



# Università Degli Studi di Messina

Dipartimento di Scienze Biomediche, Odontoiatriche e  
delle Immagini Morfologiche e Funzionali

**Dottorato di Ricerca in:**

**Translational Molecular Medicine and Surgery**

**Ciclo XXXV**

Coordinatore Prof. Gaetano Caramori

**“Inibizione di CDK 12 e CDK13 in organoidi di  
carcinoma ovarico sieroso di alto grado: nuove  
prospettive terapeutiche”**

Settore Scientifico Disciplinare MED/40

Candidato:

Dott. Giuseppe Zoccali

Tutor  
Prof. Roberta Granese

Anno Accademico 2021/2022

## *Ringraziamenti*

*Giunto alla fine di questo percorso, sento la necessità di esprimere la mia più sincera gratitudine al professore Alfredo Ercoli, per aver creduto che io potessi farcela, per gli stimoli, per gli insegnamenti, per l'esempio e per l'aiuto che in questi anni mi ha dato. Un sentito ringraziamento alla mia tutor, professoressa Roberta Granese, che con pazienza mi ha guidato in questo percorso non privo di difficoltà. Infine ringrazio chiunque con un gesto o con una parola abbia consapevolmente o inconsapevolmente partecipato al raggiungimento di questo obiettivo.*

## INDICE

Abstract.....	01
Introduzione.....	02
Materiali e Metodi.....	08
Risultati.....	13
Discussione.....	23
Bibliografia.....	26

## ABSTRACT

**Introduction.** High grade serous ovarian cancer (HGSOC) represents the leading cause of death among gynaecological malignancies. Despite all recent therapeutic advances, the median survival of ovarian cancer is about 40-50% at 10 years. Therefore, the identification of more effective chemotherapy regimens and/or target therapies are needed to improve the prognosis of HGSOC patients. Recent studies have shown how patient-derived organoids (PDOs) are powerful tools in molecular oncology, as they can be exploited to bridge the gap between ex-vivo studies and patients' real clinical response to treatments. In this study, by using HGSOC cell lines and PDOs we evaluated the anticancer activity of CDK12/13 inhibition.

**Materials and Methods.** We have collected tumour samples from six patients with HGSOC and we have performed histological, immunohistochemistry and DNA examination. From the same samples we have derived PDOs that we have treated with THZ531, Olaparib, Paclitaxel and carboplatin, alone or in combination. After the treatment we have evaluated the effect of the treatment with THZ531 alone or in combination.

**Results.** All PDOs preserved the phenotypic characteristics of the original tumour and were highly sensitive to THZ531 ( $IC_{50} < 140nM$ ). This last data confirmed the importance of CDK12/13 in the survivor of HGSOC cells. In all PDOs BRCA1/2 wild type, the concomitant treatment with sub-optimal dosed of THZ531 ( $IC_{30}$ , 30-50nM) and Olaparib (1-10 $\mu$ M) synergistically reduced the cellular viability. The concomitant treatment with Paclitaxel and THZ531 significantly improved the effect of paclitaxel on all PDOs tested.

**Discussion.** In our study, we have confirmed the high sensitivity of HGSOC cells to concomitant inhibition of CDK12/13 activity. Combined treatment with THZ531 has significantly improved the efficacy of PARPi. The results obtained with primary PDOs have clearly indicated that inhibition of CDK12/13 activity can be utilized to rescue the sensitivity of HGSOC BRCA1/2 wild type tumours to PARPi. Our study also has demonstrated that THZ531 significantly improve the cytotoxicity of Paclitaxel. THZ531 synergized with Paclitaxel in all PDO lines tested, even if its effect was stronger for the organoids that were intrinsically more sensitive to this drug.

## INTRODUZIONE

Il cancro ovarico epiteliale (COE) è la neoplasia maligna più letale tra i tumori della sfera ginecologica (1). Nel mondo rappresenta la settima neoplasia maligna più frequentemente diagnosticata nel genere femminile. Ogni anno, a livello mondiale, vengono diagnosticati circa 230.000 nuovi casi di COE e si registrano 150.000 decessi. Cumulativamente a 5 anni dalla diagnosi sopravvive solo il 46% delle pazienti (2). Una delle maggiori cause della elevata letalità del COE è rappresentata dalla diagnosi tardiva, il 75% delle pazienti viene diagnosticata in stadio avanzato poiché la malattia decorre a lungo asintomatica, e lo stadio alla diagnosi rappresenta il fattore prognostico più importante. Ad oggi non sono disponibili esami di screening che abbiano dimostrato una valida efficacia nella diagnosi precoce del COE. Il Carcinoma Ovarico Sieroso di Alto Grado (HGSOC) è l'istotipo più frequente e rappresenta il 75% dei casi di COE (fig.1). Il trattamento di scelta del HGSOC è rappresentato da una chirurgia citoriduttiva completa seguita da sei cicli di chemioterapia a base di platino. Nonostante la gran parte dei casi di HGSOC, alla diagnosi, risulti particolarmente sensibile ai chemioterapici derivati del platino, entro i tre anni successivi al trattamento primario, il 75-80% delle pazienti sviluppa una ripresa di malattia (1). Per consolidare il risultato ottenuto col trattamento primario, sono state messe appunto terapie di mantenimento, ma nonostante i progressi conseguiti in questo campo, la mortalità rimane alta. Da qui la necessità di sviluppare chemioterapici e terapie

target più efficaci per migliorare la prognosi delle pazienti affette da HGSOC.

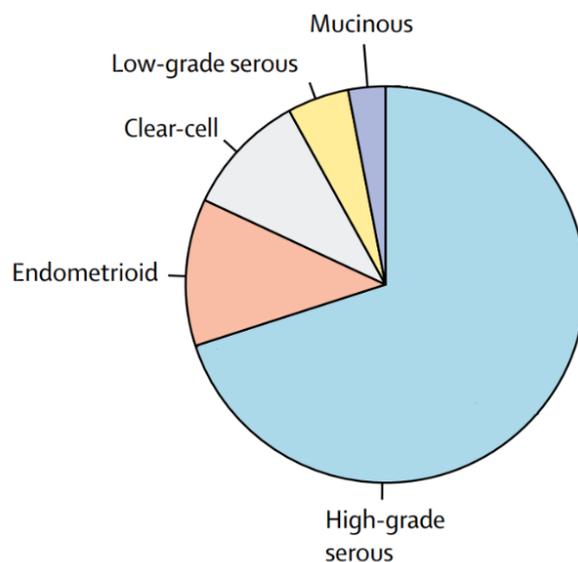


Fig. 1 Frequenza relativa dei vari istotipi di cancro ovarico epiteliale (1).

