

SOMMARIO

Il Programma Oncotecnologico mira a sviluppare nuove ed efficaci terapie anti-tumorali, sulla base delle più recenti acquisizioni della tecnologia biomedica. Il programma prevede l'esecuzione di diversi approcci scientifico-strategici, utilizzando collaborazioni multipolari tra laboratori afferenti all'ISS, agli IRCCS ed ai centri di ricerca universitari ed extra-universitari. Come dettagliato di seguito, il Programma ha già conseguito diversi risultati biomedici significativi, pubblicati su riviste scientifiche assai qualificate, e di conseguenza recensiti dai media nazionali ed internazionali.

- Il Sottoprogetto I è focalizzato sul test in vitro di resistenza delle cellule tumorali ai chemioterapici antitumorali a dosaggi assai elevati (test "extreme drug resistance", EDR), capace di predire la combinazione ottimale di farmaci da adottare in ciascun paziente. E' iniziato uno studio clinico randomizzato multicentrico per valutare in forma conclusiva l'impatto clinico-terapeutico del test EDR. Questo sottoprogetto è inizialmente focalizzato sui tumori ovarici e verrà poi esteso a quelli della mammella e ad altre neoplasie solide, avvalendosi di nuove procedure di saggio automatizzato. L'applicazione estensiva di questo approccio di chemioterapia "mirata" condurrebbe ad evidenti benefici sul piano clinico-terapeutico e a una rilevante riduzione di spesa per il SSN.

Gli altri Sottoprogetti prevedono:

- Strategie basate sull'analisi genomica delle cellule tumorali, mediante l'uso dei cosiddetti "gene arrays" che consentiranno di (a) identificare i meccanismi molecolari della farmacoresistenza e (b) di sviluppare farmaci capaci di interferire specificamente a livello dei processi molecolari oncogenetici, limitando gli effetti secondari sulle cellule normali (Sottoprogetto II). In quest'ambito sono stati identificati dei nuovi marcatori prognostici e una serie di alterazioni molecolari responsabili della crescita tumorale e della bassa risposta alla chemioterapia che caratterizza una parte consistente dei carcinomi renali, mammari e ovarici. Inoltre sono stati proposti dei modelli preclinici molto promettenti per la cura di queste patologie.

- Studi di biologia cellulare e molecolare che mirano ad ottimizzare le terapie anti-tumorali in modelli preclinici, sia attraverso l'isolamento e l'utilizzo di cellule staminali neoplastiche (Sottoprogetto III), sia interferendo con la neangiogenesi e il microambiente tumorale (Sottoprogetto IVA). Questi studi hanno già fornito informazioni del massimo rilievo sulla patogenesi e sulla terapia dei tumori cerebrali, del colon, della tiroide e della mammella, per i quali è stato possibile allestire dei modelli sperimentali preclinici assai affidabili. Inoltre è stata proposta una nuova terapia biologica pro-apoptotica per la cura dei glioblastomi, tumori altamente maligni caratterizzati da una sopravvivenza media di appena un anno.

- L'allestimento di una serie di modelli sperimentali che permettano di ottimizzare l'impiego di molecole antiflogistiche nelle neoplasie della mammella, della prostata e del colon-retto (Sottoprogetto IVB). In quest'ambito sono stati messi a punto dei modelli sperimentali particolarmente sofisticati che permetteranno di sviluppare nuove terapie per delle condizioni patologiche che costituiscono un obiettivo primario della

ricerca oncologica, come l'insorgenza di metastasi epatiche nei carcinomi del colon-retto.

- L'utilizzo di sequenze antisense per la modulazione dell'espressione di bcl2 nei linfomi a cellule B follicolari: questa proposta si colloca nel quadro generale delle terapie con sequenze antisense, potenzialmente assai rilevanti sia a livello sperimentale, sia anche per l'applicazione clinica (Sottoprogetto V). Durante questo primo anno sono state disegnate una serie di molecole che verranno presto validate per essere utilizzate in terapia.

- Un approccio innovativo di terapia antitumorale, basata sull'uso di farmaci anti-retrovirali inibitori della proteasi di HIV e della trascrittasi inversa, da impiegare da soli o in combinazione in una serie di studi in vitro e in vivo (Sottoprogetto VI). In questo primo anno sono state ottenute una serie di evidenze sperimentali che confermano la potenziale efficacia terapeutica di questi inibitori sui tumori del polmone, del colon, della prostata e sul melanoma.

