

- Urbinati C., Bugatti A., Giacca M., Schlaepfer D., Presta M. and M. Rusnati $\alpha_v\beta_3$ integrin-dependent activation of focal adhesion kinase mediates NF κ B activation and motogenic activity by HIV-1 Tat in endothelial cells. J. Cell Science, submitted.
- Urbinati C., Mitola S., Tanghetti E., Kumar C., Waltenberger J., et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ as a target for blocking HIV-1 Tat induced endothelial cell activation in vitro and angiogenesis in vivo. Arterios. Thromb. and Vascular Biol., submitted.

(II) Gli inibitori delle proteasi dell'HIV nella terapia anti-angiogenetica

Individuazione dei meccanismi d'azione degli HIV-PI, nuovi strumenti per bloccare l'angiogenesi e l'invasione tumorale.

Nostri studi precedenti hanno dimostrato che gli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) indinavir e saquinavir sono in grado di inibire lo sviluppo di lesioni angioproliferative e di edema indotti in topi atimici mediante l'inoculazione di cellule di sarcoma di Kaposi (KS) o di bFGF, e l'angiogenesi indotta da basic fibroblast growth factor (bFGF) e/o vascular endothelial growth factor (VEGF) nella membrana corioallantoidea di pollo (Sgadari et al., Nat Med 2002, e dati non pubblicati). Tali effetti sono dovuti al blocco dell'invasione, ma non della proliferazione, di cellule endoteliali e di cellule KS ed all'inibizione dell'attivazione proteolitica della metalloproteasi della matrice di tipo 2 (MMP-2), un enzima 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). Questo enzima viene attivato in seguito a due tagli proteolitici che convertono la forma latente di MMP-2 (pro-MMP-2) in una forma pre-attivata (pre-MMP-2) e, successivamente, nella forma attiva (MMP-2 attiva). Ciò ha suggerito che gli HIV-PI abbiano come target pathways 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, 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, una metalloproteasi di membrana che media l'attivazione proteolitica di MMP-2. Dopo avere raccolto i supernanti cellulari, le cellule sono state lisate mediante shock ipertonico e 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 extracellulare 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 nella forma completamente attiva. Questo step, mediato da MT1-MMP, è noto richiedere il legame di pre-MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$, ed è catalizzato da molecole di MMP-2 (in forma attiva) presenti sulla membrana cellulare in prossimità dell'integrina. 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 $\alpha_v\beta_3$, e/o intervenendo sull'espressione o sull'attività dell'integrina stessa.

L'attivazione autoproteolitica di MMP-2 è dipendente suo dal legame all'integrina $\alpha_v\beta_3$, in quanto il processo di attivazione richiede la giustapposizione di molecole di MMP-2 attiva a pre-MMP-2. Ciò si realizza mediante l'aggregazione sulla membrana cellulare di un complesso di molecole comprendenti MT1-MMP, pro-MMP-2, pre-MMP-2 e integrina

$\alpha_v\beta_3$. L'attivazione, tuttavia, può essere fatta avvenire in vitro anche in assenza dell'integrina $\alpha_v\beta_3$, in quanto è possibile ottenere concentrazioni assolute di MMP-2 attiva e pre-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). 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 viene convertita nella forma attiva nell'arco di 15 ore. Tuttavia, indinavir o saquinavir (10 μ M) non hanno determinato alcuna alterazione nella reazione attivazione di MMP-2. Questi dati indicano che indinavir e saquinavir non intervengono direttamente nel processo di attivazione proteolitica di MMP-2, ed hanno perciò suggerito che indinavir e saquinavir interferiscano 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 $\alpha_v\beta_3$ inibisce la reazione di attivazione di MMP-2, poiché il legame di pre-MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$ in vitro crea un impedimento sterico che protegge pre-MMP-2 dall'azione di MMP-2. Quando indinavir o saquinavir sono stati aggiunti alle miscele di reazione non è stato evidenziato alcun effetto sulla cinetica di protezione, indicando che gli HIV-PI non interferiscono direttamente con il legame di pre-MMP-2 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).

