

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN IMAGING MOLECOLARE XIX CICLO

IMAGING MOLECOLARE DELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON INIBITORI DI TIROSIN CHINASI MEDIANTE *microSPECT*

Relatore:
Ch.ma Prof.ssa
Silvana Del Vecchio

Coordinatore
Ch.mo Prof.
Marco Salvatore

Candidata:
Dott.ssa Francesca Iommelli

INDICE

INTRODUZIONE	2
• Strumentazioni per l'imaging molecolare	3
• Sonde molecolari per l'imaging	8
• Meccanismi molecolari del processo di apoptosi	13
BASE DELLA RICERCA SCIENTIFICA E SCOPO DEL LAVORO	21
MATERIALI E METODI	26
• Linee cellulari e trattamento	26
• Preparazione di lisati cellulari totali e di organelli cellulari	27
• Immunoprecipitazione	28
• Western Blotting	28
• Saggi di captazione del ^{99m} Tc-MIBI sulle linee cellulari dopo trattamento con inibitori di chinasi	29
• Allestimento di un modello animale per studi in vivo	30
• Imaging mediante microSPECT e ^{99m} Tc-MIBI	30
• Studi di Biodistribuzione	31
RISULTATI	32
• Caratterizzazione delle cellule di carcinoma di mammella trasfettate con il gene umano Bcl-2	32
• Studi in vitro sulla captazione del ^{99m} Tc-MIBI nelle cellule tumorali dopo trattamento con inibitori di chinasi	32
• Analisi delle proteine coinvolte nei cambiamenti di captazione del ^{99m} Tc-MIBI dopo trattamento con Gefitinib	38
• Imaging della risposta tumorale al Gefitinib mediante microSPECT	52
• Studi di biodistribuzione	52
DISCUSSIONE	54
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUZIONE

La realizzazione del progetto genoma umano (1) e lo sviluppo di tutte quelle tecnologie che caratterizzano l'approccio genomico, proteomico e metabolomico, ha permesso una crescita esponenziale delle conoscenze sulle basi genetiche e molecolari delle patologie umane. In diagnostica per immagine questo straordinario avanzamento delle conoscenze, ha condotto alla necessità di sviluppare metodiche di imaging in grado di: a) visualizzare precocemente gli eventi molecolari e cellulari che determinano l'insorgenza e la progressione di malattie umane nel singolo individuo, b) visualizzare l'espressione di bersagli molecolari per terapie individualizzate, c) monitorare in tempo reale sia l'evoluzione naturale della malattia che la risposta alla terapia, d) accelerare lo sviluppo di farmaci diretti contro bersagli molecolari. Il raggiungimento di questi obiettivi richiede nella maggior parte dei casi la sperimentazione e validazione delle metodiche di imaging nel modello animale. Ciò ha comportato una straordinaria evoluzione tecnologica nelle strumentazioni di imaging, in quanto, nel passaggio dalla specie umana al modello animale è necessario migliorare significativamente le caratteristiche tecniche degli apparecchi attuali, soprattutto in termini di risoluzione spaziale e temporale, nonché di rapporto segnale/fondo.

Tutti gli avanzamenti tecnologici operati fino ad oggi per lo sviluppo di metodiche di imaging dedicate allo studio di piccoli animali, hanno cercato di rispondere il più

possibile ai requisiti di alta risoluzione, tempi brevi di analisi, specificità del segnale, minimizzazione del rumore di fondo e scarsa invasività. Le varie apparecchiature fino ad oggi esistenti per lo studio delle patologie nell'uomo fanno riferimento a tecniche di Risonanza Magnetica (MR), di Ultrasuonografia (US), di Tomografia Computerizzata (CT), di Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) e di Tomografia Computerizzata ad Emissione di Fotone Singolo (SPECT). Le stesse tecniche vengono utilizzate nella ricerca preclinica mediante strumenti dedicati a piccoli animali. In larga espansione sono anche le tecniche di imaging ottico, che per ora non hanno apparecchiature equivalenti da impiegare nella pratica clinica. Le diverse tecnologie differiscono tra di loro per alcune principali caratteristiche come: risoluzione spaziale e temporale, grado di profondità di penetrazione del segnale attraverso i tessuti, tipo di segnale che genera l'immagine (radiazioni ionizzanti, onde elettromagnetiche, fenomeni di propagazione della luce, ultrasuoni) e disponibilità di sonde marcate biocompatibili e selettive per il proprio bersaglio (2-3).

Strumentazioni per l'imaging molecolare

Attualmente la tecnologia più avanzata e che meglio si presta ad effettuare studi quantitativi e dinamici di imaging è rappresentata dalla PET (Tomografia ad Emissione di Positroni). La PET è una tecnica di medicina nucleare in cui si utilizzano diversi isotopi emettitori di positroni tra cui: ^{15}O (emivita: 2,07 min), ^{13}N (emivita: 10 min), ^{11}C (emivita: 20,3 min), ^{18}F (emivita: 1,83 h), ^{124}I (emivita: 4,2 giorni), $^{94\text{m}}\text{Tc}$

(emivita: 53 min). Molti di questi isotopi presentano una breve emivita, così che la reazione chimica che porta alla loro incorporazione in uno scheletro di una molecola scelta come sonda, deve avvenire molto rapidamente, per consentire poi un adeguato impiego del radiofarmaco. Dalla realizzazione dei primi tomografi per piccoli animali si è cercato, nel corso del tempo, di migliorare la risoluzione spaziale, giungendo per i moderni scanner ad un valore che si aggira tra 1 e 2 mm (3). Attualmente, sono in corso studi rivolti alla realizzazione di sistemi con una risoluzione spaziale inferiore al millimetro, pur conservando un'elevata sensibilità.

La SPECT (Tomografia Computerizzata ad Emissione di Fotone Singolo) oggi rappresenta un'utile tecnica di medicina nucleare impiegata per l'imaging di diversi processi biologici, i radionuclidi tipicamente impiegati sono rappresentati soprattutto da ^{99m}Tc (emivita: 6 h), ^{111}In (emivita: 2,8 giorni) e ^{123}I (emivita: 13,2 h). Oggi sono disponibili come prodotti commerciali anche microSPECT dedicate allo studio di modelli animali. Negli ultimi anni, allo scopo di ottenere una risoluzione spaziale submillimetrica e quindi potenzialità di impiego estese, si è data grande enfasi allo sviluppo di rivelatori costituiti da un insieme di cristalli singoli e di ridottissime dimensioni, al posto di scintillatori continui (4-5).

L'imaging ottico sta assumendo oggi, sempre maggiore rilievo negli studi di modelli animali. I principi di questa tecnologia sono rappresentati dai fenomeni fisici di interazione della luce con i tessuti, come: assorbimento, eccitazione, emissione, scattering, fluorescenza e luminescenza. Attualmente, le moderne apparecchiature di imaging ottico, si avvalgono soprattutto di sonde fluorescenti o luminescenti. Questi

scanner raggiungono una risoluzione spaziale nell'ordine del millimetro ed una sensibilità nell'ordine del nanometro. I segnali luminosi emessi sono captati da una CCD camera (charge-coupled device camera) che li converte in immagini. Le CCD camere di ultima generazione sono costituite da cristalli con un'alta sensibilità alla luce ed essendo refrigerate riducono i rumori di fondo dovuti al riscaldamento termico durante l'acquisizione del segnale. I tempi di acquisizione delle immagini sono molto veloci ed è possibile eseguire l'analisi di più animali contemporaneamente. Tuttavia, la più grande limitazione dell'imaging ottico è la mancata possibilità di esplorare piani profondi, che riduce la possibilità di impiego clinico. Un approccio ancora più innovativo di imaging ottico è rappresentato dalla FMT (Fluorescent Mediated Tomography). Durante l'applicazione di questa tecnica, l'oggetto di studio viene esposto a continue onde luminose provenienti da diverse sorgenti ed i segnali emessi dai tessuti vengono poi captati da rivelatori, elaborati mediante degli algoritmi matematici e convertiti in un'immagine tridimensionale. Questi macchinari hanno il vantaggio di poter esplorare i tessuti in maggiore profondità rispetto alle altre apparecchiature di imaging ottico (profondità nell'ordine dei centimetri, piuttosto che micron), presentano una risoluzione tra 1 e 2 mm ed il risultato dell'esame è un'immagine tridimensionale acquisita con una sensibilità dello strumento nell'ordine del nanometro. Recenti applicazioni della FMT riguardano imaging di angiogenesi tumorale in vivo mediante fluorocromi NIR (Near Infrared) (6).

Grazie ai recenti sviluppi nell'ambito dell'ultrasuonografia (US) anche le apparecchiature ecografiche sono oggi disponibili come microscanner dedicati allo

studio di piccoli animali. Questi macchinari lavorano mediante sonde ad alta frequenza ed hanno una risoluzione spaziale compresa tra i 10 ed i 100 μm (7). Attualmente, sono commercialmente disponibili apparecchiature di UBM (Ultrasonic Biomicroscopy) che sfruttano frequenze comprese tra i 40 e 200 MHz. Questo strumento è stato impiegato per diverse applicazioni, tra cui studi funzionali del sistema cardiovascolare in embrione di topo e studi relativi alla crescita e differenziazione di tumori in vivo. Sono stati sviluppati anche degli scanner che lavorano a frequenze superiori ai 200 MHz ed essi sono i SAM (Scanning Acoustic Microscopy), che sono stati impiegati per la valutazione delle proprietà meccaniche delle cellule (8). Negli ultimi anni anche la messa a punto di moderni mezzi di contrasto e tecnologie di ecodoppler, fanno dell'ultrasuonografia una tecnica in larga espansione (9).

Un'altra delle tecniche di maggiore rilevanza per l'imaging è la risonanza magnetica (MR). Attualmente queste apparecchiature per piccoli animali (microMRI) presentano una buona capacità di penetrazione tessutale e raggiungono risoluzioni spaziali molto alte. Ciò è possibile grazie all'impiego di campi magnetici ad alta intensità, compresa tra i 4,7 e 17 T e mediante l'uso di hardware e software costruiti sempre più su misura per il modello animale. Queste strumentazioni offrono la possibilità di ottenere delle immagini tridimensionali con una risoluzione anche al disotto dei 10 μm . Un'estensione dell'imaging in modelli animali, mediante MR, è rappresentata dalla Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS), in cui si ottengono spettri di assorbimento

di organi sottoposti a campi magnetici. Gli spettri rilevati dipendono dalla composizione chimica e molecolare del tessuto (3,10).

Tra le altre tecniche di radiologia, la tomografia computerizzata a raggi X (CT) non riveste un ruolo prevalente nell'ambito della ricerca preclinica, rispetto al suo impiego nella clinica. Tuttavia l'allestimento di un sistema dedicato allo studio di piccoli animali ha permesso di utilizzare questa tecnica soprattutto per lo studio di tumori molli, ossa e polmone e per lo studio di diversi modelli animali transgenici knock in/out. I sistemi di microCT attualmente disponibili hanno una risoluzione spaziale di 50 μm , una buona capacità di penetrazione nei tessuti e velocità nell'esecuzione degli esami (10).

Un notevole avanzamento nell'ambito dell'imaging molecolare è rappresentato dall'imaging multimodale, che vede fuse insieme diverse metodologie come PET/CT, SPECT/CT, MRI/Imaging ottico. Questo approccio permette l'esecuzione di due diversi esami contemporaneamente su uno stesso distretto anatomico. L'indagine fornisce quindi informazioni morfologiche ed allo stesso tempo una valutazione della funzionalità dell'organo. L'imaging multimodale presenta notevoli vantaggi, non solo perché diminuisce il numero di esami al quale il soggetto è sottoposto, ma anche perché le informazioni ottenute risultano più accurate e precise, rispetto a quelle derivanti da due esami eseguiti separatamente. Attraverso la messa a punto di nuovi software possono essere registrate insieme immagini di PET e SPECT e quelle di CT ed MR. In questi ultimi anni è stata data grande enfasi soprattutto alle modalità

PET/CT e SPECT/CT che sono già da tempo a disposizione nella pratica clinica. Inoltre il grande interesse verso la ricerca preclinica in piccoli animali ha reso disponibile in commercio anche sistemi microPET/CT e microSPECT/CT. Come per le apparecchiature cliniche anche in questo caso esistono due sistemi indipendenti di acquisizione delle immagini con un software integrato di controllo. Sono in fase di studio anche modalità di integrazione tra PET e MR e sistemi PET/Imaging ottico e MR/Imaging ottico (11).

Sonde molecolari per l'imaging

Il grande progresso scientifico registrato in questi anni nell'ambito dell'imaging molecolare, non è soltanto il frutto degli avanzamenti tecnologici fin ora descritti, ma è anche il frutto dello sviluppo di nuove sonde molecolari e di moderni mezzi di contrasto. Attualmente, sono state sintetizzate sonde molecolari altamente specifiche per il proprio bersaglio. Potenziali bersagli per l'imaging molecolare sono: specifici geni, RNA messaggero e proteine (recettori di membrana, trasportatori, enzimi intracellulari, recettori per fattori di crescita ed ormoni etc.). L'amplificata espressione di una serie di proteine nel cancro, rappresenta uno dei motivi che hanno consentito di applicare l'imaging molecolare soprattutto in oncologia.

Sonde molecolari e mezzi di contrasto possono essere suddivisi in agenti non specifici, che non hanno un sito di distribuzione preferenziale, agenti selettivi per uno specifico

bersaglio ed agenti che generano un segnale amplificato in seguito all'interazione con il proprio recettore.

I mezzi di contrasto per l'imaging di risonanza magnetica rientrano in tutte le tipologie descritte. Chelati di Gadolinio e particelle di ossido di ferro sono esempi di agenti di contrasto aspecifici e possono essere utili per valutare la perfusione tissutale, permeabilità vascolare e flusso sanguigno. Particelle di ossido di ferro di ridottissime dimensioni (Ultrasmall Particles of Iron Oxide, USPIOs) trovano oggi impiego in studi di angiogenesi tumorale in vivo (12). Mezzi di contrasto specifici sono rappresentati da composti funzionalizzati mediante peptidi, proteine ed altre molecole selettivamente riconosciute da specifici bersagli. Recentemente, sono state messe a punto delle nanoparticelle contenenti Gadolinio per il riconoscimento di depositi di fibrina, inoltre sono state sintetizzate nanoparticelle superparamagnetiche CLIO (Crosslinked Iron Oxide Nanoparticles) unite all'Annessina V per il riconoscimento della fosfatidilserina di membrana delle cellule in apoptosi (13) ed ancora sono state messe a punto, particelle USPIO (Ultra Small Superparamagnetic Particles of Iron Oxide) legate ad anticorpi per il riconoscimento delle E-selectine di cellule endoteliali, per il monitoraggio della vascolarizzazione tumorale, flogosi ed aterosclerosi (14). Chelati di Gadolinio legati a gruppi fenolici sono esempi di mezzi di contrasto che in seguito ad interazione enzimatica determinano un segnale amplificato. Infatti questi agenti in seguito all'interazione con enzimi come la perossidasi, formano oligomeri con proprietà paramagnetiche amplificate (12).

Anche nell'ambito dell'ultrasuonografia, l'impiego di nuovi agenti di contrasto come microbolle o liposomi acusticamente attivi, oppure emulsioni di perfluorato di carbonio, possono aumentare la risoluzione spaziale delle convenzionali apparecchiature. Inoltre la specificità del segnale può essere incrementata funzionalizzando questi agenti di contrasto con peptidi o frammenti di anticorpi per il riconoscimento di un bersaglio. Un esempio è rappresentato da microbolle legate con anticorpi selettivi verso l'endoglina (CD105), una glicoproteina espressa sulla superficie delle cellule endoteliali (15), oppure microbolle legate all'echistatina, una molecola che riconosce l'integrina $\alpha_v\beta_3$ (16). Questi moderni mezzi di contrasto insieme a tecnologie di ecodoppler, trovano largo impiego nello studio della circolazione e perfusione miocardica, vascolarizzazione tumorale e risposta alla terapia (9).