RELAZIONE ANNUALE SULLO STATO DI REALIZZAZIONE

SINTESI INTRODUTTIVA

Il sottoprogetto I intitolato “Le basi metodologiche per una chemioterapia anti-tumorale mirata: il saggio dell’*extreme drug resistance* nel carcinoma ovario ed in altre neoplasie” è stato dedicato alla messa a punto del test dell’*extreme drug resistance* (EDR). Questo test consiste nel valutare in vitro, in maniera clinicamente predittiva, il grado di chemioresistenza delle cellule tumorali del carcinoma ovarico nei confronti dei farmaci anti-tumorali comunemente utilizzati nel trattamento di questa neoplasia. Durante il 2004 questo test è stato eseguito su più di 150 casi di carcinoma dell’ovaio. I risultati del test nei casi finora analizzati ci hanno consentito di valutare il profilo di chemioresistenza in vitro del carcinoma ovario: il 10% delle pazienti presenta una resistenza completa al cisplatino/carboplatino; il 35% delle pazienti presenta una resistenza completa al tavolo/taxotere. Sono anche disponibili anche tutti i profili di chemioresistenza anche per tutti gli altri farmaci utilizzati nella terapia del carcinoma ovario. Queste osservazioni hanno avuto un ruolo fondamentale nel ridisegnare lo studio clinico controllato di fase III che verrà realizzato nell’immediato futuro e che si baserà nel paragonare la sopravvivenza in un gruppo di pazienti sottoposte a chemioterapia standard (carboplatino+taxotere) o a chemioterapia mirata in base ai risultati del test dell’EDR. In parallelo è stato possibile dimostrare che cellule primarie di carcinoma ovario resistenti al cisplatino ed al tavolo sono sensibili all’azione di inibitori del proteosoma, quali MG132 e Velcade (quest’ultimo è già disponibile come farmaco utilizzabile in clinica). TRAIL è una citochina appena entrata in una serie di trias clinici di fase 1 per la sua azione antitumorale specifica e apparentemente priva di effetti collaterali. In una serie di esperimenti, è stato dimostrato che l’azione anti-tumorale degli inibitori del proteosoma viene considerevolmente potenziata da TRAIL. Queste osservazioni potrebbero rappresentare la base per lo sviluppo di trattamenti alternativi del carcinoma dell’ovaio, soprattutto delle forme chemioresistenti.

Il sottoprogetto II intitolato “Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell’oncogenesi” ha fornito dei dati estremamente importanti per lo sviluppo di nuove terapie per la cura dei carcinomi renali, mammari e ovarici.

Attraverso un’analisi approfondita dei carcinomi del dotto collettore del rene, che rappresentano una variante molto aggressiva dei tumori renali, sono state individuate delle alterazioni responsabili della crescita tumorale e della bassa risposta alla chemioterapia che caratterizza questi tumori. In particolare, i geni di soppressione tumorale FEZ1, Fhit e p27 sono spesso assenti o poco espressi nella maggioranza di questi tumori. Pertanto si stanno costruendo una serie di vettori che consentano una efficace terapia genica per questi tumori per i quali non esistono in atto terapie risolutive.

L’assenza del gene di soppressione tumorale FEZ1 è strettamente associato alla resistenza al taxolo nei tumori della mammella. Per identificare i meccanismi molecolari alla base di questa resistenza alla terapia con taxani,

sono stati creati dei sofisticati modelli cellulari di carcinoma della mammella che permettono di modulare l'espressione di FEZ1 e di studiarne in maniera estremamente precisa l'azione antitumorale, in modo tale da fornire una serie di informazioni cruciali per l'identificazione di importanti bersagli farmacologici.

Informazioni di estremo rilievo sono state fornite dagli studi sui carcinomi ovarici attraverso l'esecuzione dei profili di espressione genica che hanno confrontato le cellule ovariche normali con quelle tumorali. Inoltre, all'interno dei tumori ovarici sono stati confrontati quelli resistenti a quelli sensibili alla chemioterapia. Da questi studi sono emersi dei dati estremamente rilevanti dal punto di vista terapeutico. I tumori chemioresistenti hanno mostrato un'elevata espressione del gene c-erb-B2 e della corrispondente proteina HER2/neu. Se da una parte questa proteina conferisce una estrema aggressività e resistenza ai chemioterapici, questi dati suggeriscono di poter trattare efficacemente con l'Herceptin i tumori ovarici resistenti alla chemioterapia, dato che questo anticorpo specifico per HER2/neu viene utilizzato con successo nella terapia di alcuni tipi di carcinoma della mammella. Inoltre, sempre dall'analisi di questi profili genici, è emerso che, a differenza delle normali, le cellule di carcinoma ovarico esprimono claudina 3 e claudina 4, i recettori naturali della enterotossina del *Clostridium Perfringens*. Poiché un'espressione elevata di questi recettori conferisce grande sensibilità all'attività citotossica della tossina, mentre le cellule dei tessuti normali (che sono caratterizzate da una bassa espressione della claudina 3 e 4) sono insensibili al suo effetto citossico, la somministrazione intraperitoneale di enterotossina del *Clostridium Perfringens* può rappresentare una nuova terapia altamente specifica e potenzialmente efficace per il trattamento dei tumori ovarici chemioresistenti. In accordo con questa ipotesi, la somministrazione intraperitoneale di questa enterotossina si è dimostrata efficace in un modello preclinico di tumore ovarico umano chemioresistente.

Il sottoprogetto III intitolato "Le basi cellulari della farmacoresistenza tumorale: le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi anti-apoptotici" ha fornito durante il primo anno di attività dati e indicazioni di estremo rilievo sia per la patogenesi che per la terapia oncologica. Sono state infatti isolate dai tumori del colon, del cervello, della tiroide, dello stomaco, della mammella e dell'ovaio delle cellule indifferenziate che con ogni probabilità costituiscono la sorgente cellulare di queste neoplasie. Queste cellule sono state coltivate ed espanse in vitro in modo tale da poterne studiare l'espressione dei geni coinvolti nella cancerogenesi e nella risposta alla terapia citotossica. Inoltre, le putative cellule staminali neoplastiche di carcinoma della tiroide, del colon, della mammella e di glioblastoma sono state inoculate sottocute in topi immunodeficienti che dopo 4-6 settimane hanno mostrato la comparsa di un tumore istologicamente molto simile al tumore del paziente da cui sono state isolate queste cellule. La possibilità di riprodurre nell'animale il tumore che colpisce un singolo paziente costituisce uno strumento formidabile sia per studi diagnostici che per l'allestimento di modelli preclinici che consentano una validazione particolarmente affidabile delle terapie sperimentali.