Le prime fasi della neoangiogenesi sono mediate dalla degradazione della membrana basale, e dalla sua sostituzione con una "matrice provvisoria" a cui aderiscono le cellule endoteliali che sono divenute polarizzate e che cominciano a migrare. Abbiamo perciò studiato gli effetti di indinavir e saquinavir sull'adesione di cellule HUVEC seminate su substrati della lamina basale e della matrice provvisoria. Questi esperimenti hanno indicato che l'adesione di cellule HUVE a laminina e perlecano, due substrati della membrana basale che agiscono da ligandi di $\alpha_v\beta_3$, è fortemente inibita in presenza di saquinavir, mentre 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 al perlecano ed al fibrinogeno e alla protrombina, due componenti fondamentali della matrice provvisoria che agiscono da ligandi di $\alpha_v\beta_3$, ed anche questo effetto è abolito in presenza di ioni manganese. Questi esperimenti hanno dimostrato che indinavir e saquinavir agiscono interferendo con il legame delle integrine a molecole della matrice extracellulare. Ulteriori studi sono stati effettuati per valutare gli effetti degli HIV-PI sullo "spreading" delle cellule piastrate su substrati della matrice extracellulare, un processo tramite il quale le cellule creano progressivi contatti con la matrice. Questo processo è dipendente dalla rilocalizzazione di integrine ad alta affinità e di MMPs nei lamellipodi e negli invadopodi. Questi esperimenti hanno mostrato che saquinavir inibisce significativamente lo spreading di cellule endoteliali su tutti i substrati, mentre indinavir inibisce lo spreading su protrombina, fibrinogeno e laminina. Perciò i dati ottenuti fino ad ora indicano che gli HIV-PI esercitano le proprie azioni anti-angiogeniche e anti-invasive interferendo con il legame di integrine ai substrati, particolarmente ai ligandi di $\alpha_v\beta_3$, e con l'attivazione e/o rilocalizzazione di integrine

nei lamellipodi e negli invadopodi. Questi processi mediano non solo la migrazione cellulare ma anche l'attivazione autoproteolitica di MMP-2.

Per chiarire se gli HIV-PI agiscano interferendo con la rilocalizzazione di integrine nei lamellipodi, effettueremo studi per valutare l'effetto di indinavir e saquinavir sui processi di "recycling" e "trafficking" di queste integrine

Validazione degli effetti anti-angiogenici ed anti-tumoriali degli HIV-PI in modelli animali.

L'angiogenesi, l'invasione delle cellule tumorali e l'attivazione di MMP-2 sono richieste per la crescita di tutti i tumori. I nostri dati indicano, perciò, che gli HIV-PI potrebbero essere usati per la terapia non solo del KS ma di tumori con elevata incidenza e prevalenza nella popolazione umana.

Abbiamo perciò valutato l'azione degli HIV-PI sulla crescita di tumori indotti in topi nudi inoculando linee cellulari umane derivate da carcinoma del polmone, della mammella, del colon e del fegato. La somministrazione mediante gavage intragastrico di indinavir o saquinavir, a dosi paragonabili a quelle utilizzate in pazienti infettati da HIV (Deeks et al JAMA 1997; Sgadari et al Nat Med. 2002), ha inibito significativamente la crescita di questi tumori ($p < 0.01$). Sulla base di questi risultati abbiamo analizzato la capacità di indinavir e saquinavir di bloccare l'angiogenesi tumorale (Sgadari et al., Nature Medicine 2002). Sia indinavir che saquinavir hanno indotto una significativa riduzione della microvascolatura tumorale.

Inoltre, entrambi i farmaci, a dosi simili alle concentrazioni di valle rilevate nei pazienti trattati, hanno bloccato l'invasione di tutte le linee neoplastiche. Tuttavia mentre l'indinavir non ha mostrato effetti sulla crescita basale delle linee testate, il saquinavir ad alte dosi ha promosso un blocco della crescita e della sopravvivenza cellulare di tutte le linee tumorali.