Notevoli progressi sono stati registrati anche per lo sviluppo di nuove sonde per l'imaging ottico. Le sonde attualmente disponibili per questi studi sono soprattutto composti fluorescenti e bioluminescenti. In merito alla fluorescenza, oggi il composto maggiormente impiegato è rappresentato dalla Green Fluorescent Protein (GFP). Di recente questa proteina è stata utilizzata in topi transgenici per il monitoraggio dell'evoluzione tumorale e dell'insorgenza di metastasi (17). L'imaging ottico si avvale anche dei fenomeni di bioluminescenza e ciò è possibile soprattutto attraverso l'impiego del sistema luciferasi/luciferina per valutare processi come: l'espressione genica, l'attivazione di "pathways" coinvolti nella genesi del cancro, interazioni proteina-proteina e risposta alla terapia. Attualmente sono in corso di sperimentazione

nuovissimi fluorocromi, che aiutano a risolvere il problema tipico dell'imaging ottico, cioè la bassa penetrazione tissutale della luce emessa dalle sonde (10). Infatti molecole che emettono luce nel vicino infrarosso (NIR, Near Infrared) come derivati delle cianine, consentono di raggiungere una maggiore penetrazione energetica attraverso i tessuti e di ridurre anche i problemi di autofluorescenza emessa dai distretti vicini al punto di interesse. Recentemente sono stati sviluppati anche fluorocromi NIR, attivati da specifiche proteasi selettivamente presenti nella sede del bersaglio, così da aumentare la specificità del segnale e diminuire il rumore di fondo. A questo riguardo sono stati condotti alcuni studi che dimostrano le potenzialità di questa applicazione nel rivelare l'espressione proteica e l'attività enzimatica in alcuni tumori in vivo (18).

In merito all'imaging di PET e SPECT i processi cellulari che possono essere studiati attraverso sonde radiomarcate si riferiscono soprattutto a proliferazione, apoptosi, angiogenesi, cascate metaboliche, farmacoresistenza, meccanismi di trasduzione del segnale ed espressione genica. Attualmente tra le sonde radiomarcate, uno dei composti maggiormente impiegati è rappresentato dal ^{18}F -FDG (2-deossi-2- ^{18}F fluoro-D-glucosio). Esso è un analogo del glucosio che è maggiormente captato da cellule con un'elevata attività glicolitica, caratteristica tipica delle cellule tumorali maligne. Questo radiofarmaco è entrato nella pratica clinica e viene utilizzato nella diagnosi stadiazione e monitoraggio della risposta terapeutica di una moltitudine di neoplasie (2,19). Negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi agenti che possono monitorare più specificamente la proliferazione neoplastica. Un esempio di questa

classe di composti sono i nucleosidi analoghi della timidina. Alcuni di questi composti sono stati da poco saggiati in studi clinici (2). La stessa timidina, marcata con ^{11}C e ^{18}F , è stata impiegata per caratterizzare tumori umani e come agente indicatore dell'inibizione della timidilato sintetasi, dopo trattamento farmacologico (20). Sono stati sviluppati anche altri analoghi di nucleosidi marcati con ^{18}F , come la ^{18}F -FMAU [1-(2'-[^{18}F]fluoro-2'-deossi- β -D-arabinofuranosil)timina] e la ^{18}F -FLT (3'-deossi-3'-[^{18}F]fluorotimidina). La ^{18}F -FLT è un substrato della timidino chinasi e viene trattenuta all'interno della cellula dopo fosforilazione. Questo tracciante trova grande applicazione nel valutare la risposta alla terapia ed in alcuni casi risulta essere più accurato rispetto al ^{18}F -FDG (21). Attualmente per studi metabolici e funzionali in oncologia sono in fase di sperimentazione anche altre sonde radiomarcate, come la ^{11}C -metionina e la ^{11}C -Colina.

Da qualche anno, sono stati sviluppati anche dei traccianti per l'imaging dei processi di morte cellulare, come l'apoptosi. La maggior parte di questi traccianti si basa sulla molecola di AnnessinaV, che si lega con alta affinità alla fosfatidilserina, un fosfolipide di membrana marker dell'inizio del processo apoptotico. L'annessina V è stata marcata sia con nuclidi gamma emettitori che positroni emettitori. Tra tutti i composti quelli sicuramente più studiati sono stati la $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N₂S₂-AnnessinaV e la $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Hynic-AnnessinaV (22). I mitocondri giocano un ruolo fondamentale nel processo di apoptosi e possono potenzialmente fungere da bersaglio per l'imaging di questo processo biologico. Nel presente studio ci siamo proposti di usare cationi lipofilici che si

localizzano a livello mitocondriale per visualizzare mediante microSPECT le variazioni di captazione indotte dal trattamento con inibitori di tirosin chinasi in un modello animale di carcinoma della mammella.

Meccanismi molecolari del processo di apoptosi

L'apoptosi si definisce come la morte cellulare programmata ed è un meccanismo finemente regolato che determina la morte selettiva di determinate cellule e la loro silenziosa eliminazione dal tessuto senza innescare una risposta infiammatoria. Una serie di processi fisiologici che normalmente si compiono nel nostro organismo come la riparazione di ferite, il mantenimento dell'omeostasi tissutale e la regolazione di funzioni del sistema immunitario dipendono da un'efficiente apoptosi (23). Questo processo può inoltre, essere attivato da diversi tipi di stimoli come stress provocato da radicali dell'ossigeno e dal perossido di idrogeno, danni apportati da farmaci al DNA, tossine, esposizione a radiazioni, deprivazione di fattori di crescita o nutrienti e stimolazione con citochine della famiglia del TNF (Tumor Necrosis Factor). In oncologia, la maggior parte dei farmaci antitumorali risulta mortale per la cellula in quanto attivano il processo di apoptosi. Quei tumori che non sono capaci di attivare la macchina apoptotica in risposta ad un segnale citotossico sono infatti potenzialmente resistenti alla terapia. Invece un incremento precoce di cellule che vanno incontro ad apoptosi dopo la somministrazione di un farmaco potrebbe essere indicativo di una buona risposta finale al trattamento. Sono stati individuati tre "pathways" che mediano

l'apoptosi (Fig. 1), il primo comporta l'innescò di un segnale attraverso recettori di morte presenti sulla membrana cellulare, il secondo vede coinvolto il mitocondrio ed il terzo di recentissima introduzione, è mediato dal reticolo endoplasmatico (24). Nel primo caso ligandi della famiglia del TNF, come Fas, TNF (Tumor Necrosis Factor) e TRAIL (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand) si legano a recettori di membrana che agiscono come trasduttori del segnale di morte. A seguito dell'interazione ligando-recettore di morte si assiste all'assemblaggio del complesso multiproteico detto DISC (Death Induced Signaling Complex). Esso attiva la caspasi 8 che promuove poi l'attivazione delle caspasi 3,6 o 7, che a loro volta agiscono su specifici substrati cellulari dando il via a tutta la serie di processi che caratterizzano l'apoptosi. Le caspasi sono una famiglia di cistein proteasi che agiscono su diversi substrati, tagliando in corrispondenza di sequenze contenenti residui di acido aspartico (23, 25). Il secondo tipo di pathway apoptotico è mediato dal mitocondrio. Quando stimoli apoptotici raggiungono il mitocondrio si osserva un aumento della permeabilizzazione della membrana mitocondriale, il rilascio del citocromo c e di altre molecole proapoptotiche nel citosol. Il citocromo c in presenza di ATP forma un complesso proteico insieme all'APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) e la caspasi 9 viene attivata. Questo complesso è detto apoptosoma e può reclutare fino a sette dimeri di caspasi 9 (26) e determinare l'attivazione delle caspasi 3,6 o 7.

Questa cascata di eventi è sotto il controllo della famiglia di proteine Bcl-2 che possono essere divise in tre principali gruppi. Il criterio di suddivisione fa riferimento al loro ruolo nell'apoptosi ed al numero di domini BH (Bcl-2 homology domains)

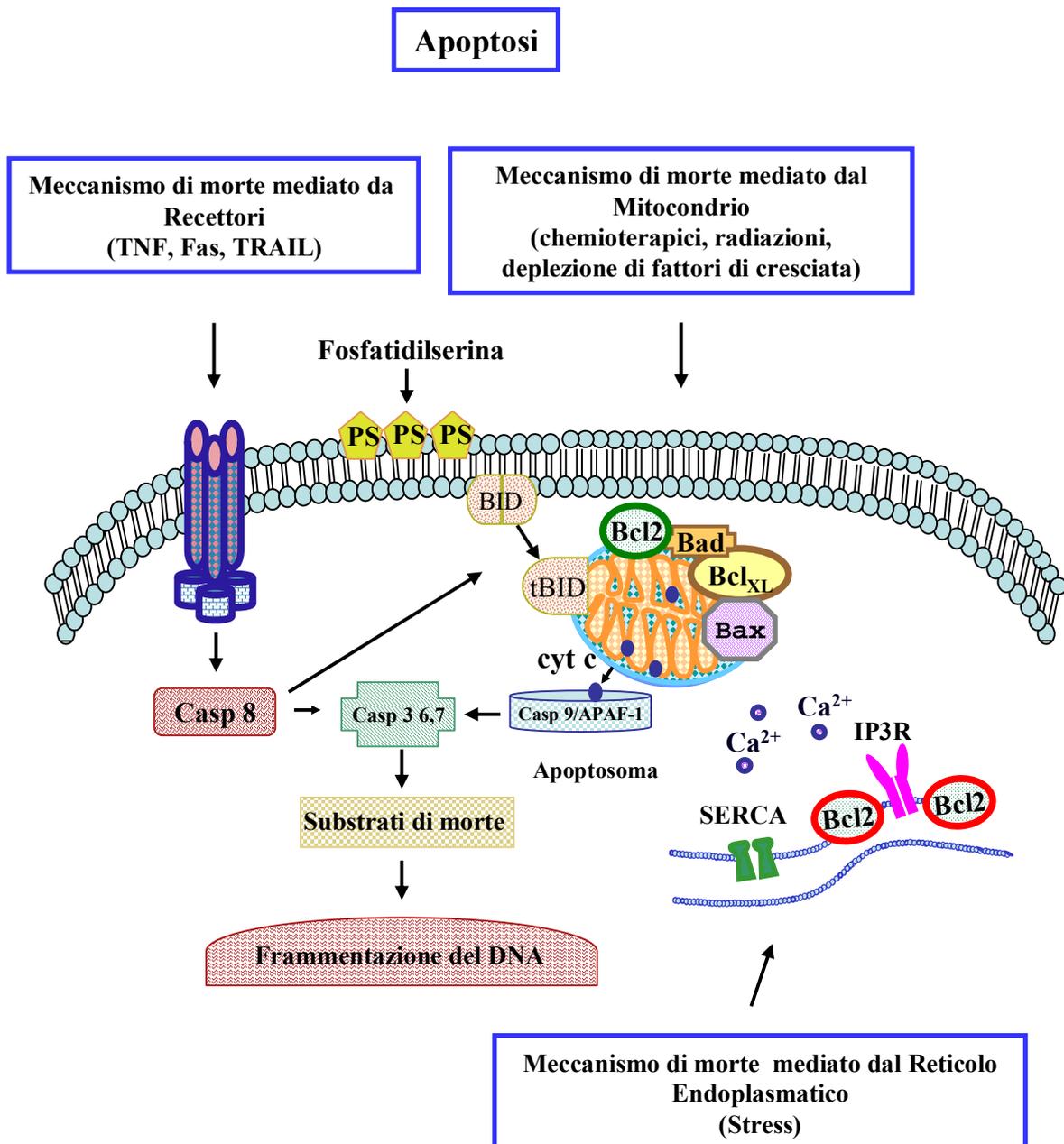


Figura 1. Eventi cellulari scatenati secondo le tre possibili vie dell'apoptosi: meccanismo mediato da recettori di morte, meccanismo mediato da mitocondrio, meccanismo mediato dal reticolo endoplasmatico

presenti nella loro molecola. Infatti, si distinguono: fattori antiapoptotici che contengono 4 domini BH, come Bcl-2 e Bcl-xL (BH1-BH4), fattori proapoptotici che contengono 3 domini BH come Bax e Bak ed infine fattori che contengono un solo dominio BH come Bad e Bid (BH3 only proapoptotic protein) (26). Tutte queste molecole insieme giocano un ruolo fondamentale per la regolazione della permeabilizzazione della membrana mitocondriale, step decisivo per il rilascio del citocromo c e ritenuto punto di non ritorno dell'apoptosi.

In seguito a stimoli proapoptotici, Bax che normalmente è presente nel citosol subisce cambiamenti conformazionali e trasloca dal citosol al mitocondrio formando oligomeri e canali permeabili nella membrana. Bcl-2 e Bcl-xL, che sono due proteine della membrana mitocondriale, interagiscono per contrastare l'attività proapoptotica di Bax. A questo punto della cascata, può intervenire la proteina Bad, che dopo essere stata fosforilata da chinasi come Akt e MAP si associa alla proteina 14-3-3 nel citosol. Durante l'apoptosi Bad viene defosforilato e trasloca dal citosol al mitocondrio dove si lega a Bcl-xL e Bcl-2 inibendo la loro attività di repressione di morte (26-27). La proteina Bcl-2 sembra legarsi anche al poro di transizione PTP (Permeability Transition Pore), da cui dipende il grado di permeabilità della membrana mitocondriale. Questo poro è un complesso multiproteico presente nella membrana dell'organello, il cui stato di attivazione viene regolato dai potenziali elettrici e dalla concentrazione dello ione calcio (28).

Un punto di connessione tra i meccanismi mitocondrio mediato e recettore mediato, fin qui descritti, è rappresentato dall'attivazione proteolitica di Bid. Tale attivazione è

mediata dalla caspasi 8 ed è seguita poi dalla traslocazione al mitocondrio del frammento C-terminale di Bid (29).

Da recentissimi studi è emerso che, oltre al mitocondrio, anche il reticolo endoplasmatico (RE) sembra rivestire un importante ruolo durante la cascata apoptotica. Infatti, questo organello svolge un ruolo chiave in molti meccanismi pro ed anti apoptotici in seguito a situazioni di stress cellulare. A questo riguardo la sua funzione di vescicola come riserva di calcio è particolarmente significativa. La membrana del reticolo endoplasmatico è caratterizzata dall'espressione di diversi canali, con diverse funzioni sul controllo dell'omeostasi del calcio. Tra questi distinguiamo: la pompa ATP dipendente SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{++} ATPase), che accumula il calcio all'interno del lume dell'organello e recettori dell'1,4,5-Inositolo-Trifosfato (IP3Rs) che invece espellono il calcio all'esterno. Lo stato di attivazione dei recettori IP3R dipende dalla loro fosforilazione da parte di diverse chinasi, tra cui la Protein Chinasi A (PKA), la Protein Chinasi C (PKC) e la Protein Chinasi II Ca^{++} /Calmodulina dipendente (30). Durante l'apoptosi il reticolo ed il mitocondrio sembrano interagire strettamente, soprattutto attraverso le proteine della famiglia di Bcl-2. I segnali apoptotici sono spesso propagati dal citosol agli organelli cellulari attraverso la traslocazione di queste proteine al mitocondrio o al reticolo, dove iniziano la loro funzione pro o anti apoptotica. Si assiste infatti ad un'espressione di Bcl-xL anche sulla membrana del RE ed ad una traslocazione di Bax e Bim dal citosol al reticolo endoplasmatico. Inoltre, in seguito a stimoli di stress il rilascio da parte del reticolo del calcio conservato, determina un aumento della

concentrazione del calcio citoplasmatico. Questo step potrebbe attivare enzimi citosolici che, oltre a controllare la distribuzione e la funzione delle proteine Bcl-2 a livello mitocondriale, determinano un aumento della permeabilizzazione della membrana attraverso l'attivazione del PTP (28). La proteina antiapoptotica Bcl-2 è un elemento cruciale nella trasmissione di segnali tra i due organelli in questione, infatti oltre ad essere una proteina integrale della membrana mitocondriale si localizza anche a livello del reticolo endoplasmatico.

L'attività di Bcl-2 è stata associata fin dalla sua scoperta, alla tumorigenesi. Il gene Bcl-2 (gene 2 del linfoma a cellule B) è stato identificato per la prima volta come il frutto della traslocazione sul cromosoma 18 nell'85% dei casi di linfoma follicolare. L'alta espressione di questa proteina in diversi tumori supporta l'idea che essa possa inibire la morte di cellule che normalmente sarebbero soppresse a causa di mutazioni ed alterazioni genetiche. Infatti l'attività oncogenica di Bcl-2 inibisce anche l'attività apoptotica di p53, il gene guardiano del genoma, importante per il mantenimento della stabilità genetica a livello cellulare. Questo fa sì che una cellula inizialmente sana possa accumulare mutazione dopo mutazione senza morire e procedere indisturbata nella sua trasformazione neoplastica (31).

