

**Università degli studi di Catania**  
**Dottorato Internazionale di Ricerca in Neurobiologia**  
Ciclo XXIII

Correlazioni molecolari fra angiogenesi e  
neurodegenerazione

**Dr.ssa Catalano Carmen**

*Tesi di dottorato*

Coordinatore : Chiar.mo Prof. Avola Roberto

Tutor: Chiar.mo Prof. Nicoletti Vincenzo Giuseppe

*ANNO ACCADEMICO 2011-2012*

|  |    |
|--|----|
| Introduzione .....                     | 3  |
| Neurodegenerazione.....                | 3  |
| Angiogenesi e neurodegenerazione ..... | 5  |
| Lenalidomide .....                     | 10 |
| Obiettivi .....                        | 16 |
| Materiali e metodi .....               | 21 |
| Risultati .....                        | 28 |
| Discussione .....                      | 35 |
| Bibliografia.....                      | 36 |

# Introduzione

## Neurodegenerazione

Col termine neurodegenerazione si intende una condizione patologica caratterizzata da disfunzione e/o morte di cellule neuronali a livello cerebrale e del midollo spinale. La neurodegenerazione è alla base di varie patologie quali il morbo di Parkinson, di Alzheimer, di Huntington, la ALS, la sclerosi multipla. Le malattie neurodegenerative sono associate ad una elevata morbilità e mortalità, e per il loro trattamento sono disponibili strategie terapeutiche scarsamente efficaci.

Il morbo di Alzheimer (AD), in particolare, è la principale causa di demenza senile nelle persone anziane, è una complessa sindrome neurodegenerativa, che porta con progressione inesorabile ad una perdita delle capacità cognitive per la quale non esiste ad oggi una cura efficace. Ad oggi, infatti sono disponibili solo alcuni farmaci sintomatici, mentre mancano sia farmaci in grado di far regredire il processo di neurodegenerazione sia efficaci strumenti diagnostici che consentano una diagnosi negli stadi primari. Il progressivo allungamento di vita della popolazione fa supporre che l'AD possa raggiungere proporzioni epidemiche entro i prossimi venti anni, il che rende essenziale lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche e di strumenti diagnostici affidabili per la diagnosi precoce di questa malattia. L'opinione emergente è che alla base del processo eziopatologico ci sia una disregolazione cerebrovascolare, che è una caratteristica non solo di patologie prettamente cerebrovascolari, come l'ictus, ma anche di condizioni neurodegenerative come l'AD. Molti studi neuropatologici hanno descritto, infatti, alterazioni morfologiche nei capillari cerebrali ed una riduzione di flusso sanguigno nei distretti cerebrali dei pazienti AD comunque l'importanza patogenetica di queste alterazioni vascolari è difficile da interpretare perché non è chiaro se si tratta di una conseguenza o una causa delle disfunzioni neuronali e del processo neurodegenerativo.

## Angiogenesi

Con il termine angiogenesi s'intende l'insieme di processi funzionali che portano alla formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da vasi preesistenti. Le cellule endoteliali che costituiscono lo strato interno di tutti i vasi, sono centrali nel fenomeno angiogenico (Conway et al., 2001). Esse sono coinvolte, seguendo un programma geneticamente determinato, mediato da specifici fattori e recettori, in una serie di eventi quale proliferazione, differenziazione, migrazione ed organizzazione morfologica in stretta connessione con il tessuto circostante. La formazione di un vaso passa quindi attraverso diversi stadi ben definiti, caratterizzati da modificazioni dell'endotelio e della matrice extracellulare. Nella prima tappa dell'angiogenesi si verifica una "destabilizzazione" dei vasi preesistenti dovuta ad un aumento della permeabilità vasale, ed una perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali. Segue quindi una seconda fase, di migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali nel punto del tessuto dove è necessaria la formazione di nuovi vasi. Nel corso di tale fase vengono liberati enzimi proteolitici che alterano la densità della matrice extracellulare allo scopo di facilitare l'attività migratoria delle cellule endoteliali. Il terzo stadio dell'angiogenesi corrisponde alla differenziazione delle cellule endoteliali, ed è caratterizzata da arresto della proliferazione cellulare e formazione di capillari primitivi. L'ultima tappa di maturazione funzionale è caratterizzata dal reclutamento di cellule periendotheliali di supporto, quali periciti e cellule muscolari lisce, nonché alla riorganizzazione delle interazioni cellulari (Bussolino 1998).

## Angiogenesi e neurodegenerazione

L'angiogenesi - lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni - è un punto cruciale per la formazione e rimodellamento del sistema nervoso e la protezione di esso dalla malattia.

Ricerche recenti hanno migliorato la nostra comprensione di come il cervello ed altri tessuti coltivano i nuovi vasi sanguigni nelle circostanze normali e patologiche. Alcuni fattori dell'angiogenesi, particolarmente il VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare) sono noti per avere un coinvolgimento nella proliferazione neuronale (neurogenesi), nella prevenzione o nella protezione da danni neuronali (neuroprotezione) e nella patogenesi dell' infarto e della malattia di Alzheimer .

Studi epidemiologici evidenziano che farmaci anti angiogenici apportano benefici ai pazienti con la malattia di Alzheimer (AD), indicando che la mancata regolazione vascolare svolga un ruolo critico nell'AD, che è quindi una malattia "angiogenesi-dipendente" (Harris 2005). Inoltre, i fattori di crescita angiogenica, VEGF e bFGF sono anche compresi fra quelli la cui sintesi è stimolata dall'A-beta (Folkman 2007), e sono anche coinvolti nella plasticità neuronale a causa della loro attività gliotrofica/neurotrofica (McAuslan 1980,Hu 1998). Lo studio della relazione tra A-beta e il processo angiogenico (Glesne DA 2006,Gaggelli 2006) può chiarire l'eziopatologia del processo AD.

Sia l'AD, come pure altri disordini neurodegenerativi, sono da considerarsi malattie neurovascolari, infatti negli ultimi anni, è emerso il concetto dell'unità neurovascolare come nuovo paradigma per lo studio sia della fisiologia che della patologia a carico del SNC. Questo concetto propone che il focus puramente neurocentrico non sia sufficiente ed enfatizza che tutte le cellule dell'unità neurovascolare cioè i componenti vascolari, i neuroni e la glia, devono essere esaminati in un contesto integrato. Il *signaling* e l'accoppiamento cellula-cellula fra questi compartimenti differenti costituiscono la base per una normale funzionalità.

Una comunicazione disordinata e un accoppiamento neuro-vascolare perturbato dà il via a disfunzioni e alla malattia.

Oltre ad un'associazione fisica nello stesso microambiente, queste cellule interagiscono l'una con l'altra attraverso meccanismi di feedback positivi e negativi legati anche alle richieste metaboliche (Pogue A 2004).

La neurogenesi e l'angiogenesi hanno rivelato molte affinità fra questi processi. Queste includono comuni di fattori di crescita e loro recettori, segnali simili per la proliferazione cellulare, destino delle cellule, formazione di contorni e spazio fisico comune come conseguenza di un modello parallelo di sviluppo anatomico (Cantara 2004).

L'angiogenesi è un processo complesso a più fattori la cui disomeostasi può essere causa di diverse malattie con decorso acuto o cronico. Essa ha suscitato l'interesse di molti studiosi che sono coinvolti nello studio di vari processi patologici, dal cancro alle malattie neurodegenerative. Quindi, uno dei principali obiettivi di questo studio riguarda la ricerca di correlazioni e di fattori comuni tra le malattie neurodegenerative croniche ed i disordini vascolari, per evidenziare il ruolo ancora sottostimato dell'angiogenesi ed individuare possibili interventi terapeutici che hanno come bersaglio primario il processo angiogenico e quindi le cellule endoteliali.

## **Ipossia e angiogenesi**

Il termine ipossia indica uno stato di insufficiente disponibilità di ossigeno nell'ambiente cellulare; tale condizione può interessare l'intero organismo in situazioni di bassa concentrazione dell'ossigeno nell'ambiente circostante (come ad esempio accade ad altitudine elevata) o può instaurarsi in una delimitata area di tessuto come conseguenza di un'ischemia o di crescita neoplastica (Jeong et al., 2011). Considerata la vitale importanza dell'ossigeno per il metabolismo cellulare aerobico, in tutti gli organismi animali si sono evoluti complessi meccanismi omeostatici al fine di contrastare l'ipossia. Specifici sensori dell'ossigeno erano già stati descritti nei batteri e

nel lievito, ma solo recentemente si è incominciato a far luce sui sistemi di regolazione attuati dagli organismi superiori, uomo incluso. Nonostante sia nota l'esistenza di alcune cellule specializzate nella valutazione dei livelli di ossigeno, tutte le cellule di mammifero sono in grado di reagire a una condizione locale di ipossia mediante l'attivazione di una cascata trascrizionale che coinvolge numerose vie metaboliche. Questo fenomeno si attua in poche ore ed è fondamentale per tutto l'organismo, tanto da essere coinvolto in numerosi processi fisiologici e patologici 11 (Gariboldi et al 2010). Numerose evidenze sperimentali e l'analisi approfondita della patofisiologia delle malattie vascolari e neoplastiche hanno permesso di individuare nella disponibilità di ossigeno un importante elemento regolatore dell'angiogenesi, sebbene i sistemi di adattamento siano complessi e ancora non del tutto chiari (Cassavaugh and Lounsbury, 2011). La comprensione dei meccanismi che regolano i processi cellulari promossi dall'ipossia potrebbero quindi assumere un ruolo molto importante nello sviluppo di strategie terapeutiche volte a contrastare importanti patologie come ad esempio retinopatie proliferative e tumori 13 (Mazzone, 2010). Numerose ricerche indicano che l'ipossia induce un incremento dell'espressione di VEGF in diversi tipi cellulari, incluse le cellule endoteliali umane 14 (Avouac et al., 2008; Cho et al., 2008; Liu et al., 2009; Nilsson et al., 2004; Takata et al., 2008; Zheng et al., 2008). L'ipossia può inoltre modulare l'espressione dei recettori

del VEGF sebbene i dati riportati nelle cellule endoteliali umane siano talvolta molto in contrasto tra loro, sia per quanto riguarda VEGFR-1 15 (Avouac et al., 2008; Cho et al., 2008; Gerber et al., 1997; Nilsson et al. 2004) che VEGFR-2 16 (Avouac et al., 2008; Takata et al., 2008; Waltenberger et al., 1996).

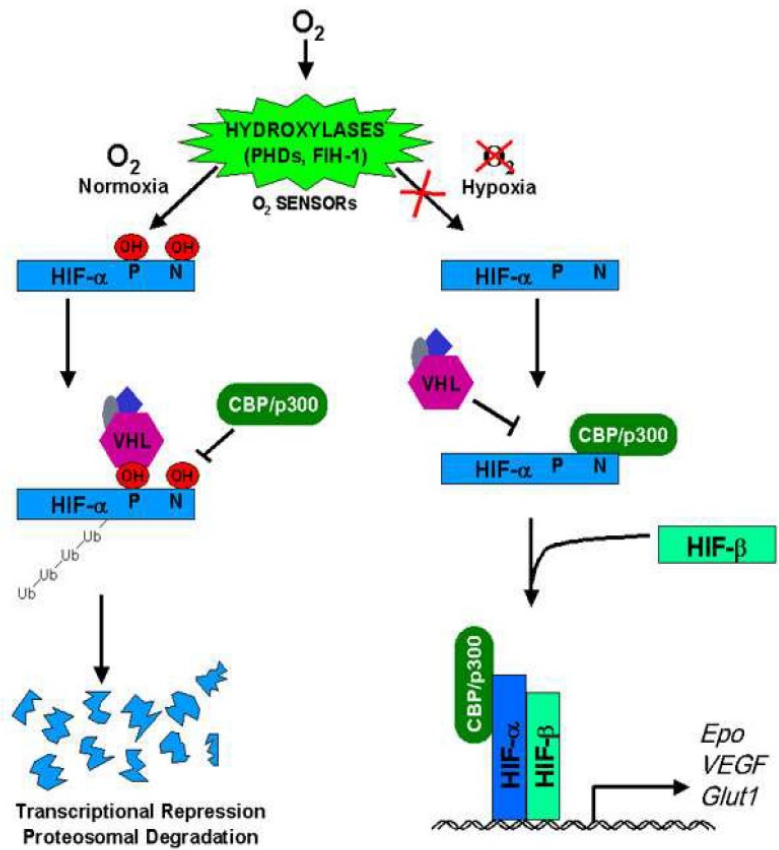
Fattori di trascrizione coinvolti nell'angiogenesi

E' stato fatto molto lavoro per chiarire il ruolo dei fattori di trascrizione nel regolare geni target coinvolti nell'angiogenesi. A questo proposito, il fattore inducibile da ipossia HIF-1 ed il trasduttore del segnale e attivatore della trascrizione STAT3, sono particolarmente interessanti perché la loro attivazione è accoppiata alla regolazione di VEGF 16 (Chen and Han, 2008; Fong, 2009). HIF-1 è

un fattore di trascrizione eterodimerico costituito dalle subunità  $\alpha$  e  $\beta$ . La subunità HIF-1 $\beta$  è costitutivamente espressa mentre l'espressione e l'attività della subunità HIF-1 $\alpha$  sono strettamente controllate dalle concentrazioni cellulari di ossigeno. Infatti, in condizioni di livelli di ossigeno normali, HIF-1 $\alpha$  viene rapidamente idrossilata dalle prolin idrossilasi, enzimi che necessitano di ossigeno e ferro per poter esercitare la propria attività, inducendo il legame di questa subunità con la proteina di Von Hippel-Lindau, una E3-ubiquitina ligasi che ne determina l'avvio alla degradazione da parte del proteasoma. In condizione di ipossia HIF-1 $\alpha$  sfugge a questa degradazione a causa dell'inattivazione delle idrossilasi ed inizia ad accumularsi nel citoplasma della cellula. Quando la sua concentrazione citoplasmatica raggiunge un livello critico, trasloca nel nucleo dove dimerizza con la subunità HIF-1 $\beta$  17 (Takahashi and Shibuya, 2005). Una volta avvenuta la dimerizzazione tra le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  all'interno del nucleo, HIF-1 si lega all'elemento responsivo all'ipossia (HRE) presente nel promotore o nelle regioni enhancer di geni inducibili dall'ipossia determinandone l'attivazione 18 (Jewell et al., 2001). HIF-1 promuove la trascrizione di oltre 70 geni bersaglio 19 (Semenza, 2004) a seconda della tipologia di cellula 20 (Kelly et al., 2003) o di organo 21 (Schneider et al., 2009). HIF-1 è in grado di regolare vari processi fisiologici tra cui l'eritropoiesi, la glicolisi e l'angiogenesi, che sono le principali risposte adattative all'ipossia 22 (Jiang et al., 1997). In particolare, HIF-1 è il principale fattore responsabile dell'espressione e secrezione di VEGF da parte delle cellule in condizioni ipossiche e gioca un ruolo chiave in diverse patologie caratterizzate da anomalo sviluppo dei vasi sanguigni quali disordini neurodegenerativi 23 (Pagés and Pouyssegur, 2005).

Per cui è sembrato interessante studiare eventuali correlazioni molecolari fra i 2 fenomeni





**Fig. 4.** Cambiamenti della concentrazione cellulare di ossigeno vengono tradotti nel nucleo come cambiamenti nell'attività di HIF-1. A sinistra della figura, in condizioni di normossia, HIF-1 $\alpha$  è idrossilato da PHD (prolil-idrossilasi), in una reazione che richiede ossigeno, con conseguente legame alla E-3 ubiquitina ligasi VHL che ne determina l'avvio verso il proteasoma. In condizioni di ipossia (destra dell'immagine) l'attività di PHD è inibita, HIF-1 $\alpha$  si accumula, dimerizza con HIF-1 $\beta$ , si lega al DNA e attiva la trascrizione di geni bersaglio. Tratto da pagina web università Adelaide 2007.

## Lenalidomide

La Lenalidomide, è un analogo della talidomide con proprietà anti-neoplastiche, anti-angiogeniche, pro-eritropoietiche e immunomodulatorie. Lenalidomide appartiene alla classe di sostanze degli IMiDs®, abbreviazione di Immunomodulatory Drugs, ossia sostanze farmaceutiche in grado di modulare il sistema immunitario. Gli IMiDs® sono composti derivati dal talidomide che, a parità o superiorità di efficacia, presentano effetti collaterali sensibilmente più contenuti.

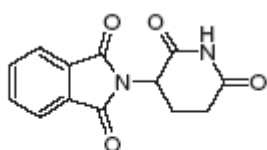


Fig. 1. Chemical structure of thalidomide.

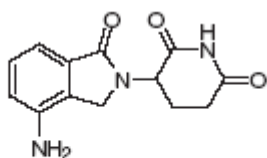


Fig. 2. Chemical structure of lenalidomide.

Il meccanismo d'azione del lenalidomide non è stato ancora del tutto chiarito. Si sa, tuttavia, che la sostanza agisce in diversi tessuti dell'organismo. Le sue proprietà immunomodulanti e antiangiogenetiche limitano la diffusione di sostanze che favoriscono le infiammazioni e aumentano la produzione di antinfiammatori. Viene impedita la formazione di vasi sanguigni sul tumore, e ciò comporta un minore apporto di sostanze nutritive alle cellule cancerose. Il lenalidomide agisce contro le cellule tumorali anche in maniera diretta, rallentandone la crescita. lenalidomide è anche in grado di correggere processi metabolici che hanno subito uno squilibrio in diversi punti dell'organismo.

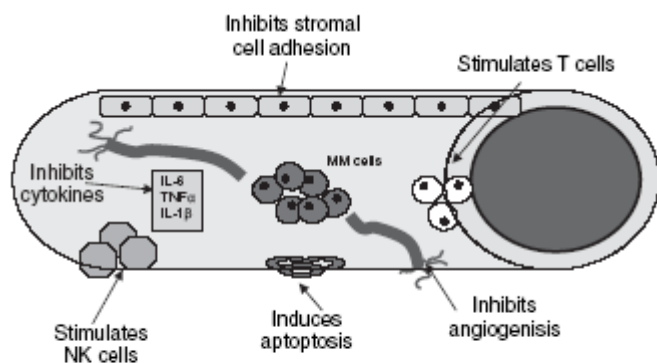


Fig. 3. Mechanisms of action of lenalidomide in multiple myeloma (from Celgene Corporation, France).

### Meccanismo d'azione

L'azione di Revlimid® (lenalidomide) si esplica con molteplici meccanismi che agiscono simultaneamente (Figura 2) includendo proprietà immunomodulanti, antiproliferative ed antiangiogenetiche.

#### *Effetti immunomodulanti*

Lenalidomide inibisce la produzione di citochine proinfiammatorie, tra cui il fattore della necrosi tumorale alfa (TNF- $\alpha$ ), l'interleuchina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), l'interleuchina 6 (IL-6) e l'interleuchina 12 (IL-12) da parte di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) stimulate da lipopolisaccaride (LPS) (Marriott 2001) La Lenalidomide inoltre, in cellule PBMC stimulate da LPS, aumenta la produzione della citochina antinfiammatoria interleuchina 10 (IL-10) inibendo di conseguenza l'espressione della ciclo-ossigenasi 2 (COX-2) ma non la sua azione enzimatica.(mullER 1996)

La Lenalidomide inoltre co-stimola le cellule T parzialmente attivate dal recettore della cellula T (TCR).(Lonial 2006). L'azione co-stimolante della lenalidomide aumenta la produzione delle citochine quali l'interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) e l'interleuchina 2 (IL-2), incrementando pertanto la proliferazione mediata da IL-2 dei linfociti T e l'azione citotossica cellulare, compresa la distruzione delle cellule tumorali mediata da NK 16. La Lenalidomide può aumentare la segnalazione mediata da TCR sia in assenza che in presenza di tali segnali secondari, favorendo in questo modo le risposte immunitarie (parve 2004)(Figura 3).

