

High-content imaging per lo studio di farmaci anti-tumorali e di nuovi bersagli terapeutici

Italia Anna Asteriti^{1,2}, Annalisa Verrico¹, Valeria Colicchia³, Giuseppe Giannini³, Pietro Cirigliano⁴, Giulia Guaruglini^{1,2}, Patrizia Lavia^{1,2}, Francesca Degrassi¹

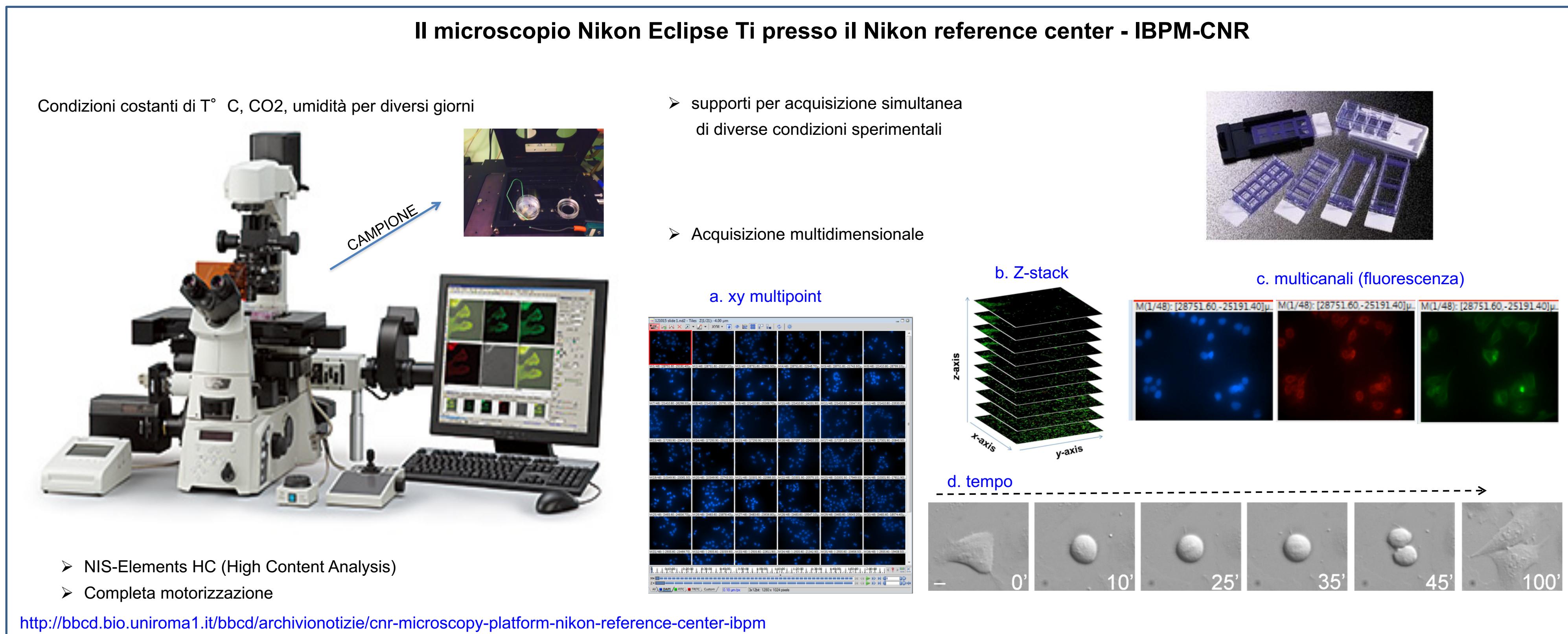
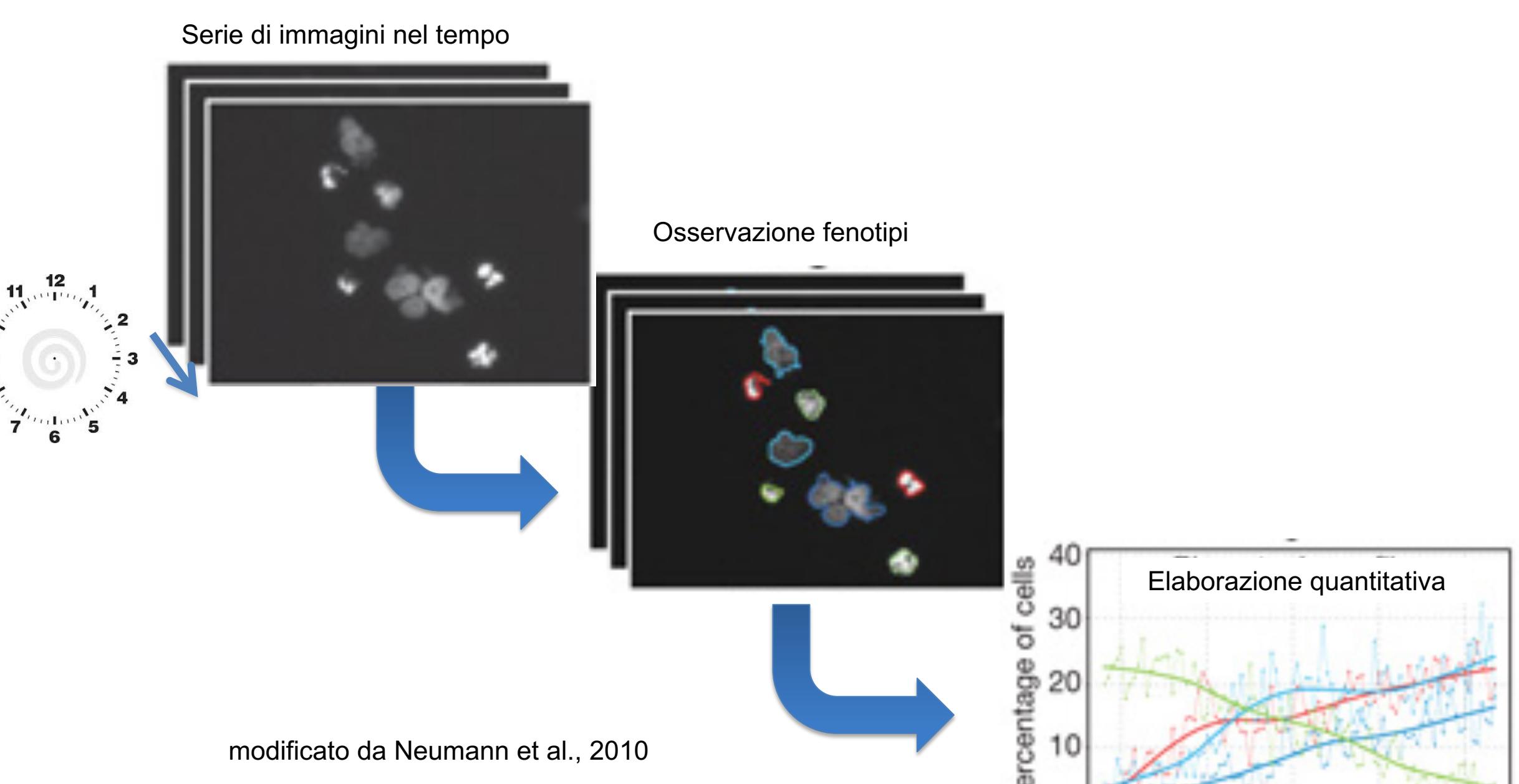
1.Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, c/o Sapienza Università di Roma, Via degli Apuli 4; 2. Nikon Reference Center for Central-Southern Italy @IBPM; 3. Dipartimento di Medicina Molecolare, Sapienza Università di Roma; 4. Nikon Instruments S.p.A., Campi Bisenzio, IT



