura ambiente, sono stati trasferiti in una micropiastra pre-coated con un anticorpo

primario specifico per la caspasi-3. Dopo un lavaggio, sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di caspasi-3 streptavidina coniugata con perossidasi che si lega con la biotina dell'inibitore precedentemente aggiunto. Dopo un ulteriore lavaggio, è stata aggiunta ad ogni pozzetto una soluzione substrato per 30 min e successivamente una soluzione di bloccaggio per bloccare la reazione. La densità ottica è stata determinata utilizzando un lettore di micropiastre impostato ad una lunghezza d'onda pari a 450 nm.

### **3.17 Test di citotossicità LDH in HMC e MMC.**

La citotossicità è stata valutata con un kit di rilevazione LDH (Biovision, Mountain View, CA), che misura l'attività LDH (lattato deidrogenasi) rilasciata dal citoplasma delle cellule danneggiate. Le HMC sono state trattate con Cl-IB-MECA (1 nM-1  $\mu$ M) per 24 h in presenza e in assenza di fibre di crocidolite (5  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) e/o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). Inoltre, MMC sono state trattate per 24 h con Cl-IB-MECA (1 nM-1  $\mu$ M) in assenza o presenza di MRE3008F20 (1  $\mu$ M). Dopo l'incubazione, 100  $\mu$ l di surnatante per pozzetto sono stati raccolti e trasferiti in una piastra da 96 pozzetti con fondo piatto, addizionati di 100  $\mu$ l di substrato LDH e incubati al buio per 30 min a temperatura ambiente. L'assorbanza di ogni campione è stata misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 490 nm.<sup>71</sup>

### **3.18 Analisi statistica.**

Per lo studio del recettore A<sub>3</sub>, le concentrazioni delle proteine sono state determinate mediante il test Bio-Rad con l'albumina bovina come standard di riferimento (Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA). Le costanti di dissociazione per i saggi di saturazione, affinità o valori delle  $K_D$ , così come le densità massime dei siti specifici di legame,  $B_{max}$ , sono state calcolate mediante l'utilizzo del programma LIGAND (Kell Biosoft, Ferguson, MO). I dati relativi allo studio funzionale sono stati calcolati con un'analisi non lineare di regressione usando l'equazione di una curva sigmoide concentrazione-risposta (GraphPAD Prism, San Diego, CA). L'analisi dei dati è stata effettuata da un'analisi della varianza. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con il test di Dunnett e sono state considerate significative a valori di  $p < 0.01$ . Tutti i dati sperimentali sono stati espressi come valore medio  $\pm$  errore standard.

Per lo studio dei microRNA, l'analisi dei dati relativi ai microarray è stata effettuata da un'analisi della varianza. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con il test ANOVA utilizzando la correzione di Benjamini e Hoechberg per la riduzione dei falsi positivi e la correlazione di Pearson come misura di similarità. L'analisi dei dati relativi alla RT-qPCR, invece, è stata eseguita utilizzando il test del "t di Student" (analisi per dati non appaiati). Le differenze sono state giudicate significative a valori di  $p < 0.05$ .

## 4. RISULTATI

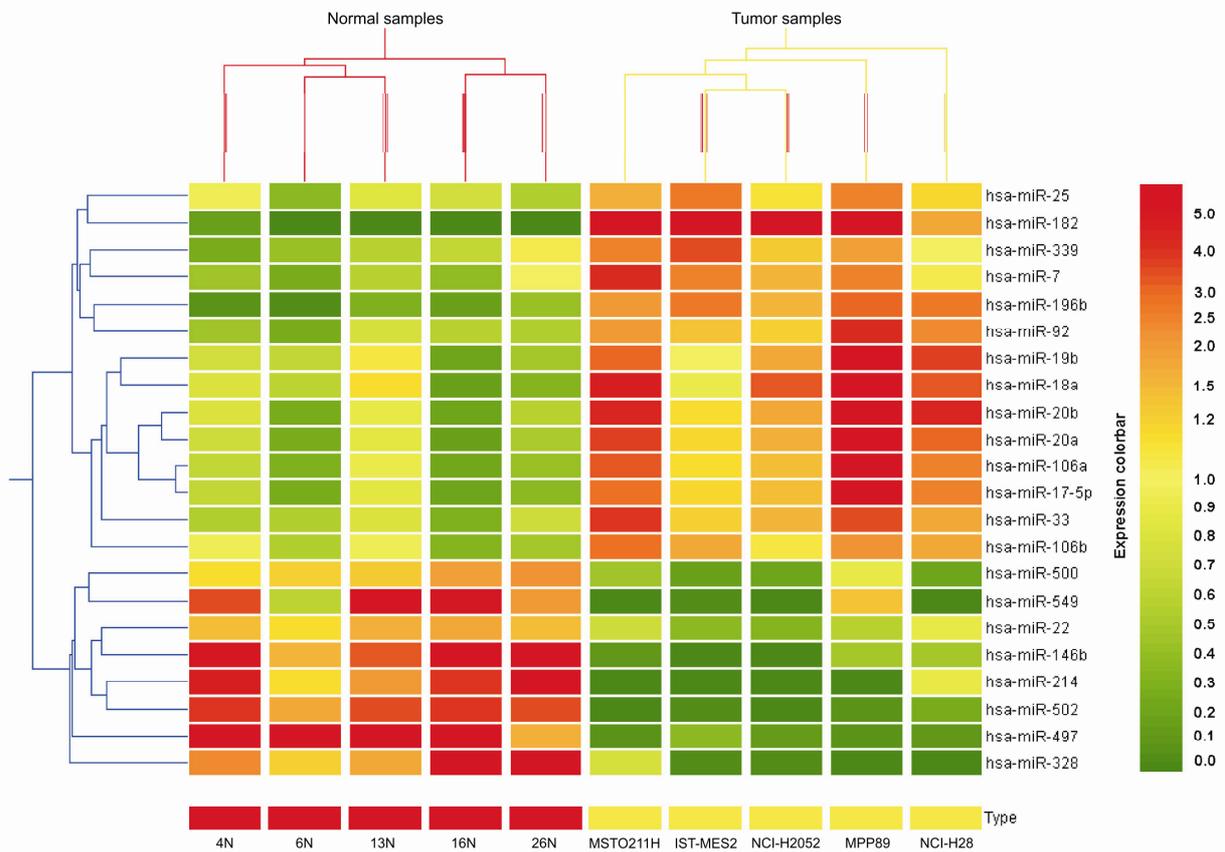
### 4.1 Analisi comparativa dell'espressione dei microRNA in HMC e MMC.

Gli RNA estratti da campioni di HMC e MPM sono stati comparativamente analizzati per l'espressione dei miRNA. A tal fine, gli RNA isolati sono stati investigati in microarray (Agilent Technologies, Human microRNA microarray G4470A). I dati ottenuti hanno mostrato una deregolazione dell'espressione dei microRNA nei campioni di MPM confrontati con le HMC. Infatti, 151 miRNA mostravano un fold-change superiore a 2 quando la media d'espressione dei miRNA nell'MPM veniva confrontata con la media d'espressione degli stessi in HMC. Fra questi, 22 miRNA sono risultati differentemente espressi in modo statistico (ANOVA p-value<0.05, correzione di Benjamini e Hochberg): quattordici sono risultati sovraespressi, mentre otto sono risultati sottoespressi (**Tabella 1**). L'analisi di cluster, fatta usando questi 22 miRNA, ha mostrato una chiara deregolazione degli stessi fra le due popolazioni cellulari, normale vs tumorale (**Figura 4**).

miRNA	miRNA cluster	Chrom	Start .. End [strand]	Expression			Fold change ratio
				p-value ‡	MPM	HMC	
hsa-miR-182	mir-183 - mir-96 - mir-182	7	129197459 .. 129197568 [-]	0.012	2.97	0.01	297.0
hsa-miR-502	mir-500 - mir-362 - mir-501 - mir-660 - mir-502	X	49665946 .. 49666031 [+]	0.012	0.01	0.28	0.04
hsa-miR-497	mir-497 - mir-195	17	6861954 .. 6862065 [-]	0.023	0.01	0.06	0.17
hsa-miR-146b	-	10	104186259 .. 104186331 [+]	0.028	0.03	1.33	0.02
hsa-miR-17-5p	mir-17 - mir-18a - mir-19a - mir-20a - mir-19b-1 - mir-92a-1	13	90800860 .. 90800943 [+]	0.033	20.74	3.35	6.19
hsa-miR-7	-	9	85774483 .. 85774592 [-]	0.033	0.78	0.17	4.59
hsa-miR-92a-1	mir-17 - mir-18a - mir-19a - mir-20a - mir-19b-1 - mir-92a-1	13	90801569 .. 90801646 [+]	0.033	76.43	18.34	4.17
hsa-miR-92a-2	mir-106a - mir-18b - mir-20b - mir-19b-2 - mir-92a-2 - mir-363	X	133131234 .. 133131308 [-]	0.033	76.43	18.34	4.17
hsa-miR-33	-	22	40626894 .. 40626962 [+]	0.033	1.64	0.4	4.10
hsa-miR-328	-	16	65793725 .. 65793799 [-]	0.033	0.01	0.14	0.07
hsa-miR-214	mir-199a-2 - mir-214	1	170374561 .. 170374670 [-]	0.033	0.04	36.1	0.001
hsa-miR-196b	-	7	27175624 .. 27175707 [-]	0.036	0.57	0.03	19.0
hsa-miR-20a	mir-17 - mir-18a - mir-19a - mir-20a - mir-19b-1 - mir-92a-1	13	90801320 .. 90801390 [+]	0.036	59.60	8.78	6.79
hsa-miR-106a	mir-106a - mir-18b - mir-20b - mir-19b-2 - mir-92a-2 - mir-363	X	133131894 .. 133131974 [-]	0.036	51.48	9.15	5.63
hsa-miR-20b	mir-106a - mir-18b - mir-20b - mir-19b-2 - mir-92a-2 - mir-363	X	133131505 .. 133131573 [-]	0.037	3.80	0.55	6.91
hsa-miR-18a	mir-17 - mir-18a - mir-19a - mir-20a - mir-19b-1 - mir-92a-1	13	90801006 .. 90801076 [+]	0.037	6.75	1.03	6.55
hsa-miR-339	-	7	1029095 .. 1029188 [-]	0.037	3.97	1.11	3.58
hsa-miR-106b	mir-106b - mir-93 - mir-25	7	99529552 .. 99529633 [-]	0.037	16.65	5.35	3.11
hsa-miR-22	-	17	1563947 .. 1564031 [-]	0.037	94.08	262.94	0.36
hsa-miR-549	-	15	78921374 .. 78921469 [-]	0.037	0.02	0.2	0.10
hsa-miR-19b	mir-17 - mir-18a - mir-19a - mir-20a - mir-19b-1 - mir-92a-1	13	90801447 .. 90801533 [+]	0.040	76.36	15.37	4.97
hsa-miR-500	mir-532 - mir-188 - mir-500 - mir-362 - mir-501 - mir-660 - mir-502	X	49659779 .. 49659862 [+]	0.040	0.18	0.94	0.19
hsa-miR-25	mir-106b - mir-93 - mir-25	7	99529119 .. 99529202 [-]	0.044	21.30	7.91	2.69

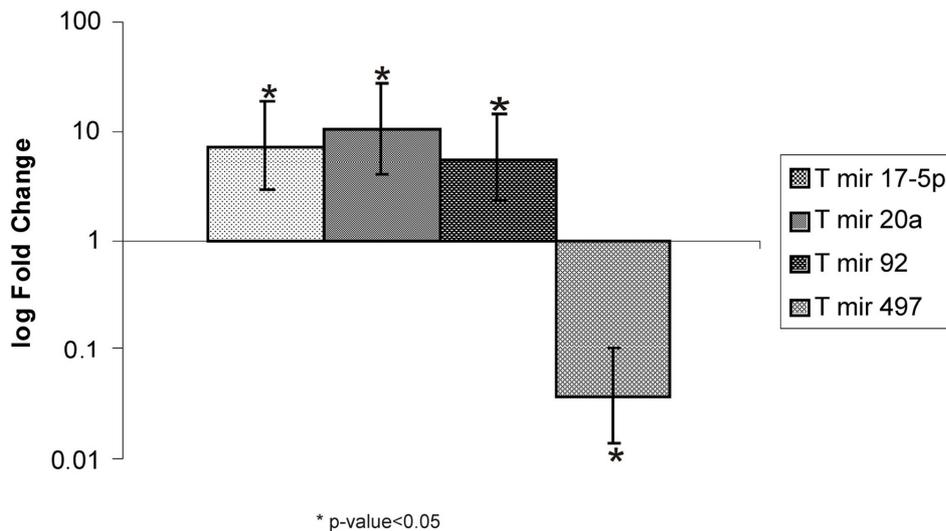
‡ p-value<0.05; correzione di Benjamini e Hochberg per la correzione dei falsi positivi.

