

SOMMARIO

- **Screening basato sull'utilizzo dello RNA-interference rivela PLK1, CDK1, e NDC80 come potenziali targets terapeutici del mesotelioma pleurico maligno**
- **CD9 regola negativamente l'espressione di CD26 e inibisce l'aumento del potenziale invasivo mediato da CD26 delle cellule maligne di mesotelioma**

Screening basato sull'utilizzo dello RNA-interference rivela PLK1, CDK1, e NDC80 come potenziali targets terapeutici del mesotelioma pleurico maligno

*A cura della **Dott.ssa Ombretta Melaiu***

Razionale e obiettivi: Nonostante un modesto miglioramento nella sopravvivenza osservato a seguito della introduzione del trattamento a base di pemetrexed e cisplatino, la prognosi dei pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno (MPM) rimane infausta. Nuovi bersagli terapeutici sono quindi necessari per comprendere più approfonditamente la biologia di questo tumore. A tal proposito, l'avvento dell'RNA-interference come strumento molecolare finalizzato al silenziamento post-trascrizionale di specifici geni, rappresenta un'ottima strategia per investigare sul ruolo di geni candidati e sul loro utilizzo come bersagli terapeutici. Nel presente studio sono stati selezionati 40 geni riportati iper-regolati nel MPM da studi di espressione genica precedentemente pubblicati. Tra questi, sono presenti geni chiave nella regolazione del ciclo cellulare, nella riparazione e controllo del DNA, nonché nella chemio-resistenza del MPM. L'espressione di ciascuno di essi è stata silenziata con lo scopo di verificare l'effetto del silenziamento sulla capacità proliferativa di linee cellulari di mesotelioma.

Disegno dello studio: Lo studio è stato condotto su quattro linee cellulari di mesotelioma (H28, H226, H2452 e MSTO-211H) ed una linea cellulare di mesotelio sano utilizzata come controllo (Met-5A), tutte

cresciute in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Ciascuna linea cellulare è stata trattata con siRNA (ossia, piccoli RNA di 21-23 nucleotidi di lunghezza aventi sequenza omologa a quello del proprio mRNA bersaglio, a determinare la degradazione di quest'ultimo, inibendo quindi la successiva traduzione del gene) scelti per ognuno dei 40 geni da silenziare. Dopo opportuna verifica dell'avvenuto silenziamento, tramite Real-Time PCR, per valutare l'effetto del siRNA, sulle cellule di MPM e controllo, sono stati condotti test fenotipici, quali un saggio di crescita per testare il tasso di proliferazione delle cellule private di uno specifico gene candidato nell'arco di un determinato periodo di tempo; un saggio di formazione di colonie, per valutare la capacità aggregante delle cellule silenziate; l'annessina V per testare l'attività apoptotica; ed infine l'analisi del ciclo cellulare con citofluorimetria a flusso. I geni risultati rivestire un ruolo chiave nella cancerogenesi del mesotelioma sono stati investigati su due coorti distinte di pazienti affetti da MPM, una di 80 soggetti e l'altra di 74, tramite la tecnica del tissue-microarray (TMA) per individuare la loro localizzazione al livello nucleare e/o citoplasmatico nelle cellule tumorali di ogni paziente.

End point: Identificare ulteriori geni che potrebbero rappresentare promettenti bersagli terapeutici del MPM, attraverso uno screening basato sull'utilizzo dello RNA-interference.

Risultati: Dei 40 geni che sono stati investigati, è emerso che il silenziamento di BIRC5, CDK1, CHEK1, NDC80, PLK1, RRM1 e RRM2 ha determinato una inibizione della crescita delle cellule di MPM superiore al 50%.

Geni come CDK1, NDC80, e PLK1 non erano mai stati correlati con i processi cancerogenici alla base del MPM.

