

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.

Laurea di primo livello in Biologia Molecolare



Elaborato di laurea

**POLIMORFISMI GENETICI E FUNZIONE DELLE
GLUTATIONE S-TRANSFERASI
NELLA RESISTENZA A FARMACI ANTITUMORALI**

Tutor: Ch. mo Dott. Luigi Quintieri

Dipartimento di Farmacologia e Anestesiologia

Laureando: Damiano Rami

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

“Credo di poter affermare che nella ricerca scientifica né il grado di intelligenza né la capacità di eseguire e portare a termine il compito intrapreso siano fattori essenziali per la riuscita e per la soddisfazione personale. Nell'uno e nell'altra contano maggiormente della totale dedizione e il chiudere gli occhi davanti alle difficoltà: in tal modo possiamo affrontare i problemi che altri, più critici e più acuti, non affronterebbero” (Rita Levi-Montalcini).

Indice

Indice	5
Abstract	7
Introduzione	9
Il glutatione	9
Struttura generale e meccanismo catalitico delle GST	11
Metabolismo degli xenobiotici e dei composti endogeni	12
Funzioni non catalitiche delle GST	12
Polimorfismi genetici delle GST citosoliche umane	13
GST Alpha	14
- Espressione e polimorfismi genetici	
- Suscettibilità allo sviluppo di neoplasie e risposta ai farmaci antitumorali	
GST Mu	16
- Espressione e polimorfismi genetici	16
- Suscettibilità allo sviluppo di neoplasie e risposta ai farmaci antitumorali	16
GST Pi	18
- Espressione e polimorfismi genetici	18
- Suscettibilità allo sviluppo di neoplasie e risposta ai farmaci antitumorali	18
Funzioni non enzimatiche della proteina GSTP1	20
GSTP, stress ossidativo e signaling cellulare	20
GST Theta	22
- Espressione e polimorfismi genetici	22
- Suscettibilità allo sviluppo di neoplasie e risposta ai farmaci antitumorali	22
Conclusioni	23
Bibliografia	25
Ringraziamenti	27

ABSTRACT

Alcune glutatione S-transferasi (GST) citosoliche umane, oltre a catalizzare l'inattivazione di agenti cancerogeni e farmaci antitumorali, per coniugazione con il tripeptide glutatione (GSH), sembrano giocare un ruolo importante nello sviluppo di neoplasie e nella risposta alla chemioterapia antitumorale, in virtù della loro capacità di interagire con alcune proteine coinvolte nella regolazione della crescita cellulare e dell'apoptosi. Ad oggi è noto che la maggior parte dei geni *GST* presentano polimorfismi, i quali influenzano la trascrizione e/o la funzione delle proteine da essi codificate. Alcune varianti alleliche *GST*, inoltre, sembrano essere associate a variazioni significative nella risposta dei pazienti alla chemioterapia antitumorale.

Introduzione

Le glutatione S-transferasi (GST, EC 2.5.1.18) costituiscono una superfamiglia di proteine, note per la loro capacità di catalizzare l'attacco nucleofilo del glutatione ridotto (γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina, GSH) con atomi carenti di densità elettronica, presenti in vari xenobiotici, metaboliti di fase I di xenobiotici, e in alcuni prodotti del metabolismo cellulare. Precisamente, la reazione tra GSH ed elettrofili porta alla formazione di coniugati fortemente idrofilici, generalmente privi di significativa attività biologica, escreti rapidamente dall'organismo. I substrati delle GST sono generalmente fortemente idrofobici e contengono un atomo di carbonio, azoto, ossigeno o zolfo, che costituisce il sito elettrofilo (Hayes *et al.* 2005, Ruzza *et al.* 2009).

Il glutatione

Il GSH (fig. 1) è un tripeptide costituito da glicina (Gly), L-cisteina (Cys) e acido L-glutammico (Gln) sintetizzato nel citosol, a partire dagli aminoacidi costituenti, in due passaggi ATP-dipendenti. Nel GSH il carbossile γ del Gln forma il legame carbamidico con il gruppo amminico della Cys (Hayes *et al.* 2005 e ref. cit.).

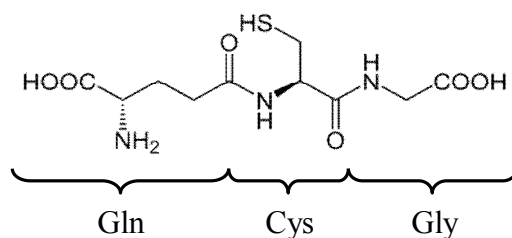


Fig. 1

Oltre a formare coniugati con composti elettrofili, il GSH svolge numerose altre funzioni, fra le quali (a) il mantenimento dei residui di Cys, di alcune proteine citoplasmatiche, nella forma ridotta, in una reazione catalizzata dall'enzima GSH reduttasi (EC 1.8.1.7), (b) la degradazione dell' H_2O_2 e dei perossidi lipidici, (c) la rigenerazione, della forma attiva, per riduzione, delle vitamine antiossidanti C ed E. Il GSH è presente, in forma ridotta, in vari tessuti e soprattutto nel fegato, organo nel quale può raggiungere una concentrazione pari a 10 mM (Hayes *et al.* 2005 e ref. cit.).

Nei mammiferi i prodotti di coniugazione con il GSH possono traslocare dal citosol nei fluidi extracellulari grazie alla presenza di alcuni trasportatori di efflusso, appartenenti alla superfamiglia delle proteine ABC (*ATP-binding cassette*), tra cui le MRP (*multi-drug resistance associated protein*). Nel caso degli epatociti i trasportatori di efflusso, in grado di riconoscere coniugati del

GSH, sono presenti, oltre che sulla membrana baso-laterale (rivolta verso i sinusoidi), anche sulla membrana canalicolare. Questi ultimi consentono l'escrezione biliare di coniugati con GSH (Hayes *et al.* 2005 e ref. cit., Ruzza *et al.* 2009 e ref. cit.).

Un secondo possibile destino dei coniugati del GSH è il metabolismo, attraverso la via degli acidi mercapturici, con formazione di addotti della cisteinilglicina (X-CG), della Cys (X-CYS) e della N-acetilcisteina (X-NAC, acidi mercapturici). Questi sono formati dall'azione, in sequenza, degli enzimi GGT (γ -glutamiltranspeptidasi), APM (amino peptidasi), e NAT (N-acetiltransferasi). La GGT è sintetizzata negli epatociti e nelle cellule epiteliali biliari ed è localizzata all'interno della membrana dei canalicoli biliari e della membrana luminale. La proteina NAT1 umana si trova in molti tessuti, mentre l'isoforma NAT2 è presente in modo predominante nell'intestino e nel fegato (Hayes *et al.* 2005 e ref. cit., Ruzza *et al.* 2009 e ref. cit.).

