

di neoplasia basati sulle cellule staminali neoplastiche per mettere a punto nuove strategie terapeutiche.

Allo scopo di trovare dei punti deboli nelle cellule staminali di glioblastoma, è stata caratterizzata in queste cellule l'espressione dei geni che codificano per microRNA, piccole molecole di RNA non ancora perfettamente caratterizzate che interferiscono con l'espressione genica. I microRNA differenzialmente espressi dalle cellule staminali neurali normali e di glioblastoma sono attualmente oggetto di studio.

Infine è stata individuata una possibile strategia terapeutica per la cura dei glioblastomi. Questi tumori sono considerati incurabili e conducono invariabilmente alla morte i pazienti che ne sono affetti, pochi mesi dopo la diagnosi. 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. Questa citochina rappresenta una eccellente risorsa terapeutica ed è stata proposta per la cura del glioblastoma. Tuttavia, a differenza di quanto è stato osservato sulle linee cellulari, l'analisi effettuata sulle cellule primarie e le staminali di glioblastoma di tutti i 10 pazienti da noi esaminati ha mostrato che TRAIL non ha alcuna azione citotossica sulle queste cellule. 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, abbiamo dimostrato che queste alterazioni sono dovute all'azione di metiltransferasi. Pertanto 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 trias di fase II per la terapia di tumori ematologici. L'impiego combinato di decitabina e TRAIL ha permesso di curare topi immunodeficienti trapiantati con glioblastomi di origine umana.

Questi dati forniscono una nuova arma terapeutica per la cura dei tumori cerebrali maligni più frequenti e più aggressivi.

Pubblicazioni:

- 1) Ricci-Vitiani L, Pedini F, Mollinari C, Condorelli G, Bonci D, Bez A, Colombo A, Parati E, Peschle C, De Maria R. Absence of Caspase 8 and High Expression of PED Protect Primitive Neural Cells from Cell Death. *Journal Experimental Medicine* 200:1257-66, 2004.
- 2) Eramo A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Patti M, Bartucci M, Ricci Vitiani L, Stassi G, Larocca LM, Peschle C, De Maria R. Trail resistance of glioblastoma cells by epigenetic silencing of caspase-8. Submitted 2005.

U.O. 06: Le basi cellulari della farmacoresistenza tumorale: le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi anti-apoptotici
Responsabile Scientifico: Carlo M. Croce

Questa U.O. ha sviluppato delle ricerche sui microRNA, allo scopo di studiarne il ruolo nelle cellule primitive neoplastiche nei prossimi mesi. I microRNA costituiscono una famiglia di RNA di 18-22 nucleotidi che prendono parte a vari processi regolatori. Il ruolo da svolto questi microRNA è in via di delucidazione, appare tuttavia evidente che in organismi, quali la *Drosophila* essi possano essere responsabili della modulazione dei meccanismi apoptotici la cui deregolazione è, nei vertebrati, alla base della trasformazione neoplastica. In particolar modo un coinvolgimento di tali geni è stato dimostrato nella leucemia linfocitica cronica di tipo B dove miR-15 e miR-16, localizzati in posizione 13q14, sono frequentemente deleti o downregolati nel 68% dei pazienti analizzati (1).

L'analisi di questi microRNA richiede un'elevata quantità di materiale (circa 20microgrammi/northern)e tecniche autoradigrafiche che comportano l'uso di radioisotopi.

Per superare tale limitazione ed analizzare l'espressione di microRNA in campioni di tessuto umani, spesso di dimensioni ridotte abbiamo sviluppato un array di microRNA mettendo a punto un metodo che potesse superare i limiti imposti dalla lunghezza di questi RNA (18-22 nn).

E' stato così messo a punto un microarray di oligonucleotidi di lunghezza di 40basi, contenenti 368 sonde specifiche generate da 248 microRNA (161 umani, 84 murini e 3 di *Arabidopsis*) 15 tRNA (8 umani e 7 murini). Queste sequenze corrispondono ai microRNA trovati in banca dati (www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna, June2003).

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. Tali prove hanno dimostrato la riproducibilità degli esperimenti anche in presenza di ampie differenze nella quantità di RNA (2).

Le analisi di espressione sono state inoltre esaminate per Northern blot allo scopo di verificarne l'esattezza.

Tutti i dati ottenuti su tessuti di diversa origine hanno confermato la validità del sistema. 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 (3-4).

Pubblicazioni:

1) Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM.: MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101(32):11755-60.

2) Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce

CM.: An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101(26):9740-4.

3) Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM.: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101(9):2999-3004.

4) Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM.: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 200, ;99(24):15524-9.

Sottoprogetto IVA

U.O. 07: Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative
Responsabile Scientifico: Marco Presta

Scopo del progetto

Scopo del presente progetto è di studiare i meccanismo alla base dell'angiogenesi tumorale, avvalendosi delle metodiche di screening di espressione e di proteomica avanzata oggi disponibili, per identificare i segnali molecolari che stimolano e mantengono l'angiogenesi nel tumore. Sulla base di questi risultati si propone di mettere a punto nuove strategie terapeutiche anti-angiogeniche, da testare su un modello di cancerogenesi in vivo.

Sintesi dei risultati ottenuti

Nel corso del primo anno del progetto abbiamo condotto studi inerenti la Fase 1: "Identificazione dei modulatori dell'angiogenesi tumorale."

