

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**Dottorato di Ricerca in Biotecnologie, Farmacologia e Tossicologia:
Progetto n.2 Farmacologia e Tossicologia**

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 05/G1

Settore Scientifico disciplinare: BIO 14

**Analisi preclinica di nuove strategie
terapeutiche basate sull'inibizione di protein-
chinasi nell'osteosarcoma**

Presentata da: Serena Vella

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. Giorgio Cantelli Forti

Relatore

Dott. Andrea Sapone

Correlatore

Dott. Massimo Serra

Esame finale anno 2013

Abstract

Scopo

L'obiettivo del presente programma di studio è stato quello di identificare e validare nuovi possibili bersagli terapeutici per l'osteosarcoma (OS) partendo dall'analisi del chinoma umano.

Risultati

L'analisi del profilo di espressione genica ottenuta su 21 campioni clinici di OS ad alto grado di malignità ha permesso di selezionare le seguenti chinasi di possibile rilevanza biologica per l'OS: AURK-A, AURK-B, CDK2, PIK3CA, PLK-1. Le chinasi selezionate sono state validate tramite RNA interference. Successivamente è stata valutata l'efficacia dei relativi inibitori specifici: VX-680 e ZM-447439 inibitori delle Aurora-chinasi, Roscovitina inibitore di CDK2 e NMS1 inibitore di PLK-1, già inclusi in studi clinici.

In termini d'inibizione della crescita cellulare le linee sono risultate maggiormente sensibili ai farmaci VX-680 e NMS1. E' stata osservata una minor sensibilità ai farmaci VX-680, ZM447439 e NMS1 nelle linee *doxorubicina(DX)-resistenti* (caratterizzate da elevati livelli di espressione di ABCB1), indicando questi farmaci come potenziali substrati di ABCB1. La Roscovitina, nonostante i valori di IC₅₀ elevati, non sembrerebbe substrato di ABCB1. La validazione preclinica di VX-680 e ZM447439 è stata completata. La forte inibizione della crescita è causata da endoreduplicazione per mancata citodieresi con conseguente formazione di una popolazione iperploide e apoptosi. Inoltre, VX-680 inibisce la motilità e la capacità di formare colonie. Esperimenti di associazione farmacologica mostrano che VX-680 interagisce positivamente con tutti i chemioterapici convenzionali impiegati nel trattamento dell'OS. NMS-1 produce interazioni positive con la DX in linee cellulari DX-resistenti, probabilmente grazie all'effetto revertante esercitato su ABCB1. La Roscovitina produce interazioni positive con CDDP e DX nelle varianti resistenti, effetto probabilmente dovuto al ruolo di CDK2 nei meccanismi di riparo del DNA.

Conclusioni

L'analisi in vitro dell'attività degli inibitori ha permesso di identificare VX-680 come nuovo farmaco di potenziale interesse clinico, soprattutto in virtù delle sue interazioni sinergiche con i chemioterapici di uso convenzionale nel trattamento dell'osteosarcoma

Abstract

Background

Objective of this study was the preclinical validation of protein kinases and kinase inhibitors of possible clinical usefulness in osteosarcoma.

Results

By mining genome-wide expression profiling data obtained from 21 osteosarcoma (OS) clinical samples, five protein kinases emerged as the most relevant for the osteosarcoma biology: AURK-A, AURK-B, CDK2, PIK3CA, PLK1. Their validation was performed by RNA interference. We therefore investigated the efficacy of the following drugs: VX-680 and ZM447439 (AURKs inhibitors), the CDK2 inhibitor Roscovitine and the PLK1 inhibitor NMS-1, which have been included in clinical trials for other tumors.

In terms of cell growth inhibition, VX-680 and NMS-1 proved to be the most effective among the tested drugs. A decrease of drug sensitivity was observed in doxorubicin-resistant cell lines (characterized by a high ABCB1 expression), suggesting VX-680, ZM447439 and NMS-1 as ABCB1 substrates. Roscovitine was less effective than other drugs but it did not appear to be affected by the ABC-mediated efflux mechanisms.

Preclinical validation of VX-680 and ZM447439 has been completed. Cell growth inhibition was caused by occurring endoreduplication with cytokinesis failure and consequent generation of hyperploid populations. Generally, this alteration is followed by apoptosis induction. VX-680 also decreased motility and soft-agar colony formation ability of human OS cells.

Drug association experiments showed that VX-680 positively interacts with all drugs conventionally used in OS. NMS-1 proved a positive interaction with DX in DX-resistant cell lines, probably due to the revertant effect of this drug on ABCB1 activity. Roscovitine produced positive interactions with CDDP and DX in resistant variants, probably due to CDK2 role in DNA-damage repair pathway.

Conclusions

These results indicate that kinases might represent new candidate therapeutic targets for OS and *in vitro* analysis of two inhibitors of AURK-A and AURK-B indicated in VX-680 a new promising drug of potential clinical usefulness to target these molecules.

Indice

Capitolo I	1
Osteosarcoma	1
1. Definizione	1
1.1 Osteosarcoma Classico	1
1.2. Epidemiologia	3
1.3. Eziologia.....	4
1.3.1 Fattori genetici e predisposizione familiare	4
1.3.2. Fattori ambientali	6
1.3.3. Traumi	7
1.4. Presentazione clinica e diagnosi.....	7
1.5. Terapia.....	8
1.5.1 Doxorubicina	12
1.5.2 Methotrexate.....	13
1.5.3 Ifosfamide.....	15
1.5.4 Cisplatino	16
Capitolo II	21
Proteine Chinasi	21
2.1 Generalità	21
2.2 Classificazione delle proteine chinasi eucariotiche.....	22
2.3 Struttura generale delle proteine chinasi	26
2.4 Importanza delle proteine chinasi nel ciclo cellulare.....	27
2.5 Importanza delle proteine chinasi nei tumori.....	30
2.6 Le proteine chinasi quali bersagli per la terapia dei tumori.....	32
2.6.1 Cell Cycle Kinases- CDKs.....	32
2.6.2 Aurora chinasi e checkpoint mitotico.....	35
2.6.3 Polo-Like Kinases, PLKs.....	37
2.6.4 PIK3CA.....	39
Capitolo II	41
Scopo della ricerca	41
Capitolo III	43
Materiali e metodi	43
3.1 Farmaci.....	43
3.2 Linee cellulari.....	43
3.3 Campioni clinici.....	44
3.4 Estrazione RNA.....	44
3.5 Silenziamento genico.....	44
3.6 Quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction (qRT-PCR).....	45
3.7 Western Blot.....	46
3.8 Sensibilità in vitro ai farmaci di linee cellulari di osteosarcoma umano.....	47
3.9 Incorporazione in fluorescenza.....	47
3.10 Interazioni farmacologiche.....	47
3.11 Analisi del ciclo cellulare.....	48
3.12 Soft agar assay.....	49
3.13 Motilità cellulare tramite "whoundhealing assay" ("rimarginazione del graffio").....	49
3.14 Analisi statistica.....	49
Capitolo IV	50
Risultati	50
4.1 Analisi dei livelli di espressione delle chinasi in campioni clinici e linee cellulari.....	50
4.2 Valutazione della rilevanza biologica delle chinasi selezionate.....	53
4.3 Inibitori chinasi-specifici.....	72

4.4 Analisi in vitro dell'attività di inibitori chinasi-specifici.	74
4.5 Efficacia in vitro dell'attività di VX-680 e ZM447439: Valutazione degli effetti di VX-680 e ZM447439 sul ciclo cellulare in linee cellulari di osteosarcoma	79
4.5.1 Valutazione della morte cellulare indotta dal trattamento con VX-680 e ZM447439.	82
4.5.2 Valutazione della motilità cellulare e della capacità di formare colonie in soft-agar.....	85
4.5.3 Interazioni farmacologiche di VX-680 e ZM447439 con i chemioterapici convenzionali. ...	88
4.6 Efficacia in vitro dell'attività di NMS-1 in linee cellulari di osteosarcoma farmacosensibili.....	90
4.6.1 Valutazione degli effetti sul ciclo cellulare e della morte cellulare in seguito al trattamento con NMS-1 di linee cellulari di osteosarcoma farmacosensibili.	90
4.6.2 Valutazione dell'efficacia in vitro del farmaco NMS-1 in linee cellulari di osteosarcoma farmacoresistenti.	94
4.6.3 Valutazione degli effetti sul ciclo cellulare dopo trattamento con doxorubicina, NMS-1 e loro combinazione.	96
4.6.4 Interazioni farmacologiche del farmaco NMS-1 con i chemioterapici convezionali.	99
4.7 Efficacia in vitro dell'attività della Roscovitina.	101
4.7.1 Valutazione degli effetti sul ciclo cellulare del trattamento con Roscovitina in linee cellulari farmacosensibili di osteosarcoma.	101
4.7.2 Interazioni farmacologiche della Roscovitina con i chemioterapici convezionali.	104
Bibliografia.....	114

Capitolo I

Osteosarcoma

1. Definizione

L'Osteosarcoma è un tumore primitivo maligno dell'apparato scheletrico, caratterizzato dalla produzione di matrice osteoide ed ossea ad opera delle cellule maligne che lo costituiscono (Klein, 2006). Ha un picco di incidenza tra la seconda e terza decade di vita, durante il periodo di maggior crescita ossea come l'adolescenza. Si possono identificare diversi sottotipi, in funzione delle caratteristiche cliniche, radiografiche e microscopiche; alcuni di questi sottotipi hanno rilevanza prognostica. Convenzionalmente, l'osteosarcoma è una neoplasia ad alto grado di malignità che colpisce le metafisi delle ossa lunghe -in particolare femore distale e tibia prossimale- in adolescenti e giovani adulti, con una lieve predominanza nel sesso maschile. La maggior parte degli osteosarcomi di origine midollare sono di alto grado, mentre quelli che originano dalla superficie ossea sono tendenzialmente di basso grado.

Esistono diverse varianti di osteosarcoma, usualmente suddivise in due grandi gruppi: osteosarcomi ad alto grado e osteosarcomi a basso grado.

Gli osteosarcomi ad alto grado di malignità (III e IV grado) rappresentano il 90% dei tumori ossei e sono accomunati da simili caratteristiche clinico-patologiche, prognostiche e terapeutiche. Gli osteosarcomi a basso grado di malignità (I e II grado) comprendono l'osteosarcoma parostale, periostale e centrale a basso grado (Klein, 2006; Picci 2007).

1.1 Osteosarcoma Classico

L'osteosarcoma classico (o OS convenzionale) rappresenta la stragrande maggioranza di tutti gli osteosarcomi. E' un tumore raro (0,2% di tutti i tumori maligni) con un'incidenza di 3 casi su 1000000 di persone all'anno. (Picci, 2007). E' un tumore dell'età pediatrica ed adolescenziale, quando si presenta in età adulta tendenzialmente è secondario a patologie quali il morbo di Paget, la sindrome di Li-Fraumeni, il Retinoblastoma ereditario (Hattinger, 2010). Macroscopicamente, l'osteosarcoma si presenta sotto forma di una massa che sostituisce la midollare metafisaria, dove il piatto cartilagineo epifisario funge da barriera protettiva, risparmiando in genere la regione epifisaria. La consistenza della lesione è variabile e dipende dalla quantità di matrice osteoide e di osso prodotta dalla neoplasia. Nel

25% dei casi è presente una ricca componente tumorale cartilaginea, tale da simulare un condrosarcoma.

Per definizione, l'osteosarcoma convenzionale è un sarcoma a cellule fusate o epitelioidi ad alto grado di malignità, che produce matrice osteoide. Tuttavia, tre varianti istologiche sono state descritte in base all'aspetto predominante della matrice: osteoblastico, fibroblastico e condroblastico. (Picci, 2007; Schajowicz, 1995). La variante *osteoblastica* è quella più frequente e rappresenta il 50% circa degli osteosarcomi convenzionali. Le cellule possono avere aspetto fusato oppure epitelioidi e presentano un significativo grado di atipia citologica. La produzione di matrice osteoide variamente mineralizzata è in genere abbondante. Essa tende a intrappolare le cellule neoplastiche con deposizione pericellulare oppure può mostrare un'organizzazione trabecolare.

Nel 25% dei casi si ha un istotipo *fibroblastico*, in cui la produzione di matrice può essere estremamente ridotta con prevalenza della componente a cellule fusate, simil-fibrosarcomatosa.

Infine, nel restante 25% dei casi si ha un istotipo *condroblastico*, caratterizzato da una componente condroide di aspetto maligno, simile a quella del condrosarcoma. In genere, intorno ai lobuli cartilaginei sono presenti cellule ad aspetto fusato con produzione di matrice osteoide. In ogni caso, anche in assenza di produzione di osteoide, la presenza di una neoplasia condroide ad alto grado di malignità con associata componente fusocellulare in un paziente giovane depone per una diagnosi di OS condroblastico. Frequentemente il tumore metastatizza a distanza per via ematica e la sede d'elezione è quella polmonare.

Prima degli anni "70-"80, il trattamento dell'osteosarcoma convenzionale consisteva nella sola rimozione chirurgica (quasi sempre amputazione) e si traduceva in una percentuale di guarigione non superiore al 10% dei pazienti. L'introduzione di un regime di polichemioterapia pre e post-operatoria a partire dall'inizio degli anni "80 ha migliorato la prognosi dei pazienti, portandola all'attuale 60%-65% di probabilità di guarigione.

La valutazione della necrosi tumorale nelle resezioni chirurgiche dopo la chemioterapia preoperatoria rappresenta un parametro di estrema utilità prognostica e terapeutica; è infatti indice della risposta del tumore al trattamento antitumorale e indirizza le fasi successive di chemioterapia postoperatoria. Tale valutazione può essere effettuata su un'unica macrosezione dell'intero tumore o su un campionamento parziale della neoplasia. Gli aspetti morfologici più frequentemente osservati in un caso di osteosarcoma dopo trattamento chemioterapico variano dalla fibrosi, alla sclerosi, alla necrosi. Molti studi hanno dimostrato che una percentuale di necrosi tumorale superiore al 90% è indice di buona risposta al trattamento ed è associato ad

una prognosi favorevole. (Krishnan Unni, *Dahlin's Bone Tumors General Aspects and Data on 11087 Cases*. 1996) (Campanacci,1999)

1.2. Epidemiologia

Il rischio di diagnosi di cancro è maggiore dall'invecchiamento in poi, infatti circa il 77% di tutti i tumori sono diagnosticati a partire dai 55 anni. Nel corso della vita, la probabilità che un individuo di sesso maschile sviluppi un tumore è leggermente inferiore a 1/2 mentre per il sesso femminile è pari a 1/3. Inoltre, per ciascun neonato il rischio di sviluppare un cancro all'età di 20 anni è di circa 1/300 per i maschi e 1/333 per le femmine, con un picco di incidenza tra 5 e 14 anni.

I tumori dell'età pediatrica rappresentano non più del 2% di tutti i tumori. Secondo i dati del SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) il tasso di incidenza per i tumori ossei e articolari, indipendentemente dall'età e dalla razza è pari a 0,9 casi ogni 100000 persone l'anno, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni pari al 67,9%. L'età media di diagnosi, sempre per questi tumori, è pari a 39 anni di cui il 27,8% possiede un'età inferiore ai 20 anni. Per i bambini (0-14 anni) il tasso di incidenza per i tumori ossei e articolari indipendentemente dall'età e dalla razza è di 0,7 casi ogni 100000 persone l'anno, con tasso di mortalità di 0,1 casi ogni 100000 persone l'anno; mentre, aumentando l'intervallo di età da 0 a 19 anni si passa a 0,9 casi ogni 100000 persone l'anno, con un tasso di mortalità pari a 0,4 casi ogni 100000 persone l'anno.

Tra i tumori tipici dell'età pediatrica l'osteosarcoma è ottavo in incidenza generale e rappresenta il 2,4% dei tumori pediatrici.

Dati provenienti dal registro tumori di pazienti con stratificazione istologica suggeriscono che l'osteosarcoma classico è il più comune tumore primitivo maligno del sistema scheletrico rappresentando il 35% dei casi seguito dal condroblastoma (25%) e dal sarcoma di Ewing (16%).

L'osteosarcoma ha una distribuzione bimodale per età con un primo picco di incidenza durante l'adolescenza e un secondo in età adulta.

Il primo picco è tra i 10-14 anni di età e coincide con una rapida crescita suggerendo una relazione stretta tra il rapido accrescimento osseo e il tumore stesso. Il secondo picco è tipico dell'età adulta dai 65 anni in su, frequentemente secondario ad altri tumori e correlato spesso con il morbo di Paget.

L'incidenza è maggiore nel sesso maschile con un tasso di 5,4 milioni di persone l'anno, contro i 4,0 milioni di persone l'anno nel sesso femminile.

Comunemente l'osteosarcoma colpisce l'estremità delle ossa lunghe in corrispondenza della cartilagine metafisaria, il femore è il sito anatomico principalmente colpito (42%, con il 75% dei tumori nella regione distale), a seguire tibia (19% , di cui l'80% nella regione prossimale) e omero (10%, di cui 80% nella regione prossimale). Altre regioni anatomiche, non del tutto inusuali, sono rappresentate da mascella (8%) e bacino (8%).

Sono fondamentali ai fini dell'esito clinico: la sede anatomica, la stadiazione tumorale, la presenza/assenza di metastasi e recidive locali, il regime chemioterapico, la completa asportazione chirurgica, le dimensioni della massa e la necrosi dopo la chemioterapia preoperatoria, (Ottaviani, 2009).

1.3. Eziologia.

Le cause responsabili dell'insorgenza dell'osteosarcoma sono tuttora sconosciute. L'aumentata attività osteoblastica ed osteogenica durante l'adolescenza, per molti, rappresenta un fattore predisponente all'insorgenza della neoplasia. (Picci, 2006)

Fattori ambientali e genetici svolgono sicuramente un ruolo importante, così come età, sesso, etnia, sviluppo e altezza, eventuale presenza di anomalie ossee. Le cellule in rapida proliferazione sono più sensibili ad agenti oncogeni ed anomalie durante la mitosi, entrambi fattori che potrebbero favorire la trasformazione neoplastica. (Ottaviani, 2009)

1.3.1 Fattori genetici e predisposizione familiare

L'insulto ambientale e la suscettibilità genetica hanno un ruolo importante nell'eziologia, ben noti sono, per l'osteosarcoma, fattori di rischio quali: radiazioni ionizzanti e agenti alchilanti, patologie come il morbo di Paget, il retinoblastoma ereditario, la sindrome di Li-Fraumeni ed altre anomalie cromosomiche.

Sono state riconosciute importanti aberrazioni genetiche per l'eziologia dell'osteosarcoma. Le cellule tumorali esibiscono, infatti, cariotipi altamente complessi che difficilmente permettono di correlare una specifica aberrazione all'osteosarcoma. La messa a punto di tecniche quali l'ibridazione genomica comparativa (CGH, *comparative genomic hybridization*) e i DNA o cDNA *microarrays*, ha consentito negli ultimi anni un rapido sviluppo ed un incremento delle conoscenze, permettendo di identificare le regioni cromosomiche e/o i geni maggiormente implicati nella patogenesi dell'osteosarcoma.

A livello molecolare l'osteosarcoma rappresenta un "puzzle" di alterazioni genetiche: la patogenesi si basa sull'inattivazione di un gene che codifica per proteine con funzione di oncosoppressore, come ad esempio la fosfoproteina nucleare che agisce da fattore trascrizionale *p53* (codificato dal gene TP53) e la proteina del retinoblastoma *pRB* (codificata

dal gene RB1). Tali alterazioni geniche sono state osservate in un rilevante numero di casi di osteosarcoma.

Altre mutazioni descritte sono relative a geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, tra cui: l'amplificazione genica dei geni codificanti per MDM2 (mouse double minute 2 homolog) e CDK4 (cyclin-dependent kinase 4), suggerendo un loro coinvolgimento nella patogenesi dell'osteosarcoma. (Gamberi, 2000)

Il gene MDM2 codifica per una proteina che lega e inattiva la proteina p53 inibendo così la progressione nel ciclo cellulare; mentre CDK4 codifica per una proteina chinasi ciclina dipendente che è in grado di fosforilare e inattivare pRB. Può essere dedotto da ciò che l'incidenza di osteosarcoma è aumentata in diverse malattie genetiche associate ad alterazioni nella linea germinale di geni oncosoppressori. Esiste un gruppo di lesioni a basso grado di malignità, classificate come osteosarcomi parostali, che esibiscono un cariotipo relativamente poco complesso, caratterizzato dalla presenza di cromosomi ad anello contenenti sequenze amplificate del cromosoma 12 insieme a poche altre aberrazioni cromosomiche. Le sequenze amplificate del cromosoma 12, presenti in questi cromosomi ad anello, includono prevalentemente la regione 12q13-q15, dove sono localizzati i geni CDK4 e MDM2.

La proteina pRb regola la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. Alterazioni a carico del gene RB1 (13q14) sono presenti nel 30-75% dei casi di osteosarcoma sporadico. I pazienti affetti da retinoblastoma di tipo ereditario hanno un'elevata incidenza di tumori secondari extra oculari di cui il più frequente è l'osteosarcoma. È nota, infatti, una forte predisposizione genica a questo tumore, nei pazienti affetti da retinoblastoma di tipo ereditario, caratterizzata da una mutazione nelle linea germinale nel gene RB1 che comporta la perdita in omozigosi del gene stesso o la traduzione di un alterato prodotto genico. La prognosi di questi pazienti è leggermente peggiore rispetto ai pazienti che non presentano la medesima mutazione.

TP53 è localizzato sul braccio corto del cromosoma 17 (17p13), codifica per una fosfoproteina nucleare la cui espressione aumenta in risposta al danno al DNA inducendo un arresto del ciclo cellulare oppure apoptosi. A fronte della perdita del controllo della crescita, mutazioni a carico di TP53 sono responsabili della formazione tumorale. Il gene risulta mutato o codifica per un prodotto proteico non funzionale in più del 50% dei tumori umani.

La sindrome di Li-Fraumeni è una malattia rara a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da un elevato rischio di sviluppare osteosarcoma, circa il 3% dei bambini affetti da questa sindrome presenta osteosarcoma. È frequentemente associata alla comparsa di diversi tumori, come l'osteosarcoma e i sarcomi dei tessuti molli nei bambini, carcinoma ovarico in giovani donne, tumori cerebrali e altre forme tumorali familiari. In circa il 50-70%

delle famiglie è stata identificata una mutazione germinale nel gene TP53, così come in alcune famiglie o pazienti sporadici suscettibili alla sindrome. Ancora, la sindrome di Rothmund-Thomson è una genodermatosi caratterizzata da un tipico rash facciale (poichiloderma) associato a bassa statura, ritardo nella crescita pre e post natale, capelli ciglia e sopracciglia rade o assenti, cataratta giovanile, invecchiamento precoce, anomalie scheletriche e predisposizione al cancro tra cui l'osteosarcoma. Pazienti affetti da questa sindrome presentano elevata instabilità genomica e un aumento di suscettibilità ad agenti in grado di causare danni al DNA, come le radiazioni ultraviolette e ionizzanti, e agli effetti tossici della chemioterapia.

Negli ultimi 10 anni sono state raccolte molteplici evidenze che indicano come l'alterazione coordinata di P53 e RB1 sia un evento chiave per la trasformazione neoplastica, in diversi tumori. L'esempio più chiaro di come P53 e RB1 possano cooperare in questo processo deriva proprio da studi compiuti sull'OS. In base a diverse evidenze sperimentali, è ormai chiaro come in molti casi l'osteosarcoma insorge quando entrambi gli alleli del gene RB1 risultano alterati o deleti, con conseguente perdita della funzionalità della proteina RB1. Oltre a questo però, affinché la cellula si trasformi in cellula osteosarcomatosa, è necessaria l'insorgenza di alterazioni anche a carico del gene P53. In molti casi, l'osteosarcoma può quindi considerarsi come il risultato della perdita della funzione normale dei prodotti dei geni oncosoppressori RB1 e P53, che appare avvenire in maniera "coordinata".

Attualmente si ritiene che la mutazione o l'inattivazione del gene RB1 può agire come evento scatenante la trasformazione di una cellula in senso osteosarcomatoso, mentre la successiva alterazione del gene P53 determinerebbe la malignità della cellula neoplastica. (Ottaviani, 2009; Longhi, 2006)

1.3.2. Fattori ambientali

Radiazioni ionizzanti, agenti alchilanti, fattori perinatali, virus e traumi sono considerati fattori esterni che potrebbero aumentare il rischio di sviluppare osteosarcoma.

Le radiazioni ionizzanti sono dei fattori eziologici ben documentati, vengono comunemente impiegate nel trattamento terapeutico di condizioni patologiche sia benigne che maligne e sono frequentemente associate alla comparsa di osteosarcoma (circa il 3% dei casi). È l'unico fattore eziologico riconosciuto come causa predisponente all'insorgenza di OS (Picci, 2007) Tra tutti i sarcomi radio-indotti l'osteosarcoma è il più comune e l'età media dei pazienti è pari a 45,6 anni (10-84 anni).

Nel 21,4% dei casi sono presenti metastasi.

Ancora l'utilizzo di radio 224, per il trattamento della tubercolosi o della spondilite anchilosante, è implicato nello sviluppo di osteosarcoma in un'ampia percentuale di pazienti

al di sotto dei 20 anni. Sebbene molti casi di osteosarcoma siano stati riportati in soggetti sopravvissuti alla bomba atomica nel 1945 in Giappone o alle radiazioni dell'incidente nucleare di Chernobyl del 1986 nessuna correlazione diretta è stata trovata tra il tumore e l'esposizione a dosi massicce di questi agenti.

Agenti alchilanti quali: mostarde azotate, ciclofosfamide, fosfamide e/o antracicline possono contribuire allo sviluppo di osteosarcoma indipendentemente dalla radioterapia, nonostante in questo caso sia fondamentale la predisposizione genetica. (Ottaviani, 2009).

1.3.3. Traumi

Anche i traumi come fattori eziologici sono stati scartati. Sebbene la diagnosi avvenga frequentemente in seguito ad una frattura ossea, non è stato trovato alcun rapporto diretto. Il trauma, molto comune nel gruppo di età tipico dei soggetti affetti da osteosarcoma, rivela la malattia ma non la causa. (Longhi, 2006)

1.4. Presentazione clinica e diagnosi

Il segno clinico principale è rappresentato dal dolore, questo inizialmente è transitorio, diviene intenso e persistente con il tempo. Altra manifestazione clinica, che compare dopo il dolore, è il gonfiore che ricalca la massa sottostante. La tumefazione ha una consistenza che varia in base al tipo di osteosarcoma: dura nella forma osteogenetica, molle e fissa nella forma osteolitica, più raramente pulsante nella forma telangectasica. La cute della zona colpita si presenta lucida e tesa, con dilatazione delle vene superficiali. A questo livello sono frequenti le fratture patologiche.

I fattori da tenere in considerazione ai fini di una corretta diagnosi presuppongono una stretta collaborazione tra il patologo il clinico e il radiologo. Per il clinico è fondamentale un attento e obiettivo esame anamnesico da integrare a quello clinico e radiografico. Assumono pertanto importanza l'età d'insorgenza della neoplasia, la localizzazione, la sintomatologia ed infine l'aspetto radiografico.

Gli esami di laboratorio mostrano nel 30% dei casi un aumento dei livelli di lattato deidrogenasi (LDH) e soprattutto di fosfatasi alcalina (AP). In assenza di metastasi un anormale valore di AP è correlato all'aumento di volume della massa tumorale e alla prognosi. Ancora la valutazione dell'emocromo e della velocità di eritrosedimentazione (VES) sono importanti fattori da valutare soprattutto in caso di ricadute. (Longhi, 2006; Bacci, 2002)

Alla diagnosi, l'osteosarcoma presenta nell'80% dei casi unica localizzazione ossea e nel 20% dei pazienti è accompagnato da metastasi. Come già detto sono frequenti le metastasi

polmonari a seguire quelle ossee, mentre altre sedi anatomiche sono poco comuni.

Gli aspetti radiografici possono essere estremamente variabili. Tanto più è alto il livello di ossificazione, tanto più facile è la diagnosi radiografica attraverso il riscontro di radiopacità.

Nella maggior parte dei casi, la lesione appare come un'area mista litica-addensante dell'osso, con estensione ai tessuti molli limitrofi. La presenza di una reazione periosteale, con produzione di trabecole ossee perpendicolari rispetto alla superficie, al confine tra l'osso corticale normale e quello infiltrato dalla neoplasia, rappresenta un utile parametro radiografico diagnostico chiamato "triangolo di Codman".

In base all'istotipo, la lesione può mostrare differenti livelli di mineralizzazione oppure essere a carattere puramente litico.

Altri strumenti diagnostici sono rappresentati dalla tomografia computerizzata e dalla risonanza magnetica. La prima è utile nell'evidenziare l'estensione intramidollare del tumore, eventuale presenza di metastasi ed infine nella valutazione della compromissione neurovascolare sia delle articolazioni che della regione corticale ossea; la seconda consente di valutare con una certa precisione la dimensione del tumore come anche la sua estensione intramidollare. Queste moderne tecniche di imaging rappresentano anche uno strumento guida per il chirurgo nel compiere resezioni adeguate e non eccessivamente demolitive.

La biopsia è fondamentale sia per la diagnosi che per la corretta stadiazione del tumore e unitamente all'esame istologico permette la diagnosi differenziale, non sempre è di facile interpretazione. La biopsia se non eseguita in maniera corretta potrebbe inficiare la chirurgia conservativa laddove possibile. In caso di sospetto di tumore osseo maligno è preferibile che il prelievo bioptico sia eseguito dal chirurgo che si occuperà anche dell'intervento definitivo.

La scelta della sede del prelievo bioptico deve seguire precisi criteri chirurgici oncologici, è indispensabile tenere conto della via d'accesso dell'intervento chirurgico definitivo per permettere l'asportazione del pezzo bioptico in blocco con il tumore.

Al fine di evitare prelievi in aree necrotiche o non rappresentative, è indispensabile tenere conto delle indicazioni dell'imaging pre-operatorio. (Longhi, 2006; Picci, 2007)

1.5. Terapia

Fino al 1970 il trattamento terapeutico per l'osteosarcoma prevedeva il ricorso o alla chirurgia (soprattutto come amputazione) o alla radioterapia e mai in combinazione.

Nonostante una buona risposta locale, molti pazienti morivano in poco tempo per l'insorgenza di metastasi, soprattutto polmonari. Con la sola chirurgia, la sopravvivenza libera da malattia a cinque anni era del 12%, e tre pazienti su quattro morivano entro due anni dalla diagnosi. Per questo motivo, nel 1970 è stata introdotta la chemioterapia adiuvante post-operatoria. La

doxorubicina (DX) ed il methotrexate (MTX) sono stati i primi farmaci ad essere impiegati con successo (Rosemburg, 1979; Campanacci, 1981).

Nel 1978 è stata introdotta da Rosen la chemioterapia neoadjuvante pre-operatoria. Oltre all'eliminazione delle micrometastasi e il miglioramento dei pazienti con malattia localizzata, l'obiettivo di questo approccio terapeutico era quello di distruggere le cellule del tumore primitivo e aggredire subito le cellule metastatiche che si trovano in circolo (anche se non sono rilevabili) già al momento della diagnosi nella maggior parte dei pazienti. Ben presto si è poi visto che, oltre a quanto detto sopra, la chemioterapia preoperatoria permetteva anche di ridurre le dimensioni della massa tumorale e permetterne una migliore resezione chirurgica (con limitazione delle amputazioni), nonché rendeva anche possibile determinare la risposta alla chemioterapia preoperatoria attraverso la valutazione istologica della necrosi tumorale chemioindotta con la possibilità di modulare in base a queste informazioni la fase post-operatoria del trattamento (Rosen, 1982).

La valutazione della necrosi presente nella sede tumorale dopo chemioterapia pre-operatoria è un fattore prognostico importante ed è correlato con la sopravvivenza sia complessiva che libera da malattia (Bacci, 2003). Attualmente la necrosi è valutata secondo la classificazione di Huvos (Grado I, assenza di necrosi; Grado II, necrosi compresa tra il 50% e il 90%; Grado III, necrosi compresa tra il 90% e il 100%; Grado IV, necrosi totale del 100%). Altro modello di classificazione, riportata dall'esperienza dell'Istituto Ortopedico Rizzoli è quella proposta dal Dott. Piero Picci, secondo cui l'entità della necrosi chemioindotta deve essere quantificata attraverso l'esame anatomico-patologico dell'intera massa neoplastica asportata chirurgicamente. Una necrosi indotta dalla chemioterapia presente in almeno il 90% del tessuto tumorale è associata a una buona risposta al trattamento chemioterapico pre-operatorio (in pazienti noti come "Good responders"), mentre una percentuale di necrosi inferiore al 90% è interpretata come una scarsa risposta (in pazienti noti come "Poor responders"). Questi dati fanno riferimento a un'unica ampia casistica istituzionale composta da 1058 pazienti affetti da osteosarcoma ad alto grado localizzato alle estremità di cui nel 59% dei casi la risposta alla chemioterapia pre-operatoria è stata buona, con necrosi pari o maggiore del 90%, mentre il restante 41% dei casi presentava un dato di necrosi inferiore al 90%. La prognosi era, pertanto, strettamente correlata alla risposta istologica, infatti la sopravvivenza complessiva ai 5 anni per i "good responders" è stata pari al 68%, contro il 52% per i "poor responders" (P=0,0001).

Oggi la valutazione del grado di necrosi tumorale in risposta alla chemioterapia pre-operatoria permette di suddividere i pazienti in diversi gruppi di rischio al fine di ricevere trattamenti terapeutici differenziati in base alla prognosi. (Picci P, 1996)

Per migliorare la risposta al trattamento farmacologico di pazienti poco responsivi alla chemioterapia, i protocolli prevedono l'intensificazione della chemioterapia post-operatoria in termini di dosi e tempo, come ad esempio il protocollo IOR/OS2 adottato dall'Istituto Ortopedico Rizzoli che prevedeva regimi di chemioterapia pre e post-operatoria con i chemioterapici classici (DX, MTX, CDDP e IFO) solo nei pazienti *poor responders* con necrosi chemioindotta < del 90% e positivi alla proteina P-glyco Protein o ABCB1, principale responsabile della farmacoresistenza alla doxorubicina (Serra, 1995).

Il grado di necrosi tumorale dopo chemioterapia pre-operatoria è un fattore prognostico avverso correlato alla risposta al trattamento farmacologico e alla sopravvivenza. Infatti, i pazienti con necrosi chemioindotta < del 90% identificano un gruppo di pazienti non responsivi al trattamento convenzionale perciò elegibili per trattamenti intensificati.

Unitamente alla chemioterapia neoadjuvante, la chirurgia conservativa è stata la scelta d'elezione grazie anche allo sviluppo di protesi migliori e facilmente disponibili (prima del 1980 le protesi venivano costruite su misura e ciò richiedeva tempi lunghi). Ciò insieme al progresso delle tecniche chirurgiche ha permesso di limitare le amputazioni in circa 80-85% dei casi preservando gli arti e la loro funzionalità il più possibile. (Wafa, 2006)

Per quanto concerne l'esperienza italiana, tra il 1997 e il 2000 è stato condotto il primo studio multicentrico (Italia e Scandinavia) pianificato dall'Italian Sarcoma Group e dallo Scandinavian Sarcoma Group (ISG/SSG 1997-2000) in cui è stato valutato il livello di espressione di ABCB1 in pazienti affetti da osteosarcoma ad alto grado al momento dell'arruolamento nel protocollo chemioterapico (e non in fasi successive come accadeva nei precedenti studi retrospettivi). Tale protocollo (Marzo 1997–Settembre 2000) prevedeva regimi di poli-chemioterapia pre e post-operatoria basati per la prima volta sull'utilizzo dei quattro chemioterapici DOX, MTX, CDDP, IFO in pazienti positivi e negativi ad ABCB1, mentre prevedeva alte dosi di IFO (HDIFO) solo per i *poor responder* ABCB1 positivi. L'IFO per la prima volta è stata usata anche nei protocolli pre-operatori. Un importante dato emerso è che l'elevata espressione di ABCB1 in pazienti affetti da osteosarcoma ad alto grado al momento della diagnosi correla con una prognosi avversa (% sopravvivenza pari al 46.9% nei pazienti ABCB1 positivi contro l'82.5% dei pazienti con bassi livelli di ABCB1). Inoltre nello stesso studio circa il 92% di 182 pazienti affetti da osteosarcoma dell'estremità non ha subito amputazione grazie proprio alla chemioterapia neoadjuvante. (Bacci, 2002) (Serra, 2006)

Oggi l'amputazione è indicata in quei pazienti dove un'asportazione ampia del tumore non sia possibile oppure quando l'asportazione della neoplasia abbia come conseguenza un arto non

funzionale. Deve essere presa in considerazione in caso di recidiva locale e nei casi di complicazioni importanti secondarie, come un'infezione, ad intervento conservativo, le quali potrebbero ritardare o far sospendere il trattamento chemioterapico, quindi compromettere la prognosi del paziente. In Tabella 1 sono riportati i protocolli di chemioterapia neoadiuvante applicati dal 1983 al 2000, nel trattamento di pazienti con osteosarcoma ad alto grado presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli (Bologna, Italia).

Protocollo	Periodo		Necrosi $\geq 90\%$	Necrosi $<90\%$
IOR/OS1	1983-1986	MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP e BCD
IOR/OS2	1986-1989	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP, IFO e VP16
IOR/OS3a	1990-1991	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP e IFO
IOR/OS3b	1991-1992	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP	
IOR/OS5	1993-1995	DX, MTX, CDDP e IFO	DX, MTX, CDDP e IFO	DX, MTX, CDDP e IFO (più cicli con IFO)
ISG/SSG1	1997-2000	DX, MTX, CDDP e IFO	DX, MTX, CDDP e IFO	DX, MTX, CDDP e IFO (nei poor responders con necrosi $< 99\%$: più cicli con CDDP)

Tabella 1 Protocolli di chemioterapia neoadiuvante eseguiti presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli dal 1983 al 2000. DX: doxorubicina, MTX: methotrexate, CDDP: cisplatino, BCD: bleomicina, IFO: ifosfamida, VP16: etoposide

Parteno da tutte queste evidenze sia cliniche che sperimentali è stato avviato nel giugno 2011 il nuovo protocollo di trattamento dell'osteosarcoma ad alto grado: ISG-OS2, che prevede un trattamento differenziale in base alla stratificazione dei pazienti in due gruppi: pazienti esprimenti bassi livelli di ABCB1 e pazienti esprimenti alti livelli. Quest'ultimo gruppo rappresenta la base per l'identificazione di un gruppo di pazienti affetti da osteosarcoma ad alto grado potenzialmente non responsivi al trattamento chemioterapico e, quindi, elegibili per trattamenti intensificati (HDIFO) e per i quali è previsto un trattamento aggiuntivo con un immunostimolatore che sia in grado di aumentare l'infiltrazione dei macrofagi nel tumore, in quanto un aumento dell'infiltrato macrofagico correla con una prognosi migliore (principio attivo: *muramyl tripeptide phosphatidylethanolamina*-MTP-TE, MEPACT[®]) (Hattinger, 2010). I pazienti riceveranno quindi trattamenti differenziati in base alle specifiche caratteristiche del tumore da cui sono affetti. Sarà necessario ancora qualche anno per ottenere i primi risultati in termini di risposta al trattamento farmacologico e di sopravvivenza con

l'utilizzo del nuovo protocollo ISG-OS2. Al momento la proteina di membrana ABCB1 è utilizzata solo come marcatore prognostico ma non come bersaglio terapeutico.

Concludendo, ad oggi non è stato identificato un trattamento chemioterapico standard. Molti studi randomizzati riportati in letteratura mettono a confronto l'efficacia di diverse combinazioni chemioterapiche, prendendo in considerazione anche i dati riportati da studi non randomizzati è chiaro che i migliori risultati vengono ottenuti da regimi chemioterapici che prevedono alte dosi di metotrexate e cisplatino, doxorubicina e ifosfamide a dosi standard.

1.5.1 Doxorubicina

Gli antibiotici antraciclinici sono considerati tra i più utili farmaci antineoplastici mai sviluppati per la terapia di molte neoplasie. La *doxorubicina* (DX) e la *daunorubicina* (DNR) sono due analoghi isolati per la prima volta nel 1960 dal microrganismo *Streptomyces peucetius var. caesioides*.

La DX (*6-metilen-5-idrossitetraclina*) presenta quattro regioni caratteristiche costituite dal nucleo aromatico, due nuclei idrochinonici che consentono di funzionare come farmaco accettore e donatore di elettroni, da una catena idrossichetonica e da un residuo zuccherino atipico (daunosamina) legato tramite legame glicosidico. (Figura 1) (Minotti, 2004).

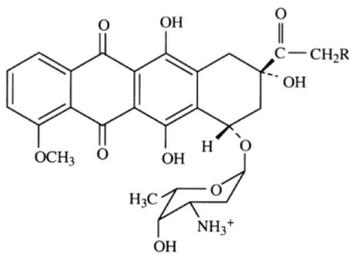


Figura 1: Struttura chimica della doxorubicina.

La tossicità esercitata dalla DX sulle cellule neoplastiche è conseguenza di meccanismi molto complessi: (1) possiede un'affinità elevata per il DNA, si accumula a livello

nucleare e intercalandosi in modo aspecifico comporta un blocco sia della trascrizione che della sintesi di DNA, attività mediata da modificazioni dell'enzima topoisomerasi II che portano alla formazione di un complesso ternario con l'enzima ed il filamento di DNA che previene lo svolgimento della doppia elica; (2) lega le membrane alterandone la fluidità e il trasporto di ioni; (3) attraverso un processo enzimatico di riduzione viene prodotto un radicale libero semichinonico e radicali liberi dell'ossigeno in grado di danneggiare il DNA stesso.