Molte chinasi come Raf-1, PKC (Protein chinasi C) e PKA (Protein chinasi A) possono fosforilare Bcl-2 su specifici residui della sua sequenza come la serina 70. In alcuni sistemi è stata attribuita a questa fosforilazione un'inattivazione della funzione proteica, mentre in altri un'attivazione della stessa. La forma fosforilata di Bcl-2 si localizza prevalentemente al RE (32) dove essa sembra interagire fisicamente con i

recettori IP3R I e III e controllare in modo diretto o indiretto il suo stato di fosforilazione ed il rilascio di calcio attraverso questo canale (33-34). Inoltre sembra che Bcl-2 possa anche interagire con la calcineurina, una fosfatasi che probabilmente presenta come suo substrato anche i recettori per IP3 (Inositolo-3-Fosfato) (33). Tuttavia, sebbene non sia ancora noto quale sia l'esatto ruolo di Bcl-2 nel meccanismo di regolazione dell'attività di IP3R, resta l'evidenza dell'importanza di questa interazione per i meccanismi di rilascio del calcio, trasmissione di segnali al mitocondrio e controllo dell'apoptosi. Il meccanismo di morte mediato dal reticolo endoplasmatico può indurre apoptosi anche mediante attivazione della caspasi 12. La caspasi 12, identificata in modelli murini, risponde a questo stimolo senza coinvolgere il mitocondrio ma attivando le caspasi 3,6,7. L'importanza di questo meccanismo è oggetto di discussione dal momento che non è ancora noto con certezza se questo enzima esista nella specie umana. Di recente è stata identificata al reticolo endoplasmatico anche la proteina Bap31, la cui attivazione durante l'apoptosi, sembra essere mediata dalla caspasi 8 che determina la formazione del frammento apoptotico P20, il quale può indurre rilascio di calcio dal reticolo (28).

Durante l'apoptosi, indipendentemente da quale pathway apoptotico sia attivato come risposta a stimoli di morte, la fase che vede coinvolta l'attivazione di caspasi come quella 8 oppure 9 viene denominata di attivazione, mentre quella successiva che vede coinvolta le caspasi esecutrici 3,6,7, viene definita di esecuzione. Durante questa fase le caspasi 3,6,7 sono attivate ed agiscono su substrati di morte che presiedono a tutti quei cambiamenti morfologici e biochimici tipici di una cellula in apoptosi.

Inizialmente si assiste alla condensazione della cromatina e contrazione del nucleo. Successivamente l'attivazione di fattori come DNase, CAD (Caspase activated deoxyribonuclease) ed ICAD (DNA fragmentation factor) causa il rilascio di endonucleasi che determinano la frammentazione del DNA. Successivamente si assiste alla contrazione del citoplasma, al rigonfiamento della membrana plasmatica ed all'esposizione sulla sua superficie esterna del fosfolipide fosfatidilserina. Nella fase ultima di degradazione dell'apoptosi, si assiste alla formazione dei corpi apoptotici, ovvero di vescicole di dimensione e composizione diversa contenenti frammenti nucleari ed organelli citoplasmatici, che vengono poi velocemente fagocitati dalle cellule vicine, come i macrofagi e degradati dai lisosomi (29).

BASE DELLA RICERCA SCIENTIFICA E SCOPO DEL LAVORO

Nel presente studio è stato impiegato il ^{99m}Tc -MIBI (^{99m}Tc -Metossi-Isobutil-Isonitrile) per visualizzare gli eventi conseguenti all'esposizione di cellule all'azione di inibitori delle tirosin chinasi. In oncologia, il ^{99m}Tc -MIBI è un tracciante comunemente impiegato nella pratica clinica, per la diagnosi di molti tumori come il carcinoma della mammella, le neoplasie polmonari, il mieloma ed il linfoma. Esso è un catione lipofilo monovalente, che diffonde passivamente all'interno della cellula in risposta ai potenziali negativi di membrana e si accumula nel mitocondrio in maniera reversibile. Sebbene l'uptake preferenziale di questo tracciante nelle lesioni tumorali è stato messo in relazione con la proliferazione cellulare, la densità mitocondriale, la neoangiogenesi (35), l'incremento del metabolismo ed aumentata cellularità, nessuna dimostrazione conclusiva dell'importanza di questi fattori è stata riportata in letteratura.

Un'altra caratteristica del ^{99m}Tc -MIBI è la sua capacità di interagire con la P-glicoproteina (Pgp). Essa è una proteina di membrana ATP dipendente responsabile dell'espulsione di sostanze tossiche dal compartimento intracellulare ed è fisiologicamente espressa nel fegato, nei reni ed in cellule epiteliali del tratto gastrointestinale. Elevati livelli di Pgp sono stati anche ritrovati in molti carcinomi e sono ritenuti responsabili della farmacoresistenza di questi tumori. Infatti diversi agenti chemioterapici come alcaloidi della vinca, taxani ed antracicline, analogamente

al ^{99m}Tc -MIBI sono substrati di questa pompa e possono essere espulsi dal compartimento intracellulare riducendo il loro potenziale citotossico. Studi precedenti del laboratorio ospitante, hanno infatti dimostrato che l'aumentato efflusso del ^{99m}Tc -MIBI da carcinomi della mammella si associava a mancata risposta alla chemioterapia con epidoxorubicina (36). Inoltre nel corso di questi studi è stato osservato che la mancata captazione del tracciante in lesioni maligne della mammella non si associava costantemente ad elevati livelli della Pgp. Ciò ha portato ad ipotizzare che l'assenza di captazione del tracciante non fosse legata ad un rapidissimo efflusso ad opera della Pgp ma fosse determinato da altri meccanismi molecolari indipendenti dall'espressione e stato funzionale della Pgp.

Per questi motivi è stato intrapreso uno studio che valutasse l'espressione di diverse proteine a livello mitocondriale che potesse in qualche modo influenzare l'accumulo del radiocomposto in questi organelli. Questo studio ha dimostrato che carcinomi della mammella negativi all'esame con ^{99m}Tc -MIBI avevano un'elevatissima espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2 (37). Elevati livelli di questa proteina rendevano quindi la membrana mitocondriale impermeabile al catione lipofilico. Per dimostrare un rapporto di causa effetto tra espressione di Bcl-2 e ridotto uptake del ^{99m}Tc -MIBI, sistemi cellulari di carcinoma della mammella sono stati trasfettati con il plasmide codificante per l'espressione della proteina Bcl-2 (38). I cloni iperespressanti la proteina Bcl-2 mostravano una drastica riduzione dell'uptake di ^{99m}Tc -MIBI, confermando il ruolo chiave della proteina Bcl-2 nell'inibire l'uptake del radiocomposto. Nell'ambito di questi esperimenti è stata fatta un'osservazione

interessante e cioè che quando le cellule con elevati livelli di Bcl-2 venivano esposte all'azione della Staurosporina, la loro capacità di accumulare il ^{99m}Tc -MIBI veniva ripristinata (Fig 2). La Staurosporina è un potente induttore di apoptosi, ma anche un inibitore di protein chinasi ad attività piuttosto aspecifica. Queste osservazioni hanno suggerito l'idea di poter saggiare l'effetto sulla captazione del ^{99m}Tc -MIBI di altri inibitori di chinasi più specifici, come il Gefitinib.

Il Gefitinib è una molecola a nucleo anilinochinazolinico che compete con l'ATP per il legame al dominio catalitico del recettore dell'EGF (EGFR). L'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) è una glicoproteina di membrana con attività tirosin chinasi, che regola processi di proliferazione e differenziazione delle cellule epidermiche. Nei tumori solidi umani l'iperespressione o l'iperattivazione dell'EGFR promuove la crescita cellulare ed è associata a cattiva prognosi ed alta aggressività tumorale. Il Gefitinib è stata sviluppata come molecola inibitrice dell'EGFR, infatti essa ne impedisce la sua autofosforilazione ed il successivo innesco della cascata intracellulare (39). Tutto questo comporta la deregolazione di molti processi come proliferazione, sopravvivenza, migrazione ed adesione cellulare. E' noto inoltre, che questo farmaco è nato come una molecola selettiva verso il suo target, ma di recente, sono state identificate più di 20 protein chinasi come altri possibili bersagli, oltre all'EGFR. Tra queste ritroviamo la protein chinasi II Ca^{++} /Calmodulina dipendente, BRK (breast tumor kinase) e RICK (la Rip-like interacting caspases-like apoptosis-regulatory proteinkinase) (40).

In studi preclinici, il Gefitinib ha mostrato un'attività antitumorale in una varietà di

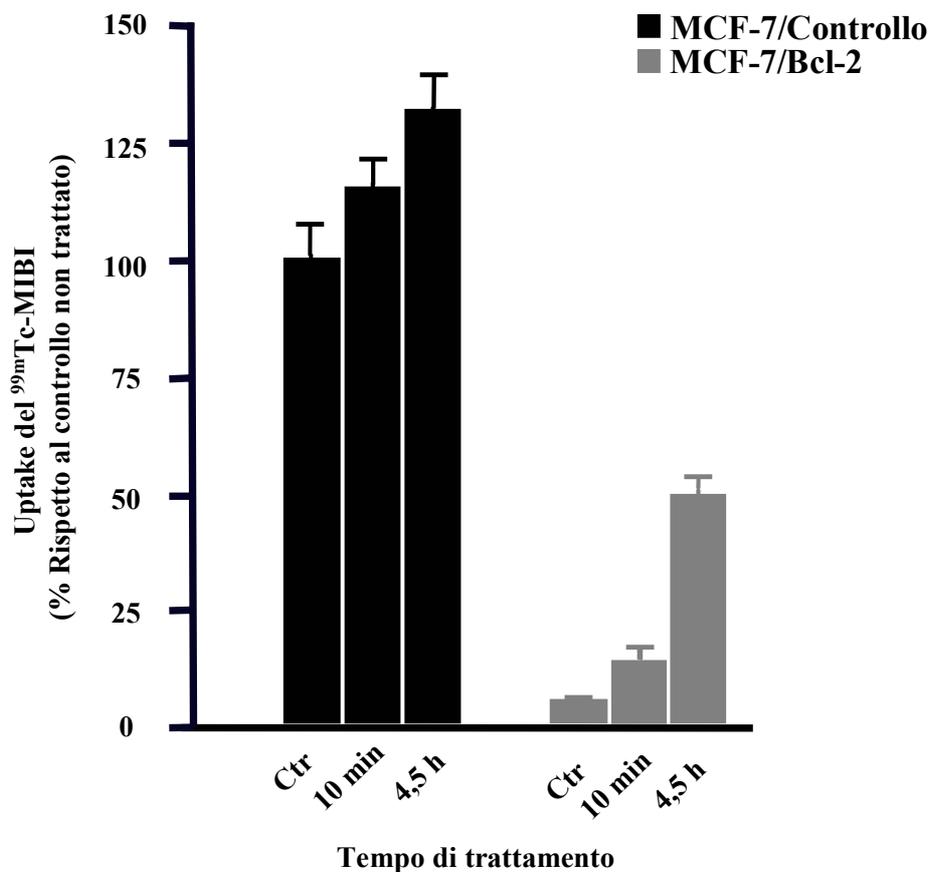


Figura 2. Captazione del ^{99m}Tc -MIBI in cellule di carcinoma della mammella iperesprimenti Bcl-2 a confronto con le cellule parentali dopo trattamento con Staurosporina 1,5 μM .

E' possibile osservare come l'iperpressione della proteina Bcl-2 determini nelle cellule MCF-7/Bcl-2 una drammatica riduzione della captazione del ^{99m}Tc -MIBI, rispetto alle cellule di controllo. Si può inoltre notare, come il trattamento mediante Staurosporina possa revertire parzialmente questo effetto dopo 4,5 h. L'incremento indotto, dal trattamento sulla captazione del ^{99m}Tc -MIBI, è rilevabile anche nelle cellule di controllo, anche se di entità minore rispetto alle cellule MCF-7/Bcl-2. I risultati sono espressi come % di uptake del ^{99m}Tc -MIBI per mg di proteina, considerando come 100% le cellule di controllo non trattate (*Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:521-527).

tumori, compreso il carcinoma del polmone, della mammella, dell'ovaio, del colon e del distretto testa-collo (41-42). In modo analogo ad altri inibitori dell'EGFR, questo farmaco, contribuisce a rafforzare in modo sinergico l'effetto citotossico dei comuni farmaci antitumorali, indipendentemente dai livelli di EGFR (43).

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la relazione tra gli eventi molecolari intracellulari scatenati dal Gefitinib e le successive variazioni di accumulo del ^{99m}Tc -MIBI registrate e se queste variazioni di captazione potessero essere utilizzate per visualizzare la risposta al trattamento con questo farmaco.

MATERIALI E METODI

Linee cellulari e trattamento

Linee cellulari umane di carcinoma della mammella: T47D, MDA-MB-231, MCF-7 e MCF7-Adr (Adriamicina resistenti), di carcinoma del polmone non a piccole cellule A549 e SKLU-1, di carcinoma della prostata PC3 e di carcinoma epidermoide A431 sono state coltivate in DMEM (Gibco Life Technologies, Italia Srl), contenente siero fetale bovino (FBS) al 10%, in presenza di 100 IU/ml di Penicillina e di 50 µg/ml di Streptomicina e tenute in incubatore a 37 °C al 5% di CO₂. Le cellule di carcinoma della mammella T47D sono state stabilmente trasfettate con il plasmide contenente l'intera sequenza del cDNA del gene umano di Bcl-2 ed il frammento pSV2neo che contiene il gene di resistenza alla neomicina (T47D/Bcl-2). Le cellule di controllo sono state trasfettate solo con il plasmide pSV2neo (T47D/Neo).

Le cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2 sono state trattate con concentrazioni crescenti di Gefitinib (Biaffin GmbH & CoKG) tra 0,5 e 20 µM per diversi tempi di incubazione (30 minuti, 1 h, 3 h, 5 h). Esperimenti analoghi di dose-risposta sono stati condotti sulle stesse cellule per 1 h con altri inibitori di chinasi, tra cui: inibitori di tirosin-chinasi peraltro già in uso in diversi studi clinici come Imatinib, Erlotinib, Sorafenib e Sunitinb (Biaffin GmbH & CoKG); inibitori delle MAP chinasi come SB203580, UO126 e PD98059 (Calbiochem) e con inibitori della famiglia delle Src chinasi come PP2, Genisteina ed Erbimicina (Calbiochem).

Le cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2, sono state anche trattate per 10 min con diverse concentrazioni di Tapsigargina (Sigma), un inibitore specifico della SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum ATPase Pump), un pompa per il Ca^{++} ATP dipendente presente sul reticolo endoplasmatico. Infine tutte le altre linee cellulari sono state esposte all'azione del Gefitinib 20 μM per 1 h.

Preparazione di lisati cellulari totali e di organelli cellulari

Le cellule adese alla piastra ad uno stato di confluenza di circa il 90%, dopo essere state lasciate in mezzo senza siero per 18 h, sono state trattate con le diverse sostanze (EGF 10 nM e Gefitinib 20 μM) per i diversi tempi. Le cellule dopo essere state lavate mediante PBS e rimosse dalle piastre, sono state centrifugate a 800 g per 10 minuti a 4°C. Dopo la rimozione del sopranatante le cellule sono state risospese in un tampone di lisi contenente EDTA 1 mM, Triton X allo 0,2% ed inibitori di proteasi e fosfatasi e sono state lisate mediante molti passaggi attraverso l'ago di una siringa da insulina.

Per la preparazione degli organelli cellulari, circa 30×10^6 di cellule sono state raccolte dalla piastra e sono state centrifugate a 800 g a 4°C. Il pellet è stato risospeso in un tampone contenente saccarosio e dopo molti passaggi attraverso l'ago di una siringa da insulina, la sospensione è stata centrifugata a 800 g per 10 minuti a 4°C. Il sopranatante recuperato, è stato poi centrifugato ad 8000 g per 10 minuti a 4°C ed il pellet ottenuto, costituito dai mitocondri è stato risospeso in un volume adeguato di tampone, aliquotato e conservato a -20°C. Il sopranatante invece, è stato recuperato e

sottoposto ad ultracentrifugazione per 1 h e 30 minuti. Il pellet così ottenuto rappresentava il reticolo endoplasmatico mentre il soprannatante rappresentava il citosol. Tutti i campioni sono stati analizzati per il loro contenuto proteico utilizzando il metodo Bradford (Biorad).

Immunoprecipitazione

I lisati cellulari totali, (circa 1 mg) sono stati incubati con 4 µg/mg di anticorpi monoclonali anti-IP3R3 ed anti-Bcl-2 e lasciati in agitazione per 18 h a 4°C. I campioni sono stati poi aggiunti alla Proteina A (Ezview Red protein A affinity, Sigma) e lasciati a 4°C in lenta agitazione per 2 h. I complessi così ottenuti sono stati lavati per diverse volte con tampone e successivamente analizzati mediante western blotting.

