

# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE**

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO**

Sede convenzionata

Dipartimento Univ. Clinico di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo

**I.R.C.C.S. BURLO GAROFOLO**

## **XXII CICLO del Dottorato di Ricerca in**

Medicina materno-infantile, pediatria dello sviluppo e dell'educazione,  
perinatologia

(Ssd: Area 06-Scienze Mediche MED/38-pediatria generale e specialistica)

## **Effetto di composti isoprenoidi sul fenotipo infiammatorio del difetto di mevalonato chinasi (MKD)**

Dottorando:

**Dott.ssa Annalisa Marcuzzi**

Coordinatore:

**Chiar.mo Prof. Alessandro Ventura  
(Università di Trieste)**

Tutore e Relatore:

**Dott. Alberto Tommasini  
(Università di Trieste)**

Anno Accademico 2008-2009

*Al mio marito Lorenzo e  
alla nostra adorata Lucilla*

# INDICE

INDICE.....	1
1 INTRODUZIONE .....	3
1.1 Le sindromi autoinfiammatorie.....	4
1.2 Il difetto di mevalonato chinasi (MKD) .....	5
1.3 Il gene MVK e la mevalonato chinasi.....	7
1.3.1 Le mutazioni in MVK e la MKD .....	8
1.4 La patogenesi della MKD.....	11
1.5 Inibitori enzimatici della via del mevalonato.....	14
1.6 Gli isoprenoidi naturali (NEIs).....	18
2 SCOPO DELLA TESI .....	23
3 MATERIALI E METODI.....	26
3.1 Reagenti chimici .....	27
3.2 Esperimenti in vitro .....	29
3.2.1 Isolamento e coltura di monociti umani .....	29
3.2.2 Pazienti.....	29
3.2.3 Colture cellulari.....	31
3.2.3.1 Protocollo sperimentale <i>in vitro</i> .....	31
3.2.4 Valutazione della produzione di monossido di azoto (NO) .....	32
3.2.5 Dosaggio delle citochine IL1 $\beta$ , IL 18, e TNF $\alpha$ .....	32
3.2.6 Test di citotossicità .....	32
3.2.7 Valutazione del colesterolo intracellulare .....	33
3.3 Esperimenti in vivo.....	33
3.3.1 Animali.....	33
3.3.1.1 Protocollo sperimentale <i>in vivo</i> .....	33
3.3.2 Dosaggio dell' amiloide A sierica (SAA) .....	34
3.3.3 Determinazione del numero di cellule nell'essudato peritoneale (PEC).....	34
3.3.4 Valutazione morfologica dell'infiammazione a carico di organi linfoidi secondari (milza) .....	34
3.3.5 Dosaggio del colesterolo sierico nel topo .....	35
3.3.6 Misura della temperatura corporea nel topo .....	35
3.4 Analisi statistica .....	36
4 RISULTATI e DISCUSSIONE.....	37
PARTE I.....	37
Modello malattia .....	38
4.1 RAW 264.7 .....	38
4.2 Monociti .....	41
4.3 Topi Balb/c.....	41
4.4 Inibitori della via del mevalonato.....	43
4.5 Discussione parte I .....	45
PARTE II.....	47
Intervento farmacologico .....	47
4.6 RAW 264.7 .....	48
4.6.1 Isoprenoidi naturali (NEIs) .....	48
4.6.2 Inibitori della farnesil-transferasi (FTIs) .....	49
4.6.3 Combinazione NEIs e FTIs.....	50
4.7.1 NEIs.....	53
4.7.2 FTIs .....	53
4.8 Topi Balb/c.....	54
4.8.1 NEIs.....	54

4.8.2	FTIS.....	57
4.9	NEIs ed FTIs risultano efficaci nel ridurre l'infiammazione in monociti di pazienti affetti da MKD .....	57
4.10	Discussione parte II .....	59
5	CONCLUSIONI.....	61
6	PROSPETTIVE FUTURE .....	64
7	BIBLIOGRAFIA.....	66

# 1 INTRODUZIONE

## **1.1 Le sindromi autoinfiammatorie**

Le sindromi auto-infiammatorie sono patologie causate da una disfunzione primaria del sistema immunitario innato, caratterizzate da episodi infiammatori ricorrenti in assenza di sottostanti condizioni infettive o autoimmuni.

Il database Infevers creato nel 2002 raccoglie le varie patologie in base alla sintomatologia clinica e al gene malattia, e ha tentato una classificazione, non ancora esaustiva, suddividendole in:

- febbri ereditarie periodiche (HPF)
- sindromi reumatologiche
- sindromi piogeniche
- sindromi granulomatose
- problemi riproduttivi
- angioedema ereditario
- suscettibilità alle infezioni

Tutte queste sindromi sono di natura genetica (monogenica o multifattoriale) e i rispettivi geni malattia codificano per proteine appartenenti alle vie di segnalazione intracellulari dell'infiammazione e/o dell'apoptosi (NF- $\kappa$ B, apoptosi, citochine pro-infiammatorie). La scoperta dei geni malattia in queste rare patologie ha permesso la descrizione di nuove vie del sistema immunitario innato, e dei meccanismi molecolari e cellulari che regolano l'infezione, lo stress endogeno, l'auto-infiammazione.

Al momento, nonostante l'occasionale ricorrenza familiare, per la sindrome PFAPA, la sindrome di Schnitzler, l'artrite infiammatoria sistemica a esordio giovanile (SOJIA), il Morbo di Still dell'adulto (AOSD), e il Morbo di Bechet non sono ancora stati identificati i geni malattia.

Le manifestazioni cliniche delle diverse sindromi auto-infiammatorie possono essere in parte sovrapponibili, rendendo problematica la diagnosi. In questo senso lo screening molecolare dei geni malattia ha migliorato molto la qualità di vita dei pazienti, fornendo una diagnosi precoce e accurata, ed un trattamento appropriato. (Milhavet et al., 2008)

L'argomento di questa tesi riguarda la patogenesi e il trattamento di una di queste febbri periodiche, il difetto di mevalonato chinasi (MKD).

## **1.2 Il difetto di mevalonato chinasi (MKD)**

La sindrome da Iper IgD (HIDS) è una sindrome auto-infiammatoria autosomica recessiva descritta per la prima volta nel 1984 (van der Meer et al., 1984). Nel 1999 due lavori diversi ne descrivono il gene responsabile, *MVK* (*mevalonato kinasi*), (Drenth et al., 1999; Houten et al., 1999) e identificano questa sindrome e la già nota mevalonico aciduria (MA) come gli estremi, rispettivamente, lieve e grave di uno spettro fenotipico, il deficit di mevalonato chinasi (MKD). La HIDS è una patologia rara, ma relativamente frequente nel Nord Europa e soprattutto in Olanda (Simon et al., 2003). Il registro internazionale della sindrome (<http://www.hids.net>) conta circa 200 pazienti in tutto il mondo. Mutazioni nel gene *MVK* che codifica per la mevalonato chinasi (MK), il secondo enzima della biosintesi del colesterolo, comportano una diminuzione dell'attività catalitica dell'enzima e/o una riduzione dei suoi livelli proteici. L'attività enzimatica residua (AER) della MK è associata alla gravità della malattia (Drenth et al., 1999; Houten et al., 2003).

Nella HIDS il difetto a carico della MK comporta solo una parziale compromissione della sua attività (AER=1-20%). Gli episodi febbrili ricorrono ogni 3-6 settimane e durano 3-5 giorni; quasi sempre sono associati a linfo-adenopatia cervicale e spesso a dolori addominali importanti con vomito e/o diarrea. Possono inoltre presentarsi altri sintomi come mal di testa, afte (Figura 1a), eritemi cutanei (Figura 1b-c), mialgia e artralgia. (Frenkel et al., 2001; Haas and Hoffmann, 2006).

Quando l'attività della MK è molto ridotta o assente (AER<1%) (MA) i pazienti presentano anche ritardo nello sviluppo, caratteri dismorfici, artrite, degenerazione retinica, atassia, atrofia cerebellare e ritardo psicomotorio (Hoffmann et al., 1993; Balgobind et al., 2005). Questa differenza nell'AER si riflette anche nei livelli di acido mevalonico nel plasma e nelle urine dei pazienti: sempre elevati nei pazienti con MA e elevati limitatamente alle crisi infiammatorie nei casi di HIDS (Haas and

Hoffmann, 2006). La HIDS ha un esordio precoce (entro il primo anno di vita) nel 90% dei casi – talvolta in seguito al primo richiamo vaccinico, a traumi lievi o a stress - ma gli episodi infiammatori tendono a divenire meno frequenti e meno gravi con la crescita. Nei periodi intercritici i pazienti stanno bene e crescono normalmente. Gli esami di laboratorio mostrano leucocitosi, indici di flogosi aumentati, e, spesso, elevati livelli di IgD, anche se quest'ultimo aspetto – da cui per altro la sindrome prende il nome – sembra costituire un epifenomeno della malattia.(Drenth et al., 1999)



**Figura 1.** Segni clinici caratteristici della HIDS: (a) afte orali; (b-c) eritema cutaneo (tratta da (Drenth et al., 2001).

La diagnosi di MKD si basa essenzialmente su segni clinici e laboratoristici caratterizzanti ed è confermata dall'analisi biochimica (dosaggio dell'acido mevalonico nelle urine; dosaggio dell'attività enzimatica) e/o genetica (analisi di sequenza del gene *MVK*).

La terapia della HIDS è problematica e la risposta ai diversi trattamenti (glucocorticoidi, farmaci antinfiammatori non steroidei, talidomide e agenti immunosoppressivi) può essere soggettiva o addirittura nulla (de Dios

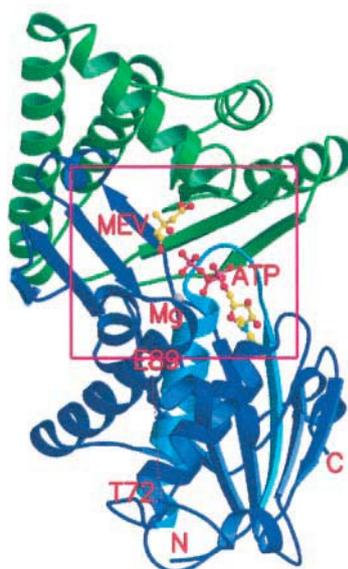
Garcia-Diaz and Alvarez-Blanco, 2001; Drenth et al., 2001). I farmaci biologici sembrano promettenti, soprattutto IL-1Ra/Anakinra (Bodar et al., 2005). La prognosi a lungo termine della HIDS in generale è buona: l'amiloidosi, una delle maggiori complicanze di malattie infiammatorie croniche, si presenta in meno del 3% dei pazienti. Purtroppo questi trattamenti non hanno effetto sulle manifestazioni neurologiche tipiche della MA che condizionano una cattiva prognosi della malattia.

### 1.3 Il gene *MVK* e la mevalonato chinasi

*MVK* è un gene di 1952 kb composto da 11 esoni e mappa sul cromosoma 12 (12q24) (Feingold et al., 1993).

Il gene codifica per la MK, un enzima critico nella biosintesi del colesterolo (nota anche come via del mevalonato), che produce steroli e isoprenoidi non steroli a partire dall'acetato.

L'enzima è formato da due subunità identiche di 42 kDa (Figura 2) e si localizza nel citosol e nei perossisomi. La MK (ATP:mevalonato 5-fosfotransferase, EC 2.7.1.36) catalizza il trasferimento del gruppo fosfato dall'ATP all'ossidrile del C5 dell'acido mevalonico per formare il mevalonato-5-fosfato, un intermedio chiave della via metabolica.



**Figura 2.** Rappresentazioni della struttura tridimensionale della MK. Le due subunità sono indicate in verde e blu ed il sito di legame per l'ATP è in azzurro. Sono presenti anche l'ATP e il mevalonato.

La MK è una proteina altamente conservata negli eucarioti, e il confronto con le sequenze aminoacidiche dell'enzima nelle diverse specie ha permesso di identificare 4 domini strutturali per cui sono ipotizzate e, in alcuni casi, dimostrate le rispettive funzioni:

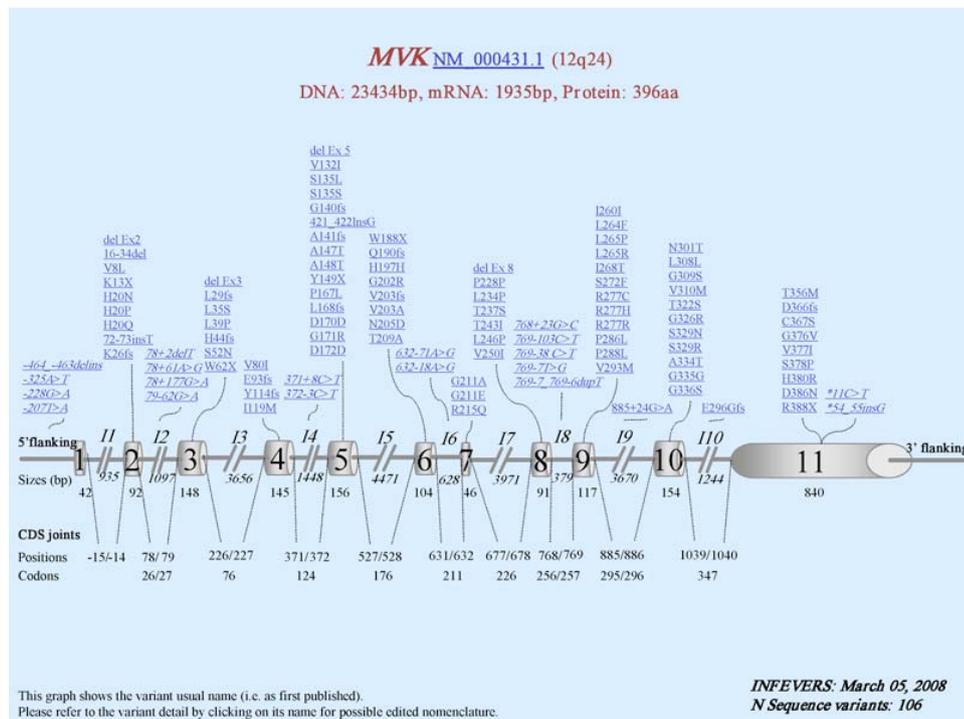
- dominio 1: sequenza leader per i perossisomi/stabilizzazione del legame con ATP/stabilizzazione struttura III o IV della proteina
- dominio 2: sito di legame per l'ATP
- dominio 3: sito catalitico
- dominio 4: stabilizzazione del legame con il mevalonato

(Houten et al., 2000).

L'attività enzimatica di MK è regolata principalmente a livello trascrizionale, infatti il promotore di *MVK* contiene un elemento regolato dagli steroli (SRE), in grado di indurre la trascrizione genica in seguito a deficit di questi prodotti della biosintesi del colesterolo. È stato dimostrato che in seguito a trattamento con composti che inibiscono questa via biosintetica (ad esempio le statine) l'attività dell'enzima aumenta di 3-6 volte. (Houten et al., 2000). La MK - insieme ai più noti HMG-CoA sintetasi e HMG-CoA reduttasi (HMGR) – è coinvolto nella regolazione della biosintesi del colesterolo e dei composti non steroli, e rappresenta un punto di controllo secondario. Il farnesil pirofosfato (FPP), il geranilpirofosfato (GPP) e il geranilgeranilpirofosfato (GGPP), prodotti a valle di MK, sono in grado di inibire MK (Houten et al., 2000).

### **1.3.1 Le mutazioni in *MVK* e la MKD**

Le mutazioni di *MVK* fino ad oggi associate alla MKD sono 106 e sono presenti in quasi tutti gli esoni senza una zona di "hot spot" (Figura 3) La sostituzione c.1129 G>A (V377I) (1129G>A) è presente nella maggioranza dei pazienti HIDS, specialmente nel Nord-Europa (>80%) dove è stato dimostrato un'effetto fondatore da cui si sarebbe diffusa nel resto dell'Europa e in USA (Simon et al., 2003). La V377I è stata trovata in omozigosi in pochi soggetti, di solito è in eterozigosi combinata con una seconda mutazione associata al fenotipo HIDS e/o MA.



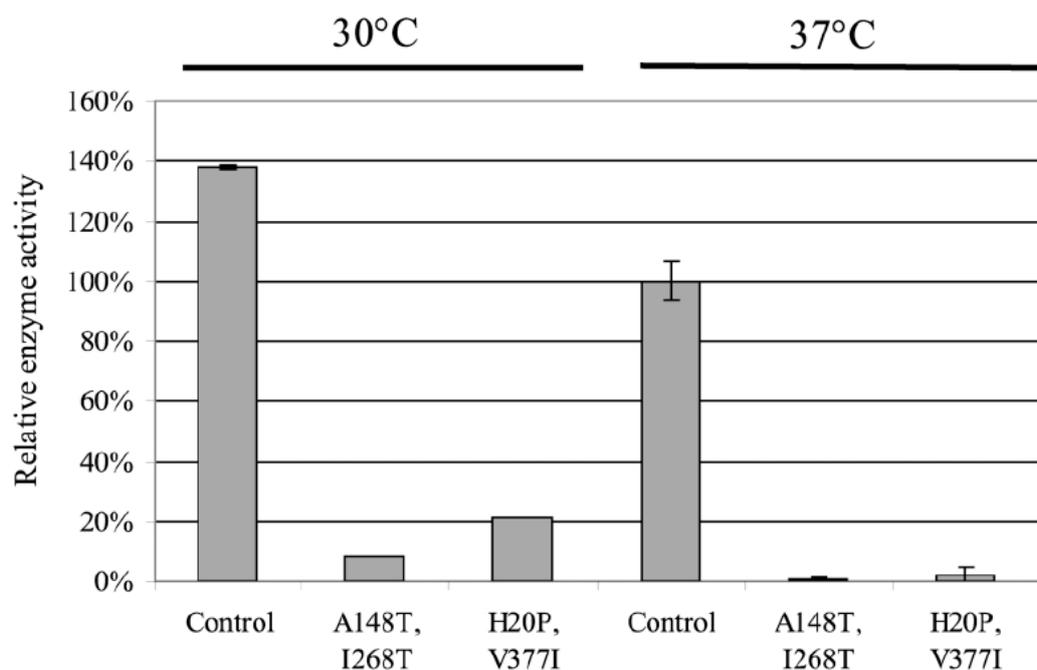
**Figura 3.** Mutazioni di *MVK* registrate nel database Infevers

La presenza di omozigoti V377I/V377I è sottorappresentata se si considera l'unico dato a disposizione sulla frequenza degli eterozigoti nella popolazione Olandese (1:153), che indicherebbe un'incidenza prevedibile di 1-6 nuovi nati all'anno, omozigoti per questa mutazione. Tali omozigoti potrebbero avere un fenotipo lieve o non avere alcuna sintomatologia ed essere quindi sottostimati.

