

Uso di vettori lentivirali per il silenziamento genico del complesso CXCR4/hERG1: una nuova strategia terapeutica nei tumori pediatrici chemioresistenti.

Prof.ssa Annarosa Arcangeli, Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali, Viale GB. Morgagni, 50, Università di Firenze.

Premesse.

La chemioresistenza, cioè la non responsività ai normali trattamenti chemioterapici, specialmente farmaci citotossici, rimane ancor oggi uno dei maggiori ostacoli al successo nel trattamento dei tumori umani. Diversi meccanismi coinvolti nella chemioresistenza sono stati identificati in specifici tipi di tumori, come ad esempio nel glioblastoma multiforme. Quest'ultimo è un tipo di tumore cerebrale fortemente aggressivo e resistente agli agenti alchilanti. La chemioresistenza è un grande problema terapeutico non solo nei tumori dell'adulto, ma anche nei tumori pediatrici. Un esempio molto illuminante è fornito dalla leucemia acuta linfoblastica (LAL) del bambino. In questa malattia, che è il più comune tumore pediatrico, sebbene le possibilità di successo della terapia possano raggiungere anche l'80% dei casi, la comparsa di resistenza al trattamento e di ricadute della malattia rimangono ancora un grosso problema clinico. Lo stesso problema coinvolge anche altri tumori dell'età pediatrica, quali il neuroblastoma, il retinoblastoma, i sarcomi (in particolare il sarcoma di Ewing), nonché i tumori cerebrali, quali il medulloblastoma e gli astrocitomi di alto grado.

L'identificazione dei geni e delle vie responsabili dello sviluppo della chemioresistenza è pertanto una tappa cruciale per lo sviluppo di nuovi trattamenti farmacologici per migliorare la sopravvivenza e lo stile di vita dei piccoli pazienti.

Il gruppo di ricerca da me coordinato ha identificato un marcatore di chemioresistenza in leucemie acute pediatriche linfoblastiche (Pillozzi et al., *Blood*, 117: 902-914, 2011) e mieloidi (Pillozzi et al., *Blood*, 110: 1238-1250, 2007), nonché in retinoblastomi (Fortunato, Pillozzi et al., *BMC Cancer*, 10:504-510, 2010). Tale marcatore è rappresentato da un complesso, a livello della membrana, formato da un canale ionico per il potassio, denominato hERG1, e da CXCR4, recettore per la citochina SDF-1 α . Il complesso CXCR4/hERG1, una volta attivato dal contatto delle cellule neoplastiche con il microambiente tumorale, e in particolare con le cellule stromali (MSC), attiva dei meccanismi segnalatori intracellulari (attivazione di PI3K/Akt e delle MAP chinasi) che inducono la sopravvivenza cellulare, cioè la resistenza all'apoptosi. Le cellule neoplastiche sono pertanto in grado di sopravvivere anche in presenza di stimoli pro-apoptotici, quali quelli indotti dai farmaci chemioterapici. E' possibile superare questa chemioresistenza, inibendo la funzione del canale hERG1 tramite farmaci antiaritmici (bloccanti specifici del canale hERG1) (Pillozzi et al., *Blood*, 117: 902-914, 2011).

Poiché questi ultimi farmaci non sono privi di una potenziale cardiotoxicità, e pertanto di difficile utilizzo nei piccoli pazienti, una tappa ulteriore di questo lavoro è quella di mettere a punto una terapia per il superamento della chemioresistenza nei tumori pediatrici, basandosi sulla inibizione selettiva del complesso CXCR4/hERG1. Una possibile strategia per ottenere questo scopo è quella basata sulla inibizione della espressione delle due proteine (CXCR4 e hERG1) tramite silenziamento genico. Si tratta di un approccio altamente innovativo, che sta dando dei buoni risultati, permettendo non solo di studiare la funzione di specifici geni e dei relativi prodotti, ma anche di approntare protocolli di terapia mirata, a bersaglio molecolare, soprattutto in campo

oncologico. Tale metodologia si basa sul trasferimento genico di sequenze di RNA con attività inibitoria (shRNA) sulla espressione di specifici geni bersaglio. In questo campo, i lentivirus rappresentano un vettore virale molto efficace per trasferire sequenze geniche in cellule target poiché sono capaci di infettare numerosi tipi cellulari, sia proliferanti che quiescenti, integrandosi stabilmente nel loro genoma.