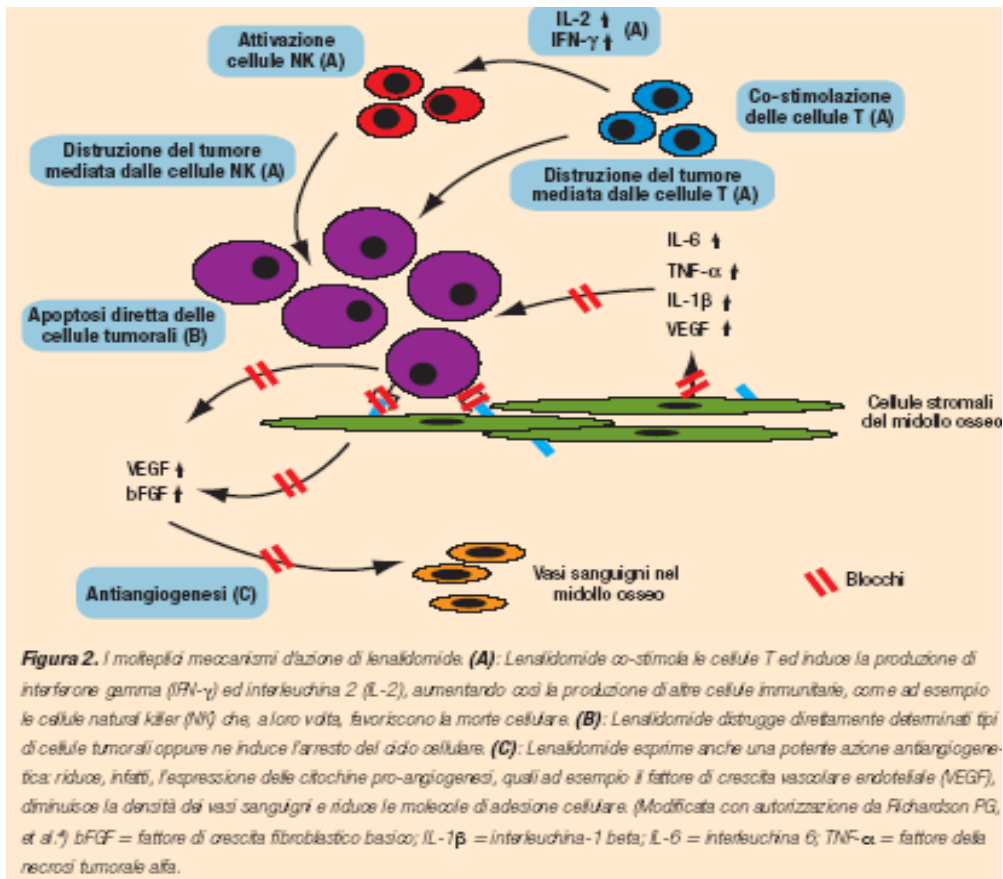
La Lenalidomide è anche in grado di modulare il legame con le cellule stromali del midollo osseo (BMSC), riducendo così la produzione delle citochine pro-angiogenetiche e di quelle che stimolano la crescita e sopravvivenza tumorale, come il VEGF, fattore di crescita vascolare endoteliale e l'IL-6.(Corral 1999)

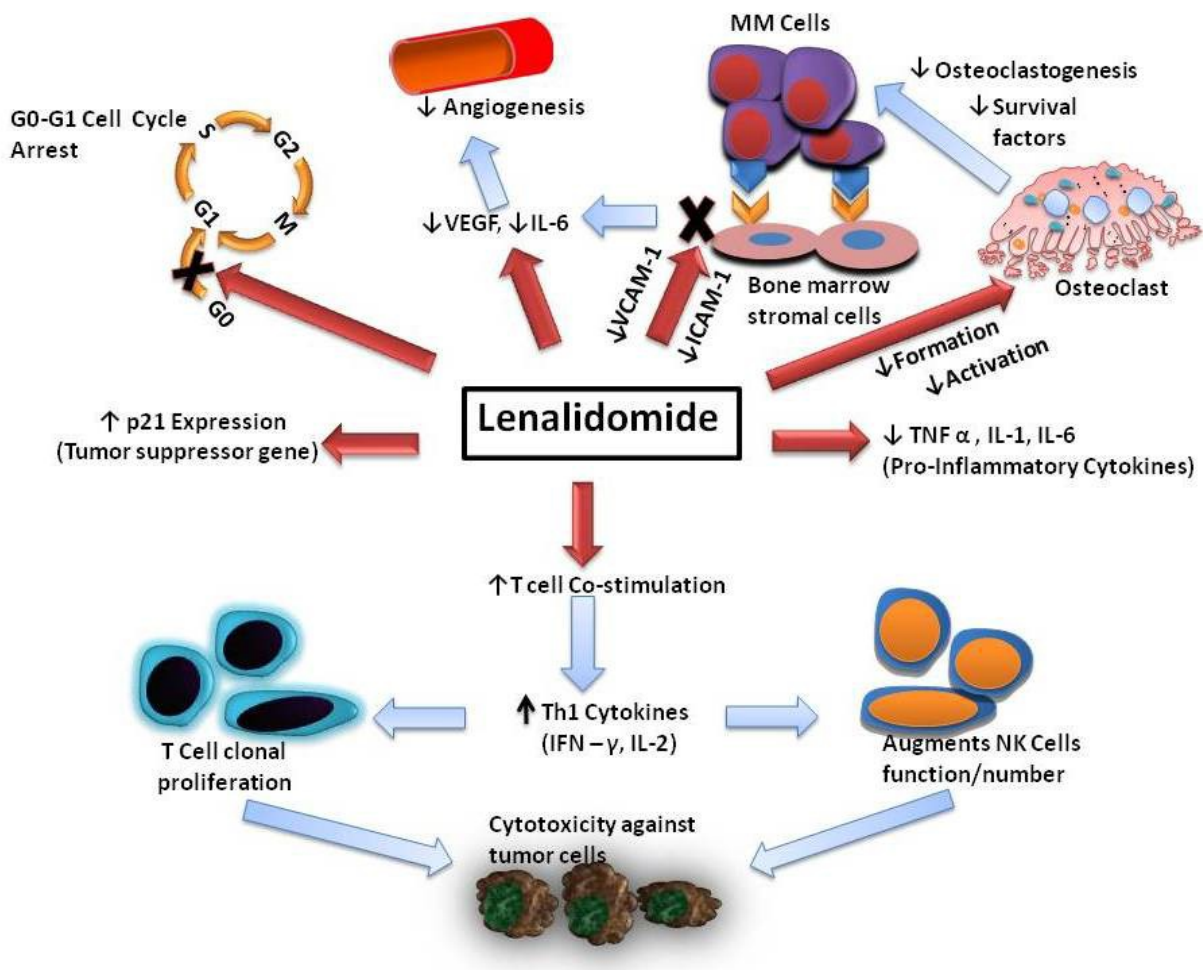
#### *Azione antiproliferativa e pro-apoptotica*

La lenalidomide ha dimostrato di possedere effetti antitumorali diretti, tra cui la capacità di arrestare la crescita cellulare nella fase G1 e di innescare il processo apoptotico caspasi-dipendente.(Haslett 2003) Essa inibisce la proliferazione di varie linee cellulari di tumori ematopoietici in vitro, tra cui quelli con difetti citogenetici del cromosoma 5 e le cellule di mieloma multiplo MM. Si pensa che l'inibizione del fattore stimolante la crescita tumorale IL-6 sia uno dei meccanismi mediante i quali la lenalidomide esplica la propria azione antiproliferativa (Davies 2001). L'induzione dell'apoptosi ad opera della lenalidomide è innescata da differenti meccanismi: dall'attivazione della caspasi 8, che porta all'aumento della sensibilità delle cellule tumorali all'apoptosi indotta da FAS, alla "iporegolazione" dell'attività del fattore nucleare kB (NF-kB), all'espressione dell'inibitore cellulare della proteina apoptotica 2 e della proteina inibitoria di FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme) (c-FLIP), ed al potenziamento dell'apoptosi correlata al TNF (TRAIL/Apo2L).(Marriott 2002)

#### *Azione antiangiogenetica*

La lenalidomide (Revlimid®) inibisce l'angiogenesi, ovvero la formazione di nuovi vasi sanguigni, blocca la formazione di microvasi e la proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali in modelli di angiogenesi *in vitro*.(Dredge 2002) In questi processi è fondamentale anche l'inibizione della produzione di TNF- $\alpha$ , del fattore di crescita fibroblastico basico (bFGF) ad opera delle BMSC, e del fattore VEGF da parte delle cellule tumorali.(Vacca 2005)





**Fig 3 Mechanism of action of lenalidomide.** Vari meccanismi attraverso i quali lenalidomide raggiunge efficacia clinica in tumori del sangue

## Lenalidomide nel mieloma multiplo

La lenalidomide è autorizzata da giugno 2007 nella terapia del mieloma multiplo refrattario alle terapie convenzionali.

Il mieloma è letteralmente un “oma,” o tumore, che coinvolge il “myelo,” o le cellule produttrici di sangue del midollo osseo. Le cellule affette sono le plasmacellule (un tipo di globuli bianchi) che sono i nostri produttori di anticorpi (immunoglobuline).

La diagnosi è principalmente basata sull’infiltrazione di plasmacellule nel midollo osseo, lesioni osteolitiche e presenza di immunoglobulina (o frammenti nel siero o nelle urine). MM rappresenta circa il 10% dei tumori ematologici e l’1% di tutti i tumori. La diagnosi di MM è fatta in circa 21 000 pazienti/anno in Europa con approssimativamente 16 000 morti all’anno.

MM è principalmente una malattia dell'anziano, con un età media di diagnosi di 68 anni. Prima dell'introduzione degli agenti alchilanti la media di sopravvivenza era di 12-17 mesi dalla diagnosi. La combinazione melphalan più prednisone (MP) è rimasta il trattamento più efficace per decenni sebbene la remissione era rara (5%) e la media di sopravvivenza non superava i 3 anni. Negli anni 1990, chemioterapia ad alte dosi (HDT) associata a trapianto autologo di cellule staminali ha prolungato la sopravvivenza (di un anno in più con tasso di mortalità di 1-2%). L'avvento dei nuovi farmaci immunomodulanti ha raddoppiato la sopravvivenza mediana dei pazienti con MM fino a circa 5 anni e i pazienti hanno il 50% di probabilità di raggiungere la risposta completa ai trattamenti con un tasso di sopravvivenza fino a 10 anni.

Più recentemente è stata sviluppata la lenalidomide nel MM recidivato e refrattario. Le interazioni tra cellule di mieloma, le cellule stromali midollari e il microcircolo contribuiscono alla persistenza e all'insorgenza del tumore e la lenalidomide agisce alterando le interazioni chiave tra cellule tumorali e cellule stromali del midollo osseo superando la resistenza del tumore ai farmaci. (Ria 2000)

## Obiettivi

Lo scopo del progetto di ricerca è stato quello di fornire nuove evidenze sul ruolo dei modulatori dell'angiogenesi e la loro connessione con i vari tipi di processi neurodegenerativi.

In collaborazione con l'azienda farmaceutica Celgene si è deciso di studiare l'attività antiangiogenica della lenalidomide e il relativo meccanismo molecolare coinvolto.

Poichè la trasduzione dei segnali legati all'interazione VEGF/VEGF-recettore-2 (VEGFR-2) contribuisce largamente all'angiogenesi e sviluppo del MM (Ria 2004), e media la proliferazione e capillarogenesi in MMECs attraverso un loop autocrino (Podar 2011); si è scelta come base di studio le cellule endoteliali isolate da aspirati midollari di pazienti affetti da mieloma multiplo (MMECs) per poi ampliare gli studi ad un nuovo modello cellulare a cellule di neuroblastoma

Per questi scopi inizialmente si è verificato se la lenalidomide influisce sull'angiogenesi in vivo con il test della membrana corioallantoidea (CAM assay), e in vitro testando il suo effetto sulla migrazione cellulare e formazione di tubuli delle MMECs prelevate in pazienti con MM alla diagnosi, fase leucemica, paragonando gli effetti con quelli su ECs (MGECS) provenienti da pazienti con gammopatie monoclonali aspecifiche (MGUS) e sulle HUVECs (human umbilical vein endothelial cells).

Successivamente si è studiato se la lenalidomide è capace di modulare l'espressione di geni chiave coinvolti in diversi meccanismi innescanti l'angiogenesi, quali VEGF, bFGF, BNIP3, SEPW1 e IER3 e se la lenalidomide ha effetti sull'attivazione/fosforilazione dei mediatori di segnale intracellulare di VEGF/VEGFR-2 quali MAP kinase Erk1/2, Src kinase, e vascular endothelial (VE)-cadherin. Considerando il potenziale antiangiogenico di tale farmaco ad oggi autorizzato esclusivamente nella cura del mieloma multiplo l'idea è stata quella di testare la sua efficacia in vitro su linee di cellule di neuroblastoma. Oggi è vivo un certo interesse in questo ambito d'applicazione.



Nonostante le recenti scoperte in neurochirurgia, radioterapia e chemioterapia la prognosi dei pazienti con glioma rimane infausta. Con il fallimento degli standard agenti citotossici c'è un crescente interesse nello sviluppo di nuove terapie con nuovi meccanismi d'azione.

Studi preclinici e clinici hanno dimostrato che i gliomi sono altamente angiogenici e che la terapia antiangiogenica rappresenta una potenziale nuova strategia di cura. La Talidomide è stato uno dei primi agenti antiangiogenici valutato nei pazienti con glioma ricorrente. E' stato dimostrato in modelli murini che la talidomide riduce l'espressione di potenti fattori angiogenici come VEGF bFGF e TNF- $\alpha$ .(Marriott 2002, Vacca 2005)

La lenalidomide mostra in vivo proprietà antitumorali dovute a una forte stimolazione delle cellule T, alla produzione di IL-2/IFN- $\gamma$ , e all'inibizione del TNF- $\alpha$  più marcata della talidomide (Richardson 2002, Corral 2004). L'effetto antitumorale della lenalidomide potrebbe essere correlato alla sua capacità di influire su processi diretti o indiretti legati alla crescita e sopravvivenza delle cellule tumorali. Il reale meccanismo antiangiogenico della lenalidomide non è ancora chiaro, sebbene sia stato visto che la lenalidomide può inibire il VEGF (Lu L 2009), il bFGF e la migrazione endoteliale indotta da TNF- $\alpha$  in modelli preclinici di MM (De Luisi 2010), ad oggi nessuna evidenza preclinica è stata osservata e compiuta su modelli neuronali.

#### Lenalidomide e gliomi

Trial di fase I e II (D'Amato 1997, Fine 2000) sono stati già condotti con la talidomide contro il glioma hanno mostrato un effetto di stabilizzazione della malattia e risposte positive, da qui la tendenza a testare molecole simili ma più efficaci come la lenalidomide. Dato il profilo di sicurezza già mostrato dalla lenalidomide nelle prove su altre forme di tumore, è stata valutata la possibile attività antiglioma della lenalidomide in uno studio di fase I in pazienti affetti da gliomi ricorrenti(Fine 2007). Su 36 pazienti 28 dei quali reclutati per valutare la tossicità primaria e finale, è stato dimostrato che la lenalidomide può essere somministrata a dosi fino a 20 mg/m<sup>2</sup>, con la sola

tossicità legata ad un aumentato rischio di eventi trombo-embolici. Nessuna risposta radiografica è stata osservata nei pazienti che hanno avuto una media di progressione di tumore <2 mesi e il 12.5% dei pazienti non hanno avuto progressione della malattia a 6 mesi.

Dati preliminari suggeriscono che il singolo farmaco può avere un indicazione limitata nel glioblastoma ricorrente alle dosi valutate, anche se queste osservazioni necessitano conferme in studi allargati.

Il meccanismo d'azione ancora non chiaro lascia ancora spazio per la ricerca del potenziale effetto del farmaco su altre patologie e modelli cellulari, fra cui i modelli neuronali.

Partendo dall'azione già confermata della lenalidomide sul VEGF e altre citochine circolanti si può ipotizzare un possibile effetto positivo della lenalidomide nei processi neurodegenerativi o patologie tumorali del SNC.

Si studierà quindi sia in cellule neuronali il pattern di espressione di alcuni fattori (endotelina-1, endoglin, Krit-1, Integrine, VEGF) coinvolti nell'angiogenesi sia a livello di proteina che di mRNA. e il grado di inibizione o sovraespressione di questi fattori in condizioni di stress e l'eventuale effetto inibitorio di tale farmaco.

### **Lenalidomide e ipossia**

L'ipossia è uno squilibrio tra domanda e offerta di ossigeno, che priva le cellule o i tessuti di ossigeno sufficiente. È consolidata che l'ipossia provoca risposte adattative, che contribuiscono a patologie a breve e lungo termine come l'infiammazione, le malattie cardiovascolari e il cancro. Indotta da ipossia del micro ambiente e mutazioni genetiche, l'elevata espressione della trascrizione di hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) e HIF-2 è una caratteristica chiave di molti tumori umani e ha dimostrato di promuovere processi cellulari, che facilitano la progressione del tumore. Si Discute

quindi del ruolo emergente di ipossia e HIFs nella patogenesi del mieloma multiplo (MM), un incurabile neoplasia ematologica. Fino ad oggi, sembra chiaro che vi è una conseguenza biologica fra un'aberrante espressione di HIF in MM e l'angiogenesi. Gli studi hanno dimostrato che esiste una correlazione positiva tra espressione HIF-1 $\alpha$  e 2 $\alpha$  HIF e il livello dell'angiogenesi nel midollo osseo e l'angiogenesi e l'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e del recettore VEGF in campioni biopsici di pazienti (Giatromanolaki A. et al 2010) Un certo numero di farmaci anti-MM, come adaphostin, lenalidomide, bortezomib, hanno anche dimostrato di mediare i loro effetti antiangiogenetici, almeno in parte, attraverso l'inibizione di HIF-1 ( LU L. et al 2009, Kaluz S et al 2006)

L'importanza crescente della HIF-1 $\alpha$  e -HIF 2 $\alpha$  nella tumorigenesi (e, numerosi altri tipi di malattia) solleva la possibilità che gli agenti che inibiscono specificamente questi fattori di trascrizione (vedi tabella 1), fornirebbero un significativo beneficio terapeutico

A questo punto si è deciso di studiare l'azione di lenalidomide nella modulazione dell'attività ed espressione di HIF 1 $\alpha$

**Table 1** Therapeutic inhibitors of hypoxia and HIFs

| <i>Agent</i>  | <i>References</i>   |
|---|---------------------|
| <i>HIF inhibitors</i>   |                     |
| PX-478, EZN-2968, polyamide-2, YC-1                               | 99, 132,133,138–142 |
| <i>Hypoxia-activated pro-drug</i>                                 |                     |
| TH-302  | 113,134,135         |
| <i>Proteasome inhibitor</i>                                       |                     |
| Bortezomib  | 123                 |
| <i>NSAIDs</i>   |                     |
| Celecoxib, NS-398, ibuprofen                                      | 143–145             |
| <i>Heat shock protein-90 inhibitors</i>                           |                     |
| Geldanamycin  | 146                 |
| <i>Tyrosine kinase inhibitors</i>                                 |                     |
| Imatinib, trastuzumab, erlotinib, cetuximab, sorafenib, sunitinib | 147–152             |
| <i>Mammalian target of rapamycin inhibitors</i>                   |                     |
| Rapamycin, CCI-779, RAD001  | 153                 |
| <i>HDAC inhibitors</i>  |                     |
| Depsipeptide (FK228)  | 154,155             |
| <i>Immunomodulatory agents</i>                                    |                     |
| Lenalidomide  | 125                 |
| <i>Microtubule inhibitors</i>                                     |                     |
| 2-Methoxyestradiol, taxotere, vincristine                         | 156–158             |
| <i>Chemotherapeutic agents</i>                                    |                     |
| Doxorubicin, daunorubicin, topotecan                              | 159,160             |

Abbreviations: HDAC, histone deacetylase; HIF, hypoxia-inducible transcription factor; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug.

## **Materiali e metodi**

### **Pazienti**

Sono stati studiati pazienti che rientravano nei criteri del e International Myeloma Working Group per il MM e MGUS. I pazienti con MM sono stati selezionati secondo le caratteristiche cliniche e I livelli di proteina M : alla diagnosi, ricaduta e fase leucemica; Nessun paziente era sotto trattamento con la lenalidomide. Tutti i pazienti hanno dato il loro consenso informato secondo la Dichiarazione di Helsinki.

