

La telomerasi come target per l'inibizione nella cura del cancro

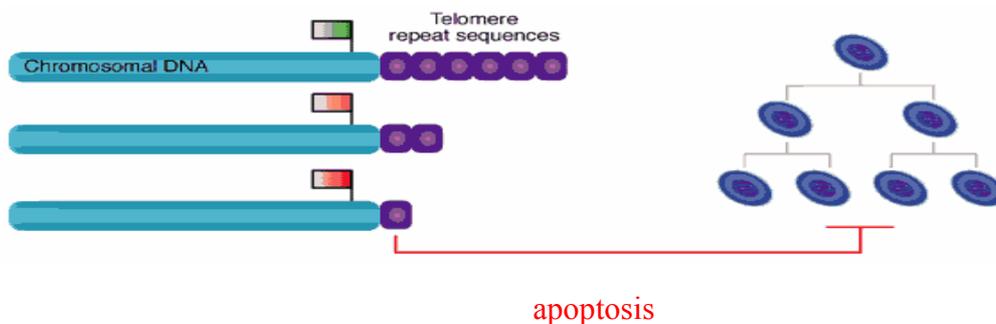
INTRODUZIONE

Esistono alcuni fattori che rendono la telomerasi un target attraente e selettivo per la cura del cancro.

In primo luogo l'attivazione della telomerasi si riscontra nell'85% dei tumori umani, mentre solo nella maggior parte dei rimanenti tumori (telomerasi-negativi) abbiamo meccanismi di mantenimento dei telomeri alternativi che vanno sotto il nome di ALT (Alternative Lengthening of Telomeres). Al contrario l'attività telomerasica è pressochè assente o appena riscontrabile nella maggior parte delle cellule somatiche umane non trasformate.

E' infine noto che l'acquisizione di attività telomerasica costituisce una tappa fondamentale nel processo di tumorigenesi, essendo un meccanismo utilizzato dalle cellule cancerogene per superare la crisi e divenire immortali.

Si pensava perciò che inibendo nelle cellule tumorali l'attività telomerasica si sarebbe ottenuto ad ogni ciclo di divisione cellulare il progressivo accorciamento dei telomeri fino a scatenare al di sotto di una certa lunghezza critica il processo di apoptosi. L'inibizione della telomerasi e la conseguente morte cellulare avrebbe inoltre colpito selettivamente le cellule tumorali, dove l'enzima telomerasi è espresso a più alti livelli.

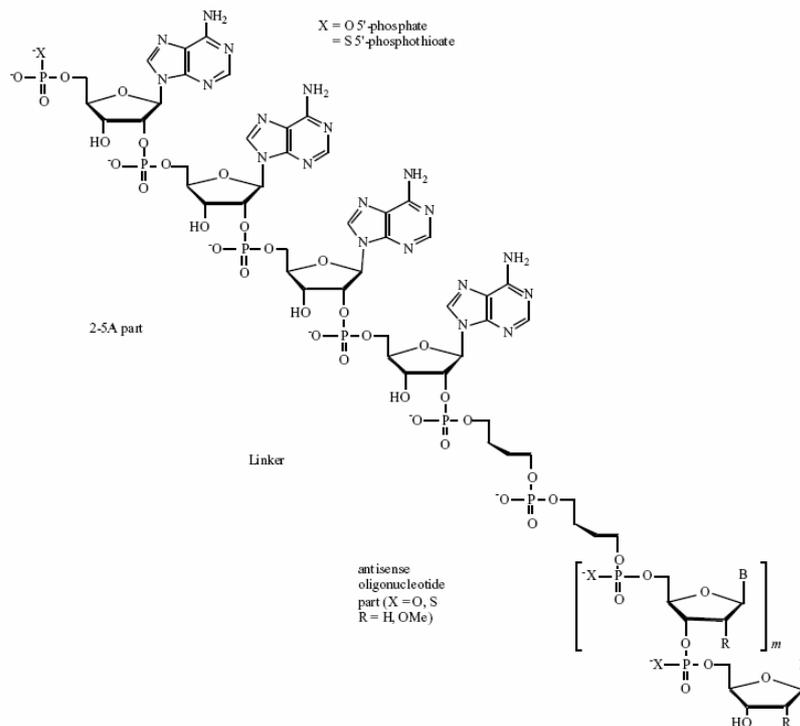


Sono state così concepite varie strategie di inibizione della telomerasi, che possiamo raggruppare in tre grandi categorie.

