

(I) Nuovi geni di soppressione tumorale alterati nella farmacoresistenza

Per quanto concerne il ruolo di FEZ1 nell'oncogenesi e nella farmacoresistenza, in questo primo anno è stato studiato questo soppressore tumorale nei carcinomi renali ad alta aggressività, in associazione ad una serie di fattori oncogenici e anti-oncogenici. 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 linfonodali (1).

Parallelamente, abbiamo caratterizzato un nuovo gene di soppressione tumorale chiamato WWOX, un ossidoreduttasi che contiene un dominio WW, localizzato nel FRA16D, uno dei più attivi siti fragili del genoma umano. L'espressione del WWOX è risultata alterata nei tumori della mammella, della prostata, dell'ovaio, del polmone, del pancreas e dello stomaco a causa di trascritti aberranti o, più raramente, di mutazioni puntiformi (2-6). Inoltre abbiamo confermato l'attività soppressoria di WWOX nei confronti dei carcinomi pancreatici, mostrando come la riespressione di questo gene impedisca l'espansione clonale del tumore (4). I nostri dati preliminari mostrano che l'assenza di WWOX conferisce una maggiore resistenza all'azione dei maggiori farmaci antitumorali in linee cellulari tumorali di prostata, pancreas e stomaco. Allo scopo di comprendere il meccanismo d'azione di WWOX, abbiamo cercato dei partner proteici di WWOX che ne potessero mediare l'azione antitumorale. A questo proposito, uno dei candidati più promettenti sembra essere costituito da p73, una proteina della famiglia di p53 che possiede una analoga attività di controllo della tumorigenesi e che potenzia l'azione pro-apoptotica di WWOX (5). Infine, abbiamo dimostrato che il primo dominio WW di WWOX lega ad alta affinità AP-2 gamma, un fattore di trascrizione frequentemente amplificato nel carcinoma della mammella. I nostri dati mostrano chiaramente come WWOX sequestri AP-2 gamma nel citoplasma, bloccando la potente attività oncogenica svolta da quest'ultimo a livello nucleare (6).

Questi risultati ci permetteranno di ottimizzare le strategie di terapia genica su una serie di carcinomi ad elevato impatto socio-sanitario.

Pubblicazioni

• Vecchione A, Galetti TP, Gardiman M, Ishii H, Giarnieri E, et al: Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical study of 11 cases. BMC Urol 2004, 4: 11-19

- Matsuyama A, Croce CM, Huebner K. Common fragile genes. *Eur J Histochem.* 2004;48(1):29-36.
- Aqeilan RI, Kuroki T, Pekarsky Y, Albagha O, Trapasso F, et al. Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 May 1;10(9):3053-8.
- Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, et al. The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 1;10(7):2459-65.
- Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, Palamarchuk A, Letofsky J, et al. Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Mar 30;101(13):4401-6.
- Aqeilan RI, Palamarchuk A, Weigel RJ, Herrero JJ, Pekarsky Y, Croce CM. Physical and functional interactions between the Wwox tumor suppressor protein and the AP-2gamma transcription factor. *Cancer Res.* 2004 Nov 15;64(22):8256-61.

(II) Le enterotossine nel trattamento dei tumori ovarici chemoresistenti

Il cancro epiteliale dell'ovaio rimane la neoplasia ginecologica gravata dalla piu' alta letalita'. 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 priorita'.

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 piu' espressi nei tumori ovarici rispetto al tessuto ovarico normale (*Santin et al., Int. J. Cancer, 112;14-25;2004*).

L'espressione di questi geni e' 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 piu' elevati di Claudina 3 e Claudina 4 rispetto ai tumori ovarici chemiosensibili.

Poiche' 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 abbiamo esposto alla CPE numerosi tumori ovarici sierosi papilliferi (la variante istologica piu' 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 e' descritta nel manoscritto sottocitato "Treatment of Chemotherapy-Resistant Human Ovarian Cancer Xenografts in C.B-17/SCID Mice by Intraperitoneal Administration of Clostridium Perfringens Enterotoxin (CPE)".