Attraverso l'impiego di cellule primarie di glioblastoma è stata individuata una possibile strategia terapeutica per la cura di questi tumori che sono considerati incurabili e conducono invariabilmente alla morte i pazienti che ne sono affetti pochi mesi dopo la diagnosi. Tramite un'analisi dell'espressione dei geni che regolano la risposta terapeutica a TRAIL sono stati individuate le alterazioni dei mediatori della morte cellulare espressi in modo alterato nei glioblastomi. La ridotta espressione di caspasi 8 e del recettore 1 di TRAIL è stata trovata associata all'aumentata espressione di PEA-15/PED, un gene che inibisce la morte cellulare. Queste alterazioni sono responsabili della refrattarietà a TRAIL di questi tumori. In una serie di esperimenti in vitro e in vivo, è stato possibile rimuovere queste alterazioni e rendere sensibile a TRAIL i glioblastomi tramite l'impiego di decitabina, un inibitore delle metiltrasferasi attualmente utilizzato in trials di fase II per la terapia di tumori ematologici. L'impiego combinato di decitabina e TRAIL ha permesso di curare topi trapiantati con glioblastomi di origine umana.

Infine sono stati condotti una serie di studi sul ruolo dei microRNA nella tumorigenesi, specificamente a livello delle cellule staminali neoplastiche. Questi piccoli RNA si legano a specifiche sequenze complementari presenti in una serie di RNA messaggeri che per lo più non sono ancora stati identificati. In questo primo anno è stato dimostrato un coinvolgimento dei microRNA nella leucemia linfocitica cronica di tipo B dove miR-15 e miR-16 sono frequentemente assenti o poco espressi nel 68% dei pazienti analizzati. Dato che l'analisi di questi microRNA richiede un'elevata quantità di materiale biologico, spesso non disponibile, è stato messo a punto un microarray di oligonucleotidi di lunghezza di 40 basi, contenenti 368 sonde specifiche per microRNA umani e murini. Il chip è stato validato con diversi esperimenti rivelando con diverse quantità di RNA (da 2,5 a 20 microgrammi) un coefficiente di correlazione tra 0,97 e 0,98. Pertanto in futuro potremo utilizzare tale strumento per quantificare in tessuti neoplastici anche di dimensioni ridotte l'espressione dei microRNA valutandone così su vasta scala il ruolo svolto all'interno dei processi tumorigenici. Tramite l'impiego di questo chip, è stata analizzata l'espressione dei microRNA nelle cellule staminali neurali confrontandole con le staminali neoplastiche di glioblastoma. I microRNA espressi in maniera differenziale sono attualmente oggetto di studio. La possibilità di utilizzare i microRNA in vivo potrebbe offrire un eccezionale strumento terapeutico per la terapia dei tumori, a livello delle cellule staminali neoplastiche.

Nell'ambito del **sottoprogetto IVA** intitolato "Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative" è stato svolto un notevole lavoro preparatorio per lo sviluppo di nuove terapie basate sull'inibizione della neoangiogenesi tumorale. Sono state analizzate cellule microvascolari di cervello, polmone e sottocute, paragonandole a cellule macrovascolari di aorta, attraverso una analisi di 12.000 diversi geni. Inoltre il fattore angiogenetico FGF2, di estrema rilevanza nella neoangiogenesi tumorale, è stato espresso in cellule micro- e macrovascolari che sono poi state analizzate per l'espressione di 22.000 diversi trascritti. Questi studi hanno permesso di identificare una serie di geni che

costituiscono potenziali bersagli terapeutici per bloccare l'angiogenesi e la metastatizzazione tumorale. I geni coinvolti appartengono alla famiglia dei fattori di crescita e dei loro recettori, oppure codificano per proteine coinvolte nel segnale intracellulare, proteasi e proteine della matrice extracellulare. Tra i geni maggiormente e costantemente indotti dall'FGF2 rientra sicuramente il gene per l'osteopontina, proteina coinvolta nella crescita e metastatizzazione tumorale.

Per quanto riguarda la creazione di strumenti farmacologici per inibire i meccanismi pro-angiogenesi identificati, sono state caratterizzate nuove eparine biotecnologiche a basso peso molecolare, che inibiscono l'attività angiogenetica di FGF2, e una serie di derivati del trans-resveratrolo, caratterizzati da una attività antiangiogenetica basata sulla capacità di destabilizzare i microtubuli delle cellule endoteliali.

