Riassunto attività di ricerca svolta durante la tesi

Laureando: Costanza Salvatori, n.326071
Titolo tesi: La Modulazione di SERCA-Ca2+ Compromette la Resistenza ai Glucocorticoidi nella Leucemia Linfoblastica Acuta a cellule T *NOTCH1*-Mutata
Relatore: Giovanni Roti
Laboratorio di Ematologia Traslazionale e Chemogenomica presso Ospedale Maggiore di Parma

Durante il mio percorso di tirocinio svolto nel laboratorio di Ematologia Traslazionale e Chemogenomica, presso l'Ospedale Maggiore di Parma, ho avuto la possibilità di lavorare ad un progetto il cui scopo era anticipare i meccanismi molecolari di resistenza agli inibitori di SERCA nella leucemia linfoblastica acuta T *NOTCH1*-mutata. Le mutazioni Gain-of-function NOTCH1 sono l'anomalia genetica più comune nella leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL), rappresentando il 55-60% dei casi. Nonostante l'esistenza di varie strategie anti-NOTCH, ci siamo soffermati su un lavoro passato del prof. Roti dove hanno identificato SERCA (Sarco-Endoplasmic Ca2+ ATPase) come gatekeeper della signaling oncogenico di Notch. I SERCA inibitori come la tapsigargina mostrano un indice terapeutico favorevole mirando specificamente alle proteine NOTCH1 mutate. È quindi importante stabilire quali meccanismi molecolari portano alla resistenza, al fine di sviluppare strategie terapeutiche efficaci per superare o prevenire la resistenza ai farmaci. Per esplorare tale condizione, abbiamo creato cloni resistenti alla tapsigargina da una linea cellulare parentale di T-ALL (ALL/SIL) mediante un aumento graduale della dose di trattamento con tapsigargina. Abbiamo condotto uno screening chemotrascrittomico sui due modelli, valutando l'espressione di geni differenzialmente espressi (DE) nella linea cellulare resistente rispetto alla parentale mediante sequenziamento dell'RNA, e identificato pathway iperespressi nella linea cellulare resistente alla tapsigargina. In parallelo, abbiamo esaminato una library di small molecule di circa 2500 composti bioattivi (provenienti dalla European Chemical Biology Library fornita da EU-OPENSCREEN) nelle ALL/SIL e ALL/SIL R. I risultati ottenuti in termini di efficacia dei composti sono stati identificati per la loro capacità di inibire ciascuna linea cellulare o entrambe. Le cellule ALL/SIL R presentavano una mutazione (c.G770T p.Gly257Val) nel gene *ATP2A2* che codifica per SERCA2. Questa variazione impedisce l'efficiente legame della tapsigargina al dominio catalitico, con conseguente diminuzione dell'effetto inibitorio nella linea resistente che però rimane parzialmente sensibile al CAD204520, un inibitore che lega SERCA in una tasca diversa da quella occupata dalla tapsigargina. Nelle cellule resistenti all'inibitore di SERCA, l'analisi trascrizionale di 6241 geni DE ha rivelato un arricchimento nelle vie di sintesi e risposta degli steroidi. Coerentemente, tra le small molecule che hanno come bersaglio la sottofamiglia 3 dei recettori degli ormoni steroidei, i glucocorticoidi (GC) hanno mostrato una migliore efficacia specificamente nelle ALL/SIL R. Mentre le cellule naïve erano resistenti ai glucocorticoidi, le cellule di ALL/SIL R hanno mostrato una maggiore sensibilità ai glucocorticoidi, tra cui desametasone, clobetasolo e fluticasone. Questo effetto è, almeno in parte, mediato dal recettore dei glucocorticoidi (GR) dal momento che le cellule resistenti hanno mostrato da un lato un'aumentata espressione del GR, come dimostrato dal western blotting e dall'analisi di RT-PCR, e dall'altro un'inversione dell'effetto sulla vitalità dopo co-trattamento tra glucocorticoidi e un bloccante specifico del loro recettore, l'RU486. Inoltre, l'associazione tra SERCA inibitori e glucocorticoidi ha mostrato un effetto sinergico maggiore nelle linee cellulari resistenti. Infine, con lo scopo di traslare in un setting clinico tali acquisizioni, abbiamo identificato nel sottogruppo genetico TAL1 di T-ALL un profilo di espressione genica maggiormente simile alle ALL/SIL R, identificando pertanto un gruppo di pazienti che potrebbe beneficiare del trattamento con i glucocorticoidi e della combinazione con gli inibitori di SERCA. Questi risultati suggeriscono che la modulazione di SERCA media il signaling dei glucocorticoidi e che SERCA inibitori innovativi possono modulare farmacologicamente la resistenza ai glucocorticoidi nelle T-ALL.