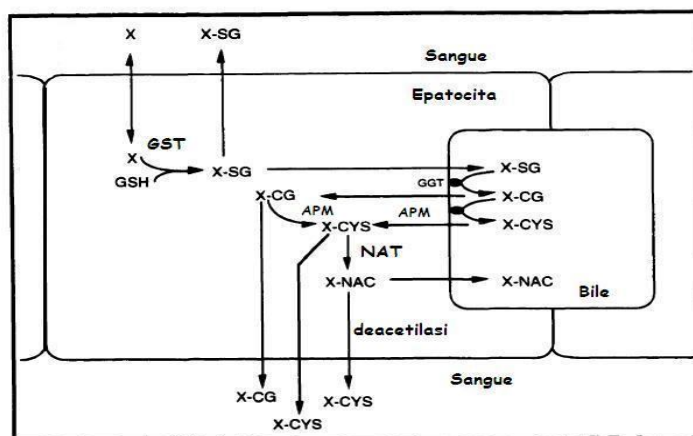


Fig. 2

La figura 2 mostra il destino dei coniugati con il GSH (X-SG) a livello dell'epatocita (modificata da Tirona, Rommel Giongco: ***Distributed-in-space glutathione conjugation kinetics of ethacrynic acid in liver.*** Dissertation, Jan 2000. Graduate Department of Pharmaceutical Sciences, University of Toronto).

Sulla base della loro localizzazione subcellulare, le GST degli eucarioti possono essere distinte in citosoliche, mitocondriali e microsomiali. Le GST citosoliche e mitocondriali sono proteine solubili e presentano forti analogie nella loro struttura quaternaria. Le GST microsomiali (*membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*, MAPEG) non sembrano giocare un ruolo significativo nel metabolismo degli xenobiotici, ma sono implicate nella biosintesi di prostanoidi e leucotrieni, molecole di segnale endogene di natura lipidica (Ruzza *et al.* 2009).

Le GST citosoliche umane (hGST) sono altamente polimorfiche e sono suddivise in sette classi, *Alfa* (α), *Mu* (μ), *Pi* (π), *Sigma* (σ), *Theta* (θ), *Zeta* (ζ), *Omega* (ω), sulla base del grado di identità nella sequenza aminoacidica, specificità di substrato, immuno-reattività e similarità nella struttura terziaria e quaternaria. Le GST della medesima classe mostrano più del 60% di identità di sequenza aminoacidica (Ruzza *et al.* 2009). Le classi GST ζ e GST ω sono state caratterizzate usando un approccio bioinformatico. Altre classi di GST citosoliche sono presenti nei batteri (*Beta*, β), negli insetti (*Delta*, δ), e nelle piante (*Phi*, ϕ e *Tau*, τ) (Ruzza *et al.* 2009 e ref. cit.).

Struttura generale e meccanismo catalitico delle GST

Tutte le GST solubili in forma attiva sono dimeri, con una massa molecolare di ~50 kDa, costituiti da due catene polipeptidiche identiche (omodimeri) o codificate da due geni distinti (eterodimeri). La formazione di eterodimeri è ristretta alle subunità della stessa classe (Ruzza *et al.* 2009). La struttura tridimensionale di alcune GST solubili è stata recentemente risolta grazie alla cristallografia ai raggi X (Ruzza *et al.* 2009). Ogni subunità delle GST solubili contiene un primo sito, chiamato *GSH-binding site* (*G-site*), il quale può riconoscere e legare il GSH, e un secondo sito di riconoscimento, chiamato *Hydrophobic-binding site* (*H-site*), in grado di legare composti idrofobici a carattere elettrofilo di varia natura. Il dominio N-terminale include la maggior parte degli aminoacidi coinvolti nella formazione del *G-site* ed è abbastanza conservato tra le classi, mentre il dominio C-terminale (α -elica) forma la gran parte dell'*H-site* ed è più divergente. La variazione nella composizione degli aminoacidi idrofobici dell'*H-site* viene a determinare la specificità di substrato (Ruzza *et al.* 2009 e ref. cit.).

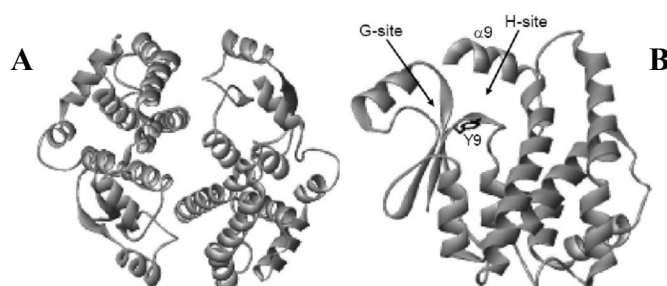


Fig. 3

In figura 3 è riportata una rappresentazione della struttura quaternaria della GSTA4-4 umana (A) (PDB: 1GUM) e la localizzazione dei siti di legame del GSH e del substrato elettrofilo nel contesto del singolo monomero (B). L' α -elica C-terminale, caratteristica della classe GST Alfa, è denominata $\alpha 9$.

Il *G-site* delle GST delle classi Alfa, Mu e Pi contiene un residuo di tirosina (Tyr) o serina (Ser), il quale ha un ruolo cruciale nell'attivazione del tripeptide. Il legame ad idrogeno, tra il residuo di Tyr o Ser del *G-site* e il gruppo tiolico del GSH, contribuisce all'abbassamento del pK_a del tripeptide, da $\sim 9,3$ in soluzione, a ~ 7 nel contesto del sito attivo dell'enzima, promuovendo la formazione dell'anione tiolato GS^- , nucleofilo più forte del gruppo sulfidrilico indissociato (-SH). Il ruolo chiave degli aminoacidi Tyr e Ser nell'attività catalitica di alcune GST solubili è stato confermato da esperimenti di mutagenesi sito-diretta. Altre classi di GST hanno un residuo di Cys nel loro *G-site*, il quale forma un ponte disolfuro con il GSH. Questi enzimi mostrano una debole attività coniugativa, ma sono implicati in reazioni redox (Ruzza *et al.* 2009).