Inoltre è stato individuato il meccanismo responsabile dell'azione anti-angiogenetica degli inibitori delle proteasi dell'HIV (indinavir e saquinavir) che si sono dimostrati in grado di far regredire le lesioni angioproliferative in modelli di sarcoma di Kaposi. Una serie di studi molecolari e cellulari hanno dimostrato che questi composti non agiscono direttamente sulle proteasi della matrice, ma esercitano le proprie azioni anti-angiogeniche e anti-invasive interferendo con il legame delle integrine ai substrati, con la loro attivazione e/o con la loro rilocalizzazione nei lamellipodi e negli invadopodi. Inoltre è stato evidenziato che l'integrina $\alpha_v\beta_3$ è un bersaglio preferenziale di questi farmaci, spiegando così, almeno in parte, la loro capacità di inibire l'attivazione autoproteolitica delle proteasi della matrice.

Infine, sempre per quanto concerne gli studi sulla neoangiogenesi, sono stati generati dei vettori che consentiranno di creare topi con espressione tessuto-specifica ed inducibile dei vari recettori del VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) e dell'angiopoietina-2, consentendo un approccio sistematico nel knocking out dei geni fondamentali per l'angiogenesi e la vasculogenesi. Il motivo per il quale è stato utilizzato il sistema Cre-lox è dovuto alla mortalità embrionale del knockout costitutivo.

Questo tipo di studi potrebbe fornire delle informazioni fondamentali per lo sviluppo di terapie antitumorali basate sull'inibizione dell'angiogenesi e della formazione delle metastasi.

Il sottoprogetto IVB intitolato "Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di NF- κ B e di scavengers di radicali liberi in modelli murini di carcinoma del colon, mammario e della prostata", ha fornito una serie di dati che dimostrano come i principali componenti della risposta infiammatoria siano attivi nelle cellule dei tumori della prostata in progressione. Infatti, le proteine classicamente espresse nei leucociti durante l'infiammazione (iNOS e COX-2) sembrano essere indotte gradualmente durante la trasformazione tumorale delle cellule prostatiche. Nell'ipotesi che queste proteine infiammatorie contribuiscano alla trasformazione e alla crescita tumorale, è stato eseguito un trattamento in vivo con inibitori di NF- κ B e con scavengers di radicali liberi in tre modelli murini. A questo scopo sono stati predisposti ed espanse le colonie di due ceppi di topi transgenici predisposti al carcinoma mammario e al cancro prostatico. E' stato eseguito

un lavoro preliminare allo scopo di controllare, mediante un esame temporale, l'insorgenza del tumore nell'organo bersaglio e la presenza di eventuali metastasi in organi distanti. Questo obiettivo è stato perseguito mediante un'autopsia sistematica e lo studio istologico dei linfonodi regionali dell'organo-bersaglio e dei principali organi distanti. Gli studi iniziali sono stati condotti sui modelli del topo transgenico per il carcinoma mammario e nel cancro del colon del ratto trattato con un cancerogeno chimico (DMH – 1,2 dimetil-idrazina). Non si hanno ancora risultati sull'obiettivo di questo protocollo. I trattamenti dovrebbero terminare tra marzo e aprile del 2005. In questo stesso modello con DMH – 1,2 dimetil-idrazina si vuole inoltre dimostrare che il controllo della risposta flogistica rallenta la comparsa di metastasi epatiche. Pertanto è stato effettuato uno studio preliminare che utilizza l'inoculazione nella vena splenica di cellule tumorali di ratto singenico per indurre comparsa delle metastasi epatiche, in funzione della quantità delle cellule inoculate. Questo modello permetterà di valutare in maniera affidabile la capacità degli inibitori in esame di bloccare la diffusione metastatica al fegato dei tumori del colon.

Il sottoprogetto V intitolato "Regolazione del turnover di Bcl2 mediante RNA antisense" ha fornito una serie di dati sull'individuazione di trascritti antisense per Bcl2 nel database delle sequenze EST non ancora identificate. Inoltre è stato effettuato un minuzioso lavoro preliminare per la realizzazione di una RT-PCR filamento-specifica e per la valutazione dell'espressione dell'RNA antisense e di Bcl2 nel linfoma follicolare. I meccanismi molecolari del turnover dell'RNA messaggero di Bcl2 sono stati analizzati in relazione all'interazione della regione 3'UTR con le diverse proteine di legame ARE. Utilizzando il sistema dei tre ibridi è stata individuata una nuova proteina umana che interagisce con l'ARE di bcl-2 denominata TINO. E' stato dimostrato che il legame di TINO all'ARE di bcl-2 svolge un'azione regolatoria negativa sui livelli post-trascrizionali di bcl-2. Infine, sono stati disegnati una serie di oligoribonucleotidi che permettono di regolare il turnover di Bcl2. In seguito alla validazione di questi nucleotidi, si procederà a valutare la loro attività antitumorale, anche in combinazione con farmaci citotossici convenzionali.

Il sottoprogetto VI intitolato "Sviluppo di nuove terapie antitumorali basate sui farmaci anti-retrovirali inibitori della proteasi di HIV e inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, da soli o combinati: studi preclinici in vitro ed in vivo" ha fornito una serie di dati in vitro e in vivo che hanno validato l'effetto anti-angiogenico ed anti-tumorale degli inibitori delle proteasi dell'HIV. Inoltre è stata esaminata, in linee tumorali di vario tipo, l'azione degli inibitori della trascrittasi inversa sulla proliferazione di cellule di carcinoma polmonare e di adenocarcinoma coloretale, melanoma e carcinoma prostatico. L'esposizione di queste cellule ad inibitori farmacologici della trascrittasi inversa (nevirapina ed efavirenz) ha mostrato un drastico rallentamento della proliferazione e l'induzione di un processo differenziativo caratterizzato da cambiamenti morfologici e dalla comparsa di specifici marcatori.