Condizioni di Coltura di cellule endoteliali Le cellule endoteliali HUVEC sono state piastrate in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> previamente trattate con collagene, utilizzando come mezzo di coltura HAM-F10 più: glutammina 2mM, 10% di PDS (plasma derived serum), eparina 80 µg/ml, penicillina e streptomicina (50 µg/ml), e ECGS (endothelial cell growth serum) 7.5 µg/ml.

Le colture sono state mantenute a 37° C al 5% di CO<sub>2</sub> in atmosfera umidificata.

Condizioni di coltura di cellule endoteliali di mieloma Cellule endoteliali isolate da midollo osseo di pazienti con mieloma multiplo (MMECs) sono state coltivate in DMEM (Sigma Chemical) supplementato con 10% siero fetale bovino inattivato, 100 units/mL penicillina, 10 µg/mL streptomicina (Life Technologies; 0.01%),e 2 mmol/L L-glutammina (1%; Life Technologies).

### **Condizioni di coltura di neuroblastoma**

Le cellule di neuroblastoma shsy5y (ATCC number CRL - 2266) sono state coltivate in mezzo DMEM/F12 (Sigma Chemical) supplementato con 10% di FBS, penicillina (50 U/ml) e streptomicina(50 µg/ml)

### **Lenalidomide**

La lenalidomide come polvere pura è stata fornita dalla Celgene. E' stata dissolta in DMSO e stoccata a -20°C; è stata diluita in mezzo di coltura (0-20 nmol/L) immediatamente prima dell'uso.

Isolamento delle cellule endoteliali da aspirato midollare Le cellule microvascolari endoteliali sono state ottenute dal midollo osseo di pazienti con mieloma multiplo dopo appropriato consenso in accordo con la dichiarazione di Helsinki.

Le cellule mononucleari sono state separate dall'aspirato del midollo osseo dei pazienti con mieloma attraverso centrifugazione su gradiente Fycoll-Hypaque. Le cellule sono state coltivate in fiasche da 25-cm<sup>2</sup> in terreno completo (RPMI 1640 supplementato con 10% FCS e 1% glutammina) per 2 ore. Le cellule endoteliali aderenti sono state raccolte con soluzione di tripsina/EDTA (0.05/0.02% in PBS), lavate 2 volte con PBS, sospese in mezzo FCS-free e immunodeplete dei macrofagi e possibili residue plasma cellule con 30-minuti di incubazione in fiasche ricoperte con anticorpi monoclonali (Immunotech, Coulter, Marseilles, France) CD14 (un marker per monocyti-macrofagi) più CD38 (un marker per plasmacellule e cellule ematopoietiche)

Le cellule residue sono state sospese in mezzo serum-free e incubate a per 30 minuti a 37°C con microbiglie magnetiche (Dynal, Oslo, Norway) ricoperte con Ulex Europaeus Agglutinin-1 (UEA-1; Sigma Chemical), un legante per uno specifico recettore per le cellule endoteliali (23). Le microbiglie con le cellule legate sono state recuperate usando una unità di separazione magnetica e trasferite in una multiwell da 12 con 3 mL di mezzo completo per pozzetto. 15- 25 giorni più tardi si sono contate da 1 a 2 x 10<sup>6</sup> cellule per paziente.

### **Saggi di angiogenesi**

La valutazione del potenziale angiogenetico del farmaco è stata effettuata attraverso determinati saggi in vitro e vivo di angiogenesi:

**Test del Wound Healing** Le cellule sono state piastrate su multi well da 24 . Un graffio è stato fatto con la punta di una micropipetta dopo che è stata raggiunta la confluenza. Le cellule sono state quindi lavate delle cellule rimosse e incubate per 24 H con il medium con varie concentrazioni di lenalidomide o con solo mezzo. I solchi sono stati fotografati e la migrazione delle cellule è stata

valutata ad occhio. Per ogni gruppo sono stati considerati tre pozzetti e ogni test è stato ripetuto almeno tre volte.

**Test morfologico su Matrigel.** Il Matrigel non polimerizzato (17 mg/mL; Becton Dickinson, Mountain View, CA) è stato depositato (50  $\mu$ L/well) in multiwell da 96 (0.32 cm<sup>2</sup>/well) e polimerizzato per 1 ora a 37°C. HUVECs e MMECs (5 x 10<sup>3</sup> per well) in 200  $\mu$ L di DMEM/10% FCS (positive control), mezzo serum-free (controllo negativo), in presenza o assenza di lenalidomide sono state stratificate sulla superficie di Matrigel. Dopo 6 ore di incubazione in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C, la crescita cellulare e l'organizzazione tridimensionale è stata osservata con microscopio a contrasto di fase.

**Test su membrana corioallantoidea.** Uova di pollo fertilizzate White Leghorn sono state incubate a 37°C a umidità costante. il giorno 3 di incubazione, una finestra è stata aperta nel guscio e circa 3 mL di albume è stata rimosso per permettere il distacco della membrana corioallantoidea. Giorno 8, 1-mm<sup>3</sup> di spugna gelatinosa (Gelfoam; Upjohn Co., Kalamazoo, MI) è stata caricata con 3  $\mu$ L di solo mezzo condizionato con MMEC o con lo stesso più la lenalidomide. Le spugne caricate con RPMI 1640 solo o supplementato con VEGF (200  $\mu$ g/mL) sono state usate rispettivamente come controllo negativo e positivo. La membrana corioallantoidea è stata esaminata giornalmente per 4 giorni dopo l'impianto. I vasi sanguigni cresciuti dentro la spugna sono stati osservati macroscopicamente (a x50), e fotografati in ovo con MC63 Camera system (Zeiss).

**RT-PCR.** La RT-PCR è stata eseguita usando 2  $\mu$ g di RNA totale estratto con il reagente Trizol (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA) e retrotrascritto con "Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase" (Invitrogen, San Diego, CA). Quindi su 1  $\mu$ g di cDNA è stata fatta la PCR per i geni selezionati. Primers (Invitrogen) sono stati usati per VEGF, HGH, PDGF, FGF. I protocolli di PCR sono stati: per VEGF, 1 ciclo di denaturazione a 95°C per 90 secondi, 30 cicli a 95°C per 60 secondi, 60°C [annealing temperature (Ta)] per 45 secondi, e 72°C per 60

Secondi; per HGH un ciclo di denaturazione a 97°C per 60 secondi, 5 cicli a 97°C per 30 secondi, 60°C Ta per 30 secondi, e 72°C per 30 secondi seguiti da 30 cicli a 95°C per 35 secondi, 60°C Ta per 30 secondi, e 72°C per 30 secondi con una estensione finale a 72°C per 7 minuti; PDGF: un ciclo di denaturazione a 94°C per 4 minuti, 30 cicli a 94°C per 45 secondi, 55°C Ta per 45 secondi, 72°C per 45 secondi, e 72°C per 10 minuti; bFBF: un ciclo di denaturazione a 95°C per 90 secondi, 35 cicli a 95°C per 30 secondi, 56°C Ta per 30 secondi, e 72°C per 30 secondi. I prodotti di PCR sono stati separate con elettroforesi su gel all' 1.5% di agarosio e colorati con etidio bromuro

**Real-time RT-PCR.** Un microgrammo di RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA. Real-time La RT-PCR è stata eseguita con ABI PRISM 7000 Sequence Detector usando reagenti specifici (Applied Biosystems, Foster City, CA). Ogni gene è stato analizzato in parallelo con Abelson (ABL) I livelli totali di VEGF, HGF, PDGF, bFBF mRNA sono stati pertanto normalizzati con il contenuto di mRNA ABL

Tutte le sonde Taqman sono state marcate al 5'- con la 6-carbossi-fluoresceina e al 3' con 6-carbossi-tetrametilrodamina. La miscela di reazione conteneva 12.5 µL di Taqman buffer A con il colorante 6-carbossi-X-rodamina come riferimento e 2.5 µL di cDNA. Per la quantificazione di VEGF, HGF, PDGF, bFBF, 1.25 µL di reagent solution è stata aggiunta alla miscela di reazione; per la quantificazione di ABL sono state usate, 300 mmol/L di primers forward e reverse e 200 nmol/L di sonde specifiche Taqman. Dopo 2-minuti di incubazione a 50°C e 10-minuti di incubazione a 95°C, l'amplificazione è stata fatta con 40 cicli a 95°C per 15 secondi seguiti da 40 cicli a 60°C per 60 secondi. Ogni campione di RNA è stato testato in duplicato La relativa quantità dei geni a differenti concentrazioni di lenalidomide è stata calcolata con metodo  $\Delta\Delta Ct$

### **Western blotting analysis**

Le ECs sono state raccolte con un tampone modificato di lisi (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), e inibitore di Protease (Sigma-Aldrich)) e messe in ghiaccio per 30 min. I lisati sono stati trattati a 14000g per 15 min a 4

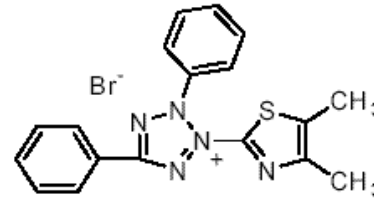


°C e le concentrazioni di proteine totali sono state determinate con il metodo Bradford usando il Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Un'aliquota di proteina (40 µg) è stata dissolta usando pre-cast 4-12% NuPAGE® Novex® Il gel a gradiente Bis-Tris (Invitrogen Corp.), è stato elettrotrasferito a una membrana di polivinilidene difluoruro (PVDF, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) e incubata con anticorpi primari e secondari. Le bande sono state visualizzate per chemiluminescenza (LiteAblot® extend substrate, Euroclone SpA, Pero, MI, Italy) usando il Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). L'intensità della bande è stata espressa come densità ottiche arbitrarie (OD).

## MTT assay

Il saggio citotossicologico MTT serve a valutare la diminuzione di vitalità delle cellule servendosi di un agente ossidante cromogeno,

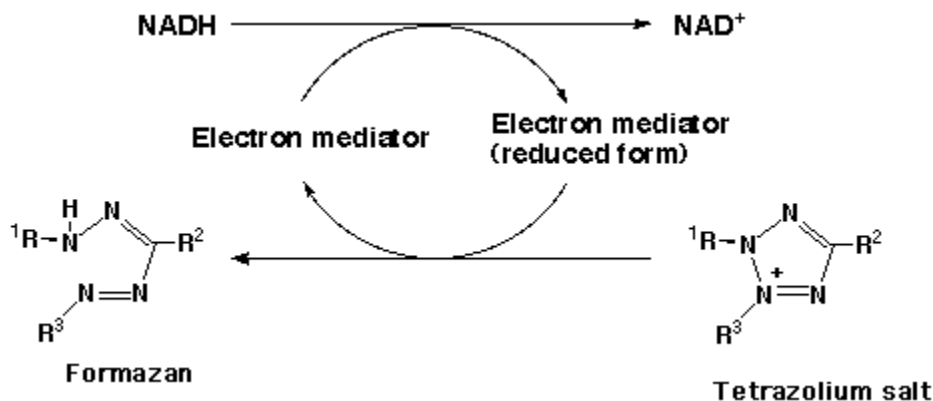
(MTT bromide) corrispondente ad un sistema policiclico (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>5</sub>S) dotato di un anello



tetrazolico che può essere facilmente ridotto

dalle deidrogenasi mitocondriali o da altri

sistemi di trasporto elettronico, formando - per apertura dell'anello tetrazolico - un composto cromogeno azotato detto formazano, il cui gruppo funzionale caratteristico è R<sup>1</sup>NH-N=CR<sup>2</sup>-N=NR<sup>3</sup>. Tale formazano forma dei cristalli insolubili nell'ambiente intracellulare a cui le membrane risultano sostanzialmente impermeabili: è quindi permessa l'entrata della molecola nella cellula, ma non l'uscita del prodotto se questo è stato correttamente metabolizzato, cioè se le catene di trasporto elettronico sono ancora metabolicamente attive (vale a dire dotate di un attivo potere riducente).



La trasformazione dell'MTT vede un viraggio della molecola da giallo a blu scuro-violetto, pertanto un saggio colorimetrico (ad esempio una lettura allo spettrofotometro) servirà per stimare il numero di mitocondri attivi e quindi il numero di cellule vitali nel campione .

E' stata effettuata la lettura spettrofotometrica a  $\lambda=570$  nm della piastra così

preparata; i valori di OD ottenuti sono stati mediati ed utilizzati per il calcolo della percentuale di vitalità cellulare secondo la formula proposta dal protocollo e di seguito riportata:

$$\% \text{ vitalità} = [ (\text{OD } 570 \text{ nm}) \text{ composto testato} / (\text{OD } 570 \text{ nm}) \text{ controllo negativo}] * 100$$

Questo saggio è stato utilizzato per testare la citotossicità di lenalidomide (Melikeet al 2007) nelle cellule di neuroblastoma

#### Saggio di ipossia con $\text{CoCl}_2$

Cloruro Cobalto (II) esaidrato ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , MW=237.9) è un induttore chimico dell hypoxia-inducible factor-1.3 8. Questo prodotto è solubile in acqua (100 mg/ml), dando luogo ad una soluzione rossa

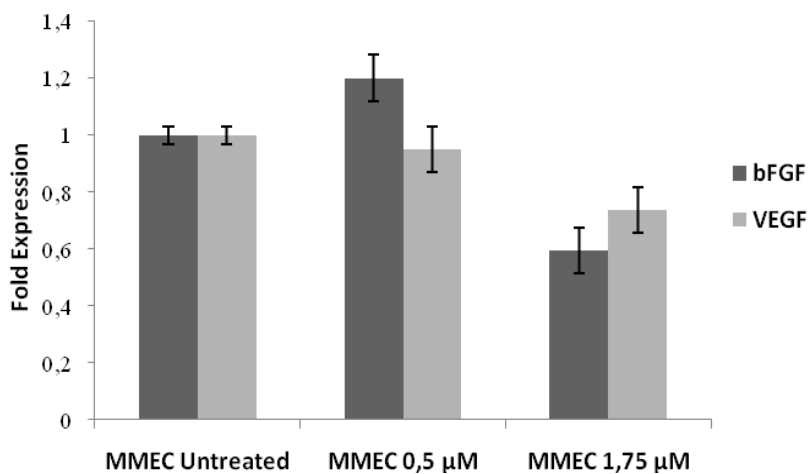
1. Preparare una soluzione stock 25mM in acqua sterile ,(preparare immediatamente prima dell uso)
2. Usare  $\text{CoCl}_2$  alla concentrazione final di 100 $\mu\text{M}$  per indurre condizione di ipossia.
3. Aggiungere  $\text{CoCl}_2$  al terreno di colture delle cellule e incubare per 24 ore in incubatore (37°C; 5%  $\text{CO}_2$ ).

## Risultati

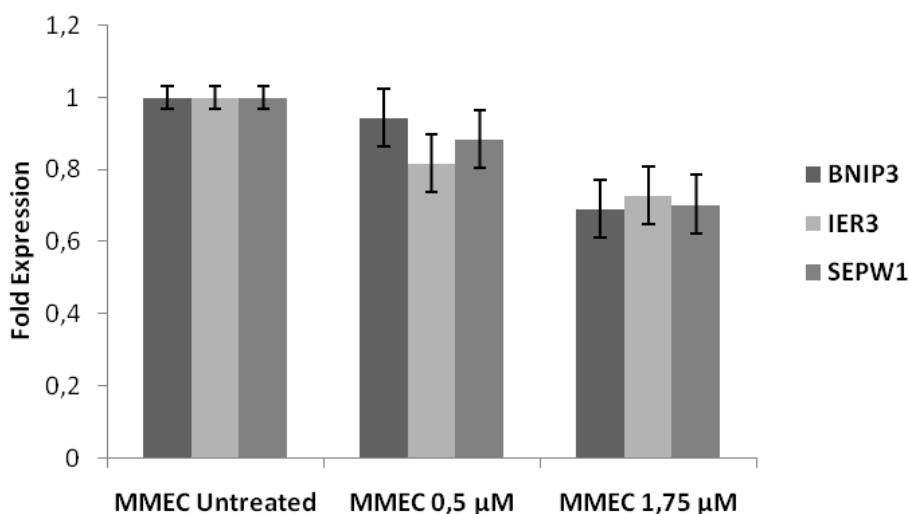
### La lenalidomide inibisce l'espressione di geni chiave coinvolti nel meccanismo biologico dell'angiogenesi

La lenalidomide a dosi terapeutiche di 1.75  $\mu\text{M}$  è stata capace di modulare l'espressione di geni chiave coinvolti nel meccanismo biologico dell'angiogenesi quali il bFGF (circa 40% in MMECs trattate vs. i controlli) e VEGF (circa 30% in MMECs trattate vs. controlli) (Fig. 5). Lenalidomide down-regola, in maniera dose-dipendente, l'espressione di geni che influiscono criticamente su funzioni biologiche delle cellule endoteliali di mieloma e che sono correlate col loro fenotipo iperangiogenico, quali BNIP3 e IER3 (entrambi coinvolti nei meccanismi di apoptosi e antiapoptosi), e SEPW1 (implicato nei processi di stress e omeostasi cellulare) (circa 30% nelle MMECs trattate con 1.75  $\mu\text{M}$  lenalidomide vs. controlli, Fig. 1).

*Fig.1*



**Fig.2**



**Lenalidomide riduce la migrazione delle MMEC e l'angiogenesi agendo sulla trasduzione del segnale indotta dal VEGF<sub>165</sub>**

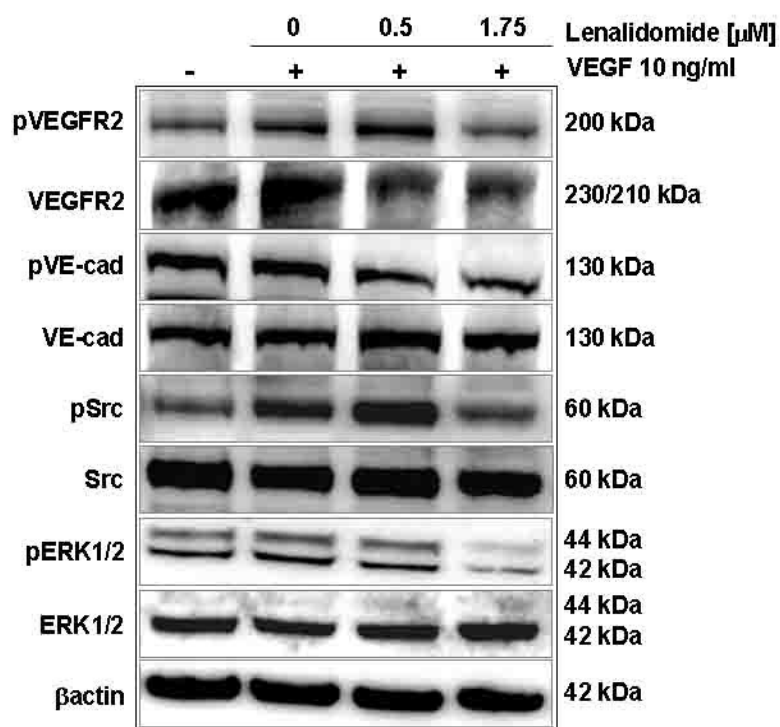
Esperimenti *in vivo* ed *in vitro* evidenziano che lenalidomide ha un effetto inibitorio sull'angiogenesi indotta dal VEGF<sub>165</sub>. Per valutare a che livello della via di trasduzione di MMECs agisce abbiamo realizzato esperimenti di Western blotting. Come mostrato in figura 2, il farmaco induce una leggera riduzione della fosforilazione del VEGFR2 mediata da VEGF<sub>165</sub> (circa 20% nelle MMECs trattate con 1,75 μM lenalidomide vs. le non trattate) e una forte inibizione del mediatore del segnale MAP kinase Erk1/2 (circa 50% nelle MMECs trattate con 1,75 μM lenalidomide vs. le non trattate), con un effetto massimo osservato alla dose terapeutica di 1.75 μM lenalidomide. Poiché è stato dimostrato che il pathway del VEGF/VEGFR-2 coinvolge anche la fosforilazione di VE-cadherin attraverso l'attività Src tirosin chinasi e che l'attivazione del complesso VE-cadherin–Src è aumentata nel tessuto angiogenico delle cellule endoteliali indotte da VEGF essendo questo uno step necessario per lo switch delle cellule endoteliali dal fenotipo quiescente a quello angiogenico, si è pensato di studiare se lenalidomide può anche interferire sulla fosforilazione di Src VE-cadherin. I risultati mostrano che lenalidomide riduce l'attività di Src

indotta da VEGF<sub>165</sub> (circa 25% nelle MMECs trattate con 1,75  $\mu$ M lenalidomide vs. le non trattate) e VE-cadherin (circa 35% nelle MMECs trattate con 1,75  $\mu$ M lenalidomide vs. le non trattate) in maniera dose-dipendente, come mostrato dalla fosforilazione su Y<sup>418</sup> e Y<sup>658</sup>. Presi insieme questi dati suggeriscono che lenalidomide inibisce l'angiogenesi indotta da VEGF-interrompendo l'attivazione di Src kinase e la conseguente fosforilazione di VE-cadherin tirosina

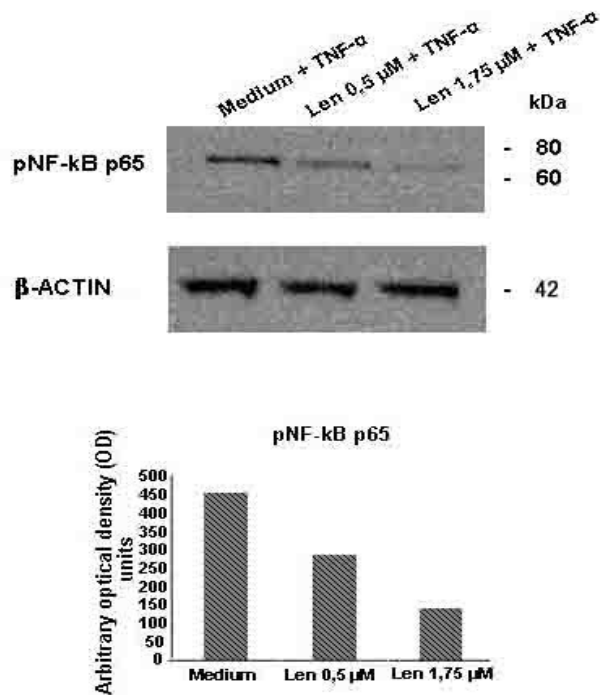
Inoltre poichè il pathway di NF- $\kappa$ B gioca un ruolo cruciale nella regolazione della crescita e sopravvivenza cellulare, è stato studiato se lenalidomide modula anche questa via.