Quest'ultimo meccanismo potrebbe essere alla base della cardiotossicità indotta tipicamente dalla DX attraverso il danno delle membrane plasmatiche causato dai radicali dell'ossigeno con conseguente dilatazione del reticolo sarcoplasmatico, vacuolizzazione del citoplasma, rigonfiamento dei mitocondri e aumento del numero dei lisosomi. (Zunino F, 1990; Chou and Gorlick, 2006)

La DX è uno dei più importanti farmaci antineoplastici, con applicazioni cliniche di rilievo in diversi carcinomi tra cui l'osteosarcoma. E' usata in associazione ad altri farmaci con i quali

spesso da luogo a potenziamento, producendo remissioni più prolungate di quelle ottenute quando è utilizzato come agente singolo. Analogamente a molti altri farmaci citotossici, la DX provoca depressione midollare ma la tossicità più specifica è rappresentata da una tossicità cardiaca potenzialmente irreversibile e correlata alla dose cumulativa. Un secondo aspetto tossicologico è rappresentato dal quasi universale verificarsi di alopecia grave o totale ai dosaggi standard. (B.G. Katzung, Farmacologia generale e clinica, Piccin)

Negli ultimi 20 anni molti studi hanno messo in evidenza, in pazienti affetti da osteosarcoma, l'insorgenza di potenziali fenomeni di farmacoresistenza o di mancata responsività durante il trattamento. (Hattinger, 2010)

La resistenza ai farmaci è uno dei problemi più gravi della chemioterapia antineoplastica. Sperimentalmente la farmacoresistenza specifica per un singolo farmaco è generalmente basata su modificazioni geniche della cellula tumorale con *amplificazione* o aumentata espressione di uno o più geni specifici. In altri casi si manifesta una multi-resistenza a tutta una serie di agenti neoplastici che compare solo dopo il contatto con uno solo di essi. Questa forma di multi-resistenza è associata ad un aumento dell'espressione del gene MDR1 (*Multi Drug Resistance-1*) che codifica la sintesi di una glicoproteina della superficie cellulare nota come P-glyco Protein (PgP) o ABCB1 coinvolta nel meccanismo di estrusione dei farmaci così come di numerose altre sostanze. Nel caso della DX sono riconosciuti diversi meccanismi di farmacoresistenza tra cui una migliore detossificazione operata dalla cellula tumorale, un aumento dell'efficienza dei meccanismi di riparo del DNA, alterazioni della topoisomerasi II il cui compito è di riparare le lesioni al DNA indotte dai farmaci. Sicuramente il principale meccanismo di resistenza nell'osteosarcoma è rappresentato proprio dalla sovraespressione di ABCB1 che trasporta attivamente la DX al di fuori della cellula (figura 5). (Chen, 1990; Serra, 1995).

E' stato, infatti, dimostrato che la sovraespressione di ABCB1 è associata ad una minore risposta clinica al trattamento chemioterapico e, conseguentemente, ad una prognosi avversa nei pazienti con osteosarcoma convenzionale trattati con protocolli chemioterapici neoadjuvanti nei quali la DX è il farmaco principale. Inoltre, aumentati livelli di ABCB1 insieme al volume della massa tumorale e all'età sono fattori di cui si tiene considerazione al fine di suddividere i pazienti in sottogruppi ad alto rischio di ricaduta per i quali è possibile considerare trattamenti terapeutici alternativi che possano portare dei benefici. (Baldini 1995; Pakos & Ioannidis, 2003; Serra, 2003, 2006).

1.5.2 Methotrexate

Il Methotrexate (*4-Amino-10-methylfolate acid hydrate - MTX*) è un antagonista dell'acido folico da cui differisce per la sostituzione di un gruppo amminico con un gruppo idrossilico in posizione 4 dell'anello di pteridina.

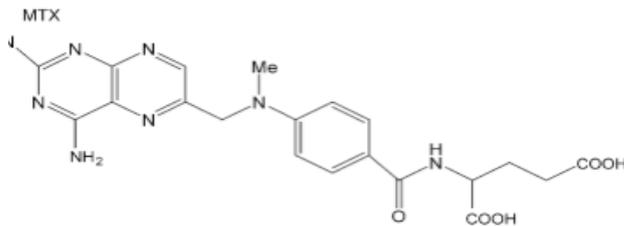


Figura 2: Struttura chimica del methotrexate.

MTX lega il sito catalitico della diidrofolato riduttasi (DHFR), interferendo con la sintesi della forma ridotta dell'acido folico stesso, che è capace di fungere da accettore delle unità

monocarboniose. L'assenza di questo cofattore interrompe la sintesi di timidilato, di nucleotidi purinici e degli aminoacidi serina e metionina, inibendo la sintesi di DNA, RNA e proteine. Il MTX è dunque un farmaco fase S specifico, impiegato nel trattamento sia di patologie auto-immuni (artrite reumatoide) e neoplasie tra cui l'osteosarcoma.

A basse dosi (inferiori a 10 μM) il methotrexate entra nella cellula per trasporto attivo attraverso l'interazione con un trasportatore specifico di membrana: *Reduced Folate Carrier* (RFC), mentre a dosi più elevate il farmaco entra nella cellula principalmente per trasporto passivo.

Una volta all'interno della cellula, il methotrexate è immediatamente coniugato a residui di acido poligluttammico dall'enzima *folipolighuttammato sintetasi* (FPGS). La reazione di poligluttammazione ha come conseguenza l'aumento di dimensioni della molecola di MTX e la sua ionizzazione che impedisce al farmaco di uscire dalla cellula per sola diffusione passiva, come avviene invece per i folato monogluttammati. (Takimoto CH, 1996)

La resistenza delle cellule tumorali al methotrexate è stata attribuita ai seguenti meccanismi: (1) riduzione del trasporto intracellulare del farmaco, dovuto a una riduzione dei livelli di espressione di RFC; (2) mutazioni a carico del gene che codifica per l'enzima DHFR con la conseguente sintesi di una molecola caratterizzata da minore affinità per il farmaco; (3) ridotta formazione di poligluttammati, con minore accumulo del farmaco a livello intracellulare; (4) maggiore sintesi di DHFR in seguito ad amplificazione e/o sovraespressione del gene unitamente alla riduzione nel numero di copie del gene RFC, con conseguente raggiungimento di livelli intracellulari di enzima tali da non poter essere più inibiti in maniera efficiente dal methotrexate accumulatosi nel citoplasma; (5) aumentato efflusso del farmaco ad causa di alcuni ABC *transporters* (ABCC2, ABCC4, ABCC6 e ABCG2) dimostrato in modelli sperimentali rappresentati da linee di osteosarcoma resistenti al MTX (Serra, 2004), oppure (6) a causa dell'aumento dei livelli dell'enzima *gamma-glutamyl hydrolase* che

idrolizza i coniugati MTX-poliglutammato, favorendone la fuoriuscita dalla cellula per trasporto passivo (Chou, 2006). Nel caso dell'osteosarcoma la farmacoresistenza al MTX (figura 5), sia sperimentale che clinica, è associata principalmente alla sovraespressione/amplificazione del gene DHFR e alla riduzione dell'espressione di RFC di membrana che veicola il farmaco all'interno della cellula. È stato dimostrato, tramite immunostochimica su una serie di campioni clinici di osteosarcoma provenienti da pazienti trattati con protocolli chemioterapici basati sull'utilizzo di methotrexate, che aumentati livelli di DHFR alla diagnosi sono associati ad un decorso clinico sfavorevole (Hattinger et al, 2009; Scionti, 2008; Serra et al, 2004). Così come una riduzione nei livelli di espressione del trasportatore RFC è molto comune in pazienti con scarsa risposta istologica alla chemioterapia pre-operatoria (Guo, 1999).

Oltre a quanto detto, dati sperimentali sembrano indicare nella presenza di alterazioni del gene *RBI*, un possibile fattore in grado di interagire con il livello di espressione del gene DHFR, con importanti possibili conseguenze sulla farmacoresistenza al methotrexate per l'osteosarcoma. Sperimentalmente è stato dimostrato come linee cellulari di osteosarcoma umano, nelle quali la funzionalità del gene *RBI* risulta compromessa o assente, presentano livelli dell'enzima DHFR più elevati della norma e risultano naturalmente più resistenti al methotrexate (Serra M, 2004).

Al fine di aggirare i meccanismi di farmacoresistenza sono stati sviluppati nuovi farmaci, tra cui il *trimetrexate*, analogo strutturale del MTX che non richiede il trasporto da parte di RFC per entrare all'interno della cellula ed è in grado di inibire direttamente DHFR, pertanto è utilizzato nel trattamento di tumori resistenti al methotrexate (Chou and Gorlick, 2006).

1.5.3 Ifosfamide

L'ifosfamide (*N,3-bis(2-cloroetil)tetraidro-2H-1,3,2-oxazafosforina-2-amino 2-ossido* -IFO) è un agente alchilante bifunzionale usato nel trattamento di molti tumori. Figura 3

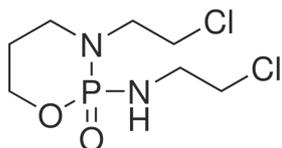


Figura 3: Struttura chimica Ifosfamide.

È un farmaco strutturalmente molto simile al ciclofosfamide, ma presenta uno spettro di attività e tossicità diversi. Tutti gli agenti alchilanti polifunzionali esercitano effetti citotossici attraverso il trasferimento di gruppi alchilici ai vari costituenti cellulari. Il meccanismo d'azione

presuppone una ciclizzazione intramolecolare con la formazione di uno ione etilenimonio che, direttamente o indirettamente attraverso la formazione di un carbocatione, trasferisce un gruppo alchilico a un costituente cellulare. Il principale sito di alchilazione del DNA è la posizione N⁷ della guanina, anche se altre basi vengono alchilate tra cui l'adenina in posizione N¹ e N³, la citosina in posizione N³ e la guanina in posizione O⁶. Queste interazioni sono

responsabili della scissione del DNA conseguenziali alla formazione di basi anomale o a depurinazione del DNA da escissione della guanina. Il fenomeno del cross-linking al DNA (tipico degli agenti alchilanti bifunzionali) è fondamentale per il farmaco nell'esplicare la sua citotossicità sulle cellule in fase moltiplicativa. Anche se gli agenti alchilanti non sono ciclo-specifici, le cellule sono più sensibili all'alchilazione nella tarda fase G1 e in fase S con conseguente blocco in fase G2.

L'ifosfamide è un profarmaco attivato *in vivo* dal sistema microsomiale di ossidasi a funzione miste citocromo-P-450 dipendente (CYP), in particolare dai sottotipi CYP3A4 e CYP2B6 che prendono parte all'idrossilazione dell'atomo di carbonio C⁴ dell'anello tetraidro-2H-1,3,2-oxazafosforina. La risultante 4-idrossiifosfamide (4-OH-IFO) è in equilibrio con l'aldoifosfamide, che una volta trasportata per via ematica ai tessuti normali e neoplastici è scissa in fosforamide mostarda (metabolita finale bi-alchilante del DNA) e nel composto nefrotossico acroleina.

La principale tossicità degli agenti alchilanti si ha a livello del midollo emopoietico con depressione dose-correlata. (Katzung, 2006)

La farmacoresistenza a questi agenti è da ricondurre a una maggiore capacità di riparo dei danni al DNA, ad una ridotta permeabilità delle membrane, ad un'aumentata formazione di glutatione responsabile dell'inattivazione degli agenti alchilanti attraverso una reazione di coniugazione, o ancora ad un'aumentata sintesi di glutatione S-transferasi, che delle reazioni di coniugazione è il catalizzatore. (Dirven, 1995)

L'uso dell'ifosfamide nei regimi di chemioterapia per i tumori muscolo-scheletrici risale ai primi anni '80. Nel caso dell'osteosarcoma ad alto grado è stato visto in uno studio randomizzato che l'uso di quattro farmaci in combinazione -DX, CDDP, MTX e IFO- porta a una minore sopravvivenza rispetto all'utilizzo dei soli tre chemioterapici DX, CDDP e MTX. Tuttavia la terapia combinata dei quattro farmaci unitamente ad un agente immunostimolatore (muramyl tripeptide phosphatidylethanolamina-MTP-TE) mostra un'attività maggiore. L'IFO è incluso negli attuali protocolli per la cura dell'osteosarcoma, nonostante il suo ruolo non sia ancora ben definito. (Hattinger, 2010)

1.5.4 Cisplatino

Il cisplatino (*cis-diclorodiamminoplatino*^{II}, CDDP) è un composto metallico inorganico neutro a geometria planare quadra che interagisce con il DNA. Le proprietà antitumorali del cisplatino sono state descritte per la prima volta alla fine degli anni '60 da Rosenberg e collaboratori, i quali osservarono che complessi neutri del platino inibiscono la divisione cellulare di *Escherichia Coli* e ne determinano la crescita in forma filamentosa (Rosenberg B,

1969). E' tra i più potenti farmaci antitumorali, impiegato nel trattamento chemioterapico di molti tumori solidi, quali il carcinoma polmonare a piccole cellule e non a piccole cellule, il carcinoma dell'esofago, tumori del tratto genitourinario, specie quelli del testicolo, delle ovaie e della vescica, e ancora l'osteosarcoma. (Galanski M, 2005).

Il DNA è sicuramente il bersaglio principale del cisplatino e gli addotti che si vengono a formare tra il platino(II) centrale della molecola di cisplatino e le basi del DNA portano all'attivazione dell'apoptosi o della necrosi a seconda della linea cellulare tumorale e/o della dose del farmaco. Tuttavia, esistono ancora lacune riguardo la conoscenza degli effetti farmaco-mediati che portano all'inibizione della sintesi del DNA, alla soppressione dei meccanismi di trascrizione del messaggero, agli effetti farmaco-mediati sul ciclo cellulare e all'apoptosi.

Il CDDP entra nella cellula mediante diffusione passiva ed è stato dimostrato che la proteina trasportatrice del rame CTR1 è coinvolta, come possibile meccanismo di trasporto attivo, nella sua incorporazione all'interno della cellula (Holzer, 2006). Dentro la cellula, il cisplatino (poiché è una molecola neutra) è attivato attraverso una serie di reazioni chimiche che comportano il legame di molecole di acqua al platino(II) centrale in sostituzione degli ioni cloro. Questa reazione è facilitata dal fatto che nel compartimento intracellulare la concentrazione degli ioni cloro è significativamente più bassa (4 mM circa) rispetto al compartimento extracellulare (Galanski M, 2005).

La specie attiva idrata che ne deriva è un agente elettrofilo bifunzionale in grado di legarsi con qualsiasi sito nucleofilo presente sul DNA e interagire con glutatione, metionina e metallotioneine che ne potrebbero causare l'inattivazione (Siddik ZH, 2003). Il CDDP interagendo con il DNA instaura legami crociati tra i filamenti complementari con la conseguente formazione di addotti CDDP-DNA e distorsioni strutturali della doppia elica.

Il principale sito di legame è N⁷ della guanina e le basi pirimidiniche citosina e uracile in posizione N³. Per ospitare la struttura planare quadrata del CDDP si verificano rotture significative tra le basi e uno snodamento della doppia elica.

Soltanto negli ultimi anni è stata compresa la sequenza di eventi che, dalla formazione di addotti, porta all'apoptosi quale effetto citotossico. Ciò ha inizio con l'individuazione del danno al DNA ad opera di circa 20 proteine (*damage recognition proteins*) che riconoscono e legano le distorsioni sul DNA causate dalla formazione di addotti del platino. Tra le proteine coinvolte nel riconoscimento del danno sono comprese: hMSH2 o hMutSa, componenti del *mismatch repair* (MMR) *complex*; proteine del *nonhistone chromosomal high-mobility group* (HMG1 and HMG2), le quali hanno una forte affinità per il DNA modificato, aumentano la citossicità del cisplatino legandosi agli addotti di DNA e ostruendo i meccanismi di

riparazione cellulare, l' *RNA polymerase I transcription* “*upstream binding factor*” (hUBF) e il fattore di trascrizione “*TATA binding protein*”(TBP).

Non è chiaro se queste proteine riconoscano insieme o da sole il danno al DNA, sicuramente è interessante come alcune proteine, tra cui HMG1 e quelle del complesso MMR, abbiano dimostrato una maggiore preferenza per gli addotti del CDDP rispetto agli addotti causati da analoghi del cisplatino stesso (oxaliplatino). Sebbene il putativo ruolo delle proteine di riconoscimento sia quello di trasdurre i segnali di danno al DNA agli effettori a valle della cascata di segnale, la loro rilevanza biologica non può essere limitata solo a questa funzione. Ad esempio, la proteina HMG1 favorisce la citotossicità del CDDP interagendo prima con l'addotto CDDP-DNA e poi prevenendo la riparazione del danno. Ancora, hUBF e TBP sono coinvolte nella fase iniziale della trascrizione ad opera della RNA polimerasi I ed è possibile che vengano sequestrati dagli addotti del cisplatino con conseguente inibizione della trascrizione stessa innescando così la trasduzione dei segnali di danno al DNA. L'inibizione della trascrizione può servire come un innesco per la trasduzione di segnali di danno al DNA. Sembra ragionevole supporre, quindi, che ciascuna delle proteine di riconoscimento può avviare uno o più eventi specifici, in modo che il danno al DNA sia responsabile di diversi effetti biologici apparentemente non correlati fra loro. Ciò è coerente con la comprensione che addotti del cisplatino inibiscono la replicazione e i processi trascrizionali, anche se tali effetti biologici non sono necessariamente correlati direttamente con la morte cellulare. Pertanto i segnali pro-apoptotici e pro-sopravvivenza, conseguenziali all'esposizione al CDDP sono attivati contemporaneamente e la relativa intensità e/o durata di ciascuno di essi dipende dagli effettori a valle che determinano il destino finale della cellula. (Siddik, 2003)

Non sono ben chiari gli effetti del CDDP sul ciclo cellulare, ma è in grado di attivare uno dei checkpoint di controllo del ciclo cellulare che porta all'inibizione del complesso CDK2/ciclina A o B e arresto in fase G2/M, che a sua volta facilita l'attività citotossica del CDDP ma è anche necessario per consentire la riparazione del danno. Il principale meccanismo di riparo coinvolto è il *nucleotide excision repair* (NER), che rimuove gli addotti promuovendo la sopravvivenza cellulare. Solo quando la riparazione del danno è incompleta, in caso ad esempio di danno esteso, le cellule vanno incontro ad apoptosi.

Le vie di trasduzione del segnale, che portano le cellule all'apoptosi, coinvolgono diverse proteine (ATR, p53, p21, p73, CHK1 e 2, MAPK) come mostrato in figura 4.

I più comuni meccanismi responsabili della resistenza al CDDP nelle cellule tumorali comprendono: (1) un minor accumulo intracellulare o un aumento dell'efflusso extracellulare del farmaco ad opera di ABC transporters, (2) l'aumento della detossificazione cellulare mediata dal sistema glutazione ridotto (GSH)/glutazione-S- transferasi (GST), (3) l'aumento

dell'efficienza dei sistemi cellulari di riparazione del DNA , (4) oltre a diverse alterazioni di importanti vie di trasduzione del segnale (MAPK, PI3K/Akt). La combinazione di questi meccanismi contribuisce allo sviluppo della resistenza al CDDP nei tumori (Chou & Gorlick, 2006; Siddik, 2003). Per quanto concerne l'osteosarcoma (Figura 5), il principale meccanismo alla base della resistenza è un aumento dell'attività del sistema di detossificazione GSH/GST. Una volta all'interno della cellula il CDDP è trasformato nella sua forma attiva idrata vulnerabile all'inattivazione ad opera di GSH, reazione catalizzata da GST, famiglia di enzimi coinvolti nei processi di detossificazione cellulare (Pasello, 2008).

Esistono, inoltre, evidenze sperimentali di un coinvolgimento di MRP2 (*multi-drug resistance-associated protein 2*) nella resistenza al CDDP nell'osteosarcoma, in quanto la sua sovraespressione potrebbe contribuire all'estrusione del farmaco (Chou & Gorlick, 2006).

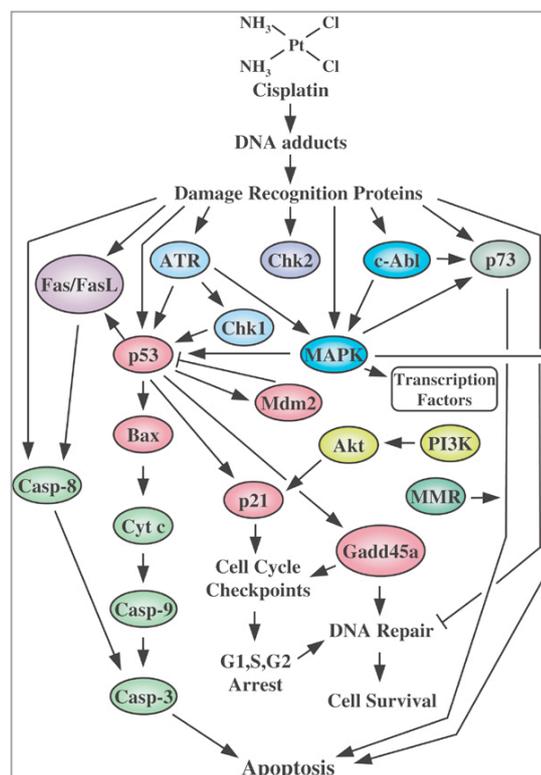


Figura 4: Struttura chimica del cisplatino e vie di segnale coinvolte nella sua attività citotossica.

Siddik, *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene 2003*

Nella figura sottostante sono rappresentati i principali meccanismi di farmacoresistenza al MTX, DX e CDDP.

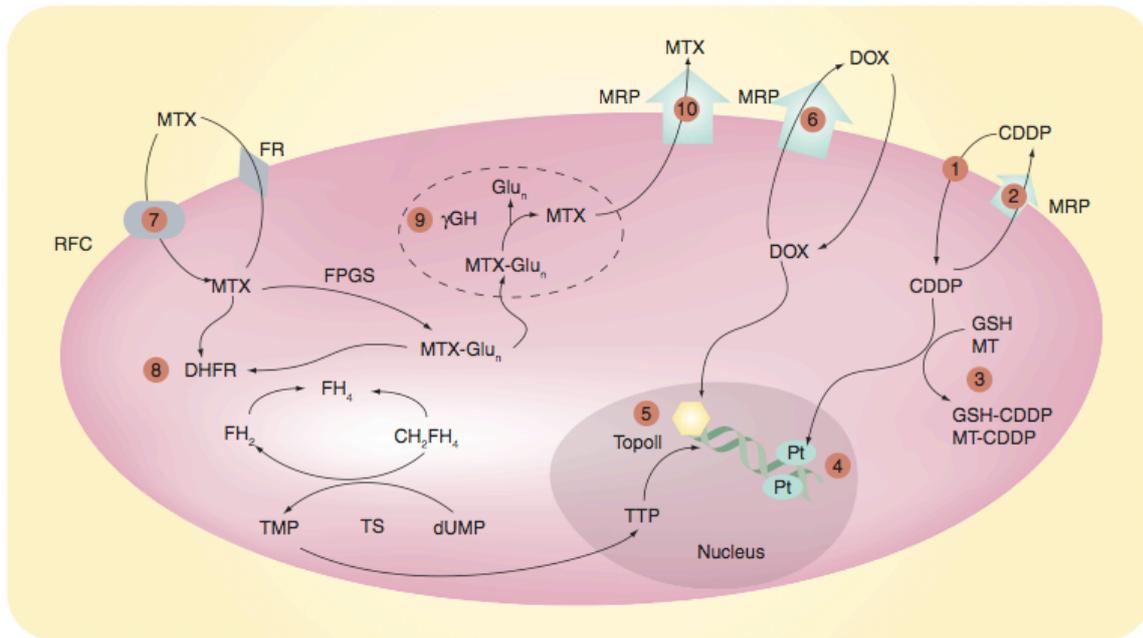


Figura 5: Meccanismi molecolari di farmacoresistenza al MTX, alla DX e al CDDP nell'osteosarcoma. Meccanismi di resistenza del cisplatino (CDDP): 1: decremento dell'accumulo intracellulare di CDDP; 2: aumento dell'efflusso del CDDP attraverso MRP; 3: inattivazione da parte di composti contenenti tioli; 4: aumento dei meccanismi di riparazione del DNA. Meccanismi di resistenza della doxorubicina (DOX): 5: mutazioni della topoisomerasi II; 6: aumento dell'efflusso attraverso MDR1 (P-glicoproteina). Meccanismi di resistenza del methotrexate (MTX): 7: decremento dell'espressione di RFC; 8: aumento dell'espressione della DHFR; 9: aumento dell'attività della γ GH; 10: aumento dell'efflusso attraverso MRP.

Chou & Gorlick, Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. Expert Rev Anticancer Ther. 2006

Capitolo II

Proteine Chinasi

2.1 Generalità

In biochimica si definisce chinasi un enzima che opera il trasferimento del gruppo gamma-fosfato (o fosfato terminale) di molecole donatrici ad alta energia (ATP o più raramente GTP) a specifici substrati, tale processo è definito *fosforilazione*. Il suo fine è riassumibile attraverso il concetto di modulazione dei substrati proteici attraverso alterazioni delle proprietà biofisiche degli stessi che può portare a un aumento o ad una diminuzione della loro attività intrinseca. In tal modo le chinasi sono in grado di attivare o inibire singole proteine a svolgere un particolare ruolo, attivare o no interi segnali di trasduzione del segnale intra-cellulare, portare alla formazione o destabilizzare complessi proteici, sequestrare proteine per la loro ubiquitinizzazione. Il processo di fosforilazione si trova così al centro della regolazione di numerose funzioni cellulari comuni a tutti gli eucarioti come, ad esempio, la replicazione del DNA, la trascrizione genica, il controllo del ciclo cellulare, il trasporto intracellulare di proteine e il metabolismo energetico. Negli organismi più evoluti, inoltre, essa è richiesta per funzioni specializzate quali il differenziamento cellulare, la comunicazione inter-cellulare importante nel mantenimento dell'omeostasi e la morte cellulare programmata. Le fosfatasi sono una classe di enzimi che hanno lo scopo di dare "reversibilità" al processo fosforilativo; difatti le fosfatasi rimuovono il fosfato covalentemente legato ai substrati delle chinasi riportandole al loro stato iniziale e regolando così la loro attività.

La vita della cellula è dunque dipendente da un finissimo e armonico equilibrio tra chinasi e fosfatasi.

Sono state codificate circa 550 chinasi nel genoma umano, corrispondenti al 2% del genoma, divise in oltre 57 famiglie. E' stata scoperta, però, solo una piccola parte del complesso quadro riguardante le interazioni funzionali di queste proteine. Data l'importanza del ruolo svolto da queste proteine, appare chiaro come mutazioni o alterazioni a carico dei geni codificanti possono essere coinvolte in numerose patologie umane come disordini dello sviluppo e del metabolismo, e certamente anche il cancro. In tutto il genoma umano, infatti, 164 di 518 geni codificanti per le proteine chinasi sono localizzati in regioni implicate nello sviluppo di tumori e circa 80 in regioni coinvolte nello sviluppo di altre patologie. (Barouch-Bentov & Sauer, 2011)

2.2 Classificazione delle proteine chinasi eucariotiche

Risale al 1994-1995 la prima classificazione “ufficiale” delle proteine chinasi eucariotiche, grazie al lavoro di S.K. Hanks e T. Hunter. La loro collaborazione ha permesso di organizzare l'enorme numero di proteine chinasi, fino ad allora identificate in una serie di gruppi e sottogruppi, utilizzando due delle regioni conservate nel dominio catalitico come punto di partenza per identificare le interconnessioni evolutive tra le varie proteine chinasi eucariotiche (ePKs).

La prima regione è rappresentata dal sottodominio I e II coinvolti nel legame dell'ATP, la seconda dal sottodominio VI responsabile dell'attività catalitica. Questa classificazione organizza circa quattrocento chinasi e pur con qualche aggiornamento nel corso del decennio successivo, è rimasta tuttora l'indicazione più importante sull'organizzazione evolutiva di questa grande famiglia di proteine. Nel dicembre del 2002, è stato pubblicato su *Science* l'ultimo aggiornamento della classificazione di Hanks e Hunter, da parte di Manning, quest'ultima porta il numero di chinasi identificate fino al 2002 a 518, di cui 478 *eukaryotic protein kinases* (ePKs) e 40 *atypical proreïn kinase families* (aPK). Le aPK sono proteine con attività biochimica, ma con una similarità di sequenza insufficiente da poterle accorpate alle ePKs.

Inoltre, all'interno di questo lavoro di classificazione è stato anche possibile identificare 106 *pseudogeni* simili ai geni delle ePK e delle aPK. Per la maggior parte, si tratta di geni derivanti da trasposizioni retrovirali e da duplicazioni genomiche; alcuni di questi non sono espressi, altri invece codificano per proteine tronche e inattive.

Quindi l'ultima classificazione delle proteine chinasi eucariotiche è basata prevalentemente su quella introdotta da Hanks e Hunter con l'aggiunta di quattro nuovi gruppi ai sette già esistenti. Gli undici gruppi sono formati da 90 famiglie, a loro volta suddivise in 145 sottofamiglie (Manning, 2002).

I principali gruppi sono rappresentati in figura 6.

Si ha così la divisione in undici grandi gruppi che comprendono le *serin/treonin-chinasi* e le *tirosin-chinasi*, le prime esplicano la loro attività tramite fosforilazione di un residuo di serina e/o di treonina, mentre le seconde tramite fosforilazione di un residuo di tirosina:

1. Il gruppo **AGC** (*Cyclic nucleotide regulated protein kinase family*), è rappresentato da serin/treonin-chinasi coinvolte nei segnali di trasduzione mediati da nucleotidi ciclici, fosfolipidi e calcio; annovera le seguenti famiglie: PKA (*Protein Kinase A*, dipendente da AMP ciclico), PKB o AKT (così chiamata per la sua omologia alla PKA, *Protein Kinase B*), PKC (*Protein Kinase C*, dipendente da calcio) e PKG (*Protein Kinase G*, dipendente da GMPciclico).

2. Il gruppo **CAMK** (*Kinases regulated by Ca²⁺/CaM and close relatives family*), include varie famiglie tra cui le diverse isoforme delle CaMK (*Calcium and Calmodulin-regulated kinases*), MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*), le cinque isoforme delle MAPK-APK (*MAPK-Activated Protein Kinase*), RAD53 (anche conosciuto come CHK2, *cell cycle checkpoint kinase*).

3. Il gruppo **CMGC** (*Cyclin-dependent kinases (CDKs) and close relatives family*), rappresenta proteine chinasi coinvolte nel controllo del ciclo cellulare, nello splicing e altre funzioni sconosciute; annovera quattro distinte famiglie fra cui: CDK (cyclin dependent kinase), CDKL (*CDK-like kinases*), MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase*).

4. Il gruppo **STE** è il primo dei quattro nuovi gruppi introdotti nell'ultima classificazione, precedentemente incluso in quello che Hanks e Hunter avevano definito gruppo oPKs (*other protein kinases*). Questo gruppo include al suo interno tre famiglie: STE7 o MAP2K (*MAP 2 Kinase*), STE11 o MAP3K (*MAP 3 Kinase*), STE20 MAP4K (*MAP 4 Kinase*). Questo gruppo oltre ad ottenere un'identità propria acquisisce vari nuovi componenti in tutte le famiglie appena descritte, e i suoi componenti sono coinvolti principalmente nella via del segnale di MAPK e nella trasduzione dei segnali dalla superficie della cellula al nucleo.

5. Il gruppo **CK1** (*Cell Kinase 1, originariamente conosciuta come casein kinase 1*) è il secondo dei nuovi gruppi introdotti dall'ultima classificazione, caratterizzato da poche chinasi con alta omologia di sequenza fra loro e in tal senso molto diverse dalle altre proteine chinasi; include al suo interno le seguenti famiglie: CK1 la più ampia, TTBK (*Tau-Tubulin Kinase*) e VRK (*Vaccinia Related Kinase*).

6. **TK (Tyrosine Kinase)**. Questo gruppo fosforila quasi esclusivamente residui di tirosina, si divide in due importanti sottogruppi:

- *RTK (receptor tyrosin kinases o membrane spanning protein-tyrosine kinases)*, che annovera le grandi famiglie di tirosin-chinasi recettoriali, *FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptors)*, *EGFR (Epidermal Growth Factor Receptors)*, *PDGFR/VEGFR (Vascular Endothelial and Platelet Derived Growth Factor Receptors)*, *InsR (Receptors for Insulin and insulin-like growth factor –IGF-)*, *TRK o NGFR (Nerve Growth Factor Receptor)*, *EPH (Ephrin Receptors)*.
- *NRTK (non receptor tyrosin kinases o Cytoplasmic Tyrosine Kinases -CTKs-)*, che fra le altre annoverano le famiglie *Src (Src Kinase)*, *Abl (Abelson Tyrosin Kinase)*,

7. **TKL (Tyrosine kinase-like)**, è il gruppo più comune tra eucarioti, piante e vertebrati. Le proteine chinasi appartenenti ad esso fosforilano residui di tirosina o treonina. Data la somiglianza di sequenza tra i gruppi TKL e TK si presume che il gruppo TK potrebbe essere emerso dalle chinasi più antiche e conservate.

TKL include cinque sottofamiglie:

- *MLK (mixed-lineage kinase)*
- *LRRK (Leucine Rich Repeat Kinases)*
- *IRAK (Interleuchin-1 Receptor-Associated Kinase)*
- *RAF (Raf family)*
- *STRK (Serine Threonine Kinase Receptors)*

8. **PKL (Protein Kinase-like)**. Le proteine chinasi appartenenti a questo gruppo nonostante possiedano un dominio catalitico non sono strutturalmente simili a ePK, inoltre sono state precedentemente classificate come aPK. A questo gruppo appartiene la famiglia *PIK (Phosphatidyl Inositol Kinases)*.

L'ultimo gruppo introdotto è stato trovato solo negli animali: **RGC (Receptor Guanylate Cyclases)**. Questo piccolo gruppo contiene proteine chinasi caratterizzate dalla presenza di un dominio attivo: *guanylate cyclase domain*, che genera secondi messaggeri dipendenti da cGMP, e un dominio catalitico inattivo con funzioni regolatorie. Gli ultimi due gruppi sono rappresentati da: **aPK** e da un piccolo gruppo definito “**Other Kinase Group**” costituite da

proteine chinasi caratterizzate da un dominio ePK tale da non poter essere incluse nei gruppi maggiori (Aurora chinasi, Bub, Polo-Like Kinase).

(http://kinase.com/wiki/index.php/Kinase_classification)

2.3 Struttura generale delle proteine chinasi

La struttura che distingue i componenti della famiglia delle ePKs dalle altre proteine è rappresentata da una sequenza di circa 250-300 amminoacidi che costituisce il *dominio catalitico*. Pochi residui di questa regione sono fortemente conservati in tutti i membri delle ePKs. La conservazione di un certo gruppo di residui all'interno del suddetto dominio catalitico è molto probabilmente dovuta ad una forte pressione evolutiva atta a mantenere la capacità biochimica fondamentale di questa famiglia proteica ovvero quella di catalizzare il trasferimento del γ -fosfato (fosfato terminale) dell'ATP ad un substrato proteico. In generale, una proteina chinasi ha forma bilobata costituita da un lobo superiore, di minori dimensioni e ricco di strutture a β -foglietto, e uno inferiore di più grandi dimensioni e ricco di strutture ad α -elica. Tra i due lobi si costituisce una profonda depressione della superficie proteica che rappresenta il sito di riconoscimento dell'ATP. Nel dettaglio, si possono identificare almeno dodici sottodomini conservati all'interno della superfamiglia delle ePK, e alcuni residui di questi sottodomini sono essenziali nella determinazione topologica e funzionale della proteina. Particolarmente importanti sono il loop ricco di glicine (*glycin rich loop*), il loop catalitico (*catalytic loop*) ed il loop di attivazione (*activation loop*), oltre ad un notevole numero di sottodomini di riconoscimento dell'ATP e per la coordinazione dello ione Mg^{2+} .

Il *sottodominio I* contiene il motivo *Gly-X-Gly-X-X-Gly-X-Val* altamente conservato in molte proteine chinasi eucariotiche. Questo *loop* ricco di glicine ha la funzione di ancorare l'ATP alla proteina.

Il *sottodominio II* è costituito da un foglietto- β contenente un residuo di *Lys* altamente conservata.

Il *sottodominio V* insinua tra i due lobi della proteina chinasi ed è parte integrante del dominio catalitico dell'enzima. E' costituito da un foglietto- β idrofobico presente all'interno del lobo superiore, da un α -elica all'interno del lobo inferiore e da una catena peptidica che li interconnette. In quest'ultima è da sottolineare la presenza dei residui Glu121, Val123 e Glu127, tutti fortemente conservati la cui funzione è quella di facilitare l'ancoraggio all'ATP mediante legami idrofobici con l'adenina e con l'anello del ribosio. I residui Met120, Tyr122 e Val123 partecipano anch'essi alla definizione della tasca idrofobica che circonda l'adenina

dell'ATP.

Il sottodominio VII ha una classica struttura *foglietto β -loop-foglietto β* , esso contiene una sequenza altamente conservata costituita dalla tripletta di aminoacidi: *Asp-Phe-Gly*. L'Asp184 ha la funzione di orientare il γ -fosfato dell'ATP favorendone il suo trasferimento al substrato. Questo è reso possibile coordinando lo ione Mg^{2+} con i gruppi fosfato β - e γ -.

Il sottodominio VIII contiene un altro motivo conservato, detto "APG" (Ala- Pro-Glu) ed il loop essenziale per la biochimica dell'enzima: l'*activation loop*. Questo sottodominio gioca il ruolo maggiore nel riconoscimento del substrato. Inoltre, l'attivazione della maggior parte delle proteine chinasi è correlata alla fosforilazione di alcuni residui nel sottodominio VIII a livello dell'*activation loop*. Una mancata fosforilazione comporta una grande mobilità dell'*activation loop* che può impedire l'ingresso dell'ATP nella cavità di riconoscimento dell'enzima. Viceversa, la sua fosforilazione blocca conformazionalmente il loop in modo tale da consentire il libero accesso all'ATP a livello del sito catalitico della chinasi (Hanks & Hunter, 1995).

2.4 Importanza delle proteine chinasi nel ciclo cellulare.

Si definisce ciclo cellulare il periodo compreso tra due divisioni mitotiche, mentre il tempo interposto tra la fine della mitosi e l'inizio della successiva prende il nome di interfase. Il periodo di effettiva divisione, corrispondente alla mitosi è definito fase M, in cui la cellula raddoppia le proprie dimensioni (processo dovuto alla trascrizione e alla traduzione di geni codificanti per lo specifico fenotipo cellulare) sino alla divisione del materiale tra le due identiche cellule figlie, ciascuna caratterizzata da un corredo diploide. L'interfase è suddivisa in tre fasi definite rispetto al momento della sintesi di DNA:

Fase G1 (G=gap, intervallo): è la fase in cui entrano le cellule dopo la mitosi, durante la quale sono sintetizzati RNA e proteine (durata 6-12 ore)

Fase S: l'inizio della replicazione del DNA segna il passaggio dalla fase G1 alla fase S, in cui è replicato il DNA e il suo contenuto totale aumenta dal valore diploide $2n$ al valore $4n$.

Fase G2 (G=gap, intervallo): in cui avviene il controllo dell'avvenuta replicazione di tutti i cromosomi e una crescita secondaria prima della mitosi. In questa fase la cellula è caratterizzata da due completi assetti diploidi.

A questo punto segue la divisione cellulare ovvero la fase M che si scompone in profase, metafase, anafase, telofase e citochinesi.

Alcuni tipi cellulari al termine della mitosi non si dividono più (cellule terminalmente differenziate) ed escono irreversibilmente dal ciclo cellulare, mentre altre cellule entrano in uno stato di quiescenza chiamato G0 e sotto stimoli vari possono lasciare questa fase e

rientrare nel ciclo cellulare. Le cellule striate dei muscoli scheletrici, ad esempio, rimangono in questo stadio per tutta la vita dell'organismo.

In una cellula animale che duplica, questa sequenza di eventi si ripete ogni 18-24 ore. La fase G1 in genere occupa tra le 6 e le 12 ore nelle cellule che crescono più rapidamente. La fase S dura 6-8h, la G2 è la fase più corta, e la fase M è un breve interludio di circa 1 ora.

Il passaggio da una fase a un'altra del ciclo cellulare avviene in modo ordinato e finemente regolato ad opera delle proteine chinasi CDK (cyclin-dependent kinase). CDK rappresenta una famiglia di serine/treonin chinasi attivate in specifici momenti del ciclo cellulare. I livelli intracellulari delle diverse CDK rimangono stabili durante il ciclo cellulare al contrario delle loro proteine regolatrici: la *ciclina* (A, B, C, D ed E), i cui livelli proteici variano e periodicamente attivano le proteine CDK. Diverse cicline sono richieste nelle varie fasi. Le cicline di tipo D (D1, D2 e D3) formano complessi con le proteine CDK4 e CDK6 coinvolte nell'ingresso in fase G1. Ancora la ciclina di tipo E si associa a CDK2 per garantire la progressione dalla fase G1 alla S. La ciclina di tipo A in complesso con CDK2 è richiesta durante la fase S. In tarda fase G2 e in precoce fase M il complesso ciclina B e CDK1 promuove l'ingresso in mitosi. L'attività delle proteine chinasi CDK è contrastata da proteine con attività inibitoria CKI (CDK-kinase inhibitors) in grado di legare CDK, sia in complesso che non, regolandone l'attività. Sono note due distinte famiglie di inibitori: INK4 e Cip/Kip. La famiglia INK4 include *p15*, *p16*, *p18* e *p19*, proteine in grado di inattivare le chinasi CDK della fase G1. La seconda famiglia di inibitori include: *p21*, *p27* e *p57* in grado di inibire l'attività dei restanti complessi CDK/cicline della fase G1 ed in particolare il complesso CDK1/ciclina B dotato di un importante ruolo per l'ingresso in mitosi.