Western Blotting

I campioni proteici ottenuti dalle diverse preparazioni sono stati bolliti per pochi minuti in presenza di un agente riducente e sono stati successivamente caricati su un gel ad una percentuale di acrilammide diversa a seconda del peso molecolare della proteina da analizzare. Successivamente le proteine sono state trasferite su di una membrana di PVDF (Polivinilidene fluoruro) e l'efficienza del loro trasferimento è stata valutata mediante la colorazione con Rosso Ponceau (Sigma). Per attenuare le

aspecificità di segnale, le membrane sono state incubate prima con latte (Biorad) al 5%, per 45 minuti a temperatura ambiente e successivamente con l'anticorpo primario di interesse, per 1 h a temperatura ambiente. Dopo diversi lavaggi con il tampone TBS/Tween-20, è stato aggiunto l'appropriato anticorpo secondario legato all'enzima perossidasi (Amersham Bioscience) ed il segnale è stato rilevato mediante chemiluminescenza (ECL Kit, Amersham Bioscience).

Per questo studio sono stati impiegati i seguenti anticorpi: anti-EGFR (SantaCruz Biotechnology), anti-EGFR fosforilato (Cell Signaling), anti-Pgp (C219, Signet), anti-Bcl-2 (Cell Signaling), anti-IP3R-3 (BD, Biosciences Pharmigen), anti-Actina (Sigma), anti-Calnexina (Stressgen Biotechnologies), anti-P-Bcl2 (Cell Signaling), anti-Calcineurina (BD Biosciences).

Saggi di captazione del ^{99m}Tc -MIBI sulle linee cellulari dopo trattamento con inibitori di chinasi

I saggi di captazione con ^{99m}Tc -MIBI, sono stati condotti su 4×10^5 cellule al 90% di confluenza. Dopo il trattamento con i diversi inibitori di chinasi le cellule sono state incubate con 1 μCi di ^{99m}Tc -MIBI per 1 h a 37°C . Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate con PBS, per rimuovere la radioattività non incorporata e lisate con NaOH 1M. Successivamente i campioni sono stati misurati al γ -counter (Wallac Oy, Turku, Finland). Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati per la quantità di radioattività iniziale e per il contenuto di proteine. Il contenuto proteico di

ogni campione è stato determinato mediante il metodo Bradford.

Allestimento di un modello animale per studi in vivo

Per questo studio sono stati impiegati topi maschi Balb/c nudi (nu/nu) di circa 5 settimane. Questi animali essendo topi immunosoppressi, rappresentano un buon modello per la crescita e lo sviluppo di un tumore. Le cellule T47D di carcinoma della mammella, risospese in 200 μ l di DMEM, sono state inoculate sottocute nel fianco destro (T47D/Neo) e sinistro (T47D/Bcl-2) degli animali. Dopo circa due settimane dall'inoculo, quando i tumori si sono sviluppati ed hanno raggiunto una grandezza compresa tra i 0,3 e 1 cm di diametro, gli animali sono stati utilizzati per gli studi di imaging.

Imaging mediante microSPECT e ^{99m}Tc -MIBI

Per gli esperimenti di imaging, sono stati iniettati nella vena caudale degli animali 10 mCi di ^{99m}Tc -MIBI e dopo circa 1 h, gli stessi animali anestetizzati con Avertin 2,5% (Sigma), sono stati sottoposti a scan mediante microSPECT (YAP(S)PET; ISE, Pisa, Italia). Questo strumento è costituito da quattro rivelatori rotanti equipaggiati con collimatori ad alta risoluzione a fori paralleli. Le immagini tomografiche sono state ottenute mediante l'acquisizione di 128 proiezioni su un angolo di 180°, seguita da una ricostruzione iterativa. Il campo di vista è di 4x4 cm, da cui si ottengono 20 sezioni transassiali, ciascuna dello spessore di 2 mm. Prima dell'inizio delle acquisizioni delle

immagini, l'animale oggetto di studio viene posto sul lettino della macchina, con i tumori al centro del campo di vista, che corrisponde all'incrocio di due laser visibili. Ciascun animale è stato sottoposto ad esame con microSPECT sia prima del trattamento che dopo trattamento con Gefitinib. Il farmaco in polvere, è stato risospeso in 100 µl di carbossimetilcellulosa allo 0,5% e somministrato per via orale tramite un sondino. La carbossimetilcellulosa è stata impiegata come veicolo per creare una sospensione del farmaco più omogenea e migliorare l'efficienza della somministrazione. Al termine del trattamento con il Gefitinib, gli animali hanno ricevuto la stessa dose di ^{99m}Tc -MIBI (10 mCi) somministrata per l'esame pre-trattamento ed è stata eseguita una seconda microSPECT usando gli stessi parametri descritti precedentemente.

Studi di Biodistribuzione

Gli animali dopo essere stati sottoposti allo studio di imaging, sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale e sottoposti al prelievo di sangue, organi e tumori per valutare la biodistribuzione del radiotracciante nei diversi distretti anatomici. I tessuti prelevati sono stati pesati e poi contati al γ -counter per la determinazione della captazione di ^{99m}Tc -MIBI. I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto alla dose iniettata e rispetto al peso in grammi del tessuto (%ID/g).

RISULTATI

Caratterizzazione delle cellule di carcinoma di mammella trasfettate con il gene umano Bcl-2

In questo lavoro, cellule di carcinoma umano della mammella T47D iperesprimenti Bcl-2 (T47D/Bcl-2) e le corrispondenti cellule di controllo (T47D/Neo), hanno costituito il sistema scelto come modello di studio per valutare l'effetto generato dal Gefitinib sulla captazione del ^{99m}Tc -MIBI e gli eventi molecolari connessi. Le cellule T47D dopo essere state trasfettate con il gene umano per Bcl-2 sono state caratterizzate per la sua espressione. Come si può osservare dalla Fig. 3A, la proteina Bcl-2 non è espressa nelle cellule di controllo T47D/Neo, mentre è altamente espressa e fosforilata nelle cellule trasfettate con il gene Bcl-2. Inoltre la proteina Bcl-2 risulta prevalentemente localizzata nella frazione mitocondriale ed assente nel citosol (Fig. 3 B).

Studi in vitro sulla captazione del ^{99m}Tc -MIBI nelle cellule tumorali dopo trattamento con inibitori di chinasi

Le cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2 dopo essere state trattate per 1 h con concentrazioni crescenti di Gefitinib, comprese tra 0.5 μM e 20 μM , sono state incubate per un'altra ora con il ^{99m}Tc -MIBI. Nella Fig. 4 si osserva che, le cellule iperesprimenti Bcl-2 mostrano una drammatica riduzione della captazione del ^{99m}Tc -

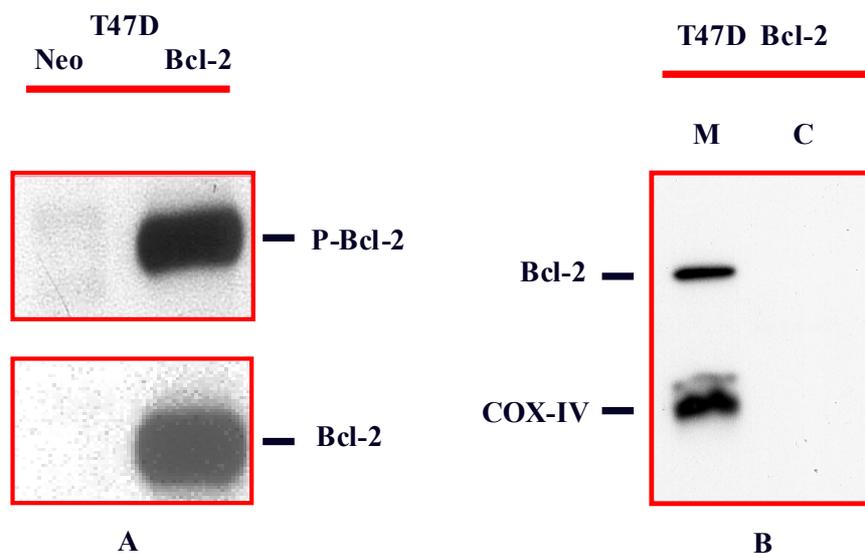


Figura 3. Caratterizzazione di cellule di carcinoma della mammella T47D trasfettate con il gene umano per la proteina anti-apoptotica Bcl-2.

A) Analisi per western blot dell'espressione di Bcl-2 e della sua forma fosforilata (P-Bcl-2) in lisati cellulari totali, preparati dalle cellule trasfettate con il gene Bcl-2 (T47D/Bcl-2) o con solo il gene della resistenza alla neomicina (T47D/Neo). Come si può osservare, l'espressione della proteina Bcl-2 si apprezza solo nelle cellule trasfettate e non in quelle di controllo

B) Analisi per western blot dell'espressione di Bcl-2 nelle frazioni citosoliche (C) e mitocondriali (M), preparate dalle cellule T47D/ Bcl-2 ed analisi dell'espressione della proteina COX-IV, marcatore della frazione mitocondriale. Questa analisi è indicativa della prevalente localizzazione mitocondriale della proteina Bcl-2 e della sua assenza nel citosol.

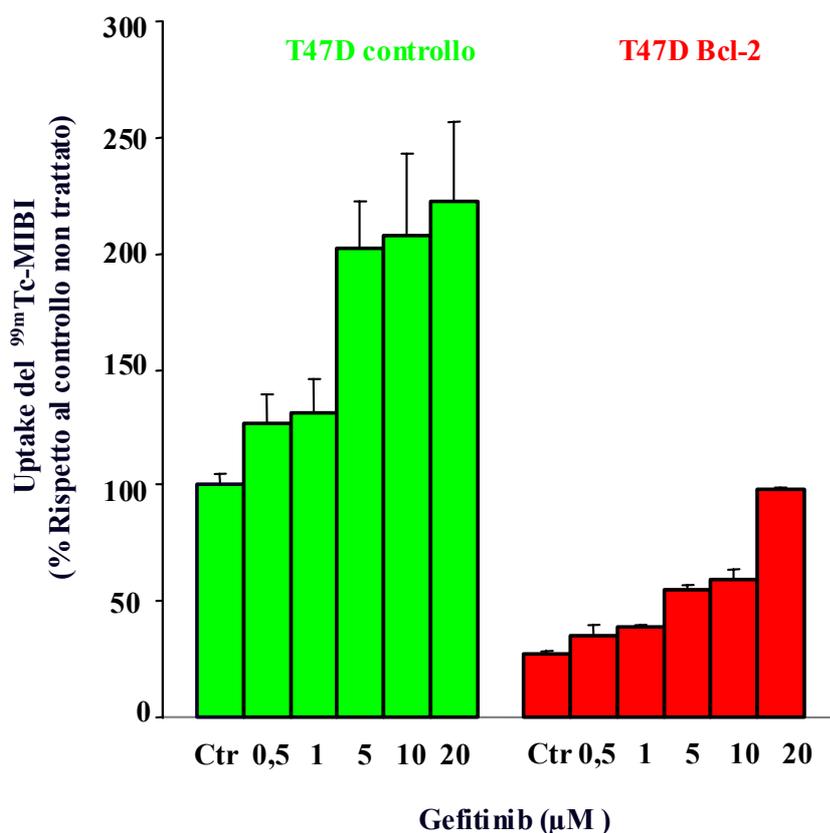


Figura 4. Captazione del ^{99m}Tc -MIBI dopo trattamento con concentrazioni crescenti di Gefitinib.

Le cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2 sono state trattate con concentrazioni crescenti di Gefitinib tra 0.5 μM e 20 μM per 1 h e messe ad incubare con ^{99m}Tc -MIBI. Le cellule dopo essere state sottoposte a lavaggi estensivi, sono state lisate e la radioattività incorporata è stata misurata al γ -counter. Alla massima concentrazione del farmaco impiegata, è possibile osservare nelle cellule T47D/Bcl-2 un incremento della captazione del tracciante di 4 volte, tale da eguagliare il valore di captazione apprezzato per le cellule di controllo non trattate. Per queste ultime si osserva alla massima concentrazione impiegata di Gefitinib, un incremento di 2 volte. I risultati sono espressi come % di uptake del ^{99m}Tc -MIBI per mg di proteina, considerando come 100% le cellule di controllo non trattate.

MIBI rispetto alle cellule di controllo. Dopo trattamento con Gefitinib si osserva invece, un incremento della captazione del tracciante di 4 volte nelle cellule T47D/Bcl-2 e di 2 volte nelle cellule T47D/Neo. Oltre ad esperimenti con concentrazioni crescenti di Gefitinib, sono stati condotti sulle stesse cellule anche saggi di captazione del ^{99m}Tc -MIBI, dopo stimolazione con Gefitinib alla concentrazione fissa di 20 μM per diversi tempi. I dati ottenuti hanno indicato che sia nelle cellule iperesprimenti Bcl-2 che in quelle di controllo, l'incremento della captazione del tracciante è stata rilevabile già dopo 30 minuti di trattamento suggerendo che gli effetti indotti dal farmaco sulla captazione del ^{99m}Tc -MIBI possono riflettere eventi molecolari Gefitinib-mediati che avvengono precocemente all'interno della cellula (Fig. 5).

Per valutare se questi eventi potessero essere indotti da altri inibitori di chinasi, le cellule sono state incubate con concentrazioni crescenti di Erlotinib, Imatinib, Sunitinib e Sorafenib. Questi inibitori sono stati saggiati sia sulle cellule Bcl-2 iperesprimenti che sulle cellule di controllo (T47D/Neo). Questi inibitori di tirosin-chinasi sono attualmente impiegati in studi clinici per il trattamento di diverse neoplasie. In Tabella 1, sono indicati i bersagli molecolari di ciascun composto e le neoplasie per cui ne è stato approvato l'uso. Tutti i farmaci sono stati saggiati nello stesso spettro di concentrazioni, compreso tra 0,5 μM e 20 μM , già utilizzato per gli studi con il Gefitinib. I risultati ottenuti hanno indicato che, con l'eccezione del Sorafenib, tutti gli inibitori hanno determinato un incremento della captazione del ^{99m}Tc -MIBI, anche se il Gefitinib è risultato essere il più attivo, soprattutto nelle

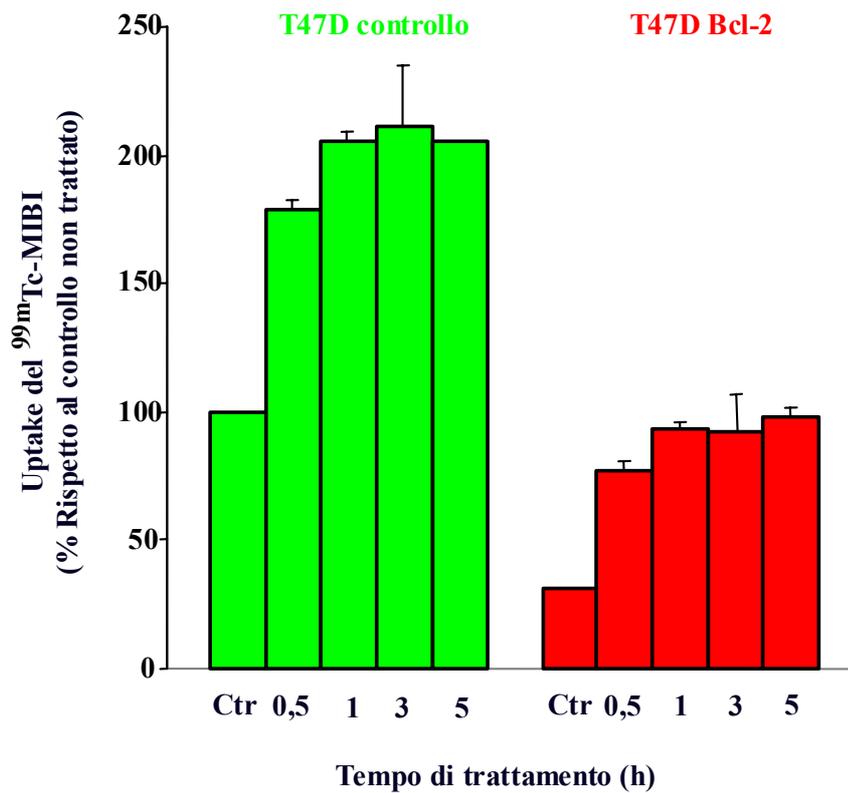


Figura 5. Captazione del ^{99m}Tc-MIBI dopo trattamento con Gefitinib 20 μ M per intervalli di tempo crescenti.