Le MMECs sono state trattate con lenalidomide (0.5  $\mu$ M e 1.75  $\mu$ M) o mezzo di controllo per 4 ore, e poi è stato aggiunto TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) per almeno 20 min. L'immunoblotting dell'intero estratto cellulare dimostra che l'espressione di NF- $\kappa$ B p65 fosforilata è inibita da lenalidomide (Fig. 4) in maniera dose dipendente, mentre il farmaco non influenza l'attività basale di NF- $\kappa$ B p65.

**Fig.3**



**Fig.4**



### **Lenalidomide inibisce angiogenesi in vitro e in vivo**

Si è studiato se lenalidomide può influire direttamente inibendo l'angiogenesi in vivo usando il CAM assay come anche la proliferazione migrazione e formazione dei capillari in vitro

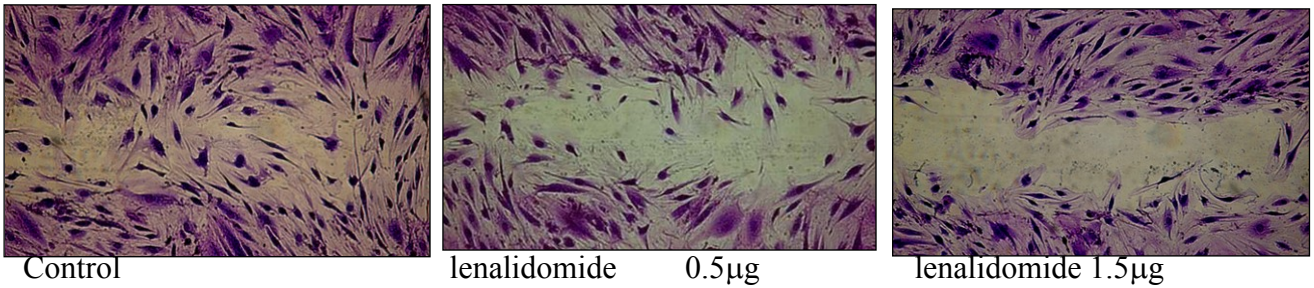
Lenalidomide influisce sulla migrazione delle cellule, questo effetto è stato valutato con il test del "wound" healing, con un effetto massimo a 1.5 μM che corrisponde alla dose terapeutica di 20-25 mg al giorno.(Fig.5)

Lenalidomide (0.1 μM - 10 μM) inibisce le cellule endoteliali (MMECs e HUVECs) nella formazione di capillari nel matrigel a dosi equivalenti a quelli usate nella clinica , deo un network disorganizzato paragonato alle cellule non trattate (Fig.6)

Lenalidomide inibisce l' angiogenesi in vivo nel sistema della membrana corioallontidea alla dose di 10 μM. In questi esperimenti, l'angiogenesi è stata indotta con VEGF (fig.7)

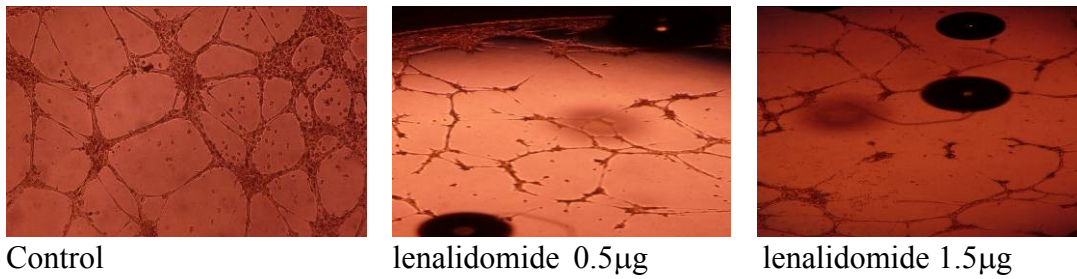
## Test del wound healing

FIG.5



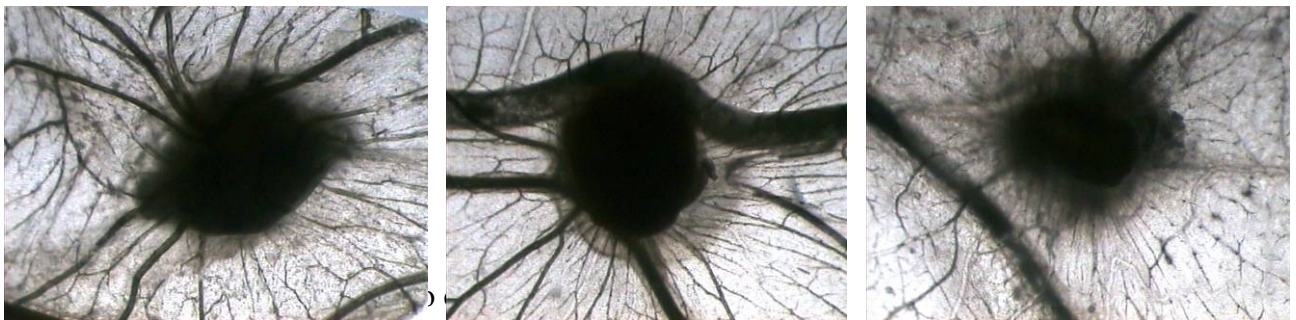
## *In vitro* Matrigel assay: 8 hr

FIG:6



## *In vivo* CAM assay: 4<sup>o</sup> giorno

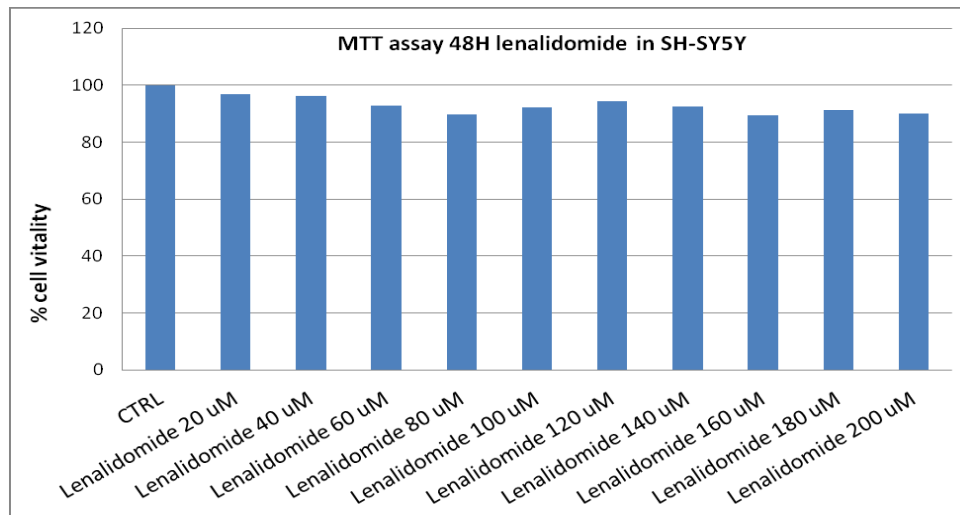
FIG.7





## Saggio di tossicità (MTT) della lenalidomide su neuroblastoma

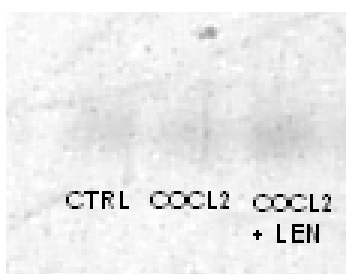
La Lenalidomide non ha esercitato alcun effetto tossico su cellule di neuroblastoma (fig 8).



## Effetto di lenalidomide su espressione di VEGF in condizioni di ipossia indotta da cloruro di cobalto.

Cellule di neuroblastoma sono state trattate a 24h con lenalidomide 50 $\mu$ M in condizioni di ipossia indotte da cloruro di cobalto 100  $\mu$ M per studiare il ruolo di lenalidomide nella modulazione di VEGF.

Dopo 24h dopo estrazione di RNA secondo protocollo Trizol (Invitrogen) si evidenzia una riduzione nell'espressione di VEGF indotta dalla lenalidomide.



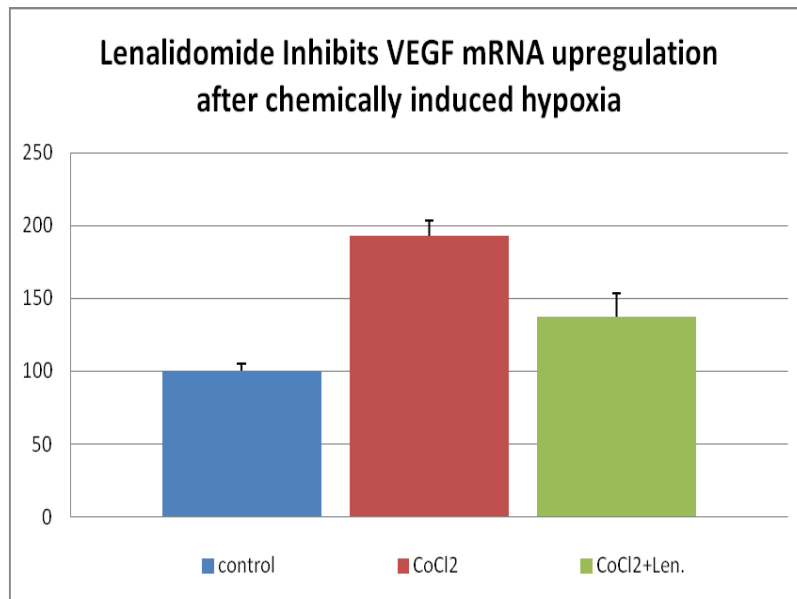


Fig.9 RT-PCR analysis of VEGF mRNA from neuroblastoma (SH-SY5Y) after chemically induced hypoxia by treatment with CoCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M (24 h). Hypoxic conditions strongly upregulated VEGF mRNA expression (+95% vs control) and co-treatment with lenalidomide (50  $\mu$ M) significantly reduced (-30% vs CoCl<sub>2</sub>) VEGF expression.

## Discussione

Focalizzandosi sull'approvata indicazione terapeutica finora ottenuta da lenalidomide nel mieloma multiplo si è cercato di investigare in vitro su cellule di mieloma multiplo l'effetto antiangiogenico del farmaco dimostrando che 1) lenalidomide impatta su importanti funzioni delle cellule endoteliali 2) down regola geni importanti coinvolti in funzioni biologiche correlate all'angiogenesi 2) influisce sulla cascata del segnale associata con attivazione/fosforilazione di VEGFR-2, MAP kinase Erk 1/2, Src kinase e VE-cadherin.

Allargando lo studio del meccanismo d'azione di lenalidomide in cellule di neuroblastoma si è voluto inizialmente testare l'effetto citotossico di questo farmaco su un modello tumorale neuronale e si è mostrato che lenalidomide neanche a concentrazioni alte (200 $\mu$ M) sembra dare segni di citotossicità, al contrario di quanto largamente noto su cellule isolate di mieloma multiplo (Hideshima T 2000, Mitsiades N 2002).

Successivamente da esperimenti di ipossia effettuati utilizzando il saggio con CoCl<sub>2</sub> si è notato che lenalidomide sembra aumentare l'espressione genica di VEGF in condizione di stress ipossico, svolgendo in questo modello cellulare un'azione pro-angiogenica.

Una marcata vascolarizzazione è una caratteristica di molte neoplasie del sistema nervoso centrale e in numerosi studi si è evidenziato come il VEGF sia un potente mediatore dell'angiogenesi in molti tumori cerebrali (glioblastoma, emangioblastoma, meningioma, neuroblastoma) e ci sia una significativa correlazione fra l'espressione del VEGF e la proliferazione dell'endotelio vascolare (Berkman RA, 1991). Comunque nel neuroblastoma, la forma più comune di tumore cerebrale pediatrico, l'espressione del VEGF sembra influire sull'angiogenesi nonché direttamente sulla crescita delle cellule maligne di neuroblastoma (Takano S 1996).

L'RNA messaggero di VEGF è espresso in grande misura nel neuroblastoma come anche nei tumori solidi che dipendono per la loro crescita e disseminazione dai processi di neo-vascolarizzazione (Langer I 2000) per cui è possibile ipotizzare che l'effetto inibitorio di lenalidomide verso l'up-regolazione di VEGF qui osservato nelle colture cellulari di neuroblastoma possa aprire nuove prospettive nell'utilizzo di questo farmaco anche in campo neurologico.



## Bibliografia

1. Avouac J, Wipff J, Goldman O, Ruiz B, Couraud PO, Chiocchia G, Kahan A, Boileau C, Uzan G, Allanore Y (2008) Angiogenesis in systemic sclerosis: impaired expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in endothelial progenitor-derived cells under hypoxic conditions. *Arthritis Rheum* 58:3550-3561
2. Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG. The evolution of thalidomide e its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:314-22
3. Bussolino F., Mantovani A., Persico G. *TIBS*, 22, 251-256, 1998
4. Cantara et al. 2004 *The FASEB J*. 2004 18:1943-1945
5. Cassavaugh J, Lounsbury KM. (2011) Hypoxia-mediated biological control. *J Cell Biochem*. 112(3):735-44
6. Chanan-Khan A, Miller KC, Musial L, Lawrence D, Padmanabhan S, Takeshita K, Porter CW, Goodrich DW, Bernstein ZP, Wallace P, Spaner D, Mohr A, Byrne C, Hernandez-Ilizaliturri F, Chrystal C, Starostik P, Czuczman MS: Clinical efficacy of lenalidomide inpatients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2006, 24(34):5343-9.
7. Chen Z, Liu F, Ren Q, Zhao Q, Ren H, Lu S, Zhang L, Han Z. (2008) Hemangiopoietin promotes endothelial cell proliferation through PI-3K/Akt pathway. *Cell Physiol Biochem*. ;22(1-4):307-14.
8. Cho SW, Hartle L, Son SM, Yang F, Goldberg M, Xu Q, Langer R, Anderson DG (2008) Delivery of small interfering RNA for inhibition of endothelial cell apoptosis by hypoxia and serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 376:158-163
9. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 49:507-21
10. Corral LG, Haslett PAJ, Muller GW, Chen R, Wong LM, Ocampo CJ, et al. Differential cytokine modulation e T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-a. *J Immunol*. 1999;163:380-6.
11. Corral LG, Muller GW, Moreira AL, Chen Y, Wu M, Stirling D, et al. Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity. *Mol Med*. 1996;2:506-15.
12. Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai Y-T, et al. Thalidomide e immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98:210-6.

13. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci US A* 1994;91:4082-5
14. De Luisi A<sup>2</sup>, Arianna Ferrucci<sup>1</sup>, Addolorata M.L. Coluccia<sup>6</sup>, Roberto Rial<sup>1</sup>, Michele Moschetta<sup>1,5</sup>, and Angelo Vacca<sup>1</sup> Lenalidomide Restrains Motility and Overangiogenic Potential of Bone Marrow Endothelial Cells in Patients with Active Multiple Myeloma
15. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, Prince HM, Harousseau JL, Dmoszynska A, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007;357:2123-32
16. Dredge K, Marriott JB, Macdonald CD, Man H-W, Chen R, Muller GW, et al. Novel thalidomide analogues display antiangiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *Br J Cancer*. 2002;87:1166-72.
17. Dredge K, Horsfall R, Robinson SP, Zhang LH, Lu L, Tang Y, Shirley MA, Muller G, Schafer P, Stirling D, Dalgleish AG, Bartlett JB: Orally administered lenalidomide (CC-5013) is anti-angiogenic in vivo and inhibits endothelial cell migration and Akt phosphorylation in vitro. *Microvasc Res* 2005, 69(1-2):56-63. Folkman J. 2007. *Nature Reviews* 6:273-286
18. Durie BG: Staging and kinetics of multiple myeloma. *Semin Oncol* 1986; **13**: 300-309.
19. Harris A.L *J Mammary Gle Biol Neoplasia* (2005) 10: 299-310
20. Haslett PA, Hanekom WA, Muller G, Kaplan G. Thalidomide and a thalidomide analogue drug co-stimulate virus-specific CD8+ T cells in vitro. *J Infect Dis*. 2003;187:946-55.
21. Haslett PA, Corral LG, Albert M, Kaplan G. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J Exp Med*. 1998;187:1885-92.
22. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raju N, Davies FE, Tai YT, Treon SP, Lin B, Schlossman RL, Richardson P, Muller G, Stirling DI, Anderson KC: Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood* 2000, 96(9):2943-50.
23. Hu GF. *J Cell Biochem* 1998;69(3):326-35.
24. Eerson KC. Lenalidomide and thalidomide: mechanisms of action--similarities and differences. *Semin Hematol*. 2005;42 Suppl4:S3-8.
25. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, et al. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 1999; **4**: 915-924.
26. Ferrara N, Kowanz M. (2006) Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res*. 12(17):5018-22.