Infine è stato condotto uno studio *in vivo* con efavirenz, in topi nudi inoculati con cellule tumorali umane di microcitoma, melanoma, colon carcinoma e carcinoma prostatico. Come osservato *in vitro*, anche *in vivo* il trattamento degli animali con efavirenz ha rallentato o bloccato del tutto la crescita dei quattro tipi di tumore. Questi risultati suggeriscono che gli inibitori della trascrittasi inversa possono costituire un'importante risorsa farmacologica nella terapia dei tumori solidi.

RELAZIONE DETTAGLIATA SULL'ATTIVITA' DEI SOTTOPROGETTI

Sottoprogetto I

**U.O. 01: Le basi metodologiche per una chemioterapia anti-tumorale
mirata: il saggio dell'EDR nel carcinoma ovarico ed in altre neoplasie
Responsabile Scientifico: Cesare Peschle**

L'attività di ricerca svolta durante il 2004 è stata rivolta essenzialmente alla messa a punto del test dell'extreme drug resistance (EDR). Questo test consiste nel valutare in vitro, in maniera clinicamente predittiva, il grado di chemioresistenza delle cellule tumorali del carcinoma ovarico nei confronti dei farmaci anti-tumorali comunemente utilizzati nel trattamento di questa neoplasia. Il test viene effettuato utilizzando un pezzo di tessuto tumorale ottenuto durante la rimozione chirurgica dello stesso, che viene dapprima ridotto in piccoli pezzi e successivamente digerito con enzimi che disaggregano la matrice extracellulare in modo da ottenere una sospensione cellulare composta da cellule isolate e da piccoli ammassi di cellule tumorali. Le cellule tumorali così isolate vengono coltivate in vitro in agar 0.8%, una condizione che consente la crescita selettiva delle cellule tumorali, in assenza ed in presenza dei vari farmaci utilizzati nella terapia del carcinoma ovarico. Dopo tre giorni di coltura viene aggiunta della timidina triziata e dopo altri due giorni di coltura vengono raccolte le cellule e vengono misurati i livelli d'incorporazione della timidina radioattiva nel DNA delle cellule tumorali. Se i farmaci hanno inibito la proliferazione delle cellule tumorali si osserva una forte diminuzione dei livelli d'incorporazione della timidina, mentre se essi non hanno inibito la proliferazione delle cellule tumorali i livelli d'incorporazione di timidina risulteranno simili a quelli osservati nel controllo.

Durante il 2004 abbiamo eseguito questo test su più di 150 casi di carcinoma dell'ovaio. Questo studio ci ha consentito di mettere a punto il test presso il nostro laboratorio e di validarlo ai fini di un suo possibile utilizzo di supporto all'attività clinica. In particolare, è stato possibile eseguire il test nel 78% dei casi analizzati: l'insuccesso era dovuto in circa il 90% dei casi alla disponibilità di quantità troppo limitate di tessuto tumorale e nel 10% ad una vitalità cellulare non ottimale. I risultati del test nei casi finora analizzati ci hanno consentito di valutare il profilo di chemioresistenza in vitro del carcinoma ovarico: il 10% delle pazienti presenta una resistenza completa al cisplatino/carboplatino; il 35% delle pazienti presenta una resistenza completa al tavolo/taxotere. Sono anche disponibili anche tutti i profili di chemioresistenza anche per tutti gli altri farmaci utilizzati nella terapia del carcinoma ovarico. Queste osservazioni hanno avuto un ruolo fondamentale nel ridisegnare lo studio clinico controllato di fase III che verrà realizzato nell'immediato futuro e che si baserà nel paragonare la sopravvivenza in un gruppo di pazienti sottoposte a chemioterapia standard (carboplatino+taxotere) o a chemioterapia mirata in base ai risultati del test dell'EDR.

In parallelo, una serie di ricerche di laboratorio è stata attivata. Nell'ambito di un primo filone di ricerca abbiamo determinato che la frazione di cellule CD44⁺/CD24⁻ contiene le cellule che sono in grado di generare in vitro colonie

di cellule tumorali attivamente proliferanti; studi successivi chiariranno se queste cellule sono in grado sviluppare in vivo il tumore dopo inoculo in topi immunodeficienti. Nell'ambito di un secondo filone di ricerca è stato possibile dimostrare che cellule primarie di carcinoma ovarico resistenti al cisplatino ed al taxolo sono sensibili all'azione di inibitori del proteosoma, quali MG132 e Velcade (quest'ultimo è già disponibile come farmaco utilizzabile in clinica). L'azione anti-tumorale degli inibitori del proteosoma viene considerevolmente potenziata da TRAIL, una citochina che attiva due potenti recettori di morte cellulare. E' interessante notare che le cellule di carcinoma dell'ovaio sono resistenti a TRAIL, ma in seguito al trattamento con inibitori del proteosoma vengono rese sensibili alla sua azione citolitica. Quest'azione permissiva degli inibitori del proteosoma sull'azione citotossica di TRAIL sembra essere dovuta in larga misura ad un'inibizione dell'espressione di molecole anti-apoptotiche della famiglia IAP. Questa interpretazione è direttamente supportata dall'osservazione che l'effetto degli inibitori del proteosoma viene mimato da piccoli peptidi che fungono da inibitori delle proteine IAP. Queste osservazioni potrebbero rappresentare la base per lo sviluppo di trattamenti alternativi del carcinoma dell'ovaio, soprattutto delle forme chemioresistenti.