**TABELLA 1.** MicroRNA differemente espressi fra MPM e HMC.



**FIGURA 4.** Analisi di cluster dei profili d'espressione dei microRNA in HMC e MPM.

Per validare i dati ottenuti nell'analisi di microarray, quattro miRNA diversamente espressi sono stati ulteriormente analizzati in RT-qPCR. Nello specifico, noi abbiamo selezionato tre miRNA, miR-17-5p, miR-20a e miR-92, sovraespressi in MPM ed un miRNA, miR-497, risultato sottoespresso nei nostri campioni di MPM. E' interessante notare che il miR-497 è già stato descritto in letteratura per essere sottoespresso in altri tumori polmonari e nel carcinoma peritoneale.<sup>78,79</sup> Le analisi svolte in RT-qPCR hanno confermato la differenza d'espressione dei miRNA fra i campioni derivati da MPM e HMC (**Figura 5**).



**FIGURA 5.** Analisi d'espressione dei microRNA in campioni di MPM mediante RT-qPCR.

#### 4.2 Modulazione dei bersagli in MPM.

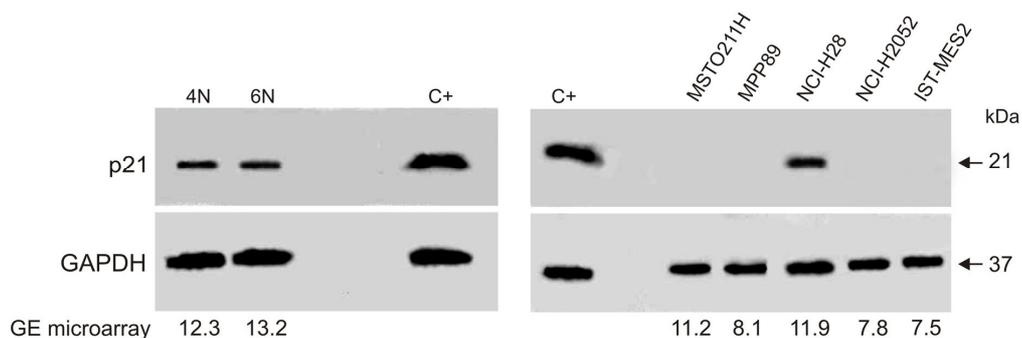
Gli stessi campioni sono stati ibridati su un Whole Human Genome Microarray (Agilent Technologies), capace di valutare l'espressione di 41.000 trascritti, in particolar modo l'espressione dei bersagli validati dei microRNA. L'analisi dei dati d'espressione genica ha mostrato una correlazione inversa fra i miRNA selezionati e molti dei loro bersagli validati (source: Tarbase) (**Tabella 2**).<sup>80</sup> Queste osservazioni supportano il ruolo di regolatori dell'espressione genica dei miRNA selezionati, dal momento che alcuni microRNA umani esercitano la loro azione inducendo la scissione completa del mRNA bersaglio come nel caso della CDKN<sub>1A</sub>. Comunque, alcuni geni bersaglio non mostrano una regolazione a livello di mRNA; ciò potrebbe essere spiegato con un'azione dei miRNA solo sulla traslazione delle proteine<sup>34</sup> o sulla concomitante azione di più miRNA sullo stesso bersaglio.

<b>miRNA</b>	<b>Fold Change MPM/HMC</b>	<b>Regulation MPM/HMC</b>	<b>miRNA Target Gene Symbol</b>	<b>Fold Change MPM/HMC (range 1.5-2.3)</b>	<b>Regulation MPM/HMC</b>
hsa-miR-17-5p	6.19	up	NCOA <sub>3</sub>	0.43	no variation
			E2F1	7.41	up
			CDKN <sub>1A</sub>	9.50	down
hsa-miR-19b	4.97	up	BACE <sub>1</sub>	10.61	down
hsa-miR-20a	6.79	up	TGFBR <sub>2</sub>	1.97	no variation
hsa-miR-20b	6.91	up	MYLIP	3.00	up
			HIPK <sub>3</sub>	1.42	no variation
			CDKN <sub>1A</sub>	9.50	down
			ARID <sub>4B</sub>	1.53	no variation
hsa-miR-106a	5.63	up	RB <sub>1</sub>	2.89	down
			MYLIP	3.00	up
			HIPK <sub>3</sub>	1.42	no variation
			CDKN <sub>1A</sub>	9.50	down
			ARID <sub>4B</sub>	1.53	no variation
hsa-miR-106b	3.11	up	CDKN <sub>1A</sub>	9.50	down
hsa-miR-214	902	down	PTEN	5.65	down

**TABELLA 2.** Espressione dei miRNA selezionati e dei loro geni bersaglio.

### 4.3 CDKN<sub>1</sub>A/p21 è sottoregolata in MPM.

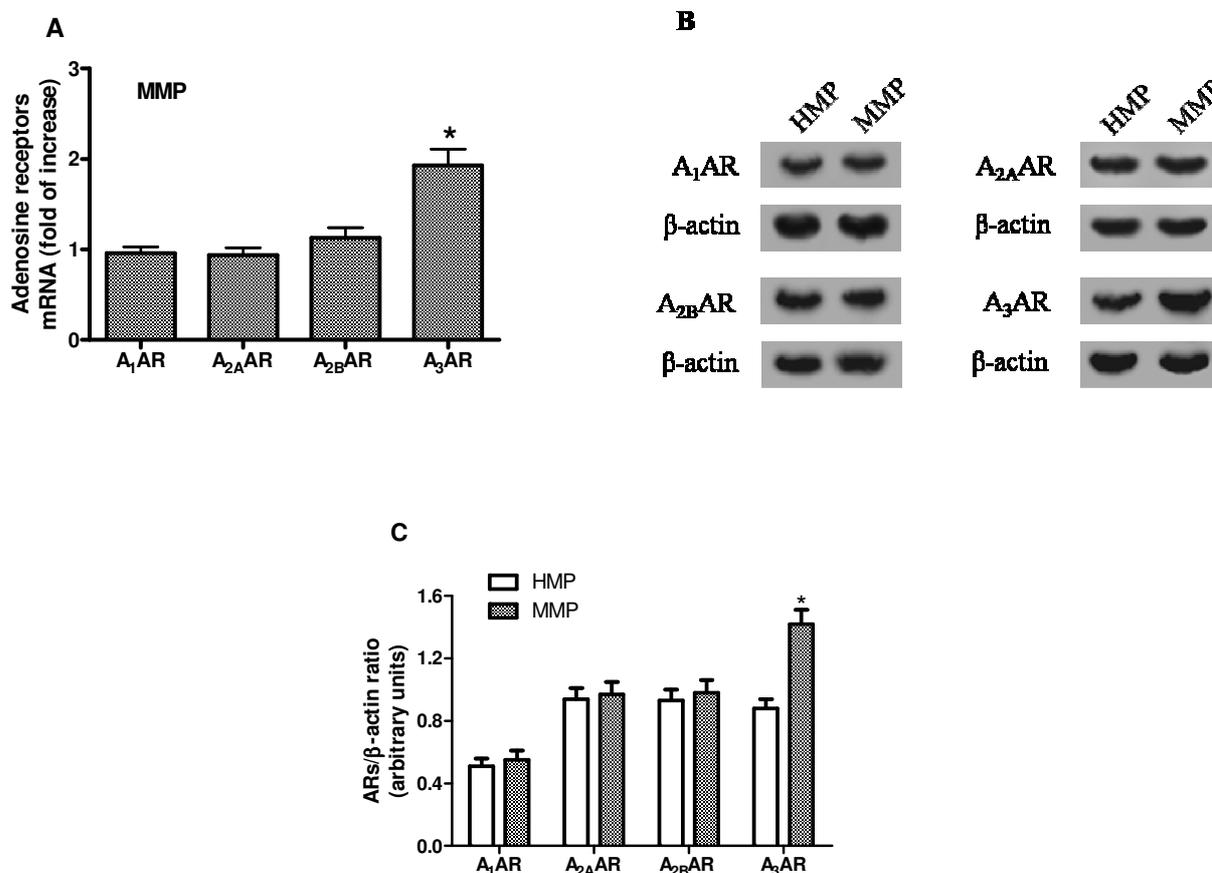
CDKN<sub>1</sub>A/p21 è una proteina che regola negativamente la progressione della cellula nel ciclo cellulare dalla fase G<sub>1</sub> alla fase S. E' stato ampiamente dimostrato in letteratura che p21 è bersaglio confermato del cluster miR-17-92 e dei suoi paraloghi<sup>81</sup> e il livello del suo mRNA è stato trovato sottoregolato nei nostri campioni di MPM. Per validare i nostri dati di microarray, 5 campioni derivati da MPM e 2 campioni di HMC, sono stati investigati per l'espressione di p21 con la tecnica del western blotting. Noi abbiamo motivato che l'assenza d'espressione di p21 nei nostri campioni di MPM potesse essere dovuta alla sovraespressione dei miRNA appartenenti al cluster miR-17-92 e ai suoi paraloghi. Nelle HMC, p21 è normalmente espressa (**Figura 6**), mentre la sua espressione è assente o ridotta nei campioni di MPM (**Figura 6**). Questa riduzione potrebbe essere l'effetto della sovraregolazione del cluster miR-17-92 osservata in MPM.



**FIGURA 6.** Espressione della proteina p21 in HMC e in campioni di MPM.

#### 4.4 Sovraespressione del A<sub>3</sub>ARs in pazienti affetti da MPM.

I livelli di mRNA di ARs, espresso come rapporto tra MMP e HMP, sono rappresentati nella **Figura 7A**. Nessuna differenza, invece, è stata trovata nell'espressione degli mRNA dei recettori A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> in MMP e HMP. Al contrario, l'espressione del mRNA dei recettori A<sub>3</sub> è risultata significativamente aumentata in MMP in confronto con HMP (**Figura 7A**). Le analisi densitometriche e di western blotting indicano un incremento del 61% nell'espressione di A<sub>3</sub>ARs in MMP rispetto a HMP (A<sub>3</sub>AR/ $\beta$ -actin ratio:  $1.42 \pm 0.09^*$  vs  $0.88 \pm 0.06$ , \*,  $p < 0.01$ ). Nessuna differenza è stata riscontrata nell'espressione dei recettori A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> in MMP e HMP (**Figura 7B e 7C**).



**FIGURA 7.** (A) Espressione dei mRNA in MMP e HMP. (B) Western blotting e (C) analisi densitometriche dei recettori adenosinici (ARs).