27. Ferrara N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280:C1358-66
28. Fine HA, FiggWD, Jaeckle K, et al. Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol* 2000;18:708<sup>^</sup>15
29. Gariboldi MB, Ravizza R, Monti E (2010) The IGFR1 inhibitor NVP-AEW541 disrupts a prosurvival and pro-angiogenic IGF-STAT3-HIF1 pathway in human glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 80:455-462
30. Glesne DA, Zhang W, Meava S et al. *Cancer Res.* 2006; 66: 4030–40
31. Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D, Valensin G. *Chem. Rev.* 2006; 106:1995–2044
32. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.*273(46):30336-43
33. Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B, Lentzsch S, Davies FE, Chauhan D, Schlossman RL, Richardson P, Ralph P, Wu L, Payvandi F, Muller G, Stirling DI, Anderson KC: Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* 2001,15(12):1950-61
34. Hewett PW, Murray JC. Human lung microvessel endothelial cells: isolation, culture e characterization. *Microvasc Res* 1993;46:89–102
35. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; **121**: 749-757.
36. Jeong JK, Moon MH, Seo JS, Seol JW, Lee YJ, Park SY. (2011) Sulforaphane blocks hypoxia mediated resistance to TRAIL-induced tumor cell death. *Mol Med Report.* 4(2):325-30.
37. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. (2001). Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 15:1312-4.
38. Jia WD, Xu GL, Xu RN, Sun HC, Wang L, Yu JH, Wang J, Li JS, Zhai ZM, Xue Q (2003) Octreotide acts as an antitumor angiogenesis compound and suppresses tumor growth in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma Xenografts. *J Cancer Res Clin Oncol* 129:327-334

39. Jiang J, Xia XB, XU HZ, Xiong Ym, Song WT, Xiong SQ, Li Y (2009) Inhibition of Retinal Neovascularization by Gene Transfer of Small Interfering RNA Targeting HIF-1  $\alpha$  and VEGF. *J Cell Physiol* 218: 66–74.
40. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL. (2003). Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res.* 93:1074-81.
41. Kumar S, Rajkumar SV. Thalidomide and lenalidomide in the treatment of multiple myeloma. *Eur J Cancer.* 2006;42: 1612-22.
42. Lacy MQ, Gertz MA, Dispenzieri A, Hayman SR, Geyer S, Kabat B et al. Long-term results of response to therapy, time to progression and survival with lenalidomide plus dexamethasone in newly diagnosed myeloma. *Mayo Clin Proc* 2007;82:1179–84
43. Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, et al. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* 2005 ; **96**:384– 391
44. Lichtenstein A, Tu Y, Fady C, Vescio R, Berenson J: Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell Immunol* 1995,162(2):248-55..
45. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods* 2001;25:402–8.
46. Lonial S. When “the same” is really “different”. *Blood.* 2006;108:3233-4.
47. Lu L, Payvandi F, Wu L, Zhang LH, Hariri RJ, Man HW et al. The anticancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions. *Microvasc Res* 2009; **77** 78–86.
48. McAuslan BR, Reilly W. *Exp Cell Res* 1980;130(1):147–57
49. Marriott JB, Muller G, Stirling D, Dalgleish AG. Immunotherapeutic and antitumour potential of thalidomide analogues. *Expert Opin Biol Ther.* 2001;1:675-82.
50. Marriott JB, Clarke IA, Dredge K, Muller G, Stirling D, Dalgleish AG. Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF- $\alpha$  and TNFR2 during co-stimulation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Clin Exp Immunol.* 2002;130:75-84.
51. Mazzone M. Novel alternatives for anti-angiogenic therapy and therapeutic angiogenesis. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 2010; **72**(3-4):165-75.
52. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G: Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993, **177**(6):1675-80.



53. Melike MUT et al Journal of neurological neurosciences 2007 24:1 #10;29-37
54. Muller GW, Corral LG, Shire MG, Wang H, Moreira A, Kaplan G, et al. Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factorinhibitory activity. J Med Chem. 1996;39:3238-40
55. Nilsson I, Shibuya M, Wennström S (2004) Differential activation of vascular genes by hypoxia in primary endothelial cells. Exp Cell Res 299:476-485
56. Payvei F, Wu L, Haley M, Schafer PH, Zhang LH, Chen RS, et al. Immunomodulatory drugs inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF-a, IL-1b, e LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner. Cell Immunol.2004;230:81-8.
57. Pogue A.I et al.. 2004 Neuroreport 15:1507-1510.
58. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 2005; **105**: 1383-1395.
59. Pagès G, Pouysségur J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene-a concert of activating factors. Cardiovasc Res. 65:564-
60. Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood* 2005; **106**: 4050–4053..
61. Rao KV. Lenalidomide in the Treatment of Multiple Myeloma *Am J Health-Syst Pharm.* 2007; 64(17): 1799-1807.
62. Ria R, Vacca A, Russo F, et al. A VEGFdependent autocrine loop mediates proliferation and capillarogenesis in bone marrow endothelial cells of patients with multiple myeloma. *Thromb Haemost.* 2004; **92**: 1438-1445.
63. Ria R, Todoerti K, Berardi S, Coluccia AM, De Luisi A, Mattioli M, et Gene expression profiling of bone marrow endothelial cells in patients with multiple myeloma. Clin Cancer Res 2009;15:5369–78.
64. Ribatti D, Nico B, Vacca A, et al. The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. *Nat Protoc* 2006; **1**: 85-91.
65. Richardson PG, Schlossman RL, Weller E, Hideshima T, Mitsiades C, Davies F, LeBlanc R, Catley LP, Doss D, Kelly K, McKenney M, Mechlowicz J, Freeman A, Deocampo R, Rich R, Ryoo JJ, Chauhan D, Balinski K, Zeldis J, Anderson KC: Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated inpatients with relapsed multiple myeloma. *Blood* 2002,100(9):3063-7.
66. Symeonidis A, Kourakli A, Katevas P, Perraki M, Tiniakou M, Matsouka P, Georgoulas V, Zoumbos N: Immune functionparameters at diagnosis in patients with myelodysplastic

- syndromes: correlation with the FAB classification and prognosis. *Eur J Haematol* 1991, 47(4):277-81.
67. Schneider C, Krischke G, Keller S, Walkinshaw G, Arend M, Rascher W, Gassmann M, Trollmann R. (2009). Short-term effects of pharmacologic HIF stabilization on vasoactive and cytotropic factors in developing mouse brain. *Brain Res.* 1280:43-51.
  68. Takata K, Morishige K, Takahashi T, Hashimoto K, Tsutsumi S, Yin L, Ohta T, Kawagoe J, Takahashi K, Kurachi H (2008) Fasudil-induced hypoxia-inducible factor-1alpha degradation disrupts a hypoxia-driven vascular endothelial growth factor autocrine mechanism in endothelial cells. *Mol Cancer Ther* 7:1551-1561
  69. Teo SK: Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *Aaps J* 2005, 7(1):E14-
  70. Vacca A, Scavelli C, Montefusco V, Di Pietro G, Neri A, Mattioli M, et al. Thalidomide downregulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:5334-46.
  71. Vacca, A., Ria, R., Semeraro, F., Merchionne, F., Coluccia, M., Boccarelli, A., Scavelli, C., Nico, B., Gernone, A., Battelli, F., Tabilio, A., Guidolin, D., Petrucci, M., Ribatti, D., and Dammacco, F. Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood* 2003; **102**: 3340-3348.
  72. Vacca, A., Scavelli, C., Montefusco, V., Di Pietro, G., Neri, A., Mattioli, M., Biccato, S., Nico, B., Ribatti, D., Dammacco, F., *et al.*. Thalidomide down-regulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 5334-5346.
  73. Vacca A, Ribatti D, Presta M, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 1999; **93**: 3064-3073.
  74. Vacca A, Scavelli C, Serini G, Di Pietro G, Cirulli T, Merchionne F *et al.* Loss of inhibitory semaphorin 3A (SEMA3A) autocrine loops in bone marrow endothelial cells of patients with multiple myeloma. *Blood* 2006; **108**: 1661-1667.
  75. Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V (1996) Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 94:1647-1654
  76. Weber DM, Chen C, Niesvizky R, Wang M, Belch A, Stadtmauer E, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone provides improved overall survival compared to high-dose dexamethasone alone for relapsed or refractory multiple myeloma (MM): results of a North American phase III study (MM-009) [abstract 7521]. *J Clin Oncol* 2006; **24Suppl**:18S.

77. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D. Endothelial barrier disruption by VEGF mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol* 2004; **167**:223– 229.

|  |    |
|--|----|
| Introduction                             |    |
| Neurodegeneration .....                  | 44 |
| Angiogenesis and neurodegeneration ..... | 46 |
| Lenalidomide .....                       | 51 |
| Objectives.....                          | 59 |
| Materials and methods .....              | 62 |
| Results.....                             | 67 |
| Discussion                               | 75 |
| References.....                          | 76 |

## INTRODUCTION

### **Neurodegeneration**

Neurodegeneration is the umbrella term for the progressive loss of structure or function of neurons, including death of neurons. Many neurodegenerative diseases including Parkinson's, Alzheimer's, and Huntington's occur as a result of neurodegenerative processes. As research progresses, many similarities appear which relate these diseases to one another on a sub-cellular level. Discovering these similarities offers hope for therapeutic advances that could ameliorate many diseases simultaneously

The greatest risk factor for neurodegenerative diseases is aging. Mitochondrial DNA mutations as well as oxidative stress both contribute to aging (DiMauro S, Schon EA 2008). Many of these diseases are late-onset, meaning there is some factor that changes as a person ages for each disease (Rubinsztein DC October 2006). One constant factor is that in each disease, neurons gradually lose function as the disease progresses with age.

Alzheimer's disease (AD), in particular, is the leading cause of senile dementia in the elderly, is a complex neurodegenerative syndrome, which leads to the inexorable progression to a loss of cognitive abilities for which there is at present an effective cure. To date, in fact only certain medications are available, while lacking both symptomatic drugs able to revert the process of Neurodegeneration and effective diagnostic tools that allow a diagnosis in primary stages the gradual lengthening of life of the population suggests that the AD can reach epidemic proportions within the next twenty years, making it essential to develop new therapeutic strategies and reliable diagnostic tools for early detection of this disease. The emerging opinion is that at the base of the eziopatologico process there is a cerebrovascular dysregulation, which is a characteristic not only of purely diseases cerebrovascular, as the stroke, but also neurodegenerative conditions. Many neuropathologic studies have described, indeed, morphological alterations in brain capillaries and a reduction of blood flow in the brain of patients with the disease-causing importance of these

vascular changes is difficult to interpret because it is unclear whether this is a consequence or a cause of neuronal dysfunction and neurovegetative process.

## **Angiogenesis**

Angiogenesis means the set of functional processes that lead to the formation of new blood vessels from pre-existing vessels. Endothelial cells that make up the inner layer of all vessels, are central in the angiogenic phenomenon (Conway 2001). They are involved, according to a genetically determined program, mediated by specific factors and receptors, in a series of events such as proliferation, differentiation, migration and morphological organization in close connection with the surrounding tissue. The formation of a jar then passes through several well-defined stages, characterized by changes of endothelium and extracellular matrix. In the first stage of angiogenesis occurs a "destabilization" of existing vessels due to an increase in vessel permeability, and a loss of connections between endothelial cells. Therefore there is a second phase of the migration and proliferation of endothelial cells in the tissue where it is required the formation of new blood vessels. During this stage proteolytic enzymes are liberated which alter the density of extracellular matrix for the purpose of facilitating migratory activity of endothelial cells. The third stage of angiogenesis corresponds to the endothelial cell differentiation, and is characterized by inhibition of cell proliferation and formation of capillaries. The last stage of functional maturation is characterized by recruitment of periendoteliali cells, which support and smooth muscle cells periciti and reorganization of cellular interactions (Bussolino 1998)

## **Angiogenesis and Neurodegeneration**

Angiogenesis--the development of new blood vessels--is a crucial step for the formation and remodeling of the nervous system and protect it from disease. Recent research has improved our understanding of how the brain and other tissues grow new blood vessels in normal and pathological conditions. Some factors of angiogenesis, particularly the VEGF (vascular endothelial growth factor) are known to have an involvement in neuronal proliferation (neurogenesis), prevention or protection from neuronal damage (neuroprotection) and in the pathogenesis of stroke and Alzheimer's disease.

Epidemiological studies show that anti angiogenic drugs bring benefits to patients with Alzheimer's disease (AD), indicating that the non-vascular regulation plays a critical role in the AD, which is then a disease "angiogenesis-dependent" (Harris 2005). In addition, the angiogenic growth factor, VEGF and bFGF are also included among those whose synthesis is stimulated by A-beta (Folkman 2007), and are also involved in neuronal plasticity due to their gliotrophic activities/controls (Mc Auslan 1980, Hu 1998). The study of relationship between A-beta and the angiogenic process (Glesne 2006, Gaggelli 2005) can clarify the process to etiopathology. Both the AD, as well as other neurodegenerative disorders are neurovascular diseases are, in fact, in recent years, it has emerged the concept of Neurovascular unit as a new paradigm for the study of the physiology and pathology of the CNS. This concept proposes that the focus purely neurocentric is not sufficient and emphasizes that all cell of Neurovascular unit i.e. vascular components, neurons and glia, should be examined in an integrated context. The signaling and cell-cell coupling between these different compartments form the basis for a normal functionality. A disordered communication and a neuro-vascular coupling disrupted gives away to disruption and disease. Besides a physical association the same micro-environment, these cells interact with one another through feedback mechanisms positive and negative related to metabolic demands (Pogue 2004). Neurogenesis and angiogenesis



revealed many similarities between these processes. These include growth factors and their receptors, similar signals for cell proliferation, cell fate, formation of contours and physical space as a result of a parallel model anatomical development (Cantara 2004). Angiogenesis is a multifactor complex process whose disomeostasis can be cause of several diseases with acute or chronic course. It has attracted the interest of many researchers who are involved in the study of various pathological processes, from cancer to neurodegenerative diseases. Then, one of the main objectives of this study concerns the search for common factors and correlations between chronic neurodegenerative diseases and vascular disorders, to highlight the role yet underestimated of angiogenesis and identify possible therapeutic interventions that have as primary target and then process the angiogenic endothelial cells.

### **Hypoxia and angiogenesis**

Angiogenesis is not just a physiological process, but is also the basis of many pathological States as the progression of tumors, retinopathy of the premature and diabetic retinopathy. The growth factor of vascular endothelial cells (VEGF) is one of the most powerful pro-angiogenic factors. Pro-angiogenic action of VEGF is mediated by its interaction with two tyrosine kinase receptor (VEGFR-1, VEGFR-2) and it is known that over-expression of VEGF is one of the main causes of this. It has been shown that hypoxia is one of the main stimuli can induce the over-expression of VEGF and therefore promote a pathological angiogenesis. However, much remains to be included about the mechanisms that regulate the system of VEGF in hypoxic conditions.

The term hypoxia indicates a State of insufficient oxygen in the cellular environment. This condition can affect the entire organism in situations of low concentration of oxygen in the environment (e.g. happens at high altitude), or it can develop in a bounded area of tissue as a result of ischemia or neoplastic growth (Jeong et al., 2011). Given the vital importance of oxygen for aerobic cellular metabolism in animal organisms have evolved complex homoeostatic mechanisms

in order to prevent hypoxia. Specific oxygen sensors were already described in bacteria and yeast, but only recently has begun to shed light on regulation systems implemented by higher organisms including humans. Despite being known to exist some specialized cells in assessing the levels of oxygen, all mammalian cells are able to react to a local condition of hypoxia by activation of a transcriptional cascade involving numerous metabolic pathways. This phenomenon takes place in a few hours and is fundamental to the whole organism, much to be involved in many physiological and pathological processes 11 (Gariboldi et al., 2010). A number of experimental evidence and in-depth analysis of the pathophysiology of vascular and neoplastic diseases have identified the availability of oxygen an important regulator of angiogenesis, although adaptive systems are complex and still not quite clear 12 (Cassavaugh and Lounsbury, 2011). Understanding the mechanisms that regulate cellular processes promoted by hypoxia may therefore assume a very important role in the development of therapeutic strategies aimed at to combat major diseases such as cancer and proliferative retinopathy (Mazzone, 2010). Numerous research indicates that hypoxia induces an increase in VEGF expression in different cell types, including human endothelial cells 12 (Avouac et al., 2008; Cho et al., 2008; Liu et al., 2009; Nilsson et al., 2004; Takata et al., 2008; Zheng et al., 2008). Hypoxia can also modulate the expression of VEGF receptors although the data reported in human endothelial cells are sometimes very at odds with one another, both as regards VEGFR-1 13 (Avouac et al., 2008; Cho et al., 2008; Gerber et al., 1997; Nilsson et al. 2004) and VEGFR-2 14 (Avouac et al., 2008; Takata et al., 2008; Waltenberger et al., 1996) It's been done a lot of work to clarify the role of transcription factors in regulating target genes involved in angiogenesis. In this regard, the HIF hypoxia inducible factor-1 from and signal transducer and activator of transcription STAT3, are particularly interesting because their activation is coupled to the regulation of VEGF 15 (Chen and Han, 2008; Fong, 2009). HIF-1 is a transcription factor heterodimeric consisting of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. The HIF-1  $\beta$  subunit is constitutively expressed while the expression and activity of HIF-1  $\alpha$  subunits are closely controlled by cellular concentrations of oxygen. In fact, in conditions of normal oxygen levels, HIF-1 Alpha is quickly

hydroxylated by prolyl hydroxylase enzymes that require oxygen and iron in order to carry on its business, prompting the binding of this protein with subunits of Von Hippel-Lindau a ubiquitin ligase E3-that determines the start to degradation by the proteasome. In condition of hypoxia HIF-1 Alpha escape this degradation due to inactivation of the hydroxylase and begins to accumulate in the cytoplasm of the cell. When its cytoplasmic concentration reaches a critical level, moves into the nucleus where neurotransmitter, such as adrenaline with the HIF-1  $\beta$  subunit (Takahashi and Shibuya, 2005). Once the dimerization of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits within the core, HIF-1 binds to hypoxia responsive element (HRE) in the promoter or enhancer regions from hypoxia inducible genes determining activation 16 (Jewell et al., 2001). HIF-1 promotes transcription of over 70 target genes 17 (seed, 2004) depending on the type of cell 18 (Kelly et al., 2003) and organ 19 (Schneider et al., 2009). HIF-1 is able to regulate various physiological processes including erythropoiesis, Glycolysis and angiogenesis, which are the main responses to adaptation to hypoxia 20 (Jiang et al., 1997). In particular, HIF-1 is the main factor responsible for the expression and secretion of VEGF by cells in hypoxic conditions and play a key role in several diseases characterized by abnormal development of blood vessels 21 (Pagés and Pouyssegur, 2005). Therefore the investigation of the existing molecular correlation between angiogenesis and ipoxia has seemed interesting and challenging

....

## Lenalidomide

Lenalidomide (Revlimid,<sup>®</sup> CC-5013) is an Immunomodulatory Drug (IMiD) structurally related to thalidomide. Development of lenalidomide and other IMiDs began in the 1990s (Hideshima 2000) to improve efficacy and reduce side effects of thalidomide.

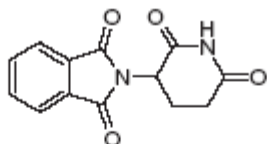


Fig. 1. Chemical structure of thalidomide.

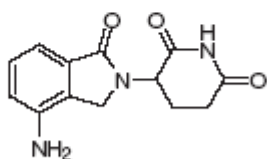


Fig. 2. Chemical structure of lenalidomide.

Phase I, II, and III trials have been carried out with lenalidomide in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (MM), and the drug has shown impressive response rates in the relapse (Dimopolous 2007). Two large multicentre phase III trials comparing the combination of lenalidomide plus dexamethasone to dexamethasone alone in patients with relapsed/refractory MM found prolonged time to progression with addition of lenalidomide (. Furthermore a phase II trial showed promising activity in newly-diagnosed myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone (Dredge 2002).

Lenalidomide gives *in vivo* antitumor properties due to a stronger stimulation of T-cells, IL-2/IFN- $\gamma$  production, and inhibition of TNF- $\alpha$  than thalidomide (Eerson 2005). The antitumor effect of lenalidomide may be related to its ability to affect multiple cell processes that are directly or indirectly involved in cancer cell growth and survival. In MM cells, lenalidomide has been shown to directly inhibit growth and promote apoptosis , and inhibit their adhesion to stromal cells via inhibition of cell adhesion molecules including ICAM-1 and VCAM-1. In stromal cells, lenalidomide reduces the expression of pro-angiogenic factors, such as VEGF and bFGF, and of other growth signals that promote bone marrow angiogenesis, such as TNF- $\alpha$ , and IL-6. It also

stimulates T-cells and NK cell activities (Bartlett 2004). However, the precise mechanisms of action and molecular targets of lenalidomide in a well-defined subpopulation of stromal cells, such as endothelial cells (ECs) in MM (MMECs) are still elusive.

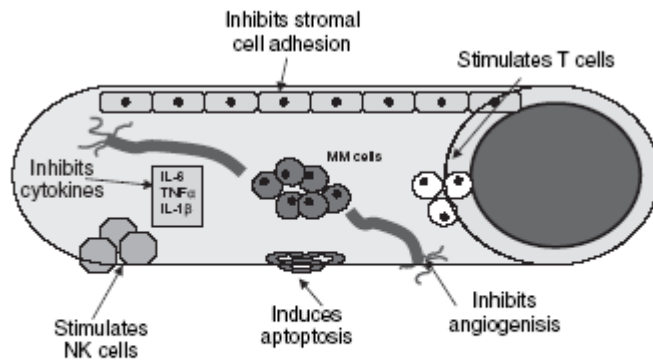


Fig. 3. Mechanisms of action of lenalidomide in multiple myeloma (from Celgene Corporation, France).