(III) Ruolo di FEZ1 nella resistenza farmacologica al taxolo**Espressione di FEZ1 in carcinomi mammari primitivi**

1 Selezione dei pazienti: Sono stati selezionati 457 pazienti con diagnosi documentata di carcinoma mammario (CM), con tessuto tumorale proveniente dal tumore primario disponibile per analisi immunoistochimica, con lesioni neoplastiche > 10 mm alla CT spirale, con storia clinica completa e follow-up disponibili. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i pazienti.

1.2 Preparazione dei campioni: Per la preparazione dei campioni è stata sfruttata la tecnologia tissue-microarray. Gli array sono stati prodotti attraverso un tissue-arrayer manuale (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) partendo da campioni di tessuto depositati. Con questo sistema, abbiamo ottenuto vetrini contenenti 252 casi diversi ciascuno.

Analisi immunoistochimica di FEZ1, ER e PR: 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".

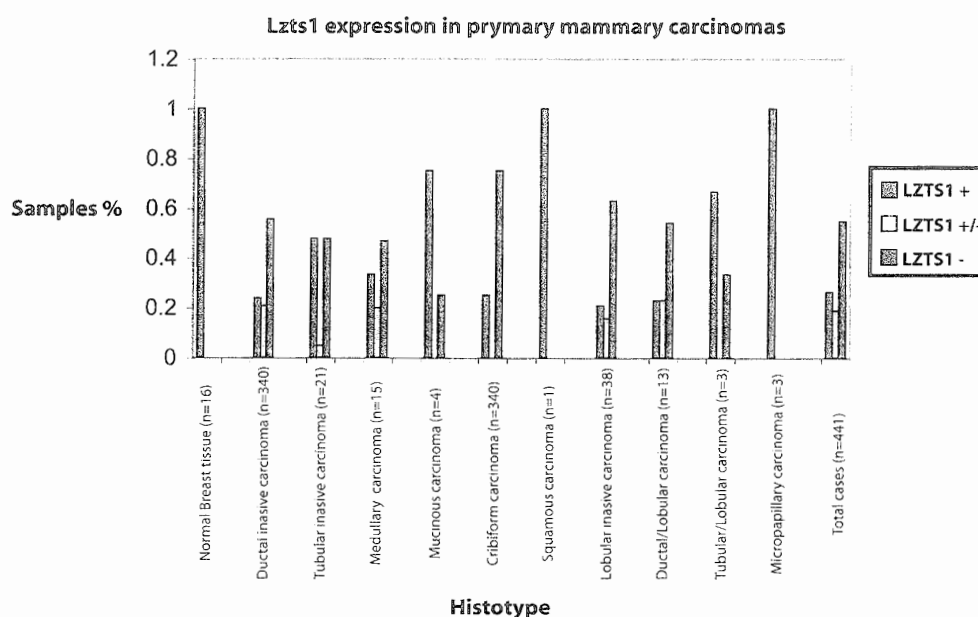
Ciascun caso, classificato secondo il particolare istotipo, è corredato di storia clinica, eventuale terapia somministrata e follow-up.

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.

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 ($p < 0.05$).

(Tab. 1)



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

1.3 Meccanismi molecolari alla base della resistenza al taxolo in cellule derivate da carcinomi mammari in cui FEZ1 è perso.

2.1 Generazione del clone stabile in cellule derivate da carcinoma mammario (MCF-7) negative per FEZ1.

Per generare un clone stabile in questa linea cellulare abbiamo utilizzato un sistema basato sul repressore Tet di E.Coli (TetR) che controlla negativamente i geni dell'operon sul transposone Tn 10. TetR blocca la trascrizione di tali geni legandosi alle sequenze dell'operatore Tet (TetO) in assenza di tetraciclina.