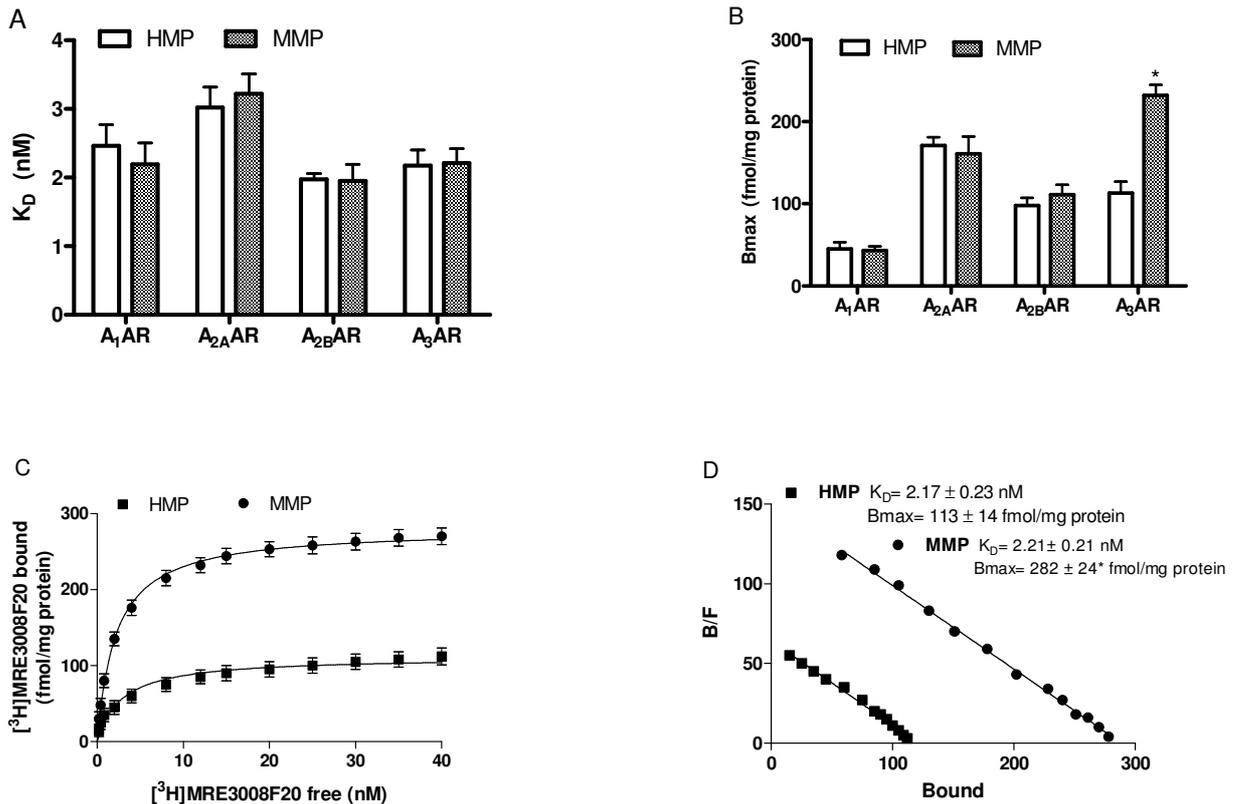
La sovraespressione dei recettori A<sub>3</sub> in MMP è stata confermata da esperimenti di binding di saturazione (**Tabella 3, Figura 8**).

	<sup>3</sup> H]-DPCPX A <sub>1</sub> AR		<sup>3</sup> H]-ZM 241,385 A <sub>2A</sub> AR		<sup>3</sup> H]-MRE2029F20 A <sub>2B</sub> AR		<sup>3</sup> H]-MRE3008F20 A <sub>3</sub> AR	
	K <sub>D</sub> (nM)	Bmax (fmol/mg protein)	K <sub>D</sub> (nM)	Bmax (fmol/mg protein)	K <sub>D</sub> (nM)	Bmax (fmol/mg protein)	K <sub>D</sub> (nM)	Bmax (fmol/mg protein)
HMP	2.48 ± 0.31	36 ± 4	3.02 ± 0.30	106 ± 10	1.97 ± 0.16	106 ± 9	2.17 ± 0.23	113 ± 14
MMP	2.19 ± 0.23	43 ± 5	2.86 ± 0.27	118 ± 14	1.95 ± 0.20	111 ± 12	2.21 ± 0.21	282 ± 24*
HMC	1.35 ± 0.12	32 ± 3	2.07 ± 0.18	95 ± 8	1.78 ± 0.15	102 ± 10	1.83 ± 0.16	93 ± 8
MMC	1.28 ± 0.11	38 ± 3	2.45 ± 0.16	104 ± 9	1.65 ± 0.15	108 ± 11	2.12 ± 0.17	325 ± 28†
Asbestos-treated HMC	1.32 ± 0.12	31 ± 3	2.03 ± 0.16	98 ± 9	1.81 ± 0.16	105 ± 11	2.25 ± 0.21	260 ± 24†

\*p<0.01 vs HMP; \*\*p<0.01 vs HMC.

**TABELLA 3.** Affinità e densità dei recettori adenosinici in HMP e MMP vs HMC e MMC.

Tutti i recettori adenosinici sono espressi nella pleura umana, ma non sono state rilevate differenze significative nei parametri cinetici del binding (la costante di affinità [K<sub>D</sub>] e la densità recettoriale [Bmax]) per i recettori A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> in MMP confrontati con quelli ottenuti in HMP. La densità dei recettori A<sub>3</sub>, invece, è risultata essere aumentata significativamente in MMP rispetto a HMP (**Figura 8B**), mentre i valori di affinità si sono dimostrati simili (**Figura 8A**). La linearità dello Scatchard è indice della presenza di un solo sito recettoriale con valori di densità pari a 113±14 fmol/mg di proteina e 282±24\* fmol/mg di proteina per HMP e MMP, rispettivamente (**Figura 8C e 8D**, \*, p<0.01).

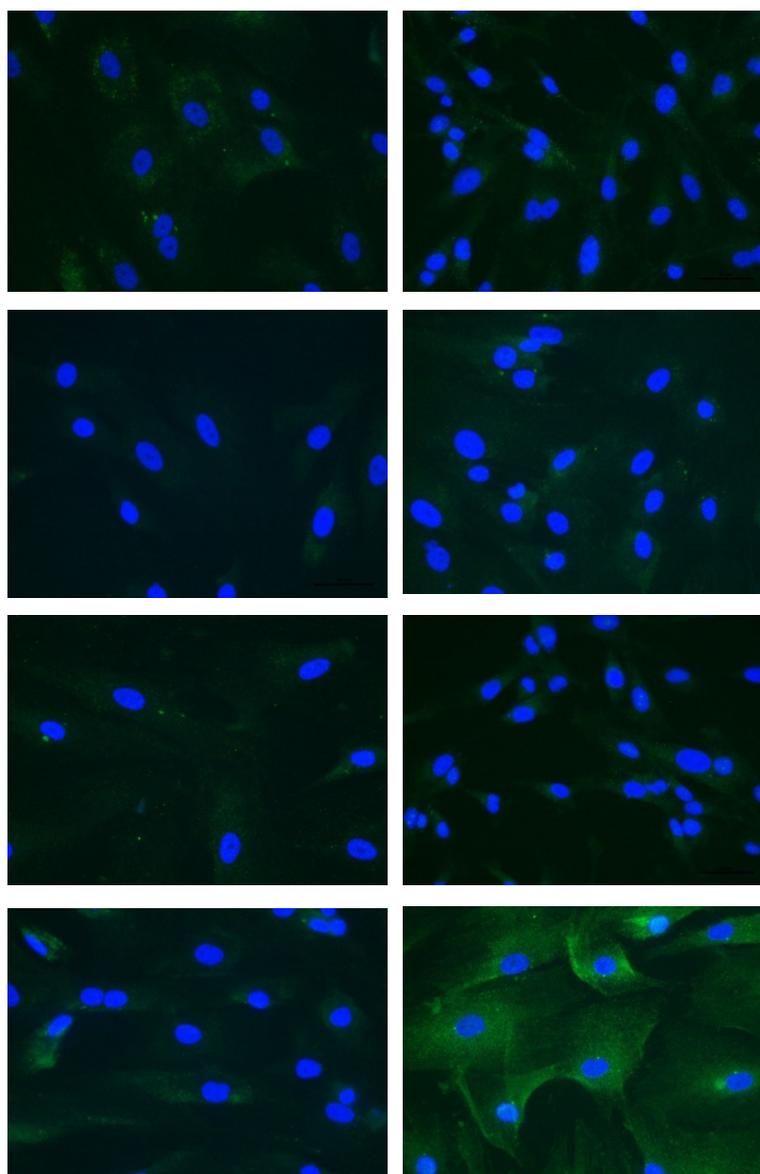


**FIGURA 8.** (A) Affinità ( $K_D$ ) e (B) densità ( $B_{max}$ ) dei recettori adenosinici in MMP e HMP. (C) Curve di saturazione e (D) grafico di Scatchard di [ $^3H$ ]MRE3008F20 per A<sub>3</sub>ARs in MMP e HMP.

#### 4.5 L'effetto funzionale e l'espressione del recettore A<sub>3</sub> sono aumentati in

##### MMC.

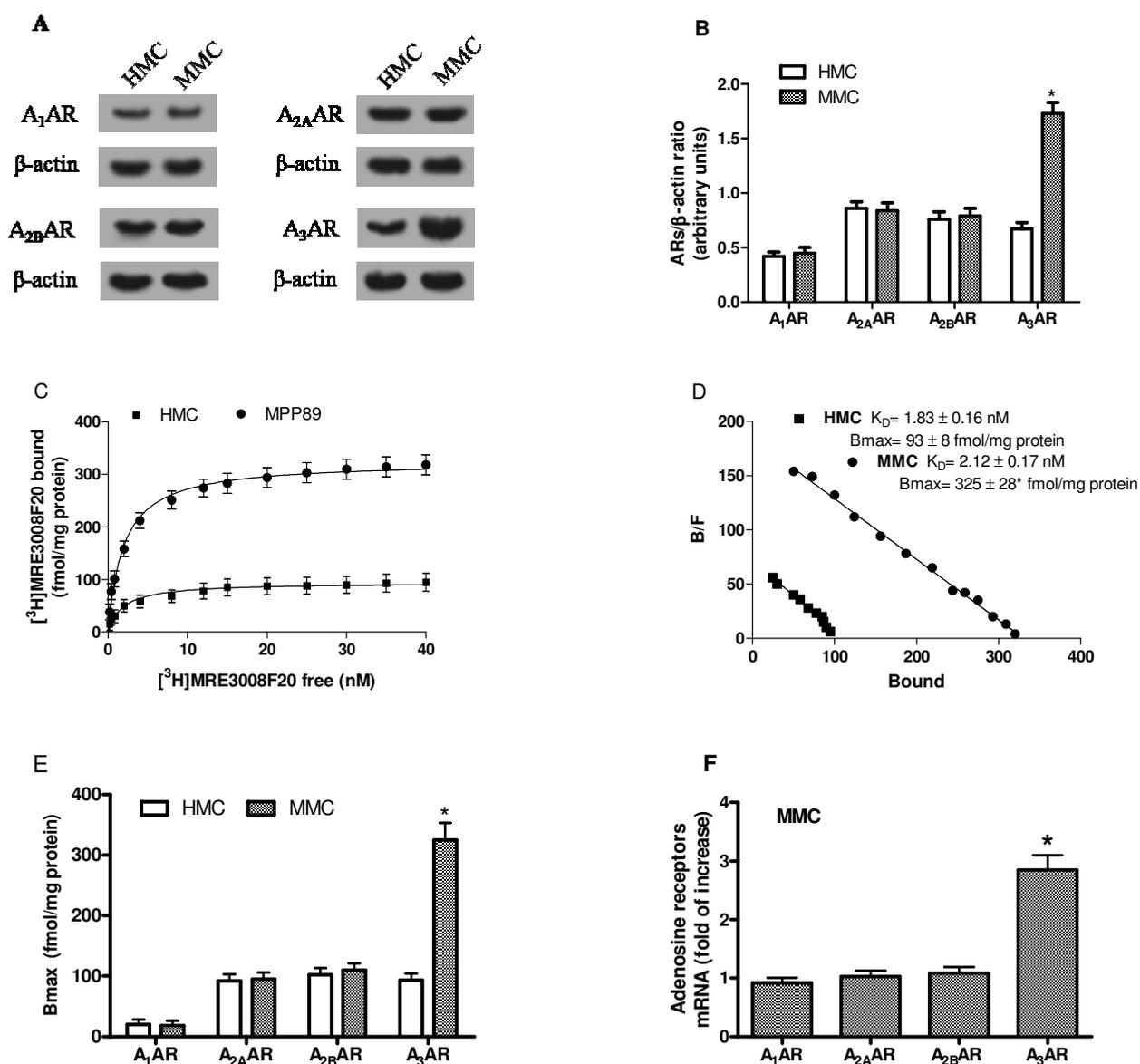
Analisi immunocitochimiche hanno rilevato un simile livello di espressione dei recettori A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> in MMC e HMC, ed una sovraespressione del recettore A<sub>3</sub> in MMC rispetto alle HMC (**Figura 9**). Analisi densitometriche e di western blotting hanno ulteriormente confermato l'espressione invariata dei recettori A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> in HMC e MMC ed un alto livello d'espressione del recettore A<sub>3</sub> in MMC (**Figura 10A e 10B**).