INTRODUZIONE

Le metodiche di imaging in campo biomedico hanno conosciuto uno sviluppo impressionante, che ha trasformato la microscopia da approccio descrittivo a disciplina quantitativa ("high content") che consente di ottenere informazioni spazio-temporali accurate e ad alta risoluzione.

Le metodiche di video-registrazione in time-lapse aggiungono un livello di informazione dinamica, essenziale per la comprensione di processi quali la divisione cellulare, il differenziamento, la senescenza, il signalling intracellulare, la comunicazione tra cellule, la migrazione, la risposta ad infezioni, l'induzione di morte cellulare.



Il microscopio Nikon Eclipse Ti presso il Nikon reference center - IBPM-CNR

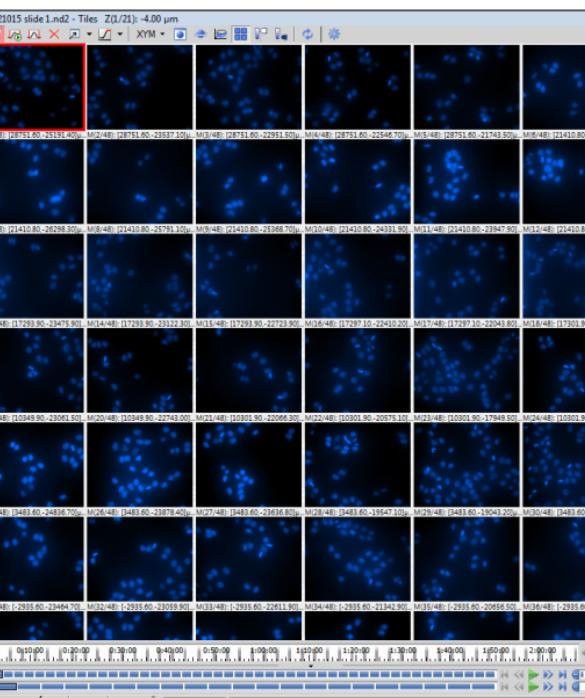
Condizioni costanti di T° C, CO₂, umidità per diversi giorni