La realizzazione del sistema prevede una doppia trasfezione stabile che includa sia il plasmide regolatore che il response plasmid. Per far questo, abbiamo prima generato un clone stabile contenente il plasmid regolatore (pTet-Off). Le cellule target (MCF-7) sono state cresciute fino ad 80% confluenza in mezzo completo e trasfettate con il plasmide Tet-Off. Quindi sono state selezionate 48h dopo trasfezione in G418, la cui concentrazione ottimale è stata calcolata mediante kill-curve. Dopo 2 settimane di selezione, comparse le colonie di resistenza, queste sono state isolate e diluite fino ad arrivare 30 singoli cloni, ciascuno sottoposto a screening per identificare quello con massima induzione e minimo background. Lo screening prevede una trasfezione provvisoria con un vettore reporter, pTRE2-Luc: i cloni sono stati espansi fino all'80% di confluenza, quindi tripsinizzati ed 2/3 sono stati utilizzati per lo screening, essendo trasfettati con pTRE2-Luc e piastrati in due pozzetti di una 6-well plate. Dopo 24 ore, in uno dei pozzetti è stata aggiunta doxyciclina, un derivato della tetraciclina e, dopo 48 ore, è stato compiuto il saggio di induzione. Sono stati selezionati i cloni con maggiore inducibilità e minore background.

Il cDNA full-length di FEZ1 è stato clonato mediante RT-PCR da cDNA di tessuto cerebrale umano (CLONTECH) e sequenziato. Quindi è stato sub-clonato nel vettore Tet-Off inducibile portatore di una resistenza alla puomicina, pTRE-Puro, e trasfettato nei cloni precedentemente selezionati. Compiuta la stessa procedura di selezione sopra esposta (ma con puomicina) i cloni sono stati mantenuti in coltura con doxyciclina per mantenere spenta la trascrizione di FEZ1 (Fig.1).

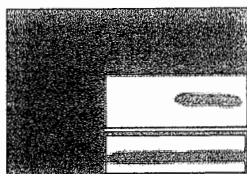


Fig. Esempio di clone inducibile per Fez1. Western Blot per Fez1 pannello superiore e per B-actina, pannello inferiore. Dox+: Le cellule sono mantenuti in coltura con Doxicillina. Dox-: Le cellule sono mantenuti in coltura in assenza di Doxicillina.

2.2 Determinazione della sensibilità al taxolo, in vitro.

La determinazione della sensibilità al taxolo è in corso. Le cellule MCF-7 FEZ1 +/+ e -/-, ottenute al punto 2.1 vengono trattate con Taxolo dissolto in dimetilsulfoxide (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) in mezzo completo per 6,12,18,24,48,72 ore a differenti concentrazioni (0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM). La concentrazione finale di dimetilsulfoxide è stata mantenuta al di sotto di 0.05% così da non esercitare un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare. Ad ogni time-point le cellule verranno tripsinizzate e contate usando un emocitometro. Per saggiare la chemiosensibilità al taxolo dei cloni FEZ1 positivi e negativi verrà usato un MTS-assay ed un electron coupling reagent (PMS), specificatamente il "Cell Titer 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay kit" (Promega).

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* 24:173:179, 2005.
- Ishii H, Mimori K, Inageta T, Murakumo Y, Vecchione A, Mori M, Furukawa Y. Components of DNA Damage Checkpoint Pathway Regulate UV Exposure-Dependent Alterations of Gene Expression of FHIT and WWOX at Chromosome Fragile Sites. *Mol Cancer Res.* 3:130-138, 2005.
- Vecchione A., Ishii H., Baldassarre G., Belletti B., Fong L.Y.Y., et al. Disruption of the *Fez1/Lzts1* tumor suppressor gene in mice causes loss of G2/M phase checkpoint and increased susceptibility to carcinogenesis. Submitted 2005

*Budget***I° anno**

Finanziamento totale	€ 750.000
-----------------------------	------------------

Questo budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget è stato suddiviso tra le diverse U.O. partecipanti, indicate a pag. 14.

II° anno

Finanziamento totale	€ 680.000
-----------------------------	------------------

Questo budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget verrà suddiviso tra le diverse U.O. indicate a pag. 14, coerentemente al primo anno di attività.

III° anno. Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.