**FIGURA 9.** Analisi immunocistochimica degli ARs,  $A_1$  (A, B),  $A_{2A}$  (C, D),  $A_{2B}$  (E, F) e  $A_3$  (G, H) in HMC (A, C, E, G) e in MMC (B, D, F, H).

Per valutare l'affinità e la densità dei ARs nei controlli e nelle cellule derivate da MPM, sono stati svolti esperimenti di binding di saturazione in HMC e MMC (**Tabella 3**). Non sono state rilevate differenze significative nei valori di affinità e densità per i recettori  $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ . Le curve di saturazione e il relativo Scatchard hanno sottolineato una marcata differenza nell'espressione di  $A_3$  fra le HMC e le MMC (**Figura 10C e 10D**). Nella **Figura 10E** sono stati riportati gli istogrammi relativi alla densità recettoriale, espressa in  $B_{max}$ , degli ARs nelle membrane

ottenute da HMC e MMC. E' interessante notare che i recettori  $A_3$  sono aumentati significativamente nelle membrane ottenute da MMC se confrontate con quelle delle HMC di 3.5 volte. Questo dato è stato confermato dall'analisi quantitativa dei livelli del mRNA degli ARs che ha rilevato un aumento di  $A_3$  a livello trascrizionale di 3.2 volte nelle MMC comparate con le HMC (Figura 10F).



**FIGURA 10.** (A) Western blotting, (B) analisi densitometriche, (E) densità recettoriale (Bmax) e (F) espressione dell'mRNA dei recettori adenosinici in MMC e HMC. (C) Curve di saturazione e (D) grafico di Scatchard per il recettore  $A_3$  in HMC e MMC.

Per valutare l'affinità degli agonisti ed antagonisti del recettore  $A_3$  sono stati eseguiti esperimenti di binding competitivo (**Tabella 3**). Come atteso, Cl-IB-MECA, agonista per il recettore  $A_3$ , ha mostrato una curva di binding competitivo bifasica verso  $A_3$ ARs, come suggerito da una misura significativamente migliore di un modello a due siti di binding e da un coefficiente di Hill inferiore all'unità (0.52). Nelle HMC, Cl-IB-MECA ha mostrato un valore di  $K_H$  pari a  $0,95 \pm 0,10$  nM e di  $K_L$  pari a  $82 \pm 9$  nM, similmente a quanto misurato in MMC. I valori di  $K_i$  dell'antagonista per il recettore  $A_3$ , MRE3008F20, hanno mostrato un'elevata affinità nel range nanomolare sia in HMC sia in MMC.

L'effetto funzionale dei  $A_3$ ARs, in HMC e MMC, è stato determinato esaminando l'effetto di Cl-IB-MECA e MRE3008F20 sulla produzione di cAMP. In HMC, l'agonista Cl-IB-MECA è stato in grado di inibire i livelli di cAMP stimolati dal forskolin in maniera concentrazione-dipendente, con una  $EC_{50}$  nel range nanomolare (**Tabella 4**). In MMC, Cl-IB-MECA ha mostrato un marcato incremento nella potenza ( $EC_{50}=12\pm 1^*$  vs  $34\pm 3$   $\mu$ M, \*,  $p<0.01$ ), probabilmente dovuto alla sovraespressione dei recettori  $A_3$  (**Figura 11A**). Forskolin 10  $\mu$ M è stato in grado di stimolare un aumento di 10 volte dei livelli di cAMP sia in HMC che in MMC rispetto ai livelli basali, suggerendo un'attività simile dell'adenilato ciclasi. Cl-IB-MECA ha inibito i livelli di cAMP stimolati dal forskolin con un maggior effetto ( $p<0.01$ ) in MMC che in HMC (**Figura 11B**). L'antagonista selettivo per il recettore  $A_3$ , MRE3008F20, ha mostrato un valore di potenza nel range nanomolare con un  $IC_{50}$  di  $10\pm 1$  nM in HMC e di  $3.45\pm 0.28$  nM in MMC. MRE3008F20, alla concentrazione di 1  $\mu$ M, è stato in grado di contrastare

completamente l'effetto di Cl-IB-MECA alla concentrazione di 100 nM suggerendo il coinvolgimento dei recettori A<sub>3</sub> (**Figura 11B**).

Compounds	[ <sup>3</sup> H]-MRE3008F20 Binding A <sub>3</sub> AR HMC Affinity (nM)	cAMP Assay HMC Potency (nM)	[ <sup>3</sup> H]-MRE3008F20 Binding A <sub>3</sub> AR MMC Affinity (nM)	cAMP Assay MMC Potency (nM)	[ <sup>3</sup> H]-MRE3008F20 Binding A <sub>3</sub> AR HMC Treated with Asbestos Affinity (nM)	cAMP Assay HMC Treated with Asbestos Potency (nM)
Cl-IB-MECA	K <sub>H</sub> = 0.95 ± 0.10 K <sub>L</sub> = 82 ± 9	EC <sub>50</sub> = 34 ± 3	K <sub>H</sub> = 0.83 ± 0.09 K <sub>L</sub> = 75 ± 8	EC <sub>50</sub> = 12 ± 1*	K <sub>H</sub> = 0.89 ± 0.09 K <sub>L</sub> = 80 ± 9	EC <sub>50</sub> = 14 ± 2*
MRE3008F20	K <sub>i</sub> = 2.13 ± 0.16	IC <sub>50</sub> = 10 ± 1	K <sub>i</sub> = 2.18 ± 0.17	IC <sub>50</sub> = 3.45 ± 0.28†	K <sub>i</sub> = 2.27 ± 0.03	IC <sub>50</sub> = 3.14 ± 0.29†

\*p<0.01 vs HMC per Cl-IB-MECA; †p<0.01 vs HMC per MRE3008F20.

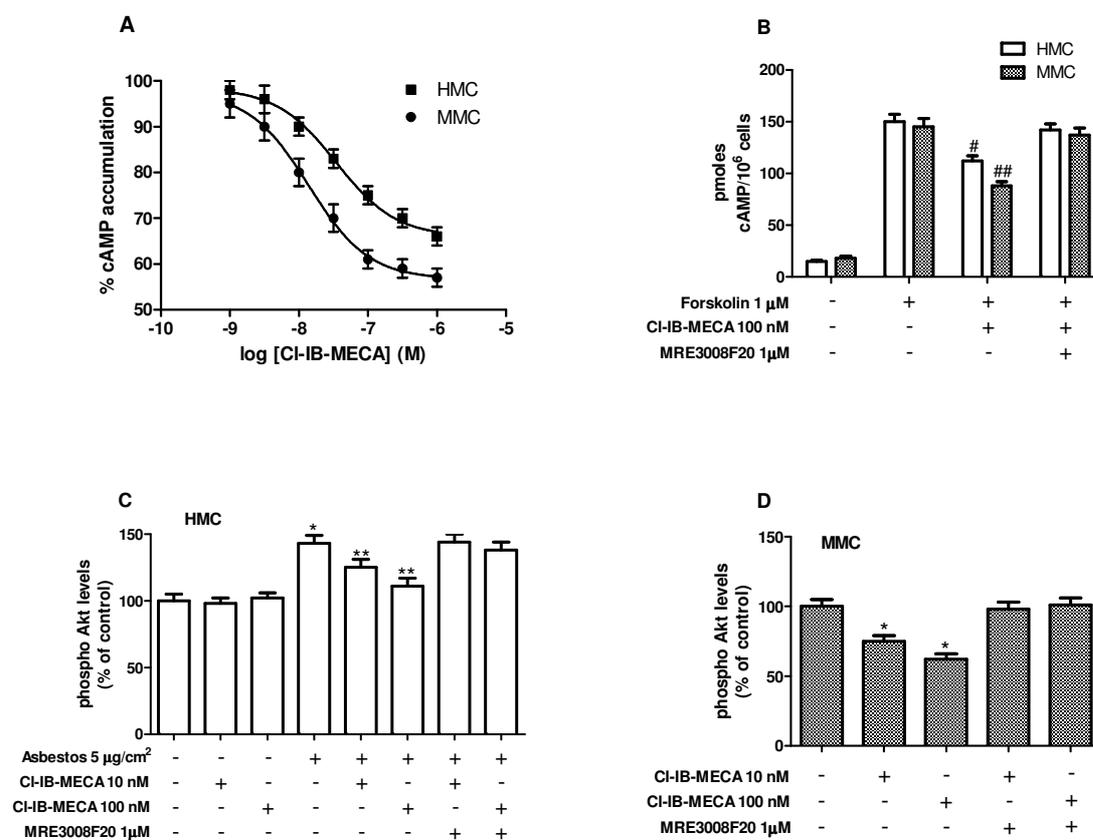
**TABELLA 4.** Affinità e potenza dell'agonista del recettore A<sub>3</sub>, Cl-IB-MECA, e dell'antagonista, MRE3008F20, in HMC e MMC.

#### 4.6 Sovraespressione dei A<sub>3</sub>ARs in HMC esposte ad amianto.

L'effetto dell'esposizione all'amianto in HMC è stata valutata per mezzo di esperimenti di binding e di saggi sull'cAMP (**Tabella 4**). Esperimenti di binding di saturazione per A<sub>3</sub>ARs hanno mostrato un valore di affinità nel range nanomolare e una densità recettoriale (Bmax) di 260n fmol/mg di proteina suggerendo un aumento significativamente statistico dei recettori A<sub>3</sub> dopo il trattamento per 24 h con l'amianto. In esperimenti di binding competitivo, i valori di affinità per Cl-IB-MECA e MRE3008F20 rilevati in HMC esposte all'amianto non presentano differenze con quelli rilevati in HMC non trattate e MMC. E' interessante notare che, in saggi sul cAMP, la potenza di Cl-IB-MECA e MRE3008F20 rilevata era più alta nelle cellule HMC trattate rispetto alle non trattate e risultava simile a quella rilevata nelle MMC.

#### 4.7 Cl-IB-MECA de-regola la via di segnale di Akt/NF-kB.

In HMC, Cl-IB-MECA, alle concentrazioni di 10 e 100 nM, non è stato in grado di modificare i livelli di Akt fosforilata se confrontati con le condizioni di controllo. La presenza di amianto ( $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ha incrementato significativamente di 1.4 volte ( $p < 0.01$ ) i livelli di fosforilazione di Akt. Questo effetto è stato inibito da Cl-IB-MECA, alle concentrazioni di 10 e 100 nM, per il 42 e 74%, rispettivamente (**Figura 11C**). In MMC, Cl-IB-MECA alle stesse concentrazioni è in grado di inibire i livelli basali di Akt fosforilata per il 25 e il 38%, rispettivamente (**Figura 11D**). MRE3008F20 ( $1 \mu\text{M}$ ) è in grado di bloccare l'effetto di Cl-IB-MECA suggerendo il coinvolgimento dei recettori  $A_3$ .