Allo scopo di identificare nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale sono stati condotti studi del trascrittoma di cellule endoteliali murine stimulate in vitro con il fattore angiogenetico FGF2 utilizzando la piattaforma Affymetrix ©.

In un primo set di esperimenti, cellule microvascolari murine di polmone 1G11 sono state stimulate per 0, 6 e 12 ore con FGF2 in assenza di siero. L'analisi del trascrittoma è stata condotta utilizzando il Gene chip Murine Genome U74 (Set version 2, Affymetrix) che interroga approssimativamente 12,000 diversi trascritti.

In un secondo set di esperimenti sono stati usati i seguenti tipi cellulari:

- cellule microvascolari murine di polmone 1G11 controllo e simulate per 10 ore con FGF2;
- cellule microvascolari murine di cervello MBE controllo e simulate per 10 ore con FGF2;
- cellule microvascolari murine isolate dal sottocute SIEC controllo e simulate per 10 ore con FGF2;
- cellule macrovascolari murine di aorta MAE controllo e simulate per 10 ore con FGF2;
- cellule microvascolari murine di polmone MBE trasfettate con FGF2 (clone MBE-3F3);

- cellule macrovascolari murine di aorta MAE trasfettate con FGF2 (cloni MAE-3F2 ed MAE-3F2T).

In questo caso l'analisi del trascrittoma è stata condotta utilizzando il Gene chip Murine Genome MOE430A set che interroga approssimativamente 22,000 diversi trascritti.

L'analisi dei risultati indica come FGF2 moduli l'espressione di numerosi geni in cellule endoteliali. Tale modulazione appare essere diversa per tipi endoteliali diversi, a conferma dell'eterogeneità dell'endotelio, e molto più marcata nei trasfettanti rispetto alle cellule stimulate con il fattore ricombinante.

I geni coinvolti riguardano geni appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita e loro recettori, proteine coinvolte nel signalling intracellulare, proteasi e proteine della matrice extracellulare. Tra i geni maggiormente e costantemente up-regolati da FGF2 rientra sicuramente il gene per l'osteopontina, proteina coinvolta nei processi immuno-infiammatori e nella crescita e metastatizzazione tumorale, ed una serie di fattori chemiotattici per cellule dell'infiltrato infiammatorio (chemochine). Abbiamo inoltre identificato tra i geni indotti da FGF2 in cellule endoteliali in vitro ed in vivo la subunità p12 della DNA polimerasi δ , coinvolta nei processi di replicazione cellulare. Parte di questi risultati sono già stati oggetto di pubblicazione.

Per quanto riguarda la Fase 2 "Creazione di strumenti farmacologici per inibire i meccanismi pro-angiogenesi identificati" abbiamo condotto studi volti alla caratterizzazione di nuove eparine biotecnologiche a basso peso molecolare volte ad inibire l'attività angiogenetica di FGF2 e di derivati del trans-resveratrolo caratterizzati da una attività antiangiogenetica e di "vascular targeting" grazie alla loro capacità di destabilizzare i microtubuli delle cellule endoteliali. I risultati sono stati oggetto di pubblicazione.

Pubblicazioni:

Presta M, Oreste P, Zoppetti G, Belleri M, Tanghetti E, Leali D, Urbinati U, Bugatti A, Ronca R, Nicoli S, Moroni E, Stabile H, Camozzi M, Hernandez G, Mitola S, Dell'Era P, Rusnati M, Ribatti D. Anti-angiogenic activity of semi-synthetic biotechnological heparins: LMW sulfated *Escherichia coli* K5 polysaccharide derivatives as FGF2 antagonists. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 25:71-6, 2005.

Dell'Era P, Nicoli S, Peri G, Nieddu M, Ennas MG, and Presta M. FGF2-induced Upregulation of DNA polymerase- δ p12 subunit in endothelial cells. Oncogene, 24:1117-21, 2005.

Belleri M, Ribatti D, Nicoli S, Cotelli F, Forti L, Vannini V, Stivala LA, Presta M. Antiangiogenic and vascular targeting activity of the microtubule-destabilizing *trans*-resveratrol derivative 3,5,4'-trimethoxystilbene. Mol Pharmacol, Feb 9 2005; [Epub ahead of print].

**U.O. 08: Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale
per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative
Responsabile Scientifico: Barbara Ensoli**

Questa U.O. si è focalizzata sull'Individuazione dei meccanismi d'azione degli HIV-PI, che costituiscono nuovi strumenti per bloccare l'angiogenesi e l'invasione tumorale (1-2).

