

Il programma di Mobilità di Breve Durata (STM) del CNR mi ha permesso di recarmi come “visiting scientist” presso il Laboratorio della Dr.ssa Merja Perala, all’Istituto VTT di Turku, in Finlandia, specializzato in screening high-throughput. Durante il mio soggiorno, dal 3 Luglio al 20 Agosto 2011, ho potuto effettuare diversi screening di siRNA su due linee di cellule tumorali tiroidee (TPC1 e FRO), in assenza ed in combinazione con farmaci inibitori di chinasi (KIs), allo scopo di identificare nuovi mediatori sia di tumorigenesi, che di letalità sintetica, che di resistenza a farmaci KI.

Descrizione del progetto:

Premessa

L’attivazione oncogenica dei geni RET e BRAF è associata ad una elevata percentuale di tumori tiroidei. Nel 20-30% dei tumori papilliferi della tiroide (PTC) si verificano riarrangiamenti genici che portano alla fusione del dominio chinasi di RET con geni che hanno domini di dimerizzazione. Gli oncogeni risultanti sono chiamati RET/PTC. Una grossa fetta (circa l’80%) di PTC è inoltre caratterizzata da mutazioni attivanti l’oncogene BRAF (V600E). La stessa lesione genetica è presente anche nei tumori di fenotipo più aggressivo, ovvero nei tumori anaplastici della tiroide o ATC. Il PTC in genere risponde bene alla chirurgia ed al trattamento adiuvante con radio-iodio; ciò nonostante, ci sono casi in cui il tumore de-differenzia e perde la capacità di concentrare lo iodio. L’ ATC invece è refrattario alla chemioterapia ed alla radioterapia convenzionale e spesso alla diagnosi si presenta già metastatico. Poiché le mutazioni riscontrate più di frequente nei tumori colpiscono le chinasi (come RET e BRAF), e poiché le cellule trasformate sembrano dipendere da tali lesioni (“oncogene addiction”), negli ultimi anni sono stati identificati numerosi farmaci inibitori di chinasi come terapie anti-tumorali. Nella maggioranza dei casi si tratta di piccoli composti che competono con l’ATP. Il paradigma di tali composti è l’imatinib mesilato (STI571, Glivec), un inibitore di BCR-ABL efficace nella leucemia mieloide cronica (CML). A differenza dell’imatinib nella CML, gli inibitori di chinasi hanno dimostrato però un’efficacia limitata nei tumori solidi, quando usati come unici agenti terapeutici. Anche nei tumori tiroidei, così come nelle altre neoplasie solide, l’evidenza che siano coinvolti molteplici difetti genetici e l’eterogeneità stessa dei tumori rendono difficile la possibilità che tali lesioni possano essere eradicare utilizzando un unico farmaco. Quindi, è sempre più accreditata l’ipotesi secondo la quale c’è bisogno di bloccare diverse vie di trasduzione del segnale affinché la terapia anti-tumorale sia efficace. Recentemente sono stati identificati alcuni inibitori molecolari di RET (ZD6474, Zactima, Astrazeneca) e di BRAF (PLX-4032, Plexicon), entrambi in studio in pazienti con tumori tiroidei. Nonostante i risultati incoraggianti derivanti dall’utilizzo di tali inibitori, spesso però l’esito è quello di ottenere solo una risposta parziale e di stabilizzazione della malattia, piuttosto che una remissione completa. Tale effetto è dovuto soprattutto al fatto che nella maggior parte dei casi i tumori sviluppano resistenza ai farmaci inibitori di chinasi; i meccanismi di tali resistenza sono solo

parzialmente conosciuti. Il meccanismo più conosciuto di mancata risposta al trattamento è dovuto allo sviluppo di mutazioni nel dominio chinasi delle cellule tumorali che rendono le chinasi resistenti al composto. Altri meccanismi di resistenza sono dovuti alla stessa natura transitoria dell'inibizione delle vie di trasduzione del segnale che può limitare l'efficacia degli inibitori molecolari. In alcuni casi, ciò è dovuto allo spegnimento di circuiti negativi che in genere controllano la trasduzione del segnale. In tali segnali sono spesso coinvolte fosfatasi che spengono le chinasi, o adattatori negativi o regolatori negativi della trascrizione. Un ulteriore meccanismo di resistenza è dato dall'attivazione di chinasi compensatorie che limitano l'efficacia degli inibitori molecolari.