La corretta progressione del ciclo dipende da punti di controlli distinti noti come “*checkpoint*”. (Figura 7)

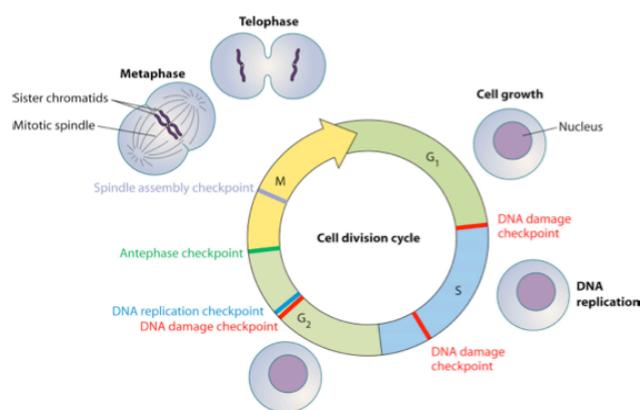


Figura 7 Schema dei principali eventi nel ciclo cellulare e relativi checkpoint.

Chin et al., *Safeguarding Entry into Mitosis: the Antephase Checkpoint. Molecular And Cellular Biology*, 2010

L'impegno a replicare i cromosomi ha luogo nella fase G1, se sono soddisfatte le condizioni per proseguire dopo un certo intervallo di tempo la cellula entrerà in fase S. Questo momento è stato definito *punto di restrizione* o START.

Vari parametri inoltre influenzano la decisione di una cellula a dividersi, tra cui stimoli esterni (sostanze nutritive) e la valutazione dell'adeguatezza della massa cellulare a sostenere l'intero ciclo. Esistono dei punti di blocco che stabiliscono se la cellula è pronta o meno, e altro non sono che circuiti di controllo distinti, ciascuno dei quali rende l'inizio di una fase del ciclo cellulare dipendente dal fatto che un evento precedente sia stato completato con successo. I punti di controllo in questione sono rappresentati dai checkpoint del danno al DNA (*DNA damage checkpoints*) collocati prima dell'ingresso delle cellule in fase S (G1/S checkpoint) e dopo la replicazione del DNA (G2/M), e il punto di controllo del fuso mitotico (*spindle checkpoints*) durante la fase M.

Al **checkpoint G1/S**, a seguito di danno al DNA, il ciclo viene bloccato per permettere alla cellula di riparare il danno e/o la rottura e l'arresto è p53 dipendente. Solitamente il livello cellulare di p53 è mantenuto basso ma in caso di danno aumenta e stimola la trascrizione di diversi geni tra cui p21, Mdm2 e Bax. L'induzione di p21, comporta l'inibizione dell'attività delle proteine chinasi CDK coinvolte in questa fase con conseguente arresto del ciclo cellulare al fine di prevenire la replicazione del DNA danneggiato. Mdm2 gioca un ruolo fondamentale nella regolazione di p53: lega p53 e inibisce la sua attività trascrizionale, favorendo la sua degradazione tramite ubiquitinazione. In aggiunta la proteina p19 regola l'ubiquitinazione di p53 in quanto lega Mdm2 e previene così la proteolisi di p53. In caso di consistente danno al DNA, p53 induce le cellule in apoptosi mediante l'attivazione di geni coinvolti nel segnale apoptotico. Diverse proteine chinasi sono deputate al riconoscimento del danno al DNA come ad esempio ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*) e ATR (*ataxia e rad3 related*). Queste chinasi una volta attivate, dalle proteine Rad e Hus in risposta al danno, attivano diversi effettori del segnale sino all'arresto del ciclo in fase G1/S se il riconoscimento del danno è dovuto ad ATM, arresto in fase G2/M se è dovuto ad ATR.

Anche l'**arresto del ciclo in G2/M** è p53-indipendente. Questo è ottenuto mantenendo la proteina chinasi CDK1 (cyclin-dependent kinase 1) in uno stato non fosforilato ad opera della proteina Chk1 (checkpoint homolog kinase) ATR-dipendente, che a sua volta fosforila Cdc25 (*Cell Division Cycle 25*) una fosfatasi che previene la progressione nel ciclo e impedisce l'attivazione del complesso CDK1/ciclina B1 responsabile dell'ingresso in mitosi.

Il **checkpoint del fuso mitotico** riconosce anomalie nell'allineamento dei cromosomi all'interno del fuso mitotico e causa l'arresto del ciclo in metafase. Diverse proteine sono coinvolte in questo checkpoint, tra cui Mad (*mitotic arrest deficient*) e Bub (*budding*

uninhibited by benimyl) le quali, una volta attivate, inibiscono Cdc20 (parte del complesso APC (anaphase-promoting complex)) responsabile della transizione dalla metafase all'anafase. (Vermeulen, 2003). A livello del checkpoint del fuso mitotico, le proteine appartenenti alle famiglie delle Aurora chinasi e delle Polo-like kinases (PLKs) controllano l'allineamento e la segregazione dei cromosomi, la loro presenza è dunque richiesta per preservare la stabilità del genoma. (Lapenna, 2009).

2.5 Importanza delle proteine chinasi nei tumori.

Le proteine chinasi possiedono un importante ruolo all'interno dei complessi processi cellulari quali crescita, differenziamento, proliferazione e apoptosi. Negli ultimi 20 anni sono state scoperte mutazioni a carico dei geni codificanti per le proteine chinasi in diverse patologie umane, come disordini neurologici (epilessia, miastenia e atassia), patologie ossee e sinostosi craniche (displasia), patologie vascolari ed ematiche, disordini endocrini e metabolici (ipogonadismo ipogonadotropo, insulino-resistenza e diabete di tipo II), patologie multi-organo (Sindrome di Carney) e certamente i tumori.

Nell'ambito delle neoplasie, la famiglia di geni frequentemente mutata è proprio quella delle proteine chinasi.

Normalmente, le proteine chinasi possono agire da oncosoppressori o da proto-oncogeni, pertanto mutazioni a loro carico possono favorire la tumorigenesi attraverso numerosi meccanismi tra cui l'attivazione di specifiche vie di segnale, instabilità genomica, ridotta risposta al danno del DNA, inattivazione di apoptosi e/o promozione di angiogenesi e stimolazione della capacità migratoria delle cellule. Mutazioni somatiche a carico di geni codificanti per proteine chinasi, principalmente con funzione di proto-oncogene, sono frequenti in diversi tumori come mostrato nella tabella sottostante:

Gene	Examples of somatic mutations associated with tumorigenesis**	Examples of effects of gene target deletion in transgenic animal models [§]
ACVR1	Melanoma	Embryonic KO is lethal at E9.5; essential in normal mesoderm formation and development after gastrulation; conditional KO in the ectoderm causes a reduction in lens size due to decreased lens cell proliferation
ALK	Ovary, breast and lung cancers, neuroblastomas and glioblastomas	Behavioural and neurochemical alterations, KO viable without any gross alterations
BMPR1B	Gastric adenocarcinoma and melanoma	Forms intact cartilaginous elements
BMPR2	Inhibitory effect on breast cancer cells by dominant-negative protein	Embryonic KO is lethal, fails to form organized structures and lacks mesoderm
BRAF	Widespread with greater incidence in ovary, skin, colon and thyroid cancers and glioblastomas	Midgestation lethality with vascular defects due to endothelial apoptosis
BTK	Lung carcinoma	Missense mutation leads to failure of mature B lymphocyte production and of immunoglobulin heavy chain rearrangement
CHEK2	Glioblastomas	Embryonic stem cells fails to maintain γ -irradiation-induced arrest in G2 phase
ERBB3	Prostate, bladder and breast cancers and glioblastomas	Prenatal lethality due to lack of Schwann cells and precursors
FGFR1	Stem cell leukemia lymphoma (FGFR1–ZNF198 chimerism), pancreatic adenocarcinomas, glioblastoma, breast carcinomas and lung cancers	Embryonic KO is embryonic lethal due to lack of embryonic growth and mesodermal patterning; in conditional KO mouse limb development is affected
FGFR2	Glioblastoma, breast, gastric, lung, ovarian, cervical and endometrial cancer	Full or partial gene KO is embryonic lethal as post-implantation development is disrupted
FGFR3	Prostate and cervical cancer, lung, bladder, upper digestive tract and intestinal carcinoma and plasma cell myeloma	Embryonic KO has defects in long bones, vertebrae growth and inner-ear development; transgenic mice with a missense mutation have retarded endochondral bone growth
FLT4	Increase in metastasis in adenocarcinoma and lymph node cancer, glioblastoma, kidney and ovary carcinoma and melanoma	Missense mutation in the catalytic domain leads to chylous ascites accumulation and limb swelling
INSR	Stomach and skin cancers and glioblastomas and colorectal cancer	Normal birth but postnatal fatal diabetic ketoacidosis
IRAK4	Prostate cancer	Severely impaired interleukin 1 and Toll-like receptor signalling
JAK3	Acute megakaryoblastic leukemia and gastric adenocarcinoma	Knockout of the catalytic domain leads to reduced number of thymocytes and severe B cell and T cell lymphopenia
KIT	Testicular and ovarian tumours	Two mutations cause protein deficiency, which leads to white coat colour, sterility and anaemia due to migration and/or proliferation failure of stem cell populations
MAPK10	Loss of expression in some brain tumours	Reduced stress-induced JNK activity; protection from brain injury after cerebral ischaemia or hypoxia
MERTK	Renal, head and neck carcinoma	C-terminal truncation of the protein leads to macrophages that are deficient in the clearance of apoptotic thymocytes
MUSK	Lung cancer	Failure to induce neuromuscular synapse formation
NTRK1	Thyroid carcinoma	Sensory and sympathetic neuropathies
NTRK2	Skin and lung cancer	Conditional KO in the postnatal forebrain has reduced hippocampal-mediated learning and overall synaptic strengthening
PDGFRA	Neuroblastoma, stomach, soft tissue, small intestine, lung and gastrointestinal cancer, glioblastoma, melanoma and haematopoietic and lymphoid myeloma	Posterolateral diaphragmatic defects
PINK1	Glioblastoma and ovary carcinoma	Impaired mitochondrial function
PRKAR1A	Soft tissue myxoma, adrenocortical tumours and thyroid carcinomas	Embryonic KO is lethal due to failure of mesodermal structure development; heterozygous knockout has osteoblast neoplasia, and Schwann cell and thyroid tumours
RPS6KA3	Prostate cancer, breast cancer, gastric adenocarcinoma and glioblastoma	Progressive osteopenia due to impaired osteoblast and osteoclast function
STK11	Widespread with greater incidence in lung, cervical and pancreatic cancers and melanoma	Midgestation lethality due to neural tube defects, mesenchymal cell death and vascular abnormalities; heterozygous mice have multiple gastric adenomatous polyps
TEK	Breast, ovarian and renal cancer	Embryonic lethal due to cardiac dysfunction and vascular haemorrhaging
TGFBR1	TGFBR1*6A/9A polymorphism is associated with increased risk of breast and ovarian cancer.	Midgestation lethality due to abnormal angiogenesis yet intact haematopoietic potential in the yolk sac
TGFBR2	Hereditary non-polyposis colon, oesophageal, stomach and lung cancers and glioblastomas	Embryonic lethality due to defects in yolk sac haematopoiesis and vasculogenesis
TRPM7	Inhibitory on head and neck carcinoma cells when expression suppressed; breast, ovary and stomach cancers	Embryonic knockout is lethal; conditional T cell-specific deletion shows disrupted thymopoiesis
WNK4	Lung and ovarian carcinoma and melanoma	Transgenic mouse has hypertension, hyperkalemia, hypercalciuria and marked hyperplasia of the distal convoluted tubule
ZAP70	Lung and head and neck carcinoma	Missense mutation in the SH2 domain causes autosomal chronic arthritis

Lahiry et al, Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships. *Nat Rev Genet.* 2010

Per quanto concerne le sindromi tumorali, sono caratterizzate principalmente da mutazioni nella linea germinale di geni codificanti sia per oncosoppressori che per proto-oncogeni. Esempi di tumori caratterizzati da mutazioni ereditarie a carico di geni codificanti per proteine chinasi ad attività di proto-oncogeni sono: neuroblastoma e tumore gastrointestinale stromale di tipo ereditario (mutazioni sul gene PDGFRA, *platelet-derived growth factor receptor α*), carcinoma della tiroide (mutazioni sul gene RET). Esempio, invece, di mutazione a carico di geni codificanti per chinasi con attività da oncosoppressore in grado di colpire sia la linea germinale che somatica è MAPK10 nei tumori cerebrali. (Lahiry, 2010).

2.6 Le proteine chinasi quali bersagli per la terapia dei tumori.

I prodotti genici che regolano la complessità del ciclo cellulare sono oggetto di studio in qualità di bersagli terapeutici, a fronte dell'importanza che rivestono nella proliferazione cellulare.

2.6.1 Cell Cycle Kinases- CDKs

Principali regolatori della proliferazione, negli ultimi anni sono stati identificati come potenziali bersagli terapeutici in qualità di proteine chinasi che coordinano sia la risposta cellulare al danno del DNA che la mitosi.

Sono sovraesprese in molti tumori umani a causa di eventi genetici ed epigenetici che influenzano le vie regolatorie di segnale in cui sono coinvolte, da cui deriva la proliferazione incontrollata tipica delle cellule tumorali. Ad esempio la sovraespressione di CDK4 comporta un'iperfosforilazione di pRb con conseguente perdita delle capacità antiproliferative delle cellule in tumori quali: l'OS, il glioblastoma e il carcinoma alla cervice uterina (Ortega, 2002); ancora, CDK5 influenza la capacità metastatica delle cellule tumorali nel carcinoma alla prostata (Lapenna, 2009), mentre la sovraespressione di CDK1 e 2 sono coinvolte nella proliferazione incontrollata di cellule di colon adenoma. (Vermeulen, 2003)

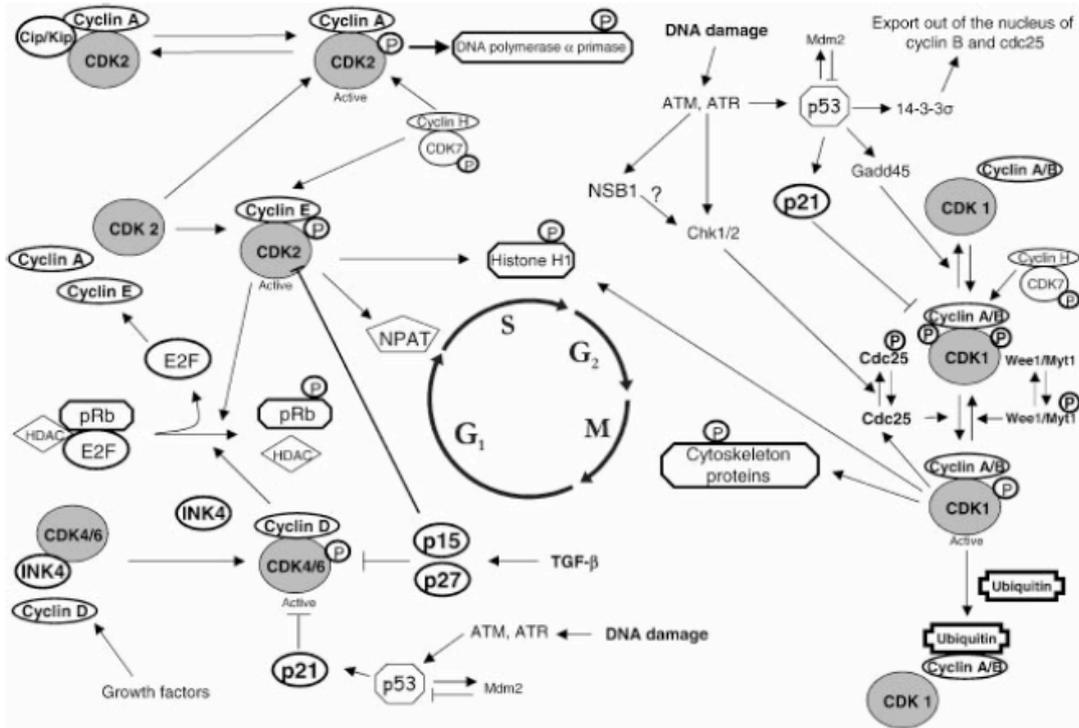
Sono stati sviluppati molti inibitori specifici delle CDK con lo scopo di limitare la progressione delle cellule tumorali attraverso il ciclo e favorirne l'apoptosi. CDK1, CDK2, CDK4 e CDK5, sono le chinasi più interessanti per lo sviluppo di terapie bersaglio specifiche in quanto esplicano principalmente la loro attività durante l'interfase. Gli inibitori di prima generazione sono identificati come pan-CDK, in grado di agire sui diversi componenti e in più fasi del ciclo cellulare. Molti inibitori, già inclusi in studi clinici, sono caratterizzati da bassa attività e/o tossicità (es. flavopiridol, olomoucine). Ancora, sono stati sviluppati inibitori caratterizzati da maggiore selettività ed attività (es. R-roscovitine e JNJ-7706621) ad oggi inclusi in vari studi clinici per il trattamento di tumori solidi. (Lapenna, 2009)

In questa tesi di dottorato è stata rivolta attenzione nei confronti della proteina chinasi CDK2, sovraespressa in campioni clinici di osteosarcoma rispetto ai tessuti normali e correlata ad una prognosi peggiore.

CDK2 forma un complesso con la ciclina E, responsabile della transizione dalla fase G1/S. Il complesso fosforila la proteina del retinoblastoma (pRb) che a sua volta attiva E2F-1, fattore trascrizionale che regola positivamente la trascrizione di proteine richieste durante la fase S. Durante la transizione G1/S, il complesso CDK2/ciclina E fosforila p27, suo inibitore, favorendone la degradazione proteasoma-dipendente. Inoltre il complesso fosforila l'istone 1 (H1) importante durante la condensazione dei cromosomi richiesta durante la replicazione del DNA.

In caso di danno al DNA il ciclo cellulare viene bruscamente interrotto ad opera di ATM e ATR e loro effettori (CHK1 e 2), principali attori in questo checkpoint di riparo del DNA. Ciò permette alle cellule di riparare il danno e preservare l'integrità del genoma (Vermeulen, 2003; Lahiry, 2010). Figura 8

In risposta ad un insulto genotossico inoltre aumenta l'espressione di CDK2 in complesso con la ciclina A1 che interagisce con i membri della famiglia di proteine Ku e fosforila Ku70, uno dei principali componenti del meccanismo di riparo del DNA noto come *non-homologous end-joining* (NHEJ) (Federico, 2010). Durante la fase S, questo complesso (CDK2/ciclinaA) è in grado di fosforilare diversi substrati permettendo la replicazione del DNA e l'inattivazione dei fattori di trascrizione tipici della fase G1 (pRb).



Vermeulen et al., *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif. 2003*

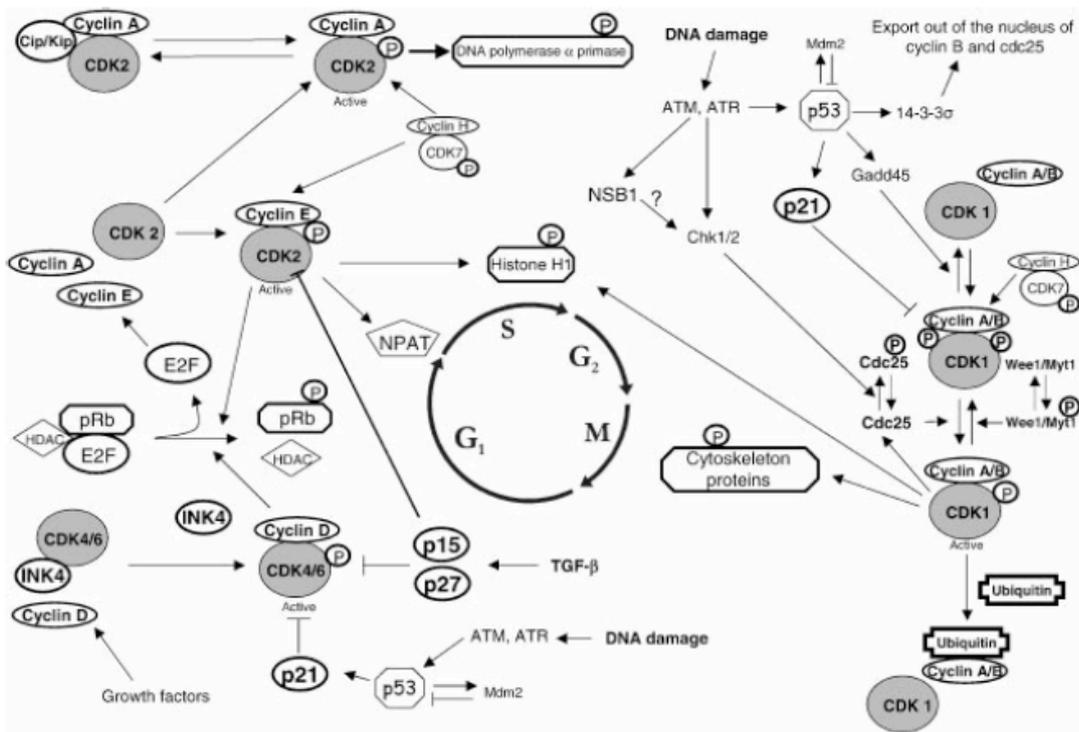


Figura 8: Rappresentazione schematica del ruolo di CDK2, CDK1 nella regolazione del ciclo cellulare.

Vermeulen et

al., *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif. 2003*

2.6.2 Aurora chinasi e checkpoint mitotico.

Durante la mitosi le cellule sono molto sensibili alla morte cellulare per apoptosi. Per questa ragione, molti pazienti affetti da tumore ricevono all'inizio della terapia farmaci antimitotici, come i taxani e gli alcaloidi della vinca. Questi farmaci agiscono sui microtubuli, depolimerizzandone la struttura o impedendo la loro mobilità intrinseca e l'assemblaggio ai poli del fuso. Quando accade ciò, il checkpoint mitotico viene attivato, inducendo un prolungamento della fase mitotica che può condurre alla morte cellulare. Ad ogni modo, dato che i microtubuli svolgono funzioni vitali per le cellule sia in divisione che non, ciò si traduce in una serie di effetti collaterali marcati. Da qui l'interesse a individuare nuovi bersagli mitotici da colpire al fine di impedire l'assemblaggio del fuso mitotico senza intaccare i microtubuli delle cellule quiescenti, come ad esempio le proteine appartenenti alla famiglia delle Aurora chinasi.

Aurora chinasi A (AURK-A) e Aurora chinasi B (AURK-B) sono membri di una famiglia di *serine/threonine* chinasi altamente conservata durante l'evoluzione.

Sono coinvolte in diverse fasi del ciclo cellulare, nello specifico la loro presenza è richiesta durante l'assemblaggio del fuso mitotico (Figura 9).

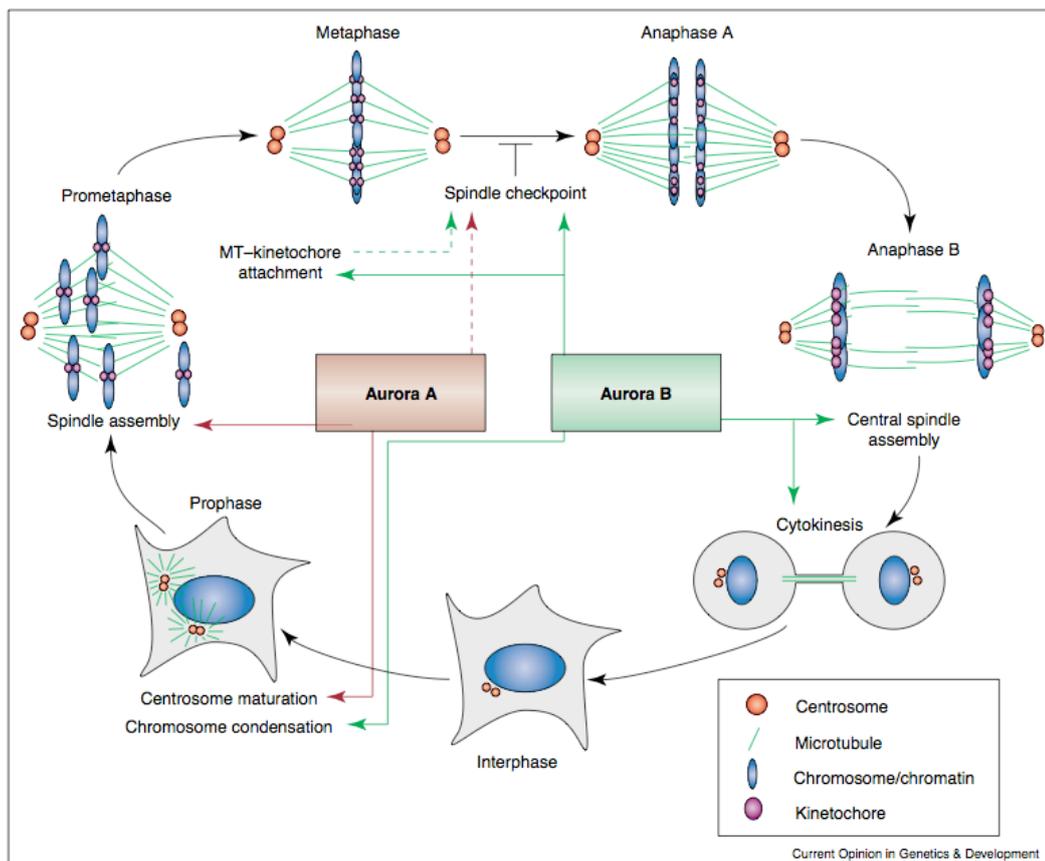


Figura 9: Ruolo delle proteine chinasi AURK-A e AURK-B all'interno del ciclo cellulare.

Meraldi et al.: Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev.* 2004

AURK-A si localizza a livello del materiale pericentriolare dalla fine della fase S fino all'inizio della successiva fase G1, collocandosi sul polo prossimale del fuso mitotico durante la mitosi. Regola la maturazione del centrosoma, la sua duplicazione e la divisione ai due poli del fuso.

In fase G2 AURKA si localizza, inizialmente, a livello del materiale pericentriolare; la maturazione del centrosoma avviene ad ogni ciclo cellulare reclutando una grossa quantità di proteine del materiale pericentriolare come la γ -tubulina. In questa fase coordina l'ingresso in mitosi tramite la fosforilazione di CDC25B, la quale a sua volta favorisce l'ingresso della ciclina B nel nucleo e la formazione del complesso CDK1/ciclina B che promuove l'ingresso in mitosi (Fu, 2007; Warner, 2008).

AURK-B durante la metafase si localizza lungo la regione centromerica dei cromosomi, regola la separazione dei cromatidi fratelli e l'adesione del cinetocore ai microtubuli sia al centro del fuso mitotico che ai poli opposti. Questo ruolo è svolto insieme ad altre proteine (INCENP, survivina e borealina) con le quali AURKB forma un complesso di cui ne rappresenta l'unità catalitica (*chromosome passenger proteins*). Il complesso si localizza a livello centromerico in prometafase e metafase, mentre si sposta al centro del fuso durante l'anafase. La mancata adesione ai microtubuli determina l'attivazione del checkpoint del fuso mitotico.

Inoltre AURK-B regola la citochinesi, infatti la sua inibizione causa poliploidia da endoreduplicazione e cellule multinucleate (Warner, 2008), fosforila l'istone 3 (H3) a livello di un residuo specifico (serina 10) attivandolo e permettendo così la condensazione e separazione della cromatina (Kollareddy, 2011).

Studi di silenziamento di AURK-A in diversi modelli sperimentali hanno dimostrato come la perdita di questa proteina causi arresto della mitosi e aneuploidia. L'inibizione di AURK-B produce invece una minor fosforilazione dell'istone H3 e induce poliploidia per mancata citochinesi. Una alterata espressione delle proteine chinasi appartenenti alla famiglia delle Aurora è stata osservata in diversi tumori, nello specifico la sovraespressione dell'AURK-A causa instabilità cromosomica, prematura segregazione e come già detto aneuploidia, tutti effetti associati alla tumorigenesi di diversi tumori umani tra cui il carcinoma coloretale e tumori ematologici (Perez de Castro, 2007; Barr, 2007)

Negli ultimi anni sono stati sviluppati inibitori selettivi sia per l'aurora chinasi A (MLN8054) che per l'aurora chinasi B (ZM447439), nonostante sia stato dimostrato che a determinate concentrazioni i farmaci in questione sono in grado di inibire entrambe le chinasi. Gli inibitori di seconda generazione includono agenti definiti pan-Aurora (VX-680), per lo più agenti

ATP-mimetici capaci, quindi, di competere con il substrato fosfodonaore a livello del sito di legame con la subunità α dell'enzima, occupandolo totalmente o parzialmente. In modelli *in vivo*, questi agenti sono in grado di ridurre la crescita tumorale, così come molti sono inclusi in diverse fasi di studi clinici. (Lapenna, 2009). I farmaci anti-Aurora sono in continuo sviluppo, la ricerca in questo campo mira alla sintesi di inibitori sempre più selettivi e specifici che possano essere in grado di modulare l'attività di queste proteine chinasi senza inficiarne l'attività basale e dunque fisiologica.

Nell'osteosarcoma, sia AURK-A che AURK-B risultano sovraesprese in campioni tumorali rispetto ai tessuti sani e correlano con una prognosi peggiore.

2.6.3 Polo-Like Kinases, PLKs.

La famiglia delle PLKs include quattro distinte proteine: PLK1, PLK2, PLK3 e PLK4. PLK1 è il membro maggiormente caratterizzato in quanto è responsabile dell'attivazione del complesso CDK1/ciclina B coinvolto nella transizione dalla fase G2 alla fase M, maturazione del centrosoma, assemblaggio fuso mitotico e citochinesi. L'inibizione di PLK1 comporta un prolungamento della mitosi a causa della sua attività sui microtubuli, simile a quella dei farmaci antimitotici. PLK1, PLK2 e PLK3 sono importanti mediatori di risposta allo stress indotto da danno al DNA nelle cellule tumorali, attività svolta in concerto con p53. Sono stati sviluppati numerosi agenti in grado di inibire in maniera selettiva l'attività di PLK1 prevenendo il legame con l'ATP, molti dei quali sono inclusi in diversi studi clinici di fase I e II (Poloxin, BI2536 e NMS-1286937). La sovraespressione di PLK1 è stata individuata in diversi tumori e spesso associata a una peggiore prognosi, tra cui il carcinoma epatico, il carcinoma al pancreas e gastrico (Simizu, 2000). Anche nel caso dell'osteosarcoma la sua sovraespressione correla con una prognosi peggiore.

PLK1 presenta due regioni altamente conservate: un dominio catalitico N-terminale Ser/Thr chinasi, e una regione non catalitica all'estremità C-terminale nota come Polo-Box Domani (PBD) che durante l'interfase interagisce con il dominio catalitico provocando l'inattivazione di se stessa. PLK1 ha un ruolo centrale nella regolazione del ciclo cellulare promuovendo: ingresso in mitosi, maturazione del centrosoma, assemblaggio fuso mitotico, divisione dei cromatidi fratelli, attivazione dell'anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) e inizio della citochinesi che determina l'uscita dalla fase M. La Figura 10 riassume i ruoli svolti da PLK1 durante il ciclo cellulare.

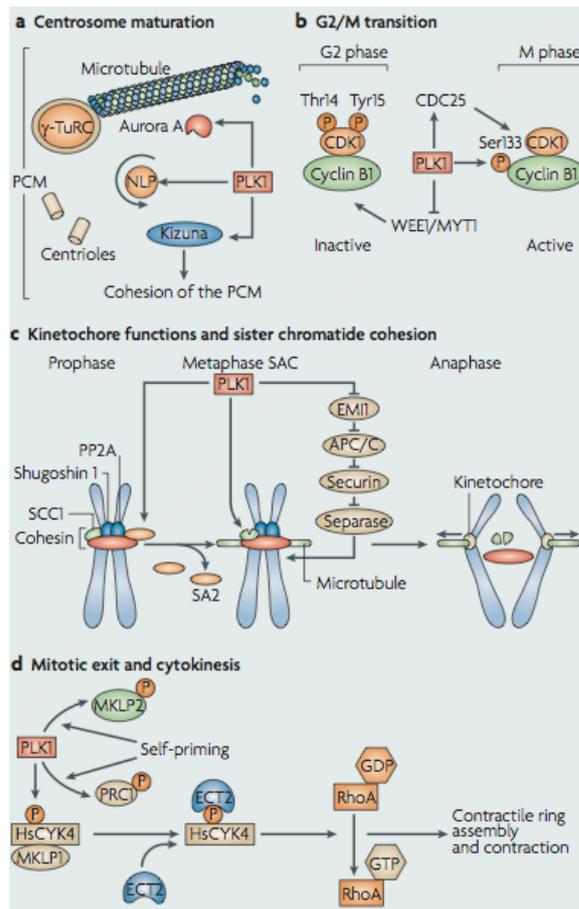


Figura 10: funzioni cellulari di PLK1, (a) maturazione del centrosoma, (b) transizione fase G2/M, (c) adesione al cinetocore e segregazione cromatidi fratelli, (e) uscita dalla mitosi e citochinesi.

Strebhardt et al., Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. Nat Rev Drug Discov. 2010

PLK1 è stato riconosciuto come un importante bersaglio terapeutico nella terapia antitumorale, in vari modelli sperimentali la sua inibizione induce apoptosi con rallentamento della progressione tumorale. L'attività di PLK1 aumenta durante il passaggio dalla fase G2 alla fase M sino a raggiungere un livello massimo durante la mitosi. Diversi studi hanno evidenziato un "cross-talk" con l'aurora chinasi A (Figura 10). Infatti, AURK-A fosforila PLK1, a livello del residuo di treonina 210 altamente conservato e localizzato sul T-loop (o activation loop). PLK1 a sua volta attiva CDK1/ciclina B promuovendo l'ingresso in mitosi. L'Aurora chinasi A richiede a sua volta la presenza del co-fattore Bora per la sua attivazione, il quale regola l'accessibilità al T-loop di PLK1 prevenendo la sua inattivazione da parte del dominio PBD (Strebhardt, 2010).

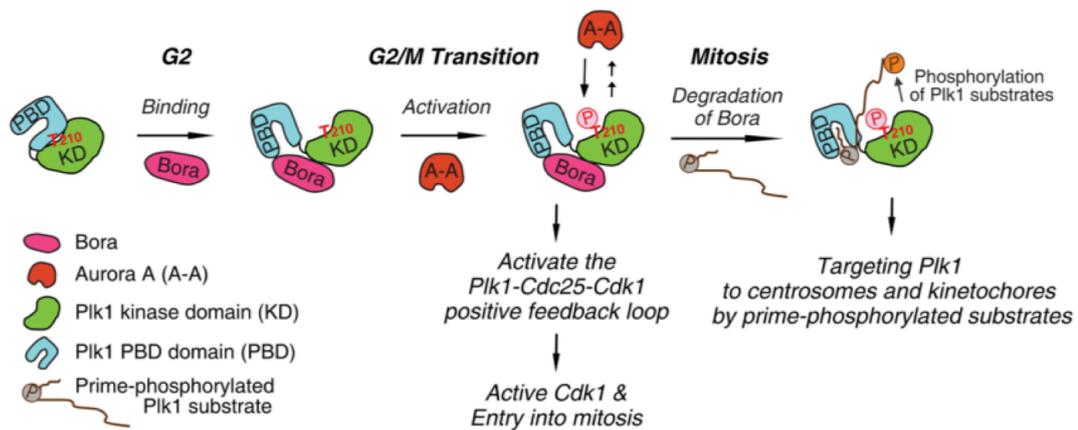


Figura 10: Regolazione di PLK1 ad opera delle proteine Bora e Aurora chinasi A nelle fasi del ciclo cellulare.

Strebhardt, Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. Nat Rev Drug Discov. 2010

L'inibizione di PLK1 ottenuta tramite l'impiego di inibitori specifici (BI2536) o tramite silenziamento genico in linee cellulari di osteosarcoma (U-2OS) comporta arresto a livello del check-point responsabile dell'integrità del DNA in G2/M, lo stesso effetto si verifica indirettamente inibendo l'AURK-A. (Macurek, 2009)

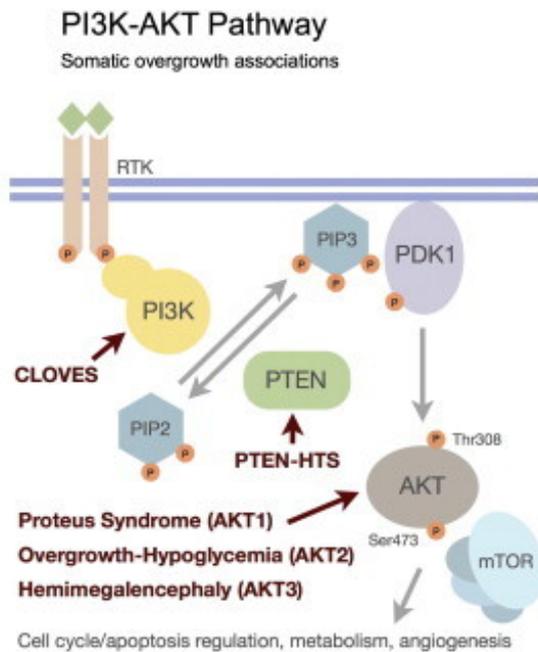
2.6.4 PIK3CA

Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) rappresenta una famiglia di chinasi lipidiche che regolano importanti vie di segnale coinvolte nella proliferazione cellulare, l'adesione, la sopravvivenza, e la motilità. Sono proteine eterodimeriche costituite da una subunità catalitica e da una regolatoria. Sono distinte in tre classi di PI3K (classe I, II e III) in base ai domini proteici che le costituiscono e ne determinano la specificità.

Le chinasi PI3K di classe I catalizzano il trasferimento di un gruppo γ -fosforico dell'ATP sulla posizione D3 del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato producendo così fosfatidilinositolo-3,4,5 trifosfato il quale a sua volta funge da ligando per reclutare, sulla faccia interna della membrana cellulare, proteine contenenti domini *Pleckstrin Homology* (PH), tra cui AKT.

Classe IA: le PI3K di classe IA vengono attivate da recettori ad attività tirosina-chinasica (RTK) e sono composte da una subunità catalitica del peso di 110 kDa (p110), e da una subunità regolatoria del peso di 85KDa. L'attivazione del recettore permette l'attivazione di una cascata di effettori di segnale coinvolti nella proliferazione cellulare e nella sopravvivenza. Appartiene a questa classe *PIK3CA*, che codifica per la subunità 110 α di PI3K. Il gene mappa nella regione 3q26, un'area spesso amplificata in vari tumori umani tra cui il carcinoma ovarico, della cervice e carcinoma del seno (Wu, 2004).

PIK3CA lega AKT che, una volta attivata da mTOR, è in grado di promuovere la sopravvivenza cellulare (Figura 11). Il segnale di sopravvivenza cellulare che viene trasmesso



Kurek, Somatic mosaic activating mutations in pik3ca cause Cloves Syndrome Am J Hum Genet. 2012

Figura 11: Cascata di segnale PI3K/AKT/mTor coinvolta nella proliferazione incontrollata delle cellule.

a seguito dell'attivazione di AKT si esplica attraverso una duplice via: l'inattivazione di segnali pro-apoptotici e l'attivazione di segnali anti-apoptotici. Pertanto la via di segnale PI3K3CA/AKT/mTOR regola il ciclo cellulare agendo su elementi proteici che fanno parte del macchinario di controllo del ciclo cellulare. Tra questi, uno dei bersagli di AKT è p27, diretto inibitore di CDK. Una volta fosforilato da AKT, p27 si localizza nel citoplasma dove non può più esercitare la sua funzione inibitoria; in questo modo CDK2 non è inibita ed il DNA viene duplicato, processo che favorisce la tumorigenesi. (Du, 2005; Martelli 2006). PIK3CA rappresenta quindi un interessante e potenziale bersaglio molecolare

per lo studio di nuove terapie antitumorali.

Nell'osteosarcoma la sovraespressione di PIK3CA nei campioni tumorali correla con una prognosi peggiore.

In questa tesi di dottorato l'attenzione è stata focalizzata verso le proteine chinasi: CDK2, PIK3CA, AURK-A, AURK-B e PLK1, con l'obiettivo di selezionare, tra queste, nuovi bersagli terapeutici utili a potenziare la cura dell'osteosarcoma verso cui analizzare inibitori chinasi-specifici di potenziale uso clinico.

Capitolo II

Scopo della ricerca

Nonostante l'introduzione della chemioterapia abbia apportato un significativo miglioramento nella prognosi, permane un rilevante numero di pazienti (40-45%) con caratteristiche di farmacoresistenza naturale e/o acquisita, i quali non rispondono al trattamento farmacologico e vanno incontro ad un decorso clinico sfavorevole, con esito fatale entro 2-3 anni dall'esordio.