Quasi tutte le sostituzioni aminoacidiche caratterizzate in MK (H20P, T243I, L264F, L265P, I268T, V310M, A334T) comportano una bassa attività enzimatica in studi di espressione batterica, o ridotti livelli proteici in fibroblasti isolati da pazienti (Houten et al., 2000).

La sostituzione A334T è associata ad una presentazione lieve della MA, perchè il residuo è coinvolto nello stabilizzare il legame con il mevalonato piuttosto che risiedere nel sito catalitico di MK. Un simile effetto è stato ipotizzato anche per T243I, anch'essa associata ad un fenotipo più benigno. H20P e I268T rendono la proteina instabile e quindi maggiormente degradabile, l'una perchè influenzerebbe la struttura secondaria della proteina, l'altra perchè impedirebbe la corretta dimerizzazione delle 2 subunità proteiche.

L'effetto della mutazione V377I è invece ancora dibattuto in quanto *in vitro* non dimostra di ridurre drasticamente l'attività enzimatica di MK, anche se riduce di molto i livelli proteici osservabili in fibroblasti isolati dai pazienti HIDS, che comunque presentano livelli normali di mRNA. Si ipotizza quindi che tale sostituzione non influenzi l'attività catalitica ma la maturazione della proteina nell'enzima attivo, cioè la proteina V377I non avrebbe un folding corretto e sarebbe rapidamente degradata. Un' effetto interessante della V377I è la sensibilità all'aumento di temperatura: l'AER di MK-V377I diminuisce in modo direttamente proporzionale all'incremento della temperatura. Questo effetto si osserva in modo più discreto anche nella proteina WT, perciò si suppone possa rappresentare un controllo negativo sulla funzionalità fisiologica dell'enzima (Figura 4). (Houten et al., 2002).



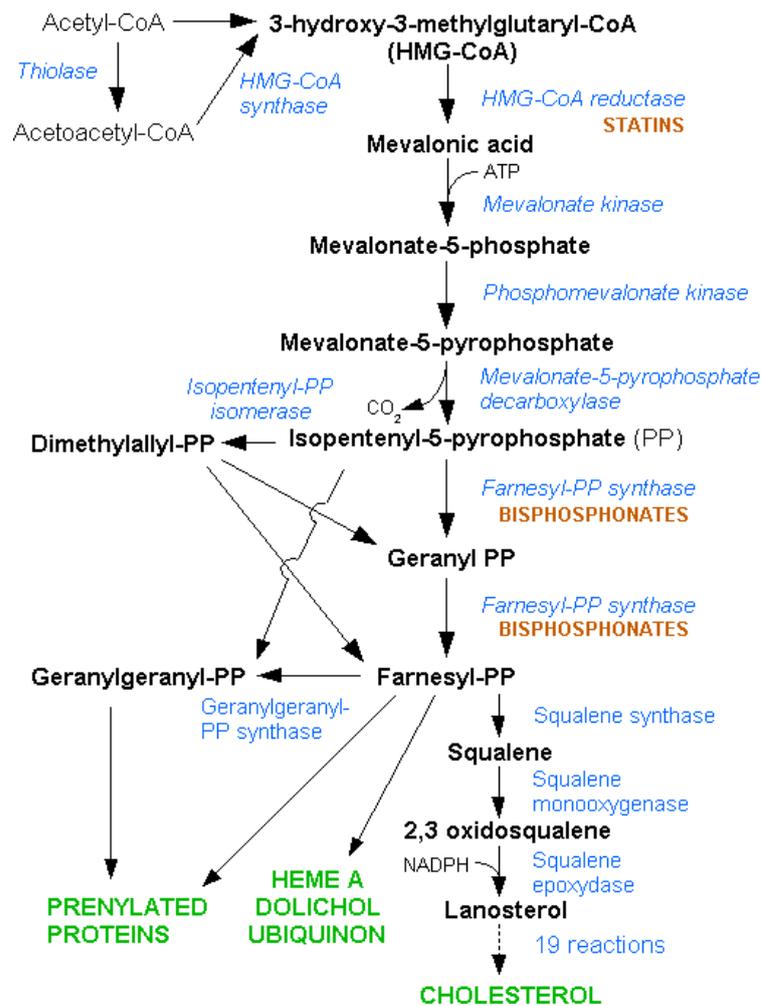
**Figura 4.** Attività enzimatica relativa di MK in fibroblasti isolati da un soggetto di controllo, e da due pazienti HIDS con diverse mutazioni (A18T/I268T e H20P/V377I). L'attività specifica di MK nei fibroblasti di controllo cresciuti a 37°C è stata usata come 100%. Tratta da (Houten et al., 2002).

## **1.4 La patogenesi della MKD**

Non è ancora del tutto chiaro come il difetto metabolico associato alle mutazioni del gene *MVK* porti al fenotipo infiammatorio periodico, osservato nei pazienti MKD.

Come precedentemente accennato, MK è il secondo enzima della biosintesi del colesterolo (Figura 5). Il colesterolo è il più importante prodotto finale della via ed è utilizzato prevalentemente come componente delle membrane cellulari e come precursore degli acidi biliari e degli ormoni steroidei. Inoltre la via biosintetica produce una serie di composti non steroidei, come:

- il gruppo isopentenilico del t-RNA
- la catena laterale di ubiquinone-10 e eme-A, importanti per il trasporto elettronico mitocondriale
- il dolicolo, essenziale per la glicosilazione N-linked
- gruppi farnesilici e geranyl-geranilici utilizzati per la modificazione lipidica posttraduzionale nota come prenilazione di proteine coinvolte nella segnalazione intracellulare come la superfamiglia RAS. La prenilazione assicura che tali proteine siano localizzate in modo corretto e ne regola l'attività. (Houten et al., 2000; Houten et al., 2003).



**Figura 5.** Schema della via del mevalonato. È cerchiata la mevalonato chinasi. Sono indicati gli inibitori disponibili degli enzimi della via.

È stato dimostrato innanzitutto che la diminuzione dei livelli di isoprenoidi intermedi, piuttosto che l'accumulo del mevalonato a monte di MK induce un'elevata secrezione della citochina pro-infiammatoria IL-1 $\beta$  (Mandey et al., 2006). Questo dato è supportato da precedenti osservazioni che indicavano come gli isoprenoidi siano molto richiesti nel processo infiammatorio. Questa ipotesi è in linea con i dati clinici e biologici secondo i quali bloccando farmacologicamente la via del mevalonato tramite statine (inibitrici dell'HMGCoA reductasi) o aminobifosfonati (inibitori della Farnesil pirofosfato sintasi), si possono provocare reazioni infiammatorie in vitro e in vivo (Endo, 1993; Frenkel, 2002; Hewitt, 2005; Takagi, 2005; Ward, 2005; Kiener, 2001).

Inoltre, secondo Frenkel et al (2002) l'infiammazione in vitro si potrebbe revertire con l'aggiunta di alcuni isoprenoidi come il geranylgeraniolo e il farnesil pirofosfato.

Nei pazienti MKD la ridotta attività di MK potrebbe comportare una diminuzione di composti isoprenoidi, soprattutto quelli ad elevato turnover:

- ubiquinone-10 (il cui livello risulta abbassato nel plasma dei pazienti MA (Hubner et al., 1993);
- le proteine prenilate RAS, che sono coinvolte in molti processi cellulari come la traduzione del segnale, l'organizzazione del citoscheletro (Mandey et al., 2006; Kuijk et al., 2008a);
- le proteine prenilate guanylate-binding sintetizzate in risposta a IFN- $\gamma$  e LPS (Nantais et al., 1996) in qualche modo associate ad un'attivazione dell'infiammazione.

Il deficit di uno o più di questi prodotti finali potrebbe attivare il fenomeno infiammatorio.

Recentemente è stato dimostrato che il blocco della via del mevalonato e la diminuzione di isoprenoidi induce elevata secrezione di IL-1 $\beta$  mediante l'auto-processamento della caspasi-1. Meccanismo che spiegherebbe anche l'aumento della produzione di IL-18 (altro substrato della caspasi-1) e forse della IL-33, che potrebbe avere un ruolo in alcuni aspetti fenotipici quali l'eritema cutaneo (Mandey et al., 2006; Kuijk et al., 2008a).

L'aumento di attività di HMGR osservata soprattutto nei leucociti di pazienti MA costituisce non l'evento patogenetico, ma piuttosto un feedback positivo indotto dalla carenza dei prodotti a valle dell'enzima e spiegherebbe in parte l'aumento di mevalonato plasmatico riscontrato nei pazienti MKD.

Infine la ciclicità degli episodi infiammatori tipici della sindrome sarebbe da attribuire all'aumento di sensibilità alla temperatura della MK mutata. In seguito a sforzo fisico o ad un' infezione (anche banale), situazioni in cui aumenta la temperatura corporea, calerebbe l'AER di MK mutata, con aumento del blocco metabolico, diminuzione degli isoprenoidi e conseguente stimolazione dell'infiammazione. Parallelamente, la diminuzione degli isoprenoidi attiverrebbe l'attività della HMGR portando all'aumento del mevalonato, che da una parte "forzerebbe" il blocco della

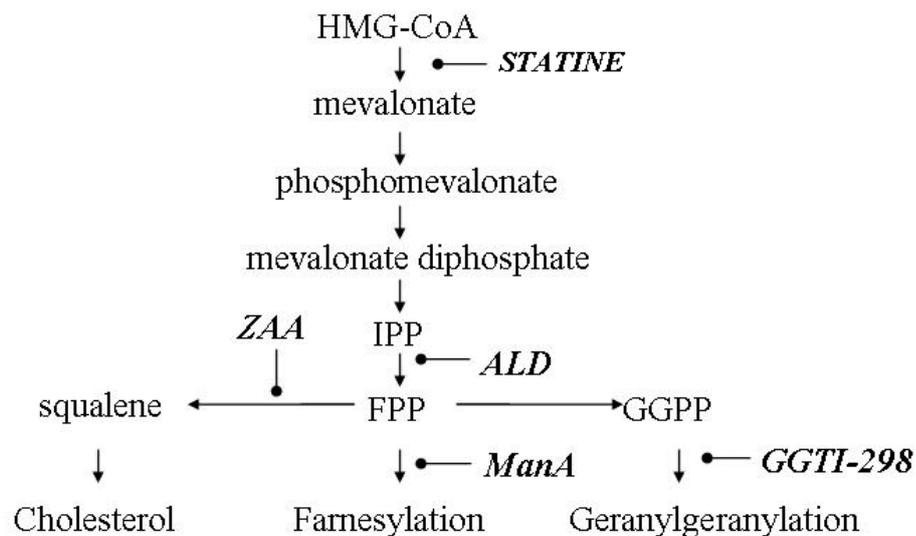
MK ripristinando i livelli dei composti a valle, dall'altra si accumulerebbe nel plasma e nelle urine (Houten et al., 2002).

### 1.5 Inibitori enzimatici della via del mevalonato

La via del mevalonato può essere inibita in diversi punti mediante l'utilizzo dei seguenti

composti (Figura 6):

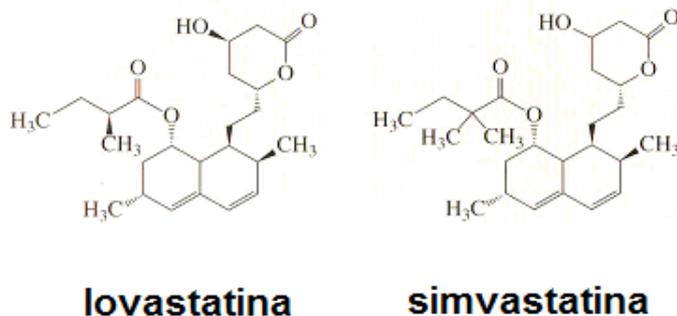
- a) statine: inibitori della HMG CoA Reduttasi
- b) aminobifosfonati: inibitori della Farnesil pirofosfato sintasi (FPPS)
- c) inibitori della prenilazione: inibitore della farnesiltransferasi (FTI) e della geranylgeranyltransferasi I (GGTI-I) e II (GGTI-II)
- d) inibitori della SS



**Figura 6.** In figura sono riportati i principali punti di inibizione della via del mevalonato in corrispondenza dei quali sono stati inseriti gli inibitori utilizzati in questo lavoro di tesi.

a) Le statine sono probabilmente i farmaci più noti in quanto vengono utilizzate nella medicina clinica per controllare i livelli di colesterolo, soprattutto in soggetti affetti da ipercolesterolemia familiare. Non è ancora chiara la loro azione in termini di infiammazione in quanto ci sono evidenze discordanti che attribuiscono alle statine tanto un'azione pro-

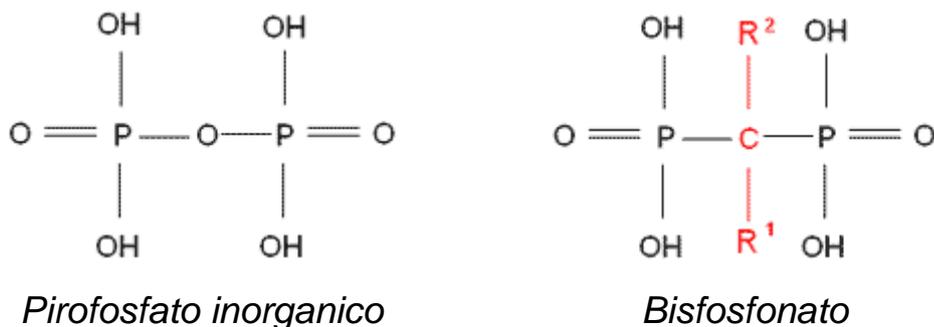
infiammatoria quanto anti-infiammatoria. (Merx et al., 2005; Coward et al., 2006)



**Figura 7:** statine

In figura 7 vengono riportate le strutture chimiche di due delle principali statine in commercio che dal punto di vista farmacocinetico sono dei profarmaci, per distinguerle da altre statine come atorvasatina e pravastatina che invece sono farmaci attivi.

**b)** I bifosfonati (BP), composti analoghi del pirofosfato inorganico (PPi), sono inibitori del riassorbimento osseo, in quanto hanno un effetto inibitorio sulla formazione, aggregazione e dissoluzione dei cristalli di calcio fosfato (Figura 8). Nella pratica clinica essi sono impiegati nel trattamento e nella prevenzione dell'osteoporosi e di altre malattie caratterizzate da un aumentato rimodellamento osseo, nonché nel trattamento di metastasi ossee associate a diverse neoplasie.



**Figura 8.** Confronto tra la struttura del pirofosfato inorganico e del bifosfonato.

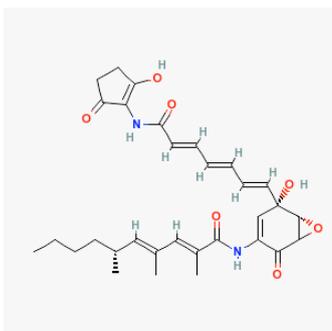
Del gruppo dei BP fanno parte diverse molecole che si differenziano tra loro per i diversi tipi di catene laterali legate all'atomo di carbonio. Tra queste gli aminobifosfonati (N-BP) sono di particolare interesse in quanto interferiscono con il metabolismo del mevalonato, inibendo l'enzima FPPS (van Beek et al., 1999). L'inibizione è di tipo competitivo e avviene mediante il legame del N-BP al sito catalitico dell'enzima. L' N-BP possiede un gruppo difosfato e agisce come analogo degli intermedi isoprenoidi pirofosfati coinvolti nella reazione (IPP e GPP).

L'azione degli N-BP porta ad un accumulo di mevalonato e alla riduzione dei composti a valle della FPPS.

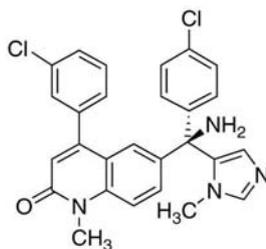
Studi recenti hanno evidenziato effetti discordanti a carico delle cellule infiammatorie: i BP

risultano anti-infiammatori o pro-infiammatori a seconda del contesto sperimentale (Adami et al., 1987; Corrado and Cantatore, 2005). I diversi effetti potrebbero essere legati alla loro diversa capacità di essere metabolizzati dalle cellule (Makkonen et al., 1999).

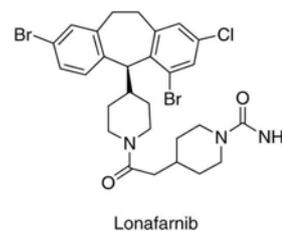
**c)** Gli inibitori della prenilazione agiscono in modo specifico sugli enzimi farnesil transferasi (FT) e geranylgeranyltransferasi (GGT), che catalizzano il trasferimento dei gruppi isoprenoidi "attivati" (FPP o GGPP) su catene polipeptidiche. Gli FTI agiscono secondo diversi meccanismi di inibizione: alcuni di essi, come la manumicina A (ManA), un composto naturale derivato da *Streptomyces*, appartengono alla classe dei derivati isoprenoidi, in questo caso analoghi del FPP, in quanto possiedono un gruppo farnesilico idrofobico e porzioni cariche negativamente come il pirofosfato (Figura 9); altri, come il Tipifarnib (R115777, Zarnestra™), sviluppato come agente antifungino, sono molecole di sintesi competitive per il sito di legame del motivo aminoacidico CAAX e appartengono alla classe dei peptidomimetici (Figura 10) od altri ancora come il Lonafarnib (SCH66336, Sarasar™) un inibitore reversibile dell'enzima il quale a differenza del Tipifarnib non è coordinato dallo ione  $Zn^{2+}$  (Figura 11).



**Figura 9.**  
Struttura della Manumicina A



**Figura 10.**  
Struttura del Tipifarnib



**Figura 11**  
struttura del Lonafarnib

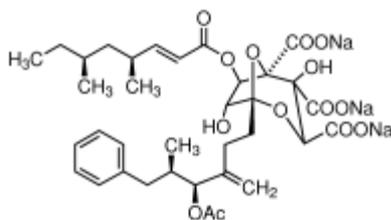
Gli inibitori delle GGT agiscono similmente agli FTI come competitori. La scoperta che alcune proteine geranilgeranilate sono coinvolte in processi patologici, come il cancro, l'infiammazione e le infezioni virali, ha determinato un crescente interesse per lo studio delle GGT come possibili bersagli terapeutici. Sono stati descritti diversi inibitori peptidomimetici della GGT-I, quali il GGTI-298 (utilizzato in questo lavoro di tesi) e il GGTI-2154, entrambi derivati dell'acido aminobenzoico (Peterson et al., 2006). Recentemente è stato osservato che alcuni inibitori appartenenti alla classe dei FTI sono in grado di inibire anche la GGT-II, detta Rab-GGT poiché specifica per le proteine Rab (Lackner et al., 2005).

