

Titolo Ricerca: Identificazione, caratterizzazione e valutazione di nuove molecole ad attività anti-proliferativa per osteosarcoma umano.

Soggetto proponente: Prof. Bruno Frediani

Descrizione Ricerca: Obiettivi / Finalità

L'Osteosarcoma (OS) è una forma tumorale altamente maligna dell'osso derivante dalla trasformazione di cellule mesenchimali che producono tessuto osteoide e matrice ossea. Colpisce maggiormente bambini e ragazzi tra i 10 e i 20 anni di età e rappresenta la forma di tumore maligno primitivo più frequente del sistema scheletrico, caratterizzato da un corso clinico altamente aggressivo, con conseguente rapido sviluppo di metastasi. Le cause dell'insorgenza di osteosarcoma sono ancora sconosciute anche se la correlazione tra l'età e lo sviluppo tumorale, per molti pazienti in coincidenza con il periodo di maggior crescita ossea, rendono una maggiore attività osteoblastica e osteogenica un fattore predisponente allo sviluppo della neoplasia. L'uso combinato della chemioterapia e della chirurgia sono al momento i sistemi più efficaci di terapia per le forme maggiormente maligne. La ricerca clinica e di nuovi approcci farmacologici per il trattamento dell'osteosarcoma si è mossa in diverse direzioni: ricerca di nuovi farmaci, trattamenti maggiormente intensivi, immunoterapia e terapia genica. Nonostante la prognosi dell'OS sia significativamente migliorata attraverso l'adozione di una terapia combinata, la mortalità della malattia rimane ancora molto elevata. La famiglia Src delle tirosin-chinasi è un importante mediatore della crescita cellulare e della mitogenesi ed è così attualmente considerata un target per farmaci sperimentali anti-mitotici. Gli inibitori selettivi della funzione di c-Src rappresentano un importante campo di ricerca per il trattamento dei tumori, in quanto l'inibizione della fosforilazione di Src può fermare la crescita incontrollata tumorale. Durante lo scorso decennio, sono stati descritti molti inibitori della tirosina-chinasi, alcuni di essi appartenenti alla classe delle pirazolo[3,4-d]pirimidine. Una serie di nuovi derivati delle pirazolo[3,4-d]pirimidine è stata recentemente sintetizzata dal nostro gruppo di lavoro e ne è stata confermata l'attività anti-proliferativa in diversi tipi di cellule tumorali. Benché la Src chinasi sia coinvolta in molti processi cellulari fondamentali, inclusa la proliferazione, la migrazione e la sopravvivenza, ad oggi non sono state riportate osservazioni sulla eventuale sovra-espressione di Src o di mutazioni geniche associate a Src nelle cellule di osteosarcoma. Ad ogni modo, il coinvolgimento di Src sembra essere cruciale nel processo di differenziamento di osteoblasti murini. Un'elevata attività della famiglia delle Src chinasi è stata inoltre dimostrata in sottolinee cellulari di osteosarcoma umano. Alcuni autori hanno osservato che la regolazione dell'attività della Src chinasi sembra essere coinvolta nello sviluppo del fenotipo maligno dell'osteosarcoma. Recentemente, il gruppo di ricerca proponente ha sintetizzato nuovi derivati di pirazolo[3,4-d]primidine pirazolo[3,4-d]primidine che dimostrano una notevole attività anti-proliferativa e pro-apoptotica per cellule di osteosarcoma umano presentando, a differenza di PP2, un inibitore di Src considerato come riferimento, una bassa tossicità per cellule non neoplastiche. Uno di questi composti ha inoltre ridotto *in vivo* la massa tumorale di un osteosarcoma procurato in un modello animale murino.

Lo scopo del presente studio sarà migliorare la solubilità e l'attività di questi potenziali farmaci, validando su un numero significativo di campioni la capacità di queste nuove molecole nell'inibire la proliferazione cellulare e promuovere l'apoptosi di cellule da osteosarcoma umano. Inizialmente verranno utilizzate linee cellulari di osteosarcoma SaOS-2, HOS, MG-63, OST, SJSA-1, U2OS, ZK-58. Le molecole maggiormente attive saranno saggiate per la validazione su colture primarie di cellule di osteosarcoma ottenute da pazienti. L'attività sperimentale proposta riguarderà la valutazione dell'effetto degli inibitori di SRC oggetto dello studio sulla proliferazione cellulare, l'effetto pro-apoptotico, la sintesi di DNA, l'arresto del ciclo cellulare e la fosforilazione proteica. Il saggio comparato dell'effetto antiproliferativo di tali composti tra cellule di osteosarcoma e osteoblasti umani normali sarà un valore aggiunto del nostro progetto di ricerca. I meccanismi tramite i quali determinate molecole agiscono a livello molecolare saranno analizzati successivamente tramite saggi biochimici post-genomici.