Le cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2 sono state trattate con Gefitinib 20 μ M per intervalli di tempo compresi tra 30 min e 5 h e messe ad incubare con ^{99m}Tc-MIBI per 1 h. Le cellule, dopo essere state sottoposte a lavaggi, sono state lisate e la radioattività incorporata è stata misurata al γ -counter. E' significativo l'effetto indotto dal Gefitinib sulla captazione del ^{99m}Tc-MIBI, dopo soli 30 min di trattamento. Questo effetto è evidente sia nelle cellule di controllo che in quelle T47D/Bcl-2. I risultati sono espressi come % di uptake del ^{99m}Tc-MIBI per mg di proteina, considerando come 100% le cellule di controllo non trattate.

Inibitore	Bersaglio	Impiego clinico
Gefitinib	EGFR	Approvato per NSCLC (Carcinoma del polmone non a piccole cellule)
Erlotinib	EGFR	Approvato per NSCLC (Carcinoma del polmone non a piccole cellule)
Sunitinib	VEGFR2 KIT PDGFR FLT3	Approvato per GIST e RCC (Tumore stromale gastrointestinale e Carcinoma renale)
Imatinib	BCR-ABL KIT PDGFR	Approvato per CML e GIST (Leucemia mieloide cronica e Tumore stromale gastrointestinale)
Sorafenib	VEGFR PDGFR RAF-K	Approvato per RCC (Carcinoma renale)

Tabella 1. Farmaci inibitori di tirosin-chinasi, loro bersagli in terapia ed applicazioni in clinica

cellule iperesprimenti Bcl-2 (Fig. 6). Sono stati condotti anche esperimenti con altri inibitori di chinasi, tra cui inibitori delle MAP chinasi come: SB203580, UO126 e PD98059, ed inibitori della famiglia delle Src chinasi come: PP2, Genisteina ed Erbimicina. Tutte queste ultime sostanze impiegate non hanno causato alcun significativo cambiamento della captazione del ^{99m}Tc -MIBI sia nelle cellule iperesprimenti Bcl-2 che in quelle di controllo (dati non mostrati).

La captazione del ^{99m}Tc -MIBI è stata valutata anche in altre linee cellulari tumorali dopo esposizione al Gefitinib. A questo scopo sono state utilizzate, oltre alle T47D, altre cellule di carcinoma della mammella, come le cellule MCF-7 e le cellule MDA-MB 231, cellule di carcinoma del polmone come le A549 e le SKLU-1 e cellule di carcinoma epidermoide come le A431. In tutte queste cellule, il trattamento con Gefitinib 20 μM per 1 h ha determinato un aumento della captazione del tracciante di circa 2 volte, rispetto a quello osservato nelle cellule non trattate, eccetto che nelle MCF-7 dove l'incremento è stato di circa il 30 % (Fig. 7).

Analisi delle proteine coinvolte nei cambiamenti di captazione del ^{99m}Tc -MIBI dopo trattamento con Gefitinib

Tutte le linee cellulari tumorali, impiegate in questo studio, sono state analizzate per valutare l'espressione dell'EGFR e della sua forma attiva fosforilata (P-EGFR). Come si può osservare dalla Fig. 8 le cellule analizzate presentano livelli diversi di espressione sia dell'EGFR che della sua forma fosforilata P-EGFR.

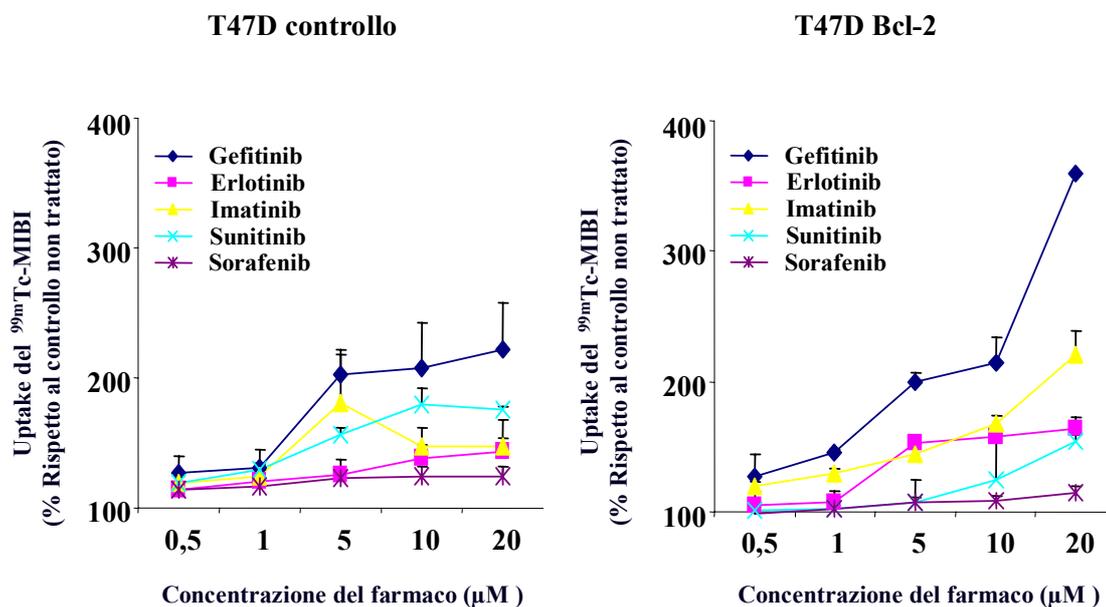


Figura 6. Effetto del trattamento con diversi inibitori di tirosin-chinasi sulla captazione del ^{99m}Tc -MIBI.

Le cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2 sono state trattate con concentrazioni crescenti di Gefitinib, Erlotinib, Sunitinib, Sorafenib ed Imatinib, per 1 h e messe ad incubare con ^{99m}Tc -MIBI. Le cellule dopo essere state sottoposte a lavaggi sono state lisate e la radioattività incorporata è stata misurata al γ -counter. Sia per le cellule di controllo che per quelle T47D/Bcl-2, si osserva come tutti gli inibitori, ad eccezione del Sorafenib, inducano un incremento della captazione del ^{99m}Tc -MIBI, e tra questi il Gefitinib è quello in grado di determinare il maggiore effetto. I risultati sono espressi come % di uptake del ^{99m}Tc -MIBI per mg di proteina, considerando come 100% le cellule di controllo non trattate.

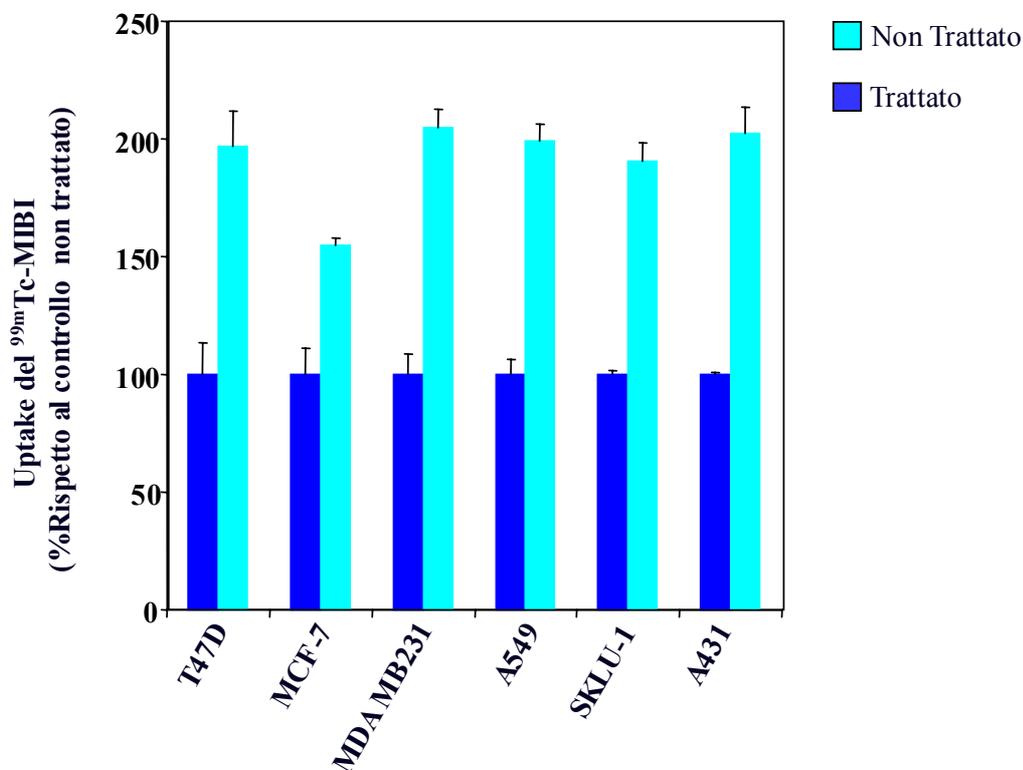


Figura 7. Effetto del trattamento con Gefitinib 20 μ M sulla captazione del ^{99m}Tc -MIBI in diverse linee cellulari tumorali.

Le cellule di carcinoma della mammella T47D, MCF-7, MDA-MB231 di carcinoma del polmone A549, SKLU-1 e di carcinoma epidermoide A431 sono state trattate con Gefitinib 20 μ M per 1 h e messe ad incubare con ^{99m}Tc -MIBI. Le cellule dopo essere state sottoposte a lavaggi sono state lisate e la radioattività incorporata è stata misurata al γ -counter. E' possibile osservare come il Gefitinib determini un'incremento della captazione del ^{99m}Tc -MIBI di circa 2 volte in tutte le linee cellulari impiegate, eccetto che le MCF-7, in cui si osserva un incremento del 30%. I risultati sono espressi come % di uptake del ^{99m}Tc -MIBI per mg di proteina, rispetto alla stessa linea cellulare non trattata.

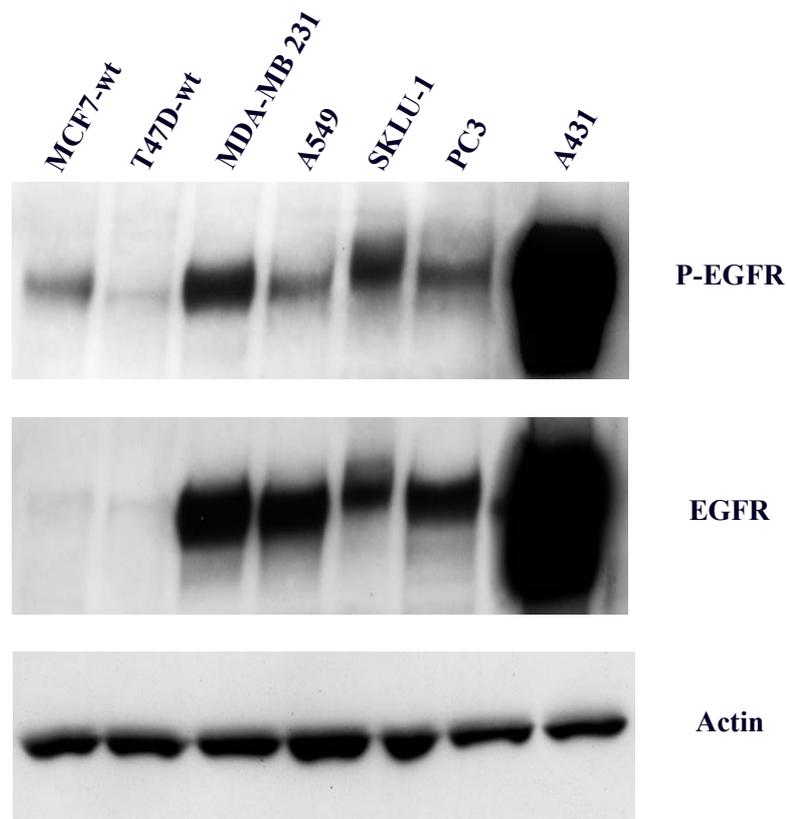


Figura 8. Analisi per western blot dell'espressione del recettore dell'EGF (EGFR) e della sua forma fosforilata (P-EGFR) nelle diverse linee cellulari tumorali.

I lisati cellulari totali preparati dalle cellule di carcinoma della mammella T47D, MCF-7, MDA-MB231, di carcinoma del polmone A549, SKLU-1, di carcinoma epidermoide A431 e di carcinoma della prostata PC3 sono stati analizzati per l'espressione del P-EGFR e dell'EGFR. I campioni sono stati analizzati anche per l'espressione dell'actina per dimostrare l'equivalenza del contenuto proteico. Da questa analisi è possibile apprezzare la diversa entità di espressione dell'EGFR e della sua forma fosforilata nelle diverse linee cellulari impiegate in questo studio.

Le cellule A431 mostrano i più alti livelli di espressione di questo recettore.

Le cellule sono state poi analizzate per il contenuto della P-glicoproteina (Pgp), che è nota essere coinvolta attivamente nell'efflusso del ^{99m}Tc -MIBI dalla cellula. Tutte le cellule esaminate sono risultate negative all'analisi per western blot. Solo le cellule MCF-7 Adriamicina-resistenti (MCF7-ADR), che rappresentano un controllo positivo, hanno mostrato alti livelli di espressione della Pgp (Fig. 9).

Come indicato da studi precedenti, l'altra proteina coinvolta nella captazione del ^{99m}Tc -MIBI è la proteina antiapoptotica Bcl-2. Nella Fig. 10, in cui le cellule T47D/Bcl-2 rappresentano il controllo positivo, è possibile osservare i livelli di espressione di Bcl-2 in tutte le linee cellulari impiegate per questo studio. Le linee tumorali analizzate hanno mostrato diversi livelli di espressione di Bcl-2. L'analisi della forma fosforilata di questa proteina (P-Bcl-2) sulle stesse linee cellulari, ha mostrato che solo le cellule T47D/Bcl-2 risultano esprimerne alti livelli mentre le altre sono negative, anche quelle che esprimono livelli rivelabili di Bcl-2 totale come le MCF-7, le MDA-MB 231, le SKLU-1 e le U937.

Al fine di fare luce sul meccanismo molecolare alla base dei cambiamenti di captazione del ^{99m}Tc -MIBI dovuti al Gefitinib, sono stati condotti degli esperimenti per valutare l'azione del farmaco sullo stato di fosforilazione di Bcl-2 a livello dei mitocondri e reticolo endoplasmatico. Dopo 1 h di stimolazione delle cellule T47D/Bcl-2 con Gefitinib si osserva, come mostrato dalla Fig. 11, una riduzione di P-Bcl-2 a livello mitocondriale ed un parallelo aumento della forma fosforilata a livello del reticolo endoplasmatico (RE).

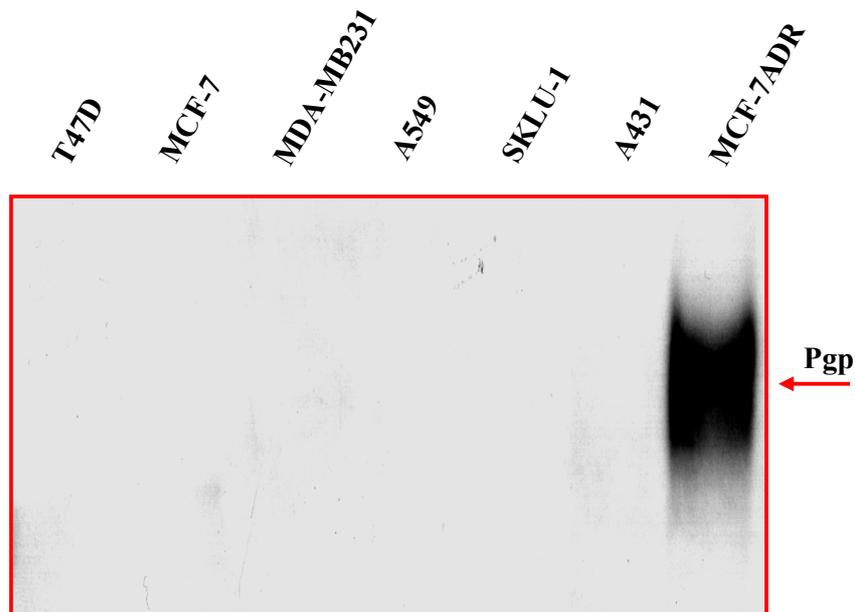


Figura 9. Analisi per western blot dell'espressione della P-glicoproteina (Pgp) nelle diverse linee cellulari tumorali.

I lisati cellulari totali preparati dalle cellule di carcinoma della mammella T47D, MCF-7, MDA-MB231, di carcinoma del polmone A549, SKLU-1 e di carcinoma epidermoide A431, sono stati analizzati per l'espressione della Pgp. Le cellule MCF-7 Adriamicina resistenti (MCF-7-ADR), note per esprimere alti livelli di Pgp sono state utilizzate come controllo positivo. Si noti, l'assenza di espressione della Pgp in tutte le linee cellulari saggate a meno delle MCF-7-ADR.