- 1) Strategie che vanno a colpire la subunità a RNA (hTR) della telomerasi
- 2) Strategie che vanno a colpire la subunità catalitica proteica (hTERT) della telomerasi
- 3) Strategie che vanno a colpire il substrato della telomerasi, ovvero i telomeri. In questo caso si mira a inibire la funzione protettiva delle estremità dei cromosomi svolta dai telomeri oppure a stabilizzare i telomeri per impedirne l'allungamento da parte della telomerasi.

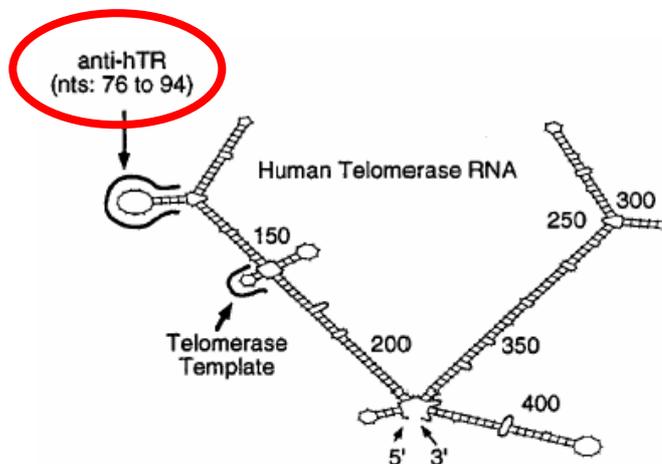
2-5A ANTISENSO

La strategia che per ora sembra aver dato i risultati più sorprendenti è compresa nella prima categoria e fa uso di una molecola chiamata oligonucleotide antisense 2'-5' tetraadenilato (2-5A antisense). Si tratta di un oligonucleotide chimérico che induce la degradazione selettiva di hTR. Esso è costituito da due componenti, una unità di tetraadenilato 2'-5'-linked (2-5A) ed un oligonucleotide antisense a DNA diretto contro una porzione di hTR; le estremità sono inoltre modificate per proteggere la molecola dall'azione di fosfatasi ed esonucleasi.



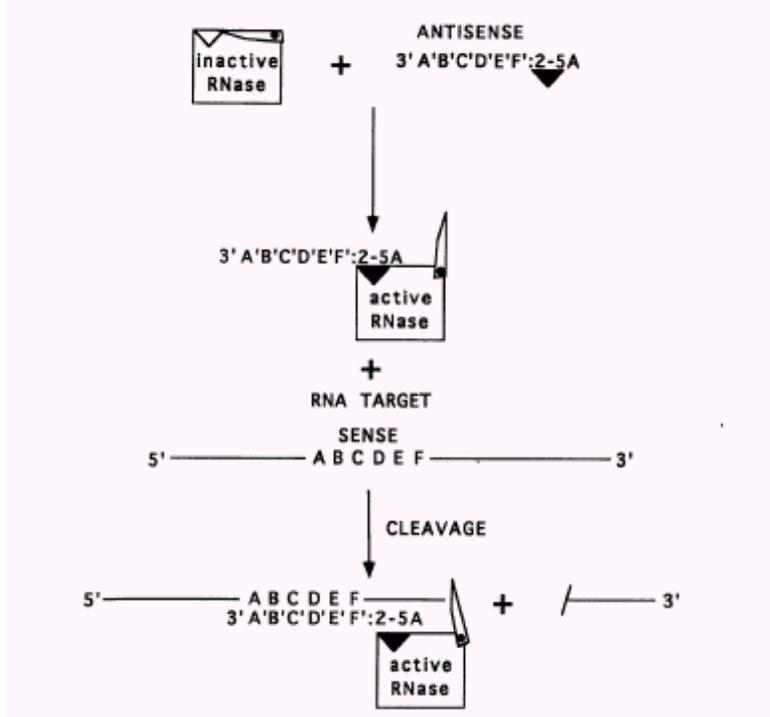
L'unità 2-5A è un potente reclutatore e attivatore della RNAsi L, una endoribonucleasi specifica per RNA a singolo filamento, espressa in tutte le cellule comprese quelle cancerose. La RNAsi L viene attivata solo in seguito al contatto con l'unità 2-5A legata all'oligo.