> supporti per acquisizione simultanea di diverse condizioni sperimentali

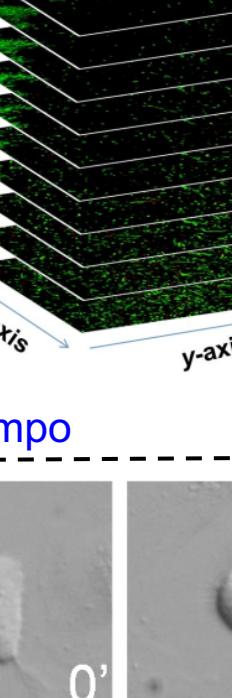


> Acquisizione multidimensionale

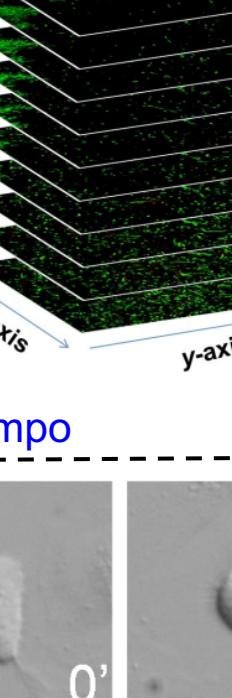
a. xy multipoint



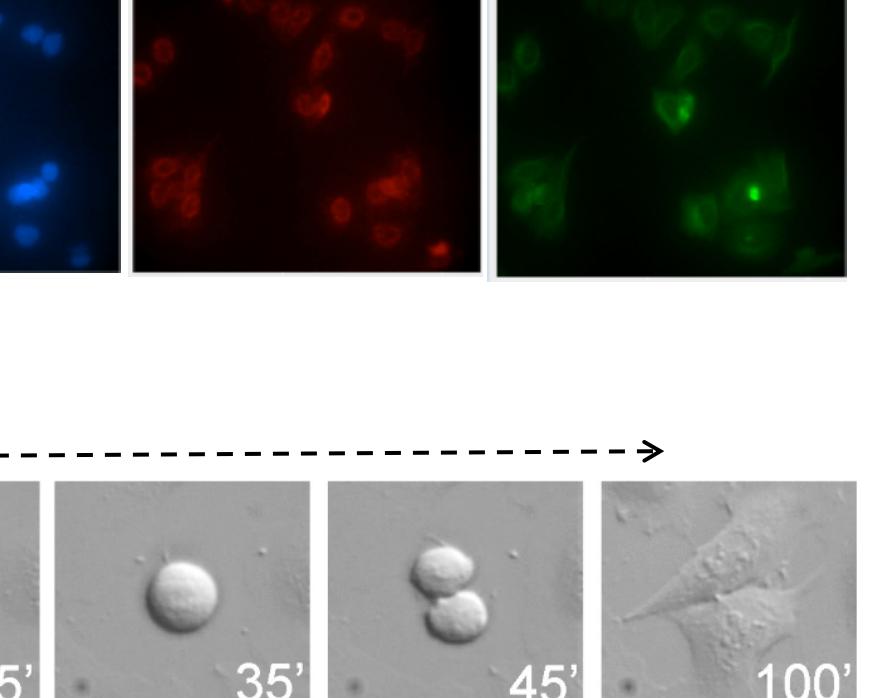
b. Z-stack



c. multicanali (fluorescenza)



d. tempo



L'imaging permette di correlare, al livello della singola cellula, specifici eventi molecolari con cambiamenti globali nell'organizzazione della cellula e nelle strutture subcellulari; misura quantitativamente specifiche risposte (ad es. l'internalizzazione di segnali); rivelava eventi "stocastici", che non sarebbero apprezzati altrimenti (ad es., l'eterogeneità del comportamento di singole cellule in una popolazione tumorale). Pertanto si sta affermando come strumento di indagine fondamentale nel campo della scoperta e valutazione biologica di nuovi farmaci e terapie biologiche.