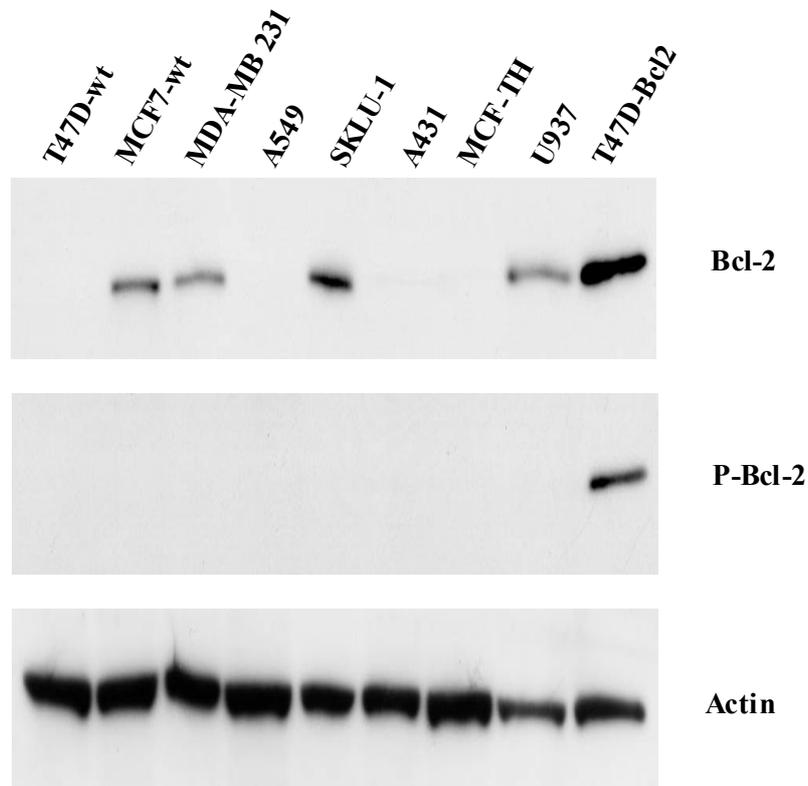


Figura 10. Analisi per western blot dell'espressione di Bcl-2 e della sua forma fosforilata (P-Bcl-2) nelle diverse linee cellulari tumorali.

I lisati cellulari totali preparati dalle cellule di carcinoma della mammella T47D, MCF-7 e MDA-MB231, del polmone A549 e SKLU-1 ed epidermoidi A431, sono stati analizzati per l'espressione di Bcl-2 e P-Bcl-2. Le cellule T47D/Bcl-2, note per esprimere alti livelli di Bcl-2 sono state utilizzate come controllo positivo. Si osserva una diversa espressione della proteina Bcl-2 nelle linee cellulari oggetto di studio, ed inoltre, livelli della forma fosforilata di questa proteina sono apprezzabili solo nelle cellule T47D-Bcl-2. I campioni sono stati analizzati anche per l'espressione dell'actina, per dimostrare l'equivalenza del contenuto proteico

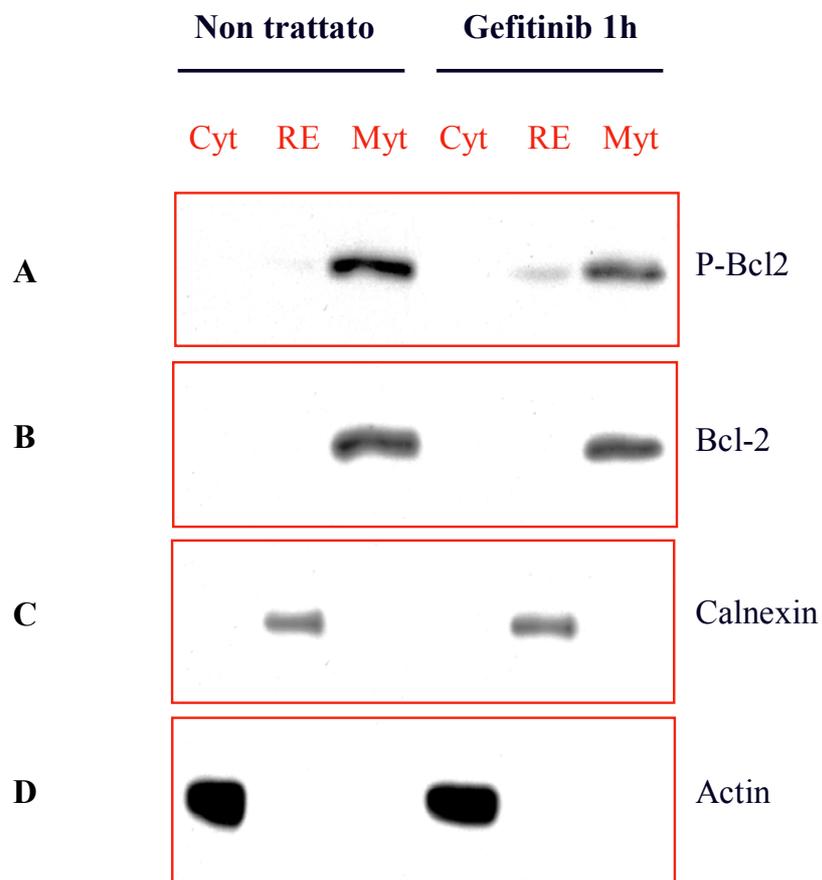


Figura 11. Analisi mediante western blot dei livelli della forma fosforilata di Bcl2 (P-Bcl-2) nelle cellule T47D/Bcl-2 in risposta al trattamento con Gefitinib 20 μ M per 1h.

Organuli cellulari di: mitocondrio (Myt), reticolo endoplasmatico (RE) e citosol (Cyt) di cellule T47D/Bcl-2 dopo trattamento con Gefitinib 20 μ M per 1h, sono stati analizzati mediante western blot per l'espressione di: A) P-Bcl-2, B) Bcl-2, C) Calnexina (marker del reticolo endoplasmatico) e D) Actina. Si può osservare come il trattamento con Gefitinib induca una diminuzione di P-Bcl-2 nel mitocondrio ed un suo contemporaneo aumento a livello del reticolo endoplasmatico.

Gli esperimenti fin qui condotti hanno focalizzato la nostra attenzione sul reticolo endoplasmatico, come mediatore degli effetti sulla captazione del tracciante a seguito di esposizione al Gefitinib. Sono stati quindi condotti degli studi utilizzando la Tapsigargina un inibitore irreversibile della pompa ATP-dipendente SERCA. Questa pompa è responsabile dell'internalizzazione del calcio dal citosol al lume del reticolo endoplasmatico. Il trattamento con Tapsigargina a concentrazioni crescenti per 10 min ha determinato un'incremento dell'uptake del ^{99m}Tc -MIBI sia nelle cellule Bcl-2 iperesprimenti che in quelle di controllo. Tuttavia in questo caso l'effetto scatenato dalla Tapsigargina è apparso più forte di quello osservato con il Gefitinib nelle cellule di controllo e meno intenso nelle cellule iperesprimenti Bcl-2 (Fig. 12). Inoltre al fine di valutare l'esistenza di un'effetto sinergico tra il Gefitinib e Tapsigargina, le cellule sono state trattate con i due composti contemporaneamente. I dati ottenuti, hanno indicato un drammatico incremento della captazione del tracciante nelle cellule trattate, che è stato più alto di quello determinato dal Gefitinib da solo oppure dalla Tapsigargina da sola (Fig. 13). I risultati hanno mostrato, quindi, l'esistenza di una sinergia tra Gefitinib e Tapsigargina evidenziando vie di azione differenti per le due sostanze.

Un'altra proteina che svolge un ruolo molto importante nel reticolo endoplasmatico sull'accumulo di calcio e sull'interazione con proteine coinvolte nell'apoptosi è il recettore per l'IP3 (Inositolo-3-Fosfato) tramite il quale, il calcio diffonde dal reticolo al citosol. Al fine di valutare le possibili interazioni tra la proteina Bcl-2 ed i recettori IP3R prima e dopo trattamento con Gefitinib, sono stati condotti esperimenti di

immunoprecipitazione delle due proteine. Dopo aver preparato lisati cellulari totali dalle cellule T47D/Bcl-2, trattate e non con il farmaco per 1 h, questi sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-IP3R3 (isoforma 3 del recettore per l'Inositolo-3-Fosfato) e analizzati per l'espressione di Bcl-2 e della sua forma fosforilata (P-Bcl-2), mediante western blotting. La Fig 14 mostra che il trattamento con il Gefitinib determina un aumento della forma fosforilata di Bcl-2 associata al recettore IP3R3 rispetto al controllo non trattato. Nella stessa figura non si osservano cambiamenti dei livelli di Bcl-2 totale. Questi dati sono stati confermati da altri esperimenti dove l'immunoprecipitazione è stata condotta con Bcl-2 e sono stati esaminati i livelli di IP3R3 (Fig. 15). Quindi l'esposizione al Gefitinib delle cellule iperesprimenti Bcl-2 ha determinato un'interazione fisica tra forma fosforilata di Bcl-2 e recettore IP3R3, con conseguente e verosimile rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico.

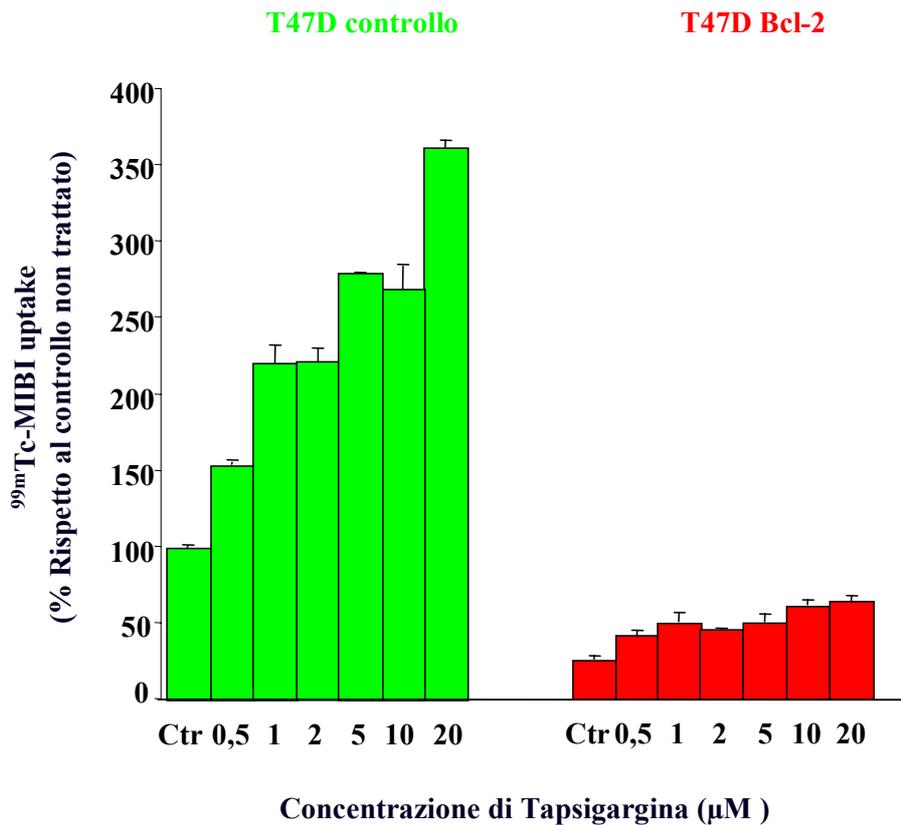


Figura 12. Uptake del ^{99m}Tc -MIBI dopo 10 min di incubazione con concentrazioni crescenti di Tapsigargina nelle cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2.

Le cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2 sono state trattate con Tapsigargina per 10 minuti a concentrazioni crescenti, e successivamente messe ad incubare con ^{99m}Tc -MIBI per 1 h. Le cellule dopo essere state sottoposte a lavaggi sono state lisate e la radioattività incorporata è stata misurata al γ -counter. In questo grafico si può osservare come la Tapsigargina induca un maggiore effetto di incremento della captazione del ^{99m}Tc -MIBI nelle cellule di controllo, rispetto a quelle iperesprimenti Bcl-2. I risultati sono espressi come % di uptake del ^{99m}Tc -MIBI per mg di proteina, considerando come 100% le cellule di controllo non trattate.

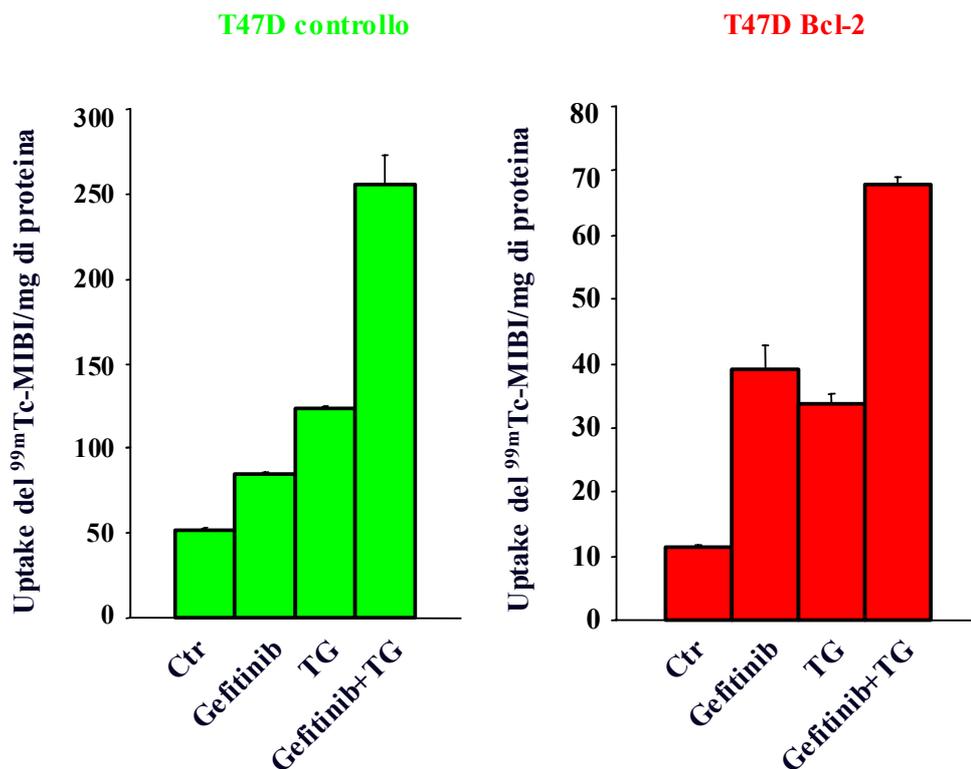


Figura 13. Effetto sinergico del trattamento di Gefitinib e Tapsigargina nelle cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2.

Le cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2 sono state trattate con Gefitinib 20 μ M, Tapsigargina 2 μ M e con i due farmaci insieme, e successivamente messe ad incubare con ^{99m}Tc-MIBI per 1 h. Le cellule dopo essere state sottoposte a lavaggi sono state lisate e la radioattività incorporata è stata misurata al γ -counter. E' possibile apprezzare da questo grafico, come il contemporaneo trattamento di Gefitinib e Tapsigargina (TG), determini, sia nelle cellule di controllo che nelle cellule iperesprimenti Bcl-2, un effetto additivo sulla captazione del ^{99m}Tc-MIBI, rispetto ai due farmaci impiegati singolarmente. I risultati sono espressi come % di uptake del ^{99m}Tc-MIBI per mg di proteina, rispetto al controllo non trattato.

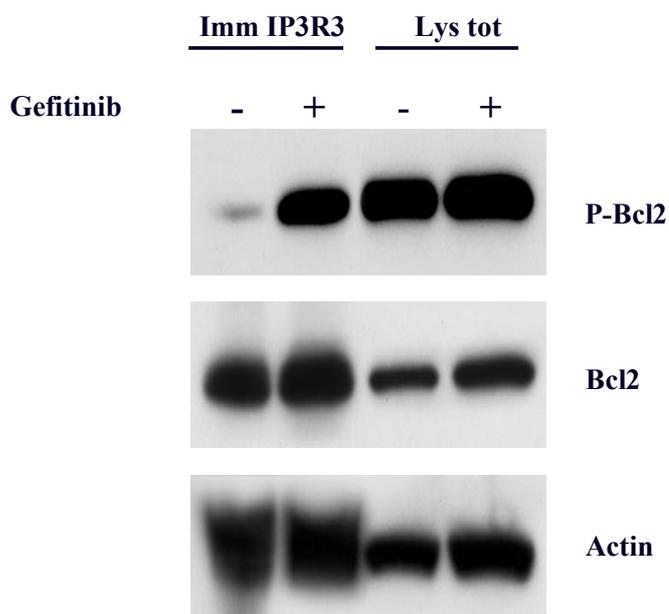


Figura 14. Immunoprecipitazione di lisati cellulari totali di cellule T47D/Bcl-2 con anticorpo monoclonale per il recettore di tipo 3 dell'inositolo trifosfato (IP3R3).