Metabolismo degli xenobiotici e dei composti endogeni

Come già accennato le GST sono coinvolte nella detossificazione, attraverso la coniugazione con il GSH, di vari xenobiotici e loro metaboliti di fase I, tra cui vari agenti cancerogeni, sostanze inquinanti ambientali e farmaci chemioterapici antitumorali. Le reazioni coniugative catalizzate dal GST includono reazioni di sostituzione nucleofila, addizioni di Michael su composti carbonilici α,β -insaturi e l'apertura di anelli epossidici. Le GST citosoliche possono inoltre catalizzare reazioni non coniugative, tra cui perossidazioni, isomerizzazioni cis-trans e reazioni tiol-transferasiche. Le GST hanno anche un ruolo importante nella detossificazione di vari composti endogeni, tra cui idroperossidi, derivanti dal danno ossidativo di lipidi e acidi nucleici, e *o*-chinoni, derivanti dall'ossidazione fisiologica delle catecolamine (Hayes *et al.* 2005, Ruzza *et al.* 2009). È importante sottolineare che non tutti i prodotti delle reazioni catalizzate dalle GST sono privi di tossicità. In alcuni casi, infatti, l'attività delle GST porta alla formazione di metaboliti citotossici reattivi e/o cancerogeni (Ruzza *et al.* 2009).

Funzioni non catalitiche delle GST

È noto da molti anni che alcune GST solubili legano, senza catalizzarne la biotrasformazione, vari composti idrofobici a peso molecolare relativamente elevato (> 400 Da), tra i quali gli acidi biliari, l'eme, la bilirubina, vari steroidi e alcuni farmaci. Il legame si associa ad una inibizione non-competitiva dell'attività enzimatica, e sembra possa essere importante per il trasporto di tali composti nella fase acquosa della cellula. Più recentemente è emerso che alcune GST solubili legano proteine intracellulari coinvolte nella trasduzione del segnale, tra cui la *c-Jun-N-terminal Kinase* (JNK) e l'*activator of S phase kinase* (ASK) (Ruzza *et al.* 2009).

Polimorfismi genetici delle GST citosoliche umane

Le classi Alfa, Mu, Theta e Omega della superfamiglia delle GST citosoliche umane contengono, ciascuna, diversi geni derivanti da eventi di duplicazione genica. Geni GST appartenenti alla medesima classe formano un *cluster* sullo stesso cromosoma (fig. 4) (Sherrat *et al.* 2001 e ref. cit.). Per contro, il genoma umano codifica una sola proteina delle classi Pi e Zeta (McIlwain CC *et al.* 2006). La classificazione più recente vuole che il nome della sottofamiglia di ogni GST sia abbreviato usando la prima lettera romana del nome della classe, seguita da un numero arabo indicante il singolo prodotto genico. A tale numero può seguire una lettera romana, facente riferimento alla variante allelica. Ad esempio, GSTM1A-1B è un enzima appartenente alla classe Mu ed è un omodimero, composto da due varianti alleliche diverse del polipeptide 1 (Ruzza *et al.* 2009).

Classe	Gene	Localizzazione cromosomica
Alfa (α)	GSTA1	6p12
	GSTA2	6p12.2
	GSTA3	6p12
	GSTA4	6p12
	GSTA5	6p12.1
Mu (μ)	GSTM1	1p13.3
	GSTM2	1p13
	GSTM3	1p13.3
	GSTM4	1p13.3
	GSTM5	1p13.3
Pi (π)	GSTP1	11q13
Theta (θ)	GSTT1	22q11.2
	GSTT2	22q11.2

Tab.1

La tabella 1 mostra la localizzazione cromosomica dei geni appartenenti ad alcune classi di GST citosoliche umane (McIlwain CC *et al.* 2006).

Numerosi geni GST umani sono polimorfi. Le varianti alleliche osservate originano, frequentemente, da mutazioni (sostituzioni nucleotidiche) o, meno comunemente, da delezioni. La variabilità allelica delle GST è molto comune nella popolazione e fornisce un contributo significativo alle differenze inter-individuali nel metabolismo dei farmaci e, più in generale, degli xenobiotici (Sherrat *et al.* 2001, Lo HW e Ali-Osman F. 2007 e ref. cit.).

Allele	Variabilità nucleotidica
GSTA1*A	<i>Wild-type</i>
GSTA1*B	Mutazioni puntiformi sul promotore
GSTA2*A	Pro110;Ser112;Lys196;Glu210
GSTA2*B	Pro110;Ser112;Lys196;Ala210
GSTA2*C	Pro110;Thr112;Lys196;Glu210
GSTA2*D	Pro110;Ser112;Asn196;Glu210
GSTA2*E	Ser110;Ser112;Lys196;Glu210
GSTM1*A	Lys173
GSTM1*B	Asn173
GSTM1*0	Delezione
GSTM1*1x2	Duplicazione
GSTM3*A	<i>Wild-type</i>
GSTM3*B	Delezione di 3 basi nell'introne 6
GSTM4*A	Tyr2517
GSTM4*B	Cyt2517
GSTP1*A	Ile105;Ala114
GSTP1*B	Val105;Ala114
GSTP1*C	Val105;Val114
GSTP1*D	Ile105;Val114
GSTT1*A	Thr104
GSTT1*B	Pro104
GSTT1*0	Delezione
GSTT2*A	Met139
GSTT2*B	Ile139

Tab.2

La tabella 2 mostra la variabilità allelica delle GST citosoliche umane presente nella popolazione (McIlwain CC *et al.* 2006).

GST Alfa

Espressione e polimorfismi genetici

La classe delle GST Alfa umane comprende 5 geni (*A1-A5*), e 7 pseudogeni, i quali formano un *cluster* localizzato sul cromosoma 6p12.1-6p12.2 (Coles *et al.* 2005). Mentre *GSTA1*, *GSTA2* e *GSTA4* risultano espressi nei tessuti di vari organi, in particolare nel fegato e nei reni, *GSTA3* è espressa a livelli significativi solo in un numero limitato di tessuti, in particolare la placenta, le ghiandole surrenali e le gonadi. Per contro, *GSTA5* non è stata identificata come prodotto genico in nessun tessuto analizzato (McIlwain *et al.* 2006). I sette pseudogeni sono caratterizzati dall'assenza di esoni, da delezioni a singolo nucleotide negli

esoni, dalla presenza di codoni di stop nell'ORF (*Open Reading Frame*) o da segnali di *splicing* irregolari (Coles *et al.* 2005).