Per questi ultimi sono state inoltre sviluppate piccole molecole che ne inibiscono l'attività biologica, ossia roscovitina per CDK1, INH1 per NDC80 e BI2536 per PLK1. Per queste ragioni sono stati condotti studi più approfonditi su questi tre geni. Il silenziamento di ciascuno dei tre è risultato in una inibizione della crescita delle cellule di MPM in maniera tempo e dose dipendente. Ridotta in modo significativo è risultata anche la capacità delle cellule tumorali silenziate di formare colonie ed aggregarsi tra loro. L'analisi del ciclo cellulare a seguito del silenziamento genico ha messo in luce un aumento in percentuale delle cellule in fase G2/M delle linee cellulari di MPM analizzate; inoltre le linee cellulari di mesotelioma mostravano aumentata attività

apoptotica. Il pannello di linee cellulari di MPM è stato poi trattato con roscovitina, INH1 e BI2536. I tre farmaci hanno mostrato uno spiccato effetto citotossico, inibendo la crescita e la capacità di formare colonie di

tutte le linee cellulari di mesotelioma. Le cellule H226 e MSTO-211H sono state simultaneamente trattate con la combinazione tra il cisplatino, chemioterapico di prima linea per i pazienti affetti da MPM, e alternativamente roscovitina, INH1, o BI2536, mettendo in evidenza un forte effetto sinergizzante soprattutto di roscovitina e INH1 sull'azione del cisplatino. La successiva analisi immunoistochimica condotta su un totale di 154 pazienti ha messo in evidenza spiccati livelli proteici di PLK1 e CDK1 nelle cellule tumorali. PLK1 è localizzato soprattutto a livello nucleare, CDK1 mostra colorazione sia a livello nucleare che citoplasmatico. Inoltre, poichè è stata notata una sopravvivenza nettamente inferiore di tutti quei pazienti aventi livelli di PLK1 >10%, questo potrebbe essere suggerito anche come marcatore prognostico.

Discussione: L'analisi condotta attraverso tecniche di RNA-interference su 40 dei geni precedentemente suggeriti come potenziali target terapeutici del MPM, ha evidenziato un ruolo chiave nella proliferazione cellulare di BIRC5, CDK1, CHEK1, PLK1, RRM1 e RRM2, in linea con il ben caratterizzato ruolo di questi geni nella biologia del cancro. Di contro, il silenziamento di altri geni come CCNB1, PSMD14, e RAD18, noti determinare l'arresto della crescita in altri tumori, non ha presentato alcun effetto sulla proliferazione delle cellule di mesotelioma. Gli autori si sono soffermati sul ruolo di PLK1, CDK1, e NDC80, in quanto potenziali marcatori innovativi.

NDC80 codifica per un complesso di quattro proteine: HEC1, Nuf20, SPC24P ed SPC25, che connettono il centromero dei cromosomi con i microtubuli mitotici. In particolare HEC1 presenta un importante ruolo in vari processi chiave della divisione cellulare. E' stata osservata una spiccata iper-regolazione di NDC80 nei tumori benigni del seno, quasi a suggerire un suo ruolo come marcatore di lesione che precede la trasformazione maligna della cellula. L'inibizione di HEC1 in modelli murini di tumore è stata associata a riduzione della crescita della massa neoplastica e anche l'utilizzo dell'inibitore INH1 ha portato a ridotta proliferazione di linee cellulari di cancro al seno, carcinoma del colon e della cervice uterina. Il tentativo di investigare ulteriormente il ruolo di NDC80 nel MPM non è stato però possibile a causa della mancanza di anticorpi di NDC80 per analisi immunoistochimiche.

PLK-1 codifica per una serina/treonina chinasi espressa principalmente nella fase G2 tardiva e nella fase M della divisione cellulare; è responsabile della separazione e maturazione del centrosoma con un ruolo chiave nella regolazione dell'entrata e dell'uscita della cellula dalla fase mitotica. La sua iper-espressione è stata collegata a prognosi infausta in caso di cancro del colon-retto, carcinoma mammario e melanoma. I risultati del presente lavoro suggeriscono di poter estendere il significato di marcatore prognostico anche in caso di MPM. Sia in caso

di carcinoma mammario che di MPM una debole espressione di PLK1 è associata ad una migliore sopravvivenza.

CDK1 codifica anch'esso per una serina/treonina chinasi, in grado di interagire con una ciclina-B1 guidando la cellula nel passaggio dalla fase G2 alla fase M; ha anche un ruolo nella regolazione dell'apoptosi. Alti livelli di espressione di CDK1 sono stati associati a malattia più aggressiva, infiltrazione di cellule tumorali e scarsa sopravvivenza di pazienti con carcinoma mammario, cancro al fegato, linfoma e cancro al colon. Anche in caso di MPM la maggior parte dei pazienti mostra alti livelli di CDK1, ma questo target non sembra avere un valore prognostico per il MPM.