Questi dati sono in accordo con studi recenti indicanti che, a dosi elevate, il ritonavir ed il saquinavir inibiscono l'attività del proteasoma (André et al Proc Natl Acad Sci 1998; Tovo AIDS 2000; Piccinini et al AIDS 2001; Pati et al., Blood 2002, Gaedicke et al. Cancer Res 2002).

Nei prossimi mesi, gli studi saranno volti a determinare gli effetti di indinavir e saquinavir sui livelli di apoptosi e proliferazione cellulare nei tumori xenogenici indotti in topi nudi. Valuteremo, inoltre, l'impatto della biodisponibilità e, mediante PET, della distribuzione tissutale di questi farmaci nell'inibizione della crescita tumorale.

Pubblicazioni

- Monini P., Sgadari C., Toschi E., Barillari G., and Ensoli B. Antitumor effects of antiretroviral activity. Nat. Rev. Cancer, 4:861-875, 2004.
- Sgadari C., Toschi E., Carlei D., Malavasi L., Bacigalupo I., et al. Proteasome-independent block of angiogenesis and tumor cell invasion by HIV protease inhibitors. (submitted)

(III) Modelli sperimentali di terapia anti-angiogenetica

La nostra unità, nel periodo di tempo che è intercorso dal precedente rendiconto, ha portato avanti i modelli di topo con ricombinazione omologa inducibile che erano stati descritti nelle versioni precedenti.

1) *topi PDK knockout*. Come descritto in precedenza, PDK controlla l'attivazione di Akt. Brevemente, ricordiamo che Akt è una proteina che media gli effetti del VEGF nell'angiogenesi e la maturazione delle cellule CD34+ verso la linea endoteliale. Poiché esistono 3 forme di Akt, abbiamo deciso di utilizzare PDK per inibire il signaling di Akt. Pertanto abbiamo creato un topo eterozigote per PDK, in cui un allele è completamente eliminato mentre l'altro ha un esone che può essere floxato. Abbiamo poi incrociato questo topo con un topo che esprime una forma di CRE attivabile con la tetraciclina a livello cardiomiocitico. Abbiamo determinato l'evento ricombinazione omologa con analisi

genomica e proteica (per PRC e per western blot, rispettivamente). E' stato dimostrato che il sistema funziona perfettamente in quanto, somministrando ai topi tetraciclina, s'induceva la scomparsa della proteina a seguito di riarrangiamento genico.

Pertanto, questi topi sono disponibili per studi atti a determinare il ruolo del pathway di Akt ("downstream" a VEGF receptor) nell'ematopoiesi ed in oncologia. Il mio gruppo li renderà disponibili per questi settori mentre studierà il ruolo di PDK/Akt nel cuore.

2) *topi Akt2 knockout*. Akt 2 gioca un ruolo critico nell'ematopoiesi, dove alcuni studi indicano essere il gene più importante tra i 3 Akt. L'approccio per generare questi topi è stato già descritto in precedenza, mentre qui preme sottolineare lo stato di avanzamento dei lavori. Siamo riusciti ad ottenere eterozigoti con il gene floxato, il che significa che la chimera ha generato eterozigoti. Questi animali debbono essere incrociati con topi che esprimono FLP in modo da togliere la cassetta NEO, che può interferire con l'espressione genica.

3) *topi CAMK 2delta*: questo gene sembra giocare un ruolo critico nello sviluppo delle cellule T. Possiamo annunciare di aver generato un topo che manca del segnale di localizzazione nucleare dell'enzima CAMKd. Pertanto, gli effetti nucleari di questo gene possono essere studiati. Contemporaneamente, stiamo generando topi in cui la funzione di CAMK manca del tutto. Abbiamo generato cellule ES con ricombinazione omologa ma non siamo riusciti ad ottenere chimere perchè la facility in questo periodo ha avuto problemi. Pertanto, si ripeterà l'iniezione delle cellule per ottenere le chimere.

