

Titolo del progetto:**“Soppressione di BCR/Abl nelle Cellule Staminali Leucemiche (LSC) e loro resistenza all’Imatinibmesilato come base per lo sviluppo di trattamenti LSC-specifici della Leucemia Mieloide Cronica”.****Nome della Unità Operativa:**

Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali, viale G.B. Morgagni 50, 50134, Firenze, Università degli Studi di Firenze / Istituto Toscano Tumori. tel +39055.4598.209, fax 900.

Responsabile scientifico:

Persio DELLO SBARBA, professore associato di Patologia Generale. persio@unifi.it

Introduzione

Il nostro laboratorio ha una lunga esperienza sul ruolo regolativo dell’ipossia e della respirazione cellulare sulle cellule staminali ematopoietiche normali (1-7, 11) e leucemiche (8-11) e ha dimostrato che queste, a differenza dei progenitori non-staminali, sono resistenti all’ipossia profonda (0.1-1% ossigeno), cosicché l’incubazione in ipossia può essere impiegata per selezionare le cellule staminali dal resto della popolazione ematopoietica. Nella leucemia mieloide cronica (CML), si è dimostrato che l’ipossia determina la soppressione della proteina oncogenetica BCR/Abl e che le cellule staminali leucemiche (LSC) selezionate in ipossia sono BCR/Abl-negative. Ciò fa sì che le LSC siano totalmente insensibili all’imatinib-mesilato (IM), il farmaco attualmente di prima scelta per la terapia della CML (9).

Sulla base di quanto sopra, molti studi nel nostro laboratorio si sono concentrati sulla caratterizzazione del ruolo dell’espressione di BCR/Abl nella regolazione del compartimento staminale della CML. Si tratta in particolare di definire nelle LSC i meccanismi di (a) soppressione di BCR/Abl e (b) elusione della dipendenza da BCR/Abl. Tale definizione fornirebbe informazioni utili ai fini della identificazione di nuovi bersagli LSC-specifici per trattamenti della CML capaci di aggirare la resistenza all’IM e di puntare alla definitiva eradicazione della malattia. A questo scopo, ci si propone di saggiare gli inibitori eventualmente identificati della soppressione di BCR/Abl, oppure delle vie di segnalazione che sostengono il mantenimento BCR/Abl indipendente delle LSC, come potenziali agenti per la terapia della CML.

Nel nostro laboratorio è stato messo a punto il *culture-repopulating Ability (CRA) assay* (4-10), un metodo semplice e rapido per la misura del mantenimento del potenziale staminale da parte di cellule ematopoietiche normali o leucemiche, sottoposte ad una procedura di selezione (per esempio, in ipossia) in una coltura liquida primaria (LC1), per mezzo del loro trasferimento e successiva incubazione in una coltura secondaria (LC2) non selettiva (per esempio, in normossia). Il mantenimento delle LSC dopo selezione in LC1 e trasferimento in LC2 è espresso dal rapporto tra il picco del numero di cellule in LC2 e il picco in LC1 non selettive istituite con lo stesso numero di cellule. Un rapporto vicino a 1 indica che le LSC sono responsabili della ripopolazione e che il loro mantenimento non ha risentito della selezione.

- 1) Hemopoietic progenitor cells are sensitive to the cytostatic effect of pyruvate. *Exp. Hematol.* 15:137, 1987.
- 2) The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82:2031, 1993.
- 3) Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. *Exp. Hematol.* 25:1187, 1997.
- 4) The expansion of murine bone marrow cells preincubated in hypoxia as an in vitro indicator of their marrow-repopulating ability. *Leukemia* 14:735, 2000.
- 5) Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. *Br. J. Haematol.* 108:424, 2000.
- 6) Primitive human HPCs are better maintained and expanded in vitro at 1 percent oxygen than at 20 percent. *Transfusion* 40:1482, 2000.
- 7) Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing

CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp. Hematol.* 30:67, 2002.

8) Hypoxia modifies proliferation and differentiation of CD34(+) CML cells. *Stem Cells* 20:347, 2002.

9) Hypoxia suppresses BCR/Abl and selects Imatinib-insensitive progenitors within clonal CML
2

population. *Leukemia* 20:1291, 2006.

10) Severe hypoxia defines heterogeneity and selects highly immature progenitors within clonal erythroleukaemia cells. *Stem Cells* 25:1119, 2007.

11) Environmental restrictions within tumor ecosystems select for a convergent, hypoxia-resistant phenotype of cancer stem cells. *Cell Cycle* 7:176, 2008.

Piano sperimentale e metodologia

Culture di cellule di CML (delle linee K562, KCL22, LAMA84, etc.) saranno incubate in ipossia (0.1-0.3% O₂) in un manipolatore/incubatore anaerobico Ruskinn Concept 400.