Oltre al loro coinvolgimento nella proliferazione, è stato suggerito un ruolo per PLK1 e CDK1 anche nella chemio-resistenza. Nel cancro al seno, il silenziamento di PLK1 in combinazione con la somministrazione del chemioterapico paclitaxel ha determinato un effetto citotossico sia su linee cellulari che su modelli murini, molto più elevato rispetto alla somministrazione dei singoli agenti. Anche nel carcinoma a cellule squamose il silenziamento di PLK1 aumenta la sensibilità al cisplatino. Nel presente studio non è stato però ottenuto un aumento della tossicità del cisplatino dato in combinazione con BI2536, suggerendo dunque un ruolo differente per PLK1 nel mesotelioma.

Conclusioni: In conclusione, nel presente lavoro è stata dimostrata l'applicabilità dello RNA-interference volto alla scoperta di nuovi targets di trattamento per il MPM. In particolare un chiaro ruolo nella crescita delle cellule di mesotelioma è stato identificato per PLK1, CDK1, e NDC80. Le molecole che inibiscono l'attività di CDK1 e NDC80 sensibilizzano le cellule di MPM al cisplatino. Inoltre è stato identificato PLK1 come importante fattore prognostico. Dati i risultati promettenti ottenuti, sono consigliate ulteriori indagini del ruolo di tali geni candidati in modelli in vivo

Parole chiave: RNA-interference; mesotelioma maligno; NDC80; CDK1; PLK1

Riferimento Bibliografico: Linton A et al. 2014. Br J Cancer. 2014 Jan 21;110(2):510-9.

CD9 regola negativamente l'espressione di CD26 e inibisce l'aumento del potenziale invasivo mediato da CD26 delle cellule maligne di mesotelioma

*A cura della **Dott.ssa Elisa Paolicchi***

Razionale e obiettivi: La CD26/dipeptidil-peptidasi IV è una glicoproteina di superficie cellulare che si compone di più domini funzionali locati intorno al suo sito ectopeptidasi. Un crescente numero di evidenze indica che l'elevata espressione di CD26 correla con l'aggressività della malattia e il potenziale invasivo delle neoplasie.

Un recente lavoro ha dimostrato che CD26 è preferenzialmente espresso sulle cellule tumorali di mesotelioma maligno (MM) ma non sulle cellule mesoteliali normali, suggerendo che l'espressione di membrana del CD26 è di potenziale importanza nel trattamento di pazienti affetti da MM. Recentemente, CD9, CD24 e CD26 sono stati identificati come marcatori di cellule staminali tumorali (CST) delle cellule di MM. Il presente studio si focalizza sull'associazione molecolare tra CD26 e CD9 e ha scoperto che l'interazione tra questi due molecole giochi un ruolo significativo nell'invasività, motilità e proliferazione di cellule di MM.

Disegno dello studio: Per lo svolgimento dello studio sono state utilizzate le seguenti linee cellulari di mesotelioma: ACC-MESO1 (MESO1), MSTO-211H (MSTO), NCI-H2452, e NCI-H226. Queste linee cellulari sono state cresciute in RPMI 1640 supplementato con 10% di FCS inattivato al calore, penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 mg/ml) a 37°C e 5% di CO₂. Le cellule MSTO sono state trasfettate con il plasmide retrovirale pLNCX2 subclonato con il cDNA di CD26 utilizzando la Lipofectamina. Come controllo, le cellule sono state trasfettate con il vettore vuoto di pLNCX2. L'espressione del cDNA trasfettato è stato confermato mediante immunoblotting e citofluorimetria. Per silenziare l'mRNA del CD26 endogeno, sono stati utilizzati tre "small interfering RNA" (siRNA) e due "short hairpins RNA" (shRNA); per il silenziamento del CD9 endogeno sono stati utilizzati due siRNA e due shRNA. Le cellule sono state analizzate mediante BD FACSCalibur e selezionate con BD FACSAria. I dati sono stati analizzati mediante software FlowJo. Le cellule MESO1 trasfettate con il siRNA di controllo o il CD26 siRNA sono state utilizzate per esaminare l'effetto del