Nostri studi precedenti hanno dimostrato che gli HIV-PI indinavir e saquinavir sono in grado di bloccare lo sviluppo e di indurre la regressione di lesioni angioproliferative e dell'edema indotti mediante l'inoculazione di cellule KS o bFGF in topi atimici, e l'angiogenesi indotta da bFGF e/o VEGF nella membrana corioallantoidea di pollo (Sgadari et al., Nat Med 2002, e dati non pubblicati). Tali effetti, già evidenti a concentrazioni di farmaco simili alla concentrazione di valle presente nel plasma dei pazienti trattati (0.1-1 μ M), sono dovuti al blocco dell'invasione, ma non della proliferazione, di cellule KS ed endoteliali, ed all'inibizione dell'attivazione proteolitica di MMP-2, proteasi che svolge un ruolo chiave nell'angiogenesi, nell'invasione tumorale e nella metastatizzazione (Sgadari et al, Nat Med, 2002; Sgadari et al., Lancet Oncol 2003; Monini et al., Nat Rev Cancer, 2004). Ciò suggerisce che i PI abbiano come target pathways fondamentali che regolano la motilità cellulare e la produzione e/o l'attivazione di enzimi deputati alla degradazione e al rimodellamento della matrice extracellulare. Per chiarire quale degli step dell'attivazione di MMP-2 sia inibito da saquinavir ed indinavir, cellule endoteliali del cordone ombelicale (HUVEC) sono state mantenute per 8-15 ore in presenza di un terreno privo di fattori angiogenici e a basso tenore di siero per inibire i processi di attivazione basale di MMP-2, e successivamente esposte, in presenza od assenza di saquinavir od indinavir (10 μ M), ad agenti in grado di attivare MMP-2. A questo scopo, le cellule sono state incubate per 10 ore in un terreno privo di fattori di crescita e di siero per indurre l'attivazione di MMPs in risposta ad apoptosi, per 8-16 ore in presenza di bFGF (10-100 ng/ml), o per 8-16 ore in presenza di TPA (50 nM), un agente in grado di indurre l'attivazione di MMP-2 mediante l'induzione e l'attivazione di MT1-MMP. Dopo avere raccolto i supernanti cellulari, le cellule sono state lisate mediante shock ipertonico/ipotonico allo scopo di allontanare i depositi intercellulari di MMP-2 latente (zimogeno), e la percentuale di pro-MMP-2, pre-MMP-2 e MMP-2 attiva rilasciata nei supernatanti o associate alla membrana e alla matrice sono state determinate mediante zimografia (Toschi et al., Mol Biol Cell 2001). Questi esperimenti hanno mostrato che indinavir e saquinavir agiscono inibendo la conversione autoproteolitica di pre-MMP-2 alla forma completamente attiva, uno step che, come descritto in precedenza, è mediato dal legame di pre-MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$ ed è catalizzato da MMP-2 attiva presente sulla membrana cellulare. Perciò, questi risultati hanno indicato che gli HIV-PI agiscono, assai probabilmente, interferendo con il taglio autoproteolitico di MMP-2, con il legame di MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$, od intervenendo sull'espressione o sull'attività dell'integrina stessa.

Studi precedenti hanno dimostrato che l'attivazione autoproteolitica di MMP-2 può avvenire in vitro anche in assenza dell'integrina $\alpha_v\beta_3$, in quanto è possibile ottenere concentrazioni assolute di MMP-2 in grado di fare procedere

la reazione con cinetiche misurabili (Stetler-Stevenson et al., J Biol Chem 1989; Crabbe et al., Eur J Biochem 1993). Per chiarire se indinavir e saquinavir interferiscano con lo step di attivazione autoproteolitica di MMP-2, l'enzima purificato o presente nei supernatanti di cellule HT1080 (Toschi et al., Mol Biol Cell 2001) è stato incubato con il dominio catalitico di MT1-MMP o con p-APMA, una molecola che, come MT1-MMT, è in grado di convertire pro-MMP-2 nella forma pre-attiva (Stetler-Stevenson et al., J Biol Chem 1989; Crabbe et al., Eur J Biochem 1993; Atkinson SJ et al., J Biol Chem 1995; Will H et al., J Biol Chem 1996). In queste condizioni, la pre-MMP-2 così generata viene convertita nella forma completamente attiva da molecole di MMP-2 attiva presenti nelle preparazioni enzimatiche purificate o nei supernatanti (Stetler-Stevenson et al., J Biol Chem 1989; Crabbe et al., Eur J Biochem 1993; Atkinson SJ et al., J Biol Chem 1995; Will H et al., J Biol Chem 1996). I risultati di questi esperimenti hanno indicato che MMP-2 latente veniva completamente convertita nella forma attiva nell'arco di 15 ore. Tuttavia, indinavir o saquinavir (10 μ M) non hanno determinato alcuna alterazione nella reazione di maturazione di MMP-2, indicando che questi HIV-PI non sono in grado di intervenire nel processo di attivazione autoproteolitico di MMP-2. Questi dati hanno suggerito, perciò, che indinavir e saquinavir inibiscano l'angiogenesi e l'invasione cellulare interferendo con il legame di pre-MMP2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$. Allo scopo di verificare questa ipotesi, è stato studiato l'effetto di preparazioni purificate di $\alpha_v\beta_3$ sull'attivazione autoproteolitica di MMP-2. Questi esperimenti hanno mostrato che l'aggiunta di $\alpha_v\beta_3$ alla reazione di attivazione di MMP-2 era in grado di inibirne la maturazione, suggerendo che il legame di MMP-2 o MT1-MMP all'integrina $\alpha_v\beta_3$ abbia effetti protettivi, probabilmente mediati da impedimento sterico, quando le molecole recettoriali e le proteasi coinvolte non sono opportunamente aggregate sulla superficie cellulare. Tuttavia, indinavir o saquinavir (10 μ M) non hanno mostrato alcun effetto sulla cinetica di protezione, indicando che gli HIV-PI non interferiscono direttamente con il legame di MMP-2 e/o MT1-MMP all'integrina $\alpha_v\beta_3$. Sono attualmente in corso esperimenti volti a validare questi risultati in un sistema sperimentale in cui l'integrina $\alpha_v\beta_3$ viene adsorbita a supporti solidi per valutare gli effetti degli HIV-PI sul legame tra pre-MMP-2 e l'integrina immobilizzata (Deryugina et al., Exp cell Res, 2001).