La farmacoresistenza rappresenta il vero "tallone d'Achille" della chemioterapia.

In base a quanto detto appare evidente come una migliore caratterizzazione biologica e biomolecolare dell'osteosarcoma può fornire utili indicazioni per l'identificazione di nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzazione di farmaci bersaglio-specifici in associazione ai chemioterapici tradizionali.

L'obiettivo del presente programma di studio è stato quello di identificare e validare nuovi possibili bersagli terapeutici per l'osteosarcoma partendo dall'analisi del chinoma umano.

I dati relativi l'analisi dell'alterazione dei livelli di espressione dei circa 500 geni del chinoma umano in cellule di osteosarcoma hanno rappresentato il punto di partenza di questo studio. Lo scopo è stato quello di identificare un gruppo di chinasi (5-10) di possibile rilevanza terapeutica per l'osteosarcoma, con un livello di sovraespressione associato ad un decorso clinico sfavorevole, da validare su modelli sperimentali unitamente all'efficacia di farmaci inibitori chinasi-specifici.

Le chinasi selezionate sono state validate *in vitro* su modelli sperimentali rappresentati da linee cellulari di osteosarcoma umano, sia farmacosensibili che resistenti ai farmaci chemioterapici utilizzati normalmente nei protocolli di trattamento dell'osteosarcoma (doxorubicina, methotrexate, cisplatino), già selezionate e caratterizzate presso il Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna.

Il Progetto di Studio è stato articolato in tre fasi fondamentali:

- I. l'analisi dei dati di profilo di espressione genica già disponibili al fine di selezionare 5-10 chinasi da validare successivamente *in vitro*.

- II. la validazione *in vitro* attraverso tecniche di *RNA interference* e silenziamento genico delle chinasi identificate nella prima fase del programma, con selezione delle 5 chinasi più promettenti come possibili nuovi bersagli terapeutici
- III. la valutazione dell'efficacia *in vitro* di farmaci diretti contro le chinasi selezionate nella fase precedente e delle loro interazioni con i chemioterapici convenzionali (doxorubicina, methotrexate, cisplatino)

Capitolo III

Materiali e metodi

3.1 Farmaci.

Cisplatino (CDDP), Doxorubicina (DX) e Methotrexate (MTX) e sono stati forniti rispettivamente da Teva Italia (Milano, Italia), Sandoz (Varese, Italia) e Wyeth Lederle (Latina, Italia). Le soluzioni madri di MTX (25 mg/ml) e CDDP (500 µg/ml) sono state mantenute a 4°C, mentre la DX (2mg/ml) è stata aliquotata e conservata a -20°C.

VX-680, ZM447439 e Roscovitina sono stati forniti da Santa Cruz Biotechnology, NMS-1 è stato donato da Nerviano Medical Science (Nerviano, Italia). Sono stati ricostituiti in dimethylsulphoxide (DMSO) alla concentrazione di 20mM VX-680, 1 mM ZM447439, 10mM Roscovitina e NMS-1, le aliquote sono state conservate a -20°C.

Per tutti i farmaci, le concentrazioni d'uso sono state preparate diluendo le soluzioni madri nel mezzo di coltura immediatamente prima dell'uso.

3.2 Linee cellulari.

Le linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 sono state ottenute da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), mentre le altre linee di osteosarcoma umano: IOR/OS9, IOR/OS18 sono state stabilizzate da campioni biotici derivanti da pazienti con osteosarcoma non trattati, nel Laboratorio di Ricerca Oncologica degli Istituti Ortopedici Rizzoli (Bologna, Italia) (*Benini S, 1999*)

Le varianti farmaco-resistenti alla DX (U-2OS/DX580, Saos-2/DX580), al MTX (U-2OS/MTX300, Saos-2/MTX300) e al CDDP (U-2OS/CDDP4µg, U-2OS/CDDP6µg) sono state ottenute esponendo le linee cellulari farmaco-sensibili U-2OS e Saos-2 a concentrazioni crescenti di ciascun farmaco (*Serra M, 1993; Serra, 2004; Pasello, 2008*). L'esposizione continua a ciascun farmaco ha prodotto una serie di varianti farmaco-resistenti che sono state identificate con il nome della linea cellulare parentale, seguito dal nome e dalla concentrazione del farmaco impiegato per la selezione. La concentrazione del farmaco si intende in ng/ml o quando chiaramente specificato in µg/ml. Le linee cellulari sono state coltivate in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Lonza, Verviers, Belgio) in cui sono state aggiunte penicillina (100 U/ml)/streptomicina (100 µg/ml) (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) e il 10% di siero fetale bovino inattivato (FBS; Biowhittaker Europe, Cambrex-Verviers, Belgio). Ciascuna linea cellulare farmacoresistente è stata coltivata in terreno di coltura addizionato del farmaco alla concentrazione usata per la selezione.

Tutte le linee cellulari sono state mantenute a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

3.3 Campioni clinici.

I campioni clinici comprendono 21 casi provenienti da pazienti affetti da osteosarcoma classico, primario ad alto grado di malignità (con tumore localizzato alle estremità, insorto in età inferiore a 40 anni). Tutti i campioni sono stati ottenuti tramite biopsia chirurgica alla diagnosi, prima di alcun trattamento chemioterapico. Tutti i pazienti sono stati trattati con un protocollo di chemioterapia neoadjuvante a base di DX, MTX, CDDP e ifosfamide. Il follow-up medio è stato di 91 mesi (intervallo di tempo compreso tra 63 e 218 mesi). Il consenso informato per l'utilizzo del materiale biologico a scopo di ricerca è stato ottenuto da ciascun paziente durante lo studio.

3.4 Estrazione RNA.

L'RNA è stato estratto da pellet cellulare tramite l'utilizzo del reagente TRIzol (Invitrogen) in accordo con il protocollo fornito dalla ditta. Completata la fase di estrazione, la concentrazione e la qualità dell'RNA sono state valutate, rispettivamente, attraverso analisi spettrofotometrica tramite NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) ed elettroforesi su gel di agarosio all'1,5%.

Per i campioni clinici, l'RNA totale è stato estratto da campione biotico congelato sempre tramite TRIzol. Prima dell'estrazione, tutti i casi sono stati esaminati istologicamente per valutare la qualità dei tessuti al fine di selezionare solo i campioni rappresentativi su cui eseguire i microarray. Dopo la normalizzazione dei dati di espressione con MAS5.0 algorithm, i profili di espressione genica sono stati valutati tramite l'utilizzo del software R2 web application (<http://r2.amc.nl>).

3.5 Silenziamento genico.

Gli esperimenti di silenziamento sono stati eseguiti tramite il sistema Dharmacon ON-TARGET plus SMARTpool (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Per ciascuna linea cellulare la densità di semina e i tempi di incubazione sono stati ottimizzati tramite esperimenti preliminari di trasfezione che prevedono l'uso di Dharmacon siGLO-Green coniugato con fluoresceina (Thermo Fisher Scientific). Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti in IMDM al 10% di FBS privo di antibiotici alle seguenti densità di semina:

- Saos-2: 120,000 cellule/well
- U-2OS: 100,000 cellule/well
- IOR/OS18: 75,000 cellule/well
- IOR/OS9:75,000 cellule/well

Dopo 24h, il mezzo di coltura è stato cambiato con IMDM, privo di FBS e antibiotici, e integrato con con 2 ul/ml di Lipofectamine 2000 (Invitrogen) e con 25 nM di Dharmacon ON-TARGET plus SMARTpool siRNA specifico per AURK-A (L-003545-01 Human AURKA), AURK-B (L-003326-01 human AURKB), CDK2 (L-003236-00-0020), PLK-1 (L-003290-00-0020) E PIK3CA (J-003018-12) oppure scrambled SMARTpool siRNA (D-001810-02-20). Il controllo è stato incubato con lo stesso mezzo senza siRNA. Dopo 5 ore dalla trasfezione il mezzo è stato sostituito con IMDM al 10% di FBS senza antibiotici e le cellule sono state mantenute in coltura per tempi sperimentali diversi:

- Silenziamento AURKA e AURKB: U-2OS 24-, 48- e 72 ore; Saos-2 e IOR/OS18 48-, 72- e 96 ore;
- Silenziamento CDK2: U-2OS 24-, 48- e 72 ore; Saos-2 72-, 96- e 120 ore, e IOR/OS18 48-, 72- e 96 ore;
- Silenziamento PLK-1 e PIK3CA: U-2OS 24-, 48- e 72 ore; Saos-2 e IOR/OS9 48-, 72- e 96 ore;

Dopo la valutazione della morfologia cellulare, le cellule sono state raccolte e contate mediante l'utilizzo di Trypan blue e processate sia per l'estrazione di RNA e proteine.

3.6 Quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Per ogni singolo gene analizzato sono stati retrotrascritti 500 ng di RNA totale utilizzando High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster city, CA) in accordo con il protocollo fornito dal produttore. Per quantificare il livello di espressione genica di ciascuna proteina chinasi nei campioni silenziati rispetto al controllo sono stati utilizzati i seguenti:

- AURKA TaqMan Gene Expression Assay (Assay ID: Hs01582072_m1)
- AURKB TaqMan Gene Expression Assay (Assay ID: Hs00177782_m1)
- CDK2 TaqMan Gene Expression Assay (Assay ID: Hs006080802_m1)
- PLK-1 TaqMan Gene Expression Assay (Assay ID: Hs00983229_m1)
- PIK3CA TaqMan Gene Expression Assay (Assay ID: Hs00907966_m1)

Come gene di riferimento, per normalizzare i dati ottenuti, è stato utilizzato GAPDH (Assay ID: Hs99999905_m1).

Le reazioni di amplificazione per ciascun campione sono state realizzate in triplicato utilizzando la TaqMAN Universal Master Mix (Applied Biosystem) in un volume totale di 25 ul con un programma standard di 40 cicli (95°C per 5 sec, 60°C per 20 sec, 72°C per 30 sec), dopo un iniziale ciclo di 95°C per 10 sec.

Lo strumento utilizzato per la reazione di amplificazione è ABI PRISM 7900 SDS.

Ogni gene e ogni variante cellulare è stata analizzata in 2 esperimenti indipendenti.

Il valore di Delta (Δ) C_T del gene GAPDH è stato impiegato per normalizzare i valori ottenuti dai diversi geni testati per la medesima aliquota di cDNA.

Il valore $2^{-\Delta\Delta C_t}$ rappresenta la differenza di espressione del gene d'interesse (intesa come numero di volte) nei campioni silenziati rispetto al relativo controllo non trattato, utilizzando il controllo stesso come calibratore ($\Delta C_T = C_T$ del gene bersaglio - C_T del gene di riferimento; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ della variante - ΔC_T del calibratore).

3.7 Western Blot.

Le cellule sono state raccolte, lavate in PBS freddo e successivamente lisate in RIPA buffer. La sospensione cellulare è stata posta in agitazione a 4°C per 30 min.

Il lisato proteico ottenuto è stato centrifugato a 13,000 rpm per 15 min a 4°C.

Concentrazioni uguali di lisato proteico sono stati caricati e le proteine separate in base al peso molecolare mediante SDS-PAGE, il trasferimento è avvenuto a 200mA per 2h a 4°C su una membrana di PVDF (Immobilion P-Transfer membrane, Millipore, Billerica, MA). Le membrane sono state poste in agitazione in una soluzione di blocco costituita da TBST al 5% di latte a temperatura ambiente per un'ora e successivamente incubate con l'anticorpo primario: anti Aurora-A kinase mouse monoclonal antibody (AbD serotec, Oxford, UK), anti Aurora-B kinase (N-term) rabbit polyclonal antibody (Epitomics, CA), anti Cdk2 Purified Mouse (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), anti PI3-kinase p110 α (H-201) rabbit monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA), anti PLK1 rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling technology, Danvers, MA) per la valutazione dell'espressione proteica dopo silenziamento genico.

Per la valutazione dell'apoptosi sono stati impiegati: Purified mouse monoclonal antibodies specifico per la Caspase 2 (Cell Signlaing Technology, Danvers, MA), Caspase 3 (Cell Signlaing Technology) e poly ADP-ribose polymerase-1 (PARP-1; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Al fine di verificare il caricamento delle proteine di ciascun campione, le membrane sono state incubate con l'anticorpo anti-Beta-Actin monoclonal antibody (Chemicon International, Temecula, CA). Gli anticorpi secondari impiegati sono: ECL Anti-rabbit IgG (GE Healthcare, UK) e ECL Anti-mouse IgG (GE Healthcare, UK)

Le bande proteiche sono state visualizzate tramite l'uso di un kit di rilevazione chemiluminescente (enhanced chemiluminescence detection system for western blotting; Liteablot® Plus, Euroclone, Milan, Italy) e autoradiografia.

3.8 Sensibilità *in vitro* ai farmaci di linee cellulari di osteosarcoma umano.

La sensibilità *in vitro* di ciascuna linea cellulare è stata calcolata attraverso la valutazione della curva dose-risposta ottenuta o con il kit 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dephenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germania), o con il kit AFC oppure tramite conta con trypan blue. La sensibilità *in vitro* è espressa in termini di IC₅₀ (corrispondente alla concentrazione di farmaco che inibisce il 50% della crescita cellulare dopo 96 ore dal trattamento). Nel caso delle linee cellulari DX-resistenti, l'efficacia *in vitro* è stata valutata anche in presenza di un inibitore di ABCB1 unitamente ai farmaci VX-680, ZM-447439 e NMS-1 (il cui nome è coperto da segreto industriale). Le cellule sono state trattate per 96 ore con dosi pari al valore di IC₅₀ di ciascun farmaco insieme alla concentrazione di inibitore pari a 0.5-1 uM, il grado di inibizione della crescita ottenuto in combinazione è stato confrontato quello ottenuto in seguito al trattamento con i singoli inibitori chinasi-specifici.

3.9 Incorporazione in fluorescenza.

È stata valutata, l'incorporazione intracellulare di DX sfruttando la sua naturale fluorescenza rossa (λ emissione: 500-800 nm). Le linee cellulari farmacoresistenti U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580 sono state seminate in dischi da 6mm alla densità di 300.000 cellule in IMDM al 10% di FBS. Raggiunta la confluenza del 60% circa, le cellule sono state incubate con una concentrazione di DX pari a 10 μ g/ml in presenza e in assenza di una concentrazione fissa di farmaco NMS-1 (2uM per le U-2OS/DX580 e 0,5 uM per le Saos-2/DX580) a 37°C per 30-45 minuti. Dopo la rimozione del farmaco, il monostrato cellulare è stato lavato brevemente con PBS, coperto con vetrino e immediatamente osservato al microscopio a fluorescenza - Nikon Eclipse 90i.

3.10 Interazioni farmacologiche

Per studiare *in vitro* le interazioni tra gli inibitori chinasi-specifici e i farmaci comunemente impiegati nei protocolli di chemioterapia convenzionale dell'osteosarcoma, le linee cellulari di osteosarcoma umano sono state trattate con diversi schemi di combinazione tra due farmaci.

In esperimenti di *associazione* simultanea di farmaci, le linee cellulari sono state trattate contemporaneamente con VX-680/ ZM-447439/ NMS-1 o Roscovitina unitamente a DX/ CDDP o MTX. In questi esperimenti tutti i farmaci sono stati usati a dosi equitossiche, corrispondenti alle dosi risultanti nell'inibizione della crescita del 50% (IC₅₀) dopo 96 ore di trattamento con il singolo farmaco. L'effetto delle associazioni tra farmaci è stato valutato in termini di additività, antagonismo o sinergismo confrontando i dati ottenuti dagli esperimenti

di trattamento con farmaco singolo a quelli derivanti dall'uso combinato dei due farmaci. Per definire il tipo di interazione, per ogni specifica associazione è stato calcolato un coefficiente di interazione (CI) a partire dall'equazione di Chou-Talalay tramite il software Calculusyn (Biosoft, Stapleford, UK).

Secondo il manuale del software, le interazioni farmaco-farmaco risultano: sinergiche quando il CI risulta inferiore a 0.90, additive quando il CI è compreso tra 0.90 e 1.10, oppure antagonista quando il CI è maggiore di 1.10.

Sono stati inoltre eseguiti esperimenti di valutazione *sequenziale*, per i farmaci NMS-1 o Roscovitina con DX CDDP e MTX, in cui le linee cellulari di osteosarcoma umano sono state esposte prima ai chemioterapici convenzionali e successivamente all'inibitore specifico per un totale di 96 ore per la sequenza DX/CDDP/MTX-NMS-1 e viceversa; e di 72 ore per la sequenza DX/CDDP-Roscovitina. La resa di ciascun esperimento è stata eseguita per le associazioni/sequenze con la DX tramite CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay (Promega Corporation, USA); per le associazioni/sequenze con il CDDP tramite MTT-assay e per associazioni/sequenze con MTX tramite conta cellulare con Trypan blue.

L'effetto degli esperimenti di sequenza è stato valutato tramite software Calculusyn.

3.11 Analisi del ciclo cellulare.

La determinazione degli effetti dei farmaci anti-chinasi sul ciclo cellulare è stata condotta seminando le linee cellulari farmacosensibili e farmacoresistenti di osteosarcoma umano in IMDM al 10% FBS. Dopo 24 ore dalla semina, il terreno di coltura è stato cambiato con IMDM al 10% di FBS senza (controllo) o con VX-680/ZM-447439/NMS-1 o Roscovitina alle concentrazioni di IC_{50} o 2 volte IC_{50} , caratteristiche di ciascuna linea cellulare. Un'ulteriore controllo interno è stato incluso negli esperimenti, ossia le cellule seminate in IMDM al 10% di FBS integrato con concentrazioni di DMSO corrispondenti a quelle dei campioni trattati con i farmaci in esame. Dopo 24, 48, 72 ore di trattamento con il farmaco, le cellule sono state incubate con bromodeossiridina *BrdU* (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 10 μ M per 1 ora a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ (eccetto per la linea cellulare IOR/OS9 che ha richiesto un tempo di incubazione maggiore di circa 1,5-2 ore). Le cellule infine sono state raccolte e fissate in etanolo al 70% per 30 minuti. Dopo la denaturazione del DNA con HCl 2N, le cellule sono state incubate con l'anticorpo primario monoclonale anti-bromodeossiridina B44 (Becton Dickinson, San Jose, CA) diluito 1:8, e in seguito con un anticorpo secondario anti-mouse FITC (Sigma-Aldrich) diluito 1:200. Per la contemporanea determinazione del contenuto in DNA, la sospensione cellulare è stata risospesa in una soluzione di ioduro di propidio (PI) alla concentrazione di 20 μ g/ml (Sigma-Aldrich). Tutti i campioni sono stati analizzati tramite citofluorimetria a flusso (FACSCalibur; Becton

Dickinson) per determinare la distribuzione delle singole popolazioni nelle varie fasi del ciclo cellulare.

3.12 Soft agar assay.

La valutazione della crescita in condizioni di non aderenza è stata determinata in agarosio allo 0.33% (SeaPlaque, FMC BioProducts, Rockland, ME) sopra uno strato di agarosio allo 0.5%. La densità di semina per ciascuna petri (60 mm) è stata di: 10,000 cellule per U-2OS/DX580, Saos-2/MTX300 and Saos-2/CDDP6 μ g; 25,000 per IOR/OS18; 33,000 per U-2OS, Saos-2, Saos-2/DX580 and U-2OS/CDDP4 μ g; 50,000 per U-2OS/MTX300 e 100,000 per IOR/OS9. La sospensione cellulare è stata risospesa in un mezzo semisolido (IMDM + 10% FBS contenente 0.33% di agarosio) con la corrispondente dose di IC₅₀ di VX-680 o ZM447439 oppure con IMDM 10% FBS addizionato con concentrazioni di DMSO corrispondenti a quelle dei trattati (non-treated DMSO controls). Le petri sono state infine incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂, e dopo 15 giorni sono state contate le colonie contenenti meno di 50 cellule ciascuna.

3.13 Motilità cellulare tramite "woundhealing assay" ("rimarginazione del graffio").

Per valutare la motilità tramite *woundhealing assay*, sono state seminate 3×10^5 cellule per ciascuna well (in piastre da 6-well). A 24 ore dalla semina si procede con il graffio al centro del pozzetto (0.6 mm) dal basso verso l'alto con un puntale sterile 1000P. Il mezzo di coltura è stato cambiato per rimuovere detriti cellulari e le cellule sono state trattate con VX-680 o ZM447439 alla corrispondente dose di IC₅₀ di ciascuna linea. I controlli non trattati sono stati coltivati in IMDM al 10% di FBS senza o con concentrazioni di DMSO corrispondenti a quelle dei campioni trattati con i farmaci.

Il graffio è stato fotografato prima di ciascun trattamento e ai differenti tempi sperimentali con il microscopio Olympus IX51 (40X magnification; Olympus Optical, Tokyo, Giappone). L'area compresa tra i margini del graffio è stata valutata tramite il software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD). La stima della capacità di rimarginare il graffio in seguito al trattamento, è stata ottenuta confrontando l'area del graffio iniziale con l'area del graffio dei campioni trattati nei vari tempi sperimentali.

3.14 Analisi statistica.

Per determinare una stima tra i valori medi è stato impiegato il test del t student. Per l'analisi delle curve di sopravvivenza è stato utilizzato il log-rank test e il metodo di Kaplan-Meier.

La significatività degli esperimenti volti a valutare la capacità migratoria sono stati analizzati tramite 2-way ANOVA (analisi con il software GraphPad Prism v5).

Capitolo IV

Risultati

4.1 Analisi dei livelli di espressione delle chinasi in campioni clinici e linee cellulari.

L'analisi dei dati di profilo di espressione genica, già ottenuti su una serie di campioni clinici di osteosarcoma ad alto grado di malignità, è stata ristretta ai circa 500 geni del chinoma umano ed eseguita con un *softwares* (R2) specificatamente sviluppato per correlare direttamente i dati di espressione genica con le caratteristiche clinico-patologiche ed il decorso clinico dei pazienti considerati in questo studio.

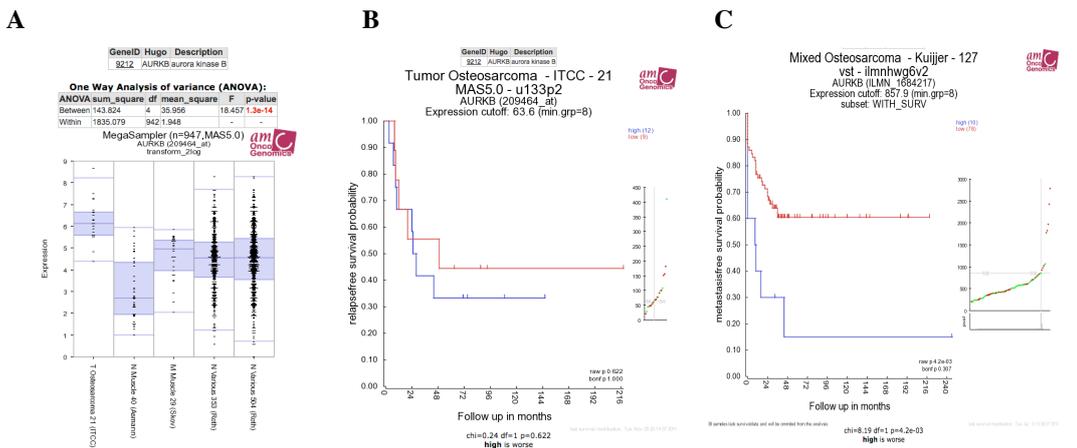
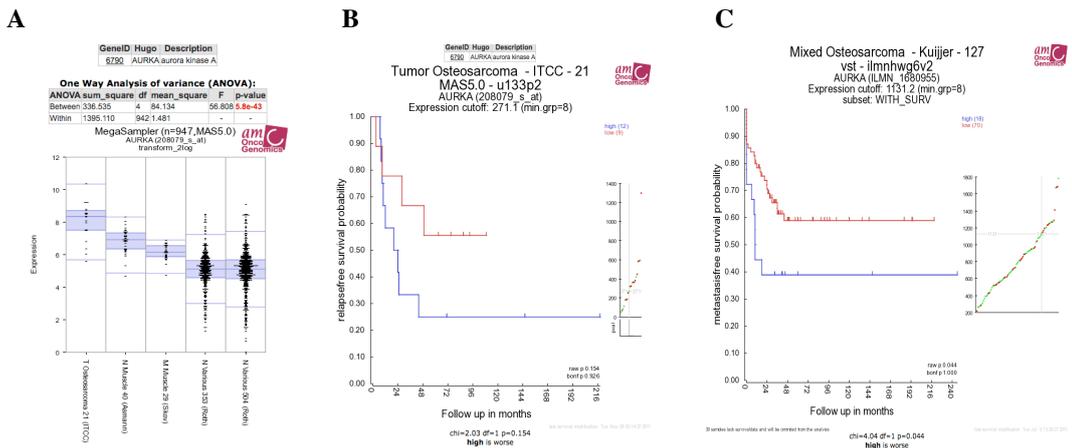
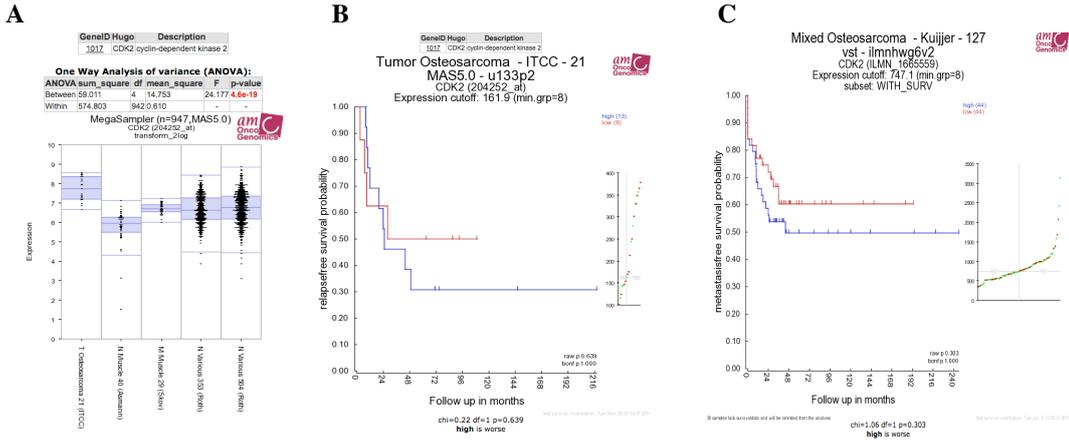
In questa analisi è stata data priorità alle chinasi che presentavano le seguenti caratteristiche:

- 1) elevata espressione in una percentuale rilevante (almeno 30-40%) di casi
- 2) maggiore espressione nei campioni tumorali di osteosarcoma rispetto ai tessuti normali e muscolo-scheletrici (**Figura 1A**)
- 3) associazione con caratteristiche clinico-patologiche di alta malignità e decorso clinico sfavorevole effettuate prima su di una casistica numericamente ristretta “training set” (**Figura 1B**) e successivamente su di una casistica più ampia “validation set” (**Figura 1C**).
- 4) disponibilità di farmaci chinasi-specifici per eventuali terapie mirate, volte ad inibire la chinasi in oggetto e/o il *pathway* metabolico in cui essa opera.

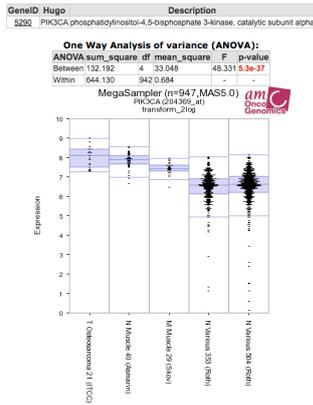
In questa prima fase dello studio sono state selezionate 5 chinasi in base ai criteri sopra esposti (elencate in ordine decrescente di priorità):

- Cycline dependent kinase 2 (CDK2)
- Aurora kinase A (AURK-A)
- Aurora kinase B (AURK-B)
- Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha polypeptide (PIK3CA)
- Polo-like-kinase 1 (PLK1)

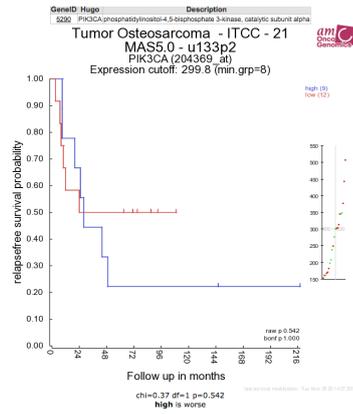
Figure 1



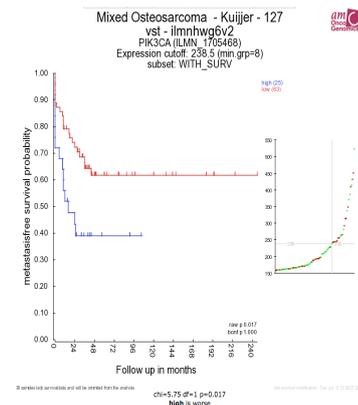
A



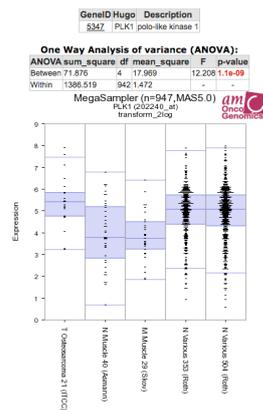
B



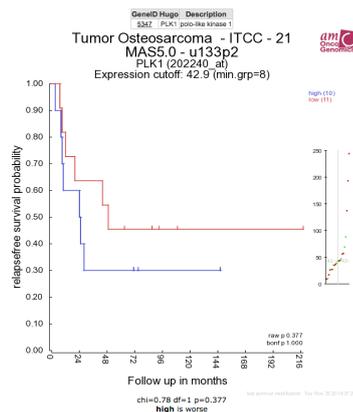
C



A



B



C

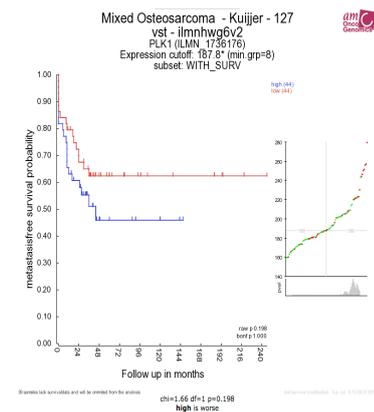


Figura 1: Analisi dei livelli di espressione genica (gene expression profiling) ottenuti tramite *hg-u133 plus 2.0 Affymetrix* microarrays e analizzati con il software R2 (<http://r2.amc.nl>).

A) Rappresentazione grafica del *box plot* dei livelli di espressione di ciascuna proteina chinasi in 21 campioni clinici di osteosarcoma (Osteosarcoma 21 (ITCC)) rispetto ai tessuti muscoloscheletrici (N Muscle 40 (Asmann); N Muscle 29 (Skov)) e altri tessuti normali (N Various 353 (Roth); N Various 504 (Roth)). All'interno delle parentesi è specificato il numero di campioni analizzati. La significatività (*P value*) è stata ottenuta tramite test ANOVA ($P < 0.01$).

B) Probabilità di sopravvivenza libera da malattia su una casistica di 21 campioni clinici di osteosarcoma ad alto grado (definita "training set") e **(C)** probabilità di sopravvivenza libera da metastasi in una casistica più ampia (definita "validation set") composta da 88 casi clinici di osteosarcoma ad alto grado in cui i pazienti sono stati stratificati in base al livello di espressione di ciascuna proteina chinasi, rappresentate nel seguente ordine: CDK2, AURK-A, AURK-B, PIK3CA e PLK1. Il gruppo di pazienti che esprimono alti livelli di ciascuna proteina chinasi (definiti "HIGH") include i casi che mostrano un livello di espressione uguale o maggiore rispetto al valore di *cut-off* prestabilito. Il gruppo di pazienti che non esprimono alti livelli di ciascuna chinasi sono definiti "LOW".

4.2 Valutazione della rilevanza biologica delle chinasi selezionate.

La dipendenza delle cellule di osteosarcoma da ognuna delle proteine chinasi selezionate, in base ai dati di profilo di espressione genica, è stata validata attraverso l'utilizzo di tecniche di silenziamento genico, basate sull'impiego del sistema *Dharmacon-SmartPool RNA interference* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). La trasfezione è stata eseguita utilizzando gli oligonucleotidi antisenso silenzianti alla concentrazione di 25 nM veicolati all'interno della cellula tramite Lipofectamine, un lipide cationico che forma un complesso con gli oligonucleotidi (liposoma) ed impedisce la repulsione elettrostatica tra la membrana e l'oligonucleotide stesso. Come controllo interno al silenziamento è stato usato un oligonucleotide non silenziante noto come "scramble" (SCR).

Lo studio è stato eseguito su linee cellulari farmacosensibili commerciali (U-2OS e Saos-2) e isolate nel Laboratorio di Oncologia Sperimentale da pazienti con osteosarcoma ad alto grado di malignità (IOR/OS18 e IOR/OS9), scelte in base ai livelli di espressione delle proteine chinasi selezionate durante la prima parte del progetto (CDK2, Aurora kinase A, Aurora kinase B, PIK3CA e PLK1).

Tali linee sono rappresentate da: U-2OS, Saos-2, IOR/OS18 per il silenziamento dei geni: AURK-A, AURK-B e CDK2; U-2OS, Saos-2 e IOR/OS9 per il silenziamento di PLK1 e PIK3CA.

L'entità del silenziamento genico è stata analizzata con tecniche di *real-time PCR* e *Western blot*, che hanno messo in evidenza un rilevante abbattimento (*knock-down*) dei livelli di RNA messaggero (mRNA) e proteina nelle linee silenziate (soprattutto per le proteine CDK2, Aurora chinasi A, Aurora chinasi B).

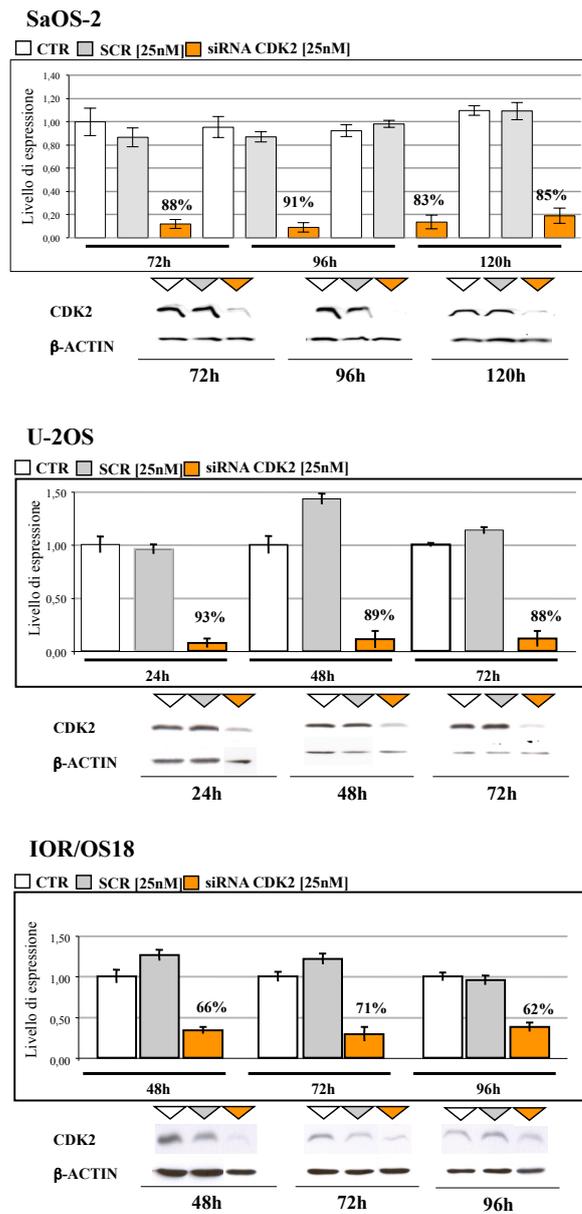
Una significativa riduzione nei livelli sia del messaggero che della proteina di CDK2 **Figura 2 (A)**, AURK-A **(B)** e AURK-B **(C)**, è stato osservato in tutte le linee cellulari, ad eccezione delle IOR/OS18 dove è stato osservato un abbattimento significativo dei livelli della proteina e minore dei livelli di mRNA per i geni AURK-A e AURK-B.

Il silenziamento del gene PIK3CA ha messo in evidenza un knock-down nei livelli di espressione del messaggero non corrispondente ad un abbattimento della proteina **Figura 2D**; probabilmente in questo caso la trasfezione avrebbe richiesto una concentrazione di oligonucleotide silenziante maggiore al fine di ottenere una riduzione nei livelli proteici rilevabile. Per quanto riguarda PLK1 è stata osservata una riduzione dei livelli sia del livello del messaggero che di proteina rilevante in tutte le linee cellulari e in modo omogeneo al primo tempo sperimentale dopo la trasfezione con l'oligonucleotide silenziante specifico **Figura 2E**.

La specificità degli esperimenti di silenziamento è confermata dal fatto che la trasfezione con il siRNA *scramble* (SCR) non ha comportato una significativa diminuzione nei livelli di espressione sia della proteina che del messaggero, rispetto al controllo non trattato (CTR).