Il HGSOC è caratterizzato da una elevata frequenza di mutazioni nei geni che controllano il processo di riparazione dei danni al DNA (3). Questa caratteristica rende il HGSOC una neoplasia maligna particolarmente instabile dal punto di vista genomico. Circa il 50% dei HGSOC risultano difettivi nel processo di riparazione del DNA attraverso la via della ricombinazione omologa. I geni più frequentemente interessati sono *TP53*, *BRCA1* e *BRCA2*, mentre le mutazioni a carico di altri proto-oncogeni o geni oncosoppressori sono meno comuni. I geni *BRCA1* e *BRCA2* sono essenziali nella riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA attraverso la via della ricombinazione omologa. La mutazione di *BRCA1* e *BRCA2*

rende il HGSOC particolarmente sensibile ai chemioterapici derivati del platino, il cui meccanismo d'azione è quello di indurre la rottura della doppia elica di DNA, e responsivo alla terapia di mantenimento con gli inibitori delle poli ADP ribosio polimerasi (PARPi). Le caratteristiche molecolari del restante 50% dei HGSOC, che non presentano alterazioni nel processo di riparazione del DNA attraverso la via della ricombinazione omologa, sono relativamente poco studiate (3). Non tutti i casi di HGSOC rispondono in egual misura alla terapia con PARPi e spesso la neoplasia sviluppa meccanismi di resistenza nei confronti di questi farmaci. Da qui la necessità di studiare altre vie molecolari da utilizzare come bersaglio per nuove e più efficaci terapie.

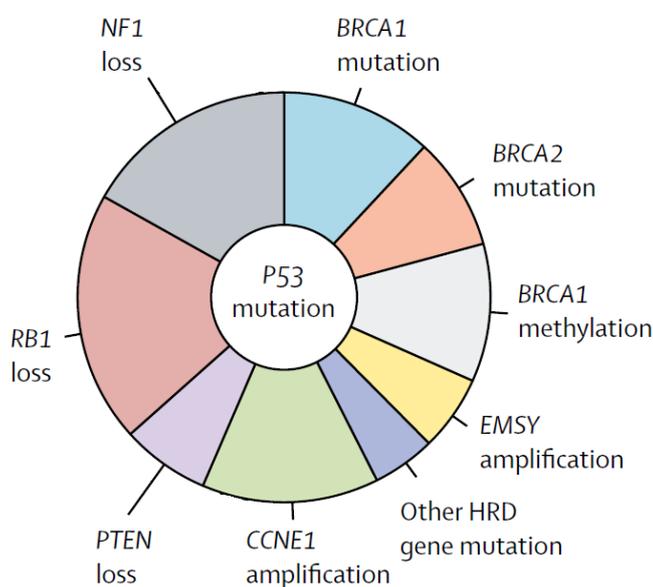


Fig. 2 Alterazioni molecolari di frequente riscontro nel HGSOC (1).

Le cicline chinasi dipendenti (CDK) sono una famiglia di serina-treonina chinasi che necessitano, per espletare la loro funzione, dell'associazione con una ciclina. All'interno del genoma umano sono noti 21 geni di CDK, alcune delle quali impegnate nella regolazione del ciclo cellulare, altre nel processo di trascrizione genica. In particolare, le CDK trascrizionali assicurano una ordinata sequenza delle fasi del ciclo di trascrizione, necessarie per una adeguata espressione genica. Tra le CDK trascrizionali, le più studiate sono *CDK7*, *CDK9*, *CDK12* e *CDK13*. Queste CDK sono espresse in maniera ubiquitaria nei tessuti umani e agiscono su passaggi simili, ma non identici, del processo di trascrizione e di maturazione del pre-mRNA. *CDK12* e *CDK13* sono due CDK di grandi dimensioni e si associano alla ciclina K. *CDK12* è una chinasi ciclina dipendente trascrizionale che promuove il processo di elongazione dell'mRNA attraverso la fosforilazione della serina 2 nel dominio carbossi-terminale di RNA polimerasi II (RNAPII) (4, 5). La perdita di funzione di *CDK12* determina una riduzione dell'espressione dei geni coinvolti nel meccanismo di riparazione del DNA attraverso la ricombinazione omologa e compromette le capacità cellulari di risposta ai danni del DNA. Le funzioni di *CDK12* e *CDK13* si sovrappongono solo parzialmente nel HGSOE, la loro concomitante inibizione produce effetti sinergici, rispetto all'inibizione di una sola di loro, determinando una spiccata attività anti-tumorale su modelli murini. Il gene *CDK12* è frequentemente mutato nel HGSOE, ed è stato dimostrato che una inibizione della sua funzione può rendere la cellula sensibile al trattamento con

PARPi (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Questa osservazione ha un interessante risvolto clinico, dal momento che i PARPi vengono utilizzati nella terapia del HGSOC, ma solo nei casi con mutazione dei geni *BRCA1* e/o *BRCA2*. Si può ipotizzare che un trattamento combinato con un inibitore di *CDK12/13* potrebbe rendere sensibile ai PARPi anche tumori senza alterazioni nel meccanismo di riparazione dei danni del DNA (4).

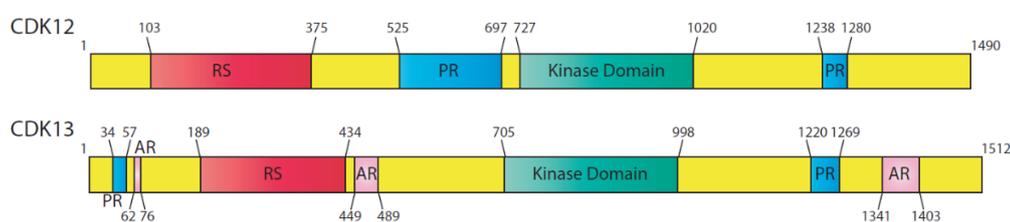


Fig. 3 Struttura schematica di CDK12 e CDK13. Dominio Arg/Ser (RS), regione ricca in Pro (PR), regione ricca in Ala (AR) (4).

Uno dei problemi nello sviluppo di nuove terapie contro i tumori è rappresentato dalla difficoltà di ottenere un modello di studio che riproduca fedelmente le caratteristiche biochimiche, genetiche, strutturali e immunologiche della neoplasia oggetto di studio. Di conseguenza, con una certa frequenza, le nuove molecole testate in vitro con risultati promettenti, falliscono durante i trials clinici. Uno dei modelli di studio comunemente utilizzati nella ricerca contro il cancro sono le colture cellulari in monostrato derivate da linee tumorali. Benché questi modelli abbiano contribuito molto alla nostra conoscenza sul cancro, il processo per il loro allestimento è

molto laborioso, determina la selezione solo di alcuni cloni cellulari che non rispecchiamo le caratteristiche della neoplasia di partenza, non rispecchiano la struttura dell'organo da cui derivano e sono geneticamente instabili. Recentemente sono state messe a punto tecniche di coltura in 3D che permettono la crescita di cellule derivate dai tessuti umani, consentendo loro di auto-organizzarsi in una struttura tridimensionale che ricalca quella del tessuto di partenza. Questo tipo di colture prendono il nome di Organoidi. Gli organoidi presentano il vantaggio di poter essere coltivati a lungo termine, di poter essere crioconservati, rimangono stabili sia genotipicamente che fenotipicamente, possono essere modificati dal punto di vista genetico e ricalcano più fedelmente le condizioni del tessuto di partenza. Studi recenti hanno dimostrato come gli organoidi possano essere uno strumento potente nello studio oncologia molecolare e come questi possano rappresentare il ponte per superare il gap tra gli studi in vivo e la reale risposta del paziente negli studi clinici (13). Alcuni autori hanno dimostrato che anche gli organoidi derivati da HGSOC mantengono fedelmente le caratteristiche del tessuto neoplastico da cui sono generate (14).

In questo studio abbiamo utilizzato organoidi derivati da HGSOC per valutare l'attività antitumorale degli inibitori di *CDK12* e *CDK13*.