### Mechanism of action of Lenalidomide

The clinical evidence for therapeutic potential of lenalidomide in various malignant conditions is consistent with the multitude of pharmacodynamic effects that have been shown in vitro and in animal models. Studies have shown that lenalidomide may work through various mechanisms in different hematologic malignancies.

These mechanism involved direct cytotoxicity as well as through indirect effects on tumor immunity. Thus the differential efficacy noted with lenalidomide therapy among various disease states can possibly be explained individual's immune status and disease specific pathophysiology. Following are the different mechanisms explained by which lenalidomide acts in the body.

### Immunomodulation

The immune system is comprised of cellular (macrophages, dendritic cells, NK cells, T cells and B cells), and humoral components (antibodies, cytokines). The immune system can prevent development of cancers by eliminating or suppressing oncogenic viral infections, altering the inflammatory milieu conducive to tumor genesis, and by immune surveillance by identifying and destroying transformed cells before they can cause harm [Hu 1998].

Lenalidomide has been shown to modulate different components of the immune system by altering cytokine production, regulating T cell co stimulation and augmenting the NK cell cytotoxicity. Immunomodulatory properties of Lenalidomide are implicated in its clinical efficacy in multiple myeloma, CLL and myelodysplastic syndromes; where the disease pathogenesis involves in part a deregulated immune system in the form of altered cytokine networks in tumor microenvironment, defective cell regulation of host-tumor immune interactions, and diminished NK cell activity.

### **Altering cytokine production**

Cytokines are soluble proteins secreted by hematopoietic and non hematopoietic cell types and are critical for both innate and adaptive immune responses. The expression of cytokines by cells may be altered in immunological, inflammatory, infectious and neoplastic disease states.

Cytokines in turn exert their effects by influencing gene activation, growth, differentiation, functional cell surface molecule expression and cellular effector function. A coordinated cellular and humoral (cytokines, antibodies) interactions facilitate tumor destruction.

Lenalidomide has been shown to inhibit production of pro inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 and elevate the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 from human PBMCs[Corral 1999]. The downregulation of TNF-secretion is particularly striking and is up to 50,000 times more when compared to thalidomide[Muller 1999]. TNF- $\alpha$  is a highly pleiotropic cytokine produced primarily by monocytes and macrophages and plays an important role in protective immune responses against bacterial and viral infections. Elevated TNF- $\alpha$  production is implicated in the pathogenesis of various hematologic malignancies [Symeonidis 2001].

These reductions correlate with cytoreduction suggesting a casual relationship with tumor growth [Chanan Khan 2006]. Similarly, reduction in IL-6 and TNF- $\alpha$  levels could explain the action of lenalidomide in multiple myeloma. IL-6 inhibits the apoptosis of malignant myeloma cells and helps in their proliferation[Lichstein 1995]. Lenalidomide downregulates the production of IL-6 directly and also by inhibiting multiple myeloma (MM) cells and bone marrow stromal cells (BMSC)

interaction which augments the apoptosis of myeloma cells [Richardson 2002]. The precise mechanism of TNF- $\alpha$  downregulation by lenalidomide is not known, however thalidomide has been shown to increase the degradation of TNF- $\alpha$  mRNA [Moreira 1993,]. It is possible that lenalidomide may work through similar mechanisms.

### **Anti-angiogenesis activity**

The growth of the primary and metastatic tumors requires the development of new blood vessels, a process described as angiogenesis. Tumors possess the ability to promote the formation of new blood vessels from preexisting host capillaries at a critical phase of the tumor development when the balance of pro- angiogenic and anti-angiogenic factors is altered. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors are required for the formation of blood vessels during embryonic development, wound healing, and carcinogenesis. Tumors are more dependent on the VEGF-Receptor signaling for growth and survival compared to normal endothelial cells

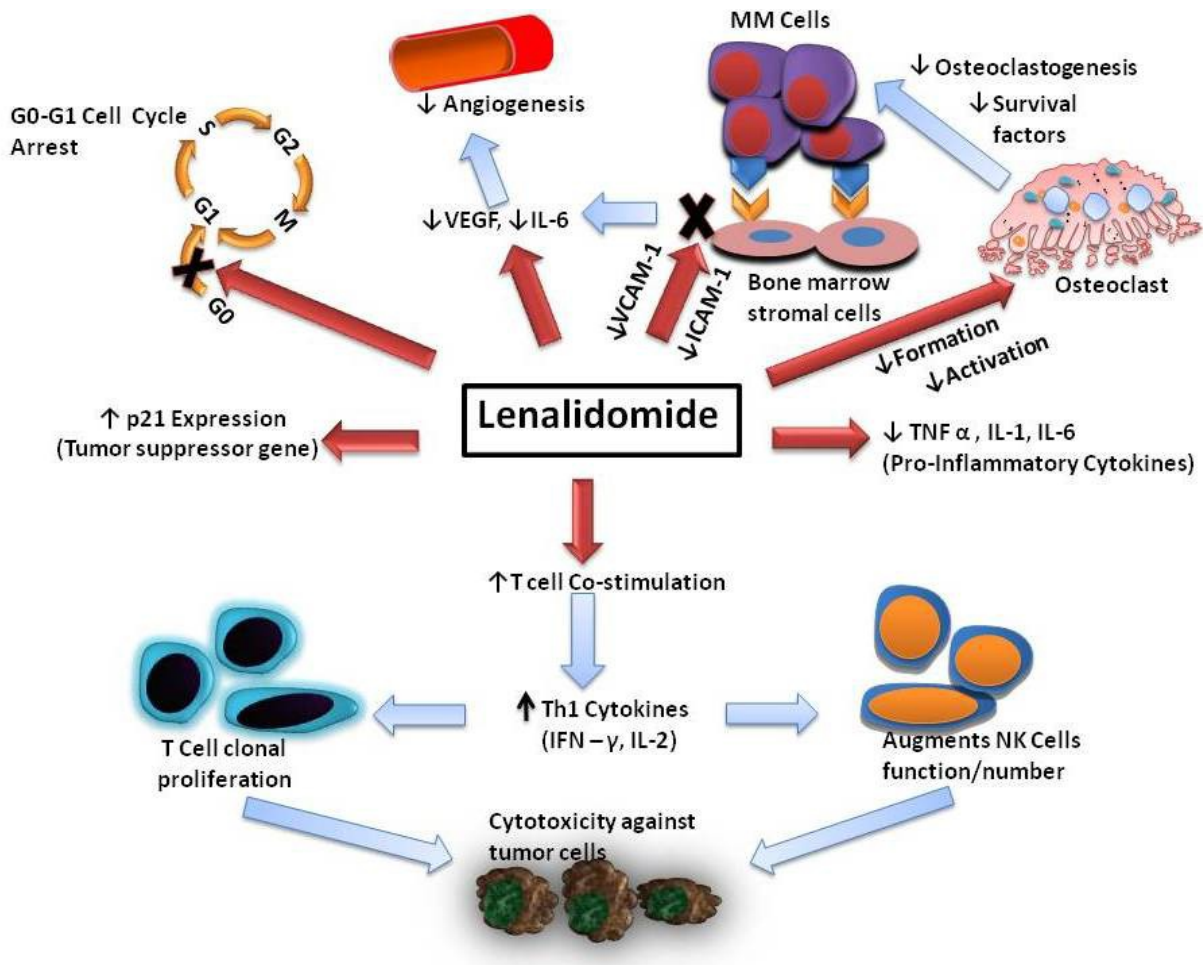
[D'amato 1994]. Early studies showed that Thalidomide had anti angiogenic activity in a rabbit model of corneal neovascularization that was induced as a response to bFGF. This report led to its use in Multiple Myeloma, where it demonstrated clinical benefit and was approved for use by the FDA. Thalidomide and the newer IMiDs have also been shown to significantly decrease the expression of angiogenic factors VEGF and Interleukin-6 (IL-6) in multiple myeloma; thereby reducing angiogenesis and hence contributing to clinical activity in multiple myeloma [Teo 2005]. The newer IMiDs were found to be 2–3 times more potent compared to thalidomide in antiangiogenic activity in various vivo assays [Gupta 2005] The antiangiogenic activity of both thalidomide and IMiDs has also been shown to be independent of immunomodulatory effects [Dredge 2001].

Apart from alteration in the levels of VEGF, analysis of signal transduction events show that lenalidomide partially inhibits Akt phosphorylation after VEGF stimulation in endothelial cells and also has inhibitory effects on phosphorylation of Gab1, a protein upstream of Akt 1 [Dredge 2005]. These observations demonstrate that IMiDs may affect angiogenesis by multiple mechanisms.

### **Direct anti tumor activity**

Lenalidomide treatment has also shown anti proliferative activity against MDS and MM cells in the absence of immune effector cells [Bartlett 2004]. Malignant plasma cells derived from refractory cases of myeloma were shown to be susceptible to IMiD induced growth arrest. Lenalidomide has also been shown to inhibit proliferation in Burkitt's Lymphoma cell lines by causing dose dependant cell cycle arrest in G0-G1 phase [Verhelle 2004]. Lenalidomide upregulated Cyclin dependant kinase (CDK) Inhibitor, p21 waf-1, a key cell cycle regulator that modulates the activity of CDKs. Similar reductions in CDK2 activity have been demonstrated in myeloma derived cell lines, U266 and LP-1. In contrast, the normal B cells obtained from healthy donors were immune from growth inhibition and did not show any upregulation of p21 expression after 3 days of lenalidomide treatment. In other studies, thalidomide and its analogues have also been shown to induce apoptosis in MM cell lines [Hideshima 2005].





### Lenalidomide in myeloma

The lenalidomide is authorized by June 2007 in Myeloma therapy refractory to conventional therapy.(Dimopolous 2007, Lacy 2007) ( Myeloma is literally a "oma, tumor, or which involve the" myelo, "or blood-producing cells of the bone marrow. The affected cells are plasma cells (a type of white blood cell) that are producers of antibodies (immunoglobulins). The diagnosis is primarily based on infiltration of plasma cells in the bone marrow, Osteolytic lesions and presence of immunoglobulin (or fragments in human serum or urine). MM represents approximately 10% of hematological cancers and 1% of all cancers. The diagnosis of MM is approximately 21.000 patients/year in Europe with approximately 16000 deaths per year.

MM is primarily a disease of the elderly, with an average age of diagnosis of 68 years. Before the introduction of alkylating agents average survival was 12-17 months after diagnosis plus melphalan

prednisone combination (MP) remained the most effective treatment for decades although remission was rare (5%) and the average survival does not exceed 3 years. In 1990, high-dose chemotherapy (HDT) associated with Autologous stem cells has prolonged the survival (of one more year with the mortality rate of 1-2%). The advent of immunomodulating drug doubled the median survival of patients with MM up to about 5 years and patients have a 50% probability of achieving complete response to treatment with a survival rate of up to 10 years

More recently the lenalidomide has been developed in MM since relapsed and refractory. Interactions between myeloma cells, stromal cells and Medullary microcirculation contribute to persistence and the onset of cancer and the lenalidomide acts by altering key interactions between tumor cells and bone marrow stromal cells by overcoming the resistance of cancer drugs.

### **Lenalidomide and Hypoxia**

Hypoxia is an imbalance between oxygen supply and demand, which deprives cells or tissues of sufficient oxygen. It is well established that hypoxia triggers adaptive responses, which contribute to short- and long-term pathologies such as inflammation, cardiovascular disease and cancer. Induced by both microenvironmental hypoxia and genetic mutations, the elevated expression of the hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) and HIF-2 is a key feature of many human cancers and has been shown to promote cellular processes, which facilitate tumor progression.

We discuss the emerging role of hypoxia and the HIFs in the pathogenesis of multiple myeloma (MM), an incurable hematological malignancy of BM PCs, which reside within the hypoxic BM microenvironment. To date, the most well-documented biological consequence of aberrant HIF expression in MM is angiogenesis. Studies have shown that there is a positive correlation between HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression, and the level of BM angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor in patient biopsy specimens. A number of anti- MM drugs, such as adaphostin, lenalidomide and bortezomib, have also been shown to mediate their antiangiogenic effects, at least in part, through inhibition of HIF-1. (Lu 2009)

The increasing importance of HIF-1a and HIF-2a in tumorigenesis (and indeed, numerous other disease states) raises the possibility that agents which specifically inhibit these transcription factors, would provide significant therapeutic benefit

As showed in table 1 a growing number of conventional and novel anticancer agents included lenalidomide has been shown to indirectly inhibit HIF activity

**Table 1** Therapeutic inhibitors of hypoxia and HIFs

| <i>Agent</i>  | <i>References</i>   |
|---|---------------------|
| <i>HIF inhibitors</i>   |                     |
| PX-478, EZN-2968, polyamide-2, YC-1                               | 99, 132,133,138–142 |
| <i>Hypoxia-activated pro-drug</i>                                 |                     |
| TH-302  | 113,134,135         |
| <i>Proteasome inhibitor</i>                                       |                     |
| Bortezomib  | 123                 |
| <i>NSAIDs</i>   |                     |
| Celecoxib, NS-398, ibuprofen                                      | 143–145             |
| <i>Heat shock protein-90 inhibitors</i>                           |                     |
| Geldanamycin  | 146                 |
| <i>Tyrosine kinase inhibitors</i>                                 |                     |
| Imatinib, trastuzumab, erlotinib, cetuximab, sorafenib, sunitinib | 147–152             |
| <i>Mammalian target of rapamycin inhibitors</i>                   |                     |
| Rapamycin, CCI-779, RAD001  | 153                 |
| <i>HDAC inhibitors</i>  |                     |
| Depsipeptide (FK228)  | 154,155             |
| <i>Immunomodulatory agents</i>                                    |                     |
| Lenalidomide  | 125                 |
| <i>Microtubule inhibitors</i>                                     |                     |
| 2-Methoxyestradiol, taxotere, vincristine                         | 156–158             |
| <i>Chemotherapeutic agents</i>                                    |                     |
| Doxorubicin, daunorubicin, topotecan                              | 159,160             |

Abbreviations: HDAC, histone deacetylase; HIF, hypoxia-inducible transcription factor; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug.

In consideration of this property we decided to test the effectiveness of lenalidomide also in neuronal models to study in vitro the effect of lenalidomide in HIF molecular cascade

## Objectives

Since the VEGF/VEGF receptor-2 (VEGFR-2) pathway greatly contributes to MM angiogenesis and growth (Ria 2004 ), and mediates proliferation and capillarogenesis in MMECs through an autocrine loop (Podar 2005); we aimed to investigate whether lenalidomide has an antiangiogenic activity on MMECs and to elucidate the molecular mechanisms involved.

For this purpose we first evaluated if lenalidomide affects the angiogenesis *in vivo* in the chorioallantoic membrane assay (CAM assay), and *in vitro* by testing its effect on cell migration and capillary tube formation of bone marrow MMECs from patients with active multiple myeloma (diagnosis, relapse, leukemic phase), compared to monoclonal gammopathies unattributed/unassociated (MGUS) ECs (MGECs) and to healthy human umbilical vein endothelial cells (HUVECs).

Then we investigated if lenalidomide is able to modulate the expression of key genes involved in the several mechanisms triggering angiogenesis, such as VEGF, bFGF, BNIP3, SEPW1 and IER3 and if lenalidomide impacts on the activation/phosphorylation of VEGF/VEGFR-2-induced intracellular signaling mediators, such as MAP kinase Erk1/2, Src kinase, and vascular endothelial (VE)-cadherin. . Considering the antiangiogenic potential of the drug until now allowed only in the treatment of multiple myeloma, the idea is to test its efficacy *in vitro* on neuroblastoma cell lines and/or glioblastoma, isolated or co-culture with endothelial cells. Today is alive some interest in this scope. Despite recent advances in neurosurgery, radiotherapy and chemotherapy prognosis of patients with glioma remains poor. With the failure of standard cytotoxic agents there is a growing interest in the development of new therapies with novel mechanisms of action. Preclinical studies and clinical trials have demonstrated that gliomas are highly angiogenic and that antiangiogenic therapy represents a potential new treatment strategy. (Fine 2000, Bauman 2004). Thalidomide was one of the first antiangiogenic agents evaluated in patients with recurrent glioma. It has been shown

in mouse models that Thalidomide reduces the expression of powerful factors as VEGF and bFGF TNF- $\alpha$ . The lenalidomide view in vivo anticancer properties due to a strong stimulation of T cells, the production of IL-2/IFN- $\gamma$ , and the inhibition of TNF- $\alpha$  stronger of Thalidomide (Kotla 2009). The Antitumor effect of lenalidomide might be related to its ability to affect processes directly or indirectly related to the growth and survival of cancer cells. The real antiangiogenic mechanism of lenalidomide is not yet clear, although it has been seen that lenalidomide can inhibit VEGF, bFGF and endothelial migration induced by TNF- $\alpha$  in preclinical models of MM, to date no preclinical evidence was observed and accomplished on neuronal models.

Therefore in accordance with Celgene we decided to study the mechanism of action of lenalidomide in neuroblastoma cells ,to elucidate the influence of that drug in molecular mechanism involved in angiogenesis and neurodegeneration

### **Lenalidomide and gliomas**

In preclinical testing, lenalidomide demonstrates antiangiogenic, proapoptotic, and anti-inflammatory activities in addition to its immunomodulatory effects (Zhu 2008)

Lenalidomide is being evaluated in a number of adult solid tumors, including lymphomas (Wiernik 2008) renal cell carcinoma Amato 2008,melanoma, and CNS tumors (Fine 2007) Although the exact antitumor mechanism is not completely understood, lenalidomide has direct effects on tumor cells, effects on the tumor microenvironment, and immunomodulatory effects that include alteration of ligand-induced cellular responses, modulation of cytokine responses, altered production of growth factors, and costimulation of T-cell activation (Crane 2005)

Clinical trials of lenalidomide have been performed in adults using several different schedules ( Fine 2007, Patel 2008, Sharma 2007) Common adverse effects include neutropenia, thrombocytopenia, GI toxicities, skin toxicity, and fatigue (Bartlett 2004) Myelosuppression is the

most common toxicity and the dose-limiting toxicity (DLT) and is more frequently observed at doses  $\geq 50$  mg/m<sup>2</sup>/d. Other toxicities are generally mild, although a possible increased risk of thrombosis has been reported ( Knight 2006) In the phase I dose-escalation trial of lenalidomide in adults with recurrent CNS tumors, a predetermined maximum dose of 40 mg daily for 21 days followed by a 1-week rest was well-tolerated (Fine 2007) Children with recurrent, refractory, or progressive primary CNS tumors were treated with lenalidomide to estimate the maximum-tolerated dose (MTD), describe toxicities, and evaluate pharmacokinetics in this population

## **Materials and methods**

### Patients

Patients fulfilling the International Myeloma Working Group diagnostic criteria (IMWG 2003) for MM and MGUS were studied. MM patients were selected according to clinical features and M-component level (Durie 1986): at diagnosis, relapse and leukemic phase; and at IIA, IIB, IIIA, and IIIB D&S stage. No patient was under treatment with lenalidomide. All patients gave their informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

### Isolation of ECs

Bone marrow MMECs and MGECs were obtained as previously described (Vacca 2005, Vacca 1999). Heparinized aspirates were centrifuged on Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) gradient and the separated mononuclear cells were left to adhere in polystyrene flasks in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS), 1% glutamine and 100µg/ml streptomycin/penicillin at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

ECs were isolated by detaching adherent stromal cells with trypsin/ethylenediaminetetraacetate (EDTA) solution and immunodepleting of macrophages and plasma cells with CD14 and CD38 monoclonal antibody (MoAb)-coated flasks (Immunotech, Coulter, Marseilles, France). Residual cells were absorbed on magnetic microbeads (Oxoid Dynal, Oslo, Norway) coated with Ulex europaeus-1 lectin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) (whose receptor is highly expressed by and restricted to ECs), and bound ECs were cultured in DMEM supplemented with 20% FBS and 1mM glutamine to allow cells to spread and grow. The purity and viability of EC preparations were assessed by fluorescence activated cell sorting (FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA) with double positivity for factor VIII-related antigen (FVIII-RA) and CD105 (or endoglycin), and negativity for CD14 and CD38 MoAbs, followed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for mRNA of FVIII-RA, CD38, CD105 and IgH VDJ region, and by trypan blue viable staining.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA), and maintained in endothelial cell growth medium-2 (EGM-2® Lonza, Walkersville, MD) supplemented with 10% FBS in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C, and were used as control.