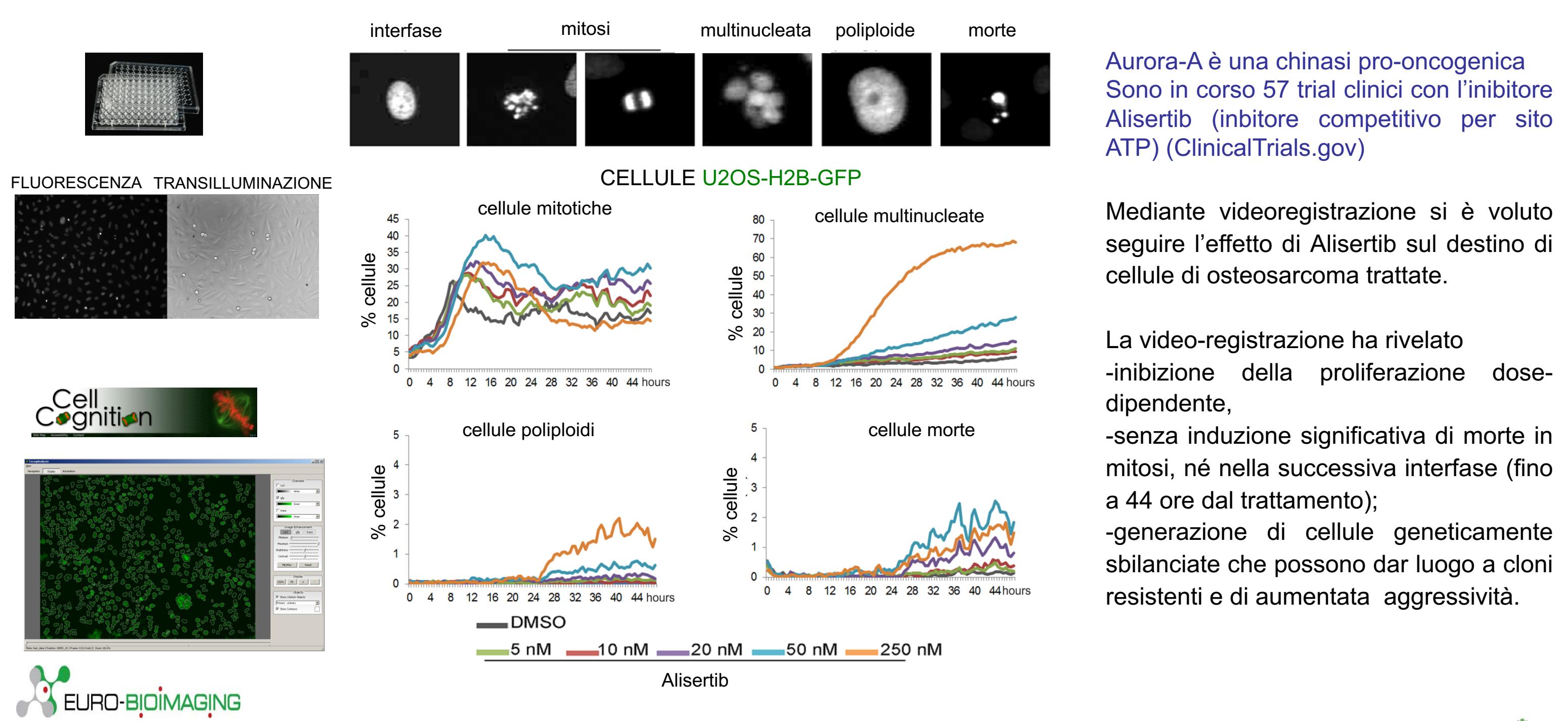
Scopo del lavoro è stato lo sviluppo di metodologie e protocolli di imaging avanzato per la caratterizzazione di molecole con potenziale anti-tumorale e la validazione di nuovi bersagli terapeutici

SCOPO DEL LAVORO

RISULTATI

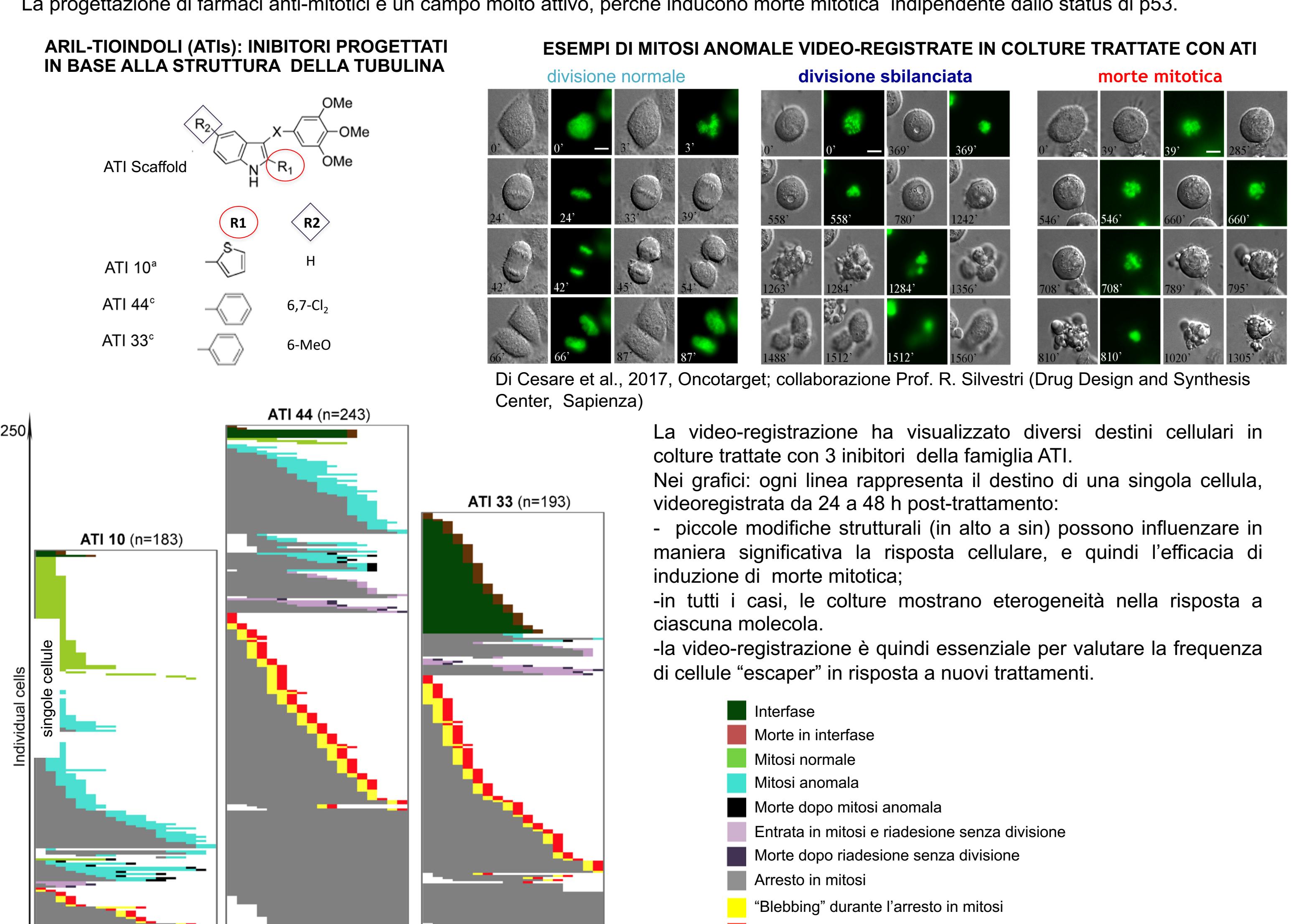
1. VIDEO-REGISTRAZIONE DEGLI EFFETTI DI MOLECOLE DI INTERESSE TERAPEUTICO: DAGLI STUDI IN VITRO AL LIVELLO PRE-CLINICO