Questi risultati suggeriscono che indinavir e saquinavir non abbiano come target diretto MMP-2, nè siano in grado di inibire il legame di MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$ o di bloccare specifici step proteolitici coinvolti nell'attivazione di questa proteasi della matrice. Al contrario, i dati ottenuti indicano che gli HIV-PI potrebbero interferire con il trafficking, la localizzazione di membrana o, in generale, l'espressione o l'attività di $\alpha_v\beta_3$ e/o altre integrine coinvolte nell'angiogenesi e nell'invasione cellulare, in particolare, $\alpha_5\beta_1$.

Successivamente, poichè gli eventi che preludono alla polarizzazione e alla locomozione cellulare prevedono l'intervento di recettori integrinici che, una volta attivati si colocalizzano con MMP-2, MT1-MMP, altre metalloproteasi e recettori per fattori di crescita (Monsky et al., Cancer Res, 1993; Brooks et al., Cell, 1996; Nakahara et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1997; Kiosses et al., Nat Cell Biol, 2001), siamo andati a studiare se gli HIV-PI intervengano modificando uno degli step coinvolti nei processi che precedono e regolano la

motilità cellulare. A tale riguardo abbiamo inizialmente analizzato gli effetti di indinavir e saquinavir sull'adesione di cellule HUVEC seminate su collagene IV, laminina, perlecano (tre substrati della membrana basale e ligandi di $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_v\beta_3$, rispettivamente). Dai risultati ottenuti si evidenzia che l'adesione è fortemente inibita in presenza di saquinavir e questo effetto è abolito se le cellule sono mantenute in presenza di ioni manganese, un forte attivatore delle integrine di membrana. Al contrario, indinavir aumenta significativamente l'adesione a fibrinogeno e protrombina, le due principali componenti della matrice provisionale, e al perlecano, ed anche questo effetto è abolito in presenza di ioni manganese. Tali dati preliminari sembrano quindi dimostrare che gli HIV-PI esercitano le proprie azioni anti-angiogeniche e anti-invasive interferendo con il legame di integrine ai substrati, con la loro attivazione e/o con la loro rilocalizzazione nei lamellipodi e negli invadopodi, e 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 di MMP-2.

Ulteriori studi sono attualmente in corso ai fini di valutare gli effetti che gli HIV-PI possono avere sullo spreading cellulare, sulla distribuzione ed il trafficking delle integrine e la loro colocalizzazione con le MMPs. Si prevede inoltre l'analisi di eventuali effetti degli HIV-PI sui meccanismi molecolari di signaling, correlati con i processi di adesione e spreading, innescati dal binding integrinico a vari substrati presenti nella matrice extracellulare.

Pubblicazioni

1. Monini P., Sgadari C., Toschi E., Barillari G., and Ensoli B. Antitumor effects of antiretroviral activity. *Nat. Rev. Cancer*, 4:861-875, 2004.

2. Sgadari C., Toschi E., Carlei D., Malavasi L., Bacigalupo I., Palladino C., Compagnoni D., Bugarini R., Falchi M., Barillari G., Monini P. and Ensoli B. Submitted.

U.O. 09: Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative **Responsabile Scientifico: Gianluigi Condorelli**

Generazione di animali transgenici per la comprensione del ruolo dei recettori del VEGF e del pathway a valle nel differenziamento dell'emoangioblasto con il sistema Cre/Lox. PRIMI 6 MESI DI LAVORO

TABELLA 1: Aggiornamento per topo knockout

	Targ.Const	ES Transf.	Clone Selec.	Chimera Gener.	Floxed Het.	Loxed Het.
FLK-1	+	-	-			
FLT-1	+	+	-			
FLT-4	+	+	+			
TIE-2	-	-	-			
AKT-2	+	+	+			

Legenda della tabella:

Targ. Constr: generazione del vettore bersaglio;

ES Transf: trasfezione dei cloni ES;

Clone Selec: Selezione dei cloni di ES;

Chimera Gener: generazione di topi chimera;

Floxed Het: generazione di topi eterozigoti in cui neo non e' stato rimosso;

Loxed Het: generazione di topi eterozigoti in cui la cassetta neo e' stata rimossa.

La procedura consiste in:

1) disegnare il costrutto gene targeting. Per far ciò si deve tirar fuori la sequenza del cDNA dal data base NCBI, fare un blast contro il genoma di topo per ottenere la sequenza e la struttura del gene (bordi introne-esone). Si deve inoltre fare una mappa di restrizione. Sulla base della mappa si disegna poi il probe e si testano i siti di restrizione per Southern blot ed infine si disegna una mappa per la strategia di knockout targeting;

2) fare il costrutto attraverso il cloning molecolare. Si fa una PCR di tutti i frammenti, si clonano nel vettore TOPO, si sequenziano i frammenti, si subclonano nel vettore designato (come mostrato nelle figure);

3) dopo che il costrutto e' fatto, si sequenza tutto e si da' alla facility delle cellule staminali dell'UCSD, dove si fa un'elettroporazione per inserire il targeting construct;

4) fare uno screening dei cloni ES resistenti alla neomicina. Usiamo l'analisi al Southern Blot per screenare la ricombinazione omologa nelle cellule ES;

5) validare i cloni positivi con un Southern blot piu' grande e fare una mappa cromosomica prima dell'iniezione nella blastocisti;

6) Iniezione nella blastocisti per ottenere chimere;

7) Breeding per ottenere la trasmissione in linea germinale del vettore targeting; breeding per rimuovere il gene neo.