4) *Topi FLT-1*. Abbiamo ottenuto le cellule con ricombinazione omologa, ma, per lo stesso motivo di cui sopra, abbiamo dovuto aspettare per la generazione di chimere.

5) *Topi FLT-4*. Purtroppo il costrutto non ha funzionato nel generare ricombinazione omologa nelle ES. Pertanto, lo stiamo rifacendo dall'inizio.

6) *Topi FLK-1*. Abbiamo fatto il costrutto e dobbiamo generare le ES con ricombinazione omologa.

Abbiamo in programma anche la generazione di topi Tie-2 per cui si è iniziato il costrutto.

Budget**I° anno**

Finanziamento totale	€ 250.000
-----------------------------	------------------

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. 28.

II° anno

Finanziamento totale	€ 225.000
-----------------------------	------------------

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. 28, 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.

(IVB) INFIAMMAZIONE E PROGRESSIONE TUMORALE.
EFFETTO DI INIBITORI DI NF-KB E DI “SCAVENGERS” DI RADICALI LIBERI IN
MODELLI MURINI DI CANCRO DEL COLON, DELLA MAMMELLA E DELLA
PROSTATA

Responsabili Scientifici: M.A. Russo, Università La Sapienza

C. Spadafora, Istituto Superiore di Sanità

P. Sinibaldi Vallebona, Università Tor Vergata

(I) Ruolo dei mediatori dell'infiammazione nella progressione neoplasticaObiettivi di questo progetto

1.-Dimostrare che in tumori umani e 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.

2.-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.

Lavoro svolto nel periodo fino ad aprile 2005.Primo obiettivo

In tumori umani, ottenuti dopo intervento chirurgico in pazienti selezionati e opportunamente caratterizzati, è stato dimostrato mediante immunistochemica che alcune proteine, funzionalmente importanti nella risposta infiammatoria, sono abbondantemente presenti nelle cellule tumorali. In particolare, in tumori della prostata in tessuti normali e di Iperplasia Prostatica Benigna (BPH) e nel tessuto mammario normale (ottenuto da interventi di mastoplastica) e in oltre 60 Ca mammari a varia malignità, sono stati studiati alcuni recettori-sensori di danno capaci di attivare NF-kB, 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'immunostaining per tutte queste proteine appariva fortemente aumentato nei carcinomi, 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 microdissezzate, 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.

Questi risultati sono stati presentati alla ARBU Conference: Prostate Cancer, the extreme points. Rome, 3-4 December, 2004. Inoltre, due manoscritti sono terminati e inviati a riviste internazionali con peer review.

Pubblicazioni

• DiVito M., Sale P., Realacci M., Gradini R., Russo A., et al. Prostate cancer and Inflammation as studied by laser-capture microdissection, molecular biology and immunohistochemistry. Submitted

• Russo A., Sale P., DeVito M., Gentileschi S., Gradini R., et al. Pro-inflammatory genes in human normal mammary tissues, benign proliferative lesions and carcinoma. An immunohistochemistry and molecular biology study. Submitted

Secondo obiettivo

E' stato iniziato il trattamento in vivo con inibitori di NF-kB (CR-3294), con scavengers di radicali liberi e con inibitori della mammalian reverse transcriptase (anti-RT) in due modelli murini. Il lavoro preliminare 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).

I primi trattamenti sono terminati tra marzo e aprile del 2005 e riguardano solo i topi transgenici per il Ca mammario. Per il topo TRAMP per il Ca prostatico è stato impossibile iniziare dei trattamenti a causa del mancato ampliamento della colonia. La causa

determinate è stata la presenza precoce di tumori alle vescicole seminali che rendevano sterili i maschi.

Sempre per motivi legati al ridotto numero di animali anche il modello di ca del colon ottenuto con trattamento chimico nel ratto non è stato ancora iniziato, ma sono stati caratterizzati morfologicamente e immunoistochimicamente i tumori ottenuti in alcuni animali di controllo.