1A. Video-registrazione in modalità high-throughput ed analisi automatizzata mediante "machine learning" per seguire, nel tempo, il destino di cellule trattate con l'inibitore della chinasi mitotica Aurora-A Alisertib

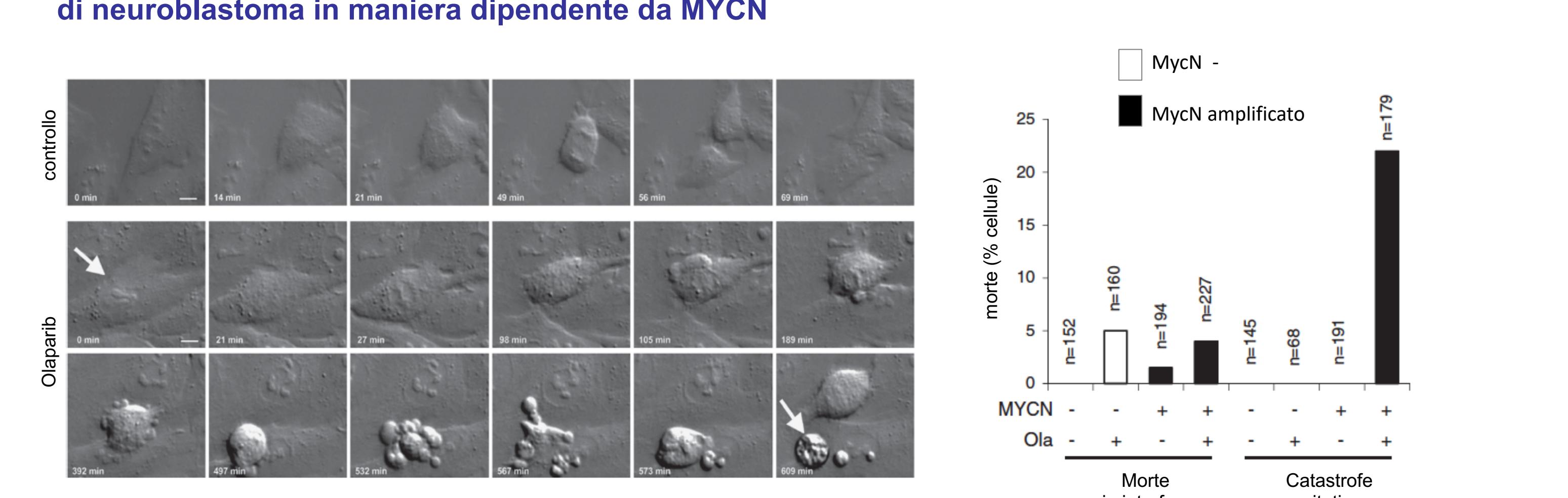


1B. SAR (structure-activity relationship)-based drug design: video-registrazione nel tempo della eterogeneità nelle risposte cellulari a nuovi inibitori dell'apparato mitotico

La progettazione di farmaci anti-mitotici è un campo molto attivo, perché inducono morte mitotica indipendente dallo status di p53.



1C. Attivazione di nuovi checkpoints: inibitori degli enzimi PARP causano catastrofe mitotica in linee di neuroblastoma in maniera dipendente da MYCN