#### Human neuroblastoma cell line (SHSY5Y) culture

After expansion in tissue culture flask of 75 cm<sup>2</sup>, the neuroblastoma cells (ATCC number CRL - 2266) were plated in 48 wells multiwell plates at the density of 20000 cells/well, in medium DMEM/F12 1:1, containing 10% of FBS, penicillin (50 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml). The cultures were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in humidified atmosphere and the medium was changed every three days. Cells were treated at a confluence of 70%.

#### Treatments with Lenalidomide

Lenalidomide (Revlimid,® Celgene Co., Milan, Italy) was dissolved in dimethyl-sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) to obtain a stock solution of 10 mM, that was then filtered and stored at -20°C until use. Drug was stepwise diluted in culture medium at the time of assay.

### **Functional studies**

#### Proliferation assay

ECs proliferation was evaluated using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. Five x 10<sup>3</sup> cells/well were seeded in triplicate in 96-well plates in SFM (negative control) or supplemented with 10% FBS or with VEGF165 (10 ng/ml, Sigma Chemical Co.) (positive controls), or added with the lenalidomide doses for 48 and 72 h. Cells were then incubated with 1 mg/mL MTT for 4 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, followed by addition of isopropanol and HCl to dissolve the formazan crystals. Dye absorbance in viable cells was



measured at 570 nm, with 655 nm as a reference wavelength, using a microplate reader model 550 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### Chemotaxis assay

The chemotaxis assay was performed in triplicate according to the Boyden microchamber technique (16) toward SFM alone (negative control), or admixed with 10 ng/ml VEGF165 alone (positive control) or supplemented with the lenalidomide doses as previously described (Vacca 2006). Cells were counted on x1000 oil-immersion field/membrane and given as mean  $\pm$  1 SD per group of patients.

#### Wound assay

ECs grown in triplicate on fibronectin (10  $\mu$ g/ml) - coated 10 cm<sup>2</sup> dishes (1x10<sup>6</sup>/dish) were scraped as a 'wound' with a P200 pipette tip in the middle of the monolayer, and exposed for 24 h to a complete medium alone (positive control) or to the medium containing lenalidomide (0.5  $\mu$ M and 1.75  $\mu$ M), fixed (Diff-Quik staining, Dade Behring, Dudingon, Switzerland), and quantified for their motility rate by counting migrated cells into the wound area in at least three randomly - chosen x10 fields across the wound length as described previously.

#### Matrigel capillarogenesis assay

ECs were plated in duplicate in 24-well plates (1 x 10<sup>5</sup> cells/well) precoated with Matrigel (200  $\mu$ L/well; Becton Dickinson) in 1 mL/well SFM alone supplemented with VEGF165 (10 ng/ml) alone or with lenalidomide doses. After an 18-h incubation, the 3-D organization was examined under a reverted, phase-contrast microscope (Leitz DM IRB; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and representative fields were photographed using a Leica D-Lux3 digital camera (Leica Camera, Solms, Germany).

#### Chorioallantoic membrane assay (CAM)

The CAM assay was performed in fertilised White Leghorn chicken eggs incubated at 37 °C at constant humidity as previously described (Ribatti 2006). On incubation day 3, a square window

was opened in the shell and 2–3 mL albumen was removed in order to detach the CAM. On day 8, the CAMs were implanted with 1-mm<sup>3</sup> sterilised gelatin sponges (Gelfoam Upjohn, Kalamazoo, MI, USA) loaded with 250 ng VEGF165 alone (positive control) or combined with 10  $\mu$ M lenalidomide. The angiogenic response was evaluated on day 12 as the number of vessels converging toward the sponge at x50 magnification, and photographed in ovo using an Olympus stereomicroscope (Olympus, Rozzano, Italy).

#### Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Real-Time RT-PCR

Total RNA was isolated from ECs using Trizol protocol (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from total RNA (1  $\mu$ g) using the "iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit" (Bio-Rad, Hercules, CA). Real-time quantitative PCR was performed using the "StepOne<sup>TM</sup> real-time RT-PCR system" (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reaction mixture contained SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems), cDNA (2 $\mu$ l, i.e., 100ng) and the following specific primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, forward/reverse): VEGF, bFGF, BNIP3, SEPW1, IER3. Reaction conditions were: 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification at 94 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Each RNA was tested in triplicate and the threshold cycles (Ct) values were averaged + 1 SD. The expression of each gene was normalized to the endogenous control gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The relative gene expression (fold change) between untreated and lenalidomide treated samples were calculated with the comparative threshold cycle method of  $\Delta\Delta$ Ct (19).

#### **Western blotting analysis**

ECs were harvested in a modified RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)) on ice for 30 min. Lysates were then clarified at 14000g for 15 min at 4 °C and total protein concentrations were determined by the Bradford method using the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). Aliquots of protein (40  $\mu$ g) were resolved by using pre-cast 4-12% NuPAGE<sup>®</sup> Novex<sup>®</sup> Bis-Tris gradient gels (Invitrogen Corp.), electrotransferred to a polyvinylidene difluoride

membrane (PVDF, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) and incubated with the primary and secondary antibodies. Then bands were visualized by enhanced chemiluminescence (LiteAblot® extend substrate, Euroclone SpA, Pero, MI, Italy) using the Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). The band intensity was expressed as arbitrary optical density (OD).

#### MTT Assay

The toxicity of the peptides was measured through the determination of cell viability in the treated cells compared to control untreated cells, by MTT test [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2 , 5-diphenyltetrazolium bromide]. The test is based on the ability of the mitochondrial enzyme, cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase, to reduce yellow tetrazole into purple formazan that, being unable to cross the plasma membrane, will accumulate within the viable cell in culture. Solubilization of formazan with an appropriate detergent will yield purple color in proportion to the amount of formazan produced and consequently to the viability of cells. After treatment with the peptides, cell cultures are incubated for 2 hours at 37°C with a solution of MTT (1mg/ml) in PBS; the formed crystals are melted with DMSO. After the solubilization of the formazan crystals, a rate of supernatant is used to read the absorbance at 590nm using a microplate reader.

#### **Hypoxia induced by CoCl<sub>2</sub> solution**

Cobalt (II) Chloride hexahydrate (CoCl<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O, MW=237.9) is a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1.3 8. This product is soluble in water (100 mg/ml), yielding a clear, red solution.

4. Prepare a 25mM stock solution in sterile dd water, (prepare immediately before use)
5. Use CoCl<sub>2</sub> at the final concentration of 100µM in your regular cell culture media to induce hypoxia.
6. Add the CoCl<sub>2</sub> containing media to your cells and incubate the cultures for 24hours in a conventional incubator (37°C; 5% CO<sub>2</sub>).

The above concentration works for the cell lines we have tested but each cell line should be tested at various concentrations (to establish a dose-dependent curve) as well as at various incubation times in order to limit drug related toxicity and optimize the assay.

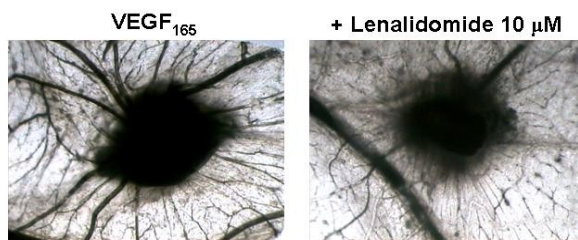
## Results

### Lenalidomide inhibits angiogenesis *in vivo* and *in vitro*

We investigated whether lenalidomide could directly inhibit angiogenesis *in vivo* using the CAM assay, as well as proliferation, migration and capillary formation *in vitro*.

CAMs implanted with sponges loaded with serum-free medium supplemented with VEGF<sub>165</sub> (positive control) were surrounded by allantoic vessels as newly formed capillaries converging radially towards the sponge in a “spoke-wheel” pattern. As shown in Fig.1 when lenalidomide at 10  $\mu$ M was added a significant reduction of the angiogenic response was found.

**Fig.1**



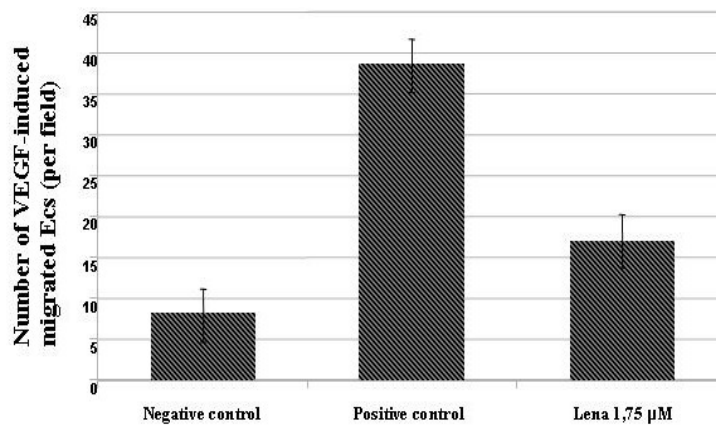
The proliferation rate of ECs from MM (MMECs) and MGUS (MGECs) patients and HUVECs exposed to different doses of lenalidomide (from 0.1  $\mu$ M to 10  $\mu$ M) was measured by MTT colorimetric assay, even if the drug seems to not affect significantly this cell function (data not shown).

Conversely lenalidomide exerted an inhibitory effect on MMECs migration as demonstrated both in the chemotaxis assay (44% of the positive control, Fig. 2), and in the “wound” assay with a

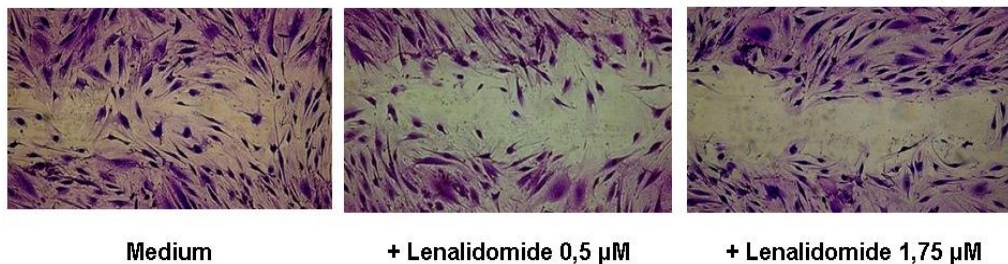
maximum result obtained with 1.75  $\mu\text{M}$  (Fig. 3), which corresponds to the MM therapeutic dose (20-25 mg/daily). Similar results were observed with HUVECs and MGECs

The effect of lenalidomide on vessel morphogenesis by MMECs was also investigated. Specifically, the *in vitro* ability of MMECs to form capillaries was studied by the Matrigel assay. After 18 hours of incubation, MMECs or HUVECs spread throughout the Matrigel surface and aligned to form branching, anastomosing, and thick tubes with multicentric junctions, which gave rise to a closely knit network of capillary-like structures. Exposure to lenalidomide (0.25 to 2.5  $\mu\text{M}$ ) gave rise to a poorly organized plexus with few straight, disorganized tubes and scarce junctions, already at low concentrations (Fig. 4).

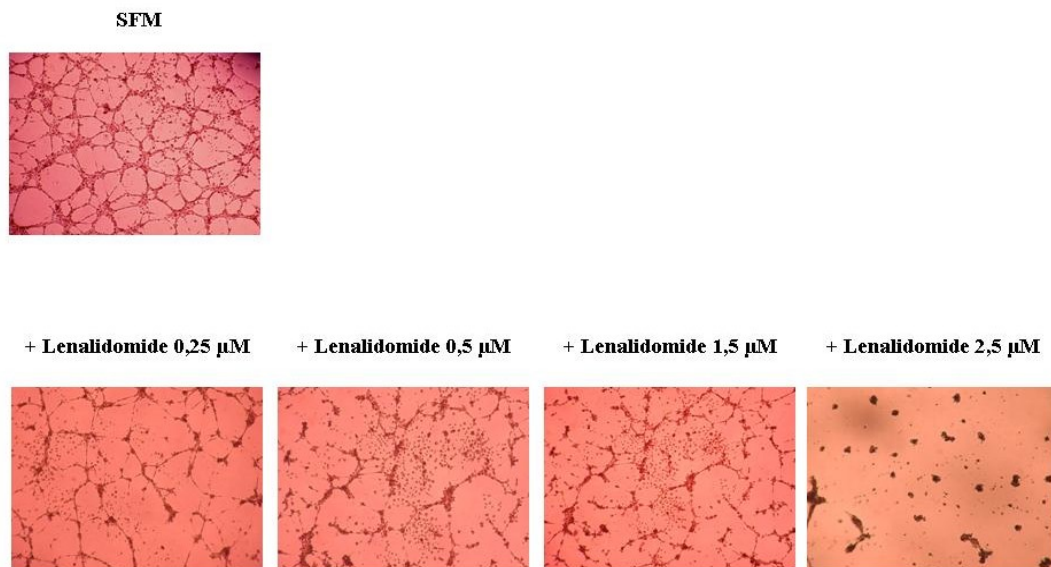
**Fig.2**



**Fig.3**



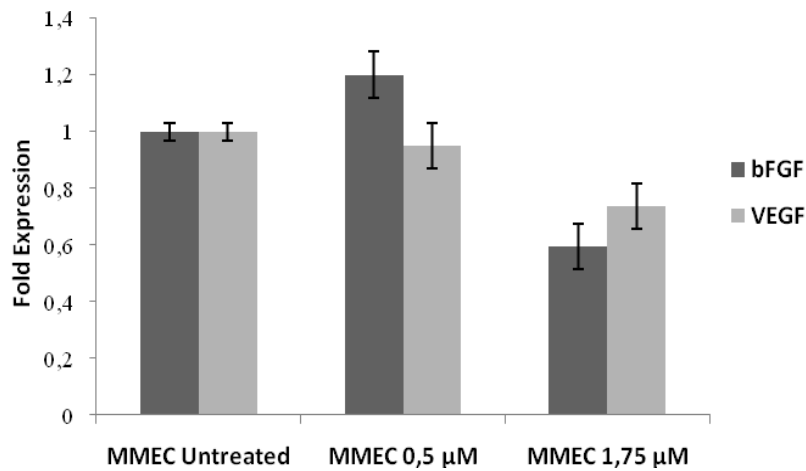
**Fig.4**



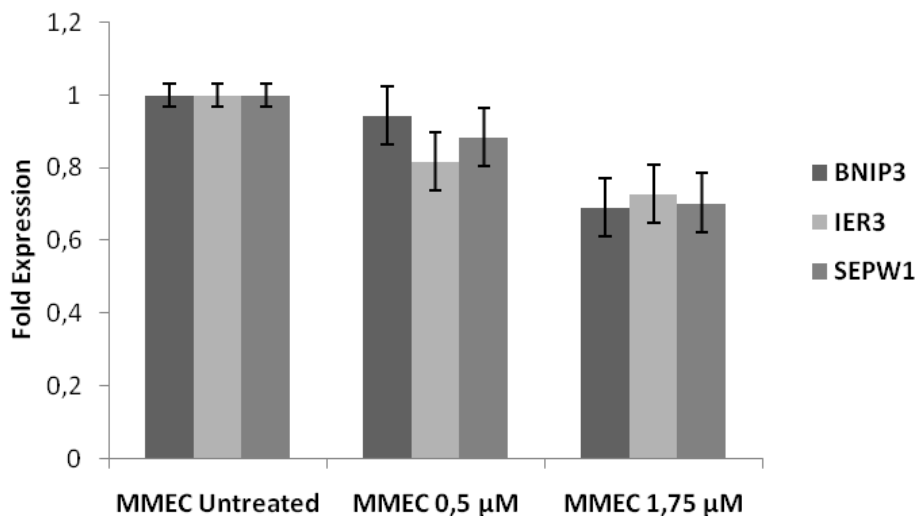
**Lenalidomide down-regulates the expression of key genes involved in the biological mechanisms of angiogenesis**

Lenalidomide at the therapeutic dose of 1.75  $\mu$ M was able to modulate the expression of key genes involved in the process of angiogenesis, such as bFGF (about 40% in MMECs treated vs. untreated) and VEGF (about 30% in MMECs treated vs. untreated) (Fig. 5). Also, lenalidomide down-regulated, in a dose-dependent manner, the expression of genes which affect critical MMECs biological functions and are correlated with their overangiogenic phenotype, such as BNIP3 and IER3 (both involved in the mechanisms of apoptosis and antiapoptosis), and SEPW1 (implicated in the cellular stress and homeostasis) (about 30% in MMECs treated with 1.75  $\mu$ M lenalidomide vs. untreated, Fig. 6).

**Fig.5**



**Fig.6**



**Lenalidomide reduces MMECs migration and angiogenesis by affecting VEGF<sub>165</sub> downstream signalling**

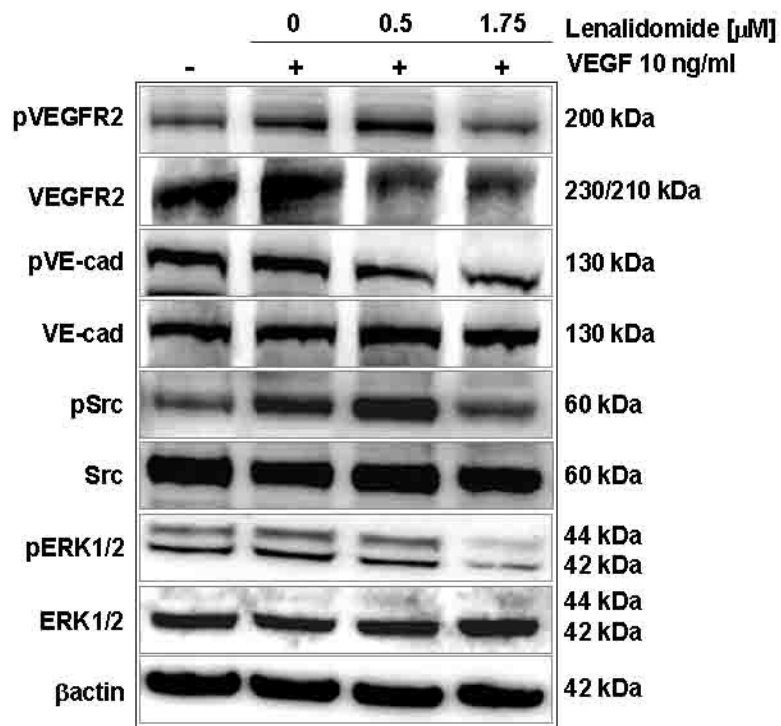
*In vivo* and *in vitro* experiments provided evidence that lenalidomide exerts an inhibitory effect on VEGF<sub>165</sub>-induced angiogenic response. To assess at which level lenalidomide impact on MMECs signalling pathway, we performed western blotting experiments. As shown in figure 7, the drug induced a slightly reduction of VEGF<sub>165</sub>-mediated phosphorylation of VEGFR2 (about 20% in



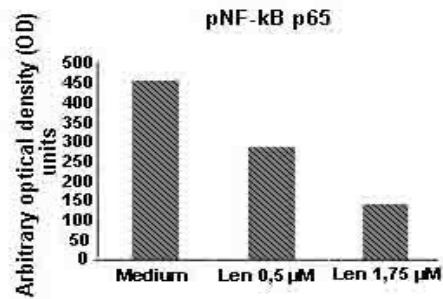
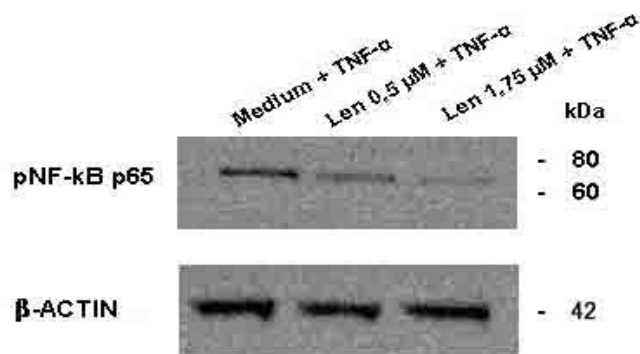
MMECs treated vs. untreated) and a strong inhibition of the downstream signalling mediator MAP kinase Erk1/2 (about 50% in MMECs treated vs. untreated), with the maximum effect observed at the therapeutic dose of 1.75  $\mu$ M lenalidomide. Since it has been shown that the VEGF/VEGFR-2 pathway involves also the phosphorylation of VE-cadherin through Src tyrosine kinase activity (phosphorylation) and that the activation of the VE-cadherin–Src complex is increased in angiogenic tissues or VEGF-induced endothelial cells (20,21), being a necessary step for the endothelial switch from the quiescent to the angiogenic phenotype (22), we thought to investigate whether lenalidomide could affect also Src and VE-cadherin phosphorylation. The results obtained show that lenalidomide reduces VEGF<sub>165</sub>-induced Src (about 25% in MMECs treated with 1,75  $\mu$ M lenalidomide vs. untreated) and VE-cadherin (about 35% in MMECs treated with 1.75  $\mu$ M lenalidomide vs. untreated) activity in a dose-dependent way, as assessed by phosphorylation on Y<sup>418</sup> and Y<sup>658</sup> respectively. Taken together, these data suggest that lenalidomide inhibition of VEGF-induced angiogenesis is mediated by disruption of Src kinase activation and the subsequent VE-cadherin tyrosine phosphorylation.