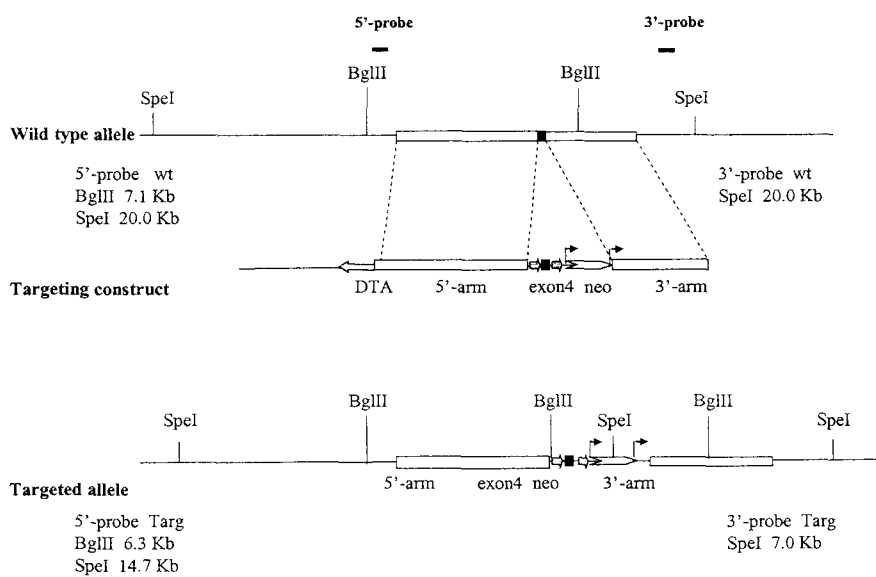
FLT-1 genome (chromosome 5)

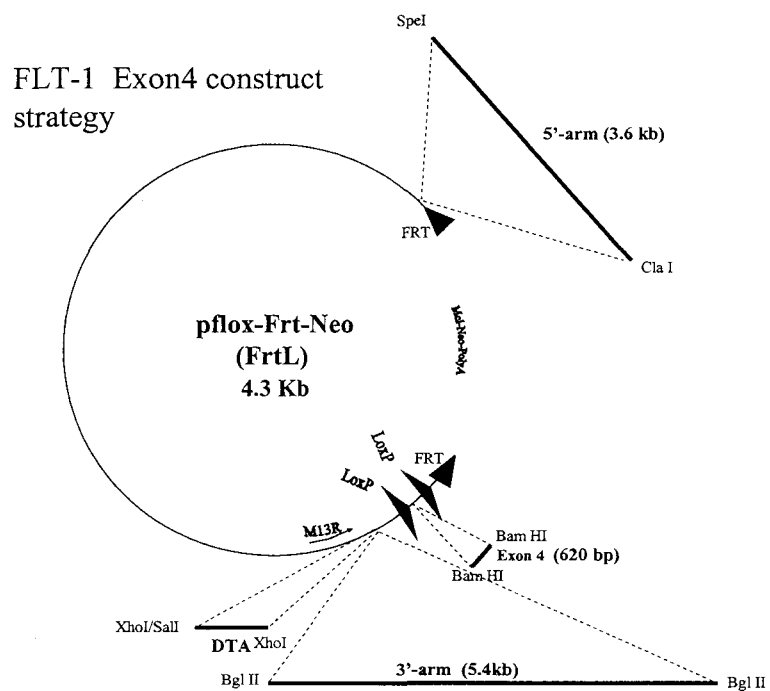
164,593 bp

166 Kb genome, 31 exons.

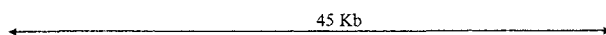
Exon 4 encodes Ig-like C2 type (domain 2).