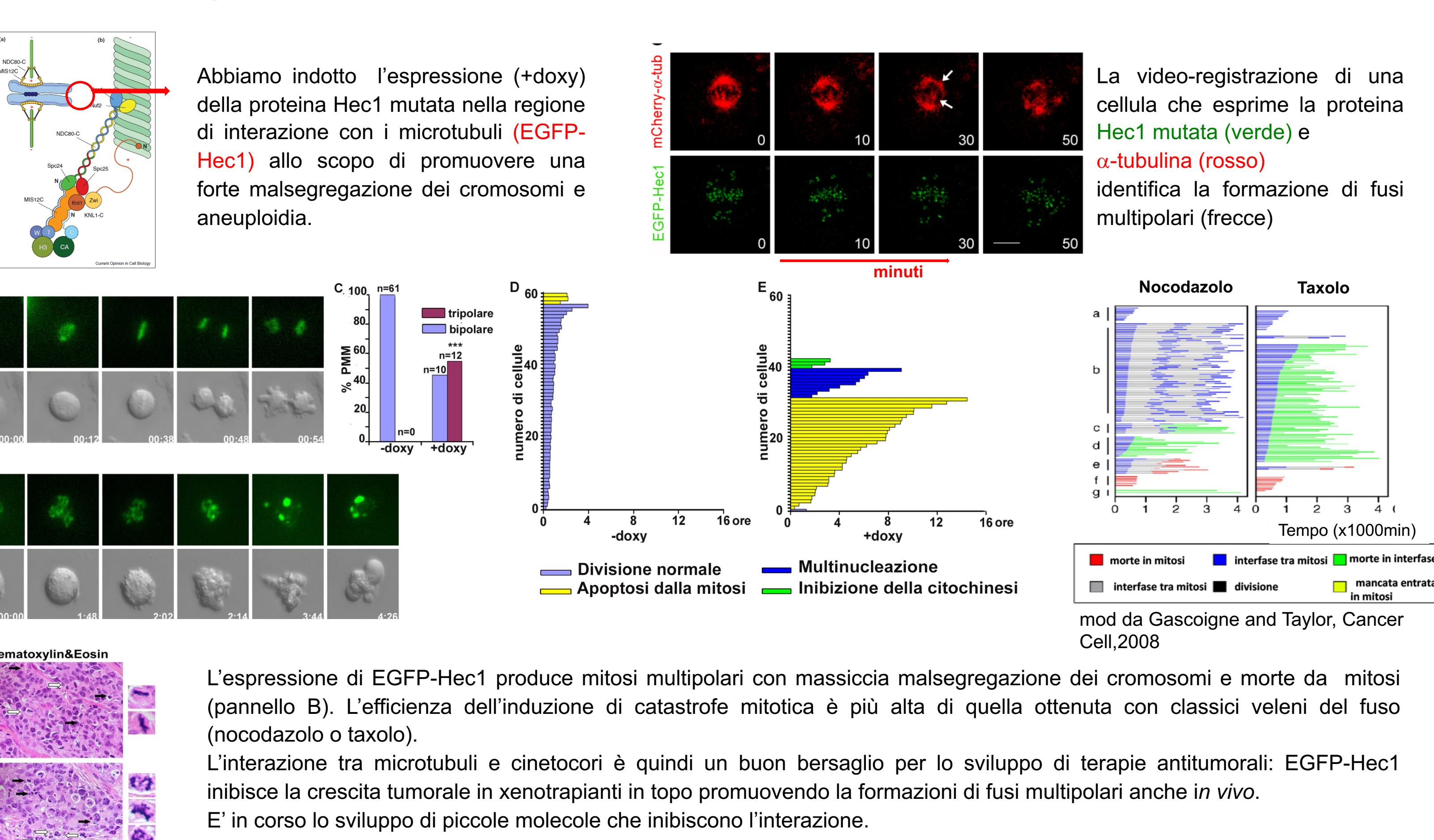


Gli inibitori delle PARP (tra cui Olaparib) sono in fase di studio preclinico e clinico per diversi tumori. La video-registrazione in time-lapse di cellule di neuroblastoma trattate con Olaparib ha mostrato una modalità inattesa di morte: le cellule entrano in mitosi anche in presenza di danno al DNA e vanno incontro a catastrofe mitotica. Questo destino è specifico delle cellule di neuroblastoma con amplificazione di MYCN, condizione caratteristica dei neuroblastomi più aggressivi.

Collaborazione Prof. G. Giannini (Dip. Medicina Molecolare, Sapienza) Colicchia et al., 2017, Oncogene

2. IDENTIFICAZIONE DI NUOVI BERSAGLI TERAPEUTICI

2A. La proteina cinetocorica Hec1 e le interazioni tra microtubuli e cinetocori rappresentano un bersaglio efficace nella terapia del cancro



L'espressione di EGFP-Hec1 produce mitosi multipolari con massiccia malsegregazione dei cromosomi e morte da mitosi (pannello B). L'efficienza dell'induzione di catastrofe mitotica è più alta di quella ottenuta con classici veleni del fuso (nocodazolo o taxolo).

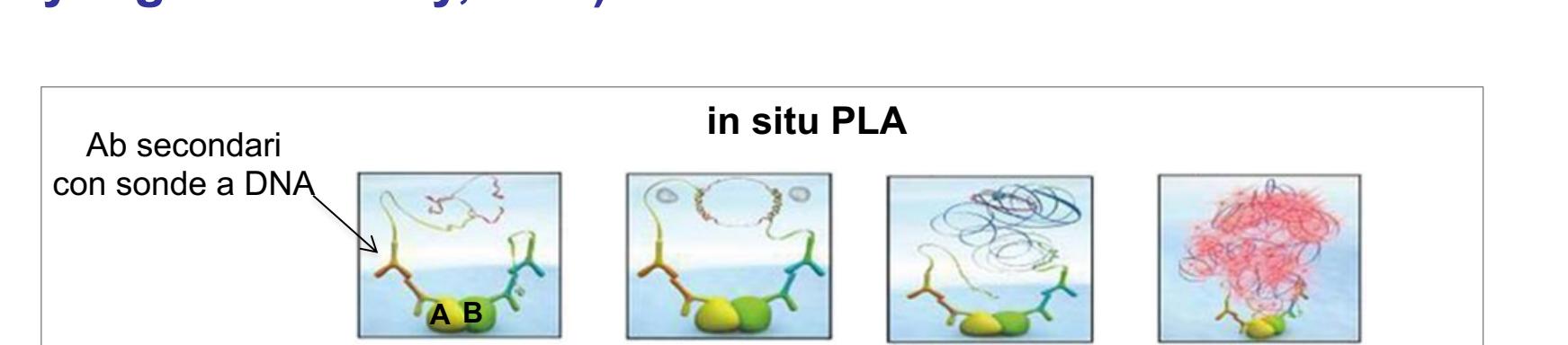
L'interazione tra microtubuli e cinetocori è quindi un buon bersaglio per lo sviluppo di terapie antitumorali: EGFP-Hec1 inibisce la crescita tumorale in xenotriplanti in topo promuovendo la formazione di fusi multipolari anche in vivo.