Sottoprogetto II

U.O. 02: Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi

Responsabile Scientifico: Carlo M. Croce

In questo primo anno è stato studiato il ruolo di FEZ1 nel carcinoma renale. Il carcinoma del dotto collettore del rene rappresenta una variante rara, ma molto aggressiva del carcinoma renale. Ha origine dall'epitelio del dotto di Bellini, nella porzione distale del nefrone. Allo scopo di comprendere meglio la biologia di questo tumore è stata valutata l'espressione di cinque geni coinvolti nello sviluppo del cancro renale (FEZ1, FHIT, TP53, P27kip e BCL2). Sono stati così selezionati undici pazienti sottoposti a nefrectomia radicale per la presenza di carcinoma al dotto collettore del rene. Tutti i pazienti hanno avuto diagnosi documentata del carcinoma e nessuno di loro è stato sottoposto a terapia sistemica prima dell'asportazione del tumore. L'espressione dei cinque markers è stata valutata in associazione con l'analisi del decorso clinico (metastasi e stadio) con il test di Fisher. Per l'analisi sulla sopravvivenza è stato usato il metodo di Kaplan/Meier.

L'analisi immunoistochimica è stata ottenuta mediante procedure standard: le sezioni in paraffina sono state deparaffinate, reidratate con concentrazioni decrescenti di etanolo e montate. Per l'analisi sono stati utilizzati gli anticorpi anti-FEZ1, anti-Fhit, anti-p53, anti-p27, anti-Bcl2.

I risultati mostrano che FEZ1 è non rilevabile o ridotta nel 64% dei casi. Fhit è assente nel 27% dei casi, mentre l'overespressione di p53 è stata osservata nel 36% dei casi. L'analisi ha mostrato inoltre che p27 è assente in 5 degli 11 casi (45,5%). In 5 dei sei positivi p27 sembra espressa solo al livello citoplasmatico, mentre solo in uno è rilevabile anche al livello nucleare. L'espressione di Bcl2 è presente nel 36% dei tumori considerati. Inoltre vi è

una correlazione ($P=0.06$) tra perdita e riduzione dell'espressione di Fez e la presenza di metastasi linfo-nodali (1). Questi risultati ci permetteranno di ottimizzare le strategie di terapia genica sul carcinoma renale.

Pubblicazioni:

Vecchione A, Galetti TP, Gardiman M, Ishii H, Giarnieri E, Pagano F, Gomella LG, Croce CM, Baffa R.: Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical study of 11 cases. BMC Urol 2004, 4: 11-19

U.O. 03: Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi

Responsabile Scientifico: Alessandro D. Santin

Il cancro epiteliale dell'ovaio rimane la neoplasia ginecologica gravata dalla più alta letalità. Sebbene la maggioranza delle pazienti con cancro ovarico inizialmente risponda alla chirurgia e alla chemioterapia adiuvante basata sulla combinazione standard con Carboplatino e Taxolo, quasi il 90% sviluppa una recidiva neoplastica e inevitabilmente muore per malattia resistente alla chemioterapia. La scoperta di nuove terapie efficaci per il trattamento del tumore ovarico resistente alle terapie convenzionali rimane un'altissima priorità.

Attraverso lo studio dei profili di espressione genica basati sulla simultanea analisi di oltre 10,000 geni, il nostro gruppo di ricerca ha recentemente identificato una serie di geni altamente e differenzialmente espressi nei tumori ovarici. Tra questi geni quelli codificanti per i recettori di membrana denominati Claudina 3 e Claudina 4 sono risultati oltre 40 volte più espressi nei tumori ovarici rispetto al tessuto ovarico normale (Santin et al., *Int. J. Cancer*, 112;14-25;2004).

Nell'ambito del programma di ricerca oncotecnologico l'espressione di questi geni è stata ulteriormente studiata utilizzando metodiche quantitative (real time-PCR), e semiquantitative (immunoistochimica) in una serie di tumori ovarici sensibili o resistenti alla chemioterapia. Di grande importanza, i tumori resistenti alla chemioterapia sono risultati esprimere livelli significativamente più elevati di Claudina 3 e Claudina 4 rispetto ai tumori ovarici chemiosensibili.

Poiché queste due proteine appartenenti alla famiglia delle giunzioni serrate costituiscono i recettori umani naturali per la tossina prodotta dal *Clostridium Perfringens* (CPE), e sono altamente efficaci nel mediare il legame con la CPE e scatenare la seguente citolisi cellulare indotta dalla tossina, questi recettori di membrana possono rappresentare dei nuovi bersagli terapeutici altamente efficaci per la terapia dei tumori ovarici umani resistenti alla chemioterapia.