Indicazione del Responsabile Ricerca

Il Responsabile del Progetto (programma o fase di esso) garantisce il rispetto delle modalità di espletamento della collaborazione oggetto del contratto stesso, al solo fine di valutare la rispondenza del risultato con quanto richiesto e la sua funzionalità rispetto agli obiettivi prefissati.

Eventuale descrizione COMPLESSIVA Ricerca Obiettivo / Finalità

COMPILARE SOLO SE LA RICERCA E' UN SOTTOPRODOTTO DI UNA RICERCA PIU' AMPIA CIOE' SE E' CONSIDERATA UNA PARTE DI UN PROGETTO GENERALE CHE VA DESCRITTO IN QUESTO SPAZIO

Dovranno essere indicate le fasi/sottofasi e i tempi di realizzazione del progetto (arco di tempo complessivo). Si richiede di prevedere i tempi di realizzazione anche per le fasi del progetto che si estendono oltre l'anno, anche se in modo meno puntuale. Nell'ultima colonna devono essere indicati i risultati che si intende raggiungere per ciascuna fase. Il numero delle fasi deve essere proporzionato alla durata del contratto di collaborazione.

	Descrizione fasi e sottofasi Ricerca	Tempi di realizzazione (n. mesi)	Obiettivi delle singole fasi
1	Dopo opportuna sintesi di derivati pirrolo-pirimidinici, la prima fase della ricerca riguarderà la messa a punto di colture di linee cellulari di osteosarcoma SaOS-2, MNNG, U2-OS, TE-85, MG-63. Parallelamente saranno estratti osteoblasti umani normali da frammenti di trabecola ossea derivata da teste di femore di pazienti che hanno subito interventi di artro-protesi. Le cellule ottenute saranno coltivate su piastre Petri secondo tecniche consolidate. Per quanto riguarda le colture di osteosarcoma umano, le cellule tumorali saranno ottenute da biopsie di pazienti fornite dall'unità di ricerca di Ortopedia Oncologica e Ricostruttiva di Firenze.	3	Allestimento di colture cellulari di osteoblasti normali e di cellule OS ottenute da banca e da biopsie patologiche
2	Le cellule in coltura, raggiunto lo stadio di confluenza, saranno trattate con i nostri composti di sintesi opportunamente diluiti a varie concentrazioni nel medium di coltura prima dell'uso. Come composto di riferimento sarà utilizzata la PP2 di note proprietà anti-proliferative e pro-apoptotiche. Le prime prove che verranno effettuate saranno svolte per misurare la proliferazione e la vitalità cellulare attraverso l'MTT test e il metodo per l'incorporazione di 5-bromo-2'-deossipuridina (BrdU) durante la sintesi di DNA. La degradazione delle catene di DNA nelle cellule	2	Dose finding per l'efficacia dei composti sulle attività anti proliferativa e pro-apoptica

	apoptotiche sarà evidenziata successivamente con il saggio del TUNEL caratteristico per la conta dei nuclei apoptotici. La colorazione di Hoechst permetterà invece di valutare la morfologia delle cellule sane o in fase necrotica e apoptotica.		
3	I composti selezionati saranno testati in una terza fase del progetto, per verificare l'assenza di un effetto compromettente la funzionalità degli osteoblasti umani alle dosi considerate avere effetto terapeutico. Verrà così determinata la formazione di noduli e il loro grado di mineralizzazione utilizzando la colorazione con rosso di alizarina e sarà effettuato parallelamente il test di attività della fosfatasi alcalina (ALKP assay).	3	Valutazione della tossicità delle dosi terapeutiche su osteoblasti normali
4	L'ultima fase del progetto riguarderà la messa a punto di saggi biochimici post-genomici. Dopo incubazione delle colture cellulari con i composti da testare per periodi determinati, le cellule verranno lisate e il prodotto ottenuto verrà sottoposto ad elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE) al fine di analizzare il proteoma cellulare. Gli spot proteici ottenuti verranno sottoposti ad opportuna colorazione e a successiva densitometria e spettrometria di massa per essere valutati dal punto di vista qualitativo e quantitativo. I pattern proteici saranno in alternativa trasferiti su membrane di nitrocellulosa e soggetti ad immunoblotting con anticorpi fosfo-specifici per Src e altre chinasi. Sarà così possibile comprendere tramite saggi di fosfo-proteomica l'azione dei composti studiati sui meccanismi di trasduzione del segnale.	4	Valutazione biochimica e proteomica dei meccanismi d'azione dei composti testati

Durata Ricerca [giorni/mesi]: 0/12

Il Proponente

Il Responsabile Ricerca per accettazione della responsabilità