E' in corso lo sviluppo di piccole molecole che inibiscono l'interazione.

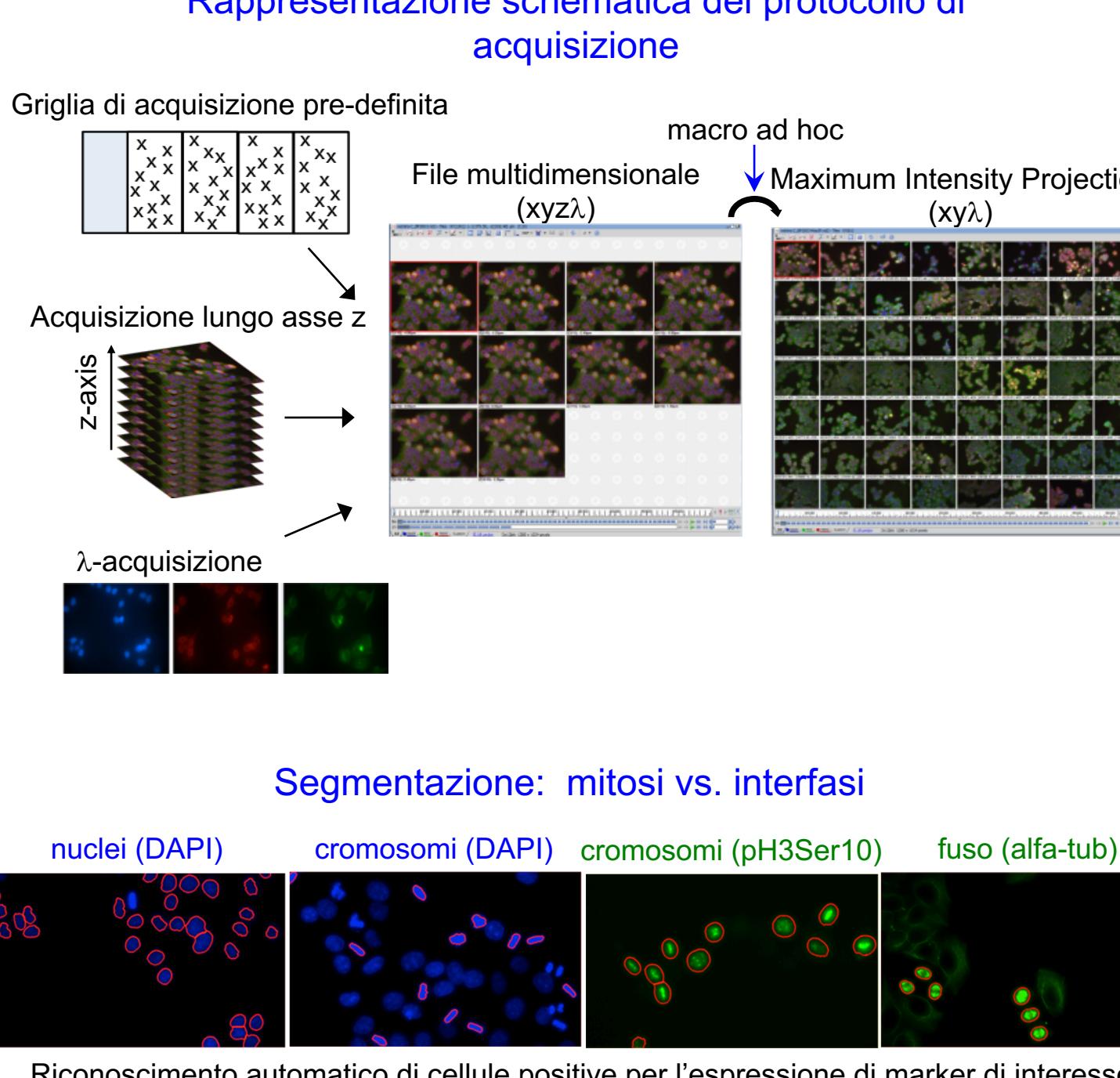
Orticello et al., 2015, Oncogene

2B. Sviluppo di metodologie di imaging *in situ* (Proximity Ligation Assay, PLA) in modalità automatizzata