FLT-1, Exon4



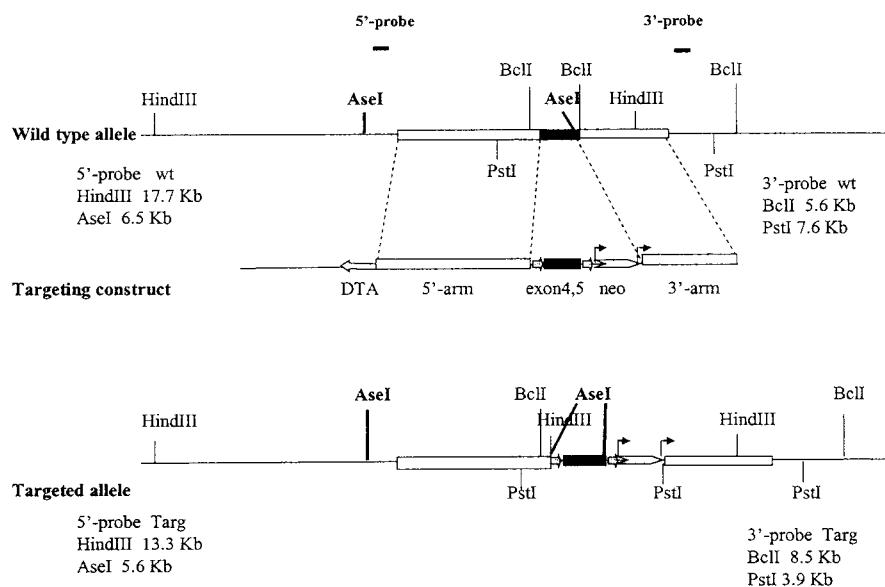
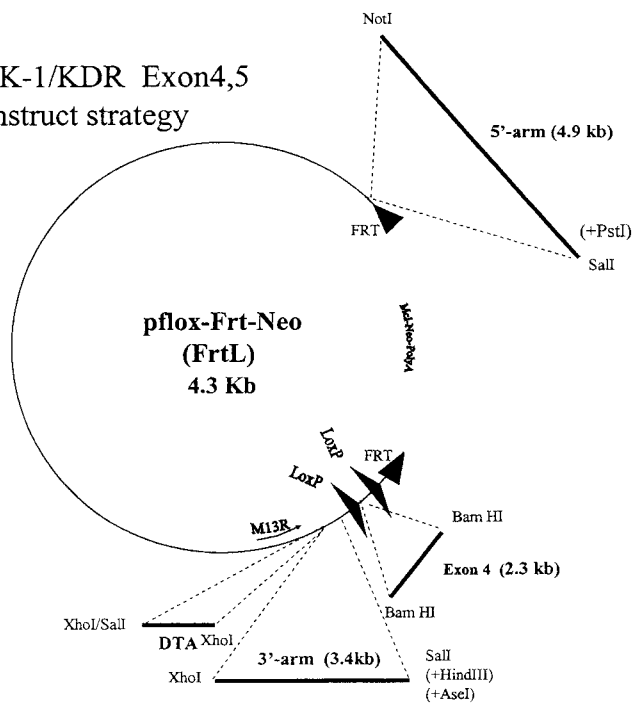


**FLK-1/KDR genome
(chromosome 5)**



45 Kb genome, 29 exons.

Exon 4&5

FLK-1/KDR, Exon4,5**FLK-1/KDR Exon4,5
construct strategy**

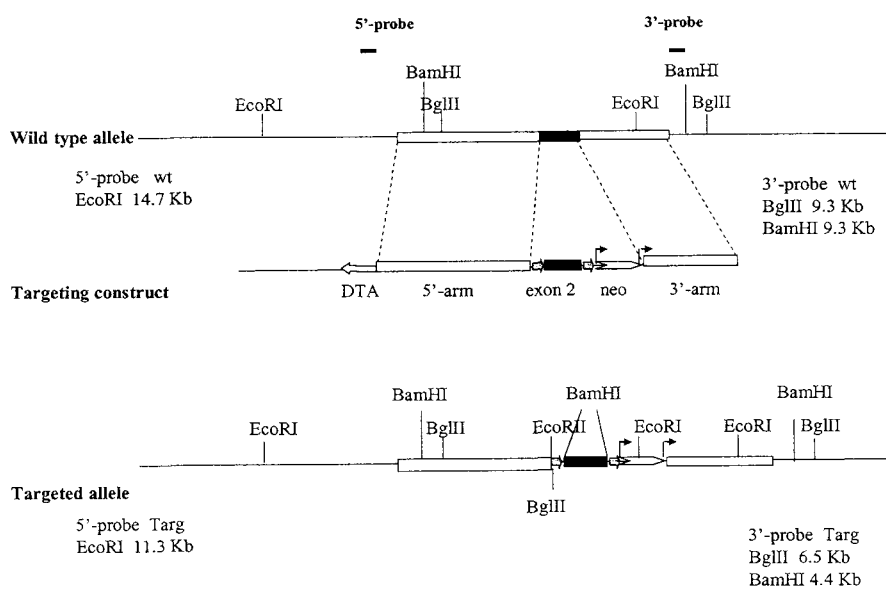
Tie2/Tek genome (chromosome 4)