## MATERIALI E METODI

Questo studio è stato realizzato in collaborazione con il Dipartimento di Scienze della salute della donna, del bambino e di sanità pubblica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma.

Obiettivo primario dello studio è stato quello di valutare l'attività antitumorale degli inibitori di *CDK12/13* su organoidi derivati da HGSOC.

Obiettivo secondario dello studio è stato quello di valutare l'attività antitumorale del trattamento combinato con inibitori di *CDK12/13* e PARPi, con inibitori di *CDK12/13* e taxani e con inibitori di *CDK12/13* e carboplatino su organoidi derivati da HGSOC.

### **Colture cellulari**

Le linee cellulari OVCAR3 e OV-90 sono state fornite da American Type Culture Collection (ATCC, Milano, Italia). La linea cellulare OVCAR3 è stata coltivata con RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) e la linea cellulare OV-90 con una miscela 1:1 di MCDB 105 medium (contenente 1,5g/L di bicarbonato di sodio) e Medium 199 (contenente 2,2g/L di bicarbonato di sodio). Il brodo di coltura è stato addizionato con MEM (Minimum Essential Medium),

Non-Essential Amino Acid 1%, glutammina 1mM, 1% di penicillina e streptomina, siero fetale bovino al 10% per OVCAR3 e con siero fetale bovino al 15% per OV-90. Le colture sono state incubate a 37°C, 95% di umidità e 5% di CO<sub>2</sub>.

Le linee cellulari OV.GEM9 e OV-GEM11 sono state ottenute a partire da campioni di HGSOC (15). I campioni di HGSOC, provenienti da pazienti, sono stati raccolti presso la Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS di Roma, previa approvazione del comitato etico locale, del Institutional Review Board (protocollo 19402/18 ID: 2045) e previo consenso informato dei pazienti. Le cellule sono state incubate in DMEM/F12 (1:1) supplementato con siero fetale bovino al 10%, glutammina 2mM e kenamicina 2mM, incubate a 37°C, 95% di umidità e 5% di CO<sub>2</sub>.

### **Organoidi derivati dai pazienti**

I campioni di HGSOC sono stati raccolti presso la Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS di Roma, previa approvazione del comitato etico locale, del Institutional Review Board (numero di approvazione ID:3046) e previo consenso informato dei pazienti. I campioni di HGSOC sono stati conservati in piastre di Petri da 60mm contenenti mezzo di coltura AdDF+++ (Advanced DMEM/F12 contenente 1x Glutamax, 10mM di HEPES e antibiotici) pre-riscaldato a 37°C e ridotti a piccoli frammenti mediante l'utilizzo di lame chirurgiche. Alcuni frammenti, selezionati in maniera casuale, sono stati fissati in formalina al 10%

per gli studi istopatologici e immunoistochimici e altri conservati a -80°C per l'estrazione del DNA e successivo studio. Le rimanenti parti sono state digerite in 10ml di AdDF+++ addizionato con 5µM di inibitore della via RHO/ROCK (Y-27632, Tocris), contenente 2mg/ml di collagenasi IV (termofisher), in un agitatore orbitale a 37°C per un'ora. Dopo la digestione, la sospensione cellulare è stata posta in una MACS SmartStrainer (100µm), inserita in una provetta da 50ml, lavata con 10ml di mezzo di coltura AdDF+++ e centrifugata a 290g. Le cellule sono state incorporate in BME (Cultrex growth factor reduced BME type 2) e ghiaccio e 40µl sono state seminate su piastre pre-riscaldate. Le piastre sono state poste in incubazione in ambiente umido, a 37°C, per 30 minuti per consentire al Matrigel di polimerizzare, prima di essere coperto con 500µl di un cocktail di fattori di crescita ed essere incubato a 37°C, in ambiente umido con CO<sub>2</sub> 5%. Il mezzo di coltura utilizzato per gli organoidi è stato AdDF+++ addizionato con EGF, A83-01, B27, Y27632, N2 e Primocin. Il mezzo di coltura è stato rinnovato ogni 3-4 giorni e gli organoidi sono stati trasferiti ogni 1-4 settimane.

### **Analisi Istologica**

I campioni biotici (peritoneo o omento) di HGSOc sono stati fissati in formaldeide al 4% immediatamente dopo il campionamento in sala operatoria, e mantenuti a temperatura ambiente per 24 ore, successivamente sono stati processati secondo gli standard comuni di disidratazione e inclusi in paraffina, sezionati al microtomo,

allestiti su vetrini e colorati con ematossilina ed eosina per la valutazione microscopica.

### **Valutazione della citotossicità**

Le cellule di HGSOc sono state seminate per una notte in piastre a 96 pozzetti, ad una densità di  $1.5/3 \times 10^3$  per pozzetto e trattate con diversi farmaci, a varie concentrazioni, da soli o in combinazione. Dopo l'incubazione 20 $\mu$ L di CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA) sono stati aggiunti a ogni pozzetto, per 1 ora. La densità ottica (OD) di ogni campione è stata rilevata a 490nm attraverso un lettore di micropiastre (Biorad). Ogni trattamento è stato realizzato in triplice copia.

Le linee cellulari degli Organoidi Derivati dai pazienti (PDO) sono state incubate con Cultrex Organoid Harvesting Solution a 4°C per 45 minuti per digerire le membrane basali, sono state successivamente dissociate meccanicamente per pipettazione e risospese in BME Growth medium al 2%. Le cellule così ottenute sono state poste in pozzetti da 100 $\mu$ L di volume, in piastre da 96 pozzetti pre-allestite con membrane basali. Dopo 24 ore di incubazione le cellule sono state trattate con vari farmaci. Dopo 5 giorni dentro ogni pozzetto è stata aggiunta la stessa quantità di CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) e la luminescenza è stata valutata mediante un lettore di micro-piastre (Tecan).

La citotossicità è stata quantificata in comparazione con i controlli (cellule esposte solo al solvente) e i dati analizzati utilizzando GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Le curve dose-risposta sono state costruite utilizzando l'analisi della regressione lineare. La concentrazione inibente (IC50) è stata determinata dopo la costruzione delle curve.

Per valutare se la contemporanea esposizione a più farmaci avesse un effetto sinergico, le linee cellulari sono state trattate con singoli farmaci a diverse concentrazioni e con più farmaci in combinazione utilizzando dosi sub-ottimali. Gli effetti combinati dei vari farmaci sono stati valutati mediante il valore dell'indice di combinazione (CI) calcolato con il Compusyn Software (Biosoft, Ferguson, MO, USA) utilizzando la metodologia descritta da Chou TC (16). Un  $CI > 1$  implica un antagonismo tra i farmaci utilizzati in combinazione, un  $CI = 1$  indica un effetto additivo tra i farmaci e un  $CI < 1$  indica un effetto sinergico.

## RISULTATI

L'analisi dei dati provenienti dal PanCancer project of The Cancer Genome Atlas (TCGA) ha messo in evidenza l'elevata frequenza delle mutazioni dei geni *CDK12* (9%) e *CDK13* (2,5%) tra le pazienti con HGSOC (n=398; fig. 4A). Le due mutazioni sono risultate quasi sempre mutualmente esclusive, solo una paziente ha presentato la concomitante mutazione dei due geni *CDK12* e *CDK13*.