Grazie al finanziamento ottenuto dalla Fondazione Bartolomei nel 2009/2010, abbiamo ottimizzato i protocolli di produzione e trasduzione lentivirale, focalizzando la nostra attenzione sulla introduzione di sequenze silenzianti (shRNA) il canale ionico hERG1. Abbiamo potuto verificare che l'inibizione di hERG1, tramite interferenza dell'RNA mediata da vettori lenti virali, è in grado di ridurre la capacità proliferativa delle cellule di adenocarcinoma coloretale (HCT116) *in vitro*. Inoltre abbiamo osservato che le linee cellulari silenziate, e cioè con una ridotta espressione del canale hERG1, hanno una maggiore sensibilità al chemioterapico cisplatino rispetto alle cellule HCT116 trasdotte con virus di controllo non-silenzianti. Questi risultati sono stati oggetti di una comunicazione al congresso nazionale della ABCD (Fortunato A. et al., 2011), nonché di un manoscritto attualmente in preparazione.

Scopo del progetto.

Sulla base della premesse sopra esposte, e dei protocolli di trasduzione lentivirale già messi a punto durante il precedente progetto di ricerca finanziato dalla Fondazione, nel presente progetto ci proponiamo di estendere tale metodica, producendo e testando lentivirus contenenti sequenze silenzianti sia hERG1 sia CXCR4. Tali virus saranno utilizzati per trasdurre linee leucemiche pediatriche, nonché cellule ottenute da culture a breve termine provenienti da tumori cerebrali e sarcomi pediatrici. Verrà valutato inizialmente l'effetto del silenziamento genico sulla effettiva diminuzione della espressione delle due proteine oggetto dello studio, e, successivamente, sulla sopravvivenza cellulare e sulla chemioresistenza *in vitro*, come riportato in Pillozzi et al., Blood, 117: 902-914, 2011.

Riteniamo che l'attuazione di questo progetto di ricerca possa dare una risposta chiara ed efficace per la cura di quei tumori pediatrici chemioresistenti e, per questo motivo, fino ad oggi incurabili.

Piano di lavoro.

- 1) Produzione di vettori lentivirali contenenti sequenze silenzianti per il gene *herg1* e *cxcr4* (Lenti/sh-herg1-cxcr4). A tale scopo verrà utilizzata la stessa strategia applicata nel progetto finanziato nel 2009/2010, facendo impiego di shRNA presenti nella libreria RNAi TRC, e del plasmide pLKO.1.
- 2) Infezione di cellule leucemiche (REH, 697), provenienti da leucemie linfoblastiche acute pediatriche, con il costrutto Lenti/sh-herg1-cxcr4. A tale scopo verrà utilizzato lo stesso protocollo applicato nel progetto finanziato nel 2009/2010, e dettagliato nella relativa relazione del lavoro svolto, presentata a fine 2010.
- 3) Messa in cultura di tumori pediatrici (tumori cerebrali e sarcomi) per la successiva infezione con il costrutto Lenti/sh-herg1-cxcr4. Le culture a breve tempo dei campioni primari (ottenuti dal Dr. Genitori (Ospedale Meyer) e dal Dr. Capanna (CTO, AOUC Careggi) saranno eseguite secondo il protocollo da noi messo a punto

in Masi A. Br. J. Cancer, 93: 781-792, 2005, e utilizzato in uno studio di espressione genica (Masselli et al., Frontiers in Pediatric Oncology, in revisione). L' infezione con il vettore lentivirale Lenti/sh-herg1-cxcr4 verrà effettuata come indicato al punto 2).

- 4) Valutazione dell'effettivo silenziamento dei geni *herg1* e *cxcr4*. L'avvenuto silenziamento dei due geni in oggetto verrà valutato mediante valutazione dell'espressione genica (tramite Real Time Quantitative PCR) e del relativo prodotto proteico (tramite western blot), come riportato in Pillozzi et al., Blood, 117,902-914, 2011.
- 5) Valutazione dell'effetto del silenziamento dei geni *herg1* e *cxcr4* su: a) attivazione delle vie di segnalazione intracellulare coinvolte nella sopravvivenza cellulare (PI3K/Akt, MAP chinasi); b) apoptosi in condizione di co-cultura delle cellule tumorali con cellule stromali; c) chemioresistenza in risposta all'aggiunta di farmaci chemioterapici. Per l'esecuzione di questi esperimenti si utilizzeranno le metodiche già descritte in Pillozzi et al., Blood, 117,902-914, 2011.