La componente antisense va invece a legare una porzione esposta di hTR; la struttura secondaria di hTR è molto complessa e la regione a singolo filamento più accessibile è stata individuata tra i nucleotidi 76 e 94, a monte della sequenza template utilizzata per allungare i telomeri: l'oligo antisense è stato disegnato per legare esattamente questa regione tra i nucleotidi 76 e 94.



Il meccanismo d'azione del farmaco è perciò il seguente:

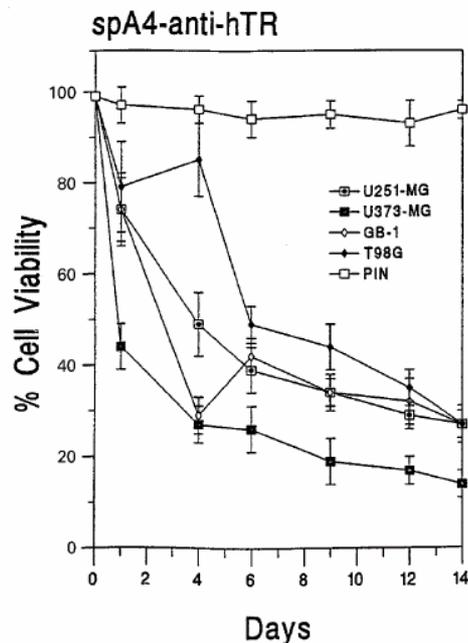
- la componente 2-5A lega e attiva la RNAsi L;
- la componente antisense della chimera dirige la RNAsi verso la molecola di RNA-target, ovvero hTR;
- la RNAsi L a questo punto degrada hTR e provoca l'inattivazione della telomerasi



Il farmaco si è dimostrato efficace *in vitro* su un'ampia gamma di linee cellulari derivate da diversi tipi di tumore, in particolare su cellule tumorali di glioma, prostata, vescica e ovario.

Quando queste cellule sono state trattate con il 2-5A antisense (5 μ M ogni 12 ore), la percentuale di cellule vitali si è ridotta drasticamente nel giro di 4-5 giorni al 20-50% delle cellule iniziali. Questo effetto sembra essere specifico per le cellule tumorali dato che il farmaco non ha avuto quasi effetto su cellule non trasformate.

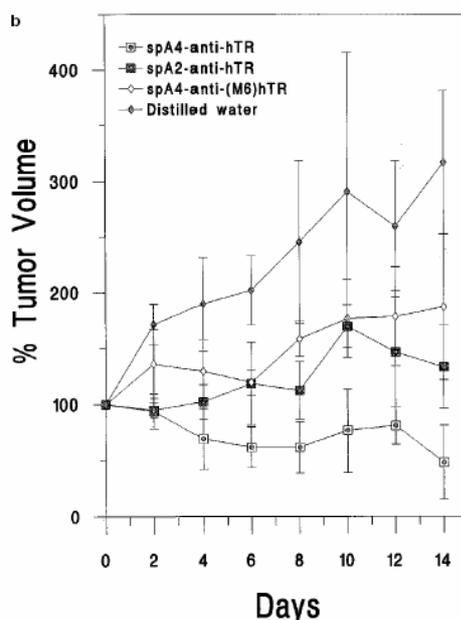
Inoltre la riduzione nella percentuale di cellule vitali sembra essere dovuta a induzione dell'apoptosi nelle cellule bersaglio



In figura riporto a titolo di esempio la percentuale di cellule vitali dopo trattamento con 2-5A per quel che riguarda linee di glioma (U251-MG, U373-MG, GB-1, T98G) e astrociti umani normali (P1N).

Effetti clamorosi sono stati riscontrati anche *in vivo*. Per ognuno dei tumori sopracitati è stato dimostrato l'effetto del farmaco su modelli murini di xenograft.

Le cellule tumorali umane sono state inoculate sottocute in topi immunodeficienti per generare un tumore di volume sufficiente (60-80 mm³); il 2-5A antisense è stato quindi iniettato direttamente nel tumore ogni 24 ore per 7-14 giorni. Il volume del tumore invece che aumentare si è ridotto nel giro di pochi giorni.