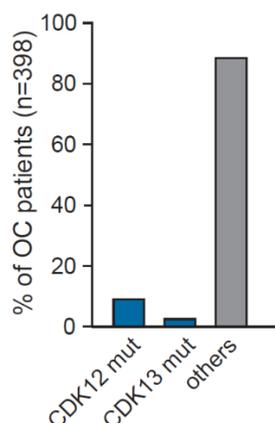


Fig. 4 Frequenza delle alterazioni dei geni *CDK12* e *CDK13* nelle pazienti con HGSOC

In circa la metà dei casi, le mutazioni del gene *CDK12* sono mutazioni missenso, di splicing o troncanti, la rimanente parte è rappresentata da delezione o amplificazione del gene. Un andamento simile riguarda le mutazioni del gene *CDK13*, sebbene questo gene sia più spesso amplificato che deletato nelle pazienti con HGSOC (fig. 5).

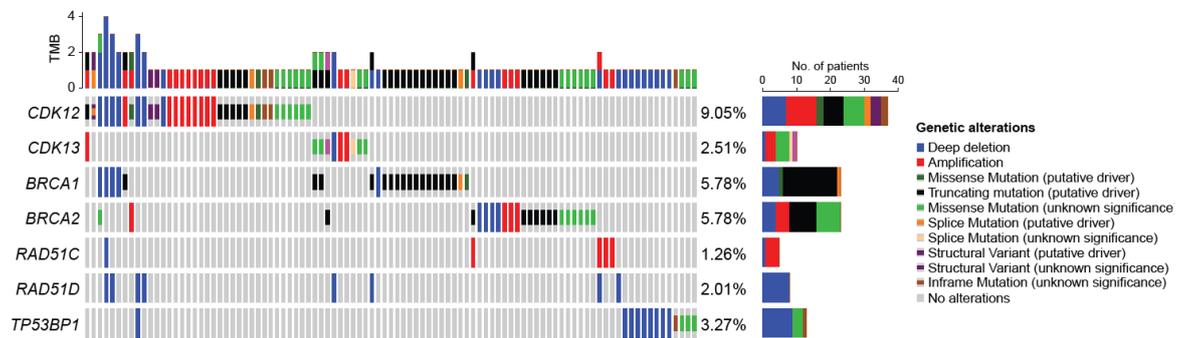


Fig. 5 Frequenza e tipologia delle mutazioni dei geni *CDK12* e *CDK13* nelle pazienti con HGSOC (TCGA, PanCancer Atlas).

Per valutare l'effetto dell'inibizione contemporanea di *CDK12* e *CDK13* abbiamo trattato le linee cellulari OVCAR3 con THZ531, un inibitore specifico di *CDK12* e *CDK13* (17). THZ531 compromette la vitalità cellulare in maniera dose-dipendente, con un effetto pressoché completo a 200nM, determinando un arresto del ciclo cellulare in fase G2/M ed un accumulo di cellule che esprimono H2AX $\gamma$ , un marker di danno al DNA non riparato (18) (fig. 6).

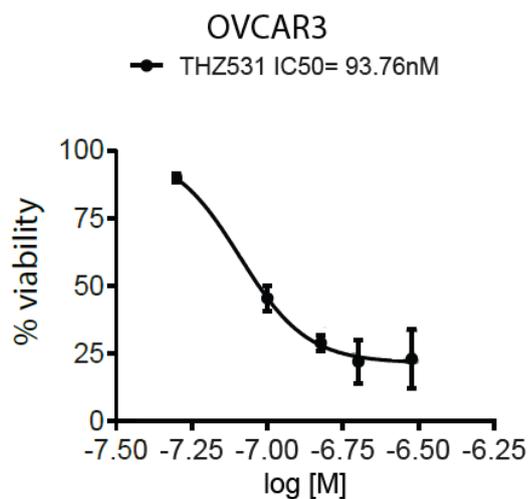


Fig. 6 Risposta delle cellule della linea OVCAR3 al trattamento con THZ531 alle dosi indicate.

Questi risultati confermano il ruolo chiave svolto da *CDK12* e *CDK13* nel processo mitotico delle cellule di HGSOC e suggeriscono il loro potenziale come target terapeutico per questo tipo di cancro.

Successivamente, abbiamo sviluppato da sei pazienti affette da HGSCO candidate a trattamento chirurgico altrettanti PDOs (fig.7). Tutti i PDOs sviluppati hanno mantenuto le caratteristiche fenotipiche dei tumori di partenza (fig.8).

Patient number	HGSOC-24.3	HGSOC-33.3	HGSOC-36.3	HGSOC-41.3	HGSOC-5.3	HGSOC-29.2
Age	68	64	55	61	52	54
Histology	HGSOC	HGSOC	HGSOC	HGSOC	HGSOC	HGSOC
FIGO stage	IIIC	IIIC	IVB	IVB	IIIC	IVB
BRCA status	WT	WT	WT	WT	WT	WT
Origin of Tissue	Peritoneum	Peritoneum	Peritoneum	Peritoneum	Peritoneum	Omentum
Timing of surgery for PDOs establishment	LPS	LPS	PDS	LPS	LPS	PDS
Neoadjuvant chemotherapy	Carboplatin + Paclitaxel	Carboplatin + Paclitaxel	Not applicable	Carboplatin + Paclitaxel + Bevacizumab	Carboplatin + Paclitaxel	Not applicable
Residual Tumor	0	0	0	IDS not performed*	IDS not performed*	0
Adjuvant Chemotherapy	Carboplatin + Paclitaxel	Carboplatin + Paclitaxel + Bevacizumab	Carboplatin + Paclitaxel	Not applicable	Not applicable	Carboplatin + Paclitaxel + Bevacizumab
Best response to platinum	PR	PR	PR	PR	SD	PR
Maintenance regimen	Niraparib	Bevacizumab	Niraparib	Rucaparib + Bevacizumab	None	Bevacizumab
Platinum free interval (PFI)	< 6 months	< 6 months	< 6 months	>6 months	<6 months	<6 months
Alive	No	No	No	No	No	No

Fig. 7 Caratteristiche cliniche delle pazienti. HGSOC = High Grade Serous Ovarian Cancer; WT = wild type; LPS = laparoscopic surgery; PDS = primary debulking surgery; PR = partial response; SD = stable disease, \* = residual disease unsuccessful for radical surgery.

Organoid name	Patient number	Origin of tissue	Tumor						Organoid					
			CK7	CK20	PAX8	WT1	p16	p53	CK7	CK20	PAX8	WT1	p16	p53
PDO-5.3	hgsoc-5.3	peritoneum	+	-	+	+	ND	mut	+	-	+	+	ND	mut
PDO-24.3	hgsoc-24.3	peritoneum	+	-	+	+	+	mut	+	-	+	+	+	mut
PDO-29.2	hgsoc-29.2	omentum	+	-	+	+	+	null	+	-	+	+	+	null
PDO-33.3	hgsoc-33.3	peritoneum	+	-	+	+	+	mut	+	-	+	+	+	mut
PDO-36.3	hgsoc-36.3	peritoneum	+	-	+	+	+	mut	+	-	+	+	+	mut
PDO-41.3	hgsoc-41.3	peritoneum	+	-	+	+	+	mut	+	-	+	+	+	mut

Fig. 8 Caratteristiche fenotipiche dei campioni di HGSOC ottenuti dai pazienti e degli organoidi da essi derivati. ND = non dterminato, mut = mutato, null = non espresso, + = positivo, - = negativo.