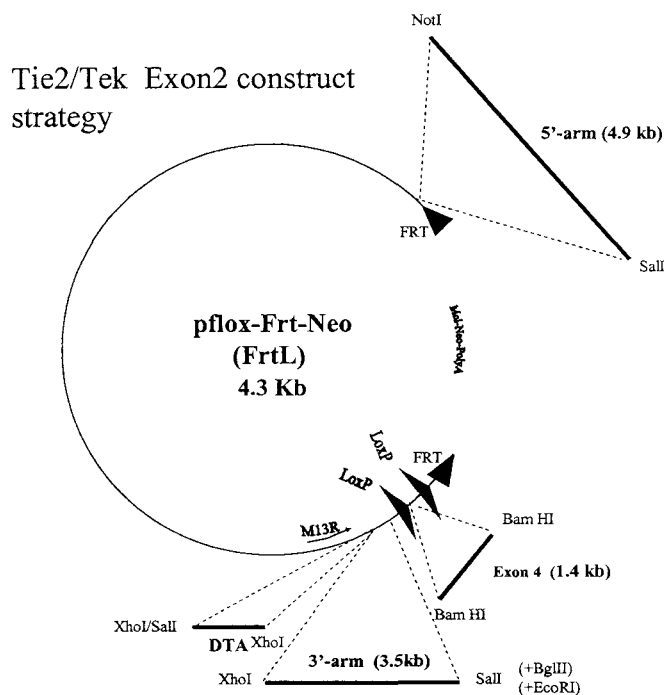
← 135 Kb →

135 Kb genome, 23 exons.

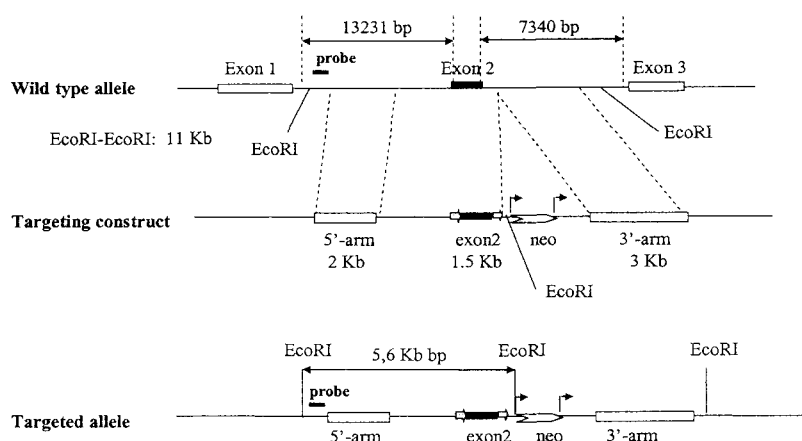
Exon 2

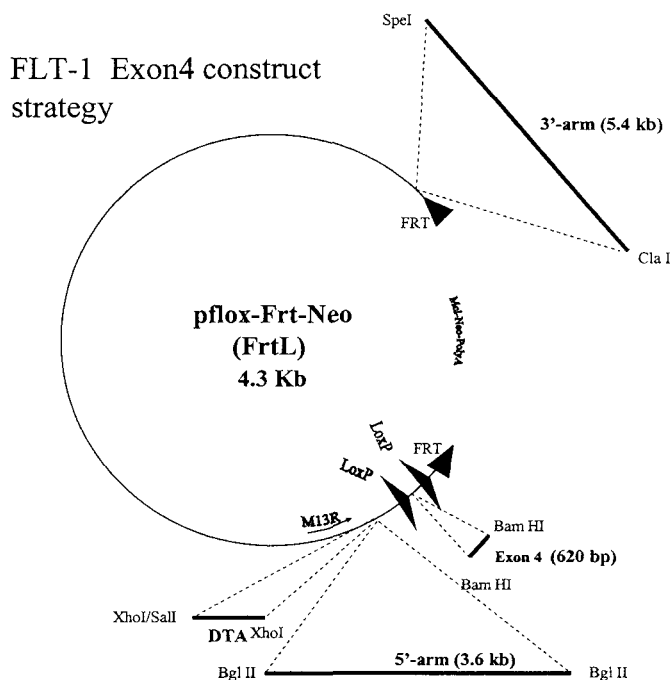
Tie2/Tek, Exon 2





Akt2





Sottoprogetto IVB

U.O. 10: Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di NF-kB e di "scavengers" di radicali liberi in modelli animali di cancro del colon, della mammella e della prostata Responsabile Scientifico: Matteo Russo

Gli obiettivi di questa UO consistono nel dimostrare (I) che in modelli murini di Ca della mammella, di Ca della prostata e Ca del colon i principali componenti della risposta infiammatoria sono attivi nelle cellule tumorali dei tumori in progressione e (II) che in questi stessi animali inibitori di NF-kB e scavengers di radicali liberi sono in grado di bloccare o rallentare la progressione di questi stessi tumori.

Primo obiettivo

In tumori umani, ottenuti dopo intervento chirurgico in pazienti selezionati e opportunamente caratterizzati, è stato dimostrato mediante immunoistochimica che alcune maggiori proteine della risposta infiammatoria sono abbondantemente presenti nelle cellule tumorali. In particolare, in tumori della prostata in tessuti normali e di Iperplasia Prostatica Benigna (BPH) è stato studiato il recettore P2X7, un sensore di danno capace di attivare NF-kB, due enzimi inducibili, classici produttori di mediatori e di effettori, NOS e COX inducibili (iNOS e COX-2), e una tipica proteina di fase acuta, legata alle cellule, la pentraxina-3. L'immunostain per tutte queste proteine fortemente appariva aumentato, mentre nelle lesioni benigne e nei tessuti normali era scarso o assente. Questo è stato confermato dall'analisi effettuata mediante western blotting eseguito su frazioni omogenee di tessuto ottenute da laser-capture microdissection. E' stato anche possibile evidenziare che le bande specifiche apparivano diminuite o assenti anche nel tessuto normale ospite del tumore, adiacente o lontano dal tumore. Infine, dalle

stesse frazioni microdissezionate, è stato estratto mRNA e, mediante real-time PCR, è stato possibile dimostrare che i geni delle suddette proteine sono molto attivi nei tumori maligno progrediti, mentre la loro trascrizione appare bassa o assente nelle lesioni benigne e nel tessuto normale. Questo ha suggerito che la risposta infiammatoria potrebbe essere attivata nelle cellule trasformate, come accade nei leucociti attivati, e contribuire con i suoi vari geni alla progressione verso il tumore maligno (1).