GSTA1-1 e GSTA2-2 catalizzano la detossificazione, per coniugazione con GSH, di metaboliti cancerogeni di inquinanti ambientali, fra cui alcuni idrocarburi policiclici aromatici (IPA) contenuti nel fumo di sigaretta, e di vari agenti alchilanti utilizzati nella chemioterapia dei tumori, tra cui la ciclofosfamida ed il busulfan. Questi due enzimi hanno, inoltre, attività perossidasi nei confronti di idroperossidi derivanti da lipidi endogeni. GSTA3-3 ha un ruolo importante nella biosintesi degli ormoni steroidei, mentre GSTA4-4 coniuga il GSH al 4-idrossinonenale, un prodotto citotossico derivato dalla perossidazione lipidica (Coles *et al.* 2005).

Suscettibilità allo sviluppo di neoplasie e risposta ai farmaci antitumorali

I risultati epidemiologici mostrano che l'espressione aberrante di GST Alfa è collegata all'aumento del rischio di sviluppare il cancro coloretale, il cancro ovarico e il carcinoma renale a cellule chiare (Coles *et al.* 2001, Coles *et al.* 2005, McIlwain *et al.* 2006).

Del gene *GSTA1* sono note due varianti alleliche (*A1*A* e *A1*B*), le quali differiscono nelle regioni promotoriali, sulla base di tre sostituzioni a singolo nucleotide nelle posizioni -567, -69 e -52. È stato dimostrato che la sostituzione nucleotidica a -52 aumenta l'attività trascrizionale del gene *GSTA1*A*, quindi negli individui eterozigoti o omozigoti per la variante *A1*B* la proteina A1 risulta essere espressa a più bassi livelli, rispetto agli individui omozigoti per l'allele *A1*A* (McIlwain *et al.* 2006).

Coles e colleghi hanno recentemente dimostrato che la variante allelica *GSTA1*B* è associata ad una maggiore suscettibilità nell'insorgenza del cancro coloretale (CRC), tipologia di cancro diagnosticata più frequentemente nel tratto gastro-intestinale. In particolare, il rischio di CRC raddoppia per gli individui omozigoti *GSTA1*B/*B*, e addirittura triplica se questi assumono frequentemente carne rossa. L'effetto è probabilmente dovuto alla ridotta detossificazione epatica, da parte di GSTA1, negli omozigoti *A1*B*, di un derivato mutageno di un'ammina eterociclica presente nella carne cotta (Coles *et al.* 2001, Coles *et al.* 2005).

Una bassa espressione di GSTA1, conseguente alla presenza della variante allelica *A1*B*, si associa ad una migliore risposta alla chemioterapia con l'agente alchilante ciclofosfamida (in associazione ad altri farmaci), in pazienti con carcinoma mammario eterozigoti o omozigoti per l'allele *A1*A* (Lo HW e Ali-Osman F. 2007 e ref. cit.). Uno studio recente ha dimostrato che individui con il genotipo omozigote *GSTA1*A/*A* eliminano più velocemente il busulfan, rispetto

a quelli con il genotipo eterozigote *GSTA1*A/*B* (Lo HW e Ali-Osman F. 2007 e ref. cit.).

Del gene *GSTA2* sono note cinque varianti alleliche (*A2*A*, *A2*B*, *A2*C*, *A2*D* e *A2*E*), le quali differiscono per polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) presenti nella sequenza genica. Le proteine *GSTA2*A-D* sono più attive, dal punto di vista catalitico, rispetto alla variante *GSTA2*E*. La variazione dell'attività catalitica, secondo uno studio pubblicato da Ning *et al.* nel 2004, è dovuta alla sostituzione di un residuo aminoacidico molto conservato di prolina (McIlwain *et al.* 2006).

Fino ad oggi non sono stati riportati polimorfismi dei geni *GSTA3*, *A4* e *A5* (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

GST Mu

Espressione e polimorfismi genetici

La classe delle GST Mu umane comprende 5 geni (*M1-M5*), localizzati in *cluster* sul cromosoma 1p13 (McIlwain *et al.* 2006, Lo HW e Ali-Osman F. 2007). Del gene *GSTM1* sono noti quattro alleli funzionali: *GSTM1*A*, *GSTM1*B*, *GSTM1*0*, un allele nullo (deleto) e *GSTM1*1x2*, un allele duplicato. *GSTM1*A* e *GSTM1*B* codificano proteine con attività enzimatica sovrapponibile, che differiscono per una sostituzione aminoacidica nel codone 173 (K173N), la quale non comporta una modifica dell'attività enzimatica (McIlwain *et al.* 2006).

Suscettibilità allo sviluppo di neoplasie e risposta ai farmaci antitumorali

La presenza dell'allele *GSTM1*A* sembra essere associata ad una diminuzione del rischio di sviluppare cancro alla vescica, probabilmente in relazione al ruolo svolto da queste proteine nella detossificazione di cancerogeni specifici per la vescica (McIlwain *et al.* 2006 e ref. cit.).

La perdita della funzione dell'enzima GSTM è attribuita alla delezione di questo gene, in omozigosi, la quale risulta nella formazione dell'allele nullo *GSTM1*0*. Xu *et al.* hanno dimostrato che la mutazione è uno dei possibili risultati di un *crossing over* ineguale dei loci *M1* e *M2*, i quali sono localizzati in stretta vicinanza sul cromosoma. La frequenza del gene *GSTM1*0* è elevata nella popolazione mondiale, infatti il genotipo nullo è presente nel 67% degli individui australiani e nel 50% dei caucasici. Il fenotipo nullo *GSTM1*0* è associato ad un aumento del rischio di sviluppare alcune neoplasie, tra cui il cancro al polmone, al colon e alla vescica, ed è anche stato associato ad un aumento della risposta ad alcuni chemioterapici (McIlwain *et al.* 2006 e ref. cit.).

Ad esempio, nei bambini in età pediatrica con leucemia linfoblastica acuta (ALL) e nei pazienti affetti da carcinoma ovarico il genotipo *GSTM1*0* è associato ad una sopravvivenza maggiore, rispetto ai genotipi *GSTM1*A* e *GSTM1*B* (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

Inoltre, altri studi hanno dimostrato che i pazienti *GSTM1*0*, affetti da leucemia mieloide acuta (AML) o con cancro ovarico, mostrano una risposta migliore al trattamento con adriamicina (doxorubicina) e ciclofosfamide (McIlwain *et al.* 2006). Il fenomeno può essere spiegato poiché gli individui sono incapaci di metabolizzare e inattivare i suddetti agenti antitumorali (Lo HW e Ali-Osman F. 2007). Per contro, uno studio recente ha dimostrato che nel cancro al polmone il genotipo *GSTM1*0* determina una minore sopravvivenza dei pazienti (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

Fino ad oggi, non sono stati riportati polimorfismi genetici per il gene *GSTM2* (Lo HW e Ali-Osman F. 2007). Questa proteina cerebrale catalizza la biosintesi della prostaglandina E2 (PGE₂ sintetasi citosolica) e la coniugazione con GSH di *o*-chinoni potenzialmente citotossici, derivanti dall'ossidazione delle catecolamine endogene dopamina, noradrenalina e adrenalina. In particolare, si ritiene che, grazie a questa attività, *GSTM2* svolga un ruolo protettivo nei confronti di malattie neurodegenerative, come il Parkinson e la schizofrenia (McIlwain *et al.* 2006 e ref. cit.).