Furthermore, since NF- $\kappa$ B pathway plays a pivotal role in regulating cellular growth and survival, we therefore sought to investigate whether lenalidomide would also lead to a modulation of this pathway. MMECs were treated with lenalidomide (0.5  $\mu$ M and 1.75  $\mu$ M) or control medium for 4 hours, and then TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) was added for the last 20 min. Immunoblotting of whole cellular extracts demonstrated that phospho NF- $\kappa$ B p65 expression was inhibited by lenalidomide (Fig. 8) in a dose dependent manner, while the drug did not affect basal NF- $\kappa$ B p65 activity.

**Fig.7**

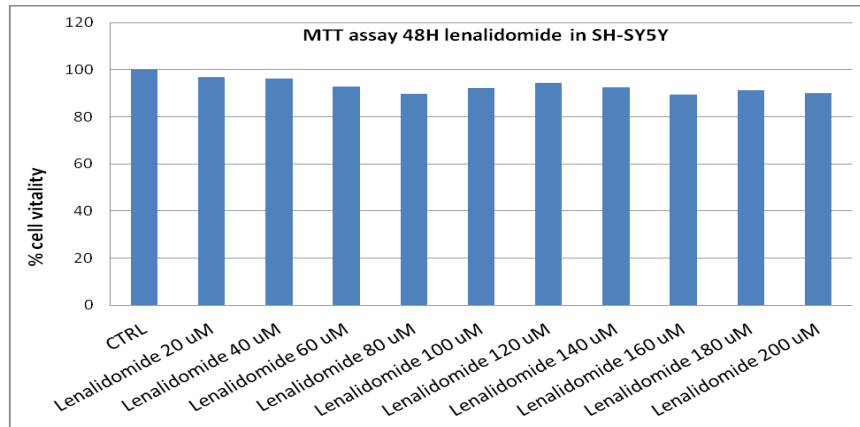


**Fig.8**



## MTT assay

Lenalidomide did not have any cytotoxic effect on neuroblastoma cells (fig 8)



## Lenalidomide down regulates VEGF expression in hypoxic condition induced by CoCl<sub>2</sub> solution

SHY5Y were treated with lenalidomide 50μM for 24 hours hypoxic conditions induced by CoCl<sub>2</sub> 100 μM to study the effect of lenalidomide on VEGF expression

After RNA extraction by Trizol protocol and RT-PCR lenalidomide had a strong inhibitory effect on VEGF mRNA expression (Fig.9)

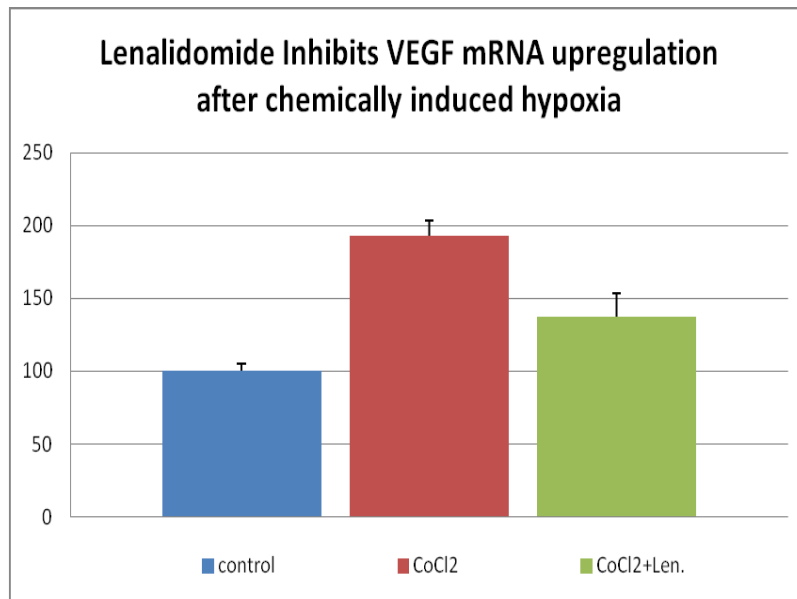


FIG. 9

RT-PCR analysis of VEGF mRNA from neuroblastoma (SH-SY5Y) after chemically induced hypoxia by treatment with CoCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M (24 h). Hypoxic conditions strongly upregulated VEGF mRNA expression (+95% vs control) and co-treatment with lenalidomide (50  $\mu$ M) significantly reduced (-30% vs CoCl<sub>2</sub>) VEGF expression.

## Discussion

In this project we aimed to investigate whether lenalidomide exerts an antiangiogenic activity on endothelial cells of patients with multiple myeloma (MMECs). Thus we have demonstrated that Lenalidomide: *i*) impacts on important ECs functions (angiogenesis *in vivo*, and migration and capillarogenesis *in vitro*) for development of overangiogenic phenotype in patients with MM, *ii*) down-regulates the expression of key genes (VEGF, bFGF, BNIP3, SEPW1 and IER3) involved in critical biological functions correlated with angiogenesis in MM patients, *iii*) affects the cascade of signalling associated with activation/phosphorylation of VEGFR-2, MAP kinase Erk 1/2, Src kinase and VE-cadherin.

Therefore we aimed to investigate the mechanism of action of lenalidomide in neuroblastoma cells thus firstly we tested the cytotoxic effect of this drug in a tumour brain model such as neuroblastoma and we demonstrated that Lenalidomide has no cytotoxic effect on this model neither at high concentration (200  $\mu$ M), on the contrary in myeloma cells this drug exerts a strong tumoricidal effect (Hideshima 2000)

Subsequently in experiments of hypoxia induced by CoCl<sub>2</sub> solution lenalidomide seems to decrease VEGF mRNA expression in neuroblastoma cell cultures (SH5Y5Y) confirming its potential effect on VEGF molecular pattern also in stress conditions

A marked vascularization is a hallmark of many neoplasms in the nervous system and VEGF has been investigated as a potent mediator of angiogenesis in many brain tumors (glioblastomas, hemangioblastomas, meningiomas and neuroblastomas) and there is a significant correlation between VEGF expression and vascular endothelial proliferation [Berkman 1993]. However, in human neuroblastomas, the most common pediatric neoplasms, VEGF expression has been shown to affect angiogenesis as well as neuroblastoma cell growth directly (Takano S 1996]

VEGF mRNA is expressed in highly malignant neuroblastoma tumors that, as well as many malignant solid tumors, depend on neo-vascularization for their growth and for dissemination [Langer 200] It is therefore possible to argue that the inhibitory effect of lenalidomide against

VEGF upregulation, here observed in neuroblastoma cell cultures, can open new perspectives in the use of this drug even in the neurologic field.

## References

1. Avouac J, Wipff J, Goldman O, Ruiz B, Couraud PO, Chiocchia G, Kahan A, Boileau C, Uzan G, Allanore Y (2008) Angiogenesis in systemic sclerosis: impaired expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in endothelial progenitor-derived cells under hypoxic conditions. *Arthritis Rheum* 58:3550-3561
2. Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG. The evolution of thalidomide e its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:314-22
3. Bussolino F., Mantovani A., Persico G. *TIBS*, 22, 251-256, 1998
4. Cantara et al. 2004 *The FASEB J*. 2004 18:1943-1945
5. Cassavaugh J, Lounsbury KM. (2011) Hypoxia-mediated biological control. *J Cell Biochem*. 112(3):735-44

6. Chanan-Khan A, Miller KC, Musial L, Lawrence D, Padmanabhan S, Takeshita K, Porter CW, Goodrich DW, Bernstein ZP, Wallace P, Spaner D, Mohr A, Byrne C, Hernandez-Ilizaliturri F, Chrystal C, Starostik P, Czuczman MS: Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2006, 24(34):5343-9.
7. Chen Z, Liu F, Ren Q, Zhao Q, Ren H, Lu S, Zhang L, Han Z. (2008) Hemangiopoietin promotes endothelial cell proliferation through PI-3K/Akt pathway. *Cell Physiol Biochem*. ;22(1-4):307-14.
8. Cho SW, Hartle L, Son SM, Yang F, Goldberg M, Xu Q, Langer R, Anderson DG (2008) Delivery of small interfering RNA for inhibition of endothelial cell apoptosis by hypoxia and serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 376:158-163
9. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 49:507-21
10. Corral LG, Haslett PAJ, Muller GW, Chen R, Wong LM, Ocampo CJ, et al. Differential cytokine modulation e T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF- $\alpha$ . *J Immunol*. 1999;163:380-6.
11. Corral LG, Muller GW, Moreira AL, Chen Y, Wu M, Stirling D, et al. Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity. *Mol Med*. 1996;2:506-15.
12. Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai Y-T, et al. Thalidomide e immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98:210-6.
13. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci US A* 1994;91:4082-5
14. De Luisi A ,2, Arianna Ferrucci1, Addolorata M.L. Coluccia6, Roberto Ria1, Michele Moschetta1,5, and Angelo Vacca1 Lenalidomide Restrains Motility and Overangiogenic Potential of Bone Marrow Endothelial Cells in Patients with Active Multiple Myeloma
15. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, Prince HM, Harousseau JL, Dmoszynska A, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007;357:2123-32
16. Dredge K, Marriott JB, Macdonald CD, Man H-W, Chen R, Muller GW, et al. Novel thalidomide analogues display antiangiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *Br J Cancer*. 2002;87:1166-72.

17. Dredge K, Horsfall R, Robinson SP, Zhang LH, Lu L, Tang Y, Shirley MA, Muller G, Schafer P, Stirling D, Dalglish AG, Bartlett JB: Orally administered lenalidomide (CC-5013) is anti-angiogenic in vivo and inhibits endothelial cell migration and Akt phosphorylation in vitro. *Microvasc Res* 2005, 69(1–2):56-63. Folkman J. 2007. *Nature Reviews* 6:273-286
18. Durie BG: Staging and kinetics of multiple myeloma. *Semin Oncol* 1986; **13**: 300-309.
19. Harris AL *J Mammary Gle Biol Neoplasia* (2005) 10: 299–310
20. Haslett PA, Hanekom WA, Muller G, Kaplan G. Thalidomide and a thalidomide analogue drug co-stimulate virus-specific CD8+T cells in vitro. *J Infect Dis.* 2003;187:946-55.
21. Haslett PA, Corral LG, Albert M, Kaplan G. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J Exp Med.* 1998;187:1885-92.
22. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies FE, Tai YT, Treon SP, Lin B, Schlossman RL, Richardson P, Muller G, Stirling DI, Anderson KC: Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood* 2000, 96(9):2943-50.
23. Hu GF. *J Cell Biochem* 1998;69(3):326–35.
24. Eerson KC. Lenalidomide and thalidomide: mechanisms of action--similarities and differences. *Semin Hematol.* 2005;42 Suppl4:S3-8..
25. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, *et al.* Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 1999; **4**: 915–924.
26. Ferrara N, Kowanzetz M. (2006) Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* 12(17):5018-22.
27. Ferrara N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280:C1358-66
28. Fine HA, Figg WD, Jaeckle K, *et al.* Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. *J Clin Oncol* 2000;18:708–15
29. Gariboldi MB, Ravizza R, Monti E (2010) The IGFR1 inhibitor NVP-AEW541 disrupts a pro-survival and pro-angiogenic IGF-STAT3-HIF1 pathway in human glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 80:455-462
30. Glesne DA, Zhang W, Meava S *et al.* *Cancer Res.* 2006; 66: 4030–40
31. Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D, Valensin G. *Chem. Rev.* 2006; 106:1995–2044
32. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the



- phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.*273(46):30336-43
33. Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B, Lentzsch S, Davies FE, Chauhan D, Schlossman RL, Richardson P, Ralph P, Wu L, Payvandi F, Muller G, Stirling DI, Anderson KC: Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* 2001,15(12):1950-61
  34. Hewett PW, Murray JC. Human lung microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. *Microvasc Res* 1993;46:89–102
  35. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; **121**: 749-757.
  36. Jeong JK, Moon MH, Seo JS, Seol JW, Lee YJ, Park SY. (2011) Sulforaphane blocks hypoxia mediated resistance to TRAIL-induced tumor cell death. *Mol Med Report.* 4(2):325-30.
  37. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. (2001). Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 15:1312-4.
  38. Jia WD, Xu GL, Xu RN, Sun HC, Wang L, Yu JH, Wang J, Li JS, Zhai ZM, Xue Q (2003) Octreotide acts as an antitumor angiogenesis compound and suppresses tumor growth in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma Xenografts. *J Cancer Res Clin Oncol* 129:327-334
  39. Jiang J, Xia XB, XU HZ, Xiong Ym, Song WT, Xiong SQ, Li Y (2009) Inhibition of Retinal Neovascularization by Gene Transfer of Small Interfering RNA Targeting HIF-1  $\alpha$  and VEGF. *J Cell Physiol* 218: 66–74.
  40. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL. (2003). Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res.* 93:1074-81.
  41. Kumar S, Rajkumar SV. Thalidomide and lenalidomide in the treatment of multiple myeloma. *Eur J Cancer.* 2006;42: 1612-22.
  42. Lacy MQ, Gertz MA, Dispenzieri A, Hayman SR, Geyer S, Kabat B et al. Long-term results of response to therapy, time to progression and survival with lenalidomide plus dexamethasone in newly diagnosed myeloma. *Mayo Clin Proc* 2007;82:1179–84

43. Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, *et al.* Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* 2005 ; **96**:384– 391
44. Lichtenstein A, Tu Y, Fady C, Vescio R, Berenson J: Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell Immunol* 1995,162(2):248-55..
45. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR e the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402–8.
46. Lonial S. When “the same” is really “different”. *Blood*. 2006;108:3233-4.
47. Lu L, Payvandi F, Wu L, Zhang LH, Hariri RJ, Man HW *et al.* The anticancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions. *Microvasc Res* 2009; 77 78–86.
48. McAuslan BR, Reilly W. *Exp Cell Res* 1980;130(1):147–57
49. Marriott JB, Muller G, Stirling D, Dalgleish AG. Immunotherapeutic e antitumour potential of thalidomide analogues. *Expert Opin Biol Ther*. 2001;1:675-82.
50. Marriott JB, Clarke IA, Dredge K, Muller G, Stirling D, Dalgleish AG. Thalidomide e its analogues have distinct e opposing effects on TNF-a e TNFR2 during co-stimulation of both CD4+ e CD8+ T cells. *Clin Exp Immunol*. 2002;130:75-84.
51. Mazzone M. Novel alternatives for anti-angiogenetic therapy and therapeutic angiogenesis. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 2010; 72(3-4):165-75.
52. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G: Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993, 177(6):1675-80.
53. Melike MUT *et al* *Journal of neurological neurosciences* 2007 24:1 #10;29-37
54. Muller GW, Corral LG, Shire MG, Wang H, Moreira A, Kaplan G, *et al.* Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. *J Med Chem*. 1996;39:3238-40
55. Nilsson I, Shibuya M, Wennström S (2004) Differential activation of vascular genes by hypoxia in primary endothelial cells. *Exp Cell Res* 299:476-485
56. Payvei F, Wu L, Haley M, Schafer PH, Zhang LH, Chen RS, *et al.* Immunomodulatory drugs inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF-a, IL-1b, e LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner. *Cell Immunol*. 2004;230:81-8.
57. Pogue A.I *et al.*. 2004 *Neuroreport* 15:1507-1510.
58. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 2005; **105**: 1383-1395.

59. Pagès G, Pouysségur J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene—a concert of activating factors. *Cardiovasc Res.* 65:564-
60. Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ et al. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood* 2005; **106**: 4050–4053..
61. Rao KV. Lenalidomide in the Treatment of Multiple Myeloma *Am J Health-Syst Pharm.* 2007; 64(17): 1799-1807.
62. Ria R, Vacca A, Russo F, et al. A VEGFdependent autocrine loop mediates proliferation and capillarogenesis in bone marrow endothelial cells of patients with multiple myeloma. *Thromb Haemost.* 2004; **92**: 1438-1445.
63. Ria R, Todoerti K, Berardi S, Coluccia AM, De Luisi A, Mattioli M, et Gene expression profiling of bone marrow endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2009;15:5369–78.
64. Ribatti D, Nico B, Vacca A, et al. The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. *Nat Protoc* 2006; **1**: 85-91.
65. Richardson PG, Schlossman RL, Weller E, Hideshima T, Mitsiades C, Davies F, LeBlanc R, Catley LP, Doss D, Kelly K, McKenney M, Mechlowicz J, Freeman A, Deocampo R, Rich R, Ryoo JJ, Chauhan D, Balinski K, Zeldis J, Anderson KC: Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood* 2002,100(9):3063-7.
66. Symeonidis A, Kourakli A, Katevas P, Perraki M, Tiniakou M, Matsouka P, Georgoulas V, Zoumbos N: Immune function parameters at diagnosis in patients with myelodysplastic syndromes: correlation with the FAB classification and prognosis. *Eur J Haematol* 1991, 47(4):277-81.
67. Schneider C, Krischke G, Keller S, Walkinshaw G, Arend M, Rascher W, Gassmann M, Trollmann R. (2009). Short-term effects of pharmacologic HIF stabilization on vasoactive and cytotoxic factors in developing mouse brain.. *Brain Res.* 1280:43-51.
68. Takata K, Morishige K, Takahashi T, Hashimoto K, Tsutsumi S, Yin L, Ohta T, Kawagoe J, Takahashi K, Kurachi H (2008) Fasudil-induced hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  degradation disrupts a hypoxia-driven vascular endothelial growth factor autocrine mechanism in endothelial cells. *Mol Cancer Ther* 7:1551-1561
69. Teo SK: Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *Aaps J* 2005, 7(1):E14-
70. Vacca A, Scavelli C, Montefusco V, Di Pietro G, Neri A, Mattioli M, et al. Thalidomide downregulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:5334–46.

71. Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V (1996) Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 94:1647-1654
72. Weber DM, Chen C, Niesvizky R, Wang M, Belch A, Stadtmauer E, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone provides improved overall survival compared to highdose dexamethasone alone for relapsed or refractory multiple myeloma (MM): results of a North American phase III study (MM-009) [abstract 7521]. *J Clin Oncol* 2006; **24Suppl**:18S.
73. Vacca, A., Ria, R., Semeraro, F., Merchionne, F., Coluccia, M., Boccarelli, A., Scavelli, C., Nico, B., Gernone, A., Battelli, F., Tabilio, A., Guidolin, D., Petrucci, M., Ribatti, D., and Dammacco, F. Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood* 2003; **102**: 3340–3348.
74. Vacca, A., Scavelli, C., Montefusco, V., Di Pietro, G., Neri, A., Mattioli, M., Biccato, S., Nico, B., Ribatti, D., Dammacco, F., *et al.*. Thalidomide down-regulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 5334-5346.
75. Vacca A, Ribatti D, Presta M, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 1999; **93**: 3064-3073.
76. Vacca A, Scavelli C, Serini G, Di Pietro G, Cirulli T, Merchionne F *et al.* Loss of inhibitory semaphorin 3A (SEMA3A) autocrine loops in bone marrow endothelial cells of patients with multiple myeloma. *Blood* 2006; **108**: 1661-1667.
77. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheres D. Endothelial barrier disruption by VEGF mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol* 2004; **167**:223– 229.