Inoltre, per come accade in vivo, dove la maggiorparte dei HGSOC è sensibile ai derivati del platino (1), i PDOs derivati dalle nostre pazienti si sono dimostrati platino-sensibili (fig.9)

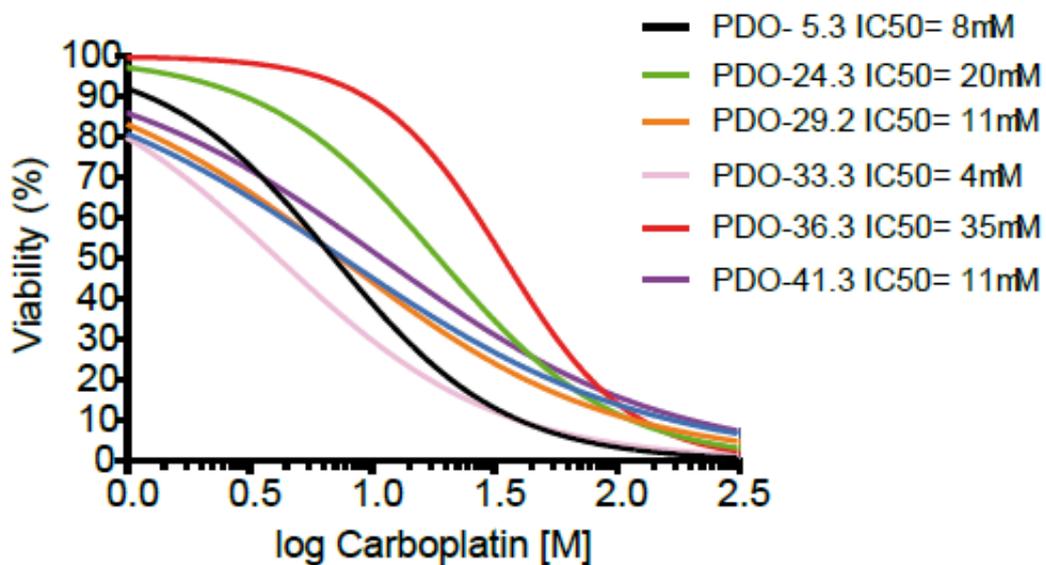


Fig. 9 Risposta degli organoidi al trattamento con dosi differenti di carboplatino. La vitalità cellulare è stata valutata mediante CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay, i valori IC50 sono stati calcolati con il software GraphPad Prism.

I PDOs sono stati trattati con dosi crescenti di THZ531 e si sono dimostrati altamente sensibili all'azione di questo farmaco, con una  $IC_{50} < 140nM$  per tutte le colture, confermando il ruolo chiave di *CDK12* e *CDK13* nella sopravvivenza anche delle cellule di HGSOc primario (fig. 10).

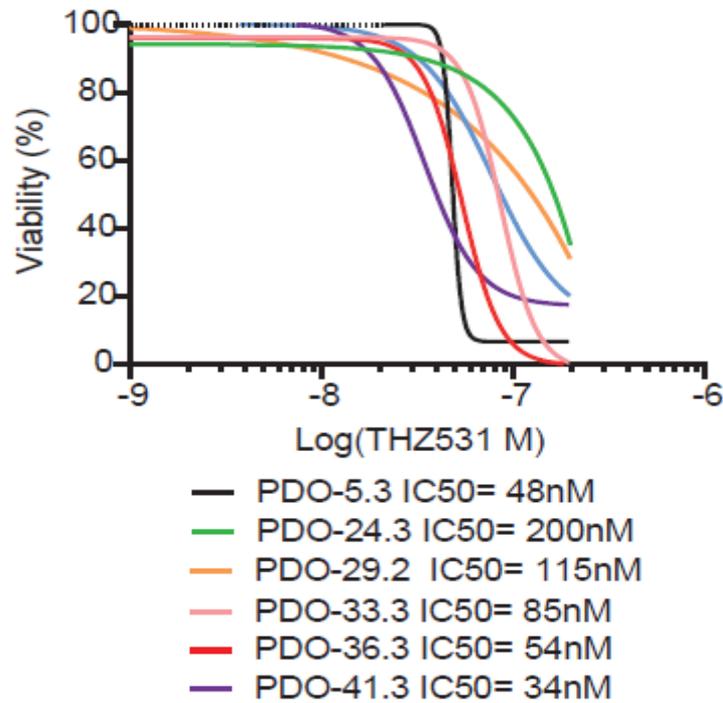


Fig. 10 Risposta degli organoidi al trattamento con THZ531 a varie concentrazioni.

Successivamente abbiamo voluto valutare se l'inibizione di *CDK12* e *CDK13* potesse sensibilizzare i PDOs non portatori di mutazioni *BRCA1/2* all'azione dei PARPi, come precedentemente dimostrato per le linee cellulari di HGSOC (12). L'analisi genetica delle biopsie ottenute dalle pazienti ha rilevato che 4 pazienti su 6 erano *BRCA1/2* non mutati (HGSOC-24.3, HGSOC-33.3, HGSOC-36.3 and HGSOC-41.3). I PDOs hanno mantenuto questa caratteristica ed erano, pertanto, insensibili al trattamento con Olaparib. Il trattamento combinato, con dosi sub-ottimali di THZ531 (IC<sub>30</sub>, 30-50nM) e di Olaparib (1-10 $\mu$ M), ha dimostrato un'attività sinergica nel ridurre la vitalità delle cellule di tutti e 4 gli organoidi testati (fig. 11).

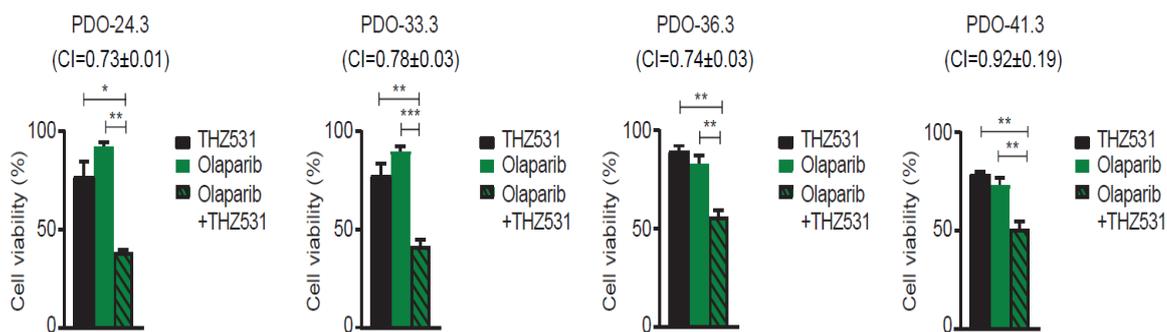


Fig. 11 Risposta degli organoidi al trattamento con THZ531, con Olaparib e al trattamento combinato con entrambe i farmaci.

Le linee cellulari dei PDOs hanno mostrato un'ampia variabilità nella risposta al Paclitaxel, un chemioterapico di prima linea nel trattamento del HGSOc che viene somministrato in associazione al carboplatino (1) (fig.12).