Del gene *GSTM3* sono note due varianti alleliche (*M3*A* e *M3*B*). L'allele *GSTM3*B* presenta una delezione di tre paia di basi nell'introne 6, la quale crea un sito di legame per un particolare fattore trascrizionale (Ying Yang 1, YY1), determinando l'espressione differenziale delle due varianti geniche (Lo HW e Ali-Osman F. 2007). Uno studio recente ha valutato la possibile esistenza di una relazione tra l'espressione di *GSTM3* e l'incidenza di astrocitoma, non evidenziando alcun legame tra i due (McIlwain *et al.* 2006).

Per contro, i genotipi omozigoti *GSTM3*A/*A* e *GSTM3*B/*B* sono risultati associati, rispettivamente, ad un aumento del rischio di sviluppare il cancro della laringe a cellule squamose, e ad una riduzione del rischio di sviluppo di tumori del tratto oro-faringeo (McIlwain *et al.* 2006).

Altri studi hanno dimostrato che il genotipo omozigote *GSTM3*A/*A* è presente molto frequentemente in pazienti affetti da carcinoma basocellulare, rispetto al genotipo omozigote *GSTM3*B/*B* (McIlwain *et al.* 2006). Uno studio recente ha dimostrato che il genotipo *GSTM3*A/*A* è raramente osservato in pazienti portatori di tumore primitivo del colon-retto in stadio avanzato e alla presenza di metastasi (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

Rispetto ai geni *GSTM1* e *GSTM2*, il gene *GSTM3* è più attivo nel metabolizzare alcuni agenti alchilanti usati nella terapia dei tumori, tra cui il 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU) (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

Basandosi sui dati attuali, l'effetto dei polimorfismi del gene *GSTM*, ai fini della suscettibilità all'insorgenza dei tumori, varia in funzione dell'istotipo considerato (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

GST Pi

Espressione e polimorfismi genetici

La classe GST Pi è codificata da un singolo gene, localizzato sul cromosoma 11q13 (Lo HW e Ali-Osman F. 2007). La proteina GSTP è espressa, ad eccezione del fegato (epatociti), in tutti i tessuti dell'organismo umano (Henderson CJ *et al.* 2005). La proteina GSTP1 è sovraespressa in una ampia gamma di tumori umani, inclusi i carcinomi ovarico, polmonare non a piccole cellule (NSCLC), della mammella, del colon, del pancreas e nei linfomi e sembra giocare un ruolo importante sia nello sviluppo della neoplasia, sia nella entità della risposta ai farmaci antitumorali (McIlwain *et al.* 2006).

Del gene *GSTP1* sono note quattro differenti varianti alleliche: *GSTP1*A*, *GSTP1*B*, *GSTP1*C* e *GSTP1*D*. Questi alleli derivano da due transizioni, localizzate nei codoni 105 (I105V) e 114 (A114V). Evidenze crescenti dimostrano che le diverse varianti alleliche *GSTP1* metabolizzano vari agenti antitumorali con efficienza che varia a seconda dell'allele e del farmaco considerati (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

Suscettibilità allo sviluppo di neoplasie e risposta ai farmaci antitumorali

La proteina codificata dall'allele *GSTP1*A*, ad esempio, presenta un'attività catalitica superiore, rispetto a quella degli alleli *GSTP1*B* e *GSTP1*C*, nei confronti del thiotepa e del chloroambucile (Lo HW e Ali-Osman F. 2007). Viceversa, le varianti alleliche *GSTP1*B* e *GSTP1*C* catalizzano la coniugazione del cisplatino con velocità circa due volte superiore rispetto a quella della variante *wild-type* (*GSTP1*A*) (Peklak-Scott *et al.* 2008).

Uno studio recente ha mostrato come l'omozigosi in posizione 105 per l'amminoacido valina (presente in *GSTP1*B* e *GSTP1*C*) si associa ad una migliore risposta, valutata in termini di prolungamento del tempo di sopravvivenza, in pazienti con cancro del colon-retto, trattati con 5-fluorouracile (5-FU) e oxaliplatino (Lo HW e Ali-Osman F. 2007 e ref. cit.). In accordo a tale studio, individui con carcinoma gastrico e portatori della sostituzione Val¹⁰⁵ mostrano una migliore risposta alla chemioterapia con 5-FU e cisplatino, e una sopravvivenza più lunga, rispetto a quelli con l'allele codificante l'Ile¹⁰⁵ (Lo HW e Ali-Osman F. 2007 e ref. cit.).

Per contro, il cancro alla prostata è l'unico esempio di neoplasia maligna nella quale l'assenza o la riduzione dell'espressione delle GSTP è associata allo sviluppo del tumore. Il gene *GSTP1* è ampiamente espresso nel tessuto prostatico normale, ma non nelle cellule neoplastiche di carcinoma prostatico (McIlwain *et al.* 2006 e ref. cit.). La perdita di espressione è causata dall'ipermetilazione del promotore del gene *GSTP*. Bakker *et al.* hanno identificato una proteina con un *methyl-CpG binding domain*, la quale media l'ipermetilazione della regione regolatrice del gene *GSTP*. Questa potrebbe fungere da target per il ripristino dell'attività del gene (McIlwain *et al.* 2006 e ref. cit.). In effetti, esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che l'esposizione di cellule di carcinoma prostatico alla procainamide, un inibitore non nucleosidico della DNA metiltransferasi, reverte l'ipermetilazione delle isole CpG del promotore della GSTP ristabilendone l'espressione (Henderson CJ *et al.* 2005 e ref. cit.).