Conclusioni: In conclusione, nel presente lavoro è stata dimostrata l'applicabilità dello RNA-interference volto alla scoperta di nuovi targets di trattamento per il MPM. In particolare un chiaro ruolo nella crescita delle cellule di mesotelioma è stato identificato per PLK1, CDK1, e NDC80. Le molecole che inibiscono l'attività di CDK1 e NDC80 sensibilizzano le cellule di MPM al cisplatino. Inoltre è stato identificato PLK1 come

importante fattore prognostico. Dati i risultati promettenti ottenuti, sono consigliate ulteriori indagini del ruolo di tali geni candidati in modelli in vivo.

silenziamento di CD26. Le cellule MSTO-Wild (controllo) e MSTO-CD26(+) sono state usate per studiare l'effetto della iperespressione di CD26. L'RNA di queste cellule è stato utilizzato per effettuare un'analisi di microarray con il "DNA chip 3D Gene". Grazie all'analisi di microarray è stata creata una mappa di geni espressi in modo diverso nelle cellule di mesotelioma dove il CD26 era silenziato (CD26 siRNA) e dove era iper-espresso. I dati illustrati in questa pubblicazione sono stati depositati in Gene Expression NCBI Omnibus e sono accessibili attraverso GEO Series (GSE52216). L'analisi dei marcatori di interesse è stata effettuata attraverso PCR real time (RT), immunoblot e immunoprecipitazione. Per testare il potenziale di invasione e migrazione è stato usato il saggio di "Boyden chamber-based cell invasion and migration" e per la proliferazione il saggio MTT. Per gli esperimenti in vivo sono stati usati topi femmine SCID di 5-6 settimane in accordo con le linee guida dell' "Institute Animal Care and Use Committee of the University of Tokyo". I topi sono stati anestetizzati con etere e sottoposti a diretta inoculazione di cellule di mesotelioma (5×10^5 per topo) nella regione dorsale. I topi sono stati sacrificati al giorno 14 dopo l'impianto delle cellule tumorali e i tumori sono stati campionati. La significatività statistica delle differenze è stata valutata mediante "two tailed t-test" ed è stato considerato significativo il valore di $p < 0,05$.

End point: Esplorare i meccanismi molecolari coinvolti nel comportamento clinico del MM, focalizzandosi sull'interazione tra CD26 e CD9, che recentemente sono stati identificati come nuovi marcatori di CST nel MM.

Risultati: Il CD26 e CD9 sono co-modulati e co-precipitano insieme nelle linee di cellule maligne di mesotelioma ACC-MESO1 e MSTO-211H. Questi risultati suggeriscono quindi che il CD26 e il CD9 hanno un'associazione fisica e potenzialmente funzionale. Lo studio con il siRNA ha rivelato che la deplezione di CD26 porta ad una maggiore espressione di CD9, mentre il silenziamento di CD9 ha portato ad un aumento dell'espressione di CD26. Coerentemente con questi risultati, è stato notato che il trasferimento genico di CD26 nelle cellule MSTO-211H CD26-negative ha ridotto l'espressione di CD9. Per comprendere la natura dell'associazione tra CD26 e CD9, è stata effettuata anche un'analisi di microarray nelle cellule di MM con CD26-silenziato e iper-espresso. È interessante notare che il silenziamento di CD26 aumentava l'espressione di CD9, mentre la iper-espressione di CD26 silenziava CD9. L'analisi citofluorimetrica ha rivelato che la deplezione di CD26 aumenta l'espressione di superficie di