Risultati nel modello di ca mammario del topo transgenico MMT.

1. Risultati a 12 settimane di vita e a 8 settimane dall'inizio del trattamento.

Animali transgenici di controllo non trattati.

L'analisi macroscopica del topo transgenico MMT di 12 settimane di vita non trattato farmacologicamente mostrava 4 grandi aree visibili macroscopicamente ove anatomicamente sono situate le ghiandole mammarie nel topo normale.

Allo studio istopatologico è stato riscontrato un carcinoma invasivo con alterazione dell'architettura mammaria e metastasi ai linfonodi loco-regionali.

Animali transgenici trattati con anti-RT

Macroscopicamente mostrava 2 aree ingrossate nella regione della testa ed una nell'area inguinale che all'esame autoptico e poi a quello microscopico sono risultate essere aree di mastopatie cistiche con aree di iperplasia e focolai di carcinoma in uno stadio ancora iniziale.

Animali transgenici trattati con inibitore di NFkB

Il quadro macroscopico appariva notevolmente meno grave, mostrando solo 2 piccole aree tumorali, soprattutto rispetto al controllo non trattato e anche rispetto al topo trattato con l'anti-RT. Microscopicamente mostrava solo un piccolo focolaio di carcinoma allo stadio iniziale. Sia il trattamento con inibitore di NFkB che con l'agente anti-RT sembrava efficace nel prevenire l'invasione di organi vicini e dei linfonodi regionali.

2. Risultati a 16 settimane di vita e a 12 settimane dall'inizio del trattamento.

Descrizione macroscopica

Il topo di controllo mostra una alterata architettura macroscopica delle 4 regioni sedi delle ghiandole mammarie. All'analisi macroscopica non si riescono a distinguere le ghiandole dalle strutture adiacenti ed al taglio si notano aree di calcificazione indice di gravità del tumore.

I topi trattati con anti nfkb e anti rt mostrano una inaspettata progressione della massa tumorale nelle 4 sedi delle ghiandole. In particolare il topo trattato con anti NFkB mostra nella regione inguinale (non so se si chiama così nel topo cmq in basso) una area di ulcerazione da definire.

L'analisi macroscopica del topo transgenico MMT di 12 settimane di vita non trattato farmacologicamente mostrava 4 grandi aree visibili macroscopicamente ove anatomicamente sono situate le ghiandole mammarie nel topo normale.

Istopatologica e analisi molecolare.

All'esame microscopico è risultato essere affetto da un carcinoma invasivo con alterazione dell'architettura mammaria e metastasi ai linfonodi loco regionali.

La maggior parte dei campioni sono stati processati, ma attendono di essere studiati e analizzati.

• Sono stati inoltre conservati a -80°C tutti i campioni su cui sarà eseguita l'analisi molecolare (WB, real-time PCR su frazioni tissutali ottenute con LCM).

(II) Gli inibitori della trascrittasi inversa e dell'infiammazione nella terapia del carcinoma mammario e prostatico

Il primo obiettivo della nostra UO è stato quello di predisporre e di espandere le colonie dei due ceppi di topi transgenici ottenuti dal National Cancer Institute (NCI). Questi topi sono naturalmente predisposti al cancro mammario (FVB/N.TG(MMTV-

PyVT)34M(T/X) e prostatico B6-TG(TRAMP)8247 Ng(T/X) e sono correntemente utilizzati in questo progetto di ricerca come modelli sperimentali sia dalla nostra UO che da quella di Matteo Russo.

Gli animali positivi sono identificati due/tre settimane dopo la nascita utilizzando campioni di DNA estratto da un frammento di coda da ognuno dei nuovi nati che sono analizzati per PCR diretta usando una coppia di oligonucleotidi specifici.

In breve:

- I topi femmine del ceppo (FVB/N.TG(MMTV-PyVT)34M(T/X) sviluppano un tumore mammario rilevabile ad esame istologico a partire dalla 8^a settimana di vita e palpabile tra la 12^a-13^a settimana. Lo sviluppo del tumore causa la morte degli animali intorno alla 16^a settimana.