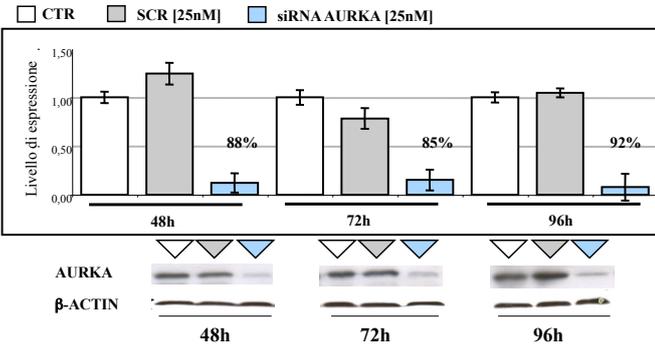
Figura 2

A

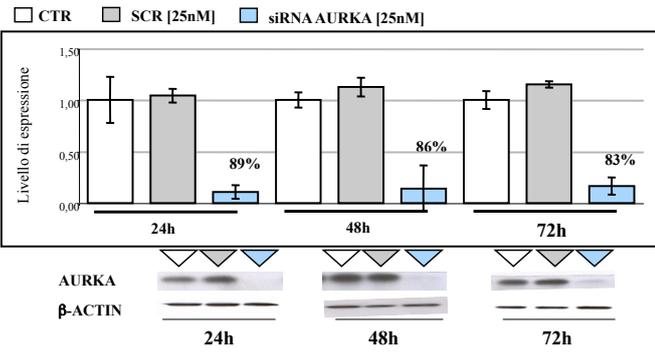


B

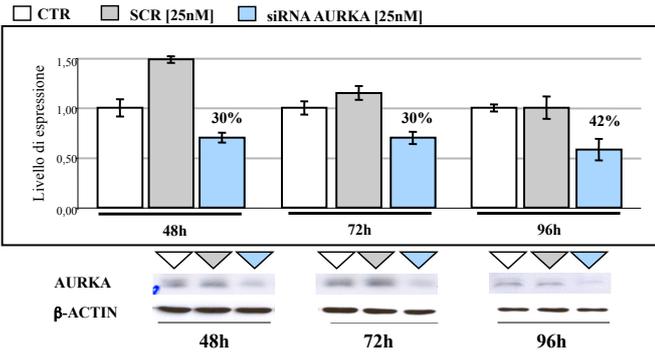
SaOS-2



U-2OS

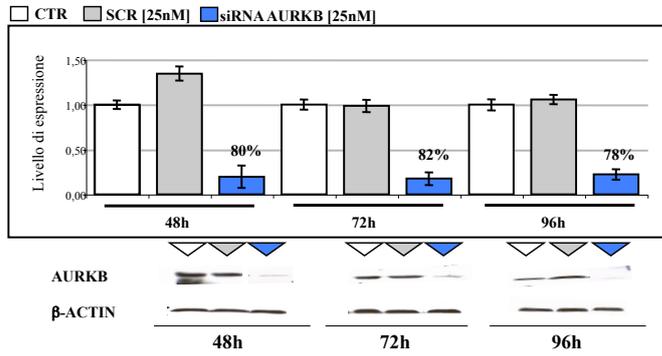


IOR/OS18

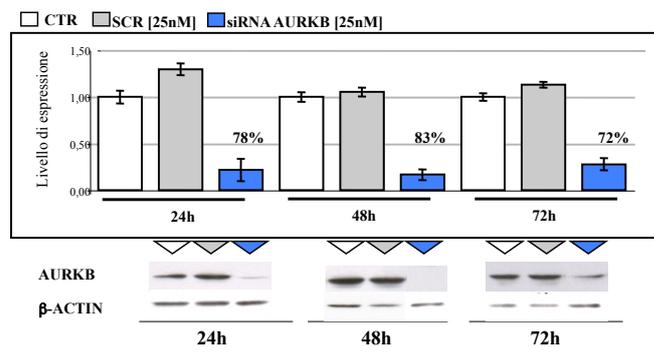


C

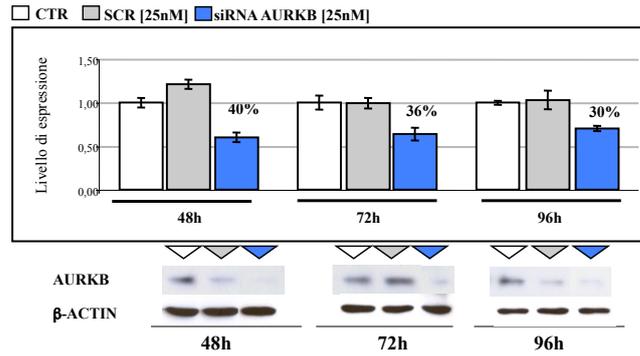
SaOS-2



U-2OS

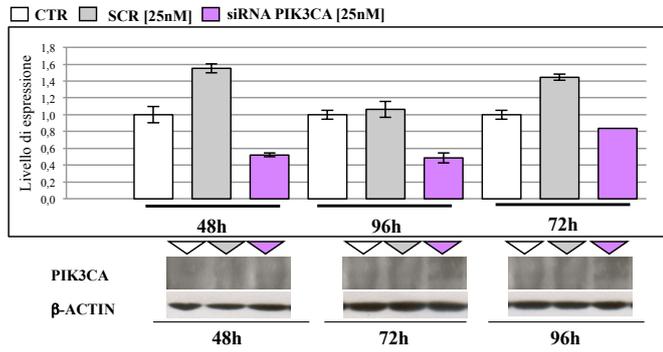


IOR/OS18

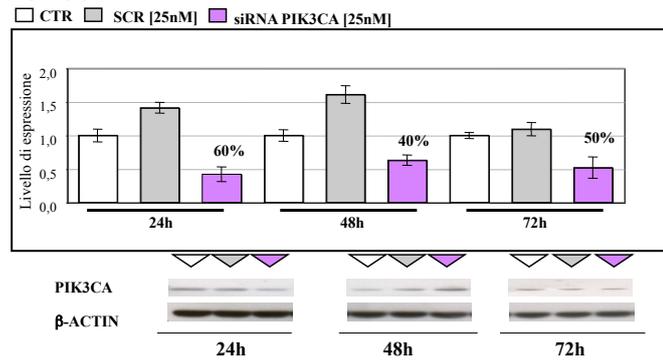


D

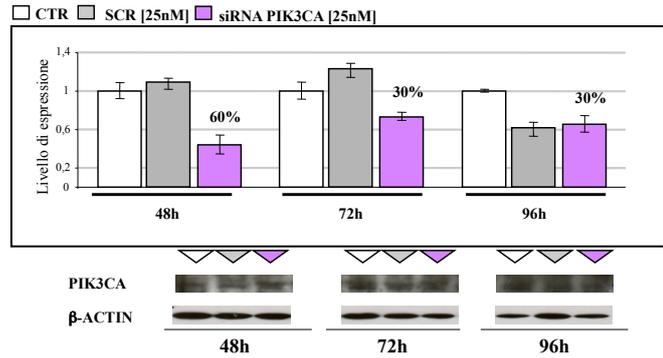
SaOS-2



U-2OS



IOR/OS9



E

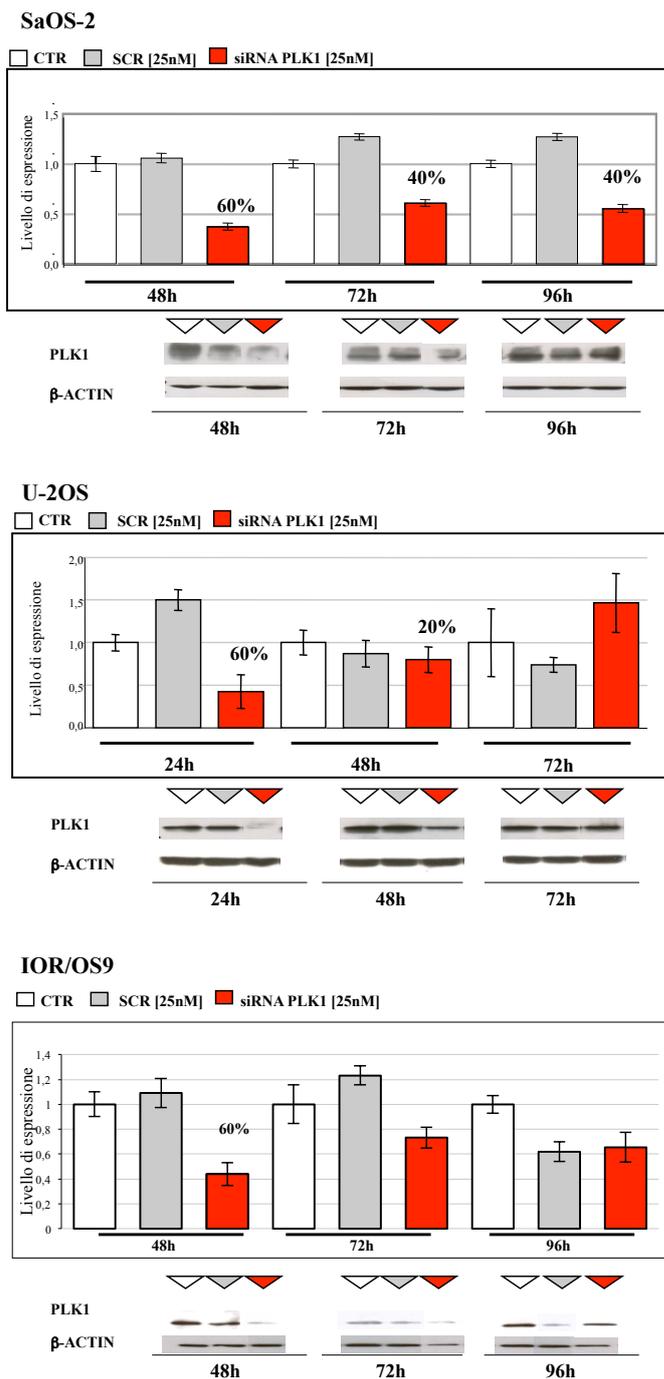


Figura 2: Valutazione dell'entità di silenziamento genico tramite *real-time PCR* e *Western Blot* ai diversi tempi sperimentali dopo silenziamento dei geni: CDK2 (A), AURK-A (B) e AURK-B (C) nelle linee cellulari di osteosarcoma U-2OS, Saos-2, IOR/OS18. L'entità del silenziamento dei geni PIK3CA (D) e PLK1 (E) è stata valutata, ai diversi tempi sperimentali, in linee cellulari di osteosarcoma U-2OS, Saos-2 e IOR/OS9.

CTR, controllo non trattato, cellule coltivate in IMDM al 10% di FBS; **SCR**, linee cellulari silenziate con il siRNA scrambled (25 nM).

Gli effetti del silenziamento genico di ogni specifica chinasi sono stati valutati in termini di:

- **inibizione della crescita cellulare (Figura 3):** presente per tutte le linee in cui sono state silenziate le proteine chinasi CDK2, AURK-A, AURK-B, e PLK1.

In particolare il silenziamento di AURK-A (**B**) e AURK-B (**C**) comporta una marcata inibizione della crescita nelle linee cellulari U-2OS (rispettivamente 55% e 46%) e Saos-2 (rispettivamente 66% e 72%) evidente 48 ore dopo la trasfezione con il siRNA, mentre la linea cellulare IOR/OS18 mostra una evidente inibizione della crescita cellulare soltanto dopo il silenziamento di AURK-B (a 72 ore dal trattamento pari al 47%).

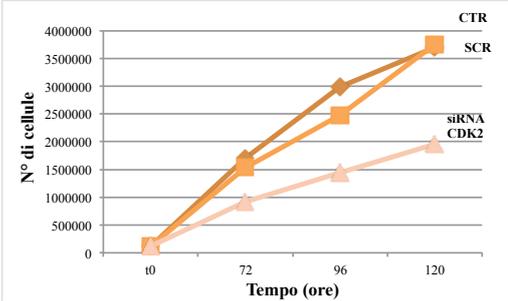
Il silenziamento del gene PLK1 in tutte le linee cellulari induce un'inibizione molto forte della crescita cellulare soprattutto a 72 e 96 ore dalla trasfezione (U-2OS 94%, Saos-2 79%; IOR/OS9 73%) (**E**).

Anche l'inibizione della crescita in seguito al silenziamento del gene CDK2 è stata rilevante, fatta eccezione per la linea cellulare U-2OS in cui l'inibizione è stata di grado inferiore se confrontata con quella dello SCR (a 24 ore inibizione pari al 6%; 48h al 9%; 72h al 19%) (**A**). L'inibizione della crescita dovuta al silenziamento di PIK3CA è di carattere lieve in tutte le linee impiegate (inibizione media della crescita in tutte le linee pari al 30%), molto probabilmente a causa della scarsa efficienza di silenziamento del gene a livello post-trasduzionale (**D**).

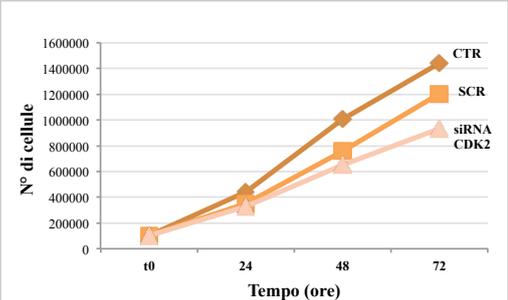
Figura 3

A

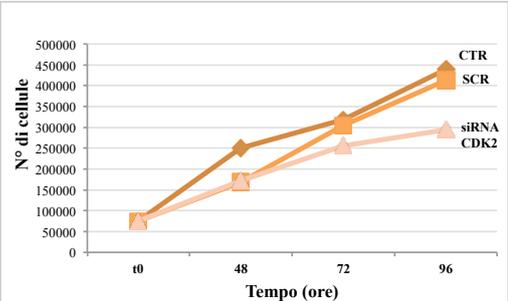
SaOS-2



U-2OS

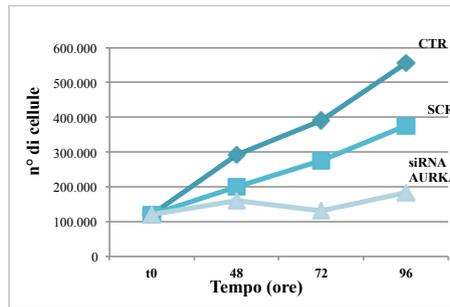


IOR/OS18

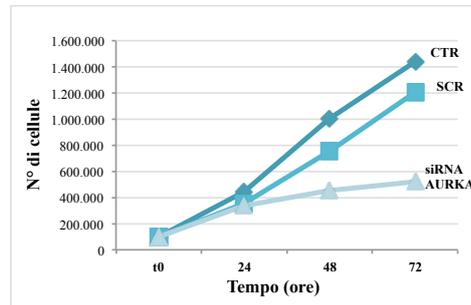


B

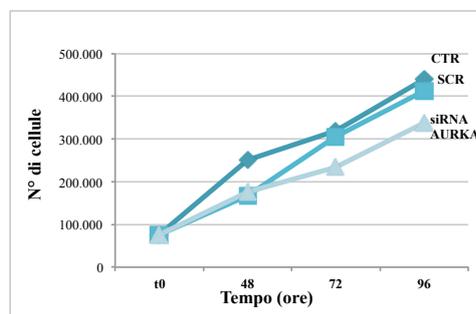
SaOS-2



U-2OS

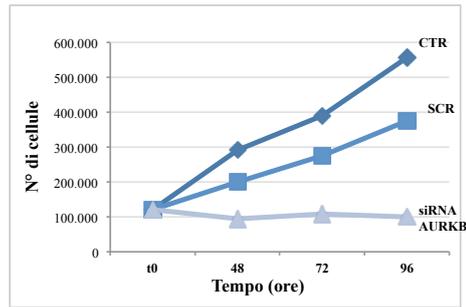


IOR/OS18

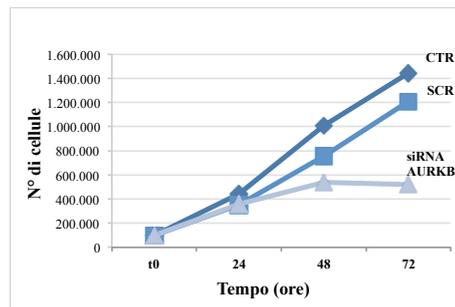


C

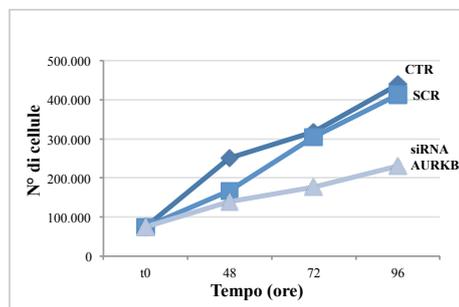
SaOS-2



U-2OS

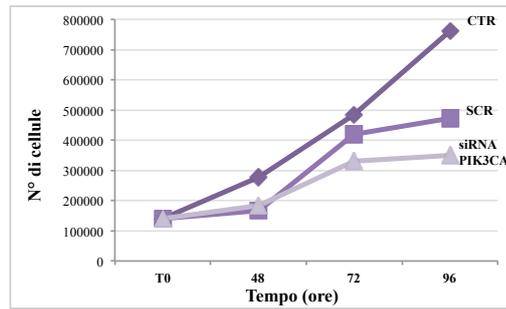


IOR/OS18

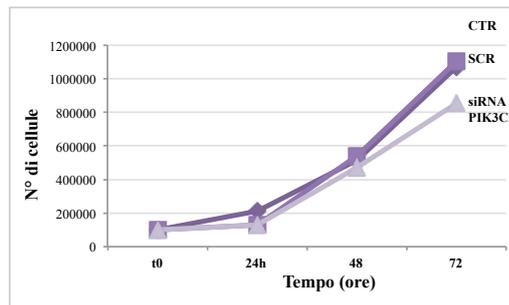


D

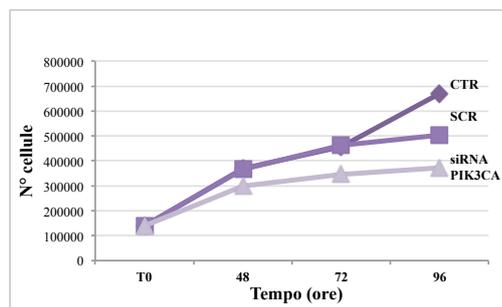
SaOS-2



U-2OS

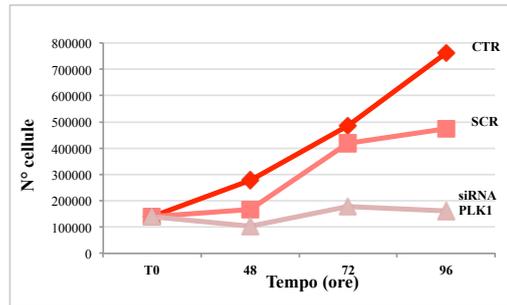


IOR/OS9

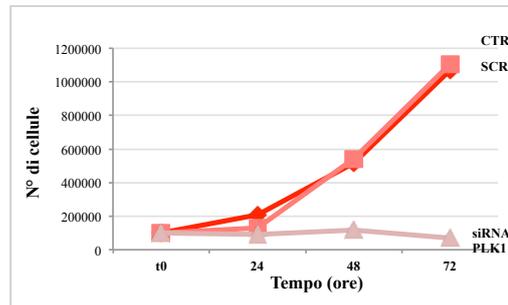


E

SaOS-2



U-2OS



IOR/OS9

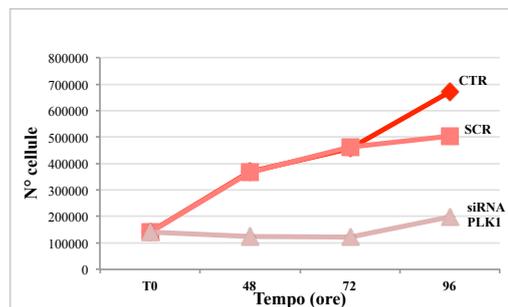


Figura 3: Valutazione della crescita cellulare dopo il silenziamento dei geni: CDK2 (A), AURK-A (B) e AURK-B (C) in linee cellulari di osteosarcoma U-2OS, Saos-2, IOR/OS18; PIK3CA (D) e PLK1 (E) in linee cellulari di osteosarcoma U-2OS, Saos-2, IOR/OS9, ai diversi tempi sperimentali. CTR, controllo non trattato; SCR, linee cellulari silenziate con il siRNA scrambled.

- **cambiamenti nella morfologia cellulare:** non rilevati, dato molto importante in quanto la trasfezione con gli oligonucleotidi non ha comportato modificazioni a carico della struttura cellulare e dunque effetti tossici; (dati non mostrati in figura)
- **induzione di apoptosi:** valutata tramite western blot in termini di clivaggio di Caspase 3 e clivaggio di PARP-1.

Le caspasi sono le proteine che controllano l'attivazione della risposta apoptotica: il ruolo principale di alcune è quello di entrare nel nucleo e frammentare la cromatina, altre tagliano specifici substrati nella cellula e ne provocano un cambiamento nella forma, tagliano lamine nucleari e proteine del citoscheletro, provocando il rilascio della struttura cellulare. Le caspasi svolgono la loro attività tramite idrolisi di residui specifici aminoacidici delle proteine bersaglio. Ognuna è composta da tre domini: un dominio centrale catalitico ("p20") contenente il sito attivo, un dominio C-terminale ("p10") e un prodominio N-terminale detto "*Death Domain*" (DD) coinvolto nella trasduzione del segnale apoptotico. La presenza del Death Domain determina il ruolo di ciascuna caspase, possiede infatti 2 sottodomini con funzioni diverse: DED (Death Effector Domain) e CARD (Caspase Recruitment Domain). In base alla struttura del prodominio N-terminale le caspasi sono suddivise in tre classi: caspasi con *ampio* prodominio (coinvolte nella risposta infiammatoria), caspasi con *lungo* prodominio definite iniziatori (contengono DED o CARD) e caspasi con prodominio *corto* definite effettori o esecutori. La **caspase 3** possiede il prodominio corto pertanto ha un ruolo da effettore o esecutore dell'apoptosi (Chowdury et al, 2008; Rupinder, 2007).

Uno dei substrati della caspase 3 è la *Poli-ADP-ribosio polimerasi 1* o **PARP-1**. E' un enzima coinvolto nei meccanismi di riparo al DNA per la sua capacità di riconoscere e legare il sito di rottura, richiamare molecole di poli-ADP-ribosio (usando il NAD come substrato energetico) e richiamare proteine riparatrici del DNA stesso. La caspase 3 idrolizza PARP-1 su un residuo specifico di *asparagina (Asp)*, determinando la formazione di due frammenti uno dei quali (contenente il DNA binding domain) resta legato al DNA e il conseguente ingombro sterico che ne deriva impedisce alle proteine responsabili del riparo del DNA di svolgere la loro funzione. (Hassa, 2009)

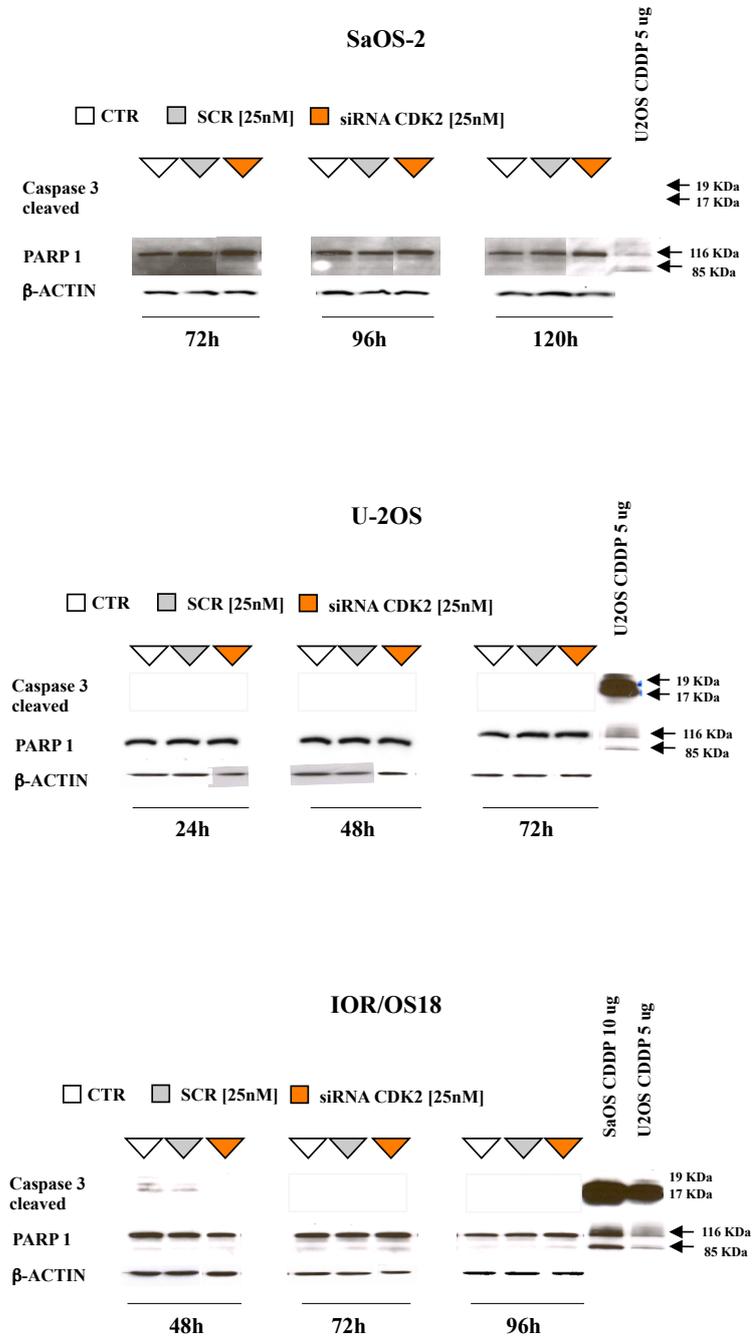
Per quanto riguarda la valutazione dell'apoptosi nelle linee cellulari silenziate, in alcune linee e per alcune protein chinasi silenziate è stato osservato il clivaggio di Caspasi 3: Saos-2 (per AURK-A, AURK-B, PLK1) e IOR/OS9 (per PLK1), **Figura 4**.

I risultati ottenuti in questi esperimenti hanno confermato che tutte le proteine chinasi selezionate (con la sola eccezione di PIK3CA) per la validazione *in vitro* sono risultate svolgere un importante ruolo biologico nell'osteosarcoma in quanto il loro silenziamento si è tradotto in un significativo rallentamento della crescita cellulare, accompagnato da induzione di apoptosi. Queste evidenze hanno

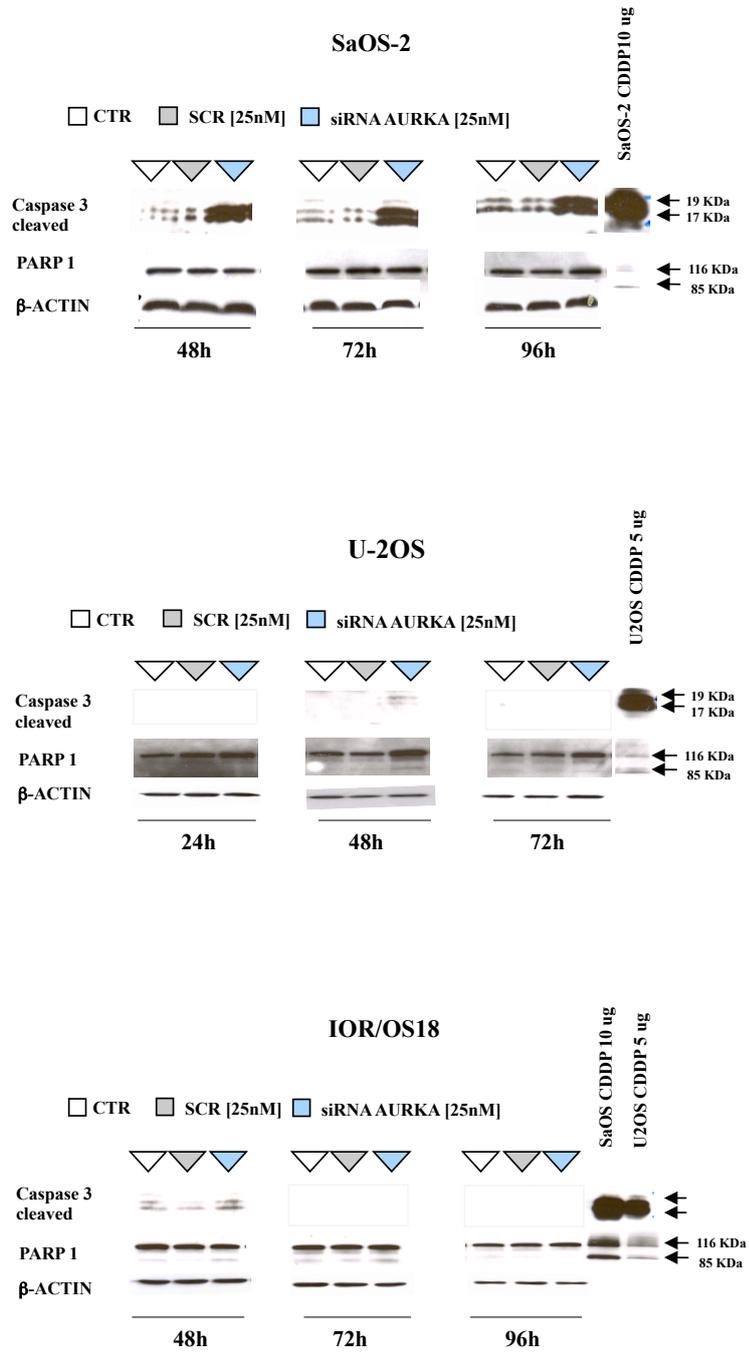
quindi indicato le protein chinasi AURK-A, AURK-B, PLK1 e CDK2 come nuovi possibili bersagli terapeutici nell'osteosarcoma, da validare ulteriormente nelle fasi successive dello studio.

Figura 4

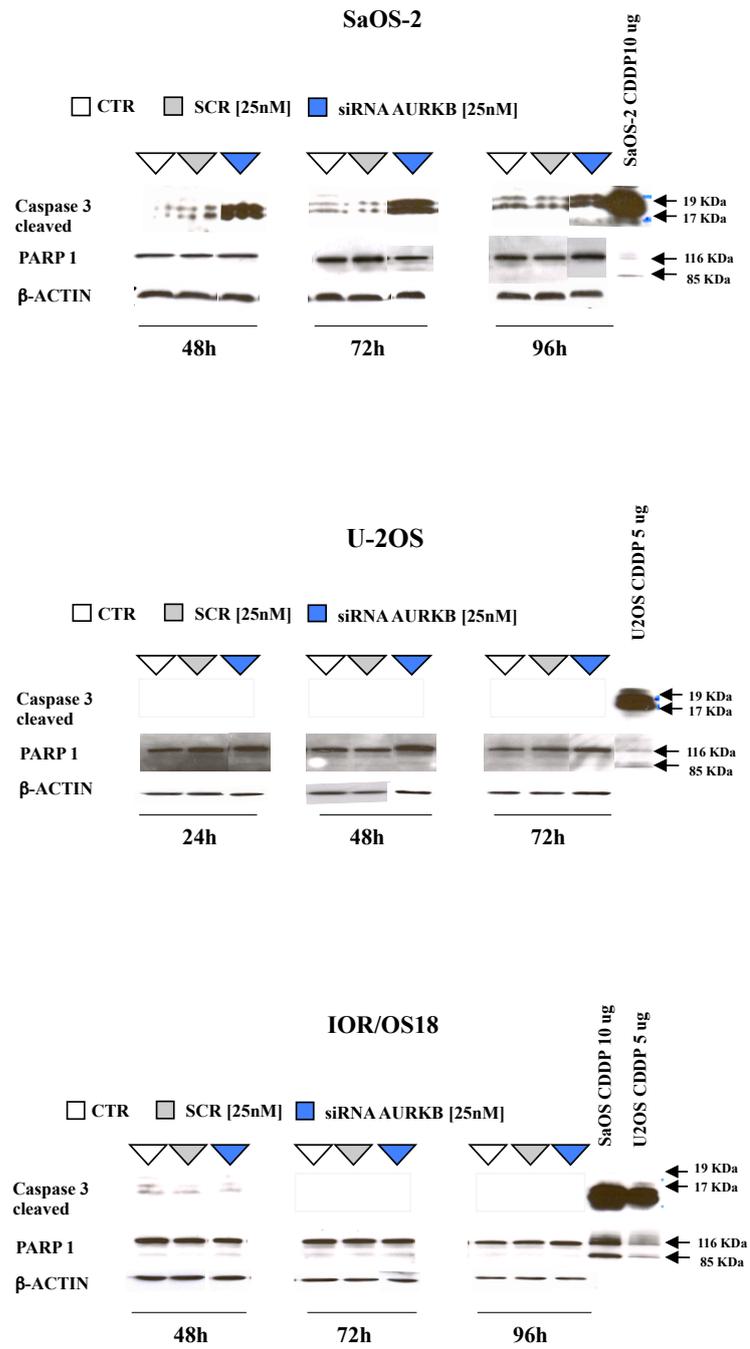
A



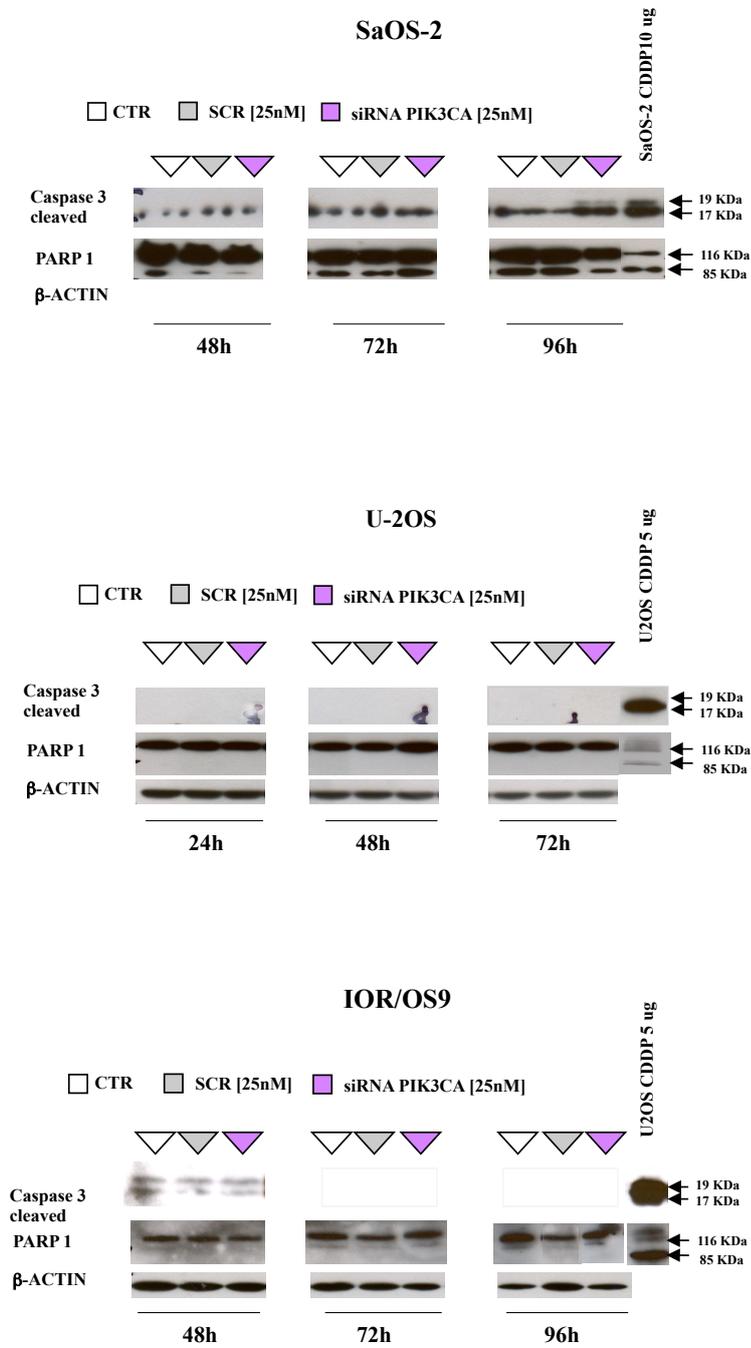
B



C



D



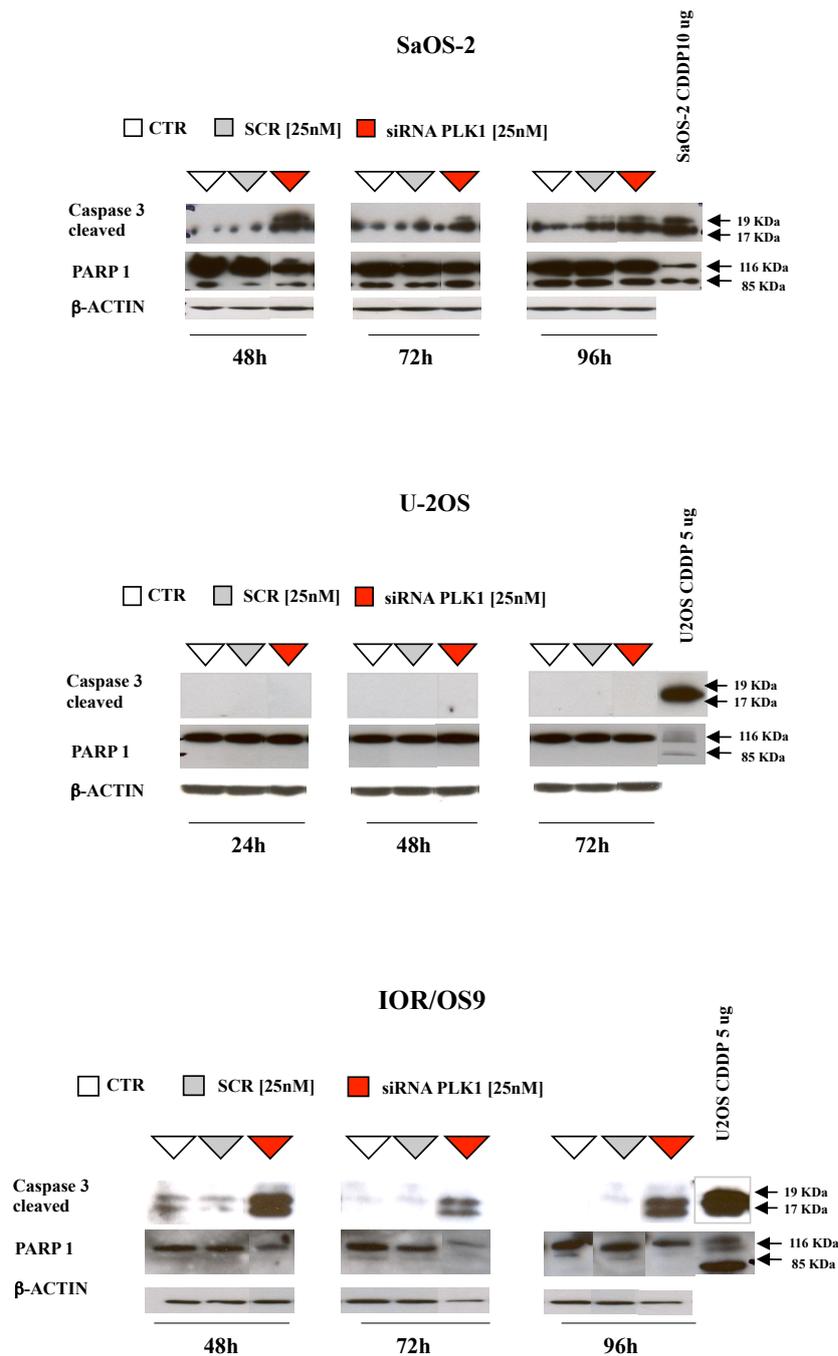
E

Figura 4: Valutazione dell'apoptosi tramite Western Blot dopo silenziamento genico. L'apoptosi è stata valutata in termini di clivaggio della caspase 3 (Caspase 3 cleaved) e clivaggio di PARP 1 (PARP 1) dopo silenziamento dei geni: CDK2 (A), AURK-A (B) e AURK-B (C) nelle linee cellulari di osteosarcoma U-2OS, Saos-2, IOR/OS18 e PIK3CA (D), PLK1 (E) nelle linee cellulari di osteosarcoma U-2OS, Saos-2, IOR/OS9, ai diversi tempi sperimentali.

CTR: controllo non trattato, cellule coltivate in IMDM al 10% di FBS; **SCR:** linee cellulari silenziate con il siRNA scrambled.

4.3 Inibitori chinasi-specifici.

Per le proteine chinasi, selezionate nella precedente fase dello studio, sono stati scelti i seguenti farmaci come inibitori: VX-680 e ZM447439 per AURK-A e AURK-B, Roscovitina per CDK2 e NMS-1286937 (NMS-P937; NMS-1) per PLK1. Questi farmaci sono stati già validati con successo in studi preclinici e clinici di fase I e II e sono risultati attivi su cellule di diversi tumori umani.

VX-680

VX-680 (anche noto come Tozasertib), è un potente inibitore delle proteine Aurora chinasi (Harrington, 2004). Si tratta, dunque, di un inibitore pan-Aurora disegnato per colpire il sito di legame dell'ATP prevenendo il legame con il substrato. Inibisce la fosforilazione dell'istone H3 sulla serina 10, responsabile della formazione di una popolazione cellulare ad alto contenuto di DNA ($4n$), effetto principalmente dovuto all'inibizione di AURK-B. VX-680 è molto attivo su linee cellulari carcinoma coloretale, leucemia e linfoma, in cui la sua esposizione causa l'arresto del processo mitotico, l'attivazione di importanti checkpoint del ciclo cellulare e morte principalmente per apoptosi. VX-680 è un agente selettivo per le cellule in divisione che esprimono alti livelli di Aurora chinasi, contrariamente a quanto accade nelle cellule non in divisione. In modelli *in vivo* di AML, carcinoma coloretale e pancreatico è in grado di ridurre la massa tumorale (22-98%).(Kitzen, 2010; Kollareddy, 2012).

ZM447439

ZM447439 è il primo inibitore pan-Aurora sviluppato (Ditchfield, 2003), anch'esso è un inibitore ATP-mimetico. Studi recenti hanno evidenziato che gli effetti fenotipici del trattamento con questo inibitore siano da ricondurre principalmente all'inibizione di AURK-B. Come VX-680, inibisce la fosforilazione dell'istone H3 (Gadea, 2005). Il trattamento con ZM447439 di cellule di leucemia porta alla formazione di una popolazione cellulare ad alto contenuto di DNA ($4n/8n$) in seguito a mancata citodieresi. Le cellule in condizioni di grave instabilità genomica, continuano a proliferare fino ad arrivare alla morte cellulare principalmente per apoptosi oppure per catastrofe mitotica. (Ikezoe, 2007; Kollareddy, 2012)

NMS-1286937

Anche noto come NMS-P937 (*4,5-dihydro-1H-pyrazolo(4,3-h)quinazoline derivative*), è un potente inibitore dell'attività di PLK1. Lega il sito di legame dell'ATP fungendo da *donatore-accettore-donatore* di legami H con la proteina chinasi a livello di specifici residui altamente conservati (Treonina 210). È selettivo nei confronti di PLK1, infatti presenta un'attività inibitoria nei confronti di PLK2 e 3 a più elevate concentrazioni. È stato studiato *in vitro* su un pannello di linee cellulari di 137 tumori solidi e 43 tumori ematologici (leucemie e linfomi), in cui ha mostrato una potente attività antiproliferativa in termini di inibizione della capacità di formare colonie in condizioni di non aderenza, aumento del contenuto di DNA delle cellule (4n) dovuto ad un prolungato arresto del ciclo cellulare in fase G2/M e morte cellulare principalmente per apoptosi. Inoltre NMS-P937 agisce selettivamente su cellule in divisione in quanto PLK1 è espresso ad alti livelli durante la tarda fase G2 e inizio della fase M. In modelli *in vivo* inibisce la crescita tumorale (Valsasina, 2012). È stato recentemente completato uno studio di fase I volto a valutare il profilo di sicurezza e tossicità di NMS-P937 in pazienti affetti da tumori solidi in stadio avanzato.

<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01014429?term=NMS&rank=4>

Roscovitina

La Roscovitina (conosciuto anche come Seliciclib, CYC202) è uno dei più promettenti membri degli inibitori di seconda generazione delle proteine chinasi CDK. È un analogo purinico che compete con l'ATP per il sito di legame alla subunità catalitica di CDK1 e 2 (ma anche CDK7 e 9). Inibisce in modo diretto il complesso CDK2/ciclina E, e anche altri complessi come CDK2/ciclina A, CDK7/ciclina H e CDK9/ciclina T. La Roscovitina attiva p53, blocca la sintesi e la trascrizione dell'RNA attraverso la fosforilazione del dominio carbossi-terminale dell'enzima RNA polimerasi-II, induce l'espressione del gene pro-apoptotico Bcl-x con conseguente rallentamento della crescita cellulare e apoptosi. L'inibitore, già incluso in studi clinici, ha mostrato buon profilo di tossicità. In studi pre-clinici ha mostrato attività antineoplastica *in vitro* e *in vivo* su un ampio pannello di tumori umani ed è attualmente incluso in uno studio di fase II (Aldoss, 2009; Le Tourneau, 2010).

La Roscovitina non svolge un'attività sul ciclo cellulare fase specifica proprio per i diversi complessi CDK/ciclina che inibisce, per cui il trattamento con la Roscovitina può causare blocco/accumulo delle cellule: in fase G0 (inattivando il complesso Cdk3/cyclin C), inibizione della transizione G1/S (inattivando il complesso Cdk2/cyclin E), inibizione della progressione in fase S (inattivando il complesso Cdk2/ cyclin A), accumulo in fase G2/M

(inattivando il complesso Cdk1/Cyclin A) e inibizione della transizione tra G2/M (inattivando il complesso Cdk1/Cyclin B). Gli effetti antimitotici della Roscovitina dipendono dalla fase del ciclo cellulare in cui si trovano le cellule e può dipendere dall'inibizione di più complessi CDK/ciclina (Hassa, 2011).