**(III) LE CELLULE NEOPLASTICHE PRIMITIVE E I MECCANISMI ANTI-APOPTOTICI:
LE BASI CELLULARI DELLA FARMACORESISTENZA TUMORALE**

Responsabili Scientifici: R. De Maria, Istituto Superiore di Sanità

C. Croce/C. Peschle, M. Valtieri, Ohio University,

Columbus, USA/Istituto Superiore di Sanità

(l) Le cellule staminali tumorali come bersaglio della terapia antineoplastica

Questa linea di ricerca del progetto oncotecnologico si propone di isolare, caratterizzare e coltivare le cellule staminali neoplastiche (CSC) presenti in una serie di tumori solidi. Si prevede che la valutazione diretta dell'azione citotossica di farmaci e biomolecole su queste cellule, che costituiscono l'unica popolazione cellulare tumorigenica, permetterà un notevolissimo avanzamento delle conoscenze sui meccanismi alla base della farmacoresistenza e favorirà l'allestimento di terapie innovative.

Nella prima fase della ricerca abbiamo isolato cellule staminali tumorali a partire da tumori di origine diversa. La dissociazione meccanica o enzimatica dei pezzi operatori e la successiva coltura *in vitro* delle cellule ottenute, in assenza di siero e in condizioni che non permettono alle cellule di aderire alla piastra di coltura, ha consentito di selezionare cellule tumorali indifferenziate che crescono come aggregati sferici, simili agli sferoidi (tumorsfere) oppure come cellule singole in sospensione a seconda dei tessuti. I terreni di coltura sono stati ottimizzati per le cellule tumorali di diversi tessuti, modificando la composizione e/o la concentrazione di nutrienti e fattori di crescita specifici allo scopo di favorire la crescita e l'espansione delle cellule ottenute di origine diversa.

In questo modo sono state isolate ed espanse *in vitro* CSC da tumori del colon, del cervello, della tiroide, dello stomaco, del polmone, della mammella, dell'ovaio, del rene e della prostata. 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 la diagnosi delle diverse neoplasie, specifici per varie citocheratine o per antigeni tumorali, dimostrando una forte corrispondenza con i tumori di origine. Per alcuni tessuti è stato possibile ottenere le corrispondenti cellule staminali sane, in particolare per il rene e per la tiroide, che saranno molto utili per un confronto con le corrispondenti cellule tumorali ottenute dallo stesso paziente.

Nel caso delle sfere prodotte da glioblastomi, adenocarcinomi del colon, tumori follicolari o papillari della tiroide e tumori del polmone sono stati eseguiti esperimenti *in vivo* utilizzando come recipienti topi immunologicamente compromessi (Nudi, SCID e NOD/SCID). Le cellule staminali tumorali sono state inoculate sottocute e dopo un periodo variabile tra le 4 e le 8 settimane si sono dimostrate in grado di attecchire, riproducendo un tumore istologicamente molto simile a quello di partenza, a dimostrazione della loro capacità tumorigenica. Al momento stiamo effettuando studi volti a determinare la quantità minima di CSC, sufficiente a trasferire la malattia nell'animale ospite allo scopo di valutare il grado di staminalità delle cellule ottenute.

Inoltre, in questo primo anno di attività, sono state paragonate cellule staminali neurali normali con delle cellule staminali isolate da questo tumore. 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 di neoplasia basati sulle cellule staminali neoplastiche per mettere a punto nuove strategie terapeutiche.

L'identificazione dei meccanismi molecolari che sono alla base della resistenza delle cellule staminali neurali normali all'infiammazione, che per altro si osserva frequentemente nella regione in cui si sviluppa il glioblastoma, ha stimolato lo studio dell'effetto dell'infiammazione sulle cellule staminali tumorali. Una delle ipotesi valutate consiste nella capacità delle cellule staminali tumorali di indurre apoptosi nelle cellule immunitarie infiltranti, in particolare linfociti T e monociti, attraverso un fenomeno conosciuto come

immunoprivilegio. E' infatti emerso che le citochine infiammatorie non solo sono prive di tossicità nei confronti delle CSC, ma possono perfino favorire la progressione tumorale attraverso l'eliminazione delle cellule immunitarie con attività antitumorale. Le citochine infiammatorie promuovono l'espressione di diversi ligandi di morte sulle CSC, in particolare di TRAIL, Fas ligand e TLA1. In esperimenti di co-cultura, le cellule staminali neurali tumorali pretrattate con le citochine infiammatorie si sono dimostrate molto efficaci nell'indurre apoptosi di cellule linfoidi e monocitarie, innescando l'attivazione di una serie di recettori di morte (manoscritto in preparazione).

