

Dipartimento di Scienze, Università degli Studi Roma Tre
Corso di Laurea Magistrale in Biologia per la Ricerca Molecolare,
Cellulare e Fisiopatologica

Tesi di Laurea Magistrale

RELATORE

Prof.ssa Alessandra di Masi

CANDIDATA

Maria Franza

Matricola 554301

**L'inibitore della chinasi CHK1, MK-8776, induce la degradazione
dell'oncoproteina PML-RAR α in cellule di leucemia promielocitica acuta**

Abstract

La leucemia promielocitica acuta (*Acute Promyelocytic Leukemia*, APL) rappresenta un sottotipo altamente aggressivo di leucemia mieloide acuta caratterizzato dalla traslocazione cromosomica t(15;17)(q22;q12), a sua volta responsabile dell'espressione della proteina oncogenica PML-RAR α . Attualmente, il trattamento della APL prevede la somministrazione cronica di acido retinoico (ATRA) e di triossido di arsenico (ATO), entrambi in grado di indurre la degradazione della proteina PML-RAR α , il differenziamento delle cellule APL e dunque la remissione della malattia nell'85% dei casi. Tuttavia, il restante 15% dei pazienti APL è resistente alla terapia con ATRA. Per questi pazienti, al momento, l'unica alternativa terapeutica è il trapianto di cellule staminali. Per questo motivo, è necessario lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per l'APL.

Le mutazioni a carico di proteine coinvolte nella risposta al danno al DNA sembrano contribuire al fenotipo delle cellule APL. L'iperattivazione dei pathway di risposta al danno al DNA, ed in particolare di specifiche chinasi del danno (e.g., ATM, ATR e CHK1) consente alle cellule APL di riparare, seppur in modo non accurato, il danno al DNA e conseguentemente di sopravvivere e proliferare superando meccanismi di controllo molecolare che normalmente determinerebbero l'eliminazione selettiva di cellule con un elevato tasso di danno. Ciò ha portato a considerare le chinasi coinvolte nella risposta al danno al DNA come possibili target anti-tumorali. Tra questi, l'inibitore della chinasi CHK1, MK-8776, sta emergendo come una molecola altamente specifica ed efficace contro diversi tumori solidi, sia in singolo che in combinato con agenti chemioterapici.

Il presente lavoro di tesi ha come obiettivo quello di caratterizzare in diverse linee cellulari APL sensibili (NB4) e resistenti (NB4-MR4 e NB4-LR2) all'ATRA i meccanismi molecolari che sottendono la capacità dell'inibitore MK-8776 di modulare specifici pathway dei blasti leucemici, inducendone l'eliminazione selettiva mediante differenziamento e/o morte cellulare programmata. Saggi di immunoblot e immunofluorescenza hanno dimostrato che l'inibitore di CHK1, MK-8776, induce la degradazione della proteina di fusione PML-RAR α mediante un meccanismo dipendente sia dal proteasoma sia dal taglio proteolitico ad opera della caspasi 3. Tuttavia, l'attivazione della caspasi-3 non correla con l'induzione di apoptosi. Il coinvolgimento della caspasi-3 nella degradazione dell'oncoproteina è stato confermato mediante l'inibitore specifico Z-DEVD-FMK in combinato con MK-8776. L'insieme dei dati ottenuti suggerisce che CHK1 sia in grado di regolare la stabilità della proteina di fusione PML-RAR α mediante un meccanismo molecolare simile a quello indotto da ATRA in cellule APL responsive. Questo risultato è di particolare importanza per valutare il possibile utilizzo di inibitori di CHK1 per il trattamento delle forme APL resistenti al trattamento tradizionale con ATRA/ATO. Inoltre, la validazione dei dati trascrizionali suggerisce che la cascata di eventi a valle dell'inibizione di CHK1 in cellule ATRA-resistenti sia simile a quella indotta dal trattamento con ATRA in cellule APL ATRA-responsive. Questo dato supporta ulteriormente una possibile ridondanza dei meccanismi di azione associati ai due tipi di trattamento (inibizione di CHK1 *vs* ATRA) che certamente merita approfondimenti mediante futuri studi in vivo. La recente generazione da parte del nostro gruppo di ricerca di un modello zebrafish APL consentirà di valutare questa ipotesi e di chiarire l'efficacia di MK-8776 da solo o in combinazione con ATRA o ATO per il trattamento delle forme resistenti di APL.