Lisati cellulari totali di cellule T47D/Bcl-2, sono stati immunoprecipitati mediante anticorpo IP3R3 (4µg/mg di lisato) ed analizzati mediante western blotting per l'espressione della forma fosforilata di Bcl-2 (P-Bcl-2), Bcl-2 ed actina. Insieme ai campioni immunoprecipitati sono stati saggiati, per western blot, anche i lisati cellulari totali non immunoprecipitati. Per i campioni immunoprecipitati, questa analisi mostra come il trattamento con il Gefitinib determini un aumento della forma fosforilata di Bcl-2 associata al recettore IP3R3 rispetto al controllo non trattato, mentre non si apprezzano cambiamenti dei livelli di Bcl-2 totale. Non si osserva alcuna differenza dei livelli di P-Bcl-2 e Bcl-2 per i lisati cellulari non immunoprecipitati, trattati e non trattati. I campioni sono stati analizzati anche per l'espressione dell'actina per dimostrare l'equivalenza del contenuto proteico.

Abbreviazioni : Imm= lisati cellulari totali immunoprecipitati mediante anticorpo IP3R3, Lys= lisati cellulari totali

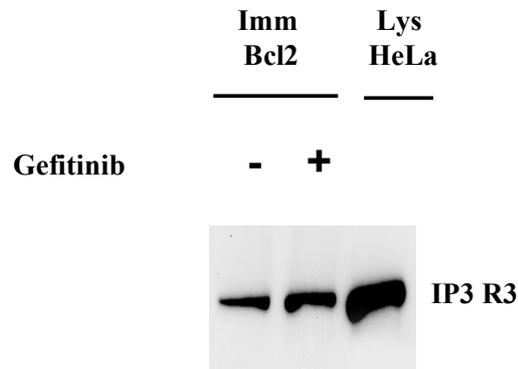


Figura 15. Immunoprecipitazione di lisati cellulari totali di cellule T47D/Bcl-2, mediante anticorpo Bcl-2 ed analisi dell'espressione della proteina IP3R3.

Lisati cellulari totali delle cellule T47D/Bcl-2 sono stati immunoprecipitati con anticorpo anti-BCL-2 alla concentrazione di 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ di lisato ed analizzati mediante western blotting per l'espressione del recettore IP3R3. Insieme ai campioni immunoprecipitati, sono stati saggiati per western blot anche i lisati cellulari totali di cellule HeLa, che rappresentano un controllo positivo di espressione per IP3R3. Si può osservare, come il trattamento con Gefitinib determini un aumento dei livelli del recettore IP3R3 nel campione trattato rispetto a quello non trattato, ad indicare una maggiore interazione fisica tra IP3R3 e Bcl-2. Abbreviazioni: Imm=lisati cellulari totali immunoprecipitati mediante anticorpo Bcl-2, Lys= lisati cellulari totali

Imaging della risposta tumorale al Gefitinib mediante microSPECT

Allo scopo di verificare se l'effetto del Gefitinib sulla captazione del ^{99m}Tc -MIBI fosse rilevabile anche in vivo, le cellule T47D iperesprimenti Bcl-2 e le corrispondenti cellule di controllo sono state inoculate sottocute su fianchi opposti di topi nudi Balb/c. I tumori si sono efficientemente sviluppati dopo circa 2 settimane dall'inoculo delle cellule tumorali ed hanno raggiunto una grandezza compresa tra i 0,3 cm e 1 cm. Successivamente i topi sono stati sottoposti a microSPECT utilizzando il ^{99m}Tc -MIBI. Tutti gli animali oggetto di studio sono stati sottoposti ad un primo scan in condizioni basali, che non è stato in grado di visualizzare nessun tumore. Dopo trattamento con Gefitinib gli stessi animali sono stati sottoposti ad un secondo scan, che ha visualizzato sia i tumori di controllo, che i tumori iperesprimenti Bcl-2, nonostante alcuni di essi avessero dimensioni inferiori ad 1cm. La Fig 16, mostra le sezioni coronali, della regione inferiore del corpo dello stesso animale prima (sinistra) e dopo il trattamento (destra) con due diversi livelli di contrasto.

Studi di biodistribuzione

Lo studio di biodistribuzione eseguito su animali trattati e non trattati non ha mostrato significative differenze di accumulo, in organi e tessuti normali, legate al trattamento farmacologico. Invece nei tumori sia di controllo che Bcl-2 iperesprimenti si è osservato un incremento di 2 volte della captazione del ^{99m}Tc -MIBI, espressa come %

ID (% della dose iniettata) per grammo (Fig. 17). Un'altra osservazione interessante nello studio di imaging nel modello animale è stata che la risposta al farmaco è stata talvolta visualizzata in regioni circoscritte del tumore soprattutto se quest'ultimo era di dimensioni elevate (Fig. 18).

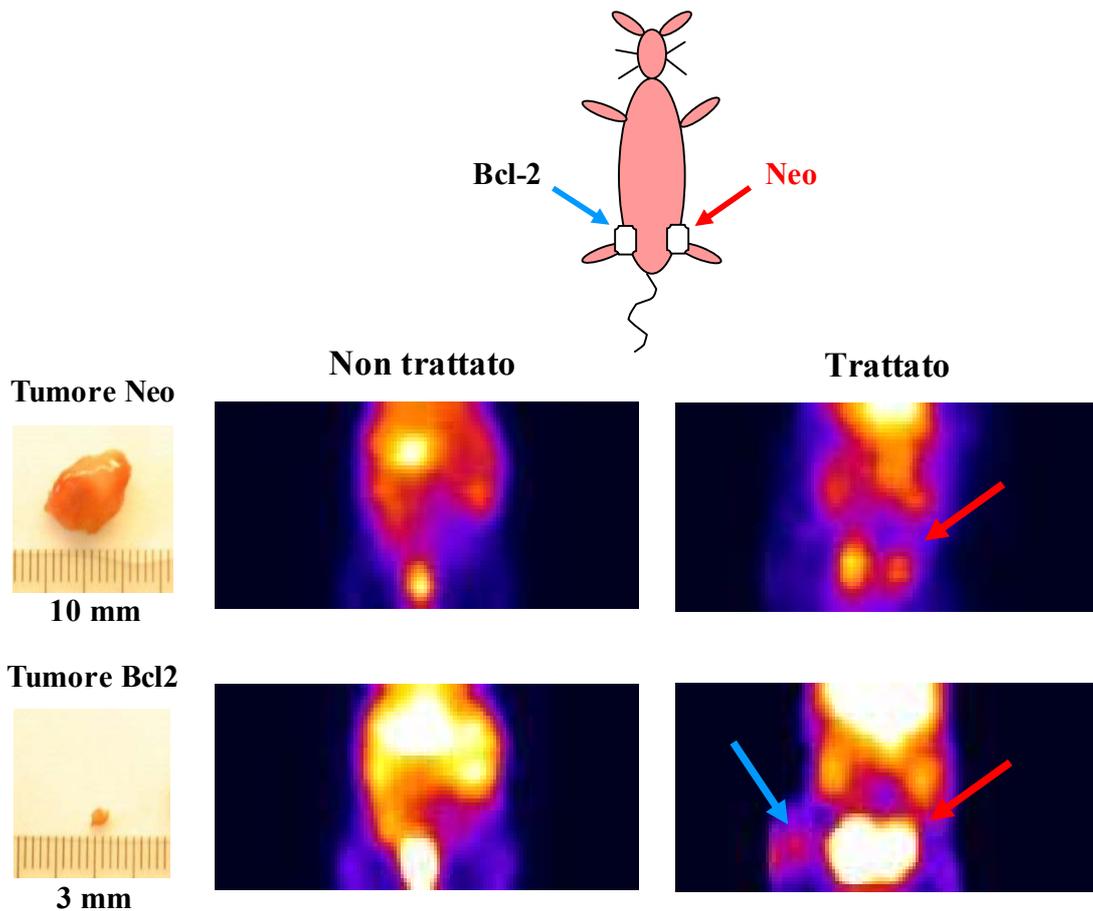


Figura 16. Immagini rappresentative di microSPECT eseguita sullo stesso animale prima e dopo trattamento con Gefitinib.

Topi nudi Balb/c, con tumori di carcinoma della mammella T47D, sviluppati sul fianco destro (Tumore Neo) e sinistro (Tumore Bcl-2), sono stati sottoposti a scan mediante microSPECT in seguito ad iniezione e.v. di ^{99m}Tc -MIBI. Le scansioni sono state eseguite nelle stesse condizioni sia prima che dopo trattamento con Gefitinib. Le sezioni coronali della regione inferiore del corpo dell'animale sono mostrate con due livelli di contrasto. Le frecce indicano i tumori trapiantati. Accanto alle immagini scintigrafiche, sono riportate le immagini e le dimensioni di ciascun tumore dopo la rimozione chirurgica. In questa immagine è evidente la visualizzazione dei due tumori dopo il trattamento farmacologico. È importante notare come questo risultato sia stato ottenuto anche con un tumore di dimensioni inferiori ad 1 cm.

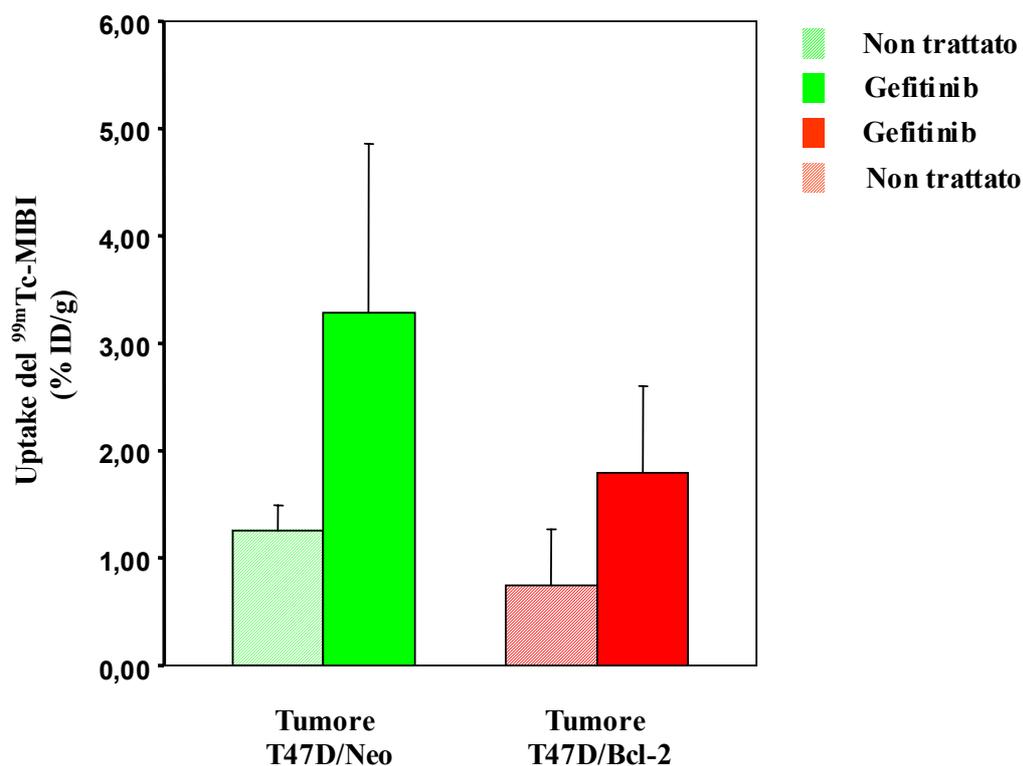


Figura 17. Tumori di carcinoma della mammella T47D/Neo e T47D/Bcl-2, prima e dopo trattamento con Gefitinib.

Topi nudi Balb/c, con tumori di carcinoma della mammella sviluppati sul fianco destro e sinistro da cellule T47D/Neo e T47D/Bcl-2, trattati e non trattati con Gefitinib (150 mg/Kg/d), sono stati iniettati e.v. con ^{99m}Tc-MIBI e dopo essere stati sottoposti ad esame mediante microSPECT, sono stati sacrificati. La radioattività dei tumori prelevati è stata misurata al γ -counter. Sia nei tumori di controllo che Bcl-2 iperesprimenti è possibile apprezzare dopo trattamento, un incremento della captazione del ^{99m}Tc-MIBI di 2 volte. I risultati sono espressi come % di uptake del ^{99m}Tc-MIBI rispetto alla dose iniettata per g di tessuto (% ID/g di ^{99m}Tc-MIBI).

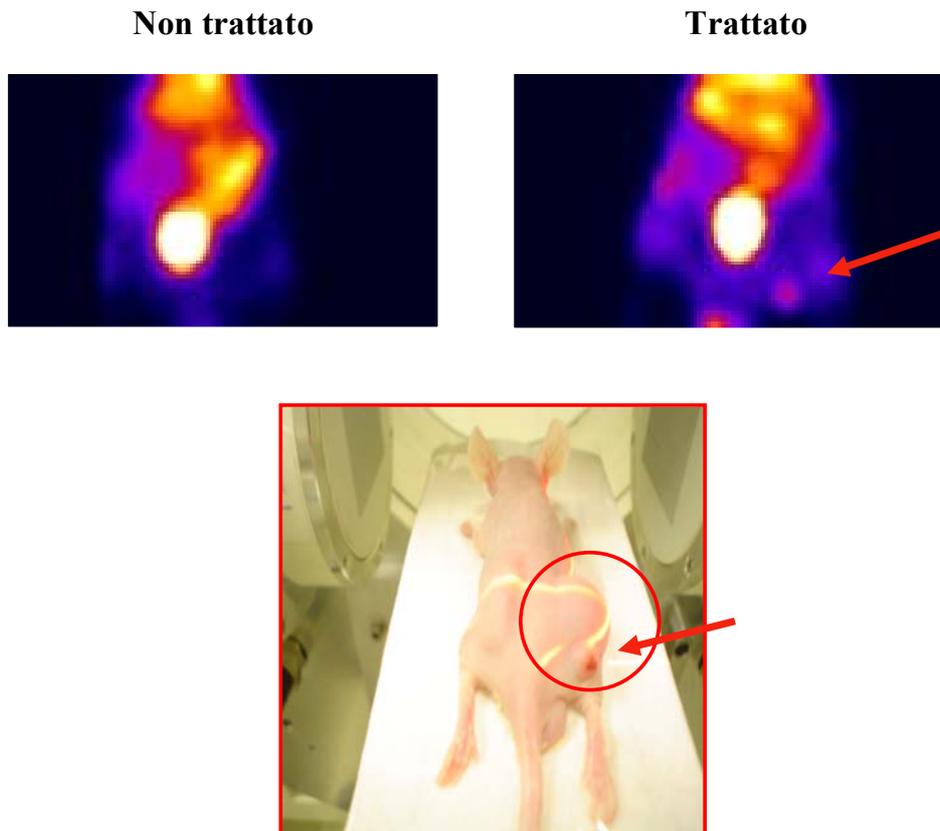


Figura 18. Visualizzazione della captazione del ^{99m}Tc -MIBI, mediante microSPECT, in tumori di carcinoma della mammella, prima e dopo trattamento con Gefitinib.

Topi nudi Balb/c con tumori di carcinoma della mammella sviluppati nella regione inferiore del corpo, sono stati iniettati con ^{99m}Tc -MIBI nella vena caudale e sottoposti a scan mediante microSPECT, sia prima che dopo il trattamento con Gefitinib. Questa immagine, in cui, nell'animale dopo trattamento, si osserva la visualizzazione di una piccola porzione di un tumore cresciuto sul fianco destro, è rappresentativa di una risposta al farmaco visualizzata solo in regioni circoscritte di un tumore di dimensioni elevate.