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.

I nostri studi hanno anche portato alla individuazione di 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 trials 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 differenziate e staminali di glioblastoma di tutti i 10 pazienti da noi esaminati ha mostrato che TRAIL non ha alcuna azione citotossica su queste cellule. Tramite un'analisi dell'espressione dei geni che regolano la risposta terapeutica a TRAIL, sono state 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 trials 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 (2).

Sempre in ambito di chemioresistenza, abbiamo dimostrato che l'interleuchina-4 è prodotta dai tumori della mammella, della prostata e della vescica dove agisce come fattore di crescita tumorale e di resistenza alla chemioterapia attraverso l'induzione di geni anti-apoptotici come Bcl-xL (3). L'analisi delle cellule staminali neoplastiche di tiroide, colon e mammella ha evidenziato che la produzione di IL-4 avviene anche al livello della cellula staminale tumorale dove promuove l'espressione di una serie di proteine antiapoptotiche, quali Bcl-xL, Bcl-2, Flip e PED. Per quanto concerne le cellule staminali tumorali tiroidee, sono stati condotti anche degli studi funzionali basati sull'impiego di anticorpi bloccanti l'IL-4 che hanno sensibilizzato le cellule staminali tumorali, prima resistenti, al taxolo e a TRAIL. Questi studi potrebbero fornire un'arma potenzialmente molto efficace per ridurre la tumorigenicità e aumentare la sensibilità a TRAIL e ai chemioterapici in queste neoplasie di particolare rilievo per il SSN.

Dal momento che la maggior parte degli agenti chemioterapici convenzionali utilizzati nella terapia del glioblastoma si è mostrata inefficace, sia in clinica, sia nella induzione di citotossicità sulle cellule staminali di glioblastoma, si è resa necessaria la sperimentazione di strategie terapeutiche innovative. L'isolamento ed espansione *in vitro* delle cellule staminali di glioblastoma ci ha permesso di valutare su queste cellule l'efficacia di agenti anti-tumoral innovativi, come gli inibitori delle istone deacetilasi e gli

inibitori del proteasoma. Tra gli inibitori delle istone deacetilasi è stato scelto SAHA poiché questo composto si è dimostrato privo di effetti collaterali in numerosi studi condotti su modelli murini. Inoltre in studi di Fase 1, saha ha mostrato bassa tossicità e ampia attività antitumorale sia per neoplasie ematologiche che per alcuni tumori solidi. I nostri studi *in vitro* mostrano un elevato effetto citotossico di SAHA sia sulle cellule primarie più differenziate che sulle cellule staminali di glioblastoma, che rappresentano i bersagli terapeutici più importanti. Il trattamento con SAHA determina variazioni nell'espressione di geni coinvolti nel ciclo cellulare, come aumento di p21 e diminuzione di survivina, e di geni pro- ed anti-apoptotici, come riduzione di Bcl-xL e aumento di TRAIL, provocando arresto della crescita e induzione di apoptosi nelle cellule staminali tumorali. Al momento stiamo analizzando il tipo di segnale apoptotico innescato da SAHA nelle cellule staminali di glioblastoma. Esperimenti preliminari suggeriscono un coinvolgimento sia del pathway estrinseco mediato dai recettori di TRAIL sia di quello intrinseco mitocondriale. Stiamo inoltre valutando il ruolo delle caspasi coinvolte nell'esecuzione del processo apoptotico indotto da SAHA, poiché il processo di morte non è inibito dagli inibitori delle caspasi 3 e 7, più frequentemente attivate in corso di apoptosi, suggerendo il coinvolgimento di altre caspasi, come la caspasi 2. Ci proponiamo di valutare l'efficacia di SAHA su xenotrapianti di glioblastoma ottenuti in topi SCID mediante inoculo di cellule staminali di glioblastoma, che rappresentano un ottimo modello pre-clinico per la valutazione dell'efficacia di strategie terapeutiche diverse, in quanto riproducono tumori istologicamente e biologicamente sovrapponibili a quelli umani.