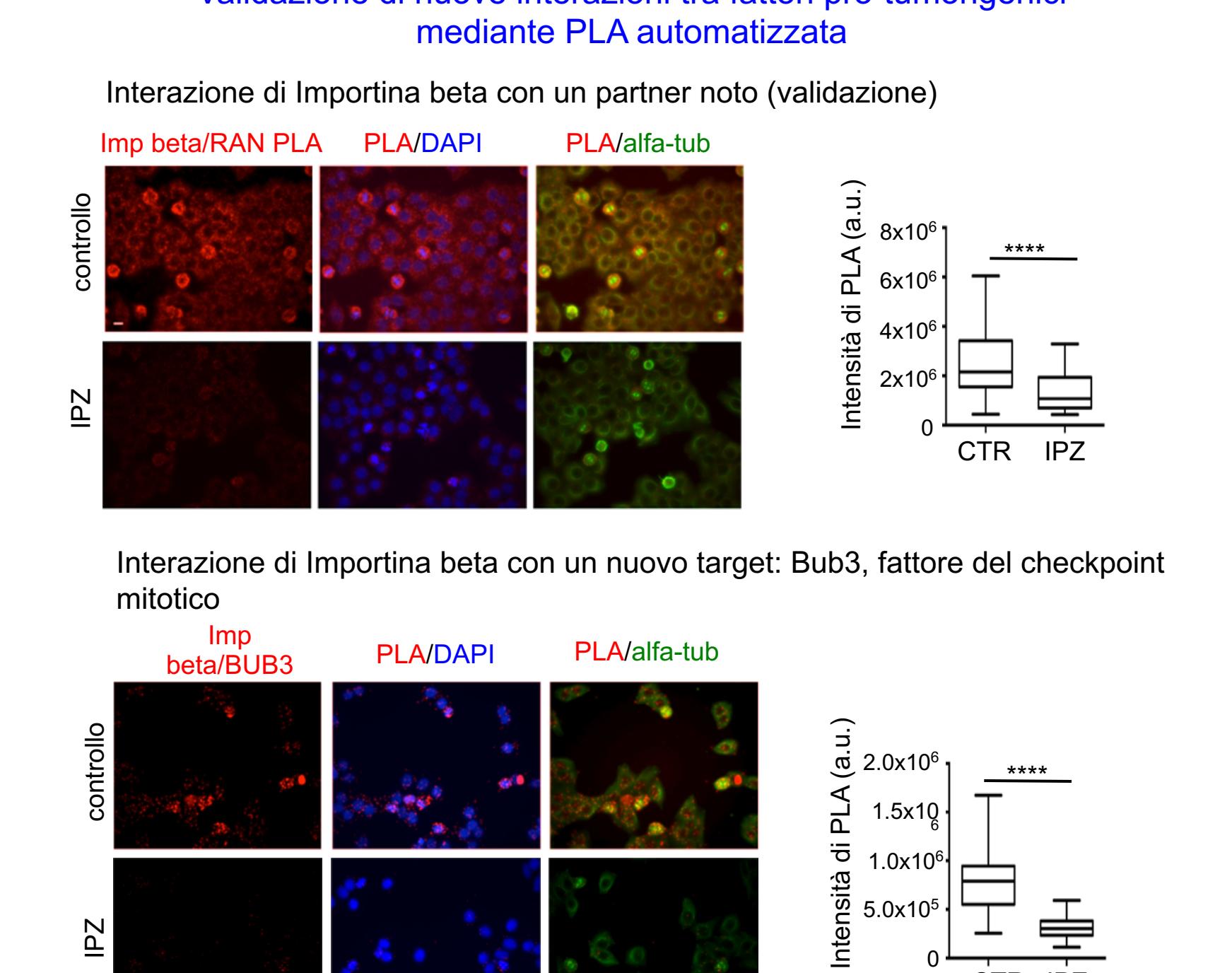
Acquisizione - Serie completa di immagini (campi multipli)
Segmentazione - Generazione automatica di maschere di segmentazione
Misure ed analisi - Misure simultanee dell'intensità del segnale nelle selezioni



Rappresentazione schematica del protocollo di acquisizione



Validazione di nuove interazioni tra fattori pro-tumorigenici mediante PLA automatizzata



Per facilitare lo screening di interazioni proteina-proteina (o proteine/inibitore) abbiamo sviluppato ed automatizzato protocolli per *in situ* Proximity Ligation Assay, per visualizzare velocemente, in condizioni native, interazioni tra proteine in singole cellule nella loro dinamica spazio-temporale.

Affiancando la PLA a screening proteomici abbiamo identificato l'interazione tra Importina beta, una proteina sovraespressa in molti tumori, e il fattore di checkpoint Bub3. L'interazione è specifica ed è inibita dall'inibitore importazolo (IPZ). Le misure di intensità di fluorescenza per i segnali di PLA sono mostrate in unità arbitrarie (a.u.).

CONCLUSIONI

Le metodologie di imaging "high content" permettono un aumentato livello di informatività sulla risposta cellulare a farmaci o altre strategie terapeutiche, e sulla eterogeneità intercellulare, non ottenibile con tecniche classiche che analizzano popolazioni cellulari in toto. Tali metodologie consentono una valutazione anche quantitativa della complessità della risposta cellulare, essenziale per un approccio di medicina personalizzata.

RINGRAZIAMENTI