In supporto a questa ipotesi nell'ambito del programma di ricerca oncotecnologico, abbiamo esposto alla CPE numerosi tumori ovarici sierosi papilliferi (la variante istologica più comune di tumore dell'ovaio), primari, metastatici e resistenti alla chemioterapia esprimenti alti livelli di Claudina 3 e/o di Claudina 4 *in vitro* e abbiamo scoperto che senza alcuna

eccezione, ma a differenza dei tessuti normali non esprimenti alti livelli di Claudina 3 e Claudina 4, questi tumori sono altamente sensibili alla citolisi mediata dalla CPE (lisi cellulare del 100% delle cellule neoplastiche ovariche esposte alla tossina).

La completa caratterizzazione dei recettori Claudina 3 e Claudina 4 come nuovi biomarkers per il trattamento innovativo del cancro ovarico resistente alla chemioterapia è descritta nel manoscritto allegato, attualmente in considerazione per pubblicazione dalla rivista *Cancer Res*.

Pubblicazioni:

Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Canè S, Gokden M, Roman JJ, O'Brien T, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J, Pecorelli S. Discrimination between uterine serous papillary carcinomas and ovarian serous papillary tumors by gene expression profiling. *Br. J. Cancer* 90: 1814-1824, 2004.

Santin AD. Role of immunohistochemical expression of HER2/neu in high grade ovarian cancer. *Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas, Volume 4, Molecular pathology, Gastrointestinal Carcinoma, and Ovarian Carcinoma*. Edited by M.A. Hayat. In press.

Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Canè S, Gokden M, Roman JJ, O'Brien T, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J, Pecorelli S. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int. J Cancer*. 112; 14-25; 2004.

Santin AD, Cane S, Bellone S, Palmieri M, Siegel ER, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Cannon MJ, Pecorelli S. Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of clostridium perfringens enterotoxin (CPE). *Cancer Res*, in press.

U.O. 04: Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi

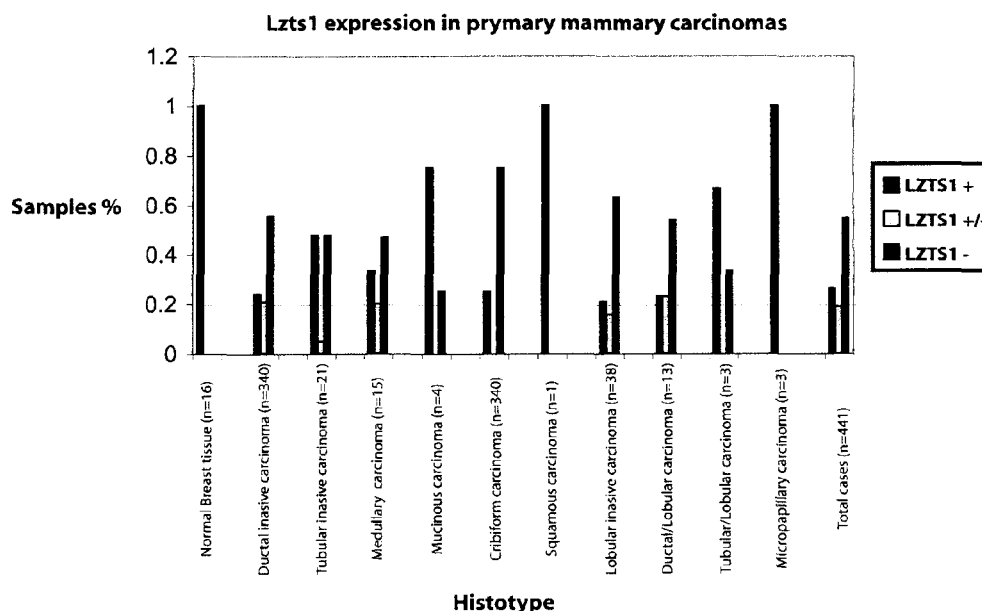
Responsabile Scientifico: A. Vecchione

Valutazione dell'espressione di FEZ1, ER e PR in carcinomi mammari primari: Abbiamo esaminato il livello di espressione di FEZ1 in 441 preparati istologici di carcinoma mammario (CM) (più 16 controlli positivi) mediante l'utilizzo di "tissue micro-array".

Ciascun caso, classificato secondo il particolare istotipo, è corredato di storia clinica, eventuale terapia somministrata e follow-up.

Il 100% (16/16) dei tessuti mammari normali ha mostrato positività per l'espressione di FEZ1. Il 54,7% (241/441) dei casi esaminati è negativo per Fez1, nel 19% (84/441) dei casi si osserva una espressione moderata, mentre soltanto il 26,3% (116/441) mostra una diffusa positività per Fez1, con differenze significative tra i vari istotipi. In particolare, i 340 casi di carcinoma duttale infiltrante risultano per il 55,38% (188/340) negativi, per il 20,80% (71/340) moderatamente positivi e per il 23,82% (81/340) positivi; i 21 casi di