In figura riporto a titolo di esempio il volume di tumori originati da una linea di cellule di glioma (U251-MG) trattati con oligo antisense 2-5A (spA4-anti-hTR), oligo antisense usati come controllo negativo (spA2-anti-hTR e spA4-anti-(M6)hTR) o acqua distillata. Il volume del tumore è espresso in termini di percentuale del volume iniziale.

L'aspetto più sorprendente di questi risultati è dato dal fatto che il trattamento con 2-5A antisense induce apoptosi nel giro di soli quattro giorni. Si tratta di un effetto molto più rapido del previsto e molto più rapido di quello ottenuto con altri approcci volti a inibire l'attività telomerasica.

E' un dato sorprendente perchè se l'apoptosi fosse innescata al termine di un progressivo accorciamento dei telomeri come effetto dell'inibizione della telomerasi, sarebbero necessari molti cicli replicativi delle cellule tumorali per raggiungere la lunghezza critica dei telomeri e innescare il processo apoptotico: avremmo tempi nell'ordine di mesi piuttosto che di giorni!

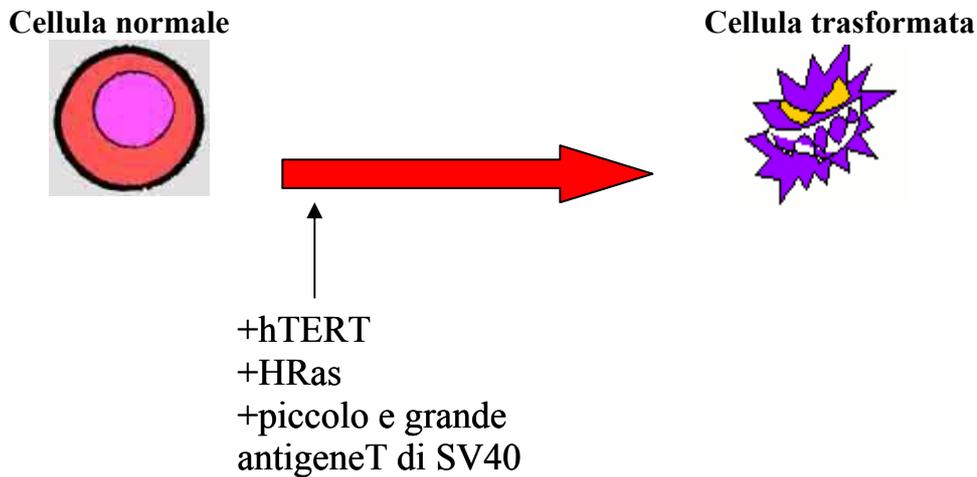
Inoltre la velocità d'azione del farmaco dipenderebbe dalla lunghezza iniziale dei telomeri nei diversi tipi cellulari analizzati, mentre questo non si è riscontrato negli esperimenti condotti con 2-5A antisense.

Questo risultato da una parte è incoraggiante perchè amplia le potenziali applicazioni di questi oligo a cellule tumorali dotate di lunghi telomeri e a tumori allo stadio avanzato, dove il paziente necessita per le sue condizioni di un'azione anti-tumorale rapida.

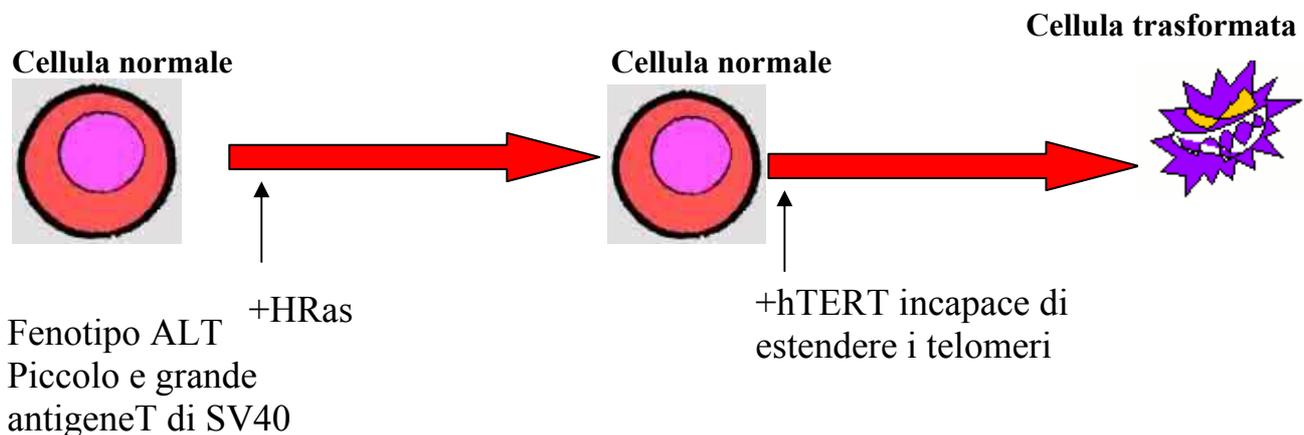
Dall'altra parte apre la strada all'ipotesi che il ruolo della telomerasi nella tumorigenesi non si limiti al mantenimento della lunghezza dei telomeri, ma che la telomerasi contribuisca alla trasformazione con meccanismi indipendenti dall'allungamento dei telomeri. In questo caso l'inibizione della