Le proteine della famiglia RAS devono essere prenilate per poter svolgere correttamente la loro funzione e quindi sono i principali bersagli di tali inibitori. In particolare gli FTI sono in grado di inibire Ras, i GGTI-I inibiscono Rho e Rac, mentre i GGTI-II agiscono su Rab (Zhang and Casey, 1996; Lackner et al., 2005).

Recenti studi sugli inibitori delle preniltransferasi hanno illustrato il loro potenziale impiego come agenti terapeutici antiparassitari, antifungini, antivirali e come antitumorali, proprio per il blocco funzionale esercitato su onco-proteine come le RAS (Lane and Beese, 2006).

**d)** Esiste, infine, una classe di inibitori della SS, il primo enzima della via dedicato esclusivamente alla sintesi degli steroli, in particolare del colesterolo. Uno di questi è l'acido zaragozico (ZAA) (Figura 12), un composto di origine fungina; l'inibizione è di tipo competitivo, poiché lo

ZAA mima il substrato enzimatico FPP e l'intermedio presqualene-PP che normalmente si forma durante la reazione che porta alla sintesi dello squalene (Bergstrom et al., 1993).

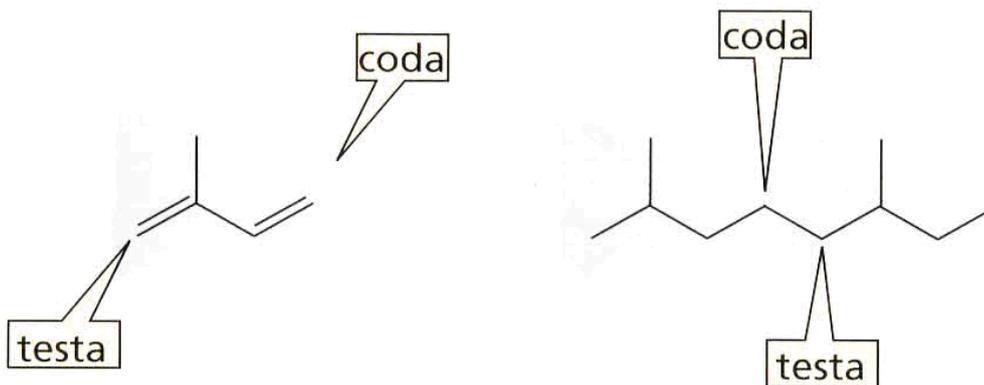


**Figura 12.** Struttura dell'acido zaragozico

Considerando la sua capacità di bloccare la sintesi del colesterolo in modelli animali, quali il topo e il ratto, senza intaccare la sintesi degli altri isoprenoidi, lo ZAA è stato proposto come potenziale farmaco per il trattamento dell'ipercolesterolemia (Bergstrom et al., 1993); tuttavia, non ci sono stati sviluppi nello studio di questo composto, né è mai stato testato nell'uomo (Schneiders et al., 2006).

## **1.6 Gli isoprenoidi naturali (NEIs)**

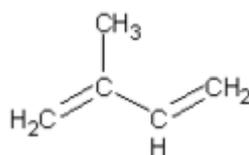
L'isoprenoide (chiamato anche unità isoprenica) è il nome comune per il 2-metil-1,3-butadiene, un composto che contiene cinque atomi di carbonio, caratterizzato da un'estremità ramificata chiamata "testa" ed un'estremità non ramificata chiamata "coda". Le singole unità isopreniche si uniscono testa-coda a formare i terpeni (Figura 13).



due unità isopreniche unite tra loro testa-coda

**Figura 13.** L'immagine illustra l'unione di due unità isopreniche a formare una molecola terpenica.

I terpeni sono una classe di lipidi; possono essere idrocarburi o contenere ossigeno ed essere alcoli, aldeidi o chetoni. Queste biomolecole possono essere lineari, ciclici o entrambi. In particolare si ricorda la regola isoprenica di Wallach del 1887 secondo cui appartengono alla classe dei terpeni i composti di struttura formata da unità C5 ramificate denominate isopreniche.



**Figura 14.** Formula chimica dell'isoprene o 2-metil-1.3butadiene

Sono noti più di 20.000 terpeni. Prodotti da molte piante, soprattutto conifere e da alcuni insetti, i terpeni sono i componenti principali delle resine e degli oli essenziali delle piante, miscele di sostanze che conferiscono a ogni fiore o pianta un caratteristico odore o aroma. Rappresentano anche i precursori biosintetici degli steroidi e del colesterolo. Molti aromi usati nei cibi o nei profumi sono derivati da terpeni o terpenoidi naturali. Molte fragranze e molti aromi trovati nelle piante sono monoterpeni o sesquiterpeni e sono noti come oli essenziali.

La via del mevalonato è caratterizzata da intermedi di tipo isoprenoide e inoltre sintetizza alcuni dei terpeni biologici importanti come lo squalene, precursore del colesterolo, e il  $\beta$ - carotene, precursore della vitamina A.

Nella tabella 1, sono indicati i principali tipi di terpeni classificati in base al numero di atomi di carbonio:

Nome	Udl	N°C	Composti	Caratteristiche
Monoterpeni	2	10	Geraniolo Mentolo	Sono i principali costituenti degli olii essenziali, estratti dai vegetali o parti di essi. Vengono utilizzati nell'industria alimentare e dei profumi per gli aromi particolari
Sesquiterpeni	3	15	Farnesolo	Si trova nell'olio essenziale di rosa e ciclamino usato nell'industria dei profumi
Diterpeni	4	20	Geranilgeraniolo	È stato riscontrato per la prima volta nell'olio di lino ma sembra essere presente in tutti gli olii vegetali
Sesteterpeni	5	25	Scalarina	Presente i funghi e organismi marini
Triterpeni	6	30	Squalene	nell'olio di fegato degli squali (elasmobranchi) ma anche nei vegetali come crusca di riso, germe di grano e olive. Viene generalmente utilizzato come adiuvante nei vaccini

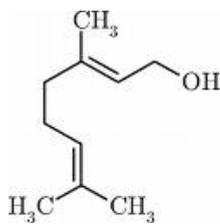
**Tabella 1.** Nomi e caratteristiche dei più importanti terpeni

Udl: unità di soprene

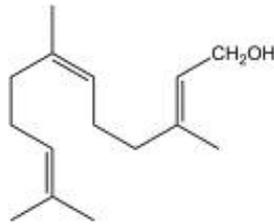
N°C: numeri di atomi di carbonio

In questa tesi sono stati presi in considerazione quattro composti isoprenoidi: il geraniolo (GOH), il farnesolo (FOH), e il geranilgeraniolo (GGOH) ed il mentolo (MOH)(Figura 15).

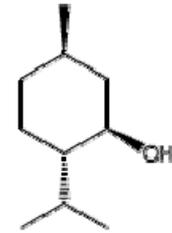
Il GOH è un alcol terpenico estratto da alcuni tipi di pianta (geranio, arancio, verbena, mirto, melissa) e comunemente utilizzato in profumeria e nell'industria alimentare. Il geraniolo, relativamente abbondante in natura, è facilmente solubile in alcol ed in etere, dotato di buona stabilità chimica e di liposolubilità, aspetto che lo rende ideale per un buon assorbimento attraverso diverse vie di somministrazione. Alcuni autori hanno già descritto l'impiego del geraniolo ad uso topico (Muruyama et al., 2005) o come coadiuvante di farmaci anti-tumorali (Ong et al., 2006).



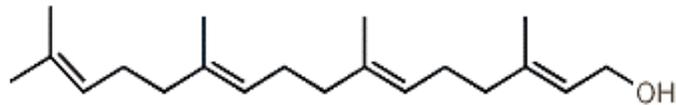
**Geraniolo**



**Farnesolo**



**Mentolo**



**Geranilgeraniolo**

**Figura 15.** Formula chimica di alcuni isoprenoidi naturali.

Il MOH è anch'esso un monoterpene, il principio attivo contenuto nell'olio essenziale di menta. Fortemente aromatico ed amaro, il mentolo è particolarmente noto per le sue proprietà antisettiche, spasmolitiche ed anestetiche locali. Le inalazioni dei vapori sviluppatasi ponendo qualche goccia di soluzione alcolica di mentolo in acqua bollente, sono famose per la capacità di alleviare i disturbi bronchiali e le congestioni nasali; il mentolo gode infatti di proprietà espettoranti e disinfettanti. Preso per via orale, il mentolo viene utilizzato anche come antifermentativo, carminativo (facilita l'eliminazione dei gas gastro-intestinali), antisettico, colagogo (facilita l'escrezione ed il deflusso della bile), rinfrescante e spasmolitico (riduce la motilità intestinale, risultando utile in presenza di coliche del tratto gastrointestinale superiore, del tratto biliare e nelle irritazioni del colon, come la sindrome dell'intestino irritabile. (Chang and Lu, 2009; Merat et al., 2009)

Il FOH è un sesquiterpene con un gruppo alcolico comunemente utilizzato in profumeria. È un liquido incolore e insolubile in acqua ma miscibile con gli oli. E' presente in molti oli essenziali e viene estratto da diversi tipi di piante (citronella, neroli, rosa, muschio). E' il derivato alcolico del FPP, un importante composto di partenza per la sintesi di numerosi composti organici.(Ong et al., 2006)

Il GGOH è un diterpene solubile in solventi organici come alcol e acetone. Alcuni di questi composti sono già utilizzati come coadiuvanti nelle terapie anti-tumorali, e anti-metastatiche (de Moura Espindola et al., 2005; Ong et al., 2006).

## **2 SCOPO DELLA TESI**

La MKD è una patologia rara e tutt'oggi senza una terapia eziologica specifica e efficace. La risposta ai diversi trattamenti (glucocorticoidi, farmaci antinfiammatori non steroidei, talidomide e agenti immunosoppressivi, farmaci biologici) si è dimostrata essere soggettiva (de Dios Garcia-Diaz and Alvarez-Blanco, 2001; Drenth et al., 2001; Bodar et al., 2005). La qualità della vita dei pazienti è condizionata dalla frequenza degli episodi infiammatori e dalla severità delle manifestazioni cliniche, soprattutto per quelle neurologiche tipiche delle forme più gravi.

In questa tesi sono state valutate differenti strategie farmacologiche atte a migliorare il fenotipo auto-infiammatorio tipico della MKD.

I dati pubblicati recentemente da alcuni gruppi (Frenkel et al., 2002; Mandey et al., 2006) sulla carenza di GGPP come evento biochimico centrale nella patogenesi della MKD, ci hanno portato a ipotizzare che agendo proprio sui livelli di questo intermedio della via del mevalonato fosse possibile ridurre la conseguente attivazione specifica della risposta infiammatoria. In particolare due approcci terapeutici sono stati considerati a questo scopo:

- la somministrazione di composti isoprenoidi esogeni che inserendosi a valle del difetto genetico a carico della MK potessero ristabilire il flusso di metaboliti della pathway;
- l'utilizzo di inibitori della farnesil-transferasi che bloccando il trasferimento di FPP alle proteine bersaglio (farnesilazione) potessero rendere il FPP disponibile alla sintesi di GGPP.

Il lavoro di ricerca è stato quindi così suddiviso:

**PARTE I.** Mettere a punto un modello malattia *in vitro* ed *in vivo* che riproduca il fenotipo infiammatorio caratteristico della MKD;

**PARTE II.** Identificare e valutare possibili interventi farmacologici efficaci in tali modelli, in particolare:

- Isoprenoidi naturali (NEIs)
- Inibitori della farnesil transferasi (FTIs)

### **3 MATERIALI E METODI**

### **3.1 Reagenti chimici**

#### *Aminobifosfonati*

- Amino-1 idrossiutildene-1.1-acido bifosfonico (alendronato, ALD) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- 3-Amino-1-idrossi-1-fosfono- propil acido fosforico (pamidronato, PAM). (Mayne Pharma S.r.l. Italia).

#### *Statine*

- Lovastatina (Lova,)
- Simvastatina (Simva)

Gli aminobifosfonati e le statine sono stati disciolti in soluzione salina sterile e portati a pH 7.0 con NaOH o HCl.

*Inibitori della prenilazione: inibitore della farnesiltransferasi (FTI) e della geranilgeraniltransferasi (GGTI)*

#### *FTI*

- Manumicina A (Man A) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Tipifarnib (Tip, R115777, Zarnestra™)
- Lonafarnib (Lon, SCH66336, Sarasar™)

Gli FTI sono disciolti in DMSO (dimetil sulfossido) e poi diluiti nel terreno di coltura cellulare (*in vitro*) o in soluzione salina (*in vivo*) in modo che la concentrazione di DMSO non sia superiore allo 0.1% .

#### *GGTI*

- GGTI-268: inibitore della GGT-I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). GGTI-298 è risospeso in EtOH 25% e poi nel terreno di coltura in modo tale che la concentrazione finale di etanolo non sia superiore allo 0.1% (vol/vol).

#### *Inibitori della SS*

- Acido zaragozico(ZAA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

#### *Isoprenoidi naturali*

- Geraniolo (GOH) (Euphar Group S.r.l., Piacenza, Italia).
- Farnesolo (FOH) (Euphar Group S.r.l., Piacenza, Italia).

- Geranilgeraniolo (GGOH) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Mentolo (MOH) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

GOH e FOH sono stati disciolti nel terreno di coltura cellulare (*in vitro*) o in soluzione salina (*in vivo*). GGOH e MOH sono risospesi in EtOH 25% e poi nel terreno di coltura (*in vitro*) o in soluzione salina (*in vivo*) in modo tale che la concentrazione finale di etanolo non sia superiore allo 0.1% (vol/vol).

#### *Stimoli pro-infiammatori*

- LPS (Lipopolisaccaride da Escherichia coli 055:B5, Sigma Aldrich)
- MDP (N-Acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutammina idrato, Sigma Aldrich)

Entrambi sono stati disciolti nel terreno di coltura cellulare (*in vitro*) ed in soluzione salina (*in vivo*).

#### *Materiale colture cellulari*

- Dulbecco's modified Eagle's medium 21885 (DMEM), (Euroclone, Italia)
- RPMI 1640 (Euroclone, Italia)
- FBS (Fetal Bovine Serum, Euroclone, Pero, MI, Italia)
- Lympholyte-H (Cell Separation Media, Cedarlane Laboratories Limited, Canada)

#### *Reattivi test di screening*

- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2.5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA)
- Reattivo di Griess (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA).
- Nitrito di Sodio (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA)

#### *Plasticheria (Corning Costar, USA)*

## **3.2 Esperimenti in vitro**

### **3.2.1 Isolamento e coltura di monociti umani**

Monociti umani sono stati isolati da sangue periferico di donatore sano o di paziente mediante (1) centrifugazione su Ficoll-Paque Plus (*Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Svezia*) e (2) successiva selezione per adesione.

(1) Dopo la centrifugazione a 500xg per 30 minuti, monociti e linfociti si vengono a trovare in una banda all'interfaccia tra plasma e Ficoll-Paque Plus. La banda viene prelevata e lavata in soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) mediante centrifugazione 150xg per 10'. Le cellule vengono, quindi, piastrate alla concentrazione di  $2 \cdot 10^5$  monociti/ml in piastre da 96 pozzetti in RPMI-1640 +FBS 10% (*Fetal Bovine Serum, Euroclone, Pero, MI, Italy*). La stima dei monociti presenti nella sospensione cellulare si basa sul rapporto 30:70 di monociti e linfociti.

(2) Dopo 90' di incubazione in termostato a 37°C in 5% CO<sub>2</sub>-95% di aria e ad umidità controllata (Sanyo Analitica De Mori, Italia), la maggior parte dei linfociti, che non sono in grado di aderire alla plastica, vengono eliminati mediante tre cicli di lavaggi con soluzione fisiologica. Le cellule aderenti, arricchite in monociti, vengono quindi, coltivati in RPMI-1640 +FBS 10%.

### **3.2.2 Pazienti**

Il sangue periferico di tre pazienti (P1, P2, P3) affetti da MKD, e seguiti presso la Clinica

Pediatria dell'Ospedale Infantile Burlo Garofolo di Trieste, è stato utilizzati in questo lavoro di tesi. I pazienti sono stati reclutati per lo studio dopo avere ottenuto un "consenso scritto informato". Le caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei pazienti sono riassunte nella tabella 2.

	PAZIENTI		
	P1	P2	P3
<b>Sesso/Età (anni)</b>	F/18	M/2	M/8
<b>Esordio (mesi)</b>	6	9	6
<b>Diagnosi (anni)</b>	9	2	4
<b>CARATTERISTICHE DELL'ACCESSO FEBBRILE</b>			
Durata accesso febbrile (giorni)	4-5	4-7	3-4
Brividi all'esordio dell'accesso febbrile	•	•	
Numero di accessi febbrili/anno	2-3	5-6	3
<b>SINTOMI ASSOCIATI ALL'EPISODIO FEBBRILE</b>			
<b>Sintomi muco-cutanei</b>			
Afte orali	•	•	
Rash cutaneo	•	•	•
<b>Sintomi riferibili al sistema linfatico</b>			
Ipertrofia tonsillare	•	•	•
Linfoadenite cervicale	•	•	•
Linfadenite mesenterica	•	•	•
Linfoadenite altro			
Splenomegalia	•	•	
Epatomegalia		•	
<b>Sintomi correlati all'apparato gastro-intestinale</b>			
Dolori addominali	•	•	•
Vomito	•	•	
Diarrea		•	•
<b>Sintomi correlati all'apparato locomotore</b>			
Artralgia	•		•
Artriti			
<b>Altri sintomi</b>			
Cefalea			
Malessere/ Astenia	•	•	
Febbre alle vaccinazioni	•		
<b>ESAMI DI LABORATORIO</b>			
<b>Dosaggio IgD</b>	positivo	negativo	positivo
<b>Mutazioni in MVK</b>	c.16-34del/ V377I	S135L/ V377I	I268T/ V377I

**Tabella 2.** Principali caratteristiche cliniche dei pazienti MKD. F sesso femminile; M sesso maschile; • presente.

### 3.2.3 Colture cellulari

La linea cellulare Raw 264.7 (Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) cresce in adesione in terreno DMEM addizionato con penicillina 100 U/ml e streptomicina 100 µg/ml (*Euroclone, Italia*), L- glutammina 2mM (*Euroclone, Italia*) e 10% FBS.

Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's modified Eagle's medium 21885 (DMEM) addizionato del 10% di siero fetale bovino, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina. Sono state mantenute in termostato a 37 °C in atmosfera umidificata contenente il 95% di aria e il 5% di CO<sub>2</sub> (Sanyo, Analitica De Mori, Italia). Arrivate a confluenza le cellule sono state staccate con cell scraper e centrifugate a 1200 rpm per 7 minuti. Il surnatante ottenuto è stato rimosso e il pellet risospeso in terreno DMEM.

#### 3.2.3.1 Protocollo sperimentale *in vitro*

Gli esperimenti sono stati condotti in piastre da 96 pozzetti (Corning Costar) utilizzando  $2 \times 10^5$  cellule/pozzetto. Le cellule all'80% di confluenza sono state contate e distribuite in piastra il giorno stesso dell'esperimento. Dopo 5 ore di incubazione in DMEM+FBS10% il medium di coltura viene cambiato e vengono aggiunti l'aminobifosfonato e/o la statina. Le cellule vengono così incubate per 20 ore (Toyra et al., 2003) ed in alcuni esperimenti sono stati aggiunti i NEIs. Unica eccezione a tale protocollo è stata impostata nei monociti dove le cellule sono preincubate per 1 ora con gli FTIs e poi si procede con l'aggiunta di ALD o Lova.(Xue et al., 2006). Al termine delle 20 ore, il terreno viene, quindi, sostituito con DMEM con siero e, ove necessario viene aggiunto anche l' LPS 10 µg/ml per ulteriori 24 ore. Al termine dell'incubazione i surnatanti delle cellule sono stati raccolti, centrifugati a 13000 rpm per 5 minuti e conservati a -80 °C per il dosaggio dell'ossido nitrico (NO) e citochine. Le cellule vengono invece lisate per il dosaggio del colesterolo intracellulare.

### **3.2.4 Valutazione della produzione di monossido di azoto (NO)**

La produzione di NO è stata misurata seguendo il metodo pubblicato da Migliorini et al 1991. In breve, 100 µl di surnatante vengono trasferiti in micropiastre (Costar) da 96 pozzetti per la lettura spettrofotometrica. Ai surnatanti vengono aggiunti 100µl/pozzetto di reattivo di Griess. Dopo 10 minuti a temperatura ambiente viene misurato l'assorbimento del composto colorato formato dall'interazione NO<sub>2</sub>-/reattivo di Griess con un lettore di micropiastre a 550 nm (Titertek Multiskan Plus Microplate Reader, Labsystem). Per costruire la curva standard viene utilizzato NaNO<sub>2</sub> diluito nel terreno di coltura in una scala di concentrazioni tra 10 e 100 µM.

### **3.2.5 Dosaggio delle citochine IL1 $\beta$ , IL 18, e TNF $\alpha$**

La produzione di IL1 $\beta$ , IL 18 e TNF $\alpha$  è stata valutata nei surnatanti delle colture cellulari con il saggio ELISA, utilizzando i seguenti kits:

- Human IL 18 ELISA [Bender MedSystem (Burligame, USA)];
- Human IL1 $\beta$  ELISA [Endogen (Cambridge, MA, USA) ]
- Human TNF $\alpha$  ELISA [Endogen (Cambridge, MA, USA) ]

Secondo le istruzioni indicate dalla ditta.

### **3.2.6 Test di citotossicità**

La citotossicità dei composti utilizzati è stata valutata sulla base della capacità delle cellule vive, e quindi metabolicamente attive, di ridurre il composto MTT. Il saggio MTT è stato eseguito seguendo il metodo di Mosmann T (Mosmann, 1983). Ciascun esperimento è stato eseguito per 5 replicati di pozzetti per ciascun composto che è stato testato.

### **3.2.7 Valutazione del colesterolo intracellulare**

La misura del colesterolo intracellulare libero è stato determinato utilizzando con il kit Amplex red cholesterol assay kit (Molecular Probes, Invitrogen), secondo le istruzioni indicate dalla ditta (Frey and De Maio, 2007; Iftakhar et al., 2009). I dati del colesterolo sono espressi come concentrazione del colesterolo ( $\mu\text{M}$ ).

## **3.3 Esperimenti *in vivo***

### **3.3.1 Animali**

Sono stati utilizzati topi maschi BALB/c (Harlan, Udine, Italia) di 6-8 settimane e del peso di 25-30 g. I topi sono stati tenuti in gabbie standard con un ciclo di 12 ore di luce/buio alla temperatura di 21°C e in condizioni ambientali libere da patogeni.

Tutti gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti in accordo con le leggi Italiane (ministero della Salute, registrazione n° 62/2000-B 6 ottobre 2000) e seguendo le linee-guida dello Stabulario dell'Università di Trieste.

#### **3.3.1.1 Protocollo sperimentale *in vivo***

I topi sono stati suddivisi in gruppi e i composti utilizzati sono stati somministrati per via intraperitoneale in un volume di 10  $\mu\text{l/g}$  di peso corporeo: l'ALD (13 mg/kg) al primo giorno di esperimento; l'MDP (100  $\mu\text{g/kg}$ ) al quarto giorno. Due ore dopo la somministrazione dell'MDP è stato eseguito il prelievo di sangue in seguito al sacrificio per decerebrazione. Gli isoprenoidi GOH (250 mg/kg), FOH (250-500 mg/kg), GGOH (250 mg/kg) e sono stati somministrati intraperitoneo in:

- a) una singola dose/esperimento insieme all' ALD (giorno 0);
- b) due dosi/esperimento (giorni 0/1, -1/0, -1/1); c) tre dosi/esperimento (-1/0/1).

Allo stesso modo, in una serie di esperimenti, ai topi è stata somministrata intraperitoneo la Man A (7.5 mg/kg) al giorno 0 (insieme all'ALD).

### **3.3.2 Dosaggio dell' amiloide A sierica (SAA)**

Il siero è stato recuperato mediante centrifugazione del sangue a 2000 xg a 4 °C e conservato a -80 °C prima di essere utilizzato. I valori di SAA sono stati misurati utilizzando un kit ELISA (Biosource, Camarillo, CA, USA) e sono stati espressi in µg/ml di siero.

### **3.3.3 Determinazione del numero di cellule nell'essudato peritoneale (PEC)**

Per ottenere le cellule dell'essudato peritoneale, subito dopo la decapitazione degli animali, 2 ml di PBS con BSA (0.1%) sono stati iniettati nella cavità peritoneale e la cavità peritoneale è stata massaggiata per 4 minuti. La sospensione di cellule in soluzione (circa 1.5 ml) è stata raccolta usando una siringa e il numero di cellule in sospensione è stato contato, dopo appropriata diluizione, usando la camera contacellule di Bürker. (Yamaguchi et al., 2000).

### **3.3.4 Valutazione morfologica dell'infiammazione a carico di organi linfoidi secondari (milza)**

Al momento del sacrificio sono state spiantate le milze, fotografate su carta millimetrata (Konika-Minolta Dynax 5D) per osservare eventuali differenze macroscopiche e rapidamente congelate per immersione in isopentano raffreddato con il ghiaccio secco e conservate a -80°C fino al sezionamento con il criostato.

L'organo al momento del sezionamento è stato portato alla temperatura della camera criostatica e confezionato su un apposito supporto ed immerso nel mezzo di inclusione OCT (Embedding Matrix, Kaltek srl., Italia) e poi tagliato al

criostato alla temperatura di  $-11^{\circ}\text{C}$ , (Slee Cryostat, Emme 3 Biotecnologie, Italia) così da ottenere sezioni di 8 micron.

Le sezioni poste su vetrino sono state colorate seguendo il protocollo di colorazione ematossilina-eosina. In breve, il vetrino con le sezioni adese viene immerso in ematossilina per 15 minuti e poi in acqua corrente per altri 15 minuti. Si prosegue con un rapido passaggio in acqua distillata seguito da immersione in eosina per 15 secondi. Il passaggio successivo prevede la scala ascendente di etanolo e quindi l'immersione del vetrino in etanolo  $60^{\circ}$ ,  $80^{\circ}$  e  $95^{\circ}$ . A questo punto si effettuano i tre passaggi in etanolo assoluto e infine i tre passaggi in xilolo. Si conclude con il montaggio del vetrino utilizzando il balsamo di Canada.

Il vetrino, così preparato, è stato osservato al microscopio ottico (Leica DC 100) per rilevare la presenza di neutrofili.

### **3.3.5 Dosaggio del colesterolo sierico nel topo**

L'analisi sul siero totale è stata effettuata utilizzando un metodo enzimatico colorimetrico (CHOL, CHOD-PAP, Cobas 105 \_\_, Roche Diagnostic, GmbH, Mannheim).

### **3.3.6 Misura della temperatura corporea nel topo**

La misura della temperatura corporea poco prima del sacrificio usando una sonda rettale è stata registrata tramite un termometro a termocoppia dotato di un display digitale (Type J 600-1000, Barnant Company, Barrington, Ill, USA) (Newsom et al., 2004)

Tutti i topi sono stati sacrificati al terzo giorno, 2 ore dopo la somministrazione di MDP o di soluzione salina, ed il sangue è stato raccolto per essere usato per le varie analisi.

### **3.4 *Analisi statistica***

I dati ottenuti mediante i diversi saggi e misurazioni sono stati analizzati con il t-test (Prism 4, GraphPad Software USA). La significatività era data da valori di:

\*  $p < 5\%$ , \*\*  $p < 0.5\%$ , \*\*\*  $p < 0.05\%$ .

## **4 RISULTATI e DISCUSSIONE**

### **PARTE I**

## ***Modello malattia***

L'aminobisfosfonato alendronato (ALD), inibitore della FPPS (vedi Figura 6, Intro pag13), e/o la lovastatina (Lova), inibitore della HMG-CoA reduttasi (vedi Figura 6, Intro pag13), sono stati utilizzati per bloccare la via metabolica del mevalonato e riprodurre una disregolazione infiammatoria simile a quella caratteristica della MKD. Su questo substrato, gli attacchi infiammatori sono stati provocati per mezzo dell'aggiunta di un composto batterico (lipopolisaccaride o muramildipeptide) in grado di stimolare l'attivazione dell'immunità naturale. In tal modo, si è cercato di riprodurre la condizione dei pazienti con MKD, in cui gli attacchi febbrili sono spesso associati a stimoli esogeni quali una vaccinazioni, un'infezioni o uno sforzo fisico (Simon et al., 2004).

Questa strategia è stata seguita prima in vitro su una linea cellulare di monociti/macrofagi murini (Raw 264.7) e su monociti isolati da donatori sani, e poi in vivo in topi Balb/c.

La linea cellulare ci ha permesso di effettuare la maggior parte degli esperimenti in vitro per la messa a punto delle condizioni sperimentali ottimali in un sistema altamente riproducibile.

Le condizioni sperimentali ottimali sono state quindi utilizzate anche in cellule primarie e in vivo.

### ***4.1 RAW 264.7***

La linea cellulare RAW 264.7 è stata trattata con 100  $\mu$ M alendronato o con 20  $\mu$ M lovastatina o con la loro combinazione (100  $\mu$ M Ald + 20  $\mu$ M Lova), in assenza o in presenza di 10  $\mu$ g/ml lipopolisaccaride. La valutazione del blocco della via del mevalonato è stata effettuata mediante il dosaggio del colesterolo intracellulare. Quali markers di infiammazione sono stati valutati IL1 $\beta$ , IL18 quali citochine attivate dalla caspasi-1, il TNF come citochina infiammatoria non caspasi-1 correlata, e il monossido di azoto.

Il livello di colesterolo intracellulare (ICL) nelle cellule RAW 264.7 è significativamente ridotto in presenza di Ald (10.79 $\pm$ 1.65  $\mu$ M) o di Lova

( $9.99 \pm 0.19 \mu\text{M}$ ) o con la loro combinazione ( $10.43 \pm 1.12 \mu\text{M}$ ) rispetto alle cellule non trattate ( $14.40 \pm 0.72 \mu\text{M}$ ).

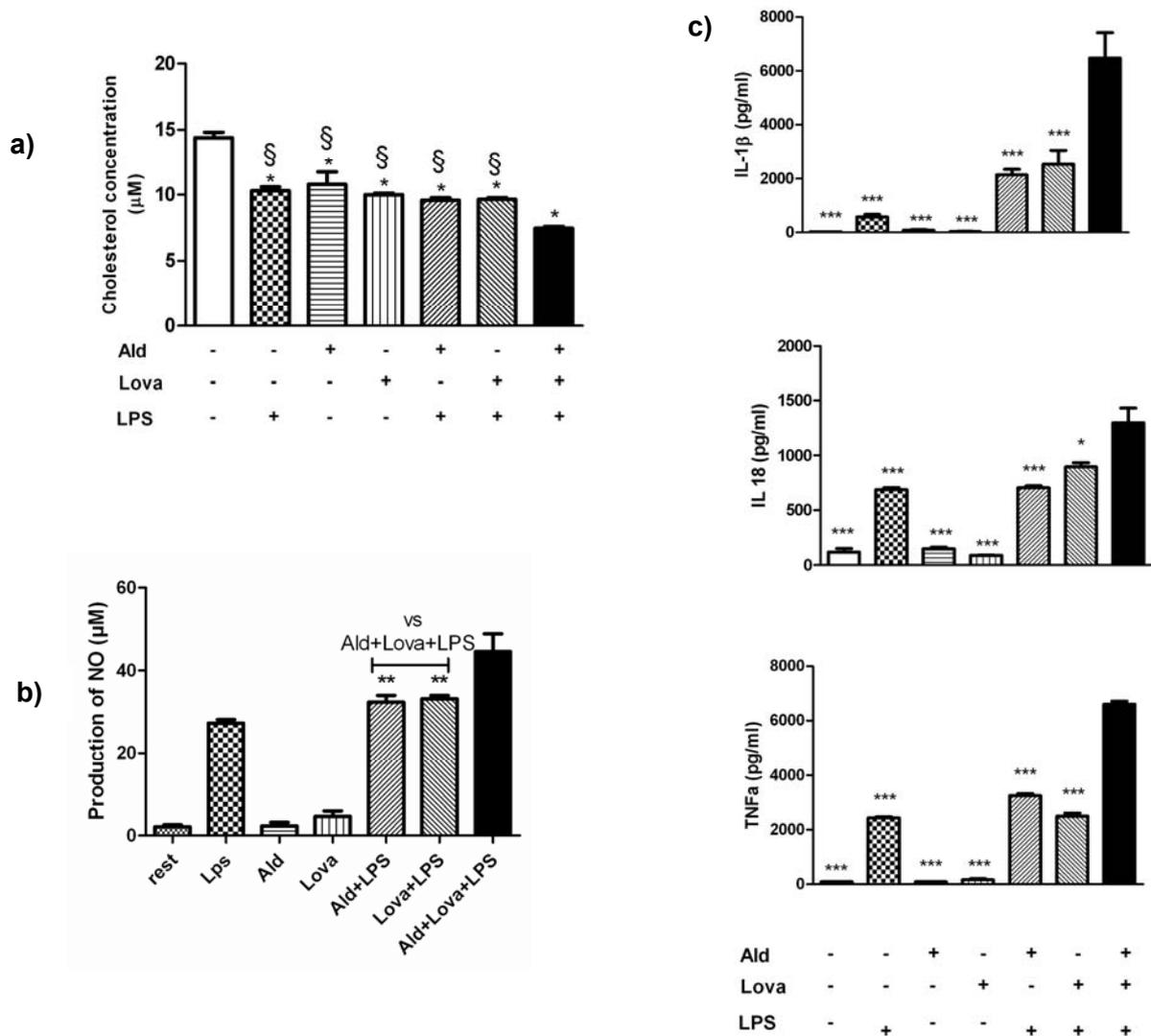
Un simile effetto è osservabile quando le cellule sono stimulate con LPS ( $10.29 \pm 0.52 \mu\text{M}$  versus  $14.40 \pm 0.72 \mu\text{M}$ ). La diminuzione dell'ICL diventa ancora maggiore quando lo stimolo infiammatorio (LPS) viene applicato su cellule trattate con i diversi inibitori: Ald+LPS ( $9.58 \pm 0.30 \mu\text{M}$ ), Lova+LPS ( $9.64 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ) o Ald+Lova+LPS ( $7.88 \pm 0.28 \mu\text{M}$ ). (Figura 16a)

Ald e Lova non inducono un aumento nella secrezione di citochine pro-infiammatorie in assenza di stimoli, ma aumentano significativamente la produzione delle citochine quando le cellule sono stimulate con LPS (Figura 16c). L'entità di questa produzione è significativamente maggiore rispetto a quella indotta dal LPS da solo. (Figura 16c).

La combinazione Ald+Lova è in grado di aumentare ulteriormente la produzione delle citochine testate (Figura 16c)

Simili risultati sono stati ottenuti quando la produzione di NO è stata valutata quale marker di infiammazione acuta. Ald+Lova amplifica la produzione di NO indotta dall'LPS ( $44.57 \pm 8.6 \mu\text{M}$ ) in modo significativo rispetto ad Ald+LPS ( $32.38 \pm 3.2 \mu\text{M}$ ) o Lova+LPS ( $33.17 \pm 1.6 \mu\text{M}$ ). (Figura 16b).

I medesimi esperimenti sono stati effettuati anche con altri inibitori: il pamidronato (aminobifosfonato), la simvastatina (statina). I risultati ottenuti sono del tutto comparabili con quelli ottenuti da alendronato e lovastatina in modo da fugare eventuali dubbi sul fatto che i fenomeni osservati siano reagenti dipendenti



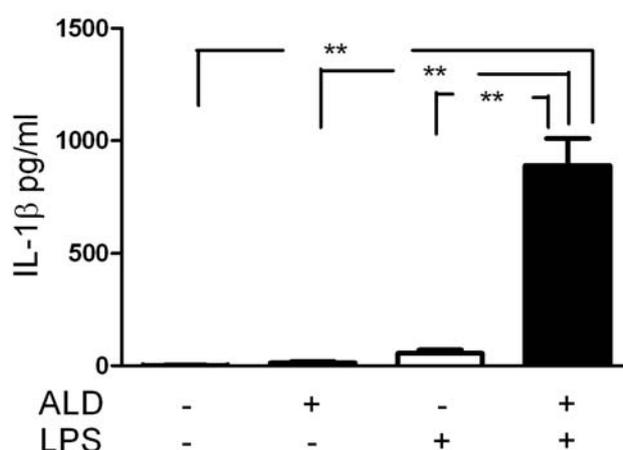
**Figura 16:** La figura mostra la risposta infiammatoria di monociti trattati con un inibitore della via del mevalonato (ALD) e con uno stimolo batterico (LPS). a) misura del colesterolo intracellulare (\*  $p < 0.05$  versus controllo, §  $p < 0.05$  versus Ald+Lova+LPS), b) produzione di ossido nitrico, c) secrezione di citochine infiammatorie. La significatività è stata calcolata mediante test ANOVA (1way analysis of variance), seguita da Tukey multiple comparison test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

Il modello sperimentale con il doppio blocco è stato messo a punto con l'obiettivo di ricreare sperimentalmente una situazione più stringente e paragonabile a quella che si verifica nella mevalonico aciduria, dove nella fase acuta dell'episodio infiammatorio si verifica un calo del colesterolo sistemico associato ad un incremento di tutti i marker flogogeni.