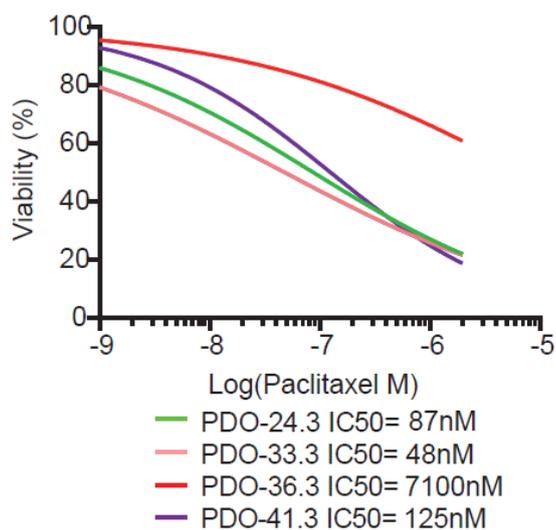


Fig. 12 Risposta degli organoidi al trattamento con Paclitaxel a varie concentrazioni.

Il trattamento con THZ531 ha migliorato sensibilmente la risposta al paclitaxel in tutti i PDOs testati: le linee PDO-24.3 e PDO-33.3 hanno mostrato un più forte effetto sinergico, con un IC<sub>50</sub> per il paclitaxel inferiore, rispetto a quelle PDO-36.3 e PDO-41.3. Questi risultati suggeriscono una possibile differente risposta a questo trattamento combinato in base alla sensibilità del singolo paziente al paclitaxel (fig. 13).

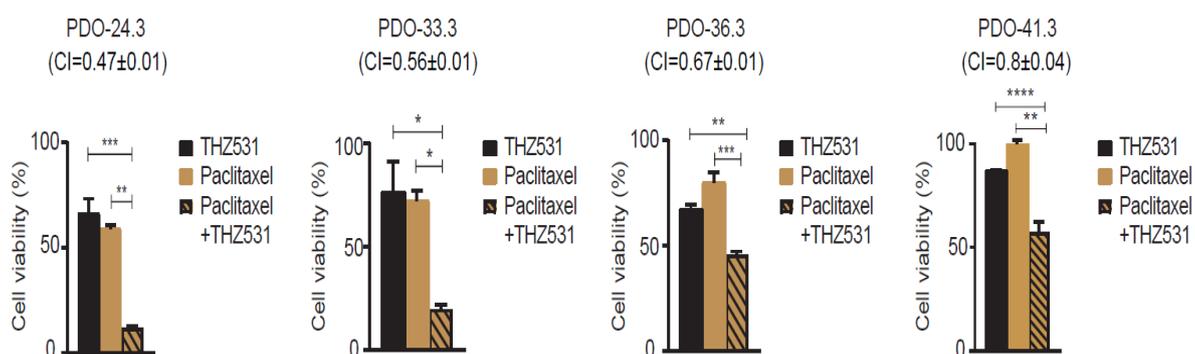


Fig. 13 Risposta degli organoidi al trattamento con THZ531, con Paclitaxel e al trattamento combinato con entrambe i farmaci.

Contrariamente a quanto precedentemente riportato in letteratura (12) noi non abbiamo osservato effetti significativi dal trattamento combinato con THZ531 e carboplatino, il chemioterapico di prima linea nel trattamento del HGSOc. Supponendo che questi risultati fossero dovuti alla spiccata sensibilità di tutti gli organoidi al solo carboplatino, come si osserva per la gran parte degli HGSOc alla

diagnosi, abbiamo testato una linea cellulare primaria di HGSOC (OV.GEM11) che era platino-resistente (15) (fig. 14).

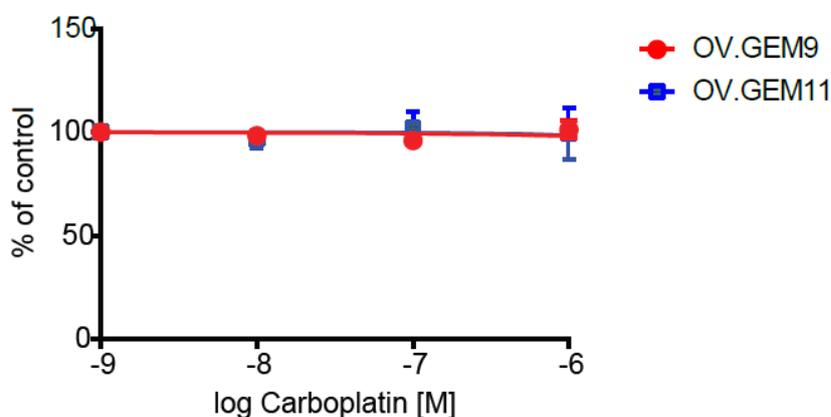


Fig. 14 Risposta della linea cellulare OV.GEM11 al trattamento con carboplatino.

Come atteso, in questa linea cellulare il co-trattamento con THR531 ha significativamente aumentato l'effetto citotossico del carboplatino, sopprimendo quasi completamente la vitalità cellulare nel campione testato (fig.15).

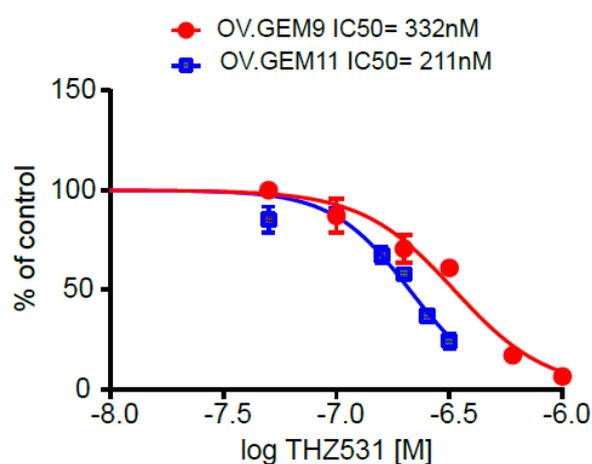


Fig. 15 Risposta della linea cellulare OV.GEM11 al trattamento combinato con carboplatino e THR531

Questi risultati indicano che la doppia inibizione di *CDK12* e *CDK13* potrebbe aiutare a superare i meccanismi di resistenza, innati o acquisiti, nei riguardi dei trattamenti chemioterapici standard.

## DISCUSSIONE

In letteratura è stato precedentemente riportato che *CDK12* e *CDK13* potevano rappresentare dei target terapeutici nei cancro umani (5,19) ed anche nel HGSOC (12, 20). *CDK12* e *CDK13* sono delle chinasi trascrizionali che promuovono, attraverso l'interazione con RNAP II, l'espressione genica, in particolare l'espressione di geni lunghi, come i geni che codificano per le proteine impegnate nel meccanismo di riparazione dei danni al DNA cellulare (6, 21, 22, 23).

Nel nostro studio confermiamo l'elevata sensibilità del HGSOC alla concomitante inibizione di *CDK12* e *CDK13*.

Un avanzamento apportato dal nostro studio è rappresentato dall'impiego di PDOs, i quali rappresentano un modello clinico molto valido per lo studio del HGSOC, neoplasia maligna caratterizzata da una spiccata eterogeneità nella risposta ai trattamenti standard, anche in scenari clinici apparentemente simili (1, 24). Abbiamo sviluppato i PDOs a partire da biopsie ottenute da sei pazienti, l'analisi dei biomarcatori del HGSOC ci ha confermato che tutti gli organoidi sviluppati hanno mantenuto il fenotipo della neoplasia di partenza. Gli organoidi di HGSOC così ottenuti hanno mostrato una spiccata sensibilità al trattamento con solo THZ531 e un effetto sinergico nel trattamento combinato con THZ531 ed Olaparib e con THZ531 e Paclitaxel.