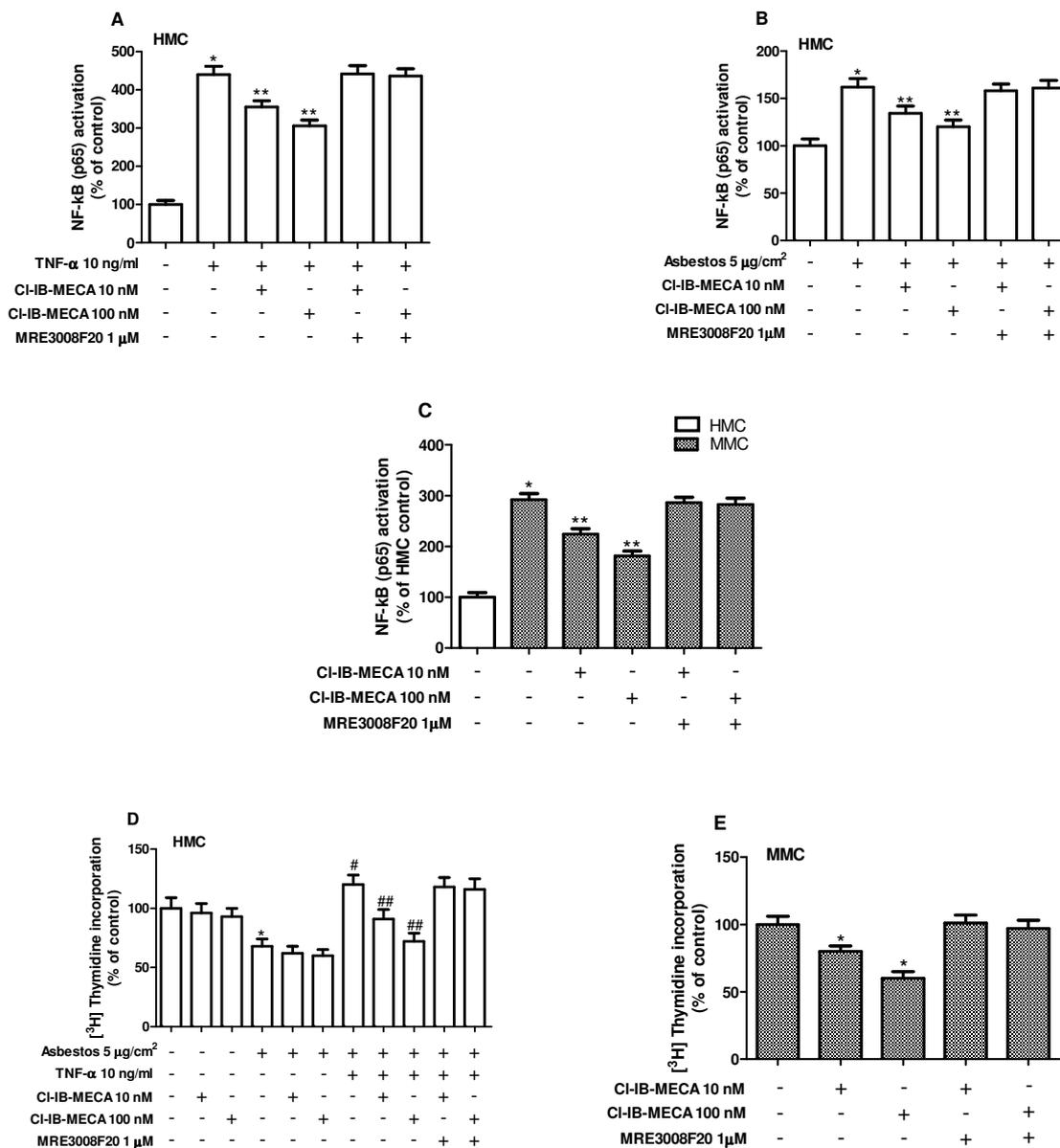
**FIGURA 11.** Effetto di Cl-IB-MECA sull'accumulo di cAMP in HMC e MMC.

In HMC, il trattamento con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) aumenta significativamente l'attivazione della subunità p65 di NF-kB. Questo effetto è risultato essere inibito dall'agonista del recettore A<sub>3</sub>, Cl-IB-MECA, alle concentrazioni di 10 e 100 nM con una riduzione di 45 e 68%, rispettivamente (**Figura 12A**, p<0.01). Anche il trattamento con l'amianto (5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) è stato in grado di aumentare marcatamente l'attivazione di NF-kB in HMC dopo 24 h e la presenza di Cl-IB-MECA 10 nM o 100 nM ha inibito l'attivazione di p65 indotta da questo trattamento (**Figura 12B**). Inoltre, la subunità p65 è risultata avere livelli basali più alti in MMC rispetto alle HMC. In MMC, Cl-IB-MECA è stato in grado di ridurre i livelli basali di attivazione di NF-kB del 35% alla concentrazione di 10 nM e del 58% alla concentrazione di 100 nM (**Figura 12C**). In questi esperimenti, il coinvolgimento dei recettori A<sub>3</sub> nella riduzione dell'attività della subunità p65 di NF-kB indotta da Cl-IB-MECA è stato dimostrato dall'uso dell'antagonista MRE3008F20 1  $\mu\text{M}$  che è stato in grado di contrastare gli effetti prodotti da Cl-IB-MECA 10 nM o 100 nM.

#### **4.8 Duplice effetto di Cl-IB-MECA sulla proliferazione e la morte cellulare.**

Cl-IB-MECA non ha avuto effetti sulla proliferazione cellulare nelle HMC, mentre media una riduzione nelle MMC (**Figura 12D e 12E**). Come atteso, l'esposizione all'amianto (5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ha causato una significativa riduzione della proliferazione cellulare e questo effetto non è stato modificato dalla presenza di Cl-IB-MECA 10 nM o 100 nM. Il co-trattamento con amianto e TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) ha aumentato la proliferazione cellulare, raggiungendo un livello superiore a quello del controllo. In queste condizioni sperimentali, Cl-IB-MECA ha ridotto la crescita cellulare

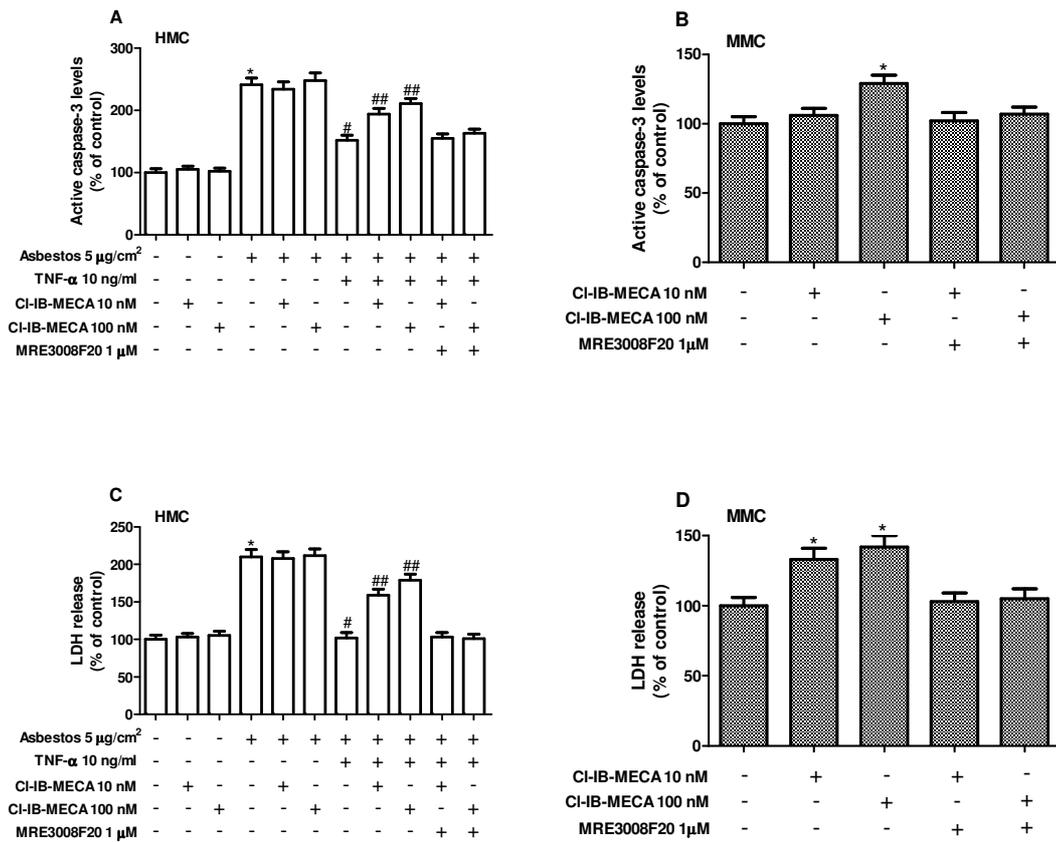
inibendo l'effetto anti-apoptotico del TNF- $\alpha$  sulle HMC esposte all'amianto. In entrambe le linee esaminate, MRE3008F20 era in grado di contrastare l'effetto dell'agonista del recettore A<sub>3</sub>, Cl-IB-MECA.



**FIGURA 12.** Effetto di Cl-IB-MECA e MRE3008F20 in HMC trattate con TNF- $\alpha$  (A) o amianto (B) e MMC (C) sull'attivazione della subunit  p65 di NF-kB. Effetto di Cl-IB-MECA, amianto, TNF- $\alpha$  e MRE3008F20 sull'incorporazione di [<sup>3</sup>H]-Thymidine in HMC (D) e MMC (E).

In HMC, Cl-IB-MECA 10 nM o 100 nM non ha causato modifiche nell'attivazione della caspasi-3 rispetto alle condizioni di controllo in presenza o assenza di

amianto ( $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Il trattamento con l'asbesto ha mostrato un marcato aumento, pari a 2.4 volte, dei livelli della caspasi-3 e la presenza di TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) è stata in grado di ridurre la sua attivazione indotta dall'amianto. La co-presenza di Cl-IB-MECA (10 nM e 100 nM) con l'amianto e il TNF- $\alpha$  hanno aumentato in maniera significativa l'attivazione della caspasi-3 (**Figura 13A**). In MMC, Cl-IB-MECA, alla concentrazione di 10 nM, non ha causato nessun effetto, mentre alla concentrazione di 100 nM era in grado di aumentare del 29% i livelli di attività della caspasi-3 (**Figura 13B**). MRE3008F20 alla concentrazione di 1  $\mu\text{M}$  era in grado di contrastare l'effetto dell'agonista Cl-IB-MECA nei campioni esaminati. In HMC, Cl-IB-MECA 10 nM e 100 nM non è risultato citotossico, come dimostrato dai livelli di LDH rilasciati nei terreni di coltura in assenza o in presenza di amianto. Il trattamento con l'amianto ( $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ha mostrato una marcata citotossicità in HMC aumentando il rilascio di LDH di 2.1 volte. Inoltre, TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) si è dimostrato in grado di ridurre la citotossicità indotta dall'amianto, un effetto che viene contrastato dal trattamento con Cl-IB-MECA 10 e 100 nM (**Figura 13C**). In MMC, Cl-IB-MECA ha aumentato il rilascio di LDH suggerendo un effetto citotossico mediato dalla stimolazione dei recettori  $A_3$  in queste cellule tumorali (**Figura 13D**). MRE3008F20 è in grado di ridurre l'effetto dell'agonista Cl-IB-MECA in tutte le cellule esaminate.



**FIGURA 13.** Effetto di CI-IB-MECA, amianto, TNF- $\alpha$  e MRE3008F20 sui livelli di caspase-3 attiva in HMC (A) e MMC (B). Effetto di CI-IB-MECA, amianto, TNF- $\alpha$  e MRE3008F20 sui livelli di LDH in HMC (C) e MMC (D).

## 5. DISCUSSIONE

La mia ricerca, in questi tre anni di dottorato, si è incentrata sulla valutazione dei profili d'espressione dei microRNA e dei livelli di espressione del recettore adenosinico A<sub>3</sub> (A<sub>3</sub>AR) nel mesotelioma maligno della pleura.

La nostra analisi in microarray per i profili d'espressione dei microRNA ha identificato un gruppo di 22 miRNA, risultati significativamente deregolati dal confronto fra i campioni di MPM e le HMC. Esperimenti svolti in RT-qPCR e western blotting hanno confermato i risultati ottenuti in microarray. Nel nostro studio, i miRNA legati all'oncogenesi, come i membri del cluster miR-17-92, sono risultati marcatamente sovraregolati in MPM (**Tabella 1**), suggerendo la loro importanza nello sviluppo del tumore. Questi dati sono in accordo con risultati precedentemente riportati in letteratura riguardanti altri tumori solidi umani,<sup>39</sup> incluso il mesotelioma.<sup>82</sup> Anche i miR-20b, miR-25, miR-106a e miR-106b, che appartengono ai paraloghi del cluster miR-17-92, sono stati trovati sovraregolati nei nostri campioni di MPM.