telomerasi indurrebbe l'apoptosi rapida a causa della perdita di questi meccanismi trasformanti indipendenti dalla lunghezza dei telomeri.

A tal proposito Stewart, Hahn e altri hanno pubblicato un paper illuminante (PNAS, october 1, 2002, vol.99, pag.12606-12611). Era già noto che cellule umane normali in coltura potevano essere trasformate inducendo l'espressione ectopica di hTERT, di una forma costitutivamente attivata di hRAS e degli antigeni T piccolo e grande del virus SV40.



Gli autori del paper sono invece partiti da una linea immortale di fibroblasti umani che mostrava fenotipo ALT e che conteneva la early region del virus SV40 (codificante per gli antigeni T piccolo e grande di SV40) integrata nel genoma. L'espressione di una forma oncogenica di hRAS in queste cellule non è stata tuttavia sufficiente a trasformarle. La trasformazione è stata completata con l'introduzione di una forma di hTERT fusa al C-terminale con un tag (HA): si tratta di un mutante di hTERT incapace di produrre l'allungamento dei telomeri in vivo. Nonostante la mancanza di attività telomerasica in vivo, hTERT-HA ha completato la trasformazione delle cellule.



Si può perciò concludere che i meccanismi ALT e l'attivazione della telomerasi non svolgono un ruolo trasformante equivalente nelle cellule umane. Inoltre sono ipotizzabili ruoli della telomerasi nella tumorigenesi diversi dal già ben noto ruolo di allungamento e mantenimento dei telomeri.

MECCANISMI ALTERNATIVI ATTRAVERSO CUI LA TELOMERASI POTREBBE PROMUOVERE LA TRASFORMAZIONE

Sono state avanzate varie ipotesi riguardo i ruoli alternativi, indipendenti dall'allungamento dei telomeri, che la telomerasi ricoprirebbe nella trasformazione tumorale. Le ipotesi più accreditate sono le seguenti:

1) La telomerasi potrebbe essere fondamentale per costituire un "cap" telomerico stabile e completo. Tale "cap" proteggerebbe le estremità dei cromosomi e impedirebbe loro di fondersi e di andare incontro a eventi di ricombinazione anomala.

Infatti l'introduzione di hTERT in fibroblasti telomerasi-negativi pre-crisi ne provoca l'immortalizzazione, nonostante i telomeri di queste cellule continuino ad accorciarsi; nei fibroblasti telomerasi-negativi pre-crisi in cui non venga introdotta hTERT si hanno invece instabilità telomerica e apoptosi.

Un simile ruolo della telomerasi è anche pensabile in analogia con altre proteine telomeriche quali TRF2, la cui mancanza conduce alla fusione delle estremità dei cromosomi indipendentemente dalla lunghezza dei telomeri.

2) La telomerasi potrebbe avere un ruolo nel sopprimere la risposta apoptotica scatenata dal danneggiamento del DNA. In questo caso l'accorciamento dei telomeri sarebbe solo uno dei possibili danni al DNA contemplati in questo programma di protezione dall'apoptosi, che in linea teorica potrebbe comprendere la soppressione di diversi pathways apoptotici scatenati da diversi tipi di danno al DNA.

A sostegno di questa funzione della telomerasi si riporta che topi hTR^{-/-} mostrano maggior suscettibilità al danneggiamento dei cromosomi in seguito a irradiazione rispetto a topi wild type.