Quattro organoidi sono risultati *BRCA1/2* non mutati e pertanto resistenti al trattamento con Olaparib ( $IC_{50} \geq 48 \mu M$ ). Tuttavia il

trattamento combinato di queste linee cellulari con THZ531 e PARPi ha significativamente aumentato l'efficacia del trattamento. Il risultato ottenuto sui PDOs indica chiaramente che l'inibizione di *CDK12* e *CDK13* può essere utilizzata per rendere sensibili al trattamento con PARPi quei casi di HGSOC *BRCA1/2* non mutati, normalmente resistenti al trattamento. Nonostante fosse già stato ipotizzato il possibile ruolo dell'inibizione di *CDK12* nella sensibilità del HGSOC alla terapia con Olaparib, i dati riportati in letteratura erano discordanti. Studi pubblicati nel 2014 indicavano che l'inibizione della funzione di *CDK12* conferiva sensibilità al trattamento con PARPi (8). Tuttavia un recente studio che utilizza sei diverse linee cellulari di cancro ovarico ha mostrato che la delezione del gene *CDK12* non migliorava la risposta al trattamento con Olaparib (25). Questa differenza nei risultati potrebbe essere dovuta alle differenti linee cellulari utilizzate ma è anche possibile che l'attività di *CDK13* possa compensare il difetto di funzione di *CDK12* e ridurre la sensibilità alla terapia con PARPi. In supporto a questa ipotesi, l'analisi massiva del trascrittoma di cellule che esprimono analoghi di *CDK12* e *CDK13* indica che la singola inibizione di queste chinasi produce minimi effetti sulla vitalità cellulare mentre la loro simultanea inibizione determina la morte cellulare e un maggiore sconvolgimento del trascrittoma cellulare (23). Inoltre queste due chinasi hanno mostrato un effetto sinergico nella promozione dell'oncogenesi del HGSOC (12), suggerendo che è necessario una inibizione concomitante delle loro funzioni per

bloccare le loro funzioni pro-oncogene nelle cellule di cancro ovarico.

Il nostro studio dimostra che il concomitante trattamento con THZ531 migliora la citotossicità del Paclitaxel nelle cellule di HGSOc (1, 24). Come nel caso dell'Olaparib, THZ531 ha mostrato un effetto sinergico con il Paclitaxel in tutti i quattro organoidi testati anche se il suo effetto è stato maggiore negli organoidi intrinsecamente più sensibili a questo farmaco. Il Paclitaxel blocca il ciclo cellulare in fase G2/M interferendo con la formazione del fuso mitotico, promuovendo la formazione di legami stabili tra i microtubuli (26). Allo stesso modo il trattamento con THZ531 blocca il ciclo cellulare in fase G2/M con accumulo di danni al DNA cellulare.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *The Lancet*. 2019 Mar;393(10177):1240–53.
2. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer*. 2009 Mar 15;115(6):1234–44.
3. Bowtell DD, Böhm S, Ahmed AA, Aspuria PJ, Bast RC, Beral V, et al. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Nov 23;15(11):668–79.
4. Naro C, Bielli P, Sette C. Oncogenic dysregulation of pre-mRNA processing by protein kinases: challenges and therapeutic opportunities. *FEBS J*. 2021 Nov 27;288(21):6250–72.
5. Pilarova K, Herudek J, Blazek D. CDK12: cellular functions and therapeutic potential of versatile player in cancer. *NAR Cancer*. 2020 Mar 1;2(1).
6. Blazek D, Kohoutek J, Bartholomeeusen K, Johansen E, Hulinkova P, Luo Z, et al. The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression

- of DNA damage response genes. *Genes Dev.* 2011 Oct 15;25(20):2158–72.
7. Johnson SF, Cruz C, Greifenberg AK, Dust S, Stover DG, Chi D, et al. CDK12 Inhibition Reverses De Novo and Acquired PARP Inhibitor Resistance in BRCA Wild-Type and Mutated Models of Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep.* 2016 Nov;17(9):2367–81.
  8. Bajrami I, Frankum JR, Konde A, Miller RE, Rehman FL, Brough R, et al. Genome-wide Profiling of Genetic Synthetic Lethality Identifies CDK12 as a Novel Determinant of PARP1/2 Inhibitor Sensitivity. *Cancer Res.* 2014 Jan 1;74(1):287–97.
  9. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011 Jun 30;474(7353):609–15.
  10. Ekumi KM, Paculova H, Lenasi T, Pospichalova V, Böskén CA, Rybarikova J, et al. Ovarian carcinoma CDK12 mutations misregulate expression of DNA repair genes via deficient formation and function of the Cdk12/CycK complex. *Nucleic Acids Res.* 2015 Mar 11;43(5):2575–89.
  11. Joshi PM, Sutor SL, Huntoon CJ, Karnitz LM. Ovarian Cancer-associated Mutations Disable Catalytic Activity of CDK12, a Kinase That Promotes Homologous Recombination Repair and Resistance to Cisplatin and Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry.* 2014 Mar;289(13):9247–53.

12. Cheng L, Zhou S, Zhou S, Shi K, Cheng Y, Cai MC, Ye K, Lin L, Zhang Z, Jia C, Xiang H, Zang J, Zhang M, Yin X, Li Y, Di W, Zhuang G, Tan L. Dual inhibition of CDK12/CDK13 targets both tumor and immune cells in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2022 Jul 20;CAN-22-0222.
13. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer.* 2018 Jul;18(7):407-418.
14. Hill SJ, Decker B, Roberts EA, Horowitz NS, Muto MG, Worley MJ Jr, Feltmate CM, Nucci MR, Swisher EM, Nguyen H, Yang C, Morizane R, Kochupurakkal BS, Do KT, Konstantinopoulos PA, Liu JF, Bonventre JV, Matulonis UA, Shapiro GI, Berkowitz RS, Crum CP, D'Andrea AD. Prediction of DNA Repair Inhibitor Response in Short-Term Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids. *Cancer Discov.* 2018 Nov;8(11):1404-1421.
15. Ciucci A, Buttarelli M, Fagotti A, Scambia G, Gallo D. Preclinical models of epithelial ovarian cancer: practical considerations and challenges for a meaningful application. *Cell Mol Life Sci.* 2022 Jun 16;79(7):364.
16. Chou T C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul.* 1984;22:27-55.
17. Zhang T, Kwiatkowski N, Olson CM, Dixon-Clarke SE, Abraham BJ, Greifenberg AK, Ficarro SB, Elkins JM, Liang Y, Hannett NM, Manz T, Hao M, Bartkowiak B,

- Greenleaf AL, Marto JA, Geyer M, Bullock AN, Young RA, Gray NS. Covalent targeting of remote cysteine residues to develop CDK12 and CDK13 inhibitors. *Nat Chem Biol.* 2016 Oct;12(10):876-84. doi: 10.1038/nchembio.2166.
18. Turinetto V, Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res.* 2015 Mar 11;43(5):2489-98.
19. Naro C, De Musso M, Delle Monache F, Panzeri V, de la Grange P, Sette C. The oncogenic kinase NEK2 regulates an RBFOX2-dependent pro-mesenchymal splicing program in triple-negative breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021b Dec 20;40(1):397.
20. Lin L, Shi K, Zhou S, Cai MC, Zhang C, Sun Y, Zang J, Cheng L, Ye K, Ma P, Shen P, Zhang M, Cheng Y, Qi C, Li Y, Yin X, Zheng Y, Tan L, Zhuang G, Zang R. SOX17 and PAX8 constitute an actionable lineage-survival transcriptional complex in ovarian cancer. *Oncogene.* 2022 Mar;41(12):1767-1779. doi: 10.1038/s41388-022-02210-3.
21. Dubbury SJ, Boutz PL, Sharp PA. CDK12 regulates DNA repair genes by suppressing intronic polyadenylation. *Nature.* 2018 Dec;564(7734):141-145. doi: 10.1038/s41586-018-0758-y.