Obiettivo 1. Caratterizzare i meccanismi che determinano la soppressione di BCR/Abl in ipossia e quindi la resistenza all'IM delle LSC della CML. Sarà verificato se BCR/Abl è soppressa mediante meccanismi trascrizionali, post-trascrizionali (ridotta stabilità dell'mRNA), traduzionali (ridotta stabilità della proteina) or post-traduzionali (degradazione della proteina). L'emivita dell'mRNA in ipossia dopo blocco della trascrizione con actinomomicina-D sarà misurata mediante real-time PCR. Il ruolo della proteolisi sarà determinato (western blotting) impiegando inibitori del proteasoma o di specifiche famiglie di proteasi extra-proteasomiche, a cominciare dalle caspasi, la principale famiglia di caspasi nota per essere attivata in ipossia.

Obiettivo 2. Stabilire se e perché le LSC della CML sono costrette a sopprimere BCR/Abl in ipossia. La nostra ipotesi che l'espressione di BCR/Abl riduca il mantenimento della LSC inducendone la transizione a cellula progenitrice leucemica (LPC) sarà affrontata cercando di interferire con la soppressione di BCR/Abl indotta dall'ipossia e determinando poi il mantenimento del potenziale staminale mediante il saggio CRA da noi sviluppato (4-10). Si procederà (a) trattando le colture ipossiche con gli inibitori delle proteolisi che si saranno dimostrati efficaci (vedi Obiettivo 1), oppure (b) cercando di superesprimere BCR/Abl per contrastarne la soppressione. Un secondo approccio è basato sul fatto che BCR/Abl induce segnali IL3-simili, da noi dimostrati ridurre il mantenimento delle HSC in ipossia (7). L'ipotesi che questa sia la ragione per la quale le LSC devono sopprimere BCR/Abl sarà indirettamente esplorata determinando (a) se l'aggiunta di IL3 alle colture ipossiche riduca il mantenimento delle LSC; (b) se citochine attive sul compartimento staminale (FltL, KitL, TPo, IL6 e VEGF), competendo contro la transizione da LSC a LPC indotta dall'IL3, siano capaci di interferire con la soppressione di BCR/Abl, pur assicurando il mantenimento delle LSC in ipossia.

Infine, si suggerirà la possibilità che BCR/Abl sia soppressa allo scopo di prevenire il noto effetto apoptogeno della localizzazione nucleare di BCR/Abl, che abbiamo osservato (dati preliminari) essere indotta dall'ipossia. Le cellule verranno trattate con leptomicin-B, (LMB) inibitore dell'espulsione delle proteine dal nucleo o trasfettate con un mutante di BCR/Abl difettivo per la "nuclear export signal sequence", e l'effetto sul mantenimento delle LSC misurato mediante il saggio CRA. Tale parte del progetto richiede l'utilizzo di vettori lentivirali per poter trasdurre in modo efficiente varie forme mutate di BCR/Abl nelle cellule. Per questi esperimenti, quindi, risulta indispensabile la utilizzazione di un laboratorio attrezzato a tal fine e in particolare del laboratorio BSL3.

Obiettivo 3. Stabilire quali vie di segnalazione sostengano il mantenimento delle LSC quando BCR/Abl è soppressa. Si determinerà in primo luogo se le vie note per essere attivate da BCR/Abl siano parimenti sopresse in ipossia. Nel caso delle MAPK, risultati preliminari indicano che ERK5, ma non ERK1/2, è soppressa in ipossia. Si verificherà la possibilità di un aumento in ipossia dell'espressione di bmi-1, STAT5 e VEGF, che sostengono il self-renewal staminale, indotto dall'ipossia. Si suggeriranno anche la via PI3K>Akt>mTOR e le tirosino-chinasi Lyn e Hck, che proteggono dall'apoptosi in modo BCR/Abl-indipendente. Verranno impiegati Western blotting e citometria a flusso.

Obiettivo 4. Impiegare i risultati degli Obiettivi 1-3 per la formulazione di trattamenti capaci di colpire specificamente le LSC BCR/Abl-negative e IM-resistenti. Sarà determinata (saggio CRA) la capacità di ridurre il mantenimento delle LSC in ipossia dei seguenti farmaci: bortezomib o MG132, inibitori del proteasoma oggetto di trials clinici; LMB, già dimostrata efficace in trials clinici

3
in combinazione con l'IM; 17-AAG o triossido di arsenico; LY294002, rapamicina e RAD001, inibitori di mTOR; gli inibitori di MAPK PD98059 e UO126 (MEK), SB203580 (p38) e SP600125 (JNK); BMS-214662, un inibitore di Ras. Inoltre, verranno impiegati sistemi lentivirali per la inibizione della proteina ERK5 (per la quale non sono al momento disponibili degli inibitori farmacologici). Per questi esperimenti, quindi, risulta indispensabile la utilizzazione di un laboratorio attrezzato a tal fine e in particolare del laboratorio BSL3.

Personale coinvolto nella ricerca

Persio Dello Sbarba – professore associato confermato

Maria Grazia Cipolleschi – ricercatore universitario confermato

Elisabetta Rovida - collaboratore di ricerca

Ignazia Tusa - dottorando di ricerca.