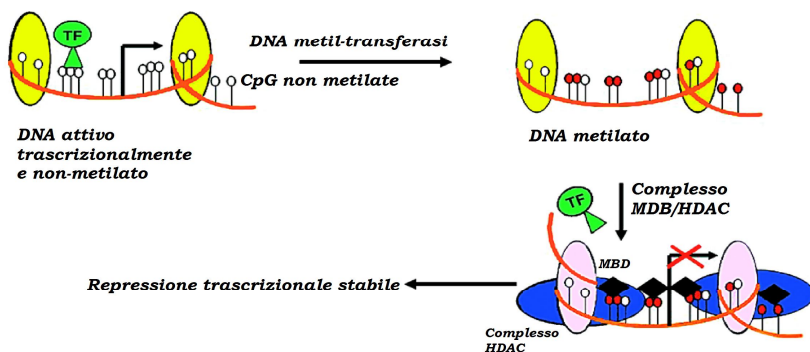


Fig. 4

La figura 4 mostra il silenziamento epigenetico dell'espressione genica. La DNA metil-transferasi effettua la metilazione delle isole CpG, la quale innesca il processo di silenziamento genico, grazie al reclutamento del *methyl binding domain* (MBD) e dell'*histone deacetylase* (HDAC), per legare il DNA metilato. Questo risulta nella deacetilazione degli istoni e nella condensazione della cromatina, portando alla perdita del legame del fattore trascrizionale con la conseguente repressione trascrizionale (Manoharan M. *et al.* 2007).

I meccanismi fondamentali che determinano la sovraespressione di *GSTP1* nei tumori umani non sono ancora ben compresi. Il gruppo di ricerca, guidato da Francis Ali-Osman, ha scoperto recentemente che la proteina p53 possiede come *target* trascrizionale il gene *GSTP1*. I ricercatori hanno identificato un motivo di legame per la p53, localizzato nell'introne 4 del gene *GSTP1*. Questo presenta una elevata percentuale di identità nella sequenza consenso, per i motivi di legame della p53, riscontrati in altri geni *target*. Tramite l'uso del saggio di mobilità elettroforetica, assieme ad un'analisi di *footprinting* con la DNasi I, è stato

osservato che la proteina p53 *wild-type* lega il motivo di legame per p53 del gene *GSTP1*; inoltre, l'impiego del *luciferase reporter assay* ha permesso di dimostrare che il motivo trascrizionale della p53, presente a monte del gene *GSTP1*, è attivo in cellule tumorali umane. Inoltre, il gruppo di ricerca ha dimostrato che l'espressione di *GSTP1* è inibita dall'impiego di uno *Small interfering RNA* (siRNA) di p53 (Lo HW *et al.* 2008).

Funzioni non enzimatiche della proteina GSTP1

La *GSTP1* possiede anche molteplici funzioni non enzimatiche, giocando un ruolo importante nella risposta a stimoli citotossici, a fattori di crescita e nel controllo della proliferazione e morte cellulare (Lo HW e Ali-Osman F. 2007). Ad esempio, la proteina *GSTP1* interagisce con la *Fanconia anemia group C protein* (FANCC), l'unica proteina citoplasmatica conosciuta del gruppo di proteine codificate dai geni dell'anemia Fanconi. L'interazione proteina-proteina media la risposta cellulare ai farmaci antitumorali, poiché i pazienti affetti da questa malattia genetica sono più sensibili ai chemioterapici che effettuano *cross-linking* delle catene del DNA (Lo HW e Ali-Osman F. 2007 e ref. cit.).

Alcuni studi recenti hanno inoltre dimostrato che la *Tissue transglutaminase 2* (TGM2), un membro della famiglia di proteine che catalizzano il *cross-linking* calcio-dipendente di varie proteine cellulari, lega la proteina *GSTP1*. TGM2 è coinvolta in vari processi fisiologici, e frequentemente sovraespressa in varie neoplasie umane. Nelle cellule neuronali, l'interazione *GSTP1*-TGM2 regola la risposta apoptotica allo stress ossidativo. Inoltre, è stato osservato che nel glioblastoma il complesso *GSTP1*-TGM2 si forma in assenza di stimoli apoptotici e protegge le cellule contro i danni al DNA indotti dall'apoptosi (Lo HW e Ali-Osman F. 2007 e ref. cit.).

Infine, è stato dimostrato che la proteina *GSTP1* umana è fosforilata dalle Ser/Thr chinasi *protein kinase A* (PKA) e *protein kinase C* (PKC), e dall'*epidermal growth factor receptor* (EGFR). La fosforilazione, dipendente dal GSH, aumenta l'attività catalitica di *GSTP1*, quindi questa proteina è iper-fosforilata nelle cellule tumorali con un'attivazione aberrante dei pathway attivati dalle chinasi PKA, PKC e EGFR (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

GSTP1, stress ossidativo e signaling cellulare

Fra le proteine con cui interagisce *GSTP1* vi è la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), una Ser/Thr chinasi della famiglia delle *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs). Le MAP chinasi rispondono a stimoli extracellulari e regolano varie attività cellulari, come l'espressione genica, la mitosi, il differenziamento, la

proliferazione cellulare e l'apoptosi (McIlwain *et al.* 2006). Recentemente è stato dimostrato che, in condizioni basali (assenza di stimoli citotossici), il monomero GSTP1 lega l'estremità C-terminale della JNK, mantenendo la chinasi in forma inattiva. Il legame inibisce il *signaling* intracellulare e il segnale apoptotico (Lo HW e Ali-Osman F. 2007 e ref. cit.). Quando le cellule sono sottoposte a condizioni di stress, conseguente all'esposizione a farmaci antitumorali o a specie reattive dell'ossigeno, GSTP1 si dissocia da JNK e oligomerizza, portando ad un incremento dell'apoptosi. La chinasi JNK può quindi fosforilare proteine bersaglio tra cui c-Jun che, in combinazione con il prodotto del proto-oncogene c-Fos, costituisce il fattore trascrizionale AP-1. I primi studi hanno mostrato che l'espressione del gene *GSTP1* è controllata dal legame di AP-1 al promotore. Un'ipotesi ancora in fase di studio afferma che l'attivazione di c-Jun, dovuta a stress ossidativo, dovrebbe aumentare l'espressione di *GSTP1* e, allo stesso tempo, attenuare il segnale mediato da c-Jun (Henderson CJ *et al.* 2005 e ref. cit.). Nessuno studio ha ancora trovato il modo in cui le cellule mantengono un *pool* di GSTP1 monomeriche. Una modificazione post-traduzionale, mediante la fosforilazione di un residuo di Ser nella regione C-terminale di GSTP1, è stata suggerita come un possibile meccanismo attraverso il quale possono essere formati i monomeri dell'enzima (Henderson CJ *et al.* 2005 e ref. cit.).