Infine studi preliminari hanno mostrato una eccezionale attività citotossica sulle cellule staminali di glioblastoma, (anche a dosi molto basse, come 10^{-8} M), da parte del bortezomib, un farmaco inibitore del proteasoma, già ampiamente utilizzato in clinica per il trattamento del mieloma. Esperimenti preliminari su modelli murini di xenotrapianto di glioblastoma mostrano una notevole riduzione del tumore negli animali trattati con inibitori del proteasoma che in futuro prevediamo di associare agli inibitori dell'istone deacetilasi. Questi studi potrebbero fornire nuove armi terapeutiche per la cura dei tumori chemioresistenti.

Pubblicazioni:

- Ricci-Vitiani L, Pedini F, Mollinari C, Condorelli G, Bonci D, et al. Absence of Caspase 8 and High Expression of PED Protect Primitive Neural Cells from Cell Death. *Journal Experimental Medicine* 200;1257-66, 2004.
- Conticello C, Pedini F, Zeuner A, Patti M, Zerilli M, et al. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. *Journal of Immunology* 172:5467-77, 2004.
- Eramo A, Pallini R, Lotti F, Sette G, et al. Inhibition of DNA methylation sensitizes glioblastoma for TRAIL-mediated destruction (submitted).

(II) La genetica molecolare nella chemioresistenza delle cellule staminali neoplastiche

Durante il primo anno di attività, questa unità operativa si è occupata di identificare dei geni potenzialmente rilevanti nelle cellule primitive tumorali. Uno dei geni di interesse si è dimostrato l'HMGA1 (la prima proteina dell'*high mobility group A*), una proteina della cromatina che pur non avendo attività trascrizionale è in grado di regolare l'espressione di diversi geni. Il blocco di uno o due alleli del gene *hmga1* ha modificato l'espressione di un numero molto elevato di geni nelle cellule staminali embrionali. L'analisi con *microarrays* ha infatti dimostrato una variazione in positivo superiore a 4 volte di 87 geni e una variazione in negativo di 163 geni. Queste variazioni si sono dimostrate specifiche per le cellule primitive, non essendo rilevate nei tessuti differenziati (Martinez Hoyos J et al,

2004). Questi risultati sono particolarmente significativi alla luce della correlazione fra l'espressione di HMGA1 e la trasformazione neoplastica. E' stato infatti dimostrato che quest'ultima avviene a carico del pool di cellule primitive sia nel compartimento emopoietico che nel tessuto nervoso e mammario, dove sono state recentemente identificate cellule staminali cancerose responsabili della rigenerazione tumorale. Pertanto l'azione specifica dell'HMGA1 sulle cellule primitive probabilmente costituisce un fattore chiave nella tumorigenesi e lo studio dei geni regolati da HMGA1 potrebbe rivelarsi fondamentale per migliorare la comprensione del processo di trasformazione neoplastica. Su questa stessa linea, stiamo analizzando l'azione di soppressione tumorale dei geni F1H e Testin a livello delle cellule tumorigeniche alla base del cancro al polmone e allo stomaco (Zanesi N et al, 2005; Drusco A et al, 2005).

