

## ABSTRACT

Il glioblastoma multiforme (GBM) è tra i tumori cerebrali più aggressivi, generalmente compare in età adulta ed è caratterizzato da eterogeneità cellulare e diverse alterazioni genetiche (Louis DN, 2016). La terapia standard consiste in una combinazione di chirurgia, radioterapia e chemioterapia. Nonostante l'aggressività dei trattamenti, non esiste ancora una cura definitiva e il tasso medio di sopravvivenza è di soli 14,6 mesi (Wilson TA, 2014).

Il farmaco di elezione nel trattamento del glioblastoma è la temozolomide (TMZ). La TMZ è un agente alchilante e viene utilizzato da solo o in combinazione con la radioterapia (Zhang J, 2012) ma, a causa dell'insorgenza di resistenza terapeutica, è un farmaco in grado soltanto di prolungare l'aspettativa di vita. Uno dei fattori responsabili dell'insorgenza di chemio-resistenza è l'aumento dell'attività dell'enzima O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT), deputato alla riparazione dei danni al DNA provocati da TMZ (Fan CH, 2013).

L'insorgenza e lo sviluppo del glioblastoma sono legati a diverse alterazioni molecolari dovute a meccanismi genetici ed epigenetici; pertanto le modificazioni nel processo apoptotico potrebbero non solo contribuire allo sviluppo del tumore, ma anche allo sviluppo di resistenza verso la classica terapia genotossica (Adamson C, 2009).

I microRNAs, piccole molecole di RNA non codificante, giocano un ruolo chiave nella sopravvivenza cellulare, proliferazione, angiogenesi, metastasi e nello sviluppo di un fenotipo maligno nelle cellule di glioma. La tumorigenesi è pertanto il risultato del disequilibrio tra microRNA oncogeni (oncomiRNA) e miRNA soppressori tumorali, entrambi capaci di regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale attraverso la repressione della traduzione o la degradazione del mRNA bersaglio. Per esempio, gli oncogeni miR-155 e miR-221, sono molto espressi nel glioblastoma e riducono l'espressione di molti geni associati alla proliferazione delle cellule cancerose, all'apoptosi, all'invasività e alla chemioresistenza (Liu Q, 2015; Xie Q, 2014; Zhang CZ, 2010; Shea A, 2016). La comprensione della patogenesi del glioma permetterebbe quindi di identificare nuovi bersagli terapeutici e di sviluppare nuovi approcci volti anche al potenziamento delle attuali terapie e/o a limitare la crescita del tumore, così come a ridurre la resistenza.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare nuovi possibili approcci terapeutici in grado di inibire la crescita delle cellule tumorali, indurre la morte cellulare per apoptosi e sensibilizzare le cellule di glioblastoma al trattamento con temozolomide e/o potenziarne

l'attività. Per questo studio sono state utilizzate le cellule umane di glioblastoma U251 e T98G, queste ultime resistenti alla TMZ; in seguito a trattamento combinato con (i) temozolomide e corilagina, un'interessante tannino estratto da piante della famiglia delle *Phyllanthaceae*, e (ii) con temozolomide e PNA anti-miR-155 e anti-miR-221, sono stati studiati gli effetti su alcuni meccanismi molecolari, tra i quali apoptosi, proliferazione e migrazione cellulare.

La corilagina (COR) presenta proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e antitumorali ed è stato dimostrato che è capace di interferire con l'anti-apoptotico NF-kB (Gambari R, 2012; Dong XR, 2010) e di indurre apoptosi in cellule tumorali (Jia L, 2013, Ming Y, 2013; Gu Y, 2016). Pertanto la corilagina potrebbe essere una molecola potenzialmente attiva nel trattamento del glioblastoma. Inizialmente, mediante studi di docking, è stato dimostrato che la corilagina è in grado di ridurre i livelli di NF-kB inibendo la sua interazione con il DNA. Dopo trattamento con COR, la proliferazione delle cellule U251 e T98G è risultata ridotta e soprattutto si è visto un aumento dello stato di apoptosi. Molto interessante è l'effetto sulle cellule resistenti alla TMZ, T98G, che quando trattate con entrambi COR e TMZ mostrano un livello di apoptosi maggiore rispetto al trattamento singolo con corilagina o temozolomide. Questo è probabilmente legato al fatto che la corilagina, ma soprattutto la corilagina combinata alla TMZ, sembrano ridurre l'espressione di MGMT e indurre l'attivazione della caspasi-3 (CASP-3); inoltre la corilagina si è dimostrata attiva anche nell'inibizione della migrazione cellulare, in particolare nel trattamento combinato.

Per quanto riguarda i microRNA e il loro utilizzo come bersagli terapeutici, in questa tesi sono stati presi in considerazione i PNA anti-miR-155 e anti-miR-221. Questi microRNA sono stati selezionati da una lunga lista di microRNA alterati nel glioblastoma e che sembrano avere come target l'RNA messaggero della caspasi-3, un importante fattore coinvolto nel processo apoptotico.

I risultati ottenuti dalle analisi Bio-Plex e dal saggio delle caspasi 3/7, dopo trattamento delle linee cellulari di glioma con i PNA R8-PNA-a155 e R8-PNA-a221, hanno confermato l'ipotesi che la CASP-3 è un gene target del miR-155 e del miR-221. Molto recentemente, nel nostro gruppo di ricerca, è stato dimostrato che R8-PNA-a221 ha effetti pro-apoptotici in cellule di glioma (Brognara E, 2016); così, abbiamo investigato anche gli effetti del R8-PNA-a155 sia nelle cellule U251 che T98G. I dati ottenuti hanno dimostrato che entrambi i PNA sono selettivi nel colpire il relativo microRNA e sono capaci di indurre apoptosi in entrambi i modelli cellulari di glioma studiati.

Dal momento che gli oncomiRNA promuovono la crescita e la sopravvivenza cellulare, abbiamo indagato se, nelle cellule T98G resistenti alla TMZ, combinando il trattamento

con TMZ e PNA si riuscivano ad ottenere risultati migliori rispetto ai singoli trattamenti. Il co-trattamento con R8-PNA-a221 o R8-PNA-a155 ha indotto apoptosi nelle cellule T98G a livelli più elevati rispetto ai livelli ottenuti con la somministrazione del solo PNA; un effetto simile è stato osservato anche per quanto riguarda l'apoptosi legata all'attivazione della caspasi-3.

In conclusione, i risultati riportati in questa tesi di dottorato dimostrano che l'induzione di apoptosi, potrebbe essere un modo efficiente per modulare la progressione del cancro e la resistenza al farmaco. Con questa ricerca, quindi, abbiamo dimostrato che l'utilizzo di composti naturali o sintetici, come la corilagina o i PNA rispettivamente, potrebbe essere un'efficace strategia per potenziare l'attività della temozolomide e per rendere le cellule di glioma resistenti più sensibili all'effetto apoptotico da essa indotto.