4.4 Analisi in vitro dell'attività di inibitori chinasi-specifici.

La sensibilità in vitro degli inibitori chinasi-specifici è stata valutata, sulla base delle curve dose-risposta ottenute 96 ore dopo il trattamento delle linee cellulari, tramite la determinazione del valore di IC₅₀ (concentrazione del farmaco che induce il 50% di inibizione della crescita cellulare rispetto ad un controllo non trattato) eseguita su un pannello di 4 linee cellulari di osteosarcoma umano farmacosensibili (impiegate negli esperimenti di silenziamento) e 6 varianti farmaco-resistenti ai chemioterapici convenzionalmente impiegati nei protocolli terapeutici per l'osteosarcoma (MTX, DX e CDDP) e derivate dalle linee cellulari U-2OS e Saos-2 (Benini, 1999; Serra, 1993; Serra, 2004).

In termini d'inibizione della crescita cellulare le linee sono risultate maggiormente sensibili ai farmaci VX-680, ZM447439 e NMS-1 rispetto alla Roscovitina, mostrando valori di IC₅₀ all'interno di un *range* di bassa micromolarità. Nel pannello di linee cellulari farmacosensibili, VX-680 (valore medio di IC₅₀ di $0,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$) e NMS-1 ($0,232 \mu\text{M} \pm 0,035 \mu\text{M}$) sono risultati più efficaci rispetto a ZM-447439 ($3,0 \pm 1,8 \mu\text{M}$). La Roscovitina ha mostrato un'attività ommogenea tra le diverse linee cellulari se pur minore rispetto agli altri farmaci ($13 \pm 4 \mu\text{M}$),

Tabella 1.

Per quanto riguarda il pannello di linee cellulari farmaco-resistenti i valori ottenuti di IC₅₀ nelle linee *methotrexate*(MTX)-resistenti sono simili a quelli ottenuti per le linee farmacosensibili.

Sia VX-680 che ZM447439 mostrano una ridotta attività nelle linee *cisplatino*(CDDP)-resistenti, ma al momento non è ancora chiaro il meccanismo responsabile della parziale resistenza osservata.

E' stata osservata una minor sensibilità ai farmaci VX-680, ZM-447439 e NMS-1 nelle linee *doxorubicina*(DX)-resistenti indicando la possibilità di una resistenza crociata con il chemioterapico.

Le linee DX-resistenti sono caratterizzate da elevati livelli di espressione della proteina *ABCB1*, principale responsabile della farmaco-resistenza alla DX (Serra, 1993; Hattinger, 2009), pertanto l'ipotesi è che i farmaci in studio possano essere substrato della stessa proteina.

Al fine di verificare l'ipotesi, l'efficacia *in vitro* di VX-680, ZM447439 e NMS-1 è stata

ulteriormente valutata in presenza di un inibitore di ABCB1 con attività di agente revertante (il cui nome è protetto da segreto industriale e pertanto indicato genericamente come “REV”). Le linee DX-resistenti sono state trattate con i farmaci in studio unitamente all’inibitore di ABCB1 alla concentrazione fissa di 0,5 μ M (corrispondente alla dose in grado di inibire circa il 10-20% della crescita cellulare).

L’inibitore aumenta l’efficacia di VX-680 e ZM447439 in termini di IC₅₀, indicando che la sovraespressione di ABCB1 interferisce in modo negativo con entrambi i farmaci inibitori delle Aurora chinasi, **Tabella 2**.

I risultati ottenuti dal trattamento dell’inibitore di ABCB1 in combinazione con NMS-1 portano a ipotizzare per quest’ultimo un ruolo da agente revertante di ABCB1, in quanto non si ottiene un effetto di inibizione della crescita cellulare alle stesse concentrazioni a cui il farmaco risulta attivo se usato singolarmente, nel caso della linea cellulare U-2OS/DX580 l’effetto della combinazione si sovrappone totalmente a quello dell’inibitore REV. L’ipotesi è che si scateni un meccanismo di competizione per ABCB1, anche se non è chiaro se si tratti di *antagonismo competitivo* o di un *antagonismo di tipo chimico* che al contrario non coinvolge alcun recettore, **Figura 5**.

La minore attività di entrambi gli inibitori delle Aurora chinasi nelle linee DX e CDDP-resistenti non è dovuta ad un aumento dei livelli intracellulari di AURK-A e AURK-B in quanto in queste linee i livelli di espressione di entrambe le proteine chinasi non differiscono da quelli ottenuti per le linee parentali (dati non mostrati).

La Roscovitina, nonostante i valori di IC₅₀ elevati, sembrerebbe non essere coinvolta in alcun meccanismo di resistenza crociata ai tre chemioterapici convenzionali mostrando un’attività nelle linee farmacoresistenti paragonabile a quella ottenuta per le linee farmacosensibili.

Tabella 1

VX-680			ZM447439	
Linea cellulare	Valore medio IC50 (μM)	DS	Valore medio IC50 (μM)	DS
U-2OS	0.4	0.2	2.7	0.1
Saos-2	0.4	0.2	2.7	0.3
IOR/OS18	2.2	0.5	5.5	1.2
IOR/OS9	0.2	0.2	0.7	0.2
U-2OS/DX580	52.8	6.5	11.2	2.3
Saos-2/DX580	16.3	2.5	13.8	2.3
U-2OS/MTX300	0.6	0.1	4.3	0.4
Saos-2/MTX300	0.3	0.2	0.6	0.2
U-2OS/CDDP4 μg	15.2	1.2	4.4	1.0
Saos-2/CDDP6 μg	8.4	2.6	2.7	0.8
NMS-1			ROSCOVITINA	
Linea cellulare	Valore medio IC50 (μM)	DS	Valore medio IC50 (μM)	DS
U-2OS	0.03	0.005	14.2	5.3
Saos-2	0.04	0.026	12.9	2.3
IOR/OS18	0.77	0.063	11.8	3.4
IOR/OS9	0.10	0.045	14.4	2.7
U-2OS/DX580	6.60	1.3	7.0	2.1
Saos-2/DX580	7.60	1.2	17.0	4.4
U-2OS/MTX300	0.71	0.09	17.1	5.9
Saos-2/MTX300	0.02	0.01	22.4	4.3
U-2OS/CDDP4 μg	0.68	0.47	12.1	5.2
Saos-2/CDDP6 μg	0.02	0.01	14.3	2.4

Tabella 1: Valore medio di IC₅₀ e relativa deviazione standard (DS) dei farmaci VX-680, ZM447439, NMS-1 e Roscovitina ottenuto su un pannello di linee cellulari farmacosensibili (U-2OS, Saos-2, IOR/OS9 e IOR/OS18) e un pannello di linee cellulari farmacoresistenti U-2OS/DX580, Saos-2/DX580, U-2OS/MTX300, Saos-2/MTX300, U-2OS/CDDP4 μg e Saos-2/CDDP6 μg .

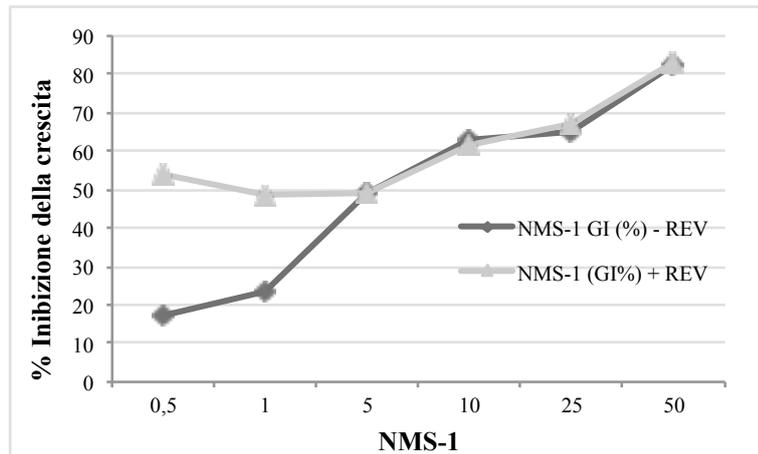
Tabella 2

Linee Cellulari	IC₅₀ (μM)	IC₅₀ (μM)		IC₅₀ (μM)	IC₅₀ (μM)	
	VX-680	VX-680		ZM447439	ZM447439	
		+ 0.5μM REV	+ 1μM REV		+ 0.5μM REV	+ 1μM REV
Saos-2/DX580	16.3	4.1	9.1	13.8	4.4	4.3
U-2OS/DX580	52.8	20.3	12.7	11.2	2.7	2.4

Tabella2: Reversione resistenza crociata ai farmaci VX-680 e ZM447439 nelle linee cellulari U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580. La tabella mostra i valori di IC₅₀ per VX-680 e ZM447439 dopo 96 ore dal trattamento in assenza e in presenza dell'inibitore di ABCB1 (REV).

Figura 5

U2OS/DX580



Saos-2/DX580

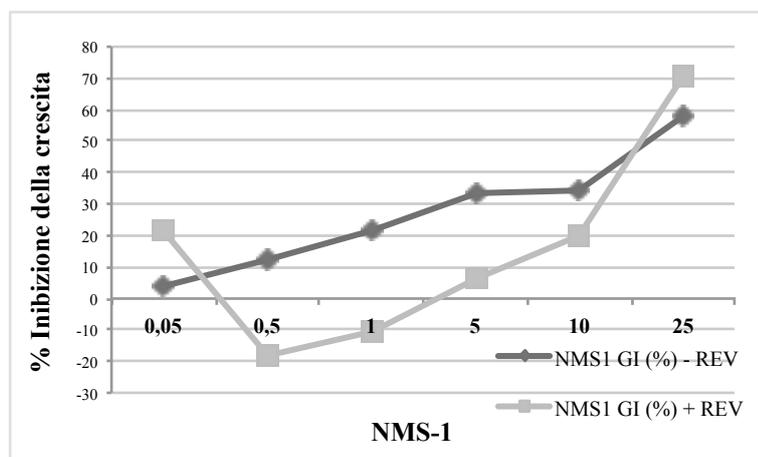


Figura 5: Esperimento di reversione della farmacoresistenza a NMS1.

Reversione resistenza crociata al farmaco NMS-1 nelle linee cellulari U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580. Il grafico mostra la percentuale di inibizione della crescita dopo 96 ore dal trattamento con NMS-1 in assenza (NMS-1 GI (%) -REV) e in presenza (NMS-1 GI (%) +REV) dell'inibitore di ABCB1 (REV).

4.5 Efficacia in vitro dell'attività di VX-680 e ZM447439: Valutazione degli effetti di VX-680 e ZM447439 sul ciclo cellulare in linee cellulari di osteosarcoma.

L'analisi dell'efficacia in vitro degli inibitori delle Aurora-chinasi (AURK-A e AURK-B) e' stata ulteriormente approfondita in termini di valutazione degli effetti sul ciclo cellulare analizzati tramite citofluorimetria a flusso, dopo incorporazione con *bromodeossiuridina* (BrdU). Il trattamento con dosi equitossiche (pari alle concentrazioni di IC₅₀) a 48 ore di VX-680 nelle linee cellulari farmacosensibili porta alla formazione di una popolazione iperploide, fenomeno probabilmente dovuto a endoreduplicazione e responsabile del rallentamento delle capacità proliferative delle cellule. Nella linea cellulare Saos-2 l'iperploidizzazione è presente, anche se in misura minore rispetto alle altre linee cellulari. Questo fenomeno non permette una reale stima della distribuzione delle cellule all'interno delle fasi del ciclo cellulare poiché il picco di cellule iperploidi sovrasta quello della fase G2/M della popolazione di cellule originale. Similmente, anche il trattamento con ZM447439 determina la formazione di una popolazione iperploide, con l'unica eccezione rappresentata dalla linea cellulare IOR/OS9. **Figura 6A.**

Nelle varianti farmacoresistenti sono stati ottenuti i medesimi risultati anche se poco omogenei tra le diverse linee. Dopo 48 ore dal trattamento con VX-680 si assiste in tutte le linee resistenti derivate dalle Saos-2 e nelle U-2OS/DX580 ad iperploidizzazione, mentre il trattamento con ZM447439 induce iperploidia soltanto nelle linee Saos-2/MTX300, Saos-2/CDDP6 μ g e U-2OS/CDDP4 μ g.

Sia per le linee farmacosensibili che farmacoresistenti gli stessi effetti sono stati riscontrati anche 72 ore dopo il trattamento (dati non mostrati). L'iperploidia è associata ad una compromessa capacità proliferativa che può guidare le cellule verso la morte cellulare programmata (Nitta, 2002). **Figura 6B.**

Figura 6

A

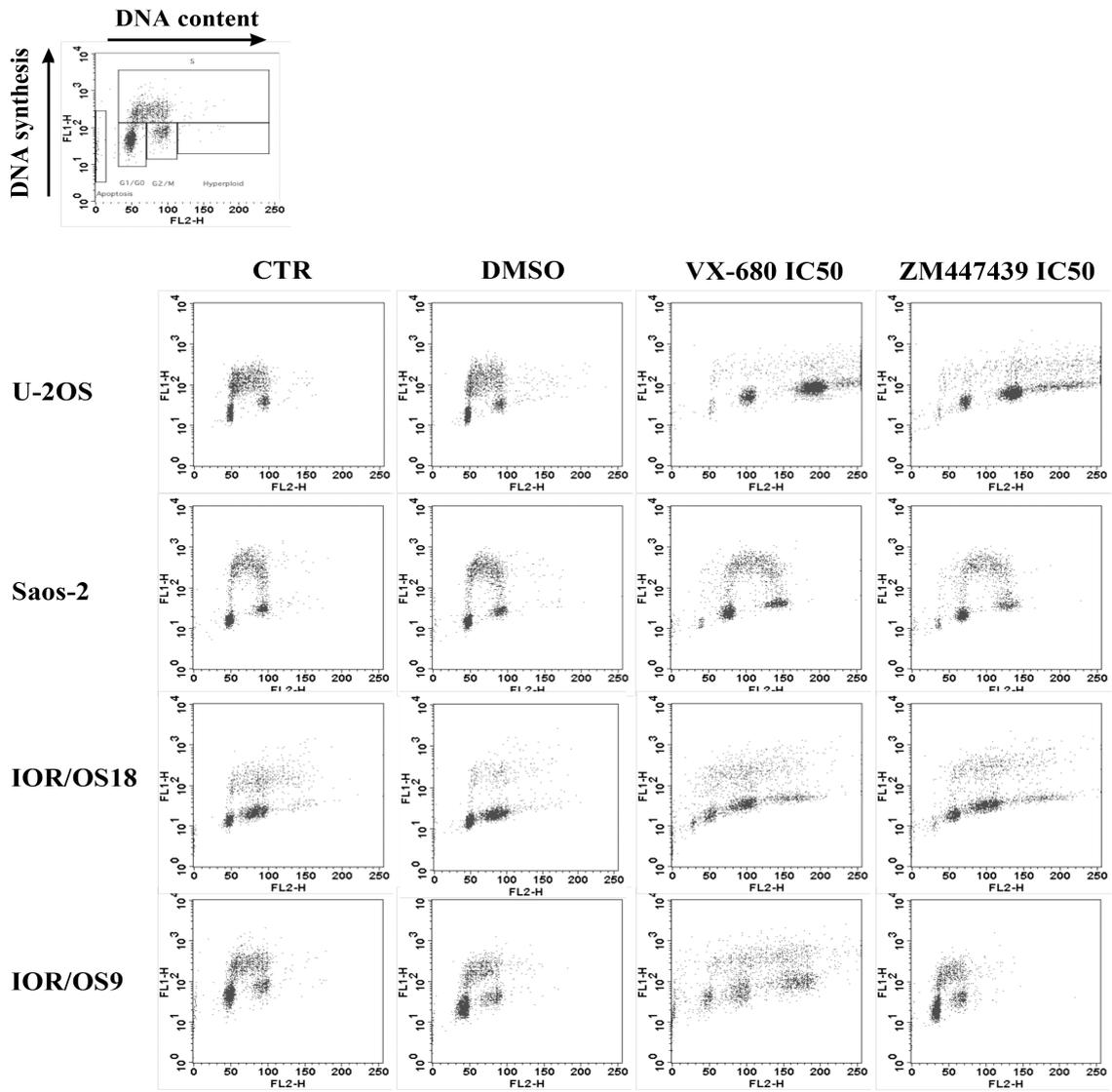


Figura 6

B

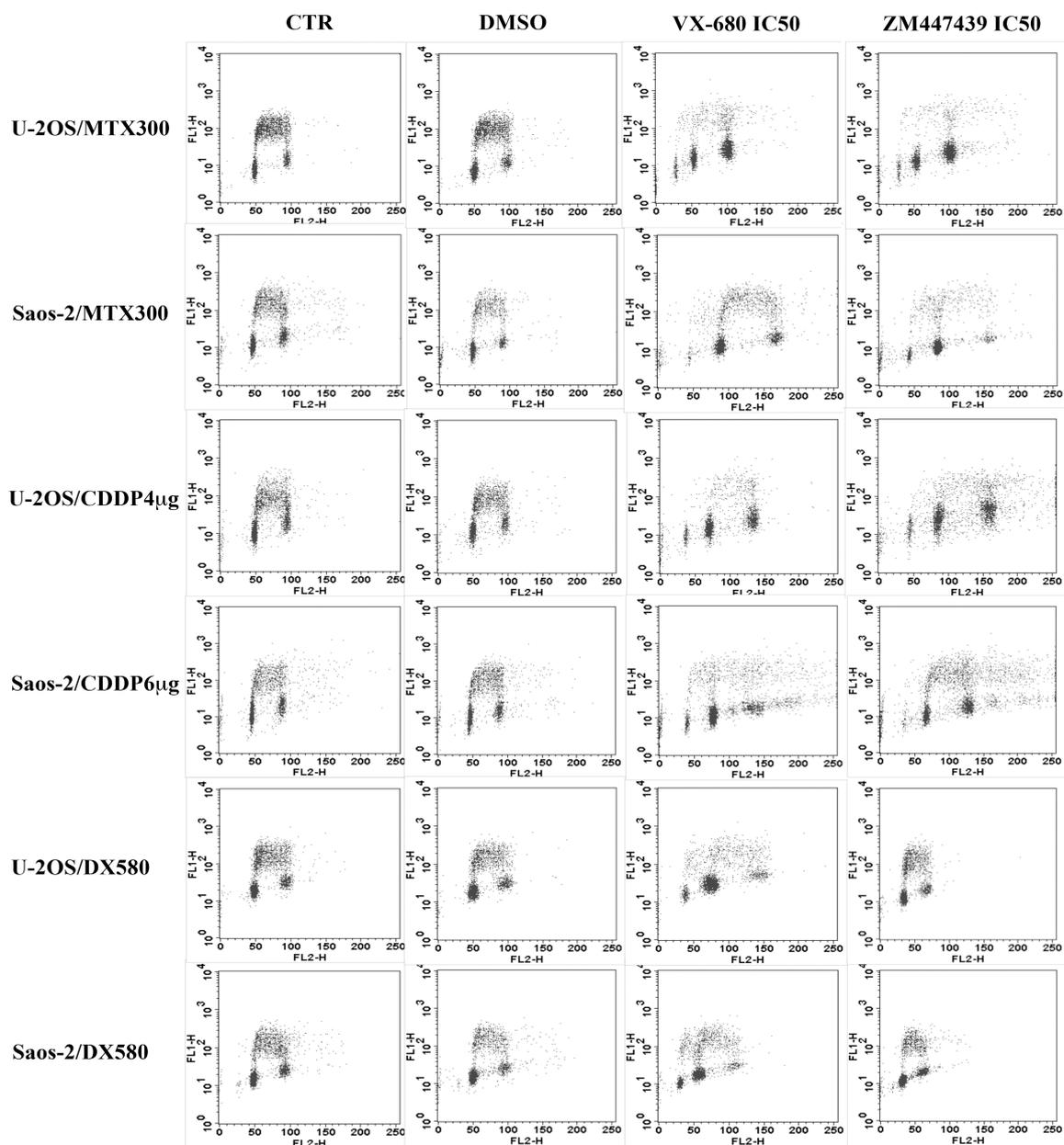


Figura 6: Valutazione degli effetti di VX-680 e ZM447439 sul ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso.

Alterazioni a carico del ciclo cellulare indotte dal trattamento con dosi di IC₅₀ del farmaco VX-680 o ZM447439 in linee cellulari di osteosarcoma umano farmacosensibili (A) e farmacoresistenti (B). I plot fanno riferimento all'analisi condotta, tramite citofluorimetria a flusso, dopo 48 ore dal trattamento con ciascun inibitore. Sull'asse delle ascisse è tracciata l'intensità di fluorescenza del propidio di ioduro (rappresentativo del contenuto di DNA). Sull'asse delle ordinate è tracciata l'intensità di fluorescenza di incorporazione della BrdU (rappresentativa della sintesi del DNA). Le diverse popolazioni cellulari sono state identificate secondo lo schema mostrato nel plot in alto a sinistra del pannello A.

CTR, controllo non trattato, le cellule sono state coltivate in IMDM al 10% di FBS, libero da farmaci o DMSO; DMSO, controllo non trattato, le cellule sono state coltivate in presenza di concentrazioni di DMSO corrispondenti a quelle impiegate con i farmaci;

VX-680 o ZM447439, le cellule sono state trattate con dosi di IC₅₀ di ciascun inibitore.

4.5.1 Valutazione della morte cellulare indotta dal trattamento con VX-680 e ZM447439.

Per valutare l'effetto proapoptotico degli inibitori delle Aurora-chinasi, le linee cellulari farmacosensibili e farmacoresistenti sono state trattate con dosi di VX-680 o ZM447439 pari al valore di IC_{50} e 2 volte l' IC_{50} . Le cellule sono state coltivate in presenza di concentrazioni di DMSO corrispondenti alle concentrazioni di IC_{50} e 2 volte l' IC_{50} impiegate per ciascun farmaco, per poter valutare eventuali effetti tossici causati dalla DMSO stessa a fronte delle elevate dosi impiegate.

Dopo il trattamento sono stati eseguiti Western Blot volti a valutare l'apoptosi in termini di clivaggio della Caspase 3 e clivaggio di PARP-1 (entrambi effettori della cascata di eventi che conducono alla morte cellulare programmata caspase-dipendente). **Figura 7 A e B.**

I risultati sono poco omogenei fra loro ma nella linea cellulare delle Saos-2 e rispettive varianti resistenti (eccetto le Saos-2/CDDP6ug) si assiste al clivaggio della caspase 3, accompagnato quasi sempre dal clivaggio di PARP-1 dopo trattamento con VX-680. Mentre dopo trattamento con ZM447439 la Caspasi 3 è clivata solo nella linea cellulare Saos-2.

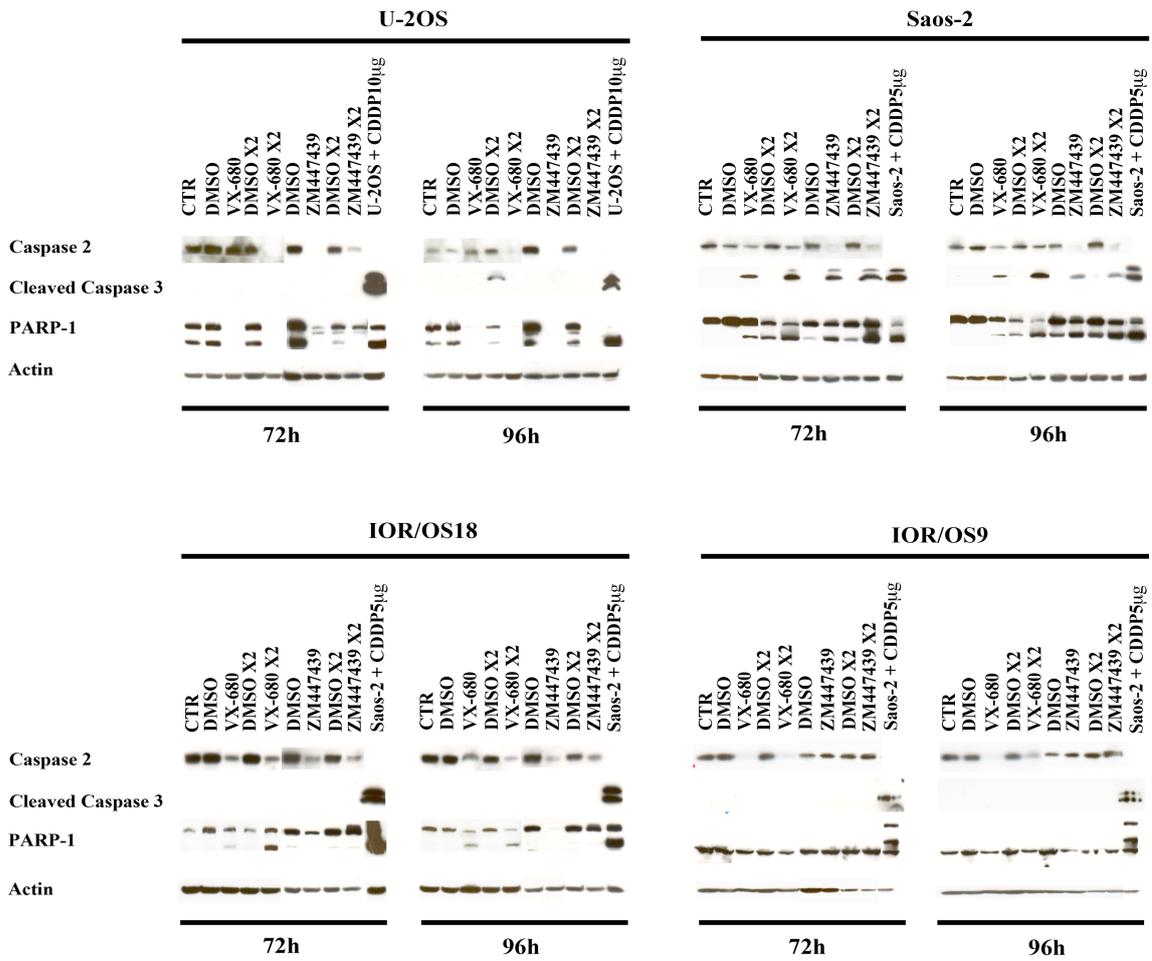
Questi risultati, se da un lato sono in linea con quanto riscontrato nella valutazione dell'apoptosi dopo gli esperimenti di silenziamento genico, dall'altro non spiegano il meccanismo alla base dell'evidente morte cellulare. Probabilmente la linea Saos-2 è più suscettibile all'apoptosi caspase-dipendente.

VX-680 e ZM447439 inibiscono bersagli fondamentali coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e in particolare nella corretta formazione del fuso mitotico e della segregazione. Come visto dall'analisi citofluorimetrica, dopo il trattamento con gli inibitori, le cellule aumentano le loro dimensioni e la ploidia, questi sono indici di un fenomeno noto come *catastrofe mitotica* (C.M.). La C.M. è un complesso processo dipendente principalmente dall'attivazione della *caspase 2* e dalla permeabilizzazione della membrana mitocondriale (Hassa, 2009). Pertanto a fronte dei risultati ottenuti e dell'evidente effetto citotossico esercitato da entrambi gli inibitori, è stato necessario indagare questo fenomeno attraverso la valutazione della degradazione della Caspase 2.

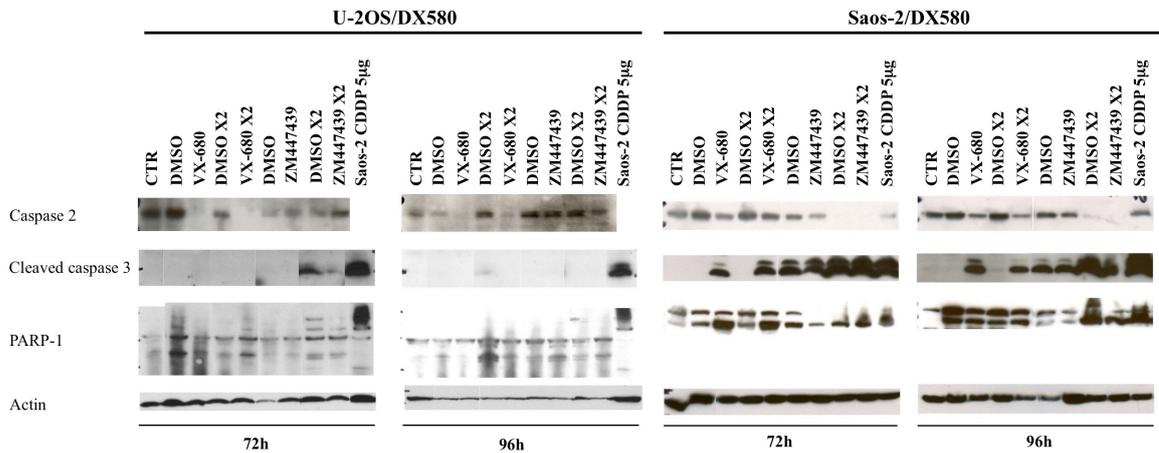
Infatti, VX-680 induce apoptosi principalmente attraverso il clivaggio o la degradazione della Caspase 2, con l'unica eccezione rappresentata dalle linee cellulari Saos-2/DX580 e Saos-2/MTX300. Il trattamento con ZM447439 induce apoptosi tramite clivaggio o degradazione di Caspase 2 solo in poche linee cellulari rispetto a VX-680 (U-2OS, Saos-2, IOR/OS18, e Saos-2/MTX300). Bisogna aggiungere che PARP-1, oltre ad essere un effettore della caspase 3, è subordinato all'attività della caspase 2 per cui laddove è presente degradazione di Caspase 2, e non di caspase 3, si assiste anche al clivaggio di PARP-1. (Hassa, 2009)

Figure 7

A



B



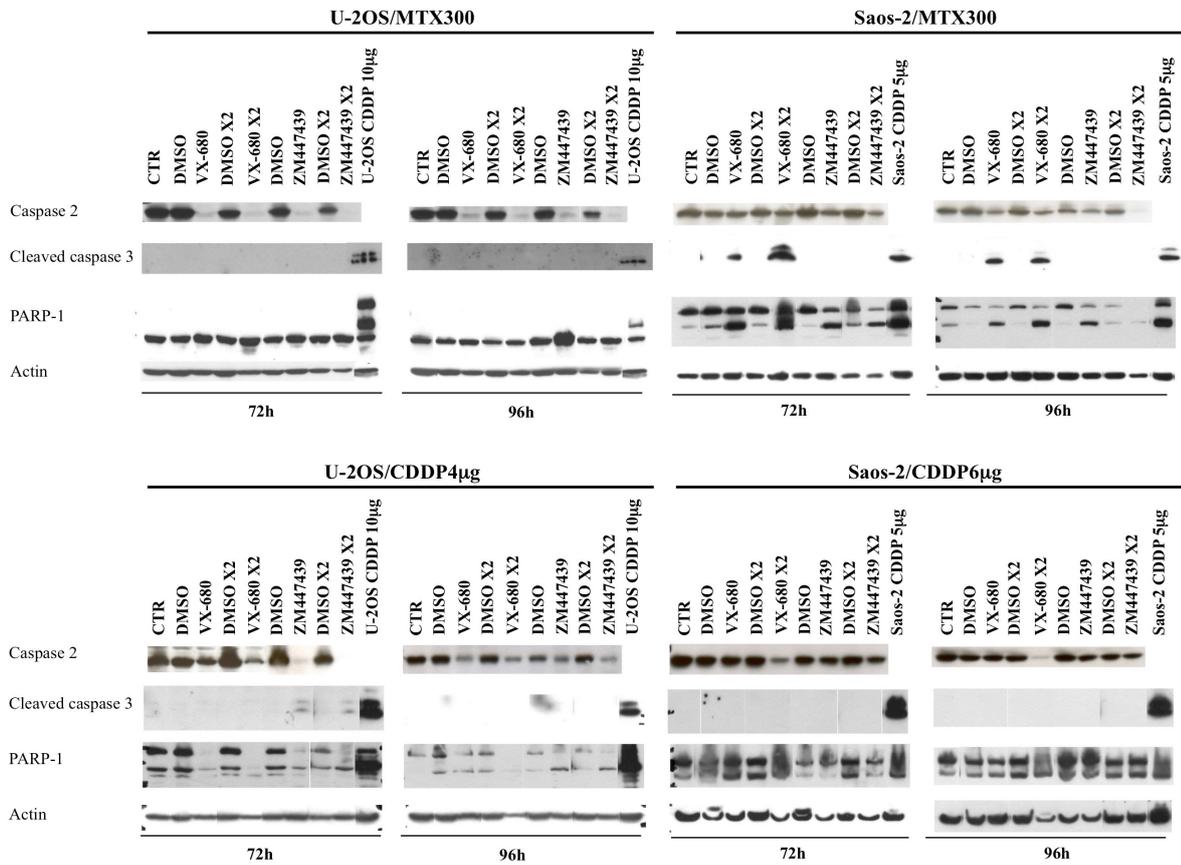


Figura 7: Valutazione della morte cellulare tramite analisi al Western Blot.

Western Blot per Caspase 2, Caspase 3 e PARP-1 in linee cellulari di osteosarcoma umano farmacosensibili (A) e farmcoresistenti (B) dopo trattamento con i farmaci VX-680 e ZM447439. Le linee cellulari U-2OS+CDDP5µg e Saos-2+CDDP10µg rappresentano i controlli positivi dell'apoptosi in termini di clivaggio di Caspase 3 (Cleaved caspase 3) e clivaggio di PARP-1, sono stati ottenuti trattando le linee cellulari U-2OS e Saos-2 rispettivamente con le seguenti dosi di cisplatino: CDDP 5µg/ml e CDDP 10µg/ml per un tempo di 48 ore.

CTR, controllo non trattato, le cellule sono state coltivate in IMDM al 10% di siero e libero da farmaci o DMSO;

DMSO, controllo non trattato, le cellule sono state coltivate in presenza di concentrazioni di DMSO corrispondenti alle concentrazioni di ic50 impiegate per i farmaci;

VX-680 o **ZM447439**, le cellule sono state coltivate con concentrazioni pari al valore di IC₅₀ o due volte IC₅₀ (VX-680x2 o ZM447439x2) specifico di ciascun inibitore.

4.5.2 Valutazione della motilità cellulare e della capacità di formare colonie in soft-agar.

L'attività *in vitro* di VX-680 e ZM447439 è stata ulteriormente valutata in termini d'inibizione della motilità cellulare e dell'efficienza clonale in condizioni di non aderenza (soft-agar), permettendo una stima indiretta dell'effetto di ciascun farmaco (in termini di IC₅₀) sul fenotipo maligno delle cellule di osteosarcoma.

In condizioni di non aderenza (soft agar) VX-680 e ZM447439 inibiscono significativamente la capacità di formare colonie in tutte le linee cellulari, **Tabella 4.**

L'impatto di entrambi gli inibitori sulla motilità cellulare è stata valutata tramite *Wound-Healing Migration Assay*. VX-680 induce una riduzione della capacità migratoria in quasi tutte le linee cellulari raggiungendo un'inibizione statisticamente significativa nelle linee cellulari IOR/OS9, U-2OS/CDDP4 μ g, Saos-2/MTX300 e Saos-2/CDDP6 μ g. Mentre per le linee cellulari IOR/OS18, U-2OS e U-2OS/MTX300 non è stata osservata inibizione della motilità da parte di VX-680. **Figura 8 (A)**

Al contrario, il trattamento con il farmaco ZM447439 non induce un'inibizione significativa della capacità migratoria (con l'unica eccezione per la linea cellulare Saos-2/CDDP6 μ g), **Figura 8 (B).**

Tabella 4

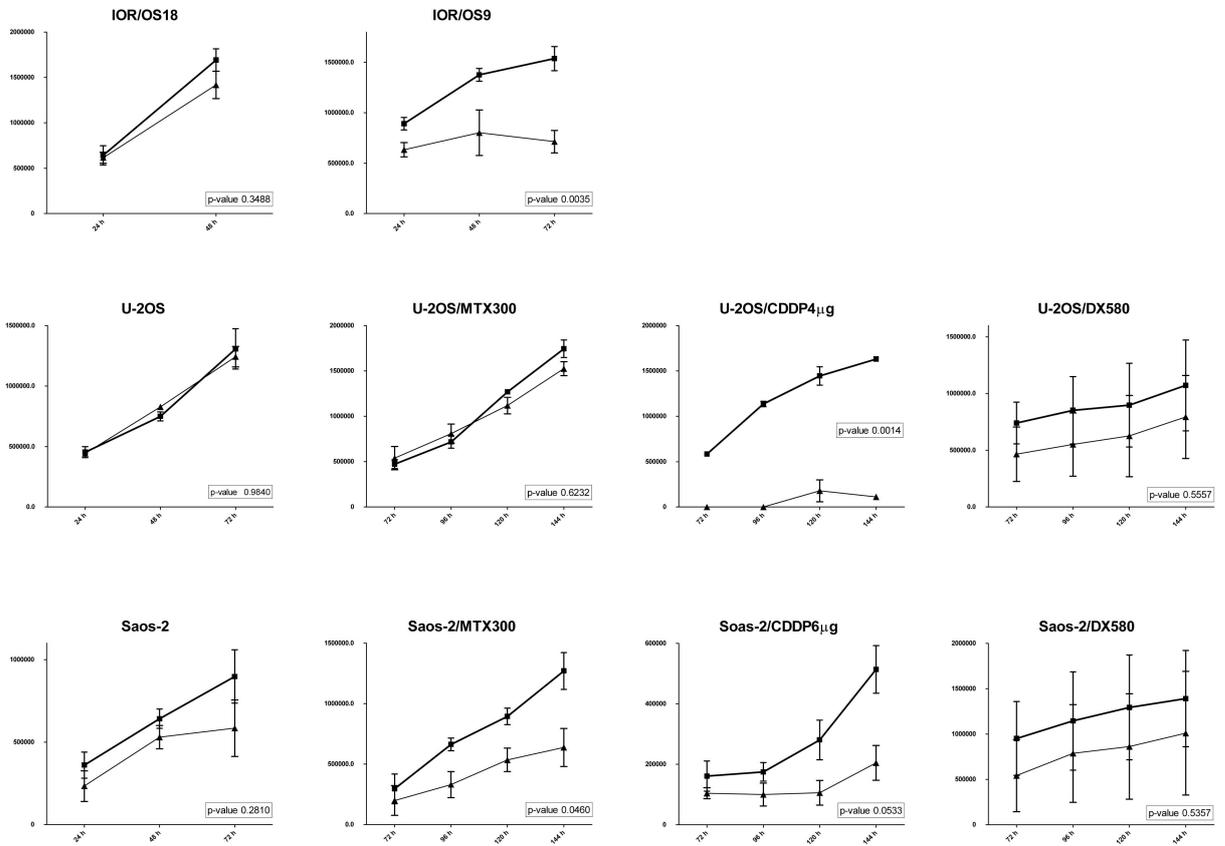
<i>Linee Cellulari</i>	VX-680		ZM447439	
	<i>% di colonie vs il corrispondente CTR+DMSO</i>	<i>P</i>	<i>% di colonie vs il corrispondente CTR+DMSO</i>	<i>P</i>
U-2OS	5.3	0.01	58.6	0.04
Saos-2	0.0	0.04	25.0	<0.01
IOR/OS18	1.8	<0.01	57.5	<0.01
IOR/OS9	0.6	0.03	38.9	0.04
U-2OS/MTX300	1.9	<0.01	0.0	0.01
Saos-2/MTX300	0.0	<0.01	8.0	<0.01
U-2OS/CDDP4 mg	0.0	0.02	80.4	0.46
Saos-2/CDDP6 mg	0.0	<0.01	39.2	0.04
U-2OS/DX580	3.8	<0.01	50.8	0.02
Saos-2/DX580	0.0	0.03	17.6	0.03

Tabella 4: Capacità di formare colonie in condizioni di non aderenza (soft-agar).

Le linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e le loro varianti farmacoresistenti sono state trattate con i farmaci VX-680 e ZM447439 alla corrispondente dose di IC₅₀. I dati in tabella rappresentano la media di due differenti esperimenti e indicano la percentuale di colonie presente nei campioni trattati con gli inibitori delle aurora chinasi rispetto ai controlli trattati con concentrazioni di DMSO corrispondenti alle medesime impiegate per i farmaci stessi (CTR+DMSO). *P* values è riferito alla differenza tra i campioni trattati con VX-680 e ZM447439 e i campioni di controllo.