Parallelamente, abbiamo cercato di capire se esistano dei geni tumorali non conosciuti la cui alterazione possa essere alla base della predisposizione genetica a bassa penetranza che si osserva frequentemente in una serie di famiglie che non mostrano alterazioni genetiche dei principali fattori di soppressione tumorale conosciuti. Basandoci sul fatto che la delezione del 13q14 sia presente in un numero molto elevato di neoplasie, abbiamo identificato un importante gene di soppressione tumorale. Abbiamo infatti dimostrato che la mutazione della proteina soppressore di tumore 1 simile al fattore di ribosilazione dell'ADP (ARLTS1) è responsabile di una generale predisposizione ai tumori su base familiare. In uno studio effettuato su un campione di 216 pazienti con tumori sporadici (leucemia mieloide cronica, cancro alla tiroide, colon, mammella, polmone e pancreas) o con pancitopenia idiopatica (un disordine del sangue, generalmente associato ai tumori, caratterizzato dalla mancanza di piastrine ed globuli rossi e bianchi), uno di 109 pazienti con forme di cancro familiare e uno di controllo costituito da 475 persone sane o con patologie non tumorali, la frequenza di un polimorfismo G446A (Trp149Stop) che codifica per una ARLTS1 troncata era significativamente più frequente nei pazienti con tumore familiare. Inoltre l'espressione di ARLTS1 si è dimostrata ridotta a causa di una metilazione del suo promotore nel 25% dei tumori primari (Calin GA et al, 2005). La riespressione di ARLTS1 nelle cellule tumorali si è dimostrata in grado di promuovere l'apoptosi e di sopprimere l'azione tumorigenica di linee cellulari e di cellule primitive primarie di tumori del polmone, mentre la forma troncata si è dimostrata inefficace (Calin GA et al, 2005). I nostri dati preliminari indicano una diversa espressione genica in cloni di cellule primitive che esprimono la forma intera o la forma troncata di ARLTS1, a suggerire che questa mutazione associata ai tumori modifica l'espressione di una serie di geni coinvolti nei processi di cancerogenesi. Questi geni sembrano regolare anche la risposta farmacologia antitumorale, in quanto le cellule con ARLTS1 troncata rispondono meno ad una serie di farmaci antitumorali. Questi risultati saranno oggetto di approfondimento nei prossimi due anni del progetto, con l'obiettivo di valutare se particolari classi di farmaci siano più appropriati per la terapia dei pazienti che abbiano la mutazione di ARLTS1.

Infine questa U.O. ha sviluppato delle ricerche sui microRNA, allo scopo di studiarne il ruolo nelle cellule primitive neoplastiche nei prossimi mesi. In particolare, 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 (Calin GA et al, 2005).

Dato che l'analisi di questi microRNA richiede un'elevata quantità di materiale (circa 20microgrammi/northern), non sempre disponibile per la comparazione delle cellule primitive neoplastiche con la controparte normale, 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. 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 (Liu CG et al, 2004). Le analisi di espressione sono state confermate e validate tramite Northern blot. 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 (Calin GA et al, 2004).

Pubblicazioni:

- Martinez Hoyos J, Fedele M, Battista S, Pentimalli F, Kruhoffer M, et al. Identification of the genes up- and down-regulated by the high mobility group A1 (HMGA1) proteins: tissue specificity of the HMGA1-dependent gene regulation. *Cancer Res.* 64:5728-35, 2004.
- Zanesi N, Mancini R, Sevignani C, Vecchione A, Kaou M, et al. Lung cancer susceptibility in Fhit-deficient mice is increased by Vhl haploinsufficiency. *Cancer Res.* 65:6576-82, 2005.
- Drusco A, Zanesi N, Roldo C, Trapasso F, Farber JL, et al. Knockout mice reveal a tumor suppressor function for Testin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:10947-51, 2005.
- Calin GA, Trapasso F, Shimizu M, Dumitru CD, Yendamuri S, et al. Familial cancer associated with a polymorphism in ARLTS1. *N Engl J Med.* 352:1667-76, 2005.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11755-60, 2004.
- Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9740-4, 2004.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:2999-3004, 2004.

Budget**I° anno**

Finanziamento Totale	€ 700.000
-----------------------------	------------------

Questo budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget è stato suddiviso tra le diverse U.O. partecipanti, indicate a pag. 21.

II° anno

Finanziamento totale	€ 635.000
-----------------------------	------------------

Questo budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget verrà suddiviso tra le diverse U.O. indicate a pag. 21, coerentemente al primo anno di attività.

III° anno. Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.