DISCUSSIONE

Il nostro studio ha dimostrato che è possibile visualizzare la risposta tumorale al Gefitinib e ad altri inibitori di tirosin chinasi mediante ^{99m}Tc -MIBI e microSPECT. L'incremento della captazione del tracciante può riflettere cambiamenti della dinamica del calcio a livello del reticolo endoplasmatico e quindi una risposta da stress che si propaga a livello mitocondriale. L'iperespressione di Bcl-2 e soprattutto il suo stato di fosforilazione sembrano essere critici per determinare l'entità della risposta. Come già menzionato da recentissimi studi, è emerso che, oltre al mitocondrio, anche il reticolo endoplasmatico (RE) sembra rivestire un importante ruolo nella risposta da stress innescata da vari stimoli (24), (Fig. 19). La proteina antiapoptotica Bcl-2 è un elemento importante nella trasmissione di segnali tra reticolo e mitocondrio, infatti, oltre a localizzarsi a livello della membrana mitocondriale si localizza anche a livello del reticolo (28). Molte chinasi come Raf-1, PKC α e PKA possono fosforilare Bcl-2 ed è noto, da alcuni studi, che la forma fosforilata di Bcl-2 si localizza prevalentemente al RE (32). In questo organello Bcl-2 sembra interagire fisicamente con i recettori IP3R e controllare il loro stato di attivazione ed il rilascio di calcio attraverso questo canale. Pertanto sono stati condotti esperimenti di immunoprecipitazione mediante anticorpo IP3R3 ed i risultati hanno indicato dopo trattamento, un'elevata associazione della proteina fosforilata Bcl-2 con i canali IP3R3 (Fig. 14). Questa interazione potrebbe direttamente o indirettamente regolare lo stato

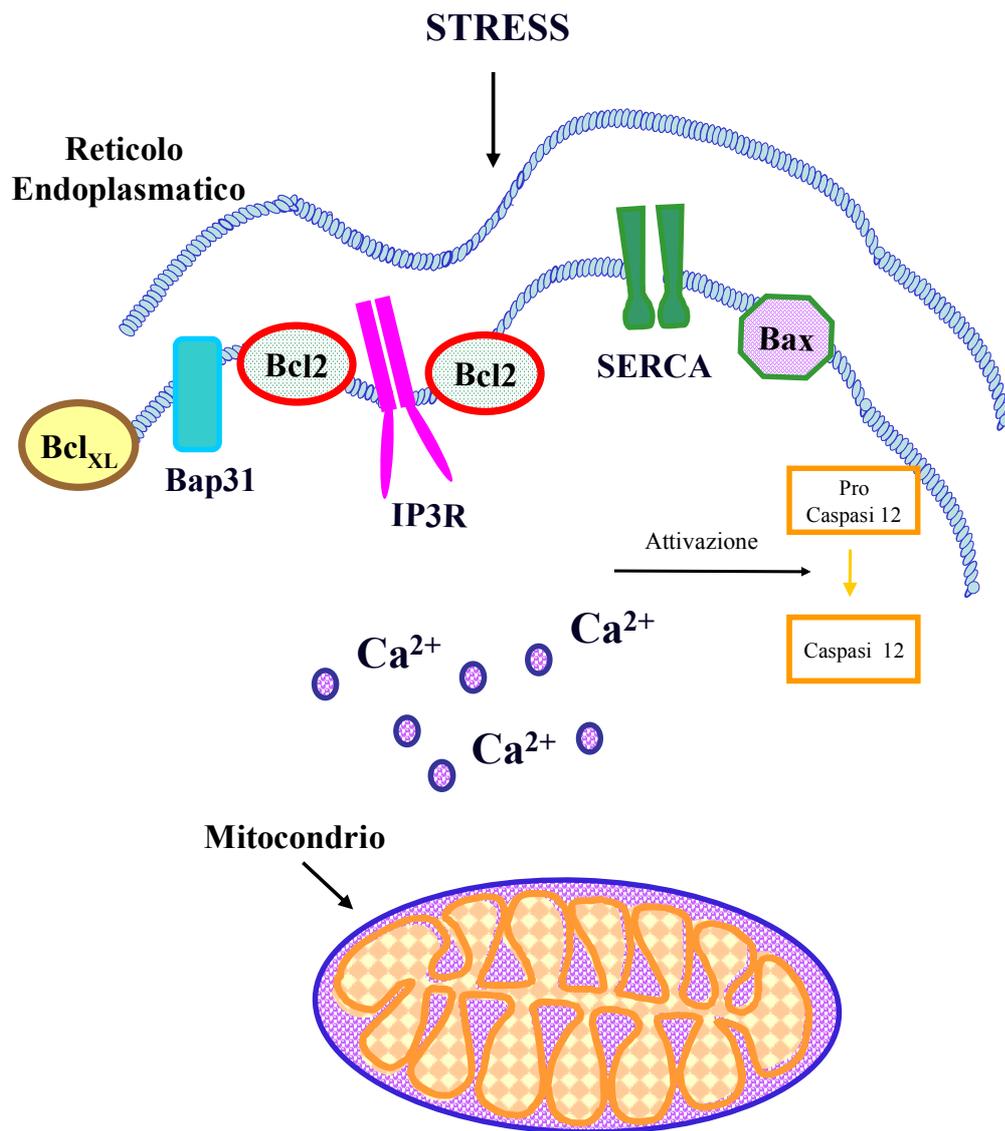


Figura 19. Rappresentazione dei principali eventi molecolari che si verificano a livello del reticolo endoplasmatico, in risposta a stimoli di stress cellulare: aumento del rilascio di Ca⁺⁺ dal lume del RE, attivazione della Caspasi 12, formazione di frammenti della proteina Bap-31

di fosforilazione di IP3R3 (34). Infatti sembra che è la forma fosforilata dei recettori IP3R ad essere attiva e quindi determinare il rilascio del calcio nel citosol (33).

Il Gefitinib è un inibitore di chinasi che in numerosi studi clinici ha mostrato un'attività antitumorale in una varietà di neoplasie, come il carcinoma del polmone NSCLC (Non-Small Cell Lung Carcinoma), della mammella, dell'ovaio, del colon e del distretto testa-collo (41-42). Analogamente ad altri inibitori dell'EGFR, questo farmaco rafforza in modo sinergico l'effetto citotossico dei farmaci antitumorali più comunemente impiegati (43). Il Gefitinib è stato il primo farmaco inibitore dell'EGFR ad essere approvato per il trattamento del carcinoma del polmone ed oggi è impiegato come trattamento di terza linea dopo il fallimento delle comuni chemioterapie (40). Poter visualizzare quindi, in vivo la risposta a questo farmaco aiuterebbe a selezionare i pazienti da candidare a tale terapia, ottenendo un miglior risultato clinico.

I saggi di uptake su cellule T47D Bcl-2 iperesprimenti e di controllo, nonché gli studi sul modello animale, hanno dimostrato che l'uptake del ^{99m}Tc -MIBI aumenta dopo trattamento con Gefitinib. Allo scopo di comprendere se quest'effetto fosse legato ai livelli di espressione dell'EGFR, sono stati eseguiti dei saggi di uptake del ^{99m}Tc -MIBI con linee cellulari, che presentano diversi livelli di espressione del recettore. Questi esperimenti hanno dimostrato che l'aumento della captazione del tracciante è indipendente dai livelli di EGFR, dal momento che in tutte le linee cellulari si osserva un incremento della captazione del tracciante indipendentemente dai livelli di questo recettore. Allo scopo di valutare l'effetto generato da altri inibitori di proteine ad attività tirosino chinasi, sono stati eseguiti gli stessi esperimenti con altri composti.

Tra i farmaci saggiati l'Erlotinib mostra una certa analogia di struttura chimica con il Gefitinib ed analogamente a questo composto agisce sull'EGFR. Nonostante queste somiglianze l'Erlotinib non ha un effetto paragonabile al Gefitinib sull'uptake del ^{99m}Tc -MIBI. Questi dati potrebbero ulteriormente confermare l'ipotesi secondo cui il Gefitinib determini le variazioni osservate sulla captazione ^{99m}Tc -MIBI, secondo una via che non vede coinvolto il recettore dell'EGFR. Questa ipotesi risulta in accordo con l'effetto sinergico mostrato dal Gefitinib con altri farmaci antitumorali, senza tuttavia associarsi a livelli elevati di EGFR. Pertanto l'esposizione a Gefitinib potrebbe, aumentando la quota di Bcl-2 fosforilato a livello del reticolo endoplasmatico, favorirne l'interazione con il recettore IP3R3 e quindi il rilascio di calcio da parte di quest'ultimo. L'aumentato uptake di ^{99m}Tc -MIBI potrebbe riflettere questo movimento intracellulare di calcio e quindi una maggiore suscettibilità all'induzione di apoptosi.

In conclusione il nostro studio ha mostrato che è possibile visualizzare in vivo la risposta tumorale ad inibitori di tirosin chinasi mediante microSPECT. Questo approccio può essere traslato a studi clinici per la selezione di pazienti candidati ad una buona risposta al trattamento con questi farmaci.

BIBLIOGRAFIA

1. Ventre J C, Adams M D, Myers E W, Li P W, Mural R J et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291: 1304-51.
2. Weissleder R. Molecular imaging in cancer. *Science* 2006;312: 1168-71.
3. Massoud T F and Gambhir S S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 2003;17: 545-80.
4. Walrand S, Jamar F, de Jong M and Pauwels S. Evaluation of novel whole-body high-resolution rodent SPECT (Linoview) based on direct acquisition of linogram projections. *J Nucl Med* 2005;46: 1872-80.
5. Beekman F J, van der Have F, Vastenhouw B, van der Linden A J, van Rijk P P, Burbach J P and Smidt M P. U-SPECT-I: a novel system for submillimeter-resolution tomography with radiolabeled molecules in mice. *J Nucl Med* 2005;46: 1194-200.
6. Montet X, Ntziachristos V, Grimm J and Weissleder R. Tomographic fluorescence mapping of tumor targets. *Cancer Res* 2005;65: 6330-6.
7. Wells P N. Ultrasound imaging. *Phys Med Biol* 2006;51: R83-98.
8. Liang H D and Blomley M J. The role of ultrasound in molecular imaging. *Br J Radiol* 2003;76 Spec No 2: S140-50.
9. Atri M. New technologies and directed agents for applications of cancer imaging. *J Clin Oncol* 2006;24: 3299-308.
10. Dzik-Jurasz A S. Molecular imaging in vivo: an introduction. *Br J Radiol*

2003;76 Spec No 2: S98-109.

11. Cherry S R. Multimodality in vivo imaging systems: twice the power or double the trouble? *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8: 35-62.
12. Persigehl T, Heindel W and Bremer C. MR and optical approaches to molecular imaging. *Abdom Imaging* 2005;30: 342-54.
13. Schellenberger E A, Bogdanov A Jr, Hogemann D, Tait J, Weissleder R and Josephson L. Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI. *Mol Imaging* 2002;1: 102-7.
14. Reynolds P R, Larkman D J, Haskard D O, Hajnal J V, Kennea N L, George A J and Edwards A D. Detection of vascular expression of E-selectin in vivo with MR imaging. *Radiology* 2006;241: 469-76.
15. Korpany G, Grayburn P A, Shohet R V and Brekken R A. Targeting vascular endothelium with avidin microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2005;31: 1279-83.
16. Ellegala D B, Leong-Poi H, Carpenter J E, Klibanov A L, Kaul S, Shaffrey M E, Sklenar J and Lindner J R. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3. *Circulation* 2003;108: 336-41.
17. Moshitch-Moshkovitz S, Tsarfaty G, Kaufman D W, Stein G Y, Shichrur K, Solomon E, Sigler R H, Resau J H, Vande Woude G Y and Tsarfaty I. In vivo direct molecular imaging of early tumorigenesis and malignant progression induced by transgenic expression of GFP-Met. *Neoplasia* 2006;8: 353-63.
18. Mahmood U and Weissleder R. Near-infrared optical imaging of proteases in

- cancer. *Mol Cancer Ther* 2003;2: 489-96.
19. Kelloff G J, Hoffman J M, Johnson B, Scher H I, Siegel B A, Cheng E Y, Cheson B D, Shaughnessy J O, Guyton K Z, Mankoff D A, Shankar L, Larson S M, Sigman C C, Schilsky R L and Sullivan D C. Progress and Promise of FDG-PET Imaging for Cancer Patient Management and Oncologic Drug Development. *Clin Cancer Res* 2005, 11: 2785-2808.
 20. Wells P, Aboagye E, Gunn R N, Osman S, Boddy A V, Taylor G A, Rafi I, Hughes A N, Calvert A H, Price P M and Newell D R. 2-[11C]thymidine positron emission tomography as an indicator of thymidylate synthase inhibition in patients treated with AG337. *J Natl Cancer Inst* 2003;95: 675-82.
 21. Kelloff G J, Krohn K A, Larson S M, Weissleder R, Mankoff D A, Hoffman J M, Link J M, Guyton K Z, Eckelman W C, Scher H I, O'Shaughnessy J, Cheson B D, Sigman C C, Tatum J L, Mills G Q, Sullivan D C and Woodcock J. The progress and promise of molecular imaging probes in oncologic drug development. *Clin Cancer Res* 2005;11: 7967-85.
 22. Lahorte C M, Vanderheyden J L, Steinmetz N, Van de Wiele C, Dierckx R A and Slegers G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31: 887-919.
 23. Okada H, and Mak T W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004;4: 592-603.
 24. Xu C, Bailly-Maitre B and Reed J C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005;115: 2656-64.

25. Reed J C. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1: 111-21.
26. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig P E, Didelot C and Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006;13: 1423-33.
27. Adachi M and Imai K. The proapoptotic BH3-only protein BAD transduces cell death signals independently of its interaction with Bcl-2. *Cell Death Differ* 2002;9: 1240-7.
28. Walter L and Hajnoczky G. Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 2005;37: 191-206.
29. Igney F H and Krammer P H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 277-88.
30. DeSouza N, Reiken S, Ondrias K, Yang Y M, Matkovich S and Marks A R. Protein kinase A and two phosphatases are components of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor macromolecular signaling complex. *J Biol Chem* 2002;277: 39397-400.
31. Coultas L and Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003;13: 115-23.
32. Bassik M C, Scorrano L, Oakes S A, Pozzan T and Korsmeyer S J. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *Embo J* 2004;23: 1207-16.
33. Oakes S A, Scorrano L, Opferman J T, Bassik M C, Nishino M, Pozzan T and Korsmeyer S J. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol

- trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102: 105-10.
34. Chen R, Valencia I, Zhong F, McColl K S, Roderick H L, Bootman M D, Berridge M J, Conway S J, Holmes A B, Mignery G A, Velez P and Distelhorst C W. Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol* 2004;166: 193-203.
35. Cutrone J A, Yospur L S, Khalkhali I, Tolmos J, Devito A, Diggles L, Vargas M P, Shitabata P, French S. Immunohistologic assessment of technetium-99m-MIBI uptake in benign and malignant breast lesions. *J Nucl Med* 1998, 39(3): 449-53.
36. Ciarmiello A, Del Vecchio S, Silvestro P, Potena M I, Carriero M V, Thomas R, Botti G, D'Aiuto G and Salvatore M. Tumor clearance of technetium 99m-sestamibi as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16: 1677-83.
37. Del Vecchio S, Zannetti A, Aloj L, Caraco C, Ciarmiello A and Salvatore M. Inhibition of early 99mTc-MIBI uptake by Bcl-2 anti-apoptotic protein overexpression in untreated breast carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30: 879-87.
38. Aloj L, Zannetti A, Caraco C, Del Vecchio S and Salvatore M. Bcl-2 overexpression prevents 99mTc-MIBI uptake in breast cancer cell lines. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31: 521-7.

39. Herbst R S, Fukuoka M and Baselga J. Gefitinib--a novel targeted approach to treating cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4: 956-65.
40. Brehmer D, Greff Z, Godl K, Blencke S, Kurtenbach A, Weber M, Muller S, Klebl B, Cotten M, Keri G, Wissing J and Daub H. Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res* 2005;65: 379-82.
41. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Somatico G, De Placido S, Bianco A R and Tortora G. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000;6: 2053-63.
42. Sirotnak F M. Studies with ZD1839 in preclinical models. *Semin Oncol* 2003;30: 12-20.
43. Sirotnak F M, She Y, Lee F, Chen J and Scher H I. Studies with CWR22 xenografts in nude mice suggest that ZD1839 may have a role in the treatment of both androgen-dependent and androgen-independent human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8: 3870-6.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare, il Prof. Marco Salvatore, Coordinatore del Dottorato di Ricerca, per la cortese disponibilità che ha sempre avuto nei miei confronti. Ringrazio il mio relatore, Prof.ssa Silvana Del Vecchio, per la preziosa e costante supervisione. Un particolare ringraziamento alla Dott.ssa Antonella Zannetti, che mi ha sostenuto durante il mio lavoro di ricerca. Un ringraziamento affettuoso a tutte le compagne di laboratorio, valide collaboratrici nel corso del mio dottorato di ricerca.