## 4.2 Monociti

I monociti isolati da sangue periferico di donatori sani sono stati trattati con ALD 100  $\mu$ M per 20h e con il LPS batterico 1  $\mu$ g/ml per ulteriori 24h. La secrezione di IL-1 $\beta$  è stata valutata quale marker infiammatorio specifico. L'andamento della secrezione delle altre citochine è risultata perfettamente paragonabile a quella verificata con la linea cellulare RAW 264.7.

In figura 17 sono riportati i risultati ottenuti. L'ALD induce una secrezione di IL-1 $\beta$  pari a quella dei monociti non trattati. L'LPS attiva i monociti in modo significativamente superiore rispetto ai monociti non trattati ( $p < 0.05$ ; non indicato nel grafico). L'associazione ALD/LPS mostra un significativo incremento della secrezione di IL-1 $\beta$  sia rispetto ai monociti non trattati che a quelli stimolati singolarmente con ALD o con LPS ( $p < 0.001$ ).



**Figura 17.** La figura mostra la risposta infiammatoria, valutata in base alla secrezione di IL-1 $\beta$ , di monociti trattati con un inibitore della via del mevalonato (ALD) e con uno stimolo batterico (LPS). La significatività è stata calcolata mediante test ANOVA (*1way analysis of variance*), seguita da *Tukey multiple comparison test*. \*\*  $p < 0.001$ .

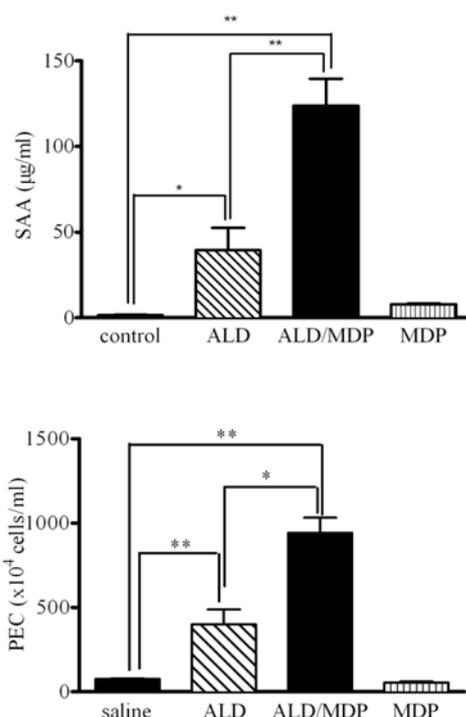
## 4.3 Topi Balb/c

Topi Balb/c sono stati trattati con 13 mg/Kg ALD per 70 h e con il 100  $\mu$ g/Kg MDP per ulteriori 2h. Tali condizioni sperimentali sono state replicate dal lavoro di Deng e collaboratori (Deng et al., 2006), dove il trattamento con l'aminobifosfonato e il LPS, per le tempistiche riportate, permetteva di ottenere la maggiore intensità infiammatoria per i marcatori considerati.

Diversamente da quanto riportato da Deng, e dagli esperimenti condotti in vitro, nel nostro modello murino di MKD è stato utilizzato il MDP al posto del LPS poiché, pur inducendo una buona risposta infiammatoria, era sempre meglio tollerato dagli animali.

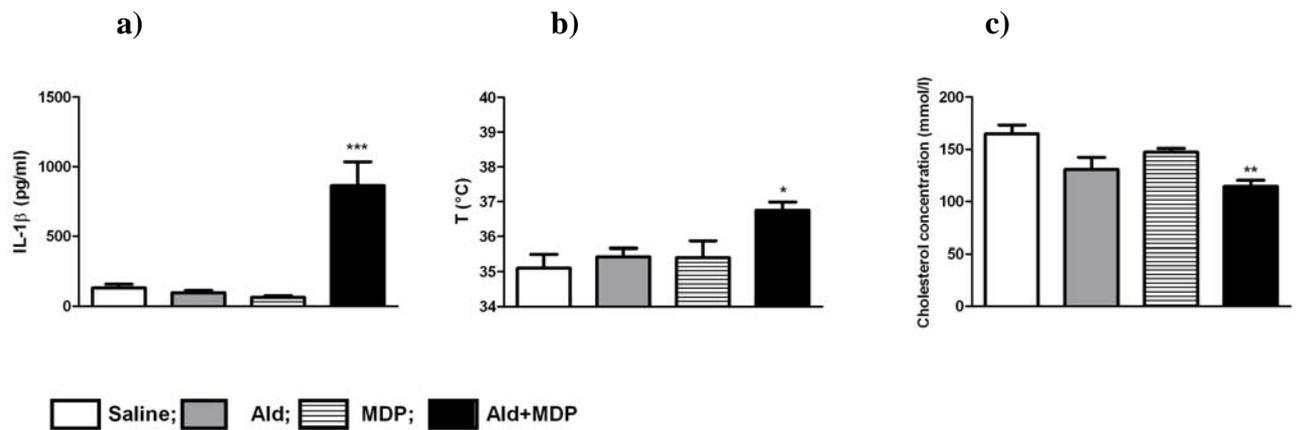
Quali markers di infiammazione sono stati utilizzati la siero amiloide A (SAA) e il numero di cellule presenti nell'essudato peritoneale (PEC).

Come si può vedere in figura 18 l'alendronato ha indotto un marcato aumento sia nei livelli di SAA (39,46  $\mu\text{g/ml}$ ) che di PEC ( $400.75 \times 10^4$  cellule)(18b) rispetto ai topi trattati con soluzione fisiologica (SAA: 1.40  $\mu\text{g/m}$ ; PEC: ). Lo stimolo con MDP ha amplificato ulteriormente la produzione di SAA (123.85  $\mu\text{g/ml}$ ) e il numero di PEC ( $942.22 \times 10^4$  cellule) in topi trattati con ALD. Il MDP da solo induce una debole ma già significativo incremento di SAA (7.90  $\mu\text{g/ml}$ ). Questi dati supportano l'ipotesi che l'inibizione della via del mevalonato possa amplificare la fisiologica attivazione dell'infiammazione.



**Figura 18.a)** Livelli di SAA e **b)** PEC nei topi di controllo, trattati solo con fisiologica, nei topi trattati con ALD 40 $\mu\text{mol/kg}$ , con ALD/MDP 100 $\mu\text{g/kg}$  e con il solo MDP; la significatività è stata valutata con Student's t test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

Successivamente l'indagine su tale modello ha portato a valutare anche la produzione di IL1 $\beta$ , la temperatura corporea ed il livello di colesterolo con l'obiettivo di verificare le somiglianze tra questo modello e gli attacchi febbrili tipici della mevalonico aciduria (Marcuzzi et al 2010, in press)



**Figura 19.** a) Produzione di IL1 $\beta$ ; b) Temperatura corporea; c) Concentrazione del colesterolo intracellulare. La significatività è stata calcolata mediante test ANOVA (*1way analysis of variance*), seguita da *Tukey multiple comparison test*. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ . cambiare la figura!!!!

In figura 19 si può notare che la produzione di IL-1 $\beta$  è aumentata ma non significativa nei topi trattati con l'MDP rispetto ai controlli ( $111.2 \pm 31.1$  pg/ml versus  $75.2 \pm 24$  pg/ml,  $p > 0.05$ ) come anche la temperatura corporea ( $164.67 \pm 21$  mmol/L versus  $147.33 \pm 6.43$  mmol/l,  $p > 0.05$ ).

Questi risultati sono stati presentati in una pubblicazione in fase di stampa (*"Decreased cholesterol levels reflect a consumption of anti-inflammatory isoprenoids associated with an impaired control of inflammation"*. A. Marcuzzi, G. Decorti, A. Tommasini, S. Crovella and A. Pontillo. *Inflammation Research*, 2010 in press)

#### **4.4 Inibitori della via del mevalonato**

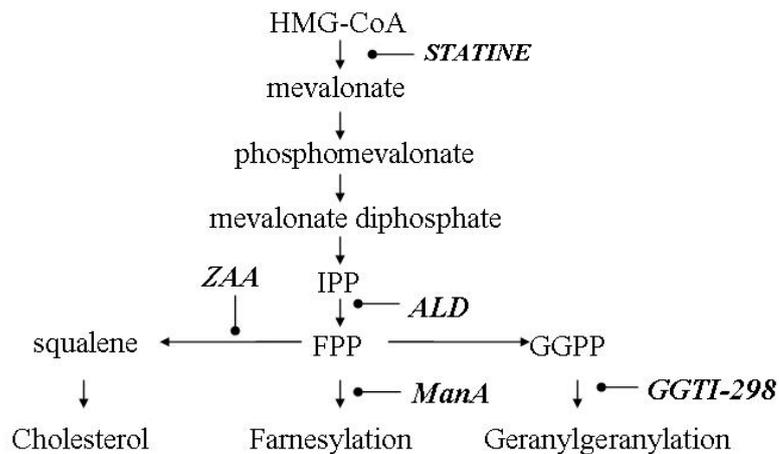
Per caratterizzare in modo approfondito i meccanismi molecolari coinvolti nel processo infiammatorio presenti nell'MKD, si è pensato inizialmente di andare a bloccare nei nostri modelli le singole uscite principali. Per fare questo abbiamo utilizzato i seguenti inibitori

ZAA: inibitore della squalene sintetasi

Man A: inibitore della farnesiltransferasi

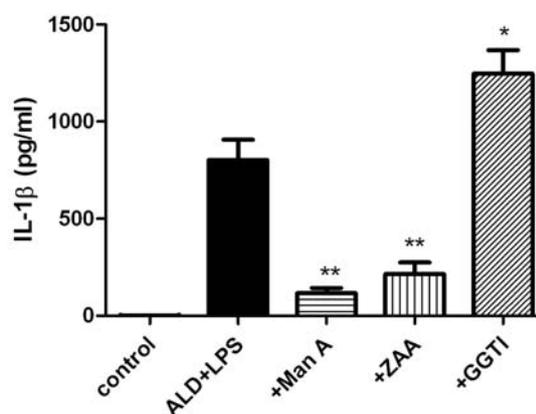
GGTI-298: inibitore della geranilgeranilazione

illustrati schematicamente in figura 20.



**Figura 20.** In figura sono riportati i principali punti di inibizione della via del mevalonato in corrispondenza dei quali sono stati inseriti gli inibitori utilizzati in questo lavoro di tesi

A titolo esemplificativo riporto (figura 21) sono riportati i dati ottenuti nei monociti, confermano, anche nel nostro modello cellulare, la capacità da parte del SS (con ZAA) o della FT (con Man A), di ridurre significativamente la secrezione di IL-1 $\beta$  nei monociti ALD/LPS al pari di quanto indicato da altri autori. In particolare la ManA sembra avere un maggiore effetto anti-infiammatorio rispetto allo ZAA, che comunque riduce in misura significativa la risposta infiammatoria (60% circa vs 40% circa). Inoltre l'utilizzo contemporaneo dei due inibitori non amplifica l'effetto anti-infiammatorio dei singoli né rispetto alla sola Man A né rispetto allo ZAA (dati non rappresentati).



**Figura 21.** La figura riporta l'aumento in percentuale di secrezione di IL-1 $\beta$  in monociti trattati con: a) Man A, b) ZAA, c) GGTI-298 rispetto monociti non trattati. La significatività è stata calcolata mediante test ANOVA (2 way analysis of variance) e Bonferroni post-test\* p<0.05, \*\* p<0.01

Viceversa l'inibitore GGTI-268, alla concentrazione di 10 $\mu$ M per 20h, ha determinato un'elevata produzione di IL-1 $\beta$  sia su monociti normali che su monociti trattati con ALD/LPS..

Questi risultati sono oggetto di un paper attualmente in fase di revisione ("*Targeting farnesyl-transferase as a novel therapeutic strategy for mevalonate kinase deficiency: in vitro and in vivo approaches*". L. De Leo, A. Marcuzzi, G. Decorti, A. Tommasini, S. Crovella, A. Pontillo. Pharmacological research, gennaio 2010).

La ManA, lo ZAA ed il GGTI non sono risultati tossici per le cellule al test del MTT.

#### **4.5 Discussione parte I**

In entrambi i modelli, in vitro e in vivo, il blocco della via del mevalonato, ottenuto qui sperimentalmente utilizzando l'ALD e/o la Lova creano uno stato pro-infiammatorio e sono in grado di predisporre ad una maggiore suscettibilità a componenti batteriche, quali il LPS o il MDP.

È chiaro che entrambi i modelli non sono esaustivi di tutti gli aspetti della patologia in studio, ma che sono in grado di riprodurre l'aspetto infiammatorio che è oggetto di questo lavoro di tesi e delle prospettive terapeutiche da noi proposte qui di seguito (parte II).

Tali modelli sono d'altronde innovativi in quanto **(a)** nei precedenti lavori in vitro (Frenkel et al., 2002; Kuijk et al., 2008b) il blocco della via del mevalonato è stato ottenuto con le statine, composti che, come già menzionato, inibiscono l'enzima a monte della MK (Figura 5). I nostri dati, ottenuti inibendo la FPPS con l'aminobisfosfonato ALD (Figura 5), indicano chiaramente che, a prescindere dal punto di blocco della via metabolica, la riduzione dei composti a valle della via metabolica, e in particolare della FPPS, induce un fenotipo infiammatorio. Inoltre **(b)** l'efficacia del blocco con ALD è stata per la prima volta dimostrata in vivo rendendo il modello malattia più completo, infatti ancora non esiste un modello animale transgenico per le mutazioni a carico del gene MVK, e il topo emizigote MVK $\pm$  pur esibendo alcune caratteristiche della MKD non sembrerebbe il modello più vicino alla malattia mostrando un'attività enzimatica residua della MK del 50% (e quindi notevolmente più elevata di quella riscontrata nei pazienti). Il doppio blocco valutato nel modello in vitro

amplifica la suscettibilità dei monociti a componenti batteriche sottolineando quanto l'entità del blocco della via metabolica influenzi l'entità della risposta infiammatoria.

Ulteriori studi sulla patogenesi dell'MKD ci hanno portato a verificare, in base a quanto presente in letteratura, su questi modelli l'effetto del blocco delle vie principali di uscita della via metabolica e i risultati ottenuti con ZAA e GGTI avvalorano ulteriormente l'ipotesi che il processo principalmente coinvolto nella patogenesi della malattia sia quello della geranyl-geranilazione, come viene confermato dal fatto che l'inibizione delle altre vie favorisce il flusso degli intermedi isoprenoidi verso di essa riducendo la risposta infiammatoria. Il tutto è poi reso meglio evidente dal fatto che il drammatico effetto pro-infiammatorio del GGTI-268 conferma il ruolo patogenetico del calo del GGP nel fenotipo infiammatorio della MKD riportato da Kujik et al. (2008) e Mandey et al. (2006), i quali hanno dimostrato che il calo della geranyl-geranilazione, conseguente al blocco della via del mevalonato, induce la secrezione di IL-1 $\beta$  mediante l'attivazione della caspasi-1 Rac1/PI3K/PKB-dipendente. Tutte queste evidenze sperimentali ci hanno portato a scegliere come alternativa e/o in associazione agli isoprenoidi come trattamento farmacologico d'elezione in questo contesto la Man A. In tale ottica è stata anche valutata la capacità anti-infiammatoria del Tipifarnib ed del Lonafarnib quali inibitori della farnesiltransferasi già impiegati in trials clinici in altri contesti clinici quali in ambito oncologico.

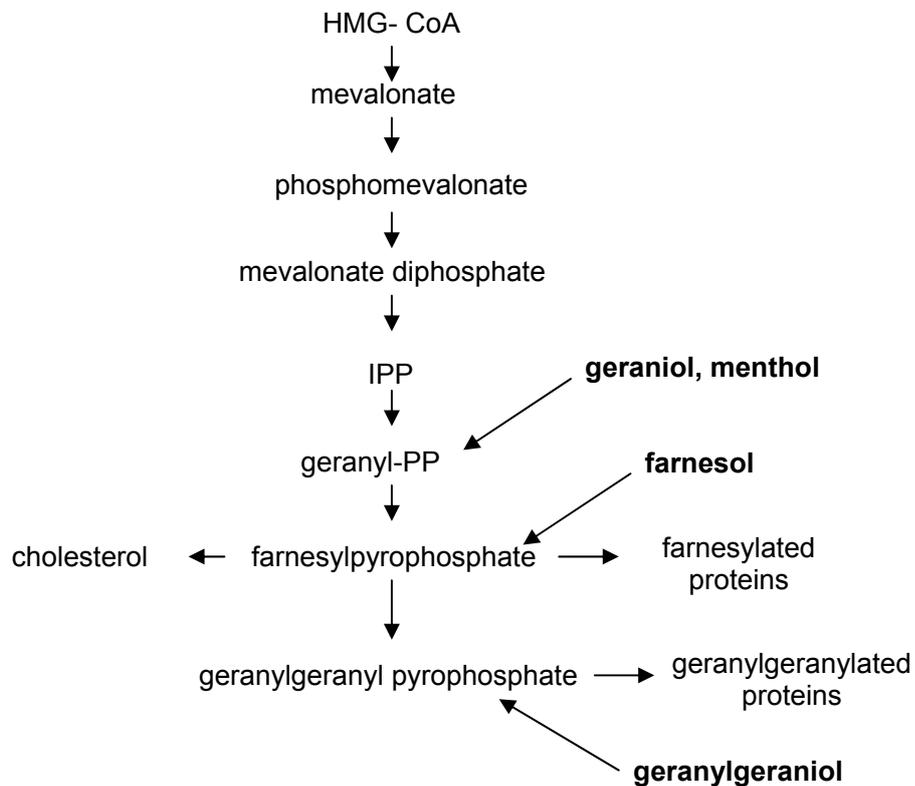
Infine non abbiamo ritenuto utile testare lo ZAA, perché da un lato è un composto che riducendo la sintesi del colesterolo può comportare serie conseguenze in vivo, dall'altro pur essendo stato preso in considerazione come farmaco anti-colesterolo ((Bergstrom et al., 1993) non è poi stato sviluppato come tale ((Schneiders et al., 2006) e ciò lasciava supporre una non fattibilità per il suo impiego nel trattamento della MKD.