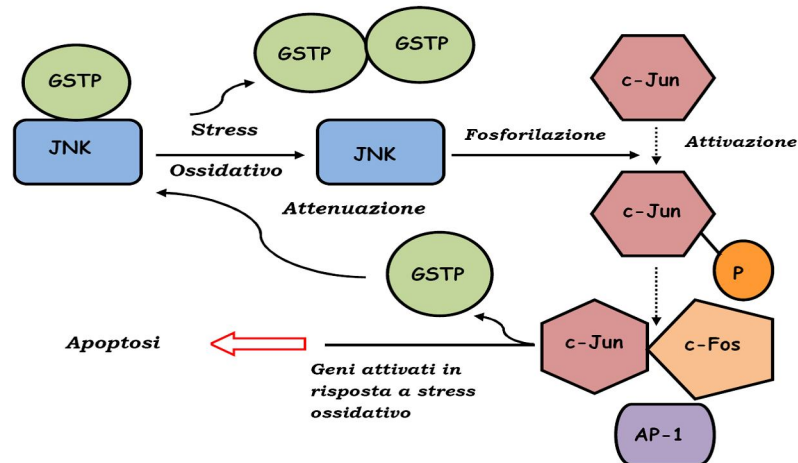


Fig. 5

La figura 5 mostra il ruolo della proteina GSTP1 nella regolazione della funzione della proteina JNK (modificata da Henderson CJ *et al.* 2005).

Un altro esempio di regolazione del signaling cellulare da parte di GST è la regolazione di ASK1, una MAPKKK (*MAP kinase kinase kinase*) che attiva i pathway intracellulari di JNK e p38, da parte di GSTM1. Precisamente, la proteina GSTM1 lega e inibisce l'attività di ASK1, esercitando così un effetto anti-apoptotico. In condizioni fisiologiche, infatti, ASK1 esibisce bassa attività,

perché sequestrata da GSTM1. L'interazione proteina-proteina determina la formazione del complesso GSTM1-ASK1, il quale si dissocia a causa di stimoli citotossici, portando al rilascio e all'attivazione di ASK1. Questo meccanismo è pertanto simile a quello proposto per GSTP1-JNK. GSTM1 dissociato oligomerizza, permettendo il rilascio di ASK1 e la conseguente induzione di apoptosi (McIlwain *et al.* 2006 e ref. cit., Lo HW e Ali-Osman F. 2007 e ref. cit.). Il ruolo dell'interazione GSTM1-ASK1 nella resistenza a farmaci antitumorali al momento non è conosciuta, ma la diminuzione dell'attività di ASK1, in seguito all'interazione con GSTM1, suggerisce che questo potrebbe essere associato alla diminuzione della risposta apoptotica, la quale potrebbe contribuire alla farmacoresistenza. Anche la sovraespressione di GSTP1 sopprime la capacità di ASK1 di indurre l'apoptosi e protegge le cellule dai danni indotti da agenti chimici (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

GST Theta

Espressione e polimorfismi genetici

La classe della GST Theta umane comprende 2 geni (*GSTT1* e *GSTT2*), entrambi localizzati sul cromosoma 22q11 (Lo HW e Ali-Osman F. 2007). Del gene *GSTT1* sono note due varianti alleliche funzionali (*T1*A* e *T1*B*) e un allele nullo (*T1*0*). I due alleli funzionali risultano da un SNP nell'esone 3; infatti, *GSTT1*A* contiene una treonina al residuo 104, la quale è sostituita da una prolina nell'allele *GSTT1*B* (McIlwain *et al.* 2006). Le proteine risultanti dalla sostituzione aminoacidica mostrano una differenza nell'attività enzimatica, dovuta alla diversa struttura tridimensionale. L'allele *GSTT1*B*, infatti, mostra una diminuzione nell'attività catalitica, rispetto all'allele *GSTT1*A*; questo fenomeno potrebbe essere attribuito al cambiamento conformazionale indotto dalla sostituzione con la prolina (McIlwain *et al.* 2006).

Suscettibilità allo sviluppo di neoplasie e risposta ai farmaci antitumorali

Grazie a studi recenti è emerso come il genotipo *GSTT* influenzi il rischio d'insorgenza di neoplasie e la risposta alla chemioterapia antitumorale. Ad esempio, gli individui con genotipo *GSTT1*0* presentano un elevato rischio di sviluppare alcuni tumori, in particolare cancro alla vescica, meningioma, leucemia mieloide acuta (AML) e carcinoma a cellule squamose (Lo HW e Ali-Osman F. 2007). Nell'AML e nei carcinomi mammario e ovarico i pazienti con genotipo *GSTT1*0* mostrano una risposta migliore alla chemioterapia e una sopravvivenza più lunga, libera da ricadute, rispetto ai pazienti esprimenti la proteina (Lo HW e

Ali-Osman F. 2007). Per contro, nel linfoma follicolare non-Hodgkin's, gli individui con una delezione nel gene *GSTT1* (o *GSTM1*) mostrano una sopravvivenza significativamente peggiore, rispetto ai pazienti con il gene non deleto. Questi studi suggeriscono che lo stato del gene *GSTT1* è un determinante importante nella risposta ai farmaci antitumorali, presumibilmente dovuto alla ridotta capacità di metabolizzare/detossificare questi ultimi (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

Del gene *GSTT2* sono note due varianti alleliche (*T2*A* e *T2*B*), le quali differiscono nel residuo aminoacidico 139 (metionina nell'allele *T2*A* e isoleucina in *T2*B*). I due prodotti genici mostrano attività enzimatica simile, sebbene differiscano nella sequenza aminoacidica (Lo HW e Ali-Osman F. 2007). Una transizione a livello dell'introne 2 (G → A) ha originato uno pseudogene (*GSTT2P*) (McIlwain *et al.* 2006). Il prodotto genico non è funzionale poiché la transizione determina una anomalia nel sito di *splicing* tra esone 2/introne 2, creando un prematuro segnale di stop tradizionale nel codone 196 (Lo HW e Ali-Osman F. 2007).