Il cluster miR-17-92 è indotto dall'oncogene c-Myc, che quindi agisce come un Myc effettore.<sup>83</sup> Inoltre, è stato dimostrato come una sovraespressione di questo cluster agisca assieme a c-Myc per accelerare lo sviluppo tumorale in un modello murino di linfoma delle cellule B, dove agisce come un oncogene anti-apoptotico.<sup>84</sup> A livello molecolare, questa funzione è mediata dall'inibizione di geni che codificano per proteine pro-apoptotiche. Fra queste, E2F1, E2F2 ed E2F3, che fungono da regolatori del ciclo cellulare e dell'apoptosi, sono bersagli verificati dei cluster miR-17-92 e miR-106-25.<sup>40,83-85</sup> E2F1 ed E2F3, in particolare, possono attivare direttamente la trascrizione di questi miRNA, stabilendo così un feedback negativo. Dato che alti livelli di E2F1 possono indurre apoptosi, questo feedback negativo potrebbe ammortizzare l'attività di E2F seguendo un segnale proliferativo fisiologico, e quindi promuovere la proliferazione cellulare anziché la morte.<sup>81</sup> Ciò potrebbe spiegare perché il miR-17-5p ed il suo bersaglio, l'mRNA di E2F1, sono entrambi sovregolati nei nostri campioni di MPM. Più recentemente, poi, l'inibitore chinasi ciclina dipendente *CDKN1A/p21* e il gene pro-apoptotico *BCL2L1/BIM* sono stati descritti per essere bersagli di molteplici membri del cluster miR-17-92 e dei relativi miRNA,<sup>40,86,87</sup> che potrebbero agire assieme per promuovere la progressione nel ciclo cellulare e, allo stesso tempo, evadere l'apoptosi mediata da BIM. Infatti, è stato dimostrato che la sovraespressione del paralogo presente sul cromosoma 7, interferendo con l'espressione di p21<sup>40</sup> e l'aploinsufficienza per BIM, può accelerare la linfomagenesi in topi transgenici Eu-Myc<sup>88</sup>, similmente alla sovraespressione del cluster miR-17-92, suggerendo che il meccanismo anti-apoptotico osservato potrebbe essere legato più alla

repressione di BIM che a quella di E2F1. E' importante notare che la sovraespressione del cluster miR-17-92 potrebbe anche incrementare l'angiogenesi tumorale, agendo su fattori anti-angiogenici come la trombospondina-1 (*Tsp1*) e il fattore di crescita del tessuto connettivo (*CTGF*), entrambi bersagli predetti per questo cluster.<sup>89</sup> Perciò, la sovraespressione dei membri della famiglia del cluster miR-17-92 potrebbe essere coinvolta nell'insorgenza/progressione dell'MPM promuovendo sia la progressione del ciclo cellulare e la sopravvivenza cellulare che l'angiogenesi. D'altra parte, *CDKN2A/p16*, inibitore chinasi ciclina dipendente, è stato dimostrato essere bersaglio di altri miRNA sovraespressi in MPM, incluso il miR-885-3p.<sup>90</sup>

Uno studio recente ha analizzato il profilo di espressione dei microRNA in tre linee cellulari commerciali, due di mesotelioma ed una di HMC. Questa ricerca riporta che molti membri del cluster dell'oncomiRNA miR-17-92 e dei suoi paraloghi, come miR-17-3p, miR-17-5p, miR-18a, miR-20a e il miR-106a, e altri miRNA legati alla tumorigenesi umana, come miR-21, miR-29a, miR-30b, miR-30c e miR-143, sono sovraespressi nel MPM. Risultati simili erano già stati riportati in letteratura per altri tumori solidi, incluso il cancro al polmone.<sup>39,82</sup> Il nostro studio, invece, è stato eseguito su linee cellulari primarie derivate da biopsie chirurgiche (HMC) e su linee commerciali di MPM. La nostra indagine ha osservato per la prima volta la deregolazione dei miRNA miR-25, miR-182, miR-339, miR-7, miR-196b, miR-92, miR-19b, miR-20b, miR-106a, miR-33, miR-500, miR-549, miR-22, miR-146b, miR-214, miR-502, miR-497 e miR-328, inoltre ha confermato la deregolazione dei miRNA miR-17-5p, miR-18a, miR-20a e miR-106b, come

riportato da Busacca et al.,<sup>82</sup> mentre non ha confermato la sovraregolazione dei miRNA miR-17-3p, miR-29a, miR-30b, miR-30c, miR-143<sup>82</sup> e miR-29c\*.<sup>45</sup> Abbiamo anche osservato che il miR-182 è risultato marcatamente sovraregolato nei nostri campioni di MPM in accordo con quanto osservato nella policitemia vera.<sup>91</sup> Allo stesso modo, il miR-7 è risultato sovraregolato nei nostri campioni di MPM. Una recente indagine ha dimostrato il coinvolgimento di questo miR nella crescita cellulare e nell'apoptosi suggerendone un potenziale ruolo oncogenico.<sup>92</sup> Infatti, in uno screening di circa 200 miRNA, atto a valutare la loro abilità di incidere sulla crescita cellulare e sull'apoptosi, l'inibizione del miR-7 portava ad una diminuzione della proliferazione cellulare incrementando l'apoptosi in cellule HeLa.<sup>92</sup> Al contrario, il miR-497 è stato trovato sottoregolato nei nostri campioni di MPM in accordo con quanto descritto in letteratura per il carcinoma peritoneale primario e il carcinoma polmonare.<sup>78,79</sup> I geni CCND1 e CCND2 sono fra i suoi potenziali bersagli.<sup>79</sup> La proteina CCND2 è reclutata nel ciclo cellulare perché forma un complesso con le proteine CDK4 o CDK6, la cui attività è richiesta per la transizione del ciclo cellulare dalla fase G<sub>1</sub> alla fase S, e ne funge da subunità regolatrice. Inoltre, è coinvolta nell'inattivazione mediata dalla fosforilazione da parte del complesso ciclina D/CDK4 della proteina oncosoppressore pRb.<sup>93</sup> Perciò, la sottoregolazione del miR-497 potrebbe portare alla presenza di alti livelli di CCND2, all'inattivazione di pRb e conseguentemente ad una proliferazione cellulare incontrollata suggerendo un potenziale ruolo oncosoppressivo per tale miR. E' interessante notare che il gene *RB1*, che codifica per pRb, è un bersaglio del miR-106a sovraregolato nel MPM e, conseguentemente, RB1 mRNA/pRb

risulta sottoespresso nei nostri campioni di MPM. Questi miRNA potrebbero essere coinvolti nella stessa via molecolare per regolare l'espressione di pRb e portare ad una progressione incontrollata del MPM.

Nei nostri campioni di MPM, il miR-214 è stato trovato sottoregolato, mentre precedenti studi avevano riportato una sua sovraregolazione nel cancro ovarico. Infatti, un recente studio ha investigato il ruolo del miR-214 nel cancro ovarico e hanno dimostrato che *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) è un bersaglio validato di questo miR.<sup>94</sup> *PTEN* è un gene oncosoppressore ubiquitario che codifica per la proteina PTEN, che è molto importante nella regolazione negativa della via di trasduzione del segnale Akt/PKB. La mancanza di funzionalità di PTEN porta ad un incremento dell'attività di Akt e della via chinasi di mTOR, che può promuovere sia la sopravvivenza cellulare sia la proliferazione attraverso la fosforilazione e l'inattivazione di molti mediatori a valle.<sup>95</sup> Nei nostri campioni di MPM, il miR-214 e il suo bersaglio, l'mRNA di *PTEN*, sono entrambi sottoregolati (**Tabella 2**). Questa discrepanza potrebbe essere spiegata dal fatto che miRNA differenti possiedono la potenzialità di modulare l'espressione di uno stesso bersaglio. Infatti, *PTEN* non è solo il bersaglio del miR-214 ma anche del miR-21, che mostra un fold-change pari a 1.3 quando la sua media d'espressione nei campioni di MPM viene confrontata con la sua media d'espressione nelle HMC nelle nostre analisi.<sup>96</sup> Perciò, i bassi livelli dell'mRNA di *PTEN* nei nostri campioni tumorali, potrebbero essere dovuti ad una sovraespressione di miR-21, come già descritto in altri studi.<sup>96</sup>

Nello studio dei recettori adenosinici (ARs), invece, ci siamo incentrati sul recettore A<sub>3</sub>. Numerosi studi in letteratura hanno attribuito agli ARs un ruolo centrale nello sviluppo tumorale e nelle infiammazioni croniche delle vie aeree.<sup>68,97-99</sup> E' stato anche riportato che alti livelli di adenosina deaminasi sono presenti in numerose neoplasie, come i linfomi e il mesotelioma.<sup>100</sup> Ad oggi, non sono stati riportati dati sull'espressione e/o sulla funzione degli ARs nel MPM. Il nostro studio sul recettore A<sub>3</sub> ha investigato la presenza degli ARs in MMP e HMP. L'mRNA e l'espressione della proteina del A<sub>3</sub>AR erano statisticamente aumentati in MMP in confronto a HMP. In particolare, A<sub>3</sub>AR presentava un aumento di 2.5 volte nella densità in MMP rispetto a HMP. La valutazione della funzionalità del recettore A<sub>3</sub> è stata effettuata mediante l'utilizzo di un modello sperimentale in vitro rappresentato da linee cellulari ottenute da tessuti pleurici sani (HMC) e derivati da mesotelioma (MMC). Non è stata riscontrata nessuna differenza di funzionalità per i recettori A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> in MMC e HMC, mentre il recettore A<sub>3</sub> è risultato sovraespresso in MMC rispetto alle HMC. Esperimenti di binding di saturazione hanno rilevato un significativo aumento della Bmax pari a 3.5 volte in MMC rispetto a HMC, suggerendo che questo recettore possa avere un ruolo importante nel mesotelioma. Questi dati hanno confermato la sovraespressione del recettore A<sub>3</sub> in tessuti o cellule derivate da altre neoplasie precedentemente analizzate.<sup>68</sup> Infatti, studi precedenti sull'espressione del recettore A<sub>3</sub> hanno supportato l'ipotesi che questo recettore sia sovraregolato in differenti tipi tumorali, come il carcinoma della mammella, il cancro al colon e i carcinomi tiroidei.<sup>97,101,102</sup> Nel nostro studio, i saggi sulla produzione di cAMP hanno riportato

un incremento nella potenza di Cl-IB-MECA e MRE3008F20 in MMC rispetto a HMC, suggerendo che la sovraespressione di  $A_3$  possa essere correlata con un'elevata funzionalità del recettore stesso. Poiché l'amianto è la causa principale dell'MPM, abbiamo valutato l'effetto sul recettore  $A_3$  dell'esposizione alle fibre di crocidolite delle HMC. Saggi di binding di saturazione hanno mostrato che il trattamento con l'amianto ha indotto un aumento sulla densità del recettore  $A_3$ , suggerendo per l'amianto un coinvolgimento nella sovraespressione di  $A_3$ . La sovraespressione di questo recettore indotta dall'amianto era più probabilmente dovuta all'abilità dell'amianto stesso di attivare NF- $\kappa$ B, che possiede un sito di legame nel promotore del gene del recettore  $A_3$ , attraverso TNF- $\alpha$ . Gli esperimenti di binding competitivo hanno constatato che l'affinità del  $A_3$ AR non era cambiata in presenza dell'asbesto. La potenza di Cl-IB-MECA e MRE3008F20 nella produzione di cAMP era significativamente aumentata dopo il trattamento con l'amianto mostrando valori simili a quelli ottenuti nei saggi sulle MMC. E' noto che l'attivazione dei  $A_3$ ARs inibisce l'attività dell'adenilato ciclasi, portando così ad una diminuzione dei livelli di cAMP. Quest'ultimo modula il livello e l'attività della protein chinasi A che fosforila elementi delle MAP chinasi e protein chinasi B coinvolte nelle vie di segnalazione di Akt.<sup>103,104</sup> Queste evidenze ci hanno indotto a investigare l'effetto di Cl-IB-MECA sulle proteine che regolano la crescita cellulare in HMC e MMC. E' interessante notare che il livello di Akt era ridotto da Cl-IB-MECA nelle cellule HMC trattate con l'amianto e MMC, suggerendo un ruolo chiave dei  $A_3$ ARs nell'inibizione della fosforilazione di Akt. La sottoregolazione della fosforilazione di Akt da parte del recettore  $A_3$  è stata