## PARTE II

### *Intervento farmacologico*

E' stato suggerito che il ripristino dei livelli intracellulari dei composti intermedi della via metabolica del mevalonato, ed in particolare del GGPP, potesse ridurre l'infiammazione indotta dal blocco della via (Mandey et al., 2006). Abbiamo perciò testato alcuni di questi composti, sia nel modello cellulare che in quello animale della malattia

- isoprenoidi esogeni naturali in grado di inserirsi a valle della FPPS. (Figura 22);



**Figura 22.** La figura indica i punti della via del mevalonato in cui si inseriscono gli isoprenoidi testati in questo lavoro di tesi.

- inibitori della farnesil transferasi (FTI): Man A, Tipifarnib e Lonafarnib che bloccando la farnesilazione delle proteine.

Di seguito vengono esposti i risultati ottenuti con questi interventi farmacologici nei modelli malattia e a titolo esemplificativo verranno riportati soltanto i dati

relativi al blocco con l'aminobifosfonato dal momento che l'effetto ottenuto con Lova/LPS è perfettamente sovrapponibile a ALD/LPS.

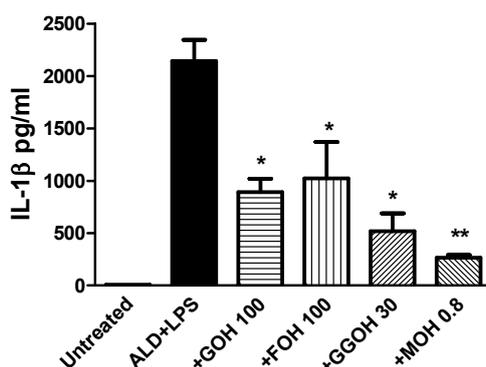
Tutti i composti NEIs ed FTIs che sono stati oggetto di questi esperimenti non sono risultati tossici per le cellule al test del MTT.

## 4.6 RAW 264.7

Le cellule Raw sono state trattate con ALD o con ALD/Lova (come descritto in dettaglio in Mat & Met 3.2.3), e stimolate con LPS. Differenti concentrazioni di composti isoprenoidi o di inibitori della farnesiltrasferasi sono stati testati in questi modelli. Quali markers di infiammazione sono state utilizzate la citochina IL-1 $\beta$ , e in alcuni esperimenti anche la IL-18 e il TNF.

### 4.6.1 Isoprenoidi naturali (NEIs)

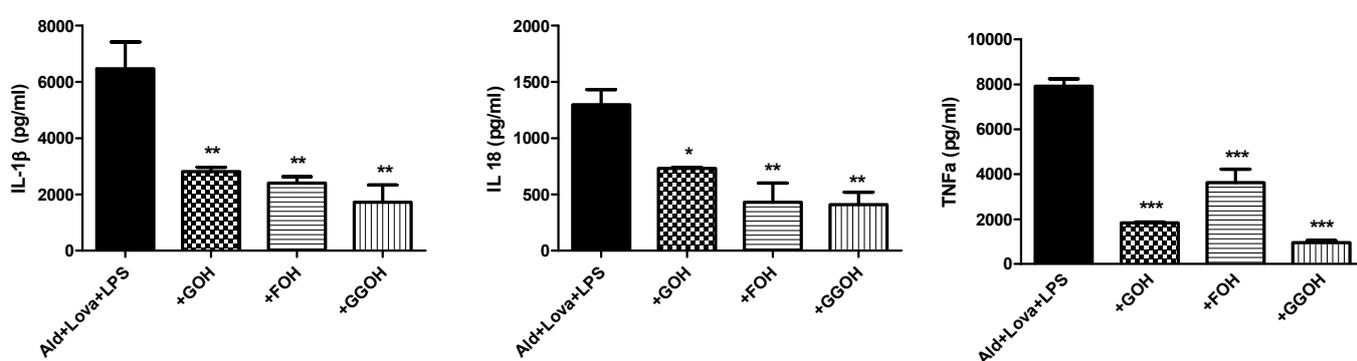
Le cellule Raw 264.7 ALD/LPS sono state trattate con gli isoprenoidi GOH, FOH, GGOH e MOH a diverse concentrazioni: GOH (25/50/100  $\mu$ M), FOH (25/50/100  $\mu$ M); GGOH (15/30/60  $\mu$ M) e MOH (0.1/0.2/0.8  $\mu$ M). In base ai risultati ottenuti si è scelto di procedere con gli esperimenti utilizzando la dose che si è dimostrata essere efficace e nel contempo non tossica per le cellule, ossia: GOH (100  $\mu$ M), FOH (100  $\mu$ M), GGOH (30  $\mu$ M), MOH (0.8  $\mu$ M). Tutti e quattro gli isoprenoidi come si può vedere in figura 23 si sono rivelati efficaci nel ridurre la secrezione di IL-1 $\beta$  indotta da ALD/LPS. In particolare, il GOH e il FOH sono stati in grado di ridurre la secrezione della citochina indotta da ALD/LPS di circa il 40% e il GGOH di circa il 60% ed il MOH di 70% come riportato in figura 23.



**Figura 23:** La figura mostra la risposta infiammatoria di Raw 264.7 ALD/LPS in presenza di isoprenoidi. La significatività è stata calcolata mediante test ANOVA (1way analysis of variance), seguita da Tukey multiple comparison test. \* p<0.05, \*\* p<0.001.

Questi risultati sono oggetto di un paper attualmente in fase di revisione (*"Natural isoprenoids inhibit LPS induced-production of cytokines and nitric oxide in aminobisphosphonate-treated monocytes."* A. Marcuzzi, A. Tommasini, S. Crovella, A. Pontillo. *International Immunopharmacology*, dicembre 2009).

Al fine di valutare l'efficacia anti-infiammatoria dei NEIs su questo modello abbiamo voluto estendere questa prova anche alla forma più stringente di blocco ossia in presenza di ALD+Lova e poi LPS: I risultati, in termini di secrezione di IL1 $\beta$ , IL18 e TNF, anche in questo caso sono stati ottimi come è rappresentato in figura 24.



**Figura 24.** In figura sono riportati i dati relativi all'efficacia di tre isoprenoidi sulle cellule trattate con ALD/LPS rispetto alla secrezione delle tre citochine. La significatività è stata calcolata mediante test ANOVA (*1way analysis of variance*), seguita da *Tukey multiple comparison test*. \* p<0.05, \*\* p<0.001, \*\*\* p<0.0001.

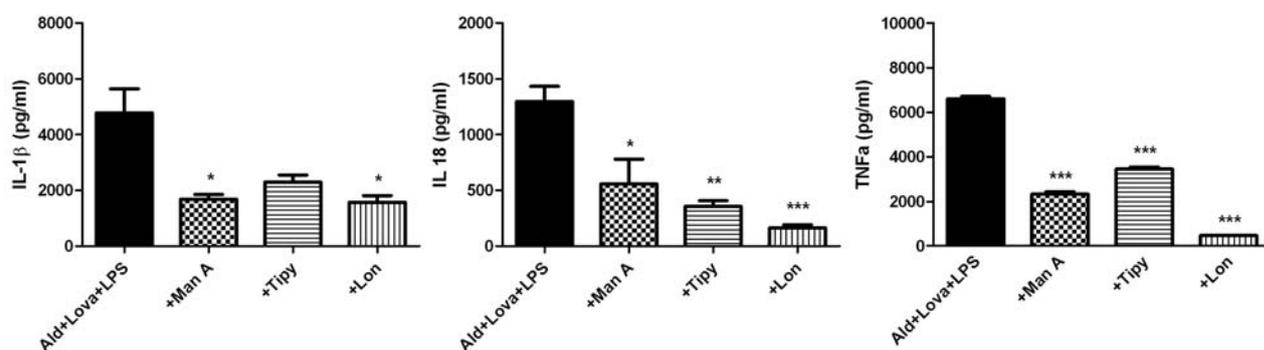
In particolare GGOH si è dimostrato essere il più efficace nel ridurre tutte le tre citochine (IL-1 $\beta$ : 69%, IL-18: 68%, TNF $\alpha$ : 88%) anche se tutti gli altri composti portano a percentuali di riduzione simili (GOH, IL-1 $\beta$ : 50%, IL-18: 44%, TNF $\alpha$ : 77%; FOH, IL-1 $\beta$ : 56%, IL-18: 67%, TNF $\alpha$ : 54%).

I dati relativi all'azione del MOH, non sono ancora ultimati al momento della stesura di questo lavoro di tesi, ma indicano un trend sovrapponibile a quello degli altri tre isoprenoidi.

#### 4.6.2 Inibitori della farnesil-transferasi (FTIs)

Man A, Tipifarnib e Lonafarnib (ManA, 10 $\mu$ M; Tip, 20 mM; Lon, 16.5mM) (Basso et al., 2005; Xue et al., 2006) si sono rivelati efficaci nel ridurre la secrezione di IL-1 $\beta$ . Parallelamente a quanto fatto per gli isoprenoidi

abbiamo voluto valutarne l'effetto nella condizione più "estrema" di blocco della via andando a trovare un buon risultato (per la secrezione di IL-1 $\beta$ , IL18 e TNF) come riportato in figura 25.

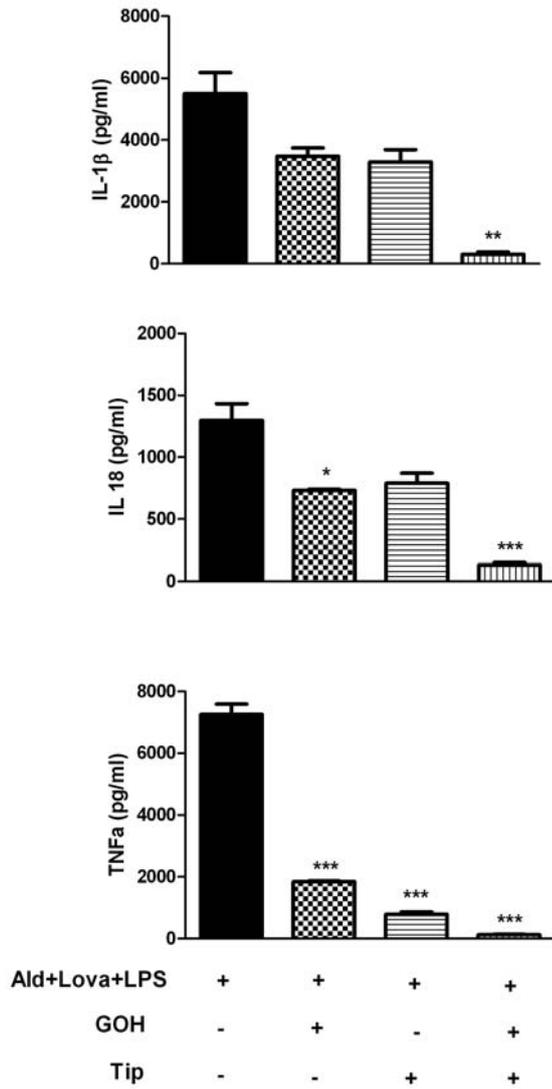


**Figura 25.** In figura sono riportati i dati relativi all'efficacia di tre FTIs sulle cellule trattate con ALD/LPS rispetto alla secrezione delle tre citochine. La significatività è stata calcolata mediante test ANOVA (*1way analysis of variance*), seguita da *Tukey multiple comparison test*. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 4.6.3 Combinazione NEIs e FTIs

Poiché per nessuna delle 2 classi di composti la riduzione della secrezione citochina è completa, è stata valutata la possibile sinergia tra NEIs ed FTIs. Di tutti i risultati ottenuti (indicati nella tabella 3), riporto quella che è risultata essere la migliore combinazione in termini di significatività statistica di riduzione della secrezione citochinica ossia quella che si realizza tra Tipifarnib e GOH come riportato in figura 26.

Questi risultati sono oggetto di un paper attualmente in fase di revisione ("*Farnesyltransferase Inhibitors and Exogenous Isoprenoids are able to rescue the inflammation induced by the block of mevalonate pathway*". A. Marcuzzi, L. De Leo, G. Decorti, S. Crovella, A. Tommasini, A. Pontillo. *Life Science*, dicembre 2009).



**Figura 26.** La figura illustra i risultati ottenuti in seguito al trattamento singolo e combinato di GOH e Tipifarnib sulle cellule trattate con Ald+Lova/LPS. La significatività è stata ottenuta mediante test ANOVA (*1way analysis of variance*), seguito da *Tukey multiple comparison test*. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

	IL1 $\beta$	IL18	TNF $\alpha$
<b>GOH +Man A</b>			
<b>Vs GOH</b>	ns	**	**
<b>Vs ManA</b>	ns	*	***
<b>GOH+Tip</b>			
<b>Vs GOH</b>	*	*	**
<b>Vs Tip</b>	*	*	***
<b>GOH+Lon</b>			
<b>Vs GOH</b>	ns	**	*
<b>Vs Lon</b>	ns	*	ns
<b>FOH +Man A</b>			
<b>Vs FOH</b>	ns	ns	*
<b>Vs ManA</b>	ns	ns	ns
<b>FOH+Tip</b>			
<b>Vs FOH</b>	ns	ns	*
<b>Vs Tip</b>	ns	ns	*
<b>FOH+Lon</b>			
<b>Vs FOH</b>	ns	ns	ns
<b>Vs Lon</b>	ns	ns	ns
<b>GGOH +Man A</b>			
<b>Vs GGOH</b>	ns	ns	ns
<b>Vs ManA</b>	ns	ns	*
<b>GGOH+Tip</b>			
<b>Vs GGOH</b>	ns	ns	ns
<b>Vs Tip</b>	ns	ns	**
<b>GGOH+Lon</b>			
<b>Vs GGOH</b>	ns	ns	ns
<b>Vs Lon</b>	ns	ns	ns

**Tabella 3.** Effetto di NEIs o di FTIs o la loro combinazione nella secrezione delle citochine dalle cellule trattate con ALD+Lova+LPS. I valori di significatività riportati sono stati elaborati con il test Anova tra trattamento singolo e combinato per la secrezione di citochine indotte dall'LPS. Ns: p>0.05; \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01; \*\*\* p<0.001.

#### **4.7 Monociti**

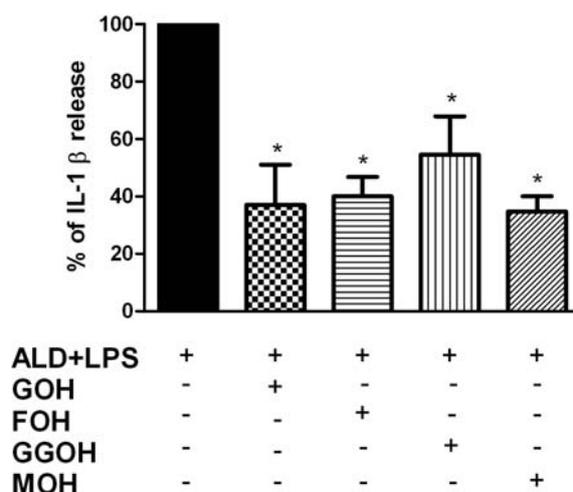
Monociti umani isolati da sangue periferico di donatori sani sono stati trattati con ALD e LPS come descritto in dettaglio in Mat&Met 4.3. Differenti concentrazioni di composti isoprenoidi o di inibitori della farnesiltrasferasi sono stati testati in questi modelli. Quale marker di infiammazione è stata utilizzata la

sola citochina IL-1 $\beta$ . Infatti in letteratura tale citochina è considerata il principale mediatore degli effetti sistemici osservabili nei pazienti MKD, inoltre essendo attivata dalla caspasi-1 risulta essere il maggiore link con il meccanismo molecolare proposto da Mandey (Mandey et al., 2006). Dagli esperimenti condotti in precedenza, inoltre, risultava chiaramente un andamento analogo tra IL1 $\beta$  e le altre citochine studiate.

#### 4.7.1 NEIs

I monociti sono stati trattati con gli isoprenoidi GOH (100  $\mu$ M), FOH (100  $\mu$ M), GGOH (30  $\mu$ M), MOH (0.8  $\mu$ M).

Tutti e quattro gli isoprenoidi si sono rivelati efficaci nel ridurre la secrezione di IL-1 $\beta$  indotta da ALD/LPS. In particolare, il GOH e il FOH sono stati in grado di ridurre la secrezione della citochina indotta da ALD/LPS di circa il 60% e il GGOH di circa il 40% ed il MOH di 65% come riportato in figura 27.

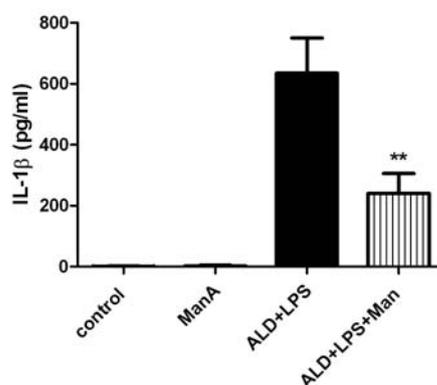


**Figura 27.** La figura illustra i risultato ottenuti in seguito al trattamento di monociti ALD/LPScon i quattro isoprenoidi. La significatività è stata ottenuta mediante test ANOVA (*1way analysis of variance*), seguito da *Tukey multiple comparison test*. \*  $p < 0.05$ .

#### 4.7.2 FTIs

I monociti sono stati trattati con la ManA (10 $\mu$ M). La ManA è stata utilizzata come rappresentativa della classe dei FTIs in quanto gli altri 2 inibitori Tipifarnib e Ionafarnib non erano disponibili per ulteriori esperimenti.

ManA è in grado di ridurre la secrezione di IL-1 $\beta$  indotta da ALD/LPS. (figura 28).



**Figura 28.** La figura riporta i dati del trattamento della Manumicina A sui monociti trattati con ALD/LPS. La significatività è stata ottenuta mediante test ANOVA (*1way analysis of variance*), seguito da *Tukey multiple comparison test*. \*\*:  $p < 0.01$

## 4.8 Topi Balb/c

Topi Balb/c sono stati trattati con ALD e MDP come descritto in dettaglio al paragrafo 3.3.1.1 dei Materiali e Metodi. Differenti concentrazioni e tempistiche di somministrazione di composti isoprenoidi o di inibitori della farnesiltrasferasi sono stati testati in questi modelli. Quali markers di infiammazione sono stati utilizzati i livelli di SAA e il numero di PEC. Inoltre l'effetto di alcuni composti è stato valutato anche a livello istologico su sezioni di milza.

