

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA TERAPEUTICA DI APPROCCI ANTI ROCK2 (SILENZIAMENTO E INIBITORI FARMACOLOGICI) NELL'OSTEOSARCOMA

Relazione attività dott.ssa Pinca Rosa Simona (periodo di riferimento 02/05/2016 –
07/04/2017)

Referente dei fondi / progetto: dott.ssa Katia Scotlandi

L'osteosarcoma è un tumore primitivo dell'osso caratterizzato da una spiccata tendenza a formare metastasi, soprattutto a livello polmonare. Questa neoplasia colpisce principalmente adolescenti e giovani adulti, da qui la necessità di identificare delle strade terapeutiche alternative alla chemioterapia convenzionale.

Studi pregressi compiuti principalmente dal Laboratorio di Oncologia Sperimentale (gruppo di ricerca guidato dalla Dott.ssa K. Scotlandi) hanno identificato nella molecola CD99 e nel suo mediatore ROCK2 elementi importanti della progressione tumorale e del processo metastatico nell'osteosarcoma (Zucchini C. et al, Oncogene 2014).

È stato infatti dimostrato che la glicoproteina di membrana CD99wt ha un effetto oncosoppressivo nelle cellule di osteosarcoma umano (Manara et al., 2006; Scotlandi et al., 2007): in tale contesto cellulare, essa esplica la sua azione reprimendo la chinasi ROCK2 e andando quindi a modulare da un lato la motilità cellulare e dall'altro le proprietà adesive delle cellule di OS, due aspetti cruciali nel processo di diffusione metastatica (Zucchini et al., 2014).

Al fine di valutare le potenzialità terapeutiche derivanti dall'inibizione di questo mediatore sia *in vitro* che *in vivo*, è stato messo a punto un modello sperimentale con silenziamento stabile della chinasi ROCK2 a partire dalla linea di osteosarcoma U-2OS. I trasfettanti ottenuti sono stati impiegati in un esperimento *in vivo* in topi NSG. Al pari del trasfettante U-2/CD99 wt, le cellule in cui è silenziata l'espressione di ROCK2 se pure in grado di formare una massa tumorale (il cui volume resta comunque significativamente inferiore rispetto al volume tumorale dei controlli) non sono in grado di formare metastasi.

Abbiamo deciso di creare un secondo modello di OS umano stabilmente silenziato per ROCK2. Dopo aver caratterizzato una serie di linee di osteosarcoma umano (sia linee

primarie che linee derivanti da PDX) in termini di espressione di ROCK2 e capacità di crescita in assenza di ancoraggio (soft agar assay), abbiamo scelto la linea SaOS-2.

I plasmidi pSilencer_shROCK2_06.1 e pSilencer_SCR sono stati amplificati (mediante amplificazione di colture batteriche trasformate) e impiegati per la trasfezione. Le cellule sono state quindi poste in mezzo di selezione contenente. Abbiamo ottenuto i seguenti pool di trasfettanti:

SaOS-2/SCR pool 20 µg (I trasfez)

SaOS-2/SCR pool 10 µg (II trasfez)

SaOS-2/shROCK2 pool 20 µg (I trasfez)

SaOS-2/shROCK2 pool 10 µg (II trasfez)

SaOS-2/shROCK2 pool 20 µg (II trasfez)

A partire dalle SaOS-2/shROCK2 pool 20 µg (II trasfez) è stata seminata una limiting dilution al fine di poter isolare singoli cloni. Dal processo di screening mediante western blotting dei cloni ottenuti (48 cloni) sono stati isolati 6 + 2 cloni in cui l'espressione di ROCK2 è ben silenziata:

Sa/shROCK2 # 14, Sa/shROCK2 # 17, Sa/shROCK2 # 49, Sa/shROCK2 # 55, Sa/shROCK2 #65, Sa/shROCK2 # 73; Sa/shROCK2 # 5 e Sa/shROCK2 #68.

Il silenziamento è stato confermato mediante un secondo e un terzo esperimento di WB (esperimenti indipendenti) ed è attualmente in corso la caratterizzazione in termini di capacità migratoria e crescita in assenza di ancoraggio e di signaling intracellulare.