CD9, mentre il silenziamento di CD9 aumenta quella di CD26. L'analisi di immunoblotting ha anche confermato che il livello proteico di CD9 era elevato dopo il silenziamento di CD26 e che il livello della proteina CD26 era elevato dopo il silenziamento di CD9 nelle cellule MESO1. La RT-PCR ha confermato i risultati a livello dell'mRNA. Il saggio di invasione delle cellule ha mostrato che la iper-espressione del gene CD26 o il silenziamento di CD9 ha portato ad una maggiore invasività, mentre la deplezione del gene CD26 ha provocato una diminuzione del potenziale invasivo, suggerendo che CD9 può sopprimere l'invasione delle cellule tumorali. Risultati simili sono stati ottenuti con il saggio di migrazione cellulare. Questi risultati indicano che CD26 può conferire maggiore invasività e motilità alle cellule tumorali. In considerazione ai dati precedenti che suggeriscono il coinvolgimento di CD9 come responsabile dell'inibizione dello sviluppo di metastasi, la capacità di CD26 di promuovere l'invasione e la migrazione delle cellule, possono essere influenzate dall'attività antimetastatica di CD9. Presi insieme, questi risultati suggeriscono che CD9 regola la migrazione e l'invasione delle cellule CD26-positive grazie al suo effetto inibitorio sulla invasività. Inoltre, il presente lavoro suggerisce che questa aumentata invasività può essere in parte mediata dall'integrina $\alpha 5\beta 1$, poiché gli studi di co-precipitazione hanno dimostrato un'associazione tra il CD26 e l'integrina $\alpha 5\beta 1$. Infine, la deplezione del gene di CD9 ha determinato livelli elevati della proteina e la fosforilazione della tirosina di FAK e Cas-L, che sono geni a valle dell'integrina $\beta 1$, mentre la deplezione di CD26 ha portato ad una riduzione dei livelli di queste molecole. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che il CD26 potenzia l'invasione delle cellule tumorali attraverso la sua interazione con l'integrina $\alpha 5\beta 1$, e che il CD9 regola negativamente l'invasione delle cellule tumorali, riducendo il livello del complesso CD26- $\alpha 5\beta 1$ attraverso un'inversa correlazione tra il CD9 e l'espressione di CD26. Questi risultati suggeriscono che il CD26 e il CD9 potrebbero essere potenziali biomarcatori così come bersagli molecolari promettenti per nuovi approcci terapeutici nel MM e altre neoplasie.

Discussione: Nel presente studio, si analizza un nuovo meccanismo molecolare che coinvolge l'interazione reciproca di CD26 e CD9. È stato dimostrato che CD9 e CD26 sono co-modulati e che co-precipitano, che a livello trascrizionale la loro espressione è regolata in maniera inversa e che hanno effetti opposti sulla invasione e la migrazione di cellule di mesotelioma. Inoltre, è stata dimostrata la co-precipitazione di CD26 e l'integrina $\alpha 5\beta 1$, il che spiega in parte l'effetto pro-metastatico di CD26. Infine, la perturbazione di CD26 o l'espressione di CD9 ha portato a modifiche della proteina e dei livelli di fosforilazione della tirosina di FAK e Cas-L. Nel presente studio, è stato dimostrato che la correlazione inversa tra CD9 e CD26 svolge un ruolo sull'invasività delle cellule tumorali CD26-positive mediata dalla soppressione di CD9. Come

ben noto, le metastasi sono la caratteristica fondamentale di malignità che influenzano la sopravvivenza globale dei pazienti. Nel cancro del colon umano, il CD26 è stato identificato come un nuovo marker per le CST e la inoculazione di cellule con iper-espressione di CD26 in topi SCID ha portato alla formazione di metastasi a distanza, indicando la capacità metastatica del CD26. La ridotta espressione di CD9 correla invece con un numero maggiore di metastasi in molti tipi di tumori maligni, suggerendo che il CD9 funziona come un soppressore di metastasi. Coerentemente con queste pubblicazioni, l'analisi multivariata di questo studio mostra che l'espressione di CD9 è un marcatore prognostico indipendente favorevole nel MM. Visto che gli anticorpi contro l'integrina $\alpha 5\beta 1$ inibiscono l'invasione delle cellule e la migrazione e che il silenziamento di CD26 riduce l'espressione dell'integrina $\alpha 5\beta 1$.