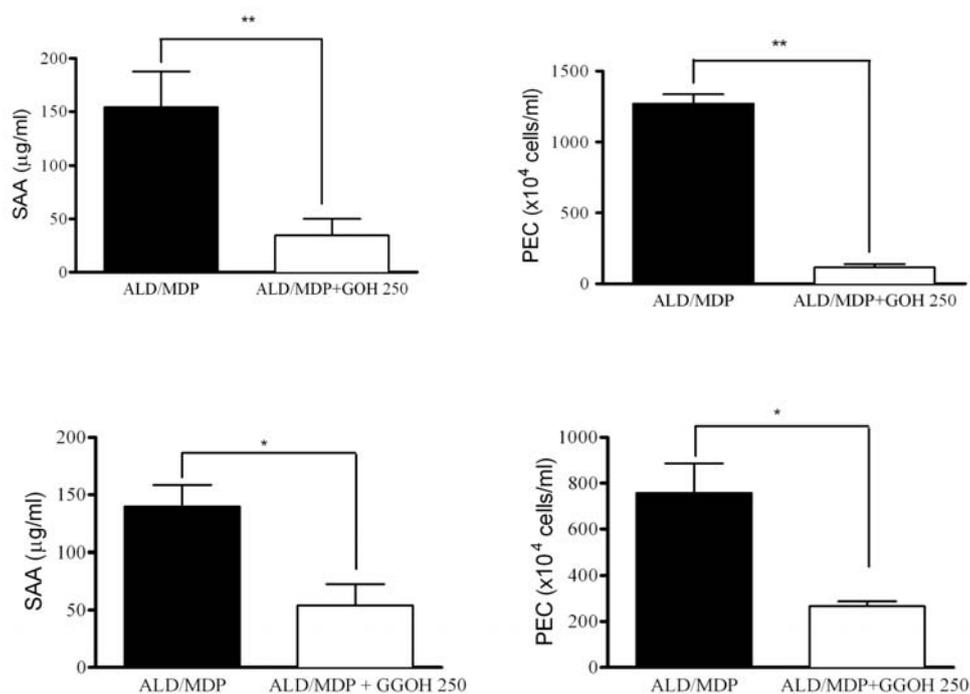
### 4.8.1 NEIs

I tre isoprenoidi GOH, GGOH e FOH sono stati somministrati nel topo ALD/MDP per via intraperitoneale con diverse dosi e tempistiche:

- una singola dose (250 o 500 mg/Kg)/esperimento (giorno -1, 0, 1);
- due dosi (2x250 mg/kg)/esperimento (giorni 0/1, -1/0, -1/1);
- tre dosi/esperimento (3x250 mg/Kg)(giorni -1/0/1).

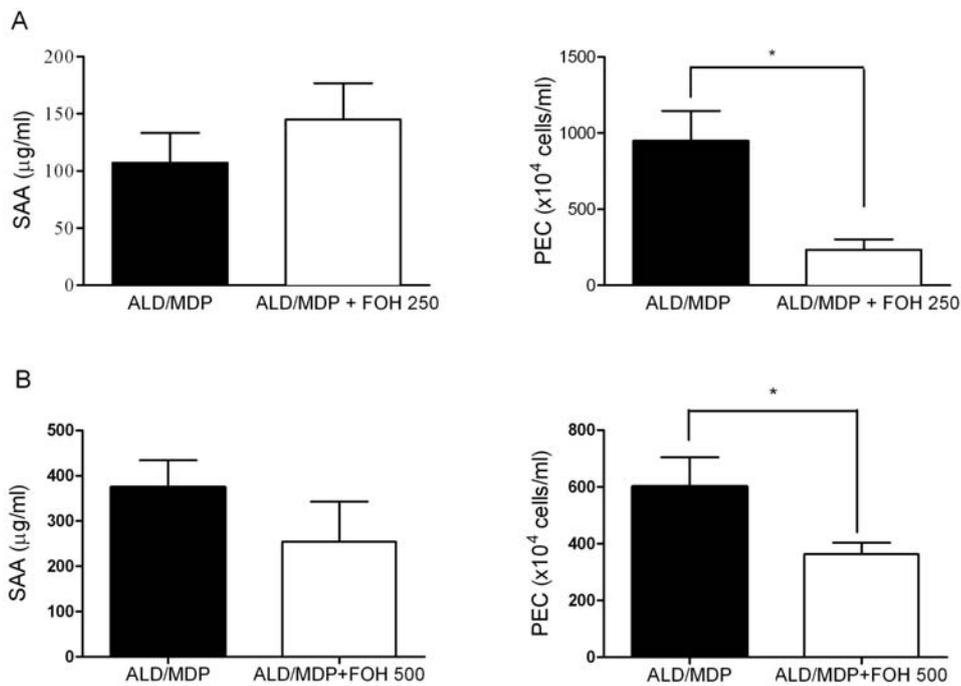
La migliore combinazione di dosi e tempistiche per il GOH e il GGOH nel ridurre i markers infiammatori nei topi Ald/MDP è risultata essere la seguente: due dosi (2x250 mg/kg) ai giorni g0 (contemporaneamente alla somministrazione di ALD)

e g1 (il giorno successivo alla somministrazione di ALD). L'efficacia del trattamento è riportata in Figura 29 e 30.



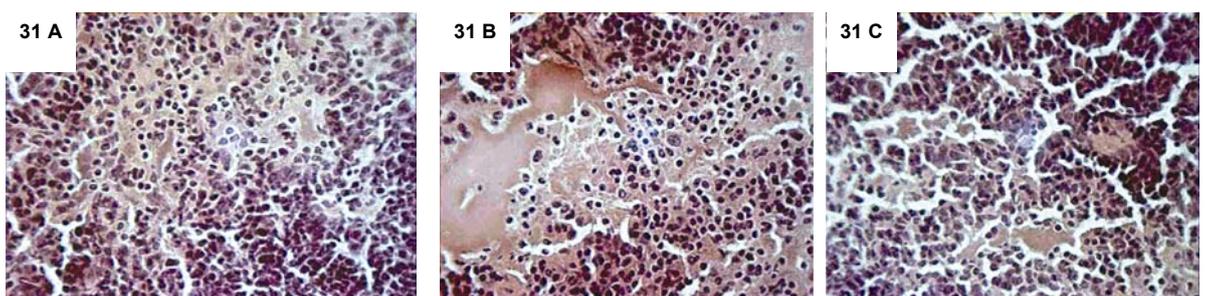
**Figura 29.** SAA e PEc relative al trattamento con GOH (250 mg/kg) e GGOH (250 mg/kg). I dati riportati corrispondono a media  $\pm$  standard error. La significatività statistica è stata valutata usando il test t di student ad 1 coda per dati non appaiati.. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

Mantenendo le stesse tempistiche di somministrazione, per il FOH invece è stato necessario duplicare la dose/giorno (2x500 mg/Kg) per ottenere un effetto anti-infiammatorio comparabile (Figura 30). I dati relativi all'azione del MOH, non sono ancora disponibili al momento della stesura di questo lavoro di tesi, ma indicano un comportamento sovrapponibile a quello degli altri tre isoprenoidi.



**Figura 30.** In figura sono rappresentati i dati relativi al trattamento con FOH adue dosi , a 250 mg/kg e a 500 mg/kg, rispettivamente A) e B). La significatività statistica è stata valutata usando il test t di student ad 1 coda per dati non appaiati.. \* p<0.05.

Questi dati sono supportati anche dall'osservazione istologica sulle milze degli animali, come illustrato in figura 31. In particolare si può osservare la sezione del controllo (31 A), rispetto all'infiltrazione dei leucociti presente nella milza degli animali trattati con ALD/LPS (riquadro 31B), mentre questo è chiaramente ridotto negli animali trattati con geraniolo (riquadro 31C).

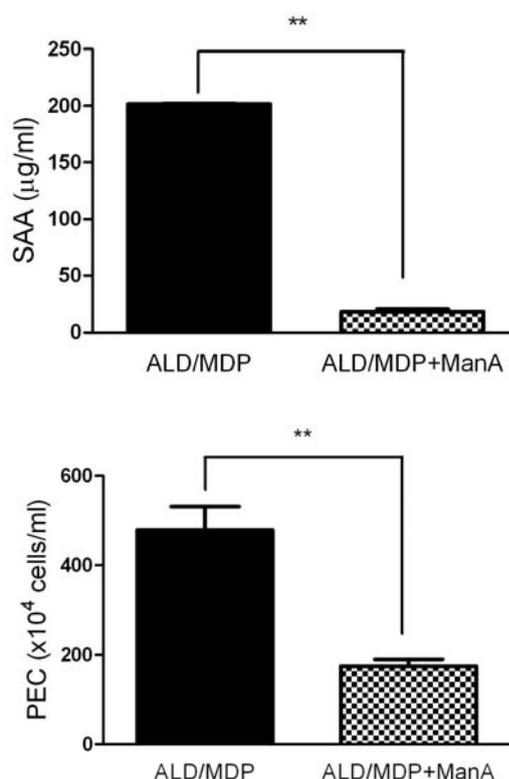


**Figura 31.** Trattamento con ematossilina ed eosina di sezione di milza di animali di controllo (31°), trattati con ALD/LPS (31B), e con ALD/LPS e GOH (31C). Ingrandimento microscopio:x40.

## 4.8.2 FTIS

Vista l'efficacia della ManA nel ridurre la risposta infiammatoria nel modello cellulare abbiamo testato l'inibitore della FT anche nel modello murino.

Topi Balb/c ALD/MDP sono stati trattati intraperitoneo con ManA 7,5 mg/kg al giorno 0 (insieme all'ALD). (Xu et al., 2001). L'inibitore è risultato efficace nel ridurre significativamente i livelli di SAA e di PEC (Figura 32).



**Figura 32.** La figura riporta i risultati ottenuti in topi Balb/c trattati con la ManA 7,5mg/kg; la significatività è stata calcolata mediante Student's t test. \*\* p<0.001.

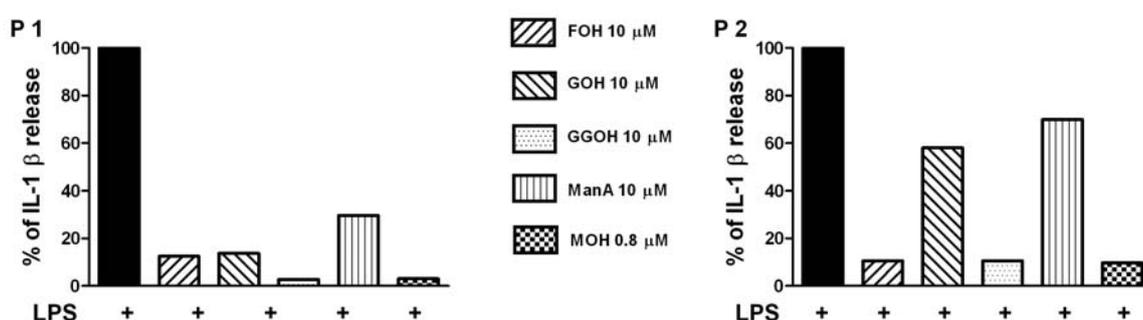
## 4.9 NEIs ed FTIs risultano efficaci nel ridurre l'infiammazione in monociti di pazienti affetti da MKD

I risultati sull'effetto anti-infiammatorio di NEIs ed FTIs ottenuti nel modello cellulare e murino della MKD, ci hanno indotto a verificarne l'efficacia su monociti isolati da sangue periferico di due pazienti (P1 e P2).

I primi esperimenti in quest'ambito sono stati condotti incubando i monociti per 20h con GOH10 µM, GGOH 10 µM, FOH 10 µM, MOH o con ManA 10 µM, e quindi per 24h con LPS 1 µg/ml.

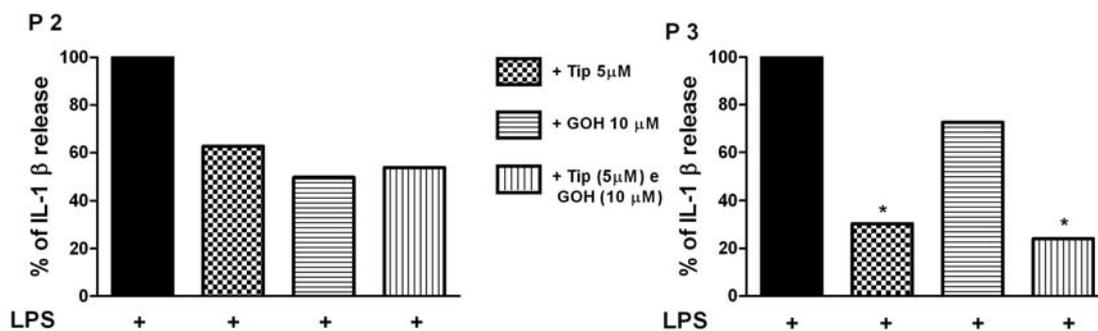
I composti hanno confermato il proprio effetto anti-infiammatorio, anche se con una certa variabilità interpersonale tra i campioni.

Nei monociti isolati dal paziente P1 si osserva una notevole riduzione della secrezione di IL-1 $\beta$  rispetto alla stimolazione con LPS per ciascuno dei composti utilizzati con una percentuale di riduzione che va dal 70% della ManA all'80% di FOH e GOH a più del 90% per il GGOH ed MOH. Tali livelli di riduzione dei livelli di IL-1 $\beta$  sono stati ottenuti solo per il FOH, GGOH ed MOH nei monociti isolati dal paziente P2. GOH e ManA inibiscono la secrezione della citochina ma di circa il 40% (Figura 33).



**Figura 33.** . In figura è riportata la secrezione di IL-1 $\beta$  indotta dall'LPS in monociti di 2 pazienti (P1e P2) di MKD, incubati in assenza o in presenza dei NEIs e della ManA per 24h. Le cellule sono state poi trattate con 1  $\mu$ g/ml di LPS per ulteriori 20 h. I valori assoluti sono stati ottenuti da 1 esperimento fatto in triplicato.

In figura 34 sono riportati i risultati ottenuti trattando i monociti di 2 pazienti MKD con Tipifarnib e GOH. La combinazione dei due composti è in grado di ridurre significativamente la secrezione di IL1 $\beta$  sia rispetto alla stimolazione con LPS, sia in parte anche verso i singoli composti (specialmente P3).



**Figura 34.** In figura è riportata la secrezione di IL-1 $\beta$  indotta dall'LPS in monociti di 2 pazienti (P2 e P3) di MKD, incubati in assenza o in presenza di 10  $\mu$ M GOH per 24h. o 5  $\mu$ M Tip for 1h, o la loro combinazione. Le cellule sono state poi trattate con 1  $\mu$ g/ml di LPS per ulteriori 20 h. I valori assoluti sono stati ottenuti da 1 esperimento fatto in triplicato.

\*  $p < 0.05$  significativamente differente dal valore assoluto della concentrazione delle citochine presente nelle cellule trattate con LPS (100%).

#### 4.10 Discussione parte II

L'aggiunta di composti intermedi che sono in grado di ripristinare i livelli dei metaboliti della via del mevalonato conferma che la mancanza di questi ha un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'episodio infiammatorio tipico della MKD. I nostri risultati sono in linea con le precedenti osservazioni sull'importanza degli isoprenoidi nell'infiammazione (Frenkel et al., 2001; Simon et al., 2004).

Inoltre tali dati suggeriscono un approccio terapeutico basato sull'utilizzo di composti isoprenoidi esogeni per la MKD. I composti isoprenoidi somministrati singolarmente agli animali non sono risultati tossici o infiammatori di per sé, condizione necessaria per poterne ipotizzare un possibile utilizzo nell'uomo. A quel punto la verifica sui monociti dei pazienti si è resa necessaria, dal momento che lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di comprendere i meccanismi patogenetici alla base della malattia e di poter sfruttare le conoscenze acquisite per proporre un possibile approccio terapeutico. Il fatto che entrambi i pazienti rispondano al trattamento con gli isoprenoidi (figura 33), sebbene in maniera diversa, ci permette di ipotizzarne un possibile uso terapeutico.

Analogamente a quanto ottenuto con gli isoprenoidi, siamo riusciti ad ottenere un importante effetto anti-infiammatorio anche con gli inibitori della farnesil transferasi, dove è stato ottenuto un eccellente risultato con ManA in vitro ma

anche nel più complesso modello animale. Purtroppo ad oggi non abbiamo avuto modo di testare l'effetto del Tipifarnib e del Lonafarnib per la limitata quantità di materiale in nostro possesso ma speriamo quanto prima di poter condurre queste prove sul modello MKD in quanto sembrano essere un intervento farmacologico promettente. Analogamente a quanto visto per i NEIs anche la Man è risultata efficace nei monociti dei pazienti MKD. E' ipotizzabile che la diversa risposta ottenuta in P1 e P2, soprattutto per quello che riguarda la ManA, sia stata influenzata dal grado di attività enzimatica della MK: infatti, una attività enzimatica residua (AER) prossima allo zero non permetterebbe la sintesi di un sufficiente livello di intermedi isoprenoidi che verrebbero poi reindirizzati dal blocco della FT verso il processo di geranylgeranilazione. In particolare, nei due pazienti considerati, si può ipotizzare che l'AER sia superiore in P1 rispetto P2 (figura 33).

Tali evidenze ci hanno indotto a testare sulle cellule di due pazienti l'effetto combinatorio di Tip e GOH che negli esperimenti con la linea cellulare costituiva la combinazione più efficace in termini di riduzione del rilascio di IL1 $\beta$ . (Figura 34). Tale condizione è risultata essere molto efficace a conferma del fatto che il Tipifarnib in associazione all'isoprenoide potrebbe rappresentare in un futuro prossimo una valida ipotesi di intervento farmacologico per l'MKD.

## **5 CONCLUSIONI**

La MKD è una malattia rara autosomica recessiva, associata al gene *MVK* che codifica per la MK, il secondo enzima della via del mevalonato. Le mutazioni a carico di *MVK* comportano una diminuzione della funzionalità enzimatica che porta ad una carenza di composti intermedi a valle della MK, in particolare di GGPP, che è l'evento patogenetico alla base del fenotipo infiammatorio osservato nei pazienti (Frenkel et al., 2002; Mandey et al., 2006; Kuijk et al., 2008a). E' ancora poco chiaro come il calo di GGPP, e la conseguente riduzione della geranilgeranilazione siano collegati all'attivazione della caspasi-1 (Kuijk et al., 2008b) e alla risposta infiammatoria.

La MKD è una patologia ancora orfana di terapia; gli anti-infiammatori non steroidei (FANS) non sono efficaci nel trattamento dei sintomi, e gli steroidi pur impiegati con un certo successo spesso hanno un elevato rapporto costo/beneficio. Lo sviluppo di nuovi trattamenti che siano specifici per questa patologia è stato l'oggetto principale di questa tesi di dottorato.