Si è voluto quindi, parallelamente, approfondire la funzione di CD99 e di ROCK2 nelle cellule di OS umano rispetto alla determinazione della sensibilità ai chemioterapici: si è deciso perciò di valutare la sensibilità ai chemioterapici "classici" dei trasfettanti over-esprimenti CD99 e dei trasfettanti silenziati per ROCK2. La sensibilità a doxorubicina, cisplatino e ifosfamide è stata saggiata tramite MTT assay, mentre per il metotrexate la valutazione è stata effettuata mediante conta vitale con Trypan blue. I risultati ottenuti suggeriscono che CD99 wt sia in grado di influenzare solo la sensibilità all'ifosfamide; risultati simili sono stati ottenuti con i cloni silenziati per l'espressione della chinasi ROCK2

Nelle cellule di OS il signaling innescato da CD99wt, e mediato da ROCK2, coinvolge quindi i processi di rimodellamento del citoscheletro di actina e potrebbe quindi essere legato alla cosiddetta "meccanotrasduzione". La via di Hippo, evolutivamente conservata, con ruolo nello sviluppo, risponde a numerosi stimoli diversi sia di natura biochimica che di natura biomeccanica, come ad esempio le interazioni cellula-cellula e cellula-ECM. L'effettore della Hippo pathway è YAP, un cofattore trascrizionale represso quando la via è attiva (una serie di fosforilazioni culmina nella fosforilazione in serina di YAP, il quale viene degradato). Quando la Hippo pathway è invece inattiva, YAP trasloca nel nucleo dove funge da cofattore per promuovere o reprimere la trascrizione di geni target coinvolti in numerosi processi (proliferazione, sopravvivenza, tumorigenesi, farmacoresistenza).

Si è quindi deciso di valutare l'eventuale coinvolgimento di questa via di segnalazione nel processo di segnalazione mediato da CD99 e da ROCK2.

In prima battuta è stata valutata l'espressione di YAP a livello proteico nei modelli di U-2 OS overesprimenti CD99wt o silenziati per ROCK2: l'analisi in western blot (3 esperimenti indipendenti) mostra che CD99 wt sopprime completamente l'espressione di YAP, mentre il silenziamento di ROCK2 da solo non è in grado di indurre effetti così significativi. I risultati di questo esperimento pongono dunque YAP a valle di CD99, ma a monte di ROCK2. Sono attualmente in corso gli esperimenti per confermare questo dato nel secondo modello cellulare a nostra disposizione (SaOS-2 con i suoi trasfettanti CD99 wt e shROCK2). Essendo YAP un cofattore trascrizionale, la sua localizzazione intracellulare fornisce indicazioni sullo stato di attivazione della molecola. Abbiamo quindi provato ad analizzare YAP mediante immunofluorescenza su cellule in aderenza, ma a causa di problemi con l'anticorpo primario l'esperimento pilota non è valutabile.

Abbiamo quindi saggiato l'espressione di YAP nei tumori primitivi derivanti dall'inoculo dei trasfettanti U-2/shROCK2 e U-2/CD99 wt: essa rispecchia l'andamento che la proteina ha nelle linee in coltura in monostrato, con una buona espressione nei tumori del gruppo U-2 OS che viene persa nel gruppo U-2/CD99 wt e recuperata nel gruppo U-2/shROCK2.

L'espressione di YAP è stata infine valutata mediante immunocitochimica su fette derivanti da colture in 3 dimensioni di U-2 OS incluse in paraffina. Nell'esperimento pilota sulla sola linea parentale è stata osservata la presenza di YAP anche a livello nucleare,

oltre che citosolico. Sono quindi state allestite colture in tre dimensioni per i cloni della linea U-2 OS trasfettati con CD99 wt o con shROCK2 al fine di poter valutare (oltre ai parametri di crescita) l'espressione e soprattutto la localizzazione di YAP in condizioni che rispecchino maggiormente quanto accade *in vivo*. L'analisi verrà quindi estesa al pannello SaOS-2.

L'espressione di CD99, ROCK2 e YAP è stata infine valutata mediante immunisto chimica su una casistica di 280 pazienti spottata su diversi TMA (Tissue Micro Array). Sono in corso le analisi.

Approvata da: dott.ssa Katia Scotlandi

Bologna 11/04/2017