**(IVA) IDENTIFICAZIONE DI NUOVI MODULATORI DELL'ANGIOGENESI
TUMORALE PER SVILUPPO DI STRATEGIE ANTI-ANGIOGENICHE INNOVATIVE.**

Responsabili Scientifici: M. Presta, Università di Brescia

B. Ensoli, Istituto Superiore di Sanità

G. Condorelli/ F. Facchiano, Università "La Sapienza",
Roma/ Istituto Superiore di Sanità

(I) Nuovi modulatori dell'angiogenesi tumoraleScopo del progetto

Scopo del presente progetto è di studiare i meccanismi 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 ottenutiFase 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 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 (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 (vedi figura).

FGF2-REGULATED GENES								
	1G11	SIEC	MBE	MBE-3F3	MAE-3F2	MAE-3F2T		
UP:	239	183	103	142	687	1142		
DOWN:	210	179	134	1096	446	1270		
	FGF2-treated			FGF2-transfected				

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, e la proteina Drm/gremlin appartenente alla famiglia delle cysteine-knot proteins dotate di attività BMP antagonista. Per quanto riguarda p12, abbiamo condotto studi che hanno dimostrato come tale proteina sia necessaria per la replicazione cellulare indotta da FGF2 (Dell'Era P et al, 2005). Abbiamo inoltre studiato l'espressione di Drm/gremlin durante lo sviluppo embrionale in Zebrafish (Nicoli S et al, 2005) ed attualmente stiamo studiando l'impatto della sua overespressione in cellule staminali murine durante il processo di differenziamento dei corpi embrionali in vitro.

Utilizzando HIV-Tat come stimolo angiogenetico, abbiamo approfondito il ruolo dell'integrina $\alpha v \beta 3$ nel processo di angiogenesi, identificando alcuni dei segnali di trasduzione (focal adhesion kinase ed NF κ B) attivati dall'engagement di tale integrina durante l'angiogenesi indotta da Tat (Urbinati C et al, submitted).

Infine, dato il ruolo fondamentale giocato dalla risposta immunitaria nel modulare l'angiogenesi tumorale, abbiamo studiato il profilo angiogenetico di cellule dendritiche attivate da un ambiente citochinico di tipo Th2 (Ribaldi E et al, submitted)).

Fase 2: "Creazione di strumenti farmacologici per inibire i meccanismi pro-angiogenesi identificati".

Stante l'indubbia importanza di FGF2 nell'angiogenesi, da noi sottolineata in una recente monografia (Presta M et al, 2005), abbiamo condotto studi volti alla caratterizzazione di nuove eparine biotecnologiche a basso peso molecolare volte ad inibire l'attività angiogenetica di FGF2 (Presta M et al, 2005).

Abbiamo inoltre studiato alcuni derivati del trans-resveratrolo caratterizzati da una attività antiangiogenetica e di "vascular targeting" grazie alla loro capacità di destabilizzare i microtubuli delle cellule endoteliali (Belleri M et al, 2005).

Infine, anche sulla base dei nostri studi sopraccitati, abbiamo investigato la capacità antiangiogenetica di un nuovo peptico-mimetico in grado di fungere da nell'engagement dell'integrina $\alpha v \beta 3$ (Urbinati C et al, submitted).

Pubblicazioni:

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

- Nicoli S., Gilardelli C.N., Pozzoli O., Presta M. and Cotelli F. Regulated expression pattern of gremlin during zebrafish development. *Gene Expr Patterns* 5:539-44, 2005.

- Presta M., Dell'Era P., Mitola S., Moroni E., Ronca R. and Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:159-78, 2005.

- Presta M., Oreste P., Zoppetti G., Belleri M., Tanghetti E., et al. Antiangiogenic activity of semisynthetic biotechnological heparins: low-molecular-weight-sulfated Escherichia coli K5 polysaccharide derivatives as fibroblast growth factor antagonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:71-6, 2005.

- Belleri, M., Ribatti D., Nicoli S., Cotelli F., Forti L., et al. Antiangiogenic and vascular-targeting activity of the microtubule-destabilizing trans-resveratrol derivative 3,5,4'-trimethoxystilbene. *Mol Pharmacol* 67:1451-9, 2005.

Manoscritti inviati per la pubblicazione:

- Ribaldi E., Musso T., Moroni M., Urbinati C., Bernasconi S., et al. Pro-angiogenic properties of alternatively activated dendritic cells. *Blood*, submitted