Inizialmente si è voluto ricreare il modello malattia caratterizzato da un'infiammazione sistemica sia *in vitro* sia *in vivo*. In tal senso l'utilizzo dell'alendronato e della lovastatina è risultato essere molto vantaggioso nel riprodurre il blocco della via metabolica e l'impiego dello stimolo pro-flogogeno ha permesso di ricreare la fase acuta della patologia stessa.

A quel punto sono stati testati diversi approcci farmacologici in grado di contrastare il calo di intermedi della via del mevalonato, e in particolar modo di GGPP, nell'ipotesi di una normalizzazione dell'aumento degli indici di flogosi indotto dal blocco artificiale della via metabolica in esame.

Inizialmente i nostri 2 modelli sono stati, quindi, trattati, con degli isoprenoidi esogeni (GOH, FOH, GGOH e MOH) in grado di inserirsi nella via del mevalonato, a valle della FPPS. Non siamo a conoscenza di come gli isoprenoidi si inseriscano nella via metabolica, anche se è stato ipotizzato che vengano convertiti in GPP, FPP e GGPP mediante due reazioni di fosforilazione (Crick et al., 1995). Tali composti sono risultati molto efficaci nel ridurre i parametri infiammatori considerati, sia *in vitro* (secrezione di IL-1 $\beta$ , IL18, TNF produzione di NO) che *in vivo* (concentrazione di SAA e numero di PEC, livello di colesterolo, IL1  $\beta$ ).

Un effetto analogo a quello ottenuto con gli isoprenoidi è stato dimostrato *in vitro* mediante l'utilizzo di un inibitore della via del mevalonato che agisce

bloccando 1 delle 3 uscite principali della via, e specificatamente la farnesilazione (con la ManA).

L'effetto anti-infiammatorio di questo composto va ricercato nel fatto che l'inibizione di questa uscita dovrebbe reindirizzare gli intermedi isoprenoidi verso la sintesi del GGPP e quindi aumentare indirettamente i livelli di geranilgeranilazione (Figura 5). Tra gli inibitori della via del mevalonato con effetto anti-infiammatorio abbiamo testato nel modello murino la ManA, che si è dimostrata molto efficace replicando i dati ottenuti *in vitro*. Partendo da tale osservazione abbiamo voluto testare nel modello cellulare di Raw l'effetto degli inibitori della farnesilazione, come il Tipifarnib (Braun and Fenaux, 2008) ed il Lonafarnib che sono attualmente in sperimentazione nella pratica clinica come farmaci anti-tumorali e antimetastatici.

Questi risultati aprono la via ad un nuovo possibile utilizzo degli inibitori della farnesilazione anche come farmaci anti-infiammatori. GOH, GGOH, FOH e ManA, che nei modelli *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato essere molto efficaci nel ridurre la risposta infiammatoria indotta dal blocco della via del mevalonato, sono stati quindi testati nei monociti isolati da 2 pazienti affetti da MKD. I risultati confermano i dati ottenuti nei nostri modelli sperimentali, e ci inducono a proseguire la ricerca su questi composti come futuri farmaci nel trattamento della MKD. Allo stesso modo siamo andati a vedere se la migliore combinazione di isoprenoide ed inibitore della farnesil-transferasi (Tipifarnib e geraniolo) riuscisse a determinare un decremento di rilascio di citochine nei monociti dei pazienti. Purtroppo a causa della mancanza di materia prima (FTI) non abbiamo potuto estendere i nostri esperimenti ma contiamo di farlo nel prossimo futuro.

Questi dati ci spingono a proseguire gli studi sugli isoprenoidi per valutare la possibilità di un loro futuro impiego nel trattamento della MKD, e forse di altre patologie infiammatorie.

## **6 PROSPETTIVE FUTURE**

Perseguendo l'obiettivo di approfondire la patogenesi della malattia le possibilità che ci si prospettano sono molteplici ma quelle su cui confidiamo di investire le nostre risorse è soprattutto quello di valutare gli aspetti patogenetici presenti nella mevalonico aciduria che comportano danni psico-motori nel paziente , grazie all'ausilio di modelli malattia in vitro ed in vivo.

In particolare noi contiamo di sviluppare dapprima un modello cellulare neuronale e poi trasporre il tutto su modello murino. I danni neurologici non sono ostati oggetto di studio nei topi KO della via del mevalonato in quanto è pregiudicata la sopravvivenza stessa dell'animale per il quale l'assenza del gene è letale. Nel modello eterozigote (Hager et al., 2007), quest'aspetto non è stato preso in considerazioni in quanto l'attività enzimatica residua(AER) si aggira attorno al 50% e a tale valore non si fa corrispondere la forma di MKD più grave che invece ha un AER inferiore all'1% anche se si indica che gli animali alla 12<sup>a</sup> incominciano ad avere dei movimenti rallentati anomali.

Dati di letteratura, inoltre, ci indicano che topi con difetto dell'enzima colesterolo 24-idrossilasi , un enzima del metabolismo del colesterolo, che manifesta una riduzione del livello di colesterolo e di altri isoprenoidi non steroidei. (Kotti et al., 2006). In corrispondenza a questa condizione si evidenziano a livello sistemico nell'animale danni motori che sembrano essere ridotti dall'aggiunta di geranilgeraniolo. Tali dati sono supportati anche in vitro su prove eseguite su linee cellulari neuronali.

Da parte nostra facendo tesoro di queste osservazioni, un possibile approccio a questo problema potrebbe essere quello di trattare gli animali dalla fase fetale in utero fino a 2 settimane dalla nascita, tempo in cui si sa che termina di svilupparsi il cervelletto. In tali condizioni si potrebbe valutare la ricaduta in termini di problematica motoria. Infine se tutto questo riuscirà ad avere un riscontro effettivo si potrebbe verificare l'effetto antinfiammatorio degli isoprenoidi e degli inibitori della farnesiltransferasi.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- Adami S, Bhalla AK, Dorizzi R, Montesanti F, Rosini S, Salvagno G and Lo Cascio V (1987) The acute-phase response after bisphosphonate administration. *Calcif Tissue Int* **41**:326-331.
- Balgobind B, Wittebol-Post D and Frenkel J (2005) Retinitis pigmentosa in mevalonate kinase deficiency. *J Inherit Metab Dis* **28**:1143-1145.
- Basso AD, Mirza A, Liu G, Long BJ, Bishop WR and Kirschmeier P (2005) The farnesyl transferase inhibitor (FTI) SCH66336 (lonafarnib) inhibits Rheb farnesylation and mTOR signaling. Role in FTI enhancement of taxane and tamoxifen anti-tumor activity. *J Biol Chem* **280**:31101-31108.
- Bergstrom JD, Kurtz MM, Rew DJ, Amend AM, Karkas JD, Bostedor RG, Bansal VS, Dufresne C, VanMiddlesworth FL, Hensens OD and et al. (1993) Zaragozic acids: a family of fungal metabolites that are picomolar competitive inhibitors of squalene synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:80-84.
- Bodar EJ, van der Hilst JC, Drenth JP, van der Meer JW and Simon A (2005) Effect of etanercept and anakinra on inflammatory attacks in the hyper-IgD syndrome: introducing a vaccination provocation model. *Neth J Med* **63**:260-264.
- Braun T and Fenaux P (2008) Farnesyltransferase inhibitors and their potential role in therapy for myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **141**:576-586.
- Chang FY and Lu CL (2009) Treatment of irritable bowel syndrome using complementary and alternative medicine. *J Chin Med Assoc* **72**:294-300.
- Corrado A and Cantatore FP (2005) [The bisphosphonates: chemical characteristics, skeletal biological effects and extra-skeletal effects]. *Reumatismo* **57**:142-153.
- Coward WR, Marei A, Yang A, Vasa-Nicotera MM and Chow SC (2006) Statin-induced proinflammatory response in mitogen-activated peripheral blood mononuclear cells through the activation of caspase-1 and IL-18 secretion in monocytes. *J Immunol* **176**:5284-5292.
- Crick DC, Andres DA and Waechter CJ (1995) Farnesol is utilized for protein isoprenylation and the biosynthesis of cholesterol in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **211**:590-599.
- de Dios Garcia-Diaz J and Alvarez-Blanco MJ (2001) Glucocorticoids but not NSAID abort attacks in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *J Rheumatol* **28**:925-926.
- de Moura Espindola R, Mazzantini RP, Ong TP, de Conti A, Heidor R and Moreno FS (2005) Geranylgeraniol and beta-ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappaB activation. *Carcinogenesis* **26**:1091-1099.
- Deng X, Yu Z, Funayama H, Shoji N, Sasano T, Iwakura Y, Sugawara S and Endo Y (2006) Mutual augmentation of the induction of the histamine-forming enzyme, histidine decarboxylase, between alendronate and immuno-stimulants (IL-1, TNF, and LPS), and its prevention by clodronate. *Toxicol Appl Pharmacol* **213**:64-73.
- Drenth JP, Cuisset L, Grateau G, Vasseur C, van de Velde-Visser SD, de Jong JG, Beckmann JS, van der Meer JW and Delpech M (1999) Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. International Hyper-IgD Study Group. *Nat Genet* **22**:178-181.
- Drenth JP, Vonk AG, Simon A, Powell R and van der Meer JW (2001) Limited efficacy of thalidomide in the treatment of febrile attacks of the hyper-IgD and periodic fever syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Pharmacol Exp Ther* **298**:1221-1226.

- Feingold KR, Hardardottir I, Memon R, Krul EJ, Moser AH, Taylor JM and Grunfeld C (1993) Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters. *J Lipid Res* **34**:2147-2158.
- Frenkel J, Houten SM, Waterham HR, Wanders RJ, Rijkers GT, Duran M, Kuijpers TW, van Luijk W, Poll-The BT and Kuis W (2001) Clinical and molecular variability in childhood periodic fever with hyperimmunoglobulinaemia D. *Rheumatology (Oxford)* **40**:579-584.
- Frenkel J, Rijkers GT, Mandey SH, Buurman SW, Houten SM, Wanders RJ, Waterham HR and Kuis W (2002) Lack of isoprenoid products raises ex vivo interleukin-1beta secretion in hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Arthritis Rheum* **46**:2794-2803.
- Frey T and De Maio A (2007) Increased expression of CD14 in macrophages after inhibition of the cholesterol biosynthetic pathway by lovastatin. *Mol Med* **13**:592-604.
- Haas D and Hoffmann GF (2006) Mevalonate kinase deficiencies: from mevalonic aciduria to hyperimmunoglobulinemia D syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **1**:13.
- Hager EJ, Tse HM, Piganelli JD, Gupta M, Baetscher M, Tse TE, Pappu AS, Steiner RD, Hoffmann GF and Gibson KM (2007) Deletion of a single mevalonate kinase (Mvk) allele yields a murine model of hyper-IgD syndrome. *J Inherit Metab Dis* **30**:888-895.
- Hoffmann GF, Charpentier C, Mayatepek E, Mancini J, Leichsenring M, Gibson KM, Divry P, Hrebicek M, Lehnert W, Sartor K and et al. (1993) Clinical and biochemical phenotype in 11 patients with mevalonic aciduria. *Pediatrics* **91**:915-921.
- Houten SM, Frenkel J, Rijkers GT, Wanders RJ, Kuis W and Waterham HR (2002) Temperature dependence of mutant mevalonate kinase activity as a pathogenic factor in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Hum Mol Genet* **11**:3115-3124.
- Houten SM, Frenkel J and Waterham HR (2003) Isoprenoid biosynthesis in hereditary periodic fever syndromes and inflammation. *Cell Mol Life Sci* **60**:1118-1134.
- Houten SM, Kuis W, Duran M, de Koning TJ, van Royen-Kerkhof A, Romeijn GJ, Frenkel J, Dorland L, de Barse MM, Huijbers WA, Rijkers GT, Waterham HR, Wanders RJ and Poll-The BT (1999) Mutations in MVK, encoding mevalonate kinase, cause hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Nat Genet* **22**:175-177.
- Houten SM, Wanders RJ and Waterham HR (2000) Biochemical and genetic aspects of mevalonate kinase and its deficiency. *Biochim Biophys Acta* **1529**:19-32.
- Hubner C, Hoffmann GF, Charpentier C, Gibson KM, Finckh B, Puhl H, Lehr HA and Kohlschutter A (1993) Decreased plasma ubiquinone-10 concentration in patients with mevalonate kinase deficiency. *Pediatr Res* **34**:129-133.
- Iftakhar EKI, Koide N, Hassan F, Noman AS, Dagvadorj J, Tumurkhuu G, Naiki Y, Komatsu T, Yoshida T and Yokochi T (2009) Novel mechanism of U18666A-induced tumour necrosis factor-alpha production in RAW 264.7 macrophage cells. *Clin Exp Immunol* **155**:552-558.
- Kotti TJ, Ramirez DM, Pfeiffer BE, Huber KM and Russell DW (2006) Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3869-3874.
- Kuijk LM, Beekman JM, Koster J, Waterham HR, Frenkel J and Coffey PJ (2008a) HMG-CoA reductase inhibition induces IL-1beta release through Rac1/PI3K/PKB-dependent caspase-1 activation. *Blood* **112**:3563-3573.

- Kuijk LM, Mandey SH, Schellens I, Waterham HR, Rijkers GT, Coffey PJ and Frenkel J (2008b) Statin synergizes with LPS to induce IL-1 $\beta$  release by THP-1 cells through activation of caspase-1. *Mol Immunol* **45**:2158-2165.
- Lackner MR, Kindt RM, Carroll PM, Brown K, Cancilla MR, Chen C, de Silva H, Franke Y, Guan B, Heuer T, Hung T, Keegan K, Lee JM, Manne V, O'Brien C, Parry D, Perez-Villar JJ, Reddy RK, Xiao H, Zhan H, Cockett M, Plowman G, Fitzgerald K, Costa M and Ross-Macdonald P (2005) Chemical genetics identifies Rab geranylgeranyl transferase as an apoptotic target of farnesyl transferase inhibitors. *Cancer Cell* **7**:325-336.
- Lane KT and Beese LS (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J Lipid Res* **47**:681-699.
- Makkonen N, Salminen A, Rogers MJ, Frith JC, Urtti A, Azhayeveva E and Monkkonen J (1999) Contrasting effects of alendronate and clodronate on RAW 264 macrophages: the role of a bisphosphonate metabolite. *Eur J Pharm Sci* **8**:109-118.
- Mandey SH, Kuijk LM, Frenkel J and Waterham HR (2006) A role for geranylgeranylation in interleukin-1 $\beta$  secretion. *Arthritis Rheum* **54**:3690-3695.
- Merat S, Khalili S, Mostajabi P, Ghorbani A, Ansari R and Malekzadeh R (2009) The Effect of Enteric-Coated, Delayed-Release Peppermint Oil on Irritable Bowel Syndrome. *Dig Dis Sci*.
- Merx MW, Liehn EA, Graf J, van de Sandt A, Schaltenbrand M, Schrader J, Hanrath P and Weber C (2005) Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation* **112**:117-124.
- Milhavet F, Cuisset L, Hoffman HM, Slim R, El-Shanti H, Aksentijevich I, Lesage S, Waterham H, Wise C, Sarrauste de Menthiere C and Touitou I (2008) The infevers autoinflammatory mutation online registry: update with new genes and functions. *Hum Mutat* **29**:803-808.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55-63.
- Nantais DE, Schwemmler M, Stickney JT, Vestal DJ and Buss JE (1996) Prenylation of an interferon-gamma-induced GTP-binding protein: the human guanylate binding protein, huGBP1. *J Leukoc Biol* **60**:423-431.
- Newsom DM, Bolgos GL, Colby L and Nemzek JA (2004) Comparison of body surface temperature measurement and conventional methods for measuring temperature in the mouse. *Contemp Top Lab Anim Sci* **43**:13-18.
- Ong TP, Heidor R, de Conti A, Dagli ML and Moreno FS (2006) Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis* **27**:1194-1203.
- Peterson YK, Kelly P, Weinbaum CA and Casey PJ (2006) A novel protein geranylgeranyltransferase-I inhibitor with high potency, selectivity, and cellular activity. *J Biol Chem* **281**:12445-12450.
- Schneiders MS, Houten SM, Turkenburg M, Wanders RJ and Waterham HR (2006) Manipulation of isoprenoid biosynthesis as a possible therapeutic option in mevalonate kinase deficiency. *Arthritis Rheum* **54**:2306-2313.
- Simon A, Drewe E, van der Meer JW, Powell RJ, Kelley RI, Stalenhoef AF and Drenth JP (2004) Simvastatin treatment for inflammatory attacks of the

- hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Clin Pharmacol Ther* **75**:476-483.
- Simon A, Mariman EC, van der Meer JW and Drenth JP (2003) A founder effect in the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Am J Med* **114**:148-152.
- Toyraas A, Ollikainen J, Taskinen M and Monkkonen J (2003) Inhibition of mevalonate pathway is involved in alendronate-induced cell growth inhibition, but not in cytokine secretion from macrophages in vitro. *Eur J Pharm Sci* **19**:223-230.
- van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lowik C and Papapoulos S (1999) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **255**:491-494.
- van der Meer JW, Vossen JM, Radl J, van Nieuwkoop JA, Meyer CJ, Lobatto S and van Furth R (1984) Hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever: a new syndrome. *Lancet* **1**:1087-1090.
- Xu G, Pan J, Martin C and Yeung SC (2001) Angiogenesis inhibition in the in vivo antineoplastic effect of manumycin and paclitaxel against anaplastic thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:1769-1777.
- Xue X, Lai KT, Huang JF, Gu Y, Karlsson L and Fourie A (2006) Anti-inflammatory activity in vitro and in vivo of the protein farnesyltransferase inhibitor tipifarnib. *J Pharmacol Exp Ther* **317**:53-60.
- Yamaguchi K, Motegi K, Iwakura Y and Endo Y (2000) Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates in mice. *Br J Pharmacol* **130**:1646-1654.
- Zhang FL and Casey PJ (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**:241-269.

## *Ringraziamenti*

*Ringrazio il dott. Alberto Tommasini, ideatore di questo progetto, per aver dato l'avvio a questa nuova linea di ricerca frutto di una delle sue "speciali" intuizioni e per avermi dato fiducia e autonomia nello svolgimento di questo lavoro.*

*Un doveroso ringraziamento rivolgo alla dott.ssa Alessandra Pontillo per avermi dato la possibilità di partecipare a questo progetto nato tra molte difficoltà ma seguito nel tempo con tanta energia. A lei, va tutta la mia gratitudine per la grinta e la dedizione con cui porta avanti questo studio a cui siamo tanto affezionate e in cui crediamo!*

*Infine grazie a tutto il personale del laboratorio, ed in particolare a Luigina e a Sara, che mi hanno aiutato nel condurre questo lavoro di tesi di dottorato.*

*Grazie di cuore a tutti!*