Possiamo concludere che il CD26 promuove l'invasività attraverso la formazione del complesso molecolare CD26- $\alpha 5\beta 1$. D'altra parte, la deplezione di CD9 aumenta sia l'integrina $\alpha 5\beta 1$ che l'espressione di CD26, causando un'innalzamento del livello del complesso CD26- $\alpha 5\beta 1$. Questi risultati sono in contrasto con il lavoro precedente che indica che la deplezione di CD9 correla con la diminuzione dei livelli di integrine $\alpha 5$ e $\beta 1$, contribuendo alla diffusione dei carcinomi ovarici. Questa discrepanza può essere in parte attribuibile a differenze di origine cellulare e dai contenuti molecolari di tetraspanine o di CD26. Nel presente studio, è stato dimostrato che il CD9 sopprime l'invasione delle cellule e la migrazione, inibendo la formazione di CD26- $\alpha 5\beta 1$ attraverso la regolazione negativa di CD26. Questi risultati quindi suggeriscono un nuovo meccanismo coinvolto nella soppressione di invasività e metastasi mediata da CD9. Sulla base dei risultati di cui sopra, si può affermare che bloccando sia CD26 che CD9 si ha una marcata inibizione della invasività e della proliferazione dei tumori.

Pertanto, l'applicazione combinata di anti-CD26 e anti-CD9 potrebbe essere una probabile strategia terapeutica promettente per il trattamento del MM.

Parole chiave: Cellule staminali tumorali, CD9, CD26, Mesotelioma maligno

Riferimento Bibliografico: Okamoto T et al. PLoS One. 2014 Jan 23;9(1):e86671

Conclusioni: In conclusione, il presente studio dimostra che l'interazione tra CD26 e CD9 media il comportamento del mesotelioma, suggerendo che CD26 e CD9 potrebbero essere biomarcatori promettenti così come bersagli molecolari per il futuro trattamento del mesotelioma maligno.

NEWSLETTER GRUPPO ITALIANO MESOTELIOMA (GIMe)

<http://www.gime.it/>

<https://www.facebook.com/pages/GIME-Mesotelioma-Luciano-Mutti/457987864331790?ref=nf>

Direttore: Prof. Luciano Mutti (Direttore del Dipartimento di Medicina Generale e del Laboratorio di Oncologia Clinica, Vercelli/ Ospedale di Borgosesia)

Coordinatrici: Dott.ssa Ombretta Melaiu (Università di Pisa) Dott.ssa Elisa Paolicchi (Università di Pisa)

Web editor: Lillo Mendola

Hanno contribuito a questo numero:

Dott.ssa Ombretta Melaiu (Università di Pisa) Dott.ssa Elisa Paolicchi (Università di Pisa) Dott.ssa Elisa Barone (Università di Pisa)

Supervisione Prof. Luciano Mutti (Direttore del Dipartimento di Medicina Generale e del Laboratorio di Oncologia Clinica, Vercelli/ Ospedale di Borgosesia)

Contatti: luciano.mutti@hotmail.it,
ombretta.melaiu@for.unipi.it
elisa.paolicchi@for.unipi.it

DISCLAIMER – Leggere attentamente

Gli autori e redattori della newsletter del Gruppo Italiano Mesotelioma sono Medici, Farmacisti e Biologi, e quanto riportato deriva da affidabili ed autorevoli fonti e studi scientifici, accompagnato dai relativi estratti o riferimenti bibliografici alle pubblicazioni. In ogni caso, le informazioni fornite, le eventuali nozioni su procedure mediche, posologie, descrizioni di farmaci o prodotti d'uso sono da intendersi come di natura generale ed a scopo puramente divulgativo ed illustrativo. Non possono, pertanto, sostituire in nessun modo il consiglio del medico o di altri operatori sanitari. Nulla su <http://www.gime.it/>, sulle relative newsletter, e-mails, o qualsiasi dei progetti del GIMe, può essere interpretato come un tentativo di offrire o rendere un'opinione medica o in altro modo coinvolta nella pratica della Medicina. Il gruppo italiano mesotelioma, i suoi Soci od altre parti ad esso connesse non possono, quindi, essere ritenuti responsabili circa risultati o conseguenze di qualunque utilizzo o tentato utilizzo di una qualsiasi delle informazioni riportate.

Il servizio è totalmente gratuito e non esistono conflitti di interesse o finalità di lucro. Non sono ammesse la divulgazione e la diffusione della newsletter "GIMe" senza precedente autorizzazione scritta del Gruppo Italiano Mesotelioma.

Sostieni il Gruppo Italiano Mesotelioma (GIMe)!

Il GIMe è un'associazione senza scopo di lucro, sostienilo con il tuo 5 per mille dell'IRPEF per destinare tali fondi a Borse di studio e di ricerca per giovani ricercatori.