Pubblicazioni

1) Gradini Roberto, Realacci Massimo, Sale Patrizio, Frati Giacomo, Denora Paola, Russo Andrea, Petrangeli Elisa, Tafani Marco, Franco Di Silverio, Gallucci M, Mantovani A. and Russo Matteo A. Prostate cancer and Inflammation as studied by laser-capture microdissection, molecular biology and immunohistochemistry. Submitted, 2004

Secondo obiettivo

E' iniziato il trattamento in vivo con inibitori di NF-kB e con scavengers di radicali liberi in tre modelli murini. Il lavoro preliminare di questa UO è stato di controllare, mediante un time-course, l'insorgenza del tumore nell'organo bersaglio e la presenza di eventuali metastasi in organi distanti. Questo è stato perseguito mediante un'autopsia sistematica e lo studio istologico dei linfonodi regionali dell'organo-bersaglio e dei principali organi distanti.

Si stanno studiando per prima i modelli del topo transgenico per il ca mammario e del ca del colon nel 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.

U.O. 11: Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di NF-kB e di "scavengers" di radicali liberi in modelli animali di cancro del colon, della mammella e della prostata Responsabile Scientifico: Corrado Spadafora

Obiettivi di questa UO

- Dimostrare che la risposta flogistica è coinvolta nella progressione di tumori spontanei in animali transgenici predisposti al ca mammario e al cancro prostatico.
- Definire il pattern di espressione della Trascrittasi Inversa (RT) endogena nella progressione tumorale in animali transgenici predisposti al ca mammario e al cancro prostatico.
- Dimostrare che il controllo negativo dell'RT è correlato con la risposta flogistica e rallenta la progressione dei tumori.

Il primo obiettivo della nostra UO è stato quello di predisporre e di espandere le colonie dei due ceppi di topi transgenici, naturalmente predisposti al cancro mammario e prostatico, che verranno utilizzati nel corso di questo progetto di ricerca come modelli sperimentali dalla nostra UO e da quella di Matteo Russo.

A questo scopo sonostati ottenuti dal National Cancer Institute (NCI) verso la fine dello scorso mese di agosto:

A) 3 topi MASCHI mutanti: FVB/N.TG(MMTV-PyVT)34M(T/X). Le femmine eterozigoti positive di questo ceppo sviluppano spontaneamente e progressivamente un il tumore alla mammella a partire dal 60° giorno di vita.

Questi animali sono stati accoppiati con topine femmine del ceppo FVB/Ncr (X/X) wild type.

B) 3 topi FEMMINE mutanti: B6-TG(TRAMP)8247 Ng(T/X). I maschi eterozigoti positivi di questo ceppo sviluppano spontaneamente e progressivamente un tumore prostatico a partire dal 3° mese di vita in poi. Questi animali sono stati accoppiati maschi del ceppo C57BL/6Ncr (X/X) wild type.

Ad oggi sono nate tre nidiate dall'incrocio del ceppo MMTV/X (maschio) x X/X (femina) per complessivi 5 femmine (3 MMTV positive) e 9 maschi. Due/tre settimane dalla nascita, gli animali sono sottoposti a screening per l'individuazione dei MMTV/X positivi. A questo scopo si utilizza il DNA estratto da un frammento di coda da ognuno dei nuovi nati che è analizzato per PCR diretta usando una coppia di oligonucleotidi specifici. La prima delle tre femmine positive, è stata sacrificata all'ottava settimana e sottoposta ad autopsia per stabile l'eventuale insorgenza del tumore nell'organo bersaglio e la presenza di metastasi negli altri organi espuntati. Gli altri due topi positivi verranno utilizzati per lo stesso scopo alla 10° e 12° settimana di vita per caratterizzare la progressione tumorale. Gli esami autoptici sono condotti dall'Uo di Matteo russo.

La colonia di questi mutanti è al momento in via di espansione. Ci proponiamo di ottenere un numero sufficiente di animali per caratterizzare l'attività di Trascrittasi Inversa (RT) in rapporto alla genesi e progressione tumorale ed iniziare il trattamento con inibitori della RT.

Dagli incroci TRAMP/X (femmina) x (X/X) maschio sono nati ad oggi 5 femmine ed un maschio. Lo screening di questi animali è in corso. E' da rilevare che questo ceppo sembra essere scarsamente fertile per cui sarà necessario aumentare le nidiate per raggiungere il numero di animali maschi positivi necessari allo svolgimento del programma.

U.O. 12: Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di NF-kB e di "scavengers" di radicali liberi in modelli animali di cancro del colon, della mammella e della prostata
Responsabile Scientifico: Paola Sinibaldi-Vallebona

Obiettivo specifico

1. Dimostrare che la risposta flogistica è coinvolta nella progressione del cancro del colon chimicamente indotto da 1,2-dimetilidrazina in ratti ceppo BDIX.

20 ratti del ceppo BDIX sono stati trattati con 1,2-dimetilidrazina (18mg/Kg) somministrata s.c. una volta a settimana per 5 settimane consecutive. Un eguale numero di animali sono stati utilizzati come controlli.

A partire dal 14° giorno dall'ultima somministrazione del cancerogeno e ad intervalli regolari di 14 giorni, tutti gli animali sono stati sacrificati: il colon è