Figura 8

A



B

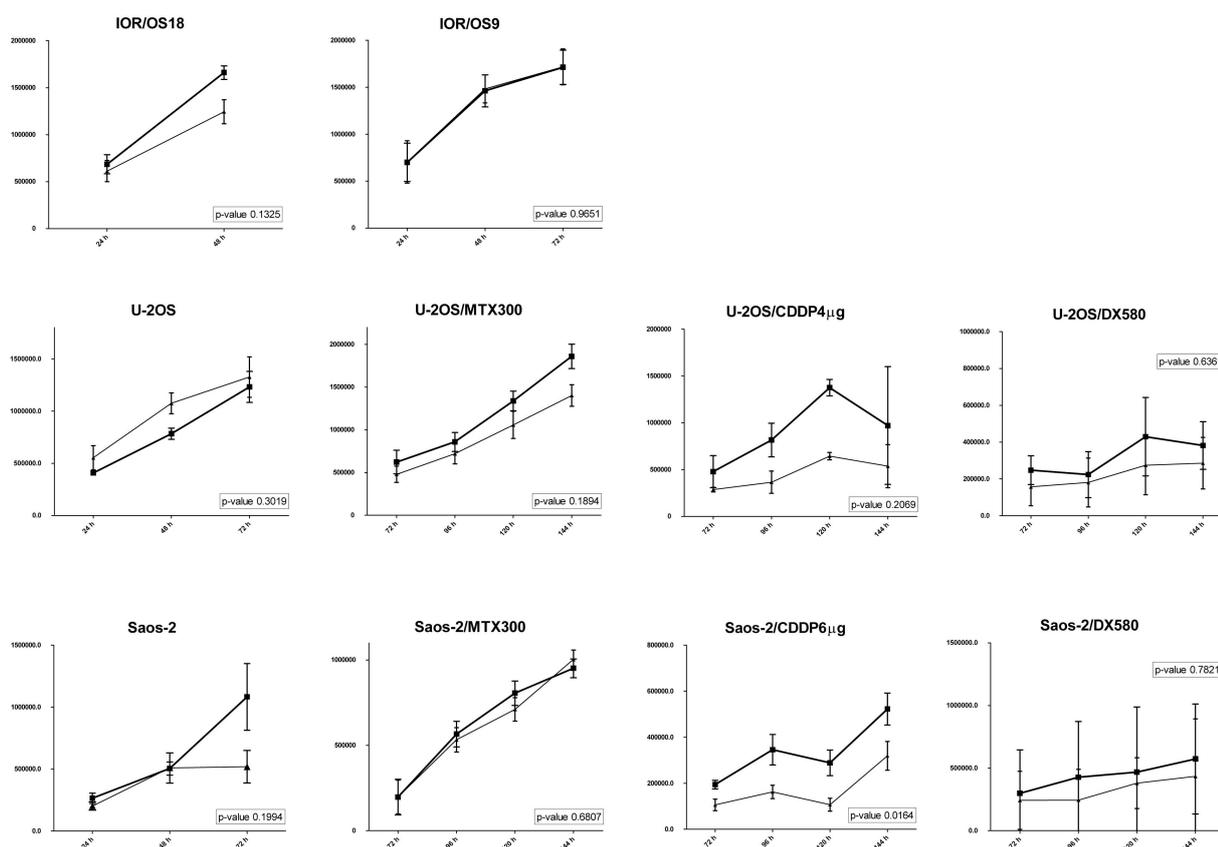


Figura 8: Valutazione della capacità migratoria dopo trattamento con VX-680 e ZM447439.

L'effetto dei farmaci VX-680 (A) e ZM447439 (B) sulla capacità migratoria delle linee cellulari di osteosarcoma è stato valutato tramite *wound-healing migration assay*.

A 24 ore dalla semina nelle cellule adese in monostrato è stato eseguito un "graffio" in senso verticale con un puntale sterile e successivamente il terreno di coltura è stato sostituito con un terreno contenente la dose di IC_{50} di ciascun inibitore (VX-680 or ZM447439) oppure con un terreno contenente concentrazioni di DMSO corrispondenti alle dosi di IC_{50} impiegate per ciascun farmaco (DMSO). La capacità di rimarginare il "graffio" è stata quantificata mediante l'utilizzo del software Image J che restituisce un corrispondente numerico all'area del graffio. Successivamente l'area del graffio ai vari tempi sperimentali è stata sottratta a quella del tempo sperimentale 0. Quindi sull'asse delle ordinate è rappresentata l'area di avanzamento della crescita cellulare, che è maggiore nei controlli non trattati CTR e nei controlli DMSO rispetto ai trattamenti con entrambi i farmaci. I dati sono riferiti alla media \pm la deviazione standard di tre distinti esperimenti. Il P values fa riferimento alla differenza tra le curve in relazione al trattamento ed è stato calcolato tramite il test "2-way ANOVA".

CTR, controllo non trattato, le cellule sono state coltivate in IMDM al 10% di FBS, libero da farmaci o DMSO;

DMSO, le cellule sono state coltivate in presenza di concentrazioni di DMSO corrispondenti a quelle impiegate per i farmaci VX-680 e ZM447439;

VX-680 o ZM447439, le cellule sono state coltivate con concentrazioni pari al valore di IC_{50} di ciascun inibitore.

4.5.3 Interazioni farmacologiche di VX-680 e ZM447439 con i chemioterapici convenzionali.

Al fine di valutare le interazioni farmacologiche con i chemioterapici convenzionalmente impiegati nei protocolli terapeutici per l'osteosarcoma, sono stati eseguiti esperimenti di associazione dei farmaci chinasi-specifici con CDDP, DX e MTX, **Tabella 5**.

E' stato osservato che VX-680 interagisce positivamente con tutti i chemioterapici in molte linee cellulari, mostrando solo un'interazione antagonista con il MTX e la DX rispettivamente nelle linee cellulari farmacosensibili U-2OS e Saos-2. È utile osservare che l'associazione di VX-680 con i tre chemioterapici è positiva in tutte le linee cellulari farmacoresistenti indicando così un suo potenziale utilizzo in combinazione con gli stessi.

Particolarmente interessante è l'osservazione del sinergismo tra i farmaci VX-680 e CDDP nelle linee CDDP-resistenti, dati che supportano il coinvolgimento delle Aurora-chinasi nei meccanismi di resistenza al CDDP, come già descritto per altri tumori. (Shahzad, 2009)

Il farmaco ZM447439, invece, interagisce principalmente in modo negativo con i chemioterapici convenzionali.

Tabella 5

CI ^a	U-2OS	Saos-2	U-2OS/		Saos-2/		U-2OS/		Saos-2/	
			MTX300	MTX300	CDDP4μg	CDDP6μg	DX580	DX580		
VX-680 + DX^b	SIN ^e	Ant ^f						ADD	ADD	
VX-680 + MTX^c	Ant	ADD ^g	SIN	SIN						
VX-680 + CDDP^d	SIN	ADD			SIN	SIN				
ZM447439 + DX	ADD	Ant						Ant	Ant	
ZM447439 + MTX	Ant	Ant	SIN	Ant						
ZM447439 + CDDP	Ant	SIN			Ant	Ant				

Tabella 5: Interazioni farmacologiche.

Gli esperimenti di associazione sono stati valutati nelle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti farmacoresistenti.

^aCoefficiente di Interazione; ^bdoxorubicina; ^cmethotrexate; ^dcisplatino; ^esinergismo; ^fantagonismo; ^gadditivismo

4.6 Efficacia in vitro dell'attività di NMS-1 in linee cellulari di osteosarcoma farmacosensibili

Come già anticipato (vedi paragrafo 4.3), anche la sensibilità in vitro dell'inibitore della proteina chinasi PLK1 è stata valutata tramite la determinazione del valore di IC₅₀ su un pannello di linee cellulari farmacosensibili (**Tabella 1**). NMS-1 è risultato, nel pannello di linee cellulari farmacosensibili, molto attivo in termini di inibizione della crescita cellulare (IC₅₀ 0,232 µM±0,035 µM).

4.6.1 Valutazione degli effetti sul ciclo cellulare e della morte cellulare in seguito al trattamento con NMS-1 di linee cellulari di osteosarcoma farmacosensibili.

Tramite *citofluorimetria a flusso*, dopo incorporazione con BrdU, sono stati valutati gli effetti sul ciclo cellulare successivi al trattamento con dosi equitossiche di NMS-1 (IC₅₀).

Nella linea cellulare Saos-2 il farmaco induce endoreduplicazione con conseguente formazione di una popolazione con il doppio del contenuto di DNA, soprattutto 72 ore dopo il trattamento rispetto ai relativi controlli in cui non si osserva iperplodia (CTR; DMSO), questo fenomeno è indice di un rallentamento della fase G2 o M. Il fatto che non si evidenzia una popolazione con contenuto di DNA maggiore del doppio è invece indice che la citodieresi non viene inibita, contrariamente a quanto osservato dopo trattamento delle cellule con i farmaci anti-Aurora chinasi. Un minore effetto in questo senso è stato osservato nella linea cellulare U-2OS, **Figura 9**.

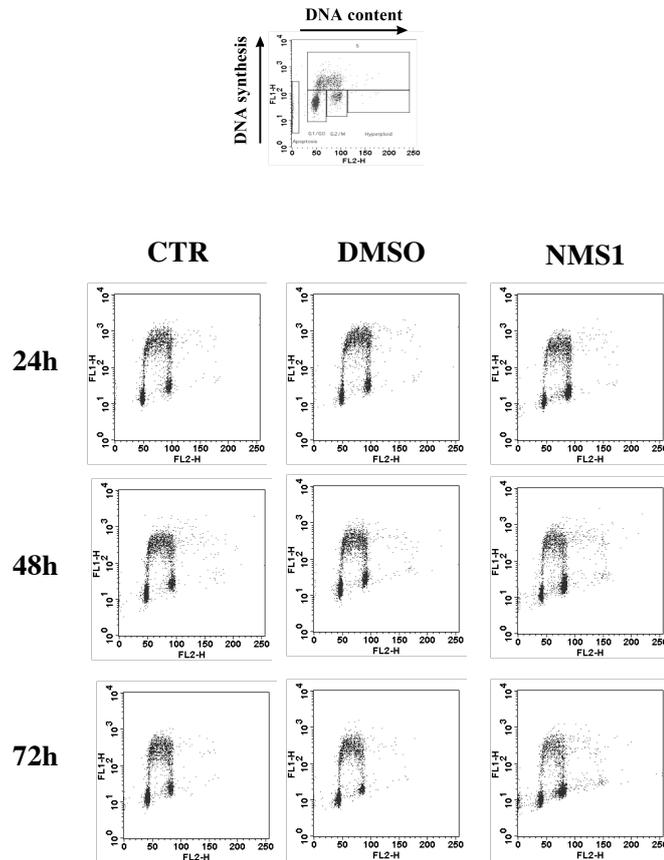
Come già descritto nel capitolo introduttivo, PLK1 svolge importanti ruoli all'interno del ciclo cellulare, tra cui la corretta formazione e distribuzione del fuso mitotico. Pertanto è sembrato opportuno, come per VX-680 e ZM447439, valutare tramite esperimenti di Western Blot sia l'apoptosi caspase-dipendente (tramite clivaggio di Caspasi 3 e di PARP-1) che la catastrofe mitotica (tramite degradazione della caspase 2).

NMS-1 non induce catastrofe mitotica in nessuna linea cellulare farmacosensibile, mentre induce apoptosi in termini di clivaggio di caspase 3 esclusivamente nella linea cellulare Saos-2, **Figura 10**.

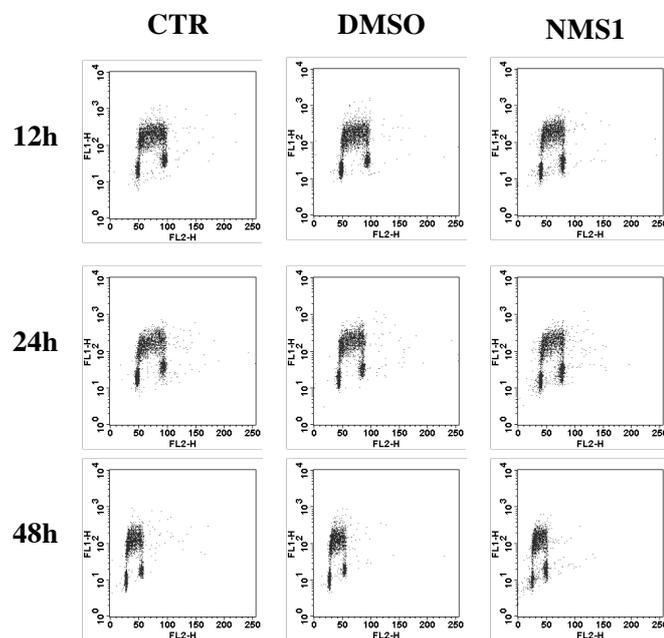
Sono previsti esperimenti atti a valutare un eventuale coinvolgimento della necrosi e/o di morte cellulare programmata-caspase indipendente, al fine di identificare il meccanismo responsabile della forte inibizione della crescita osservata.

Figura 9

Saos-2



U-2OS



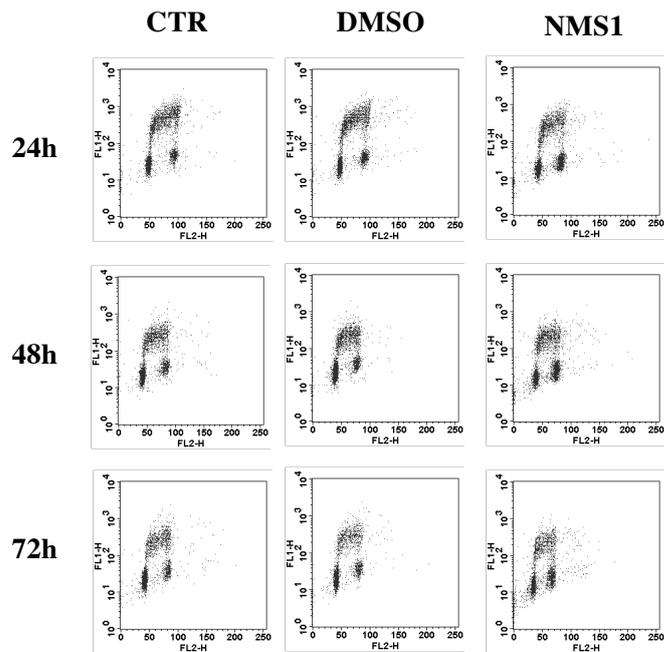


Figura 9: Valutazione degli effetti sul ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso dopo trattamento con NMS1 di linee cellulari di osteosarcoma farmacosensibili.

Alterazioni a carico del ciclo cellulare indotte dal trattamento con dosi di IC_{50} del farmaco NMS-1 in linee cellulari di osteosarcoma umano farmacosensibili. I plot sono riferiti all'analisi tramite citofluorimetria a flusso condotta, ai diversi tempi sperimentali specifici per ciascuna linea cellulare, dopo il trattamento con l'inibitore. Sull'asse delle ascisse (x) è tracciata l'intensità di fluorescenza del propidio di ioduro (rappresentativo del contenuto di DNA). Sull'asse delle ordinate (y) è tracciata l'intensità di fluorescenza di incorporazione della BrdU (rappresentativa della sintesi del DNA). Le diverse popolazioni cellulari sono state identificate secondo lo schema mostrato nel plot in alto al pannello A.

CTR, controllo non trattato, le cellule coltivate in IMDM al 10% di FBS, libero da farmaci o DMSO;

DMSO, le cellule sono state coltivate in presenza di concentrazioni di DMSO corrispondenti alle dosi impiegate per NMS-1;

NMS-1, le cellule sono state trattate con dosi pari al valore di IC_{50} dell'inibitore.

Figura 10

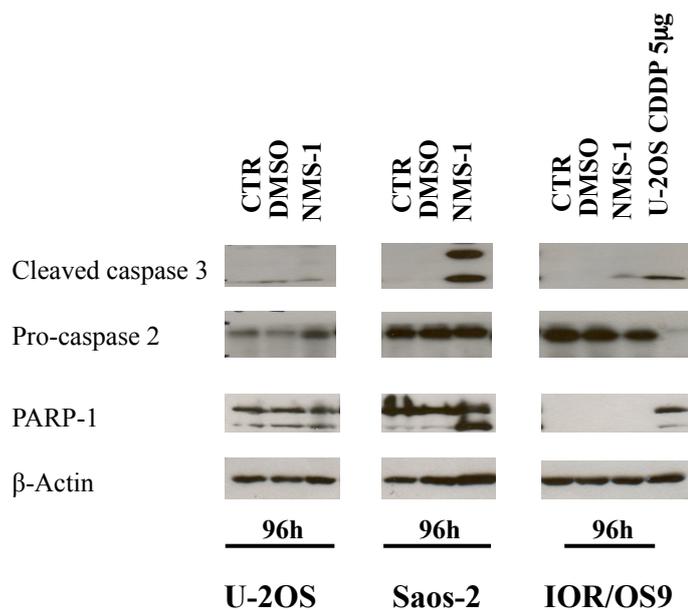


Figura 10: Valutazione della morte cellulare tramite analisi al Western Blot.

Analisi al *Western Blot* per Caspase 2, Caspase 3 e PARP-1 in linee cellulari di osteosarcoma umano farmacosensibili (Saos-2, U-2OS, IOR/OS9) dopo trattamento con NMS-1. La linea cellulari U-2OS+CDDP5µg è stata impiegata come controllo positivo dell'apoptosi in termini di clivaggio di Caspasi 3 (Caspase 3 cleaved) e PARP-1, indotta dal trattamento con 5µg/ml di cisplatino (CDDP) per un tempo di 48 ore.

CTR, controllo non trattato, le cellule coltivate in IMDM al 10% di FBS, libero da farmaci o DMSO;

DMSO, le cellule sono state coltivate in presenza di DMSO alle dosi corrispondenti ai valori di IC₅₀ impiegate per NMS-1;

NMS-1, le cellule sono state coltivate con concentrazioni pari al valore di IC₅₀ dell'inibitore.

4.6.2 Valutazione dell'efficacia in vitro del farmaco NMS-1 in linee cellulari di osteosarcoma farmacoresistenti.

Le linee cellulari *doxorubicina(DX)-resistenti* sono risultate meno sensibili all'attività del farmaco NMS-1 (come mostrato in **tabella1**). Sono stati eseguiti esperimenti di associazione con l'agente revertante (REV), inibitore di ABCB1, al fine di valutare il coinvolgimento della pompa nell'estruzione di NMS-1. Le linee cellulari Saos-2/DX580 e U-2OS/DX580 sono state trattate con dosi equitossiche di NMS-1 in presenza e in assenza di dosi fisse dell'agente revertante (REV). I risultati ottenuti mostrano che l'associazione di NMS-1 e REV non porta ad un aumento di sensibilità al farmaco NMS-1 nelle linee DX-resistenti, soprattutto rispetto alla sensibilità ottenuta con concentrazioni di NMS-1 uguali o minori al valore di IC_{50} , **Figura 5**.

Questo potrebbe essere dovuto ad una competizione tra i due inibitori per la stessa proteina, infatti REV lega ABCB1 inibendo la sua attività ed è possibile che anche NMS-1 agisca nello stesso modo. Ciò porta ad ipotizzare un ruolo da agente revertante di ABCB1 per NMS-1.

Al fine di ottenere maggiori informazioni riguardo al meccanismo di azione di NMS-1, sono stati eseguiti esperimenti di reversione nelle linee DX-resistenti con NMS-1 in qualità di agente revertante insieme alla DX. NMS-1 è stato utilizzato alle concentrazioni fisse di 2 μ M per le U-2OS/DX580 e 0,5 μ M per le Saos-2/DX580 (concentrazioni in grado di inibire circa il 10-20% della crescita cellulare). La sensibilità alla DX nelle linee cellulari DX-resistenti aumenta in combinazione con NMS-1, come mostrato in **Tabella 6**.

Questo dato è stato avvalorato da esperimenti di incorporazione della DX, nei quali si sfrutta la naturale emissione di fluorescenza rossa della doxorubicina stessa (Serra,1992).

Le linee cellulari U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580 sono state trattate con dosi equitossiche di DX in presenza o assenza di NMS-1 alle concentrazioni fisse impiegate negli esperimenti di reversione (2 μ M per le U-2OS/DX580 e 0,5 μ M per le Saos-2/DX580). Dopo 30-45 minuti dal trattamento le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse 90i microscope), come mostrato in **Figura 11**.

Le linee cellulari resistenti alla DX sovraesprimono ABCB1, pertanto il trattamento solo con la DX non permette l'accumulo del farmaco all'interno del citoplasma, visibile in modo blando per la linea Saos-2/DX580. In risposta al trattamento combinato (DX+NMS-1) si assiste ad un accumulo a livello nucleare di DX nelle linee DX-resistenti, dato che rafforza l'ipotesi iniziale di NMS-1 quale agente revertante in grado di inibire l'attività di ABCB1 (probabile competitore con la DX per il legame con ABCB1).

Tabella 6

Linee Cellulari	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
	DX	DX+ NMS-1
U-2OS/DX580	16,9	11,6
Saos-2/DX580	5,7	2,9

Tabella 6: Reversione resistenza alla DX in linee cellulari farmaco-resistenti.

Reversione della resistenza alla DX nelle linee cellulari U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580. La tabella mostra i valori di IC₅₀ della DX nelle linee cellulari U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580 dopo 96 ore dal trattamento in assenza e in presenza di NMS-1, alle concentrazioni 2 μM per le U-2OS/DX580 e 0,5 μM per le Saos-2/DX580.

Figura 11

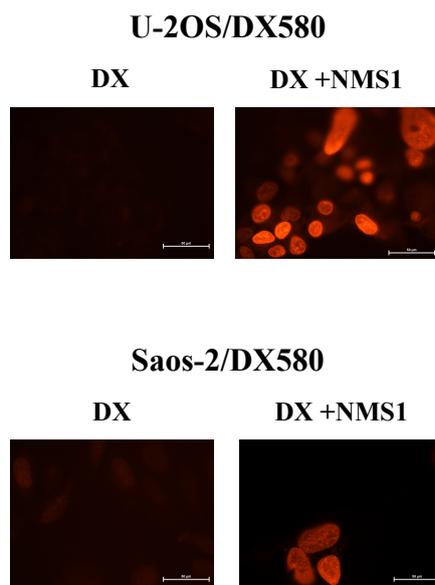


Figura 11: Valutazione dell'incorporazione della DX in linee cellulari di osteosarcoma farmaco-resistenti osservata in microscopia a fluorescenza.

Incorporazione DX (10μg) nelle linee cellulari U-2OS/DX580 e Saos-2/DX580 in assenza e in presenza di NMS-1 rispettivamente alle concentrazioni 0.5 e 2 μM, le cellule sono state osservate 45 minuti dopo il trattamento.

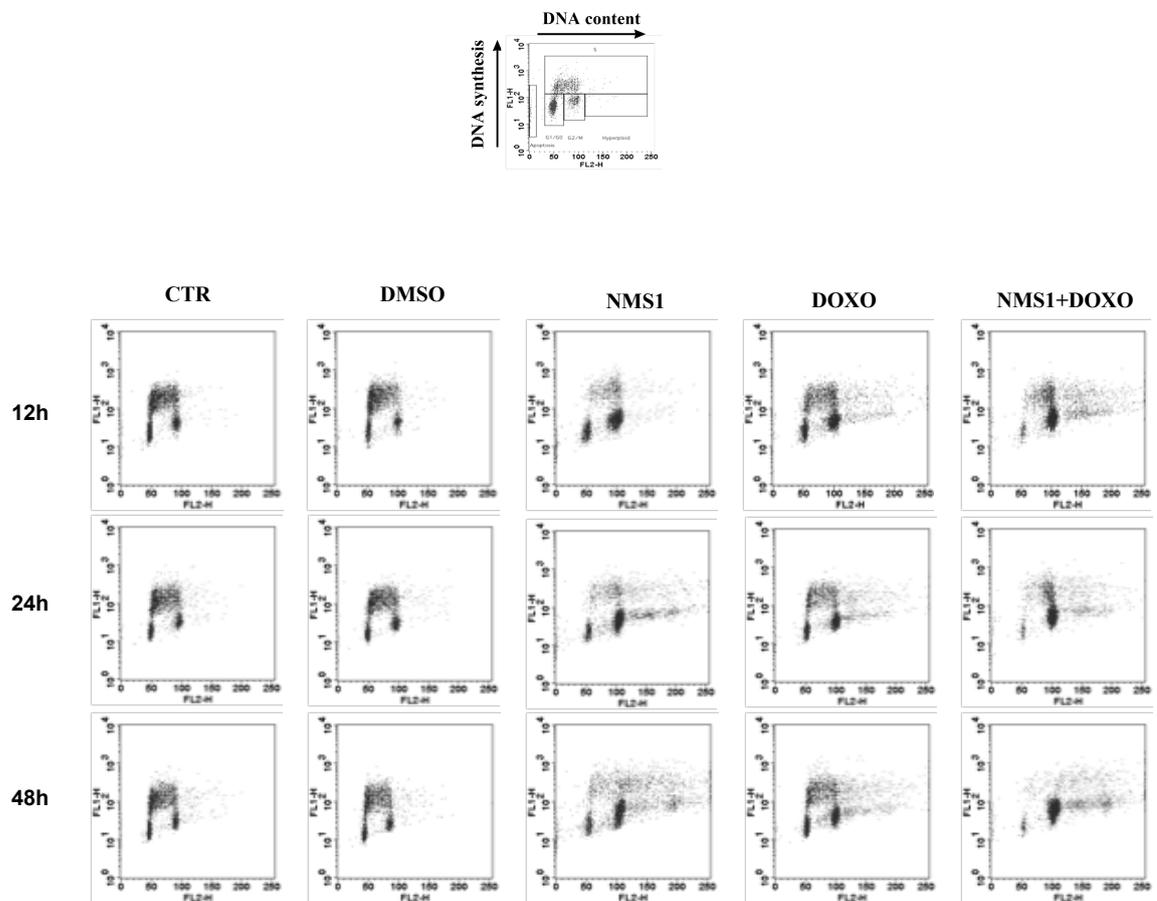
4.6.3 Valutazione degli effetti sul ciclo cellulare dopo trattamento con doxorubicina, NMS-1 e loro combinazione.

Le linee DX-resistenti sono trattate con dosi equitossiche (corrispondenti al valore di IC_{50}) di DX e NMS-1, in associazione e in trattamento singolo. Successivamente, sono state processate con BrdU per l'analisi citofluorimetrica al fine di indagare gli effetti del trattamento sul ciclo cellulare.

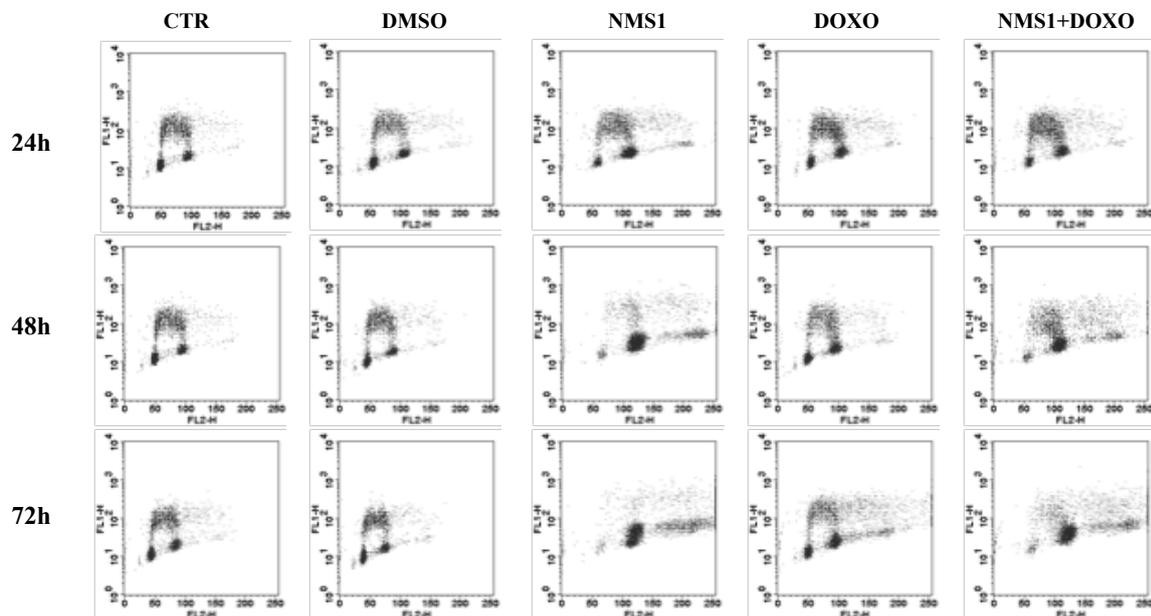
Come mostrato in **Figura 12**, nelle linee cellulari U-2OS/DX580 (A) e Saos-2/DX580 (B) il trattamento con NMS-1 causa iperplodia ed arresto delle cellule in fase G2/M (rispettivamente 12 e 24 ore dopo il trattamento), il trattamento esclusivo con DX genera una popolazione ad alto contenuto di DNA poco definita, mentre il trattamento in combinazione di DX e NMS-1 causa un marcato arresto delle cellule in fase G2/M unitamente alla formazione di una popolazione iperploide, probabilmente dovuta ad un rallentamento della mitosi causato dall'inattivazione di PLK1 (Lindon,2004).

Figura 12

(A) U-2OS/DX580



(B) Saos-2/DX580



Valutazione degli effetti sul ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso

Alterazioni a carico del ciclo cellulare indotte dal trattamento con dosi di IC_{50} dei farmaci NMS-1, DX e NMS-1+DX in linee cellulari di osteosarcoma umano farmacoresistenti alla DX (U-2OS/DX580 (A), Saos-2/DX580 (B)). I *plot* sono riferiti all'analisi tramite citofluorimetria a flusso condotta ai tempi sperimentali indicati in figura con i farmaci. Sull'asse delle ascisse (x) è tracciata l'intensità di fluorescenza del propidio di ioduro (rappresentativo del contenuto di DNA). Sull'asse delle ordinate (y) è tracciata l'intensità di fluorescenza di incorporazione della BrdU (rappresentativa della sintesi del DNA).

CTR, controllo non trattato, le cellule coltivate in IMDM al 10% di FBS, libero da farmaci o DMSO;

DMSO, le cellule sono state coltivate in presenza di concentrazioni di DMSO corrispondenti a quelle impiegate per NMS-1;

NMS-1, le cellule sono state trattate con concentrazioni pari al valore di IC_{50} dell'inibitore.

DX, le cellule sono state trattate con concentrazioni di DX pari al valore di IC_{50} del farmaco.

NMS-1+DX, le cellule sono state trattate con dosi equitossiche di NMS-1 e DX pari al valore di IC_{50} relativo a ciascuna linea cellulare.

4.6.4 Interazioni farmacologiche del farmaco NMS-1 con i chemioterapici convenzionali.

Sono stati eseguiti esperimenti di associazione di NMS-1 con *CDDP*, *DX* e *MTX* nelle linee cellulari farmacosensibili e farmacoresistenti. Come mostrato in **tabella 7 (A)**, NMS-1 interagisce negativamente in associazione sia con il CDDP (eccetto che per la linea cellulare U-2OS) che con il MTX risultando in un effetto antagonista.

Al contrario, nelle linee cellulari DX-resistenti mostra un effetto additivo/sinergico con la DX, probabilmente dovuto all'azione revertante di NMS-1 sull'attività di ABCB1.

In seguito ai risultati ottenuti in associazione, l'attività in vitro di NMS-1 è stata valutata in esperimenti di valutazione sequenziale con i chemioterapici.

Le linee cellulari di osteosarcoma parentali e le relative farmacoresistenti sono state esposte in modo sequenziale, per un totale di 96 ore, ad NMS-1 per 48 ore e successivamente dopo la rimozione del terreno con il farmaco sono state trattate con DX/MTX o CDDP per ulteriori 48 ore. Lo stesso schema di trattamento è stato ripetuto trattando le cellule prima con i chemioterapici convenzionali e successivamente con NMS-1. I risultati sono mostrati in **tabella 7B**.

Il trattamento sequenziale che prevede prima l'esposizione a NMS-1 poi quella al chemioterapico, porta principalmente ad interazioni positive in modo però poco omogeneo tra le linee parentali e le relative resistenti. In particolare, nelle linee cellulari DX-resistenti il trattamento sequenziale porta ad un antagonismo contrariamente a quanto accade in associazione. Il trattamento sequenziale inverso, cioè agente chemioterapico prima e NMS1 dopo, genera interazioni antagoniste, con la sola eccezione di un effetto sinergico con la DX nelle linea cellulare farmacosensibile Saos-2 e con il MTX nella linea cellulare farmacoresistente Saos-2/MTX300.

Tabella 7

A

CI ^a	U-2OS	Saos-2	U-2OS/ MTX300	Saos-2/ MTX300	U-2OS/ CDDP4 μ g	Saos-2/ CDDP6 μ g	U-2OS/ DX580	Saos-2/ DX580
	NMS-1 + DX ^b	Ant ^f	Ant					ADD
NMS-1 + MTX ^c		Ant ^g	Ant	Ant				
NMS-1 + CDDP ^d	ADD ^g	Ant			Ant	Ant		

B

CI ^a	U-2OS	Saos-2	U-2OS/ MTX300	Saos-2/ MTX300	U-2OS/ CDDP4 μ g	Saos-2/ CDDP6 μ g	U-2OS/ DX580	Saos-2/ DX580
	NMS-1 + DX ^b	SIN ^e	SIN					Ant
DX+NMS-1	Ant ^f	SIN					Ant	Ant
NMS-1 + MTX ^c	ADD ^g	Ant	SIN	Ant				
MTX + NMS-1			Ant	SIN				
NMS-1 + CDDP ^d	SIN	SIN			Ant	SIN		
CDDP + NMS-1	Ant	SIN			Ant	Ant		

Tabella 7: Interazioni farmacologiche di NMS-1 con i chemioterapici convenzionali.

Gli esperimenti di associazione (A) e sequenza (B) sono stati valutati nelle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle relative varianti farmacoresistenti ai chemioterapici in uso nei protocolli chemioterapici (DX, CDDP e MTX).

^aCoefficiente di Interazione; ^bdoxorubicina; ^cmethotrexate; ^dcisplatino; ^esinergismo; ^fantagonismo; ^gadditivismo

4.7 Efficacia in vitro dell'attività della Roscovitina.

La sensibilità in vitro della Roscovitina è stata valutata sulla base delle curve dose-risposta ottenute dopo 96 ore dal trattamento delle linee cellulari farmacosensibili e farmacoresistenti tramite la determinazione del valore di IC₅₀. Diversamente dagli altri inibitori studiati, la Roscovitina ha mostrato un'attività minore in termini di micromolarità (valore medio di IC₅₀ pari a 13 ± 4 µM), ma omogenea tra le linee cellulari farmacosensibili e farmacoresistenti, come mostrato in **tabella 1**. A differenza di VX-680 e ZM447439, la Roscovitina sembra non essere substrato di ABCB1 e quindi si propone come un farmaco potenzialmente interessante per un possibile futuro impiego clinico anche in pazienti affetti da osteosarcoma e sovraesprimenti questo trasportatore di membrana.

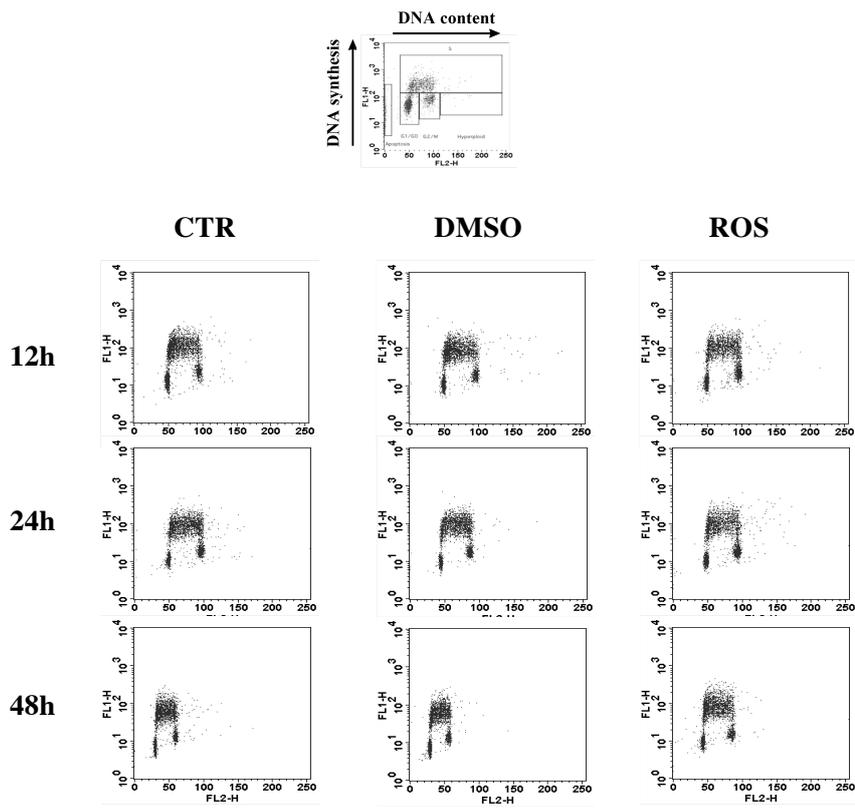
4.7.1 Valutazione degli effetti sul ciclo cellulare del trattamento con Roscovitina in linee cellulari farmacosensibili di osteosarcoma.

L'analisi dell'efficacia in vitro della Roscovitina è stata ulteriormente approfondita in termini di valutazione degli effetti sul ciclo cellulare analizzati tramite citofluorimetria a flusso, dopo incorporazione con BrdU a diversi tempi sperimentali nelle linee cellulari farmacosensibili U-2OS e Saos-2.

Il trattamento della linea cellulare Saos-2 con Roscovitina (pari alla concentrazione di IC₅₀) determina la formazione di una popolazione ad alto contenuto di DNA (**Figura 13B**), come osservato dopo trattamento con NMS-1. Lo stesso effetto di entità più lieve si osserva anche nella linea cellulare U-2OS (**Figura 13A**).

Figura 13

(A) U-2OS



(B) Saos-2

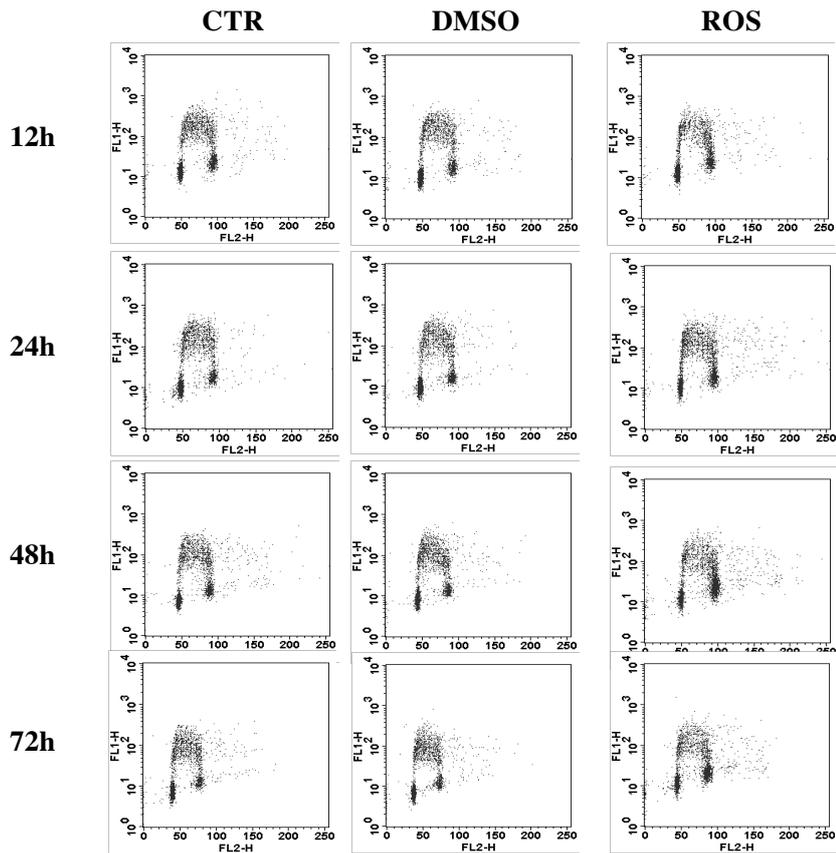


Figura 9: Valutazione degli effetti sul ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso in seguito al trattamento con la Roscovitina di linee cellulari di osteosarcoma farmacosensibili.

Alterazioni a carico del ciclo cellulare indotte dal trattamento con dosi di IC_{50} di Roscovitina nelle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2. I plot sono riferiti all'analisi tramite citofluorimetria a flusso condotta, ai diversi tempi sperimentali specifici per ciascuna linea cellulare, dopo il trattamento con l'inibitore. Sull'asse delle ascisse (x) è tracciata l'intensità di fluorescenza del propidio di ioduro (rappresentativo del contenuto di DNA). Sull'asse delle ordinate (y) è tracciata l'intensità di fluorescenza di incorporazione della BrdU (rappresentativa della sintesi del DNA). Le diverse popolazioni cellulari sono state identificate secondo lo schema mostrato nel plot in alto al centro del pannello A.

CTR, controllo non trattato, le cellule coltivate in IMDM al 10% di FBS, libero da farmaci o DMSO;

DMSO, le cellule sono state coltivate in presenza di concentrazioni di DMSO corrispondenti alle dosi impiegate per la Roscovitina;

ROS, le cellule sono state trattate con dosi pari al valore di IC_{50} di Roscovitina.

4.7.2 Interazioni farmacologiche della Roscovitina con i chemioterapici convezionali.

Sono stati eseguiti esperimenti di associazione della Roscovitina con CDDP, DX e MTX su un pannello di linee cellulari di osteosarcoma farmacosensibili e le relative varianti resistenti, al fine di valutare le interazioni farmacologiche con i chemioterapici.