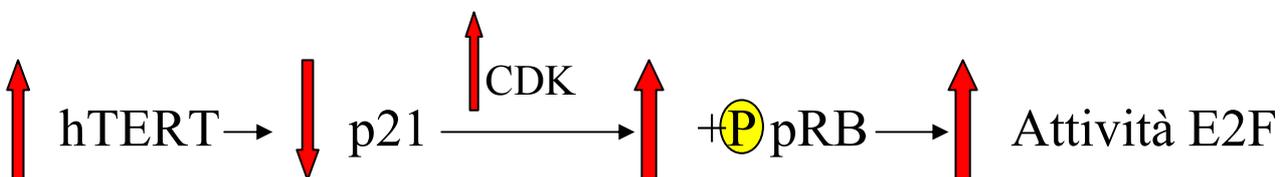
3) La telomerasi potrebbe interagire in modo diretto o indiretto con pathways che controllano la proliferazione cellulare.

Xiang, Wang e altri (Oncogene (2002) 21, 3784-3791) hanno per esempio dimostrato che l'overespressione di hTERT sia nella linea cellulare umana HLE (cellule epiteliali immortalizzate di cristallino) che in cellule di colture primarie:

- accelera il ritmo di crescita delle cellule;
- down-regola l'espressione di p21 (oltre che di p53 e di altre proteine).
- conduce alla iper-fosforilazione di pRb e all'incremento dell'attività trascrizionale di E2F

La telomerasi sembra perciò regolare in modo indiretto (mediante l'interazione con altre proteine) o in modo diretto (recenti studi hanno suggerito che la telomerasi potrebbe interagire con sequenze di DNA diverse da quelle telomeriche) l'espressione di specifici geni bersaglio in aggiunta alla sua già ben nota funzione di mantenimento dei telomeri.

In questo caso specifico possiamo perciò definire un modello di questo tipo:



Ciò non esclude ovviamente che la telomerasi possa controllare l'espressione anche di altri geni coinvolti nel ciclo cellulare e nella proliferazione.

E' infine importante notare che per tutte queste funzioni "alternative", specie per quel che riguarda il ruolo di protezione dall'apoptosi, sembra sia importante la presenza di entrambe le subunità della telomerasi.

Concludendo, alla luce di quanto dimostrato finora, sembra evidente che inibendo funzioni della telomerasi indipendenti dal suo tradizionale ruolo di mantenimento dei telomeri, quali protezione dall'apoptosi e stimolo alla proliferazione, si possa indurre apoptosi rapida nelle cellule cancerose, per quanto tali meccanismi alternativi non siano ancora del tutto noti.

DISCUSSIONE DEI DATI

Dall'analisi dei risultati ottenuti con vari tipi di inibitori della telomerasi, emergono alcuni interrogativi importanti.

Alcuni inibitori della telomerasi producono una rapida apoptosi delle cellule trasformate, mentre altri (la maggior parte) provocano apoptosi lenta in maniera dipendente dalla lunghezza iniziale dei telomeri (v. Modello d'azione in fig. Diapositiva n°3). Per quale motivo, perciò, l'inibizione di hTR mediante 2-5A antisense conduce ad apoptosi rapida, mentre ad esempio l'inibizione di hTR con una forma modificata di RNA interference provoca apoptosi lenta dipendente dall'accorciamento progressivo dei telomeri? E, in analogia, perchè l'inibizione di hTERT con un ribozima diretto contro il suo mRNA conduce ad apoptosi rapida, mentre l'utilizzo di una forma dominante negativa di hTERT per inibire la stessa proteina ha come effetto apoptosi lenta?

Una possibilità è che soltanto l'inibizione completa della telomerasi (agendo su una o sull'altra subunità) porti sia al blocco dell'attività telomerasica che al blocco di tutti quei meccanismi trasformanti alternativi, quali protezione dall'apoptosi e stimolo alla crescita, riconducibili alla telomerasi; in questo caso si avrebbe apoptosi rapida indipendente dall'accorciamento dei telomeri.