Conclusioni

Nel corso degli anni si sono accumulate varie evidenze sperimentali le quali hanno stabilito l'importanza delle GST citosoliche nello sviluppo delle neoplasie e nella loro risposta alla chemioterapia. Infatti, tali enzimi possiedono la capacità di metabolizzare e inattivare, per coniugazione con GSH, vari farmaci antitumorali. Recenti studi hanno evidenziato l'esistenza di funzioni non enzimatiche appartenenti alle GST solubili, in particolare la regolazione dell'attività di proteine coinvolte nel controllo della proliferazione e morte cellulare. Inoltre, molte GST solubili sono proteine polimorfe. Alcune varianti alleliche risultano associate ad un aumentato rischio di sviluppare talune neoplasie e/o ad un diverso tasso di risposta al trattamento con farmaci antitumorali. Attualmente si ritiene che, nel loro complesso, debbano essere tenuti in considerazione molti fattori nell'interpretazione dei risultati degli studi clinici sul ruolo delle GST nella biologia dei tumori e nella risposta alla terapia antitumorale, quali il livello di espressione delle GST nelle diverse neoplasie, il genotipo *GST* del paziente, l'entità della fosforilazione delle GST, i livelli di espressione e/o attività delle chinasi PKA, PKC e EGFR nelle cellule neoplastiche, la natura del trattamento farmacologico, l'istotipo tumorale, lo stato di metilazione dei geni *GST* e le mutazioni in alcuni geni oncosoppressori (*p53*).

Bibliografia

1. McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD: **Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy.** *Oncogene* 2006; 25:1639-1648.
2. Ruzza P, Rosato A, Rossi CR, Floreani M, Quintieri L: **Glutathione Transferases as Targets for Cancer Therapy.** *Anticancer Agents Med Chem.* 2009; 9:763-777.
3. Coles BF, Kadlubar FF: **Human alpha class glutathione S-transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease.** *Methods Enzymol.* 2005; 401:9-42.
4. Henderson CJ, Wolf CR: **Disruption of the glutathione transferase pi class genes.** *Methods Enzymol.* 2005; 401:116-35.
5. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR: **Glutathione transferases.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45:51-88.
6. Sherratt PJ, Hayes JD: **Glutathione S-transferases.** *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics.* Ioannides C, ed. (2002) Chichester, UK: Wiley & Sons. 319–352.
7. Coles B, Nowell SA, MacLeod SL, Sweeney C, Lang NP, Kadlubar FF: **The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk.** *Mutat Res.* 2001; 482:3-10.
8. Manoharan M, Ramachandran K, Soloway MS, Singal R: **Epigenetic targets in the diagnosis and treatment of prostate cancer.** *Int Braz J Urol.* 2007; 33:11-8.
9. Lo HW, Stephenson L, Cao X, Milas M, Pollock R, Ali-Osman F: **Identification and functional characterization of the human glutathione S-transferase P1 gene as a novel transcriptional target of the p53 tumor suppressor gene.** *Mol Cancer Res.* 2008; 6:843-50.
10. Peklak-Scott C, Smitherman PK, Townsend AJ, Morrow CS: **Role of glutathione S-transferase P1-1 in the cellular detoxification of cisplatin.** *Mol Cancer Ther.* 2008; 7:3247-55.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la mia famiglia, culla della vita e dell'Amore, la quale è onnipresente nella mia vita per offrirmi un sostegno nelle difficoltà e un sorriso nei momenti di sconforto. Ringrazio mamma Daniella, la quale ha saputo spronarmi a continuare nella scelta universitaria intrapresa, papà Gabriele, il quale mi ha sempre detto di seguire la mia aspirazione e mia sorella Anna, la quale ha sopportato per questi tre anni tutte le mie elucubrazioni mentali, condividendo con me momenti di gioia e parecchie litigate.

Ringrazio i miei nonni, i quali mi hanno amato come un figlio fin dal giorno che sono nato, soprattutto nonno Adolfo, che dal cielo mi ha accompagnato in quest'ultimo anno universitario, per avermi indirizzato verso lo studio delle materie biologiche, vista la passione per l'orto e la chemioterapia ricevuta. Ringrazio nonna Maria, la quale è stata sostegno spirituale e pure materiale, per le laute mance ricevute e nonna Adriana, per gli immancabili "thè e biscotti" e le chiacchierate interminabili.

Dal cuore nasce un grazie speciale per Patrizia, una fidanzata splendida, sempre pronta nel momento del bisogno e con la quale ho trascorso momenti indimenticabili. Lei, acqua e sapone, con il sorriso sulle labbra, con tatto e riservatezza mi ha accompagnato nel quotidiano e nella realtà universitaria e, se il coraggio di andare avanti, di tenere duro veniva meno, mi ha offerto la sua semplicità e una spalla per aiutarmi a crescere, spronandomi ogni giorno a suon di litigate, a perseverare nella scelte della vita.

Ringrazio i genitori di Patrizia, Annamaria e Antonio e suo fratello Lorenzo, la mia seconda casa, persone meravigliose che mi hanno accolto nella loro vita, sempre presenti a tutte le tappe della mia vita universitaria. Ringrazio i suoi nonni Matilde e Tonino, i quali mi hanno deliziato con dolci e l'agnello.

Ringrazio tutti i miei zii e cugini, in particolare Stefano, con il quale ho trascorso gli anni di vita studentesca e solo all'Università abbiamo intrapreso strade diverse ma, nelle occasioni in cui ci siamo ritrovati, non sono mancate le risate spensierate.

Desidero ringraziare il mio tutor, Ch.mo dott. Luigi Quintieri, per la dedizione con la quale ha saputo aiutarmi nel redigere la tesi e nei preziosi consigli datemi per migliorarla.

Rivolgo un grazie immenso ai miei più cari amici Andrea, i due Alberto, Cristian, Domenico, Enrico, Mara, Mauro, Mike, Paoletta, Rami e Samuele, i quali hanno sempre creduto in me e hanno saputo regalarmi il loro tempo, senza ricevere nulla in cambio se non il mio affetto, per una chiacchierata, una risata, una serata assieme e con i quali ho condiviso momenti indimenticabili, che rimarranno indelebili nel mio cuore.

Ringrazio Don Daniele e Don Giorgio, Tommaso e Claudio, i quali mi hanno aiutato a crescere nella fede, offrendomi sempre una parola di conforto in estrema semplicità.

Infine, ringrazio tutte le persone che hanno incrociato il loro cammino con il mio, gli animatori che condividono con me l'esperienza di crescita umana e spirituale, l'associazione A.V.I.S. di cui faccio parte e, non ultimi, i compagni dell'Università Cristina, Erica, Federica, Giulia, Ilaria, Isabella, Laura, Paolo, Stefania e Verena, i quali mi hanno regalato momenti di gioia e di spensieratezza in questi tre anni di vita universitaria.

Grazie a tutti!

Damiano