22. Krajewska M, Dries R, Grasseti AV, Dust S, Gao Y, Huang H, Sharma B, Day DS, Kwiatkowski N, Pomaville M, Dodd O, Chipumuro E, Zhang T, Greenleaf AL, Yuan GC, Gray NS, Young RA, Geyer M, Gerber SA, George RE. CDK12 loss in cancer cells affects DNA damage response genes through premature cleavage and polyadenylation. *Nat Commun.* 2019 Apr 15;10(1):1757. doi: 10.1038/s41467-019-09703-y.
23. Fan Z, Devlin JR, Hogg SJ, Doyle MA, Harrison PF, Todorovski I, Cluse LA, Knight DA, Sandow JJ, Gregory G, Fox A, Beilharz TH, Kwiatkowski N, Scott NE, Vidakovic AT, Kelly GP, Svejstrup JQ, Geyer M, Gray NS, Vervoort SJ, Johnstone RW. CDK13 cooperates with CDK12 to control global RNA polymerase II processivity. *Sci Adv.* 2020 Apr 29;6(18):eaaz5041. doi: 10.1126/sciadv.aaz5041.
24. Lorusso D, Ceni V, Daniele G, Salutati V, Pietragalla A, Muratore M, Nero C, Ciccarone F, Scambia G. Newly diagnosed ovarian cancer: Which first-line treatment? *Cancer Treat Rev.* 2020 Dec;91:102111.b
25. Coelho R, Tozzi A, Disler M, Lombardo F, Fedier A, López MN, Freuler F, Jacob F, Heinzelmann-Schwarz V. Overlapping gene dependencies for PARP inhibitors and carboplatin response identified by functional CRISPR-Cas9 screening in ovarian cancer. *Cell Death Dis.* 2022 Oct 28;13(10):909.

26. Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(3):1561–1565.
27. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011. 474(7353):609-15. doi: 10.1038/nature10166. PMID: 21720365.
28. Curtin NJ, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2020 Oct;19(10):711-736.
29. Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol*. 2015 Sep;25(9):545-55.
30. George A, Kaye S, Banerjee S. Delivering widespread BRCA testing and PARP inhibition to patients with ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 May;14(5):284-296.
31. Harlen KM, Churchman LS. The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Apr;18(4):263-273. doi: 10.1038/nrm.2017.10.
32. Kopper O, de Witte CJ, Löhmußaar K, Valle-Inclan JE, Hami N, Kester L, Balgobind AV, Korving J, Proost N, Begthel H, van Wijk LM, Revilla SA, Theeuwsen R, van de Ven M, van Roosmalen MJ, Ponsioen B, Ho

- VWH, Neel BG, Bosse T, Gaarenstroom KN, Vrieling H, Vreeswijk MPG, van Diest PJ, Witteveen PO, Jonges T, Bos JL, van Oudenaarden A, Zweemer RP, Snippert HJG, Kloosterman WP, Clevers H. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat Med.* 2019 May;25(5):838-849. doi: 10.1038/s41591-019-0422-6.
33. Levine AJ. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer.* 2020 Aug;20(8):471-480.
34. Motoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Feb;14(1):11-6.
35. Nam EA, Cortez D. ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem J.* 2011 Jun 15;436(3):527-36.
36. Naro C, Jolly A, Di Persio S, Bielli P, Setterblad N, Alberdi AJ, Vicini E, Geremia R, De la Grange P, Sette C. An Orchestrated Intron Retention Program in Meiosis Controls Timely Usage of Transcripts during Germ Cell Differentiation. *Dev Cell.* 2017 Apr 10;41(1):82-93.e4.
37. Naro C, Pellegrini L, Jolly A, Farini D, Cesari E, Bielli P, de la Grange P, Sette C. Functional Interaction between U1snRNP and Sam68 Insures Proper 3' End Pre-mRNA Processing during Germ Cell

- Differentiation. *Cell Rep.* 2019 Mar 12;26(11):2929-2941.e5.
38. Nero C, Vizzielli G, Lorusso D, Cesari E, Daniele G, Loverro M, Scambia G, Sette C. Patient-derived organoids and high grade serous ovarian cancer: from disease modeling to personalized medicine. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021 Mar 31;40(1):116. doi: 10.1186/s13046-021-01917-7.
  39. Parashar D, Nair B, Geethadevi A, George J, Nair A, Tsaih SW, Kadamberi IP, Gopinadhan Nair GK, Lu Y, Ramchandran R, Uyar DS, Rader JS, Ram PT, Mills GB, Pradeep S, Chaluvally-Raghavan P. Peritoneal Spread of Ovarian Cancer Harbors Therapeutic Vulnerabilities Regulated by FOXM1 and EGFR/ERBB2 Signaling. *Cancer Res.* 2020 Dec 15;80(24):5554-5568.
  40. Quereda V, Bayle S, Vena F, Frydman SM, Monastyrskyi A, Roush WR, Duckett DR. Therapeutic Targeting of CDK12/CDK13 in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Cell.* 2019 Nov 11;36(5):545-558.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2019.09.004.
  41. Tian B, Manley JL. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Jan;18(1):18-30.
  42. Tien JF, Mazloomian A, Cheng SG, Hughes CS, Chow CCT, Canapi LT, Oloumi A, Trigo-Gonzalez G,

- Bashashati A, Xu J, Chang VC, Shah SP, Aparicio S, Morin GB. CDK12 regulates alternative last exon mRNA splicing and promotes breast cancer cell invasion. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jun 20;45(11):6698-6716.
43. Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science.* 2019 Jun 7;364(6444):952-955. doi: 10.1126/science.aaw6985.
44. Venters CC, Oh JM, Di C, So BR, Dreyfuss G. U1 snRNP Telescripting: Suppression of Premature Transcription Termination in Introns as a New Layer of Gene Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019 Feb 1;11(2):a032235.
45. Zeng M, Kwiatkowski NP, Zhang T, Nabet B, Xu M, Liang Y, Quan C, Wang J, Hao M, Palakurthi S, Zhou S, Zeng Q, Kirschmeier PT, Meghani K, Leggett AL, Qi J, Shapiro GI, Liu JF, Matulonis UA, Lin CY, Konstantinopoulos PA, Gray NS. Targeting MYC dependency in ovarian cancer through inhibition of CDK7 and CDK12/13. *Elife.* 2018 Nov 13;7:e39030.
46. Mhawech-Fauceglia P, Wang D, Samrao D, Godoy H, Ough F, Liu S, Pejovic T, Lele S. Pair Box 8 (PAX8) protein expression in high grade, late stage (stages III and IV) ovarian serous carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2012 Oct;127(1):198-201.