anche dimostrata in altre cellule tumorali, come melanoma, colon, prostata e carcinoma epatocellulare.<sup>59,62,105-107</sup> Vista la stretta associazione fra Akt e l'attivazione di NF- $\kappa$ B, abbiamo analizzato il ruolo del recettore A<sub>3</sub> sulla via di traduzione del segnale NF- $\kappa$ B. E' stato dimostrato che l'amianto attiva la via di traduzione del segnale NF- $\kappa$ B, portando alla trascrizione di molteplici geni anti-apoptotici che promuovono lo sviluppo tumorale. In particolare, l'attivazione di NF- $\kappa$ B da parte di TNF- $\alpha$  permette alle cellule mesoteliali, con un danno al DNA provocato dall'esposizione all'amianto, di dividersi anziché morire aumentando così la probabilità di sviluppare il mesotelioma.<sup>108</sup> Noi abbiamo trovato che in HMC, Cl-IB-MECA era in grado di inibire l'attivazione della subunità p65 di NF- $\kappa$ B indotta da TNF- $\alpha$  o dalla crocidolite, suggerendone un ruolo nell'inibizione della via di sopravvivenza e, di conseguenza, nel potenziale blocco dello sviluppo tumorale indotto dall'amianto. E' interessante notare che la subunità p65 era costitutivamente più attivata in MMC rispetto alle HMC ed era sottoregolata da Cl-IB-MECA, suggerendo per questo agonista la capacità di inibire la via di sopravvivenza NF- $\kappa$ B anche in queste cellule tumorali. Le vie di traduzione del segnale NF- $\kappa$ B sono coinvolte nella modulazione di numerosi processi cellulari, inclusi la proliferazione, la sopravvivenza e l'apoptosi. L'effetto inibitorio di Cl-IB-MECA sulla proliferazione cellulare era evidente nelle HMC trattate con l'amianto e TNF- $\alpha$  e in MMC, confermando il coinvolgimento dell'attivazione di A<sub>3</sub> nel blocco dello sviluppo tumorale o della proliferazione. Ad oggi, l'effetto anti-proliferativo di Cl-IB-MECA è stato largamente investigato ottenendo risultati contrastanti dovuti al tipo di tessuti o linee cellulari analizzate. Recentemente, è

stato dimostrato che Thio-CI-IB-MECA è in grado di inibire la proliferazione cellulare in cellule A549 di carcinoma polmonare umano.<sup>65</sup> Un effetto simile degli agonisti del recettore  $A_3$  è stato trovato anche in cellule murine di linfoma NB2-11C, cellule umane di melanoma A375 e carcinoma alla mammella MCF-7.<sup>56,59,105,109</sup> In contrasto con i risultati sopra riportati, in una serie di esperimenti è stato mostrato che CI-IB-MECA è in grado di stimolare la proliferazione cellulare in molte linee cellulari tumorali, tra cui Caco-2, DLD1 e HT-29.<sup>57,110</sup> Molti studi hanno riportato che l'esposizione all'amianto causa apoptosi in cellule mesoteliali ed epiteliali alveolari principalmente attraverso la produzione di specie reattive dell'ossigeno che portano all'attivazione della caspasi-3.<sup>111-113</sup> Nelle nostre condizioni sperimentali, la presenza di TNF- $\alpha$  in HMC era in grado di inibire l'apoptosi indotta dall'amianto e questa inibizione veniva contrastata dall'agonista CI-IB-MECA. In MMC, l'agonista per il recettore  $A_3$  era in grado di aumentare l'attivazione della caspasi-3 che è risultata bloccata dalla presenza dell'antagonista MRE3008F20. E' già noto che gli agonisti del recettore  $A_3$  mediano l'induzione dell'apoptosi in varie cellule tumorali, come cellule di leucemia promielocitica HL-60 e cellule di carcinoma tiroideo papillare NPA.<sup>114,115</sup> I dati riportati in letteratura forniscono un potenziale meccanismo per la trasformazione delle HMC mediata dall'amianto. E' stato riscontrato, infatti, che il trattamento con il TNF- $\alpha$  è in grado di indurre una riduzione della citotossicità dell'amianto mediante l'attivazione di NF-kB. Di conseguenza, NF-kB ha inibito la citotossicità indotta dall'amianto ed aumentato il numero di HMC resistenti alla sua esposizione, e quindi la percentuale di cellule che si potrebbero trasformare.<sup>71</sup> I nostri risultati

indicano che Cl-IB-MECA è in grado di inibire l'effetto anti-apoptotico di TNF- $\alpha$  sulle HMC esposte all'amianto, suggerendo un potenziale uso degli agonisti del recettore A<sub>3</sub> come agenti bloccanti della trasformazione maligna delle cellule HMC esposte all'amianto. Inoltre, Cl-IB-MECA ha mostrato un significativo effetto citotossico sulle MMC, come dimostrato dall'aumentare del livello di LDH rilasciato nel terreno di coltura, ma nessun effetto citotossico sul controllo HMC. Questi risultati sono coerenti con quanto riportato in letteratura dove un agonista del recettore A<sub>3</sub>, CF101, è stato in grado di potenziare l'effetto dell'agente chemioterapico 5-FU in cellule di carcinoma al colon HTC-116.<sup>116</sup> Infine, l'mRNA e l'espressione della proteina del recettore A<sub>3</sub> sono risultati significativamente aumentati in MMC e HMC trattate con amianto rispetto al controllo HMC non trattato. Inoltre, l'agonista Cl-IB-MECA porta una diminuzione della proliferazione ed esercita un effetto pro-apoptotico e citotossico in HMC trattate con amianto e TNF- $\alpha$  e MMC ma non sul controllo HMC. Questi effetti sembrerebbero essere legati alla deregolazione delle vie di segnalazione cellulare Akt/NF-kB contribuendo al processo che porta alla trasformazione maligna delle cellule mesoteliali esposte all'amianto.

In conclusione, i microRNA che sono risultati deregolati, tra cui i miRNA, miR-17-5p, miR-18a, miR-20a e miR-106a, identificati deregolati in MPM anche in altri studi, potrebbero essere proposti come marcatori specifici del MPM. Essi ed il recettore A<sub>3</sub> potrebbero rappresentare potenziali bersagli per nuovi approcci terapeutici atti alla prevenzione dello sviluppo del mesotelioma dopo l'esposizione all'amianto e al trattamento della malattia conclamata. Infatti, l'uso di

oligonucleotidi sintetici contro miRNA specifici (AMO) o la reintroduzione di miRNA assenti potrebbero essere un nuovo approccio terapeutico. Ad oggi, l'uso degli AMO in vivo ha mostrato buoni risultati sia sul piano della realizzazione che su quello dell'efficacia,<sup>117</sup> mentre la reintroduzione del miR-31 porta alla soppressione del ciclo cellulare e inibisce l'espressione di molteplici fattori coinvolti nella progressione del ciclo cellulare.<sup>46</sup> Inoltre, studi preclinici e di Fase I hanno dimostrato che questi agonisti dei recettori A<sub>3</sub> sono sicuri e ben tollerati negli esseri umani e quindi possono essere considerati possibili agenti terapeutici per le malattie tumorali.<sup>68</sup>

Sebbene siano necessari ulteriori studi, l'identificazione di questi miRNA deregolati e lo studio dell'effetto degli agonisti del recettore A<sub>3</sub> nel MPM potrebbero rappresentare un'informazione importante per lo sviluppo di nuove terapie non convenzionali contro questa malattia fatale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Cell Biology* 2003;36:9-16.
2. Yung S, Li FK, Chan TM. Peritoneal Mesothelial cell culture and biology Technological advanced in peritoneal dialysis research. *Perit Dial int* 2006;26(2):162-73.
3. Jaurand MC, Fleury-feith J. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Respirology* 2005;10:2-8.
4. Cunliffe WJ, Sugarbaker PH. Gastrointestinal malignancy: Rationale for adjuvant therapy using early postoperative intraperitoneal chemotherapy. *British J Surg* 1989;76:1082-1090.
5. Liu W, Ernst JD, Broaddus VC. Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:371-8.
6. Britton M. The epidemiology of mesothelioma. *Semin Oncol* 2002;29(1):18:25.
7. Pass HI. Malignant pleural mesothelioma: surgical roles and novel therapies. *Clin Lung Cancer* 2001;3(2):102-17.

8. Peto J, Decarli A, La Vecchia C, et al. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer* 1999;79(3-4):666-72.
9. Orengo AM, Spoletini L, Procopio A, et al. Establishment of four new mesothelioma cell lines: characterization by ultrastructural and immunophenotypic analysis. *Eur Respir J* 1999;13(3):527:34.
10. Neragi-Miandoab S, Gangadharan SP, Sugarbaker DJ. Cardiac sarcoma 14 years after treatment for pleural mesothelioma. *N Engl J Med* 2005;352:1929-1930.
11. Pasello G, Nicotra S, Marulli G. Platinum-based doublet chemotherapy in pre-treated malignant pleural mesothelioma (MPM) patients: A mono-institutional experience. *Lung cancer* 2011; epub of print.
12. Allen TC. Recognition of Histopathologic Patterns of Diffuse Malignant Mesothelioma in Differential Diagnosis of Pleural Biopsies. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129(11):1415-20.
13. Sugarbaker DJ, Garcia JP, Richards WG, et al. Extrapleural pneumonectomy in the multimodality therapy of malignant pleural mesothelioma. Results in 120 consecutive patients. *Ann Surg* 1996;224(3):288-94.
14. Dixon K, Koprass E. Genetic alteration and DNA repair in human carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2004;14(6):441-8.
15. Wang NS, Jaurand MC, Magne L, et al. The interactions between asbestos fibres and metaphase chromosomes of rat pleural mesothelial cells in culture. A scanning and transmission electron microscopic study. *Am J Pathol* 1987;126:343-349.

16. Leard LE, and Broaddus VC. Mesothelial cell proliferation and apoptosis. *Respirology* 2004;9:292-299.
17. DeShazo RD, Nordberg J, Baser Y, et al. Analysis of depressed cell-mediated immunity in asbestos workers. *J Allergy Clin Immunol* 1983;71(4):418-24.
18. Tulinka J, Jahnova E, Dusinka M, et al. Immunomodulatory effects of mineral fibers in occupationally workers. *Mutat Res* 2004;533(1-2):111-24.
19. Olofsson K and Mark J. Specificity of asbestos-induced chromosomal aberrations in short-term cultured human mesothelial cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1989;41: 33–39.
20. Oshimura M, Hesterberg TW, Barrett JC. An early nonrandom karyotypic change in immortal Syrian hamster cell lines transformed by asbestos: trisomy of chromosome 11. *Cancer Genet Cytogenet* 1986;22:225–237.
21. Betsholtz C, Johnsson A, Heldin CH, et al. cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor-A chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 1986;320:695–699.
22. Flejter WL, Li FP, Antman KH, et al. Recurring loss involving chromosomes 1,3,and 22 in malignant mesothelioma: possible sites of tumor suppressor genes. *Genes Chromosomes Cancer* 1989;1(2):148-54.
23. Walker C, Everitt J, Barrett JC. Possible cellular and molecular mechanisms for asbestos carcinogenicity. *Am J Ind Med* 1992;21: 253–273.
24. Lecomte C, Andujar P, Reiner A, et al. Similar tumor suppressor gene alteration profiles in asbestos-induced murine and human mesothelioma. *Cell cycle* 2005;12:1862-9.

25. Sartore-Bianchi A, Gasparri F, Galvani A, et al. Bortezomib inhibits nuclear factor-kappaB dependent survival and has potent in vivo activity in mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2007;13:5942-51.
26. Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, et al. TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10397-402.
27. Bertino P, Marconi A, Palumbo L, et al. Erionite and asbestos differently cause transformation of human mesothelial cells. *Int J Cancer* 2007;121:12-20.
28. Cacciotti P, Barbone D, Porta C, et al. SV40-dependent AKT activity drives mesothelial cell transformation after asbestos exposure. *Cancer Res* 2005;65:5256-62.
29. Cacciotti P., Stizzi L., Vianale G., Iaccheri L., Libener R., Porta C., Tognon M., Gaudino G., Mutti L.. The presence of Simian-Virus 40 Sequences in Mesothelioma and Mesothelial Cell Is Associated with High Levels of Vascular Endothelial Growth Factor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002, 26:189-193.
30. Carbone M, Rizzo P, Grimley PM, et al. Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nat Med* 1997;3(8):908-912.
31. Tomek S, Manegold C. Chemotherapy for malignant pleural mesothelioma: past results and recent developments. *Lung cancer* 2004;1:S103-19.
32. Di Leva G, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2006;78:180 – 189.

33. Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:563–568.
34. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-297.
35. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, et al. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* 2005;123:631-40.
36. Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the argonautes. *Nat Chem Biol* 2007;3:36-43.
37. Rivas FV, Tolia NH, Song JJ et al. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:340-349.
38. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004;305:1437-41.
39. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2257–2261.
40. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008;13:272–286.

41. Ota A, Tagawa H, Karnan S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31–q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 2004;64:3087–3095.
42. Gee GV, Koestler DC, Christensen BC, et al. Downregulated microRNAs in the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer*. In press.
43. Benjamin H, Lebanony D, Rosenwald S, et al. A diagnostic assay based on microRNA expression accurately identifies malignant pleural mesothelioma. *J Mol Diagn* 2010;12:771–779.
44. Guo Y, Chen Z, Zhang L, et al. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:26 – 33.
45. Pass HI, Goparaju C, Ivanov S, et al. hsa-miR-29c\* is linked to the prognosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res* 2010;70:1916–1924.
46. Ivanov SV, Goparaju CM, Lopez P, et al. Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. *J Biol Chem* 2010;285:22809 –22817.
47. Villareal F, Zimmermann S, Makhsudova L, et al. Modulation of cardiac remodeling by adenosine: in vitro and in vivo effects. *Mol Cell Biochem* 2003;251:17-26.
48. Sebastião AM, Ribeiro JA. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *TIPS* 2000;21:341-346.
49. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol* 1998;50:413-492.

50. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, et al. Nomenclature and classification of purinoreceptors. *Pharmacol Rev* 1994;46:143-156.
51. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, et al. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:527-552.
52. Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of the accessory proteins. *Cell Signa* 2002;14:99-108.
53. Zhou QY, Li C, Olah ME, et al. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7432-7436.
54. Salvatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, et al. Molecular cloning and characterization of the human A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:10365-10369.
55. Monitto CL, Levitt RC, Disilvestre D, et al. Localization of the A<sub>3</sub> adenosine receptor gene (ADOA3) to human chromosome 1p. *Genomics* 1995;26:637-638.
56. Merighi S, Benini A, Mirandola P, et al. A<sub>3</sub> adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells. *J Biol Chem* 2005;280:19516-19526.
57. Gessi S, Merighi S, Varani K, et al. Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A(3) adenosine subtype. *J Cell Physiol* 2007; 211: 826-836.

58. Gessi S, Merighi S, Varani K, et al. The A<sub>3</sub> adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacol Ther* 2008;117:123-140.
59. Fishman P, Bar-Yehuda S, Madi L, et al. A<sub>3</sub> adenosine receptor as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2002;13:437-443.
60. Fishman P, Bar-Yehuda S, Ohana G, et al. An agonist to the A<sub>3</sub> adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 beta and NF-kappa B. *Oncogene* 2004;23:2465-2471.
61. Merighi S, Mirandola P, Varani K, et al. A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther* 2003;100:31-48.
62. Bar-Yehuda S, Stemmer SM, Madi L, et al. The A<sub>3</sub> adenosine receptor agonist CF102 induces apoptosis of hepatocellular carcinoma via de-regulation of the Wnt and NF-kappaB signal transduction pathways. *Int J Oncol* 2008;33:287-295.
63. Fishman P, Bar-Yehuda S, Barer F, Madi L, Multani AS, Pathak S. The A<sub>3</sub> adenosine receptor as a new target for cancer therapy and chemoprotection. *Exp Cell Res* 2001;269:230-236.
64. Panjehpour M, Karami-Tehrani F. Adenosine modulates cell growth in the human breast cancer cells via adenosine receptors. *Oncol Res* 2007;16:575-585.
65. Kim SJ, Min HY, Chung HJ, et al. Inhibition of cell proliferation through cell cycle arrest and apoptosis by thio-Cl-IB-MECA, a novel A<sub>3</sub> adenosine receptor agonist, in human lung cancer cells. *Cancer Lett* 2008;264:309-315.
66. Morello S, Sorrentino R, Porta A, et al. Cl-IB-MECA enhances TRAIL-induced apoptosis via the modulation of NF-kappaB signalling pathway in thyroid cancer cells. *J Cell Physiol* 2009;221:378-386.

67. Jajoo S, Mukherjea D, Watabe K, et al. Adenosine A<sub>3</sub> receptor suppresses prostate cancer metastasis by inhibiting NADPH oxidase activity. *Neoplasia* 2009;11:1132-1145.
68. Fishman P, Bar-Yehuda S, Synowitz M, et al. Adenosine receptor and cancer. *Handb Exp Pharmacol* 2009;193:399-441.
69. Varani K, Massara A, Vincenzi F, et al. Normalization of A<sub>2A</sub> and A<sub>3</sub> adenosine receptor up-regulation in rheumatoid arthritis patients by treatment with anti-tumor necrosis factor alpha but not methotrexate. *Arthritis Rheum* 2009;60:2880-2891.
70. Varani K, Caramori G, Vincenzi F, et al.. Alteration of adenosine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:398-406.
71. Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, et al. TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:10397-10402.
72. Panzarini E, Tenuzzo B, Palazzo F, et al. Apoptosis induction and mitochondria alteration in human HeLa tumour cells by photoproducts of Rose Bengal acetate. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 2006;83:39-47.
73. Varani K, Merighi S, Gessi S, et al. [<sup>3</sup>H]-MRE 3008-F20: a novel antagonist radioligand for the pharmacological and biochemical characterization of human A<sub>3</sub> adenosine receptors. *Mol Pharmacol* 2000;57:968-975.

74. Varani K, Laghi-Pasini F, Camurri A, et al. Changes of peripheral A<sub>2A</sub> adenosine receptors in chronic heart failure and cardiac transplantation. *FASEB J* 2003;17:280-282.
75. Varani K, Gessi S, Merighi S, et al. Pharmacological characterization of novel adenosine ligands in recombinant and native human A<sub>2B</sub> receptors. *Biochem Pharmacol* 2005;70: 1601-1612.
76. Zampetaki A, Zeng L, Margariti A, et al. Histone deacetylase 3 is critical in endothelial survival and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Circulation* 2010;121:132-142.
77. Varani K, Caramori G, Vincenzi F, et al. Oxidative/nitrosative stress selectively altered A<sub>2B</sub> adenosine receptors in chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J* 2010; 24:1192-1204.
78. Crawford M, Batte K, Yu L, et al. MicroRNA 133B targets pro-survival molecules MCL-1 and BCL2L2 in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388:483– 489.
79. Flavin RJ, Smyth PC, Laios A, et al. Potentially important microRNA cluster on chromosome 17p13.1 in primary peritoneal carcinoma. *Mod Pathol* 2009;22:197–205.
80. Papadopoulos GL, Reczko M, Simossis VA, et al. The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D155–D158.
81. Mendell JT. miRiad roles for the miR-17–92 cluster in development and disease. *Cell* 2008;133:217–222.

82. Busacca S, Germano S, De Cecco L, et al. MicroRNA signature of malignant mesothelioma with potential diagnostic and prognostic implications. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;42:312–319.
83. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005;435:839–843.
84. Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, et al. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem* 2007;282:2135–2143.
85. Woods K, Thomson JM, Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem* 2007;282:2130 – 2134.
86. Ivanovska I, Ball AS, Diaz RL, et al. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 2008;28:2167–2174.
87. Koralov SB, Muljo SA, Galler GR, et al. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell* 2008;132:860–874.
88. Egle A, Harris AW, Bouillet P, et al. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6164–6169.
89. Dews M, Homayouni A, Yu D, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 2006;38:1060–1065.
90. Guled M, Lahti L, Lindholm PM, et al. CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma—a miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48:615–623.

91. Bruchova H, Merkerova M, Prchal JT. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica* 2008;93:1009 –1016.
92. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, et al. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1290 –1297.
93. Bartkova J, Gron B, Dabelsteen E, et al. Cell-cycle regulatory proteins in human wound healing. *Arch Oral Biol* 2003;48:125–132.
94. Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* 2008;68:425– 433.
95. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280:1614 –1617.
96. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647– 658.
97. Madi L, Ochaion A, Rath-Wolfson L, et al. The A<sub>3</sub> adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: potential target for tumor growth inhibition. *Clin Cancer Res* 2004;10:4472-4479.
98. Caruso M, Varani K, Tringali G, et al. Adenosine and adenosine receptors: their contribution to airway inflammation and therapeutic potential in asthma. *Curr Med Chem* 2009;16:3875-3885.

99. Polosa R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2002;20:488-496.
100. Yildirim H, Metintas M, Ak G, et al. Increased pleural fluid adenosine deaminase levels in patients with malignant pleural effusions: a potential predictor of talc pleurodesis outcome. *Lung* 2007;185:349-354.
101. Gessi S, Cattabriga E, Avitabile A, et al. Elevated expression of A<sub>3</sub> adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:5895-5901.
102. Morello S, Petrella A, Festa M, et al. Cl-IB-MECA inhibits human thyroid cancer cell proliferation independently of A<sub>3</sub> adenosine receptor activation. *Cancer Biol Ther* 2008;7:278-284.
103. Seino S, Shibasaki T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* 2005;85:1303-1342.
104. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-663.
105. Fishman P, Bar-Yehuda S, Ardon E, et al. Targeting the A<sub>3</sub> adenosine receptor for cancer therapy: inhibition of prostate carcinoma cell growth by A<sub>3</sub>AR agonist. *Anticancer Res* 2003;23:2077-2083.
106. Merimsky O, Madi C, Bar-Yehuda S, et al. Modulation of the A<sub>3</sub> adenosine receptor by low agonist concentration induced anti-tumor and myelostimulation effects. *Drug Dev Res* 2003; 58: 386-389.

107. Ohana G, Bar-Yehuda S, Arich A, et al. Inhibition of primary colon carcinoma growth and liver metastasis by the A<sub>3</sub> adenosine receptor agonist CF101. *Br J Cancer* 2003;89:1552-1558.
108. Bolognesi C, Martini F, Tognon M, et al. A molecular epidemiology case control study on pleural malignant mesothelioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1741-1746.
109. Lu J, Pierron A, Ravid K. An adenosine analogue, IB-MECA, down-regulates estrogen receptor alpha and suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2003; 63:6413-6423.
110. Abbracchio MP, Camurri A, Ceruti S, et al. The A<sub>3</sub> adenosine receptor induces cytoskeleton rearrangement in human astrocytoma cells via a specific action on Rho proteins. *Ann N Y Acad Sci* 2001;939:63-73.
111. Kamp DW, Panduri V, Weitzman SA, et al. Asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis: role of mitochondrial dysfunction caused by iron-derived free radicals. *Mol Cell Biochem* 2002;234-235:153-160.
112. Panduri V, Surapureddi S, Soberanes S, et al. P53 mediates amosite asbestos-induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:443-452.
113. Baldys A, Pande P, Mosleh T, et al. Apoptosis induced by crocidolite asbestos in human lung epithelial cells involves inactivation of Akt and MAPK pathways. *Apoptosis* 2007;12:433-447.

114. Lee EJ, Min HY, Chung HJ, et al. A novel adenosine analog, thio-Cl-IB-MECA, induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 2005;15;70:918-924.
115. Kim SG, Ravi G, Hoffmann C, et al. p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, Cl-IB-MECA. *Biochem Pharmacol* 2002;63:871-880.
116. Bar-Yehuda S, Madi L, Silberman D, et al. CF101, an agonist to the A<sub>3</sub> adenosine receptor, enhances the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in a colon carcinoma murine model. *Neoplasia* 2005;7:85-90.
117. Fabani MM, Abreu-Goodger C, Williams D, et al. Efficient inhibition of miR-155 function in vivo by peptide nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 2010;38:4466–4475.

## LISTA DELLE PUBBLICAZIONI

1. Veronica Balatti, **Stefania Maniero**, Manuela Ferracin, Angelo Veronese, Massimo Negrini, Gloria Ferrocci, Fernanda Martini, Mauro G. Tognon. MicroRNAs Dysregulation in Human Malignant Pleural Mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology*, 2011;in press.
2. Katia Varani, **Stefania Maniero**, Fabrizio Vincenti, Martina Targa, Angela Stefanelli, Pio Maniscalco, Fernanda Martini, Mauro Tognon, Pier Andrea Borea. A<sub>3</sub> receptors are overexpressed in pleura from patients with mesothelioma and reduce cell growth via Akt/Nuclear Factor-kB pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:522-530.