L'inibizione parziale avrebbe invece come unico effetto quello di arrestare l'attività telomerasica, mentre i meccanismi trasformanti alternativi rimarrebbero funzionanti; in questo caso avremmo apoptosi lenta per il progressivo accorciamento dei telomeri ad ogni ciclo replicativo delle cellule-target. In tal senso farmaci quali il 2-5A antisense o ribozima anti-hTERT condurrebbero all'inibizione completa della telomerasi, mentre altri farmaci solo a quella parziale.

Un'altra spiegazione plausibile è che gli inibitori che conducono ad apoptosi rapida agiscano sulle cellule cancerose mediante meccanismi aspecifici, non limitati all'inibizione della telomerasi. In ogni caso l'inibizione è diretta in modo specifico contro le cellule tumorali che esprimono alti livelli di telomerasi.

Un secondo interrogativo fondamentale si apre riguardo l'effetto di questi inibitori della telomerasi nei confronti delle cellule staminali adulte, caratterizzate anch'esse da attività telomerasica. La deplezione delle cellule staminali da parte di inibitori della telomerasi renderebbe infatti questi farmaci del tutto simili a dei comuni chemioterapici.

C'è da dire, tuttavia, che le cellule staminali hanno livelli di attività telomerasica di molto inferiori rispetto alle cellule cancerose, fattore che le relega a target secondario per gli inibitori della telomerasi. In secondo luogo, alla luce degli effetti rapidi mostrati da alcuni di questi inibitori, potrebbero essere sufficienti trattamenti per brevi periodi di tempo per ottenere il risultato voluto; si eviterebbero così conseguenze indesiderate, quali l'azione contro cellule staminali e stati patologici simili a quelli riscontrati in topi K.O. per hTR o hTERT, problemi cui si andrebbe probabilmente incontro se la somministrazione dell'inibitore fosse più prolungata. Sono tuttavia necessarie ulteriori verifiche per escludere effetti negativi di questi inibitori nei confronti delle cellule staminali adulte.

ALTRE STRATEGIE TERAPEUTICHE TRA SPERIMENTAZIONE E TRIALS CLINICI

La Geron, industria bio-farmaceutica californiana, ha sviluppato nuovi e interessanti trattamenti anti-tumorali che sfruttano la presenza di un'intensa attività telomerasica nelle cellule cancerose. Tra questi cito i più importanti:

- 1) Virus oncolitici
- 2) Vaccini anti-telomerasi

1) Si tratta di virus ingegnerizzati per andare a colpire ed esercitare la loro funzione oncolitica selettivamente nei confronti delle cellule che esprimono alti livelli di telomerasi.

Il promotore del gene codificante per hTERT è stato clonato e introdotto a monte di geni virali fondamentali per la replicazione del virus nella cellula infettata. In questo modo solo quando il virus ricombinante infetta una cellula tumorale che esprime la telomerasi, tali geni virali sono trascritti e il virus può moltiplicarsi nella cellula e condurla alla lisi. Quando il virus infetta invece cellule somatiche non trasformate, non può replicarsi ed è destinato a scomparire.

Gli effetti litici selettivi di questo virus sono stati verificati in vitro su varie linee cellulari e in vivo su modelli animali di tumore al fegato e alla prostata, mostrando l'attesa selettività nei confronti delle cellule tumorali.

2) La tecnica si basa sull'esposizione del paziente ad un antigene tumore-specifico, in questo caso la telomerasi, che induca il sistema immunitario del paziente stesso ad attaccare in modo selettivo le cellule trasformate esprimenti la telomerasi.

A questo scopo cellule dendritiche (le più efficienti antigen-presenting-cells) sono state isolate dal sangue del paziente, elettroporate con l'mRNA codificante per hTERT e reintrodotte nel corpo del paziente, dove hanno scatenato una risposta immunitaria di linfociti CD8+ in un primo tempo e in seguito anche CD4+, diretta contro le cellule tumorali esprimenti l'antigene.

L'approccio ha raggiunto le fasi 1 e 2 di trial clinico sugli esseri umani, in particolare su 24 pazienti affetti da cancro alla prostata ad uno stadio avanzato. In questi pazienti è stata riscontrata una robusta risposta immunitaria CD8+ e CD4+ telomerasi-specifica. Su 10 pazienti che prima del trattamento mostravano alti livelli di cellule cancerose circolanti nel sangue, 9 hanno mostrato una significativa riduzione di tali livelli. Infine, in nessun caso è stata rilevata alcuna forma di risposta auto-immunitaria a seguito della vaccinazione.