Gli esperimenti di associazione hanno prodotto soprattutto effetti antagonisti nelle linee parentali e resistenti al MTX; mentre le associazioni CDDP/DX con la roscovitina sono risultate sinergiche o additive nelle linee resistenti ad entrambi i chemioterapici, **Tabella 8 A.**

Evidenze riguardo ad un sinergismo tra Roscovitina e DX in modelli in vitro di diversi sarcomi, tra cui l'osteosarcoma (Lambert, 2008), hanno suggerito di approfondire l'analisi dell'efficacia in vitro con schemi di trattamento sequenziale che prevedono prima l'utilizzo del chemioterapico DX/CDDP in grado di causare il danno al DNA e successivamente il trattamento con la Roscovitina in grado di inibire CDK1 e 2 e dunque alcuni dei meccanismi di riparo del danno al DNA.

Le linee cellulari di osteosarcoma farmacosensibili e farmacoresistenti sono state esposte in modo sequenziale, per un totale di 72 ore, a DX o CDDP per 24 ore (tempo necessario per causare il danno al DNA) seguite da trattamento con Roscovitina della durata di 48 ore. I risultati sono riassunti in **tabella 8 B.**

Sono stati osservati effetti sinergici o additivi in entrambi i pannelli di linee cellulari, fatta eccezione per il trattamento sequenziale DX e Roscovitina nelle linee parentali farmacosensibili.

Tabella 8

A

CI ^a	U-2OS	Saos-2	U-2OS/ MTX300	Saos-2/ MTX300	U-2OS/ CDDP4 μ g	Saos-2/ CDDP6 μ g	U-2OS/ DX580	Saos-2/ DX580
	ROS + DX ^b	Ant ^f	SIN ^e					SIN
ROS + MTX ^c	Ant ^g	Ant	Ant	Ant				
ROS ^h + CDDP ^d	Ant	Ant			ADD	ADD		

B

CI ^a	U-2OS	Saos-2	U-2OS/ CDDP4 μ g	Saos-2/ CDDP6 μ g	U-2OS/ DX580	Saos-2/ DX580
	DX+ ROS	Ant	Ant			SIN
CDDP + ROS	SIN	SIN	SIN	ADD		

Tabella 8: Interazioni farmacologiche della Roscovitina con i chemioterapici convenzionali.

Gli esperimenti di associazione (A) e sequenza (B) sono stati valutati nelle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle relative varianti farmacoresistenti ai chemioterapici in uso nei protocolli chemioterapici (DX, CDDP e MTX).

^aCoefficiente di Interazione; ^bdoxorubicina; ^cmethotrexate; ^dcisplatino; ^esinergismo; ^fantagonismo; ^gadditivismo; ^hRoscovitina.

Capitolo V

Discussione

Circa il 2% del genoma umano codifica per le proteine chinasi (> 500) che costituiscono quindi una tra le famiglie proteiche più numerose. Tali enzimi catalizzano la fosforilazione proteica, uno dei più importanti meccanismi post-trascrizionali che regolano reversibilmente le funzioni proteiche, incluse molecole che controllano complessi processi cellulari come la crescita, il differenziamento, la proliferazione e l'apoptosi. Le proteine chinasi giocano quindi un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale intracellulare di fenomeni finemente regolati. Negli ultimi 20 anni, sono state identificate mutazioni a carico di geni codificanti per le proteine chinasi coinvolte nello sviluppo di molte patologie umane tra cui diversi tumori umani. Attualmente, oltre la metà dei proto-oncogeni identificati codifica per proteine chinasi e molti altri sono substrati e/o effettori delle stesse. (Lahiry, 2010; Barouch and Sauer, 2011) Da qui l'interesse da parte di varie ditte farmaceutiche a sviluppare nuovi e selettivi inibitori di proteine chinasi al fine di un loro potenziale utilizzo clinico in terapie bersaglio-specifiche. Nonostante l'osteosarcoma sia ad oggi uno dei tumori meno caratterizzati da questo punto di vista, esistono evidenze riguardo il coinvolgimento di diverse proteine chinasi nella patogenesi e aggressività di questo tumore (Messerschmitt, 2008; Yamagouchi, 2009).

Lo scopo di questo studio è stato quello di studiare l'impatto biologico e molecolare sulle cellule di osteosarcoma di cinque proteine chinasi correlate al ciclo cellulare: AURK-A, AURK-B, PLK1, PIK3CA e CDK2. In particolare è stata valutata la loro rilevanza biologica ai fini della crescita cellulare e dell'aggressività delle cellule di osteosarcoma, e per quattro di loro (AURK-A, AURK-B, PLK1, e CDK2) e' stata anche valutata l'efficacia in vitro di inibitori di potenziale utilizzo per la pianificazione di protocolli di trattamento clinici: VX-680, ZM-447439, NMS-1 e Roscovitina.

Aurora chinasi, VX-680 e ZM447439.

Le Aurora chinasi appartengono alla classe di serina/treonina chinasi definite come "key regulator" del processo di mitosi: sono infatti indispensabili per una corretta ed adeguata segregazione del corredo genomico dalla cellula madre alle cellule figlie.

Un'alterata regolazione dei membri di questa famiglia è stata correlata alla tumorigenesi, infatti l'amplificazione e/o la sovraespressione del gene codificante per l'AURK-A risulta frequentemente associata a diversi tumori (carcinoma ovarico, carcinoma del pancreas,

carcinoma epatico e gastrico) così come le mutazioni a carico del gene che codifica per l'AURK-B (carcinoma coloretale, carcinoma prostatico, carcinoma renale e polmonare). (Dar, 2010)

Appare quindi chiaro come entrambe queste proteine chinasi della famiglia delle Aurora rappresentino un interessante bersaglio terapeutico.

L'analisi dell'espressione genica di AURK-A e AURK-B condotta su una serie clinica di 21 casi di osteosarcoma umano ad alto grado di malignità ha mostrato che entrambe le chinasi sono espresse ad alti livelli nei campioni tumorali rispetto ai tessuti muscolo-scheletrici sani e ai tessuti normali. Inoltre l'elevata espressione di Aurora chinasi è associata a caratteristiche clinico-patologiche di alta malignità e decorso clinico sfavorevole.

Ciò suggerisce il coinvolgimento di AURK-A e AURK-B nella patogenesi e decorso clinico dell'osteosarcoma.

La dipendenza delle cellule di osteosarcoma dalle Aurora chinasi A e B selezionate in base ai dati di profilo di espressione genica, è stata validata attraverso l'utilizzo di tecniche di silenziamento genico.

Lo studio è stato eseguito su linee cellulari farmacosensibili isolate da pazienti con osteosarcoma ad alto grado di malignità e scelte in base ai livelli di espressione di AURK-A e AURK-B.

Il silenziamento genico ha messo in evidenza un rilevante abbattimento (*knock-down*) dei livelli di RNA messaggero e proteina nelle linee silenziate per entrambe le chinasi, corrispondente ad una forte inibizione della crescita cellulare tumorale. Ciò ha confermato l'importanza dell'espressione di queste chinasi per la proliferazione delle cellule di osteosarcoma.

I risultati ottenuti hanno fornito il razionale per estendere lo studio all'analisi in vitro dell'attività di farmaci inibitori Aurora chinasi specifici: VX-680 e ZM447439.

VX-680 è stato validato con successo in fase preclinica per diversi tumori umani e ed è già incluso in trials clinici di fase I, II e III, mentre ZM447439 è in corso di validazione preclinica (Kollareddy, 2012).

La sensibilità di entrambi gli inibitori è stata valutata tramite la determinazione del valore di IC_{50} eseguita su un pannello costituito dalle 4 linee cellulari di osteosarcoma umano farmacosensibili (tre delle quali utilizzate negli studi di silenziamento) e 6 varianti farmacoresistenti ai chemioterapici convenzionalmente impiegati in chemioterapia.

In termini di inibizione della crescita cellulare le linee sono risultate sensibili sia a VX-680 che a ZM447439, con valori di IC_{50} all'interno di un intervallo di bassa micromolarità.

Nelle varianti farmacoresistenti gli inibitori sono risultati attivi nelle linee

methotrexate(MTX)-resistenti, mentre è stata osservata una minor sensibilità nelle linee *doxorubicina(DX)-resistenti* e in modo minore nelle linee *CDDP-resistenti*. Il principale meccanismo responsabile di farmacoresistenza nelle linee U-2OS e Saos-2 DX-resistenti è rappresentato dalla sovraespressione della glicoproteina di membrana ABCB1 o P-glycoprotein (Serra, 1993; Hattinger, 2009) con funzione di pompa di efflusso per composti xenobiotici con un ampio spettro di substrati. Pertanto è stato necessario verificare se gli inibitori in studio (VX-680 e ZM447439) fossero potenziali substrati di ABCB1. L'efficacia *in vitro* di entrambi i farmaci è stata quindi ulteriormente valutata in presenza di un inibitore di ABCB1 nelle linee DX-resistenti (un agente revertante l'attività di ABCB1, il cui nome è coperto da segreto industriale pertanto citato in modo generico come "REV"). L'efficacia di VX-680 e ZM447439 in presenza di agente revertante ha confermato che la sovraespressione di ABCB1 interferisce in modo negativo con l'efficacia di entrambi i farmaci. Ad oggi non è stato possibile verificare per le linee cellulari CDDP-resistenti quale sia il meccanismo di parziale resistenza al farmaco VX-680, un'ipotesi è data dal coinvolgimento del sistema di detossificazione glucatione-S-trasferasi (famiglia di isoenzimi detossificanti che catalizzano la coniugazione di varie molecole tossiche con il glutatione rendendole meno reattive e più facilmente eliminabili dall'organismo) strettamente connesso alla farmacoresistenza al CDDP (Pasello, 2008).

Al fine di valutare le interazioni farmacologiche con i chemioterapici convenzionalmente impiegati nei protocolli terapeutici per l'osteosarcoma sono stati eseguiti esperimenti di associazione dei farmaci VX-680 e ZM447439 con CDDP, DX e MTX. E' stato osservato che VX-680 produce interazioni additive o sinergiche con tutti i chemioterapici sia nelle linee parentali che nelle varianti farmacoresistenti. Ciò supporterebbe, a fronte di ulteriori approfondimenti sia preclinici che clinici, un suo potenziale utilizzo in combinazione i chemioterapici convenzionali. Particolarmente interessante è l'osservazione di un'interazione sinergica tra VX-680 e cisplatino (CDDP) nelle linee CDDP-resistenti, dati che supportano il coinvolgimento delle Aurora chinasi nei meccanismi di resistenza al CDDP, come descritto per altri tumori (Shahzad, 2009).

Differentemente da VX-680, gli esperimenti di associazione con ZM447439 hanno prodotto interazioni principalmente negative, per ragioni al momento ancora sconosciute.

Il trattamento con VX-680 e ZM447439 induce nella maggior parte delle linee cellulari di osteosarcoma endoreduplicazione con la conseguente formazione di una popolazione iperploide, responsabile del rallentamento delle capacità proliferative delle cellule.

In diversi modelli sperimentali è stato riportato che l'inibizione di AURK-A e/o AURK-B può comportare alterazioni a carico del ciclo cellulare e conseguentemente nella ploidia,

dipendenti dallo stato di p53: le linee cellulari p53 positive (wild-type) o con p53 attivo solitamente vanno incontro ad apoptosi o arresto del ciclo cellulare in una pseudo fase G1. Mentre le cellule negative o mutate per p53 tendono a progredire nelle fasi del ciclo cellulare e diventare poliploidi. (Nair, 2012)

Nel nostro studio non abbiamo osservato questa stretta associazione tra lo stato di p53 e la tendenza all'iperploidia o all'apoptosi dopo trattamento con VX-680 o ZM447439, nonostante il nostro pannello di linee includa due linee cellulari p53 positive wild type (U-2OS, e IOR/OS9) e due linee cellulari con P53 parzialmente deleta e non funzionale (Saos-2 e IOR/OS18) (Ottaviano, 2010). Piuttosto quest'evidenza conferma che nei nostri modelli sperimentali l'iperploidia indotta da VX-680 o ZM447439 non dipende dallo stato di p53, come invece descritto per altri tumori umani (Nair, 2012).

Inoltre, è stato visto che l'iperploidia indotta dal trattamento con VX-680 e/o ZM447439 risulta associata ad una compromessa capacità proliferativa che indirizza le cellule verso l'apoptosi. Gli inibitori delle Aurora-chinasi sono agenti che interferiscono con la formazione del fuso mitotico, infatti dopo il trattamento le cellule aumentano le loro dimensioni e la ploidia andando incontro al processo descritto già per altri tumori come catastrofe mitotica (Hassa, 2009). La degradazione di Caspase 2 e clivaggio di Caspase 3 e PARP-1 che è stata osservata, seppur in modo variabile nelle diverse linee, ha confermato l'induzione di catastrofe mitotica e apoptosi operata dai farmaci in questione nelle linee cellulari di osteosarcoma.

È noto, in diversi modelli sperimentali, che l'inibizione di AURK-A e AURK-B porta ad una inibizione della capacità di crescita in condizioni di non aderenza e ad una riduzione della capacità migratoria (Guan, 2007; Wan, 2009).

Pertanto è stato valutato l'effetto di ciascun inibitore sul fenotipo maligno delle cellule di osteosarcoma in termini di capacità invasiva e migratoria, al fine di ottenere una stima indiretta del potenziale metastatico.

VX-680 e ZM447439 inibiscono significativamente la capacità di formare colonie in condizioni di non aderenza (soft agar) in tutte le linee cellulari. VX-680 è in grado, inoltre, di ridurre la capacità migratoria in quasi tutte le linee cellulari, mentre ZM447439 induce una riduzione della motilità cellulare solo nella variante farmacosistente Saos-2/CDDP6 μ g.

In conclusione l'analisi *in vitro* dell'attività dei farmaci anti-Aurora ha permesso di identificare VX-680 come nuovo farmaco di potenziale interesse clinico, soprattutto in virtù delle sue interazioni sinergiche con i chemioterapici di uso convenzionale e per l'impatto che ha sul fenotipo maligno delle cellule di osteosarcoma.

PLK1 e NMS-1

I farmaci antimitotici rappresentano il principale strumento di cura per la terapia di tumori solidi ed ematologici. PLK1 rappresenta un bersaglio molecolare importante in quanto svolge importanti ruoli durante il ciclo cellulare; è infatti implicato nell'ingresso in mitosi, maturazione del centrosoma, assemblaggio del fuso mitotico ai due poli, divisione dei cromatidi fratelli e uscita dalla mitosi con l'inizio della citodieresi (Strebhardt, 2010).

I dati del profilo di espressione genica unitamente alle curve di sopravvivenza hanno messo in evidenza che PLK1 è maggiormente espresso nei campioni tumorali di osteosarcoma ad alto grado di malignità (21 casi clinici) rispetto ai tessuti muscolo-scheletrici sani e ai tessuti normali e che la sua sovraespressione correla con una prognosi peggiore.

Come per le Aurore chinasi, l'importanza della sovraespressione di PLK1 per l'osteosarcoma è stata validata attraverso tecniche di silenziamento genico eseguite su linee cellulari farmacosensibili.

Il silenziamento genico ha messo in evidenza un rilevante abbattimento dei livelli di RNA messaggero e proteina nelle linee silenziate in modo omogeneo al primo tempo sperimentale dopo la trasfezione con l'oligonucleotide silenziante, corrispondente ad una forte inibizione della crescita cellulare. Ciò ha confermato l'importanza dell'espressione di PLK1 per la proliferazione delle cellule di osteosarcoma, pertanto lo studio è stato esteso all'analisi *in vitro* dell'attività di un inibitore specifico: NMS-1286937 (NMS-1, NMS-P937).

La sensibilità a NMS-1 è stata valutata tramite la determinazione del valore di IC₅₀ eseguita su un pannello costituito dalle 4 linee cellulari di osteosarcoma umano farmacosensibili e le 6 varianti farmacosensibili ai chemioterapici convenzionali.

In termini di inibizione della crescita cellulare sia le linee cellulari farmacosensibili che le farmacosensibili sono risultate sensibili all'attività di NMS-1, mostrando un valore medio di IC₅₀ all'interno un intervallo di bassa micromolarità (0,232 μ M \pm 0,035 μ M), fatta eccezione per le linee cellulari DX-resistenti che, come già descritto, sovraesprimono ABCB1. In questo caso è stato verificato per NMS-1 un ruolo da agente revertante forse in grado di antagonizzare l'attività dell'inibitore di ABCB1 (REV), in quanto esperimenti di associazione di NMS-1 in presenza di DX nelle linee DX-resistenti produce sia un aumento di sensibilità alla DX che un accumulo della medesima nei nuclei cellulari, fenomeno che non si verifica normalmente.

Il trattamento con NMS-1 induce la formazione di una popolazione con contenuto di DNA doppio nelle linee cellulari farmacosensibili, mentre il trattamento combinato con DX causa iperplodia e un imponente blocco in fase G2/M nelle linee cellulari DX-resistenti, come già dimostrato *in vitro* per altre linee tumorali umane (Valsasina, 2012) e probabilmente dovuto

ad un rallentamento della mitosi causato dall'inattivazione di PLK1 (Lindon,2004). NMS-1 è in grado di interferire con la formazione del fuso mitotico, infatti, come per VX-680 e ZM447439, il trattamento induce un aumento delle dimensioni e del contenuto di DNA delle cellule, con conseguente morte cellulare a causa del prolungato blocco mitotico.

È stata documentata apoptosi caspase-dipendente e morte mitotica, in seguito al trattamento con alte concentrazioni di NMS-1 in diverse linee cellulari tumorali (Valsasina, 2012). La linea cellulare Saos-2 è indotta in apoptosi tramite clivaggio della caspase 3. In diversi modelli sperimentali è stato riportato che la deplezione di PLK-1 in cellule tumorali p53-negative causa una sovraregolazione di *p73* (membro della famiglia p53) e della proteina pro-apoptotica "*p53-regulated apoptosis-inducing protein 1*". La regolazione di *p73* da parte di PLK-1 inibisce l'apoptosi in maniera p53-indipendente (Strebhardt, 2010). Come descritto per altri tumori anche nei nostri modelli di osteosarcoma, l'apoptosi indotta dall'inibizione di PLK-1 è probabilmente p53-indipendente, infatti nella linea cellulare U-2OS (p53-positiva) non si assiste al clivaggio di caspase 3 o di PARP-1 conseguentemente all'inibizione di PLK-1.

Al fine di valutare le interazioni farmacologiche con i chemioterapici convenzionalmente impiegati nei protocolli terapeutici per l'osteosarcoma sono stati eseguiti esperimenti di associazione e sequenza di NMS-1 con CDDP, DX o MTX. NMS-1 interagisce negativamente sia con il CDDP che con il MTX risultando in un effetto antagonista, mentre risulta in un effetto additivo/sinergico con la DX nelle linee cellulari DX-resistenti, probabilmente grazie all'azione revertante esercitata da NMS-1 su ABCB1.

Il trattamento sequenziale con la somministrazione di NMS-1 prima del chemioterapico (CDDP, DX o MTX) produce principalmente interazioni positive in modo però poco omogeneo tra le linee parentali e le relative resistenti. In particolare, nelle linee cellulari DX-resistenti il trattamento sequenziale produce un effetto antagonista, contrariamente a quanto accade in associazione. Questo dato avvalorava maggiormente l'ipotesi dell'azione di NMS-1 come agente in grado di inibire ABCB1 e di ridurre così la farmacoresistenza alla DX, effetto che richiede la concomitante presenza di NMS-1 e DX e che non si può quindi verificare nel caso di un trattamento sequenziale .

I dati emersi da questo studio indicano quindi in NMS-1 un altro farmaco con interessanti prospettive di utilizzazione clinica la cui utilizzazione però non può prescindere dalle indicazioni prodotte da questa validazione preclinica, soprattutto per i pazienti con elevata espressione di ABCB1.

CDK2 e Roscovitina.

Le proteine chinasi appartenenti alla famiglia CDK e le cicline ad esse correlate sono importanti regolatori del ciclo cellulare. Alterazioni a loro carico possono indurre le cellule alla crescita e alla proliferazione incontrollata, processo alla base di numerose patologie umane tra cui il cancro (Lapenna, 2009).

L'analisi dell'espressione genica di CDK2 condotta prima su una serie clinica ridotta di 21 casi e poi su una serie clinica più ampia (88 casi) di osteosarcoma umano ad alto grado di malignità, ha mostrato che CDK2 è sovraespressa nei campioni tumorali di osteosarcoma rispetto ai tessuti muscolo-scheletrici sani e ai tessuti normali, e inoltre è associata a un decorso clinico sfavorevole. Ciò ha confermato il coinvolgimento di CDK2 nella patogenesi dell'osteosarcoma e il suo potenziale impatto sul decorso clinico.

L'importanza di CDK2 per le cellule di osteosarcoma è stata validata attraverso tecniche di silenziamento genico che hanno messo in evidenza un rilevante abbattimento dei livelli di RNA messaggero (mRNA) e proteina nelle linee silenziate per CDK2, corrispondente ad una forte inibizione della crescita cellulare tumorale. Ciò ha confermato l'importanza della sovraespressione di questa chinasi per la proliferazione delle cellule di osteosarcoma.

Lo studio è stato esteso all'analisi *in vitro* dell'attività di un inibitore specifico di CDK2, la Roscovitina.

Rispetto gli altri inibitori studiati, la Roscovitina ha mostrato un'attività *in vitro* minore in termini di valori medi di IC₅₀ ($13 \pm 4 \mu\text{M}$) ma uniforme tra il pannello di linee cellulari farmacosensibili e farmacoresistenti, probabilmente perché non è substrato di ABCB1. L'analisi dell'efficacia *in vitro* della Roscovitina è stata approfondita in termini di valutazione degli effetti a carico del ciclo cellulare nelle linee cellulari farmacosensibili U-2OS e Saos-2. Il trattamento con la Roscovitina determina l'aumento di una popolazione cellulare ad alto contenuto di DNA, indice di un possibile rallentamento in fase G2 o M. (Vermeulen, 2003).

In diversi tumori solidi CDK2, insieme alla ciclina A1, è coinvolta nei meccanismi di riparo al DNA (*non-homologous end-joining DNA repair*, NHEJ; *Homologous Repair*, HR; *Mismatch Repair*, MMR; *DNA Double Strand Break repair*, DNA DSB_r) in corrispondenza del checkpoint G1/S di verifica dell'integrità del DNA attivato in risposta ad insulto genotossico da radiazioni o chemioterapici come la DX e il CDDP (Federico, 2010).

In seguito ad insulto genotossico dovuto al trattamento con DX o CDDP, la Roscovitina previene il riparo del DNA da parte del meccanismo di riparo NHEJ, prevenendo la sovraespressione della ciclina A1 (indotta dal danno) e la conseguente formazione del complesso CDK2/ciclina A1 responsabile dell'attivazione dei meccanismi di riparo.

Le linee cellulari di osteosarcoma parentali e le relative farmacoresistenti sono state esposte al trattamento sequenziale con DX o CDDP per 24 ore (tempo necessario per causare il danno al DNA prima dell'attivazione dei meccanismi di riparo) e Roscovitina per 48 ore, sulla base di evidenze sperimentali ottenute per altri tumori (Federico, 2010; Lambert, 2008). La Roscovitina produce interazioni additive o sinergiche con entrambi i chemioterapici nelle varianti farmacoresistenti, suggerendo anche nel nostro modello sperimentale l'importante coinvolgimento di CDK2 nei meccanismi di riparo.

L'obiettivo sarà quello di approfondire gli effetti inibitori della Roscovitina sui meccanismi di riparo del danno al DNA tramite "comet assay" (un saggio in grado di valutare "double/single strand break point" nel DNA, conseguenti al trattamento con DX e CDDP), di verificare gli effetti a carico del ciclo cellulare in risposta al trattamento sequenziale con DX o CDDP e Roscovitina nelle linee cellulari DX-resistenti e CDDP-resistenti e valutare l'induzione di morte cellulare programmata caspase-dipendente e la morte per autofagia, a fronte di evidenze scientifiche riguardo questi meccanismi di morte in linee cellulari di sarcomi tra cui l'osteosarcoma (Lambert, 2008).

Da questo studio si evince che una migliore caratterizzazione biologica e biomolecolare dell'osteosarcoma può fornire utili indicazioni per l'identificazione di nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di farmaci bersaglio-specifici come valida alternativa terapeutica.

In conclusione l'analisi *in vitro* dell'attività dei farmaci anti-Aurora ha permesso di identificare VX-680 come nuovo farmaco di potenziale interesse clinico, soprattutto in virtù delle sue interazioni sinergiche con i chemioterapici di uso convenzionale e per l'impatto che ha sul fenotipo maligno delle cellule di osteosarcoma.

I dati preliminari ottenuti per i farmaci NMS-1 e Roscovitina sono promettenti, sarà interessante approfondire il ruolo di NMS-1 quale agente revertante la farmacoresistenza alla doxorubicina e come l'inibizione di CDK2 da parte della Roscovitina possa inibire i meccanismi di riparo del danno al DNA, favorendo così la risposta ai chemioterapici in condizioni di farmacoresistenza, principale causa di fallimento dei protocolli terapeutici attuali.

Bibliografia

1. Aldoss IT, Tashi T, Ganti AK. Seliciclib in malignancies. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Dec;18(12):1957-65. doi: 10.1517/13543780903418445.
2. Avella M, Bacci G and Mc Donald DJ. “Adjuvant chemotherapy with six drugs (adriamycin, methotrexate, cisplatin, bleomycin, cyclophosphamide and dactinomycin) for non metastatic high grade osteosarcoma of the extremities. Results of 32 patients and comparison to 127 patients concomitantly treated with the same drugs in neoadjuvant form”. *Chemioterapia*. 7: 133- 137, 1988.
3. Bacci G, Bertoni F, Longhi A, Ferrari S, Forni C, Biagini R, et al. “Neoadjuvant chemotherapy for high-grade central osteosarcoma of the extremity. Histologic response to preoperative chemotherapy correlates with histologic subtype of the tumour”. *Cancer*. 97: 3068 – 3075, 2003.
4. Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, Longhi A, Casadei R, Fabbri N, Forni C, Versari M, Campanacci M.: Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the istituto ortopedico rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol*. 2000 Dec 15;18(24):4016-27.
5. Bacci G, Ferrari S, Longhi A, et al. “High dose ifosfamide in combination with high-dose methotrexate, doxorubicin and cisplatin in the neoadjuvant treatment of the extremity osteosarcoma: preliminary results of an Italian Sarcoma/Scandinavian Group Pilot study”. *J. Chemother*. 14: 198 – 206, 2002.
6. Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Picci P, Mercuri M, Alvegard TA, Saeter G, Donati D, Manfrini M, Lari S, Briccoli A, Forni C; Italian Sarcoma Group/Scandinavian Sarcoma Group.
7. Bacci G, Longhi A, Ferrari S, Lari S, Manfrini M, Donati D, Forni C, Versari M.: Prognostic significance of serum alkaline phosphatase in osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: recent experience at Rizzoli Institute. *Oncol Rep*. 2002 Jan-Feb;9(1):171-5.
8. Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Bròdano G, Manara MC, Maurici D, Bacci G, Bertoni F, Picci P, Sottili S, Campanacci M and Serra M. “Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome”. *N. Eng. J. Med*. 333: 1380-1385, 1995a.

9. Barouch-Bentov R, Sauer K. Mechanisms of drug resistance in kinases. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011 Feb;20(2):153-208. doi: 10.1517/13543784.2011.546344.
10. Barr AR, Gergely F. Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci*. 2007 Sep 1;120(Pt 17):2987-96.
11. Benini S, Baldini N, Manara MC et al. Redundancy of autocrine loops in human osteosarcoma cells. *Int J Cancer* 1999; 80: 581-588.
12. Buckley JD, Pendergrass TW, Buckley CM, Pritchard DJ, Nesbit ME, Provisor AJ, Robison LL.: Epidemiology of osteosarcoma and Ewing's sarcoma in childhood: a study of 305 cases by the Children's Cancer Group. *Cancer*. 1998 Oct 1;83(7):1440-8.
13. Campanacci M, Bacci G, Bertoni F et al. "The treatment of osteosarcoma of the extremities: Twenty year's experience at Istituto Rizzoli". *Cancer*. 48: 1569 – 1581, 1981.
14. Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem* 1990. 265:506-14.
15. Chou AJ, Gorlick R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006 Jul;6(7):1075-85. Review.
16. Chou AJ, Gorlick R.: Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006 Jul;6(7):1075-85.
17. Dirven HA, Megens L, Oudshoorn MJ, Dingemans MA, van Ommen B, van Bladeren PJ.: Glutathione conjugation of the cytostatic drug ifosfamide and the role of human glutathione S-transferases. *Chem Res Toxicol*. 1995 Oct-Nov;8(7):979-86.
18. Ditchfield C, Johnson VL, Tinghe A, et al. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol*. 2003;161:267–280
19. Du K, Tsichlis PN (2005): Regulation of the Akt kinase by interacting proteins. *Oncogene* 24:7401-9.
20. Federico M, Symonds CE, Bagella L, Rizzolio F, Fanale D, Russo A, Giordano A. R-Roscovitin (Seliciclib) prevents DNA damage-induced cyclin A1 upregulation and hinders non-homologous end-joining (NHEJ) DNA repair. *Mol Cancer*. 2010 Aug 4;9:208. doi: 10.1186/1476-4598-9-208.

21. Federico M, Symonds CE, Bagella L, Rizzolio F, Fanale D, Russo A, Giordano A. R-Roscovitin (Seliciclib) prevents DNA damage-induced cyclin A1 upregulation and hinders non-homologous end-joining (NHEJ) DNA repair. *Mol Cancer*. 2010 Aug 4;9:208. doi: 10.1186/1476-4598-9-208.
22. Ferrari S, Smeland S, Mercuri M, et al. Neoadjuvant chemo-therapy with high-dose ifosfamide, high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for patients with localized osteo- sarcoma of the extremity: A Joint Study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. *J Clin Oncol* 2005;23:8845–52.
23. Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res*. 2007 Jan;5(1):1-10.
24. G Manning, DB Whyte, R Martinez, T Hunter, S Sudarsanam (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome *Science* 298:1912-1934
25. Gadea BB, Ruderman JV. Aurora kinase inhibitor ZM447439 blocks chromosome induced spindle assembly, the completion of chromosome condensation, and the establishment of the spindle integrity checkpoint in *Xenopus* Egg extracts. *Mol Biol Cell*. 2005;16:1305–1318
26. Gamberi G, Ragazzini P, Benassi MS, et al. Analysis of 12q13-15 genes in parosteal osteosarcoma. *Clin Orthop* 2000; 377: 195-204
27. Goorin AM, Schwartzentruber DJ, Devidas M, Gebhardt MC, Ayala AG, Harris MB, Helman LJ, Grier HE, Link MP; Pediatric Oncology Group.: Presurgical chemotherapy compared with immediate surgery and adjuvant chemotherapy for nonmetastatic osteosarcoma: Pediatric Oncology Group Study POG-8651. *J Clin Oncol*. 2003 Apr 15;21(8):1574-80
28. Guojun Wu, Mingzhao Xing, Elizabeth Mambo, Xin Huang, Junwei Liu, Zhongmin Guo, Aditi Chatterjee, David Goldenberg, Susanne M Gollin, Saraswati Sukumar, Barry Trink and David Sidransky: Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Research* 2005, 7:R609-R616 (DOI 10.1186/bcr1262)
29. Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*. 1995 May;9(8):576-96.

30. Harrington EA, Bebbington D, Moore J, et al. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med*. 2004;10:262–267
31. Hattinger CM, Pasello M, Ferrari S, Picci P, Serra M.: Emerging drugs for high-grade osteosarcoma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2010 Dec;15(4):615-34. Epub 2010 Aug 9.
32. Hattinger CM, Stoico G, Michelacci F et al. Mechanisms of gene amplification and evidence of coamplification in drug-resistant human osteosarcoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 289-309.
33. High dose ifosfamide in combination with high dose methotrexate, adriamycin and cisplatin in the neoadjuvant treatment of extremity osteosarcoma: preliminary results of an Italian Sarcoma Group/Scandinavian Sarcoma Group pilot study. *J Chemother*. 2002 Apr;14(2):198-206.
34. Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, et al. A novel treatment strategy targeting Aurora kinases in acute myelogenous leukemia. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:1851–1857
35. Kitzen JJ, de Jonge MJ, Verweij J. Aurora kinase inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010 Feb;73(2):99-110. doi: 10.1016/j.critrevonc.2009.03.009. Epub 2009 Apr 14.
36. Klein MJ, Siegal GP: Osteosarcoma: anatomic and histologic variants. *Am J Clin Pathol*. 2006 Apr;125(4):555-81.
37. Kollareddy M, Zheleva D, Dzubak P, Brahmshatriya PS, Lepsik M, Hajduch M. Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic. *Invest New Drugs*. 2012 Dec;30(6):2411-32. doi: 10.1007/s10637-012-9798-6. Epub 2012 Feb 18.
38. Kyle C. Kurek, Valerie L. Luks, Ugur M. Ayturk, Ahmad I. Alomari, Steven J. Fishman, Samantha A. Spencer, John B. Mulliken, Margot E. Bowen, Guilherme L. Yamamoto, Harry P.W. Kozakewich and Matthew L. Warman: Somatic mosaic activating mutations in pik3ca cause Cloves Syndrome *Am J Hum Genet*. 2012 June 8; 90(6): 1108–1115.
39. K. Krishnan Unni, Dahlin's Bone Tumors General Aspects and Data on 11087 Cases. 1996
40. Lahiry P, Torkamani A, Schork NJ, Hegele RA. Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):60-74. doi: 10.1038/nrg2707.
41. Lambert LA, Qiao N, Hunt KK, Lambert DH, Mills GB, Meijer L, Keyomarsi K.

- Autophagy: a novel mechanism of synergistic cytotoxicity between doxorubicin and roscovitine in a sarcoma model. *Cancer Res.* 2008 Oct 1;68(19):7966-74. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1333.
42. Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Jul;8(7):547-66. doi: 10.1038/nrd2907.
43. Le Tourneau C, Faivre S, Laurence V, Delbaldo C, Vera K, Girre V, Chiao J, Armour S, Frame S, Green SR, Gianella-Borradori A, Diéras V, Raymond E. Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer.* 2010 Dec;46(18):3243-50. doi: 10.1016/j.ejca.2010.08.001. Epub 2010 Sep 6.
44. Liya Zhang and Shulan Zhang. ZM447439, the Aurora kinase B inhibitor, suppresses the growth of cervical cancer SiHa cells and enhances the chemosensitivity to cisplatin. *Obstet. Gynaecol. Res.* Vol. 37, No. 6: 591–600, June 2011
45. Longhi A, Errani C, De Paolis M, Mercuri M, Bacci G.: Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art. *Cancer Treat Rev.* 2006 Oct;32(6):423-36. Epub 2006 Jul 24.
46. Macurek L, Lindqvist A, Medema RH. Aurora-A and hBora join the game of Polo. *Cancer Res.* 2009 Jun 1;69(11):4555-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0142.
47. Madhu Kollareddy, Daniella Zheleva, Petr Dzubak, Pathik Subhashchandra Brahmkshatriya, Martin Lepsik, and Marian Hajdich: Aurora kinase inhibitors: Progress towards the clinic. *Invest New Drugs.* 2012 December; 30(6): 2411–2432. Published online 2012 February 18.
48. Martelli AM, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Cappellini A, Billi AM, Cocco L (2005): Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias. *Histol Histopathol* 20:239-52.
49. Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Feb;14(1):29-36.
50. Mian M.K. Shahzad, Gabriel Lopez-Berestein and Anil K. Sood Novel Strategies for Reversing Platinum Resistance *Drug Resist Updat.* 2009 December; 12(6): 148–152.
51. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L. Anthracycline: molecular Advances and Pharmacologic developments in Antitumor Activity and cardiotoxicity.

- Pharm. Rev. 56 (2): 185 – 229, 2004.
52. Moustapha Hassan,1,2,* Hatem Sallam,1 and Zuzana Hassan. The Role of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Early Drug Development with reference to the Cyclin-dependent Kinase (Cdk) Inhibitor - Roscovitine Sultan Qaboos Univ Med J. 2011 May; 11(2): 165–178. Published online 2011 May 15.
 53. Nair JS, Ho AL, Schwartz GK. The induction of polyploidy or apoptosis by the aurora A kinase inhibitor MK8745 is p53-dependent. *Cell Cycle* 2012; 11: 807-817.
 54. Nitta M, Tsuiki H, Arima Y, Harada K, Nishizaki T, Sasaki K, Mimori T, Ushio Y, Saya H. Hyperploidy induced by drugs that inhibit formation of microtubule promotes chromosome instability. *Genes Cells*. 2002 Feb;7(2):151-62.
 55. Operskalski EA, Preston-Martin S, Henderson BE, Visscher BR.: A case-control study of osteosarcoma in young persons. *Am J Epidemiol*. 1987 Jul;126(1):118-26.
 56. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Mar 14;1602(1):73-87.
 57. Ottaviani G, Jaffe N.: The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009;152:3-13. doi: 10.1007/978-1-4419-0284-9_1.
 58. Ottaviani G, Jaffe N.: The etiology of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*. 2009;152:15-32. doi: 10.1007/978-1-4419-0284-9_2.
 59. Pakos EE and Ioannidis JP. “The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis”. *Cancer*. 98: 581 – 589, 2003.
 60. Pasello M, Michelacci F, Scionti I et al. Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma, *Cancer Res* 2008; 68: 6661-6668.
 61. Pérez de Castro I, de Cárcer G, Malumbres M. A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy. *Carcinogenesis*. 2007 May;28(5):899-912. Epub 2007 Jan 27.
 62. Picci P, Bacci G, Rosito P, et al. “The importance of chemotherapy-induced necrosis as prognostic factor in localized Ewing’s sarcoma (ES) of the extremities”. *Med. Ped. Oncol*. 27: 255 - 260, 1996.
 63. Picci P. : Osteosarcoma (osteogenic sarcoma). *Orphanet J Rare Dis*. 2007 Jan 23;2:6.
 64. Rosemburg SA, Chabner BA and Young RC. “Treatment of osteogenic sarcoma.

- Effect of adjuvant high-dose Methotrexate after amputation". *Cancer Treat. Rep.* 63: 739 – 751, 1979.
65. Rosen G, Caparros B, Huvos AG, Kosloff C, Nirenberg A, Cacavio A, et al. "Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumour to preoperative chemotherapy". *Cancer.* 49 (6): 1221 – 1230, 1982.
66. Schajowicz F, Sissons HA, Sobin LH: The World Health Organization's histologic classification of bone tumors. A commentary on the second edition. *Cancer.* 1995 Mar 1;75(5):1208-14.
67. Serra M, G. Reverter-Branchat G, Maurici D et al. Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells. *Ann Oncol* 2004; 15: 151–160.
68. Serra M, Pasello M, Manara MC, Scotlandi K, Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Alvegard TA, Picci P, Bacci G and Smeland S. "May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol". *Int. J. Oncol.* 29 (6): 1459 – 1468, 2006.
69. Serra M, Scotlandi K, Manara MC et al. Establishment and characterization of multidrug-resistant human osteosarcoma cell lines. *Anticancer Res* 1993; 13: 323-329.
70. Serra M, Scotlandi K, Reverter-Branchat G, Ferrari S, manara MC, Benini S, Incaprera M, Bertoni F, Mercuri M, Briccoli A, Bacci G and Picci P. "Value of P-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities". *J. Clin. Oncol.* 21 (3): 536 – 542, 2003.
71. Serra M, Tarkkanen M, Baldini N, et al. Simultaneous paired analysis of numerical chromosomal aberrations and DNA content in osteosarcoma. *Mod Pathol* 2001; 14: 710-716
72. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265–79. 6. Kelland LR. Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 2000;59:1–8.
73. Simizu S, Osada H. Mutations in the Plk gene lead to instability of Plk protein in human tumour cell lines. *Nat Cell Biol.* 2000 Nov;2(11):852-4.
74. Souhami RL, Craft AW, Van der Eijken JW, Nooij M, Spooner D, Bramwell VH, Wierzbicki R, Malcolm AJ, Kirkpatrick A, Uscinska BM, Van Glabbeke M, Machin

- D. Randomised trial of two regimens of chemotherapy in operable osteosarcoma: a study of the European Osteosarcoma Intergroup. *Lancet*. 1997 Sep 27;350(9082):911-7
75. Strebhardt K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Aug;9(8):643-60. doi: 10.1038/nrd3184.
76. Takimoto CH. "New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications". *The Oncologist*. 1: 68 – 81, 1996.
77. Valsasina B, Beria I, Alli C, Alzani R, Avanzi N, Ballinari D, Cappella P, Caruso M, Casolaro A, Ciavolella A, Cucchi U, De Ponti A, Felder E, Fiorentini F, Galvani A, Gianellini LM, Giorgini ML, Isacchi A, Lansen J, Pesenti E, Rizzi S, Rocchetti M, Sola F, Moll J. NMS-P937, an orally available, specific small-molecule polo-like kinase 1 inhibitor with antitumor activity in solid and hematologic malignancies. *Mol Cancer Ther*. 2012 Apr;11(4):1006-16. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0765. Epub 2012 Feb 7.
78. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):131-49.
79. Wafa H, Grimer RJ. Surgical options and outcomes in bone sarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006 Feb;6(2):239-48.
80. Warner SL, Stephens BJ, Von Hoff DD. Tubulin-associated proteins: Aurora and Polo-like kinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Oncol Rep*. 2008 Mar;10(2):122-9.
81. Warner SL, Stephens BJ, Von Hoff DD. Tubulin-associated proteins: Aurora and Polo-like kinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Oncol Rep*. 2008 Mar;10(2):122-9.
82. Zunino F, Capranico G. DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des* 1990. 5:307-17.

Siti internet

(http://kinase.com/wiki/index.php/Kinase_classification)

(<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=seliciclib>)

(<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01014429?term=NMS&rank=4>)