carcinoma tubulare infiltrante sono per il 47,60% negativi (10/21), per il 4,80% (1/21) moderatamente positivi e per il 47,60% (10/21) positivi; i 15 casi di carcinoma midollare sono per il 46,66% (7/15) negativi, per il 20% (3/15) moderatamente positivi e per il 33,33% (5/15) positivi; i 4 casi di carcinoma mucinoso sono per il 25% (1/4) negativi e per il 75% (3/4) positivi; i 4 casi di carcinoma cribriforme sono per il 75% (3/4) negativi e per il 25% (1/4) positivi; i 38 casi di carcinoma lobulare infiltrante sono per il 63,15% (24/38) negativi, per il 15,80% (6/38) moderatamente positivi e per il 21,05% (8/38) positivi; i 13 casi di carcinoma misto duttale/lobulare sono per il 54% (7/13) negativi, per il 23% (3/13) moderatamente positivi e per il 23% (3/13) positivi; i 3 casi di carcinoma tubulo-lobulare sono per il 33% (1/3) negativi e per il 66,6% (2/3) positivi; infine i 3 casi di carcinoma micropapillare sono per il 100% (3/3) positivi. (Tab. 1)



E' evidente che l'alterazione dell'espressione di FEZ1 è strettamente associata ai diversi tipi di carcinoma mammario: utilizzando il test del χ^2 abbiamo individuato un'associazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra l'assenza di Fez1 ed i vari istotipi esaminati.

Al fine di individuare eventuali correlazioni tra l'espressione di FEZ1 e quella del recettore degli estrogeni (ER) o del recettore del progesterone (PR), abbiamo esaminato 351/441 casi per l'espressione di ER e 354/441 per quella di PR. Abbiamo visto che FEZ1 risulta espresso nel 39.1% (92/235) dei tumori ER positivi contro il 29.3% (34/116) dei tumori ER negativi e nel 46.9% (61/130) dei tumori PR positivi contro il 28.5% (64/224) dei tumori PR negativi. L'associazione tra il parametro FEZ1 ed i parametri ER e PR è stata analizzata mediante test χ^2 ed essa è risultata statisticamente significativa solo tra Fez1 e PR ($p < 0.05$).

I dati sopra esposti, globalmente, consentono di ipotizzare un ruolo fondamentale di FEZ1 nello sviluppo del carcinoma mammario.

Pubblicazioni:

Ishii H, Mimori K, Yoshikawa Y, Mori M, Furukawa Y, Vecchione A. Differential roles of E-type cyclins during transformation of murine E2F-1-deficient cells. *DNA and Cell Biology*, 24, 2005, in press.

Vecchione A, Ishii H, Baldassarre G, Belletti B, Fong LYY, Zanesi N, Murakumo Y, Fidanza V, Alder H, Donovan PJ, Baffa R, Croce CM. Disruption of the *Fez1/Lzts1* tumor suppressor gene in mice causes loss of G2/M phase checkpoint and increased susceptibility to carcinogenesis. Submitted 2005

Ishii H, Inageta KMT, Murakumo Y, Vecchione A, Mori M, Furukawa Y. Components of DNA Damage Checkpoint Pathway Regulate Ultraviolet Exposure-dependent Alterations of Gene Expression of *FHIT* and *WWOX* at Chromosome Fragile Sites. Submitted 2005.

Sottoprogetto III

U.O. 05: Le basi cellulari della farmacoresistenza tumorale: le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi anti-apoptotici
Responsabile Scientifico: Ruggero De Maria

Nella prima fase della ricerca abbiamo ottenuto, tramite disgregazione meccanica ed enzimatica di tumori di diversa origine, seguita da coltura in vitro in assenza di siero, aggregati sferici di cellule tumorali indifferenziate. Queste sfere tumorali sono state prodotte da neoplasie del colon, del cervello, della tiroide, dello stomaco, della mammella e dell'ovaio. Le cellule contenute nelle sfere tumorali hanno mostrato il loro potenziale differenziativo in seguito a coltura in presenza di siero. Le cellule differenziate sono state caratterizzate con gli anticorpi monoclonali comunemente utilizzati per riconoscere le diverse neoplasie, specifici per varie citocheratine o per antigeni tumorali, dimostrando una forte corrispondenza con i tumori di origine.

Nel caso delle sfere prodotte da glioblastomi, adenocarcinomi del colon e tumori follicolari o papillari della tiroide sono stati eseguiti esperimenti in vivo utilizzando come recipienti topi immunologicamente compromessi.

Le cellule delle sfere tumorali ottenute da queste neoplasie si sono dimostrate capaci di attecchire nei topi nudi, riproducendo un tumore istologicamente molto simile a quelli di partenza, a dimostrazione della capacità tumorigenica di queste cellule contenute nelle tumosfere.

Inoltre, in questo primo anno di attività, sono state paragonate cellule staminali neurali normali con delle cellule staminali di glioblastoma. Le cellule staminali neurali sono di per se molto resistenti alla apoptosi, in quanto non hanno mostrato espressione di caspasi 8, un importante mediatore del segnale di morte cellulare, mentre hanno mostrato livelli molto elevati di PED, una proteina molto efficace nel proteggere queste cellule (1). La comparazione tra queste cellule ha dimostrato che le cellule staminali di glioblastoma crescono più rapidamente di quelle normali e sono molto poco sensibili alla chemioterapia. Questi dati sono in linea con l'andamento clinico della malattia e suggeriscono la possibilità di utilizzare i modelli sperimentali