Risultati:

Il mio progetto era finalizzato ad individuare nuovi bersagli terapeutici da inibire in combinazione con RET o BRAF per ridurre la sopravvivenza delle cellule tumorali tiroidee, per aumentare l'efficacia dei farmaci inibitori di chinasi, e per superare la resistenza ai farmaci inibitori di chinasi. A tale scopo ho effettuato diversi screening genetici di perdita di funzione utilizzando una libreria di piccoli RNA interferenti (siRNA) aventi come bersaglio l'intero chinoma, su cellule derivanti sia da PTC (TPC1) che da ATC (FRO). Screening simili hanno permesso di identificare chinasi importanti nella vitalità di numerose cellule tumorali o in grado di potenziare inibitori chinasi. Ho scelto di investigare il chinoma per molteplici motivi: i) per identificare chinasi compensatorie, responsabili della resistenza agli inibitori di singole chinasi; ii) perchè l'inibizione di molteplici chinasi è più efficace del trattamento con agenti a singolo bersaglio; iii) perchè le chinasi sono proteine "bersagliabili", e quindi l'individuazione di nuovi mediatori della crescita tumorale cellulare può offrire nuove possibilità terapeutiche. Nel mio progetto ho utilizzato una libreria commerciale di siRNA che contiene oligi in grado di spegnere l'intero chinoma (646 bersagli molecolari diversi) comprendenti tutte le chinasi conosciute ed alcune proteine interattori di chinasi (Human Kinase siRNA Set V2.0-Qiagen). Per ridurre l'effetto aspecifico dei siRNA la libreria conteneva molteplici oligi per uno stesso gene, assieme a controlli negativi, come siRNA anti GFP o siRNA senza bersagli specifici. I siRNA sono stati piastrati su multiwell da 384, a cui sono poi state aggiunte le cellule ad una densità di circa 1000 cellule/ pozzetto ed a seguire il reagente di trasfezione HyperFect (Qiagen). A 72 ore dalla trasfezione è stata misurata la vitalità cellulare tramite il CellTitre Blue Assay (Promega) con un lettore di multipiastre EnVision (Perkin Elmer). I siRNA efficaci nel ridurre la vitalità cellulare di almeno il 30% sono stati catalogati come "down-hits", ed i loro geni bersaglio rappresentano potenziali mediatori di vitalità cellulare e quindi di tumorigenesi tiroidea. Nelle cellule TPC1 tali "down-hits" sono 49, tra cui le classi di geni più rappresentate sono quelle dei recettori tirosino-chinasi della famiglia delle efrine (EPHR) e delle JNK-MAPK. Nelle FRO i "down-hits" sono più numerosi, circa 100, ed alle classi individuate nelle TPC1 si aggiunge una numerosa fetta di geni che controllano la stabilità genomica. Per caratterizzare gli effetti derivanti dall'inibizione di RET e BRAF e per individuare eventuali mediatori di sensibilità o

di resistenza ai farmaci inibitori di chinasi, ho inoltre effettuato gli screening con la stessa libreria di siRNA anche in combinazione con i farmaci ZD6474 per spegnere RET nella cellula TPC1 e PLX4032 per spegnere BRAF nelle cellule FRO. Una prima analisi bioinformatica mi ha già permesso di individuare diverse molecole (circa 20 sia in TPC1 che in FRO) come potenziali mediatori di letalità sintetica, ovvero come bersagli che se inibiti in combinazione con RET o BRAF migliorano l'efficacia terapeutica di ZD6474 e PLX4032, misurata come ridotta vitalità cellulare. Tutti gli screening sono stati ripetuti in duplicato ed i dati sono molto consistenti. All'analisi bioinformatica dovrà però adesso seguire una approfondita analisi statistica dei dati, che sarà svolta in Finlandia, dal gruppo della dott.ssa Perala che mi ha ospitato, ed una serie numerosa di esperimenti di biochimica e biologia cellulare sia *in vitro* che *in vivo*, che sarà svolta da me presso l'istituto IEOS-CNR di Napoli allo scopo di: i) validare i risultati ottenuti; ii) caratterizzare il ruolo delle chinasi individuate nella tumorigenesi tiroidea; iii) eventualmente proporre le molecole individuate come potenziali bersagli terapeutici nei tumori tiroidei.