- Abbiamo fino ad ora selezionato 15 animali positivi di questo ceppo che sono stati suddivisi in tre gruppi: a) 8 di diversa età sono stati utilizzati per gli studi di immunoistochimica utilizzando un anticorpo anti Trascrittasi Inversa (RT) allo scopo di stabilire l'espressione di RT in rapporto alla comparsa della lesione tumorale, b) 3 sottoposti a trattamento col farmaco anti infiammatorio CR3294.HCL e c) 4 sottoposti al trattamento con l'inibitore di RT Efavirenz. Entrambi i gruppi di animali sono trattati farmacologicamente a partire dal primo mese di vita. Dagli ultimi due gruppi, animali sono stati soppressi alla 12esima settimana ed alla 16esima settimana ed i tumori espiantati sono stati utilizzati per esami istologici ed istochimici usando anticorpi specifici allo scopo di verificare eventuali effetti esercitati dai farmaci sulla crescita tumorale. Dati preliminari suggeriscono che: a) negli animali non trattati, l'RT è fortemente espressa nella lesione tumorale conclamata della ghiandola mammaria mentre è assente nello stesso tessuto normale; b) alla 12 settimana, i trattamenti con inibitori di RT e con l'anti infiammatorio rallentano marcatamente la progressione tumorale rispetto al controllo. Inoltre, i topi trattati non presentano invasioni metastatiche in organi vicini e non hanno linfonodi coinvolti come invece avviene nei controlli non trattati; c) l'analisi dei reperti biotipici alla 16 settimana sono ancora parziali e tutt'ora in corso. Tuttavia all'esame macroscopico appare come se la crescita tumorale abbia ripreso vigore nonostante i trattamenti. Sulla base di questi primi dati, emerge l'efficacia dei due trattamenti nel contrastare la crescita tumorale; questo effetto è tuttavia più rilevante nelle fasi iniziali ed intermedie della progressione tumorale, mentre è ridotta nella fase più avanzata.

- I topi del ceppo B6-TG(TRAMP)8247 Ng(T/X) sono poco fertili. Sono nati in tutto 15 animali che devono ancora essere selezionati per identificare i positivi. Lo sviluppo del tumore prostatico è inoltre molto più lento (circa 6 mesi) in paragone all'altro ceppo. Sarà necessario pertanto aumentare le nidiate per raggiungere il numero di animali maschi positivi richiesti per lo svolgimento del programma.

Attività da svolgere nel II° anno del Programma

- Variazione dei dosaggi dei farmaci: i protocolli correntemente adoperati prevedono l'uso di dosi fisse dei due farmaci selezionate arbitrariamente prima dell'inizio della sperimentazione. Sulla base dei dati iniziali, ci proponiamo di aumentare le dosi soprattutto con lo scopo di controllare la crescita tumorale nelle fasi avanzate/terminali.

- Analisi biochimiche-molecolari sui tumori espiantati da topi trattati: allo scopo di caratterizzare a livello molecolare gli effetti dei farmaci sui tumori, ci proponiamo di esaminare l'espressione genica dei tumori trattati rispetto ai controlli. In particolare ci focalizzeremo sulla comparsa di eventuali marcatori del differenziamento e sull'espressione di geni coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare. Questo studio verrà effettuato sia su espianti della 12 settimana, quando la crescita tumorale è sotto il controllo farmacologico, sia su campioni della 16 quando questo controllo è attenuato.

- Cinetica dell'espressione di RT in rapporto alla genesi tumorale: ci proponiamo inoltre di stabilire l'eventuale relazione temporale tra comparsa di RT (come proteina) e l'insorgere della lesione tumorale. Questo studio verrà effettuato utilizzando espianti da

animali in cui la lesione sia a stadi molto precoci o addirittura ancora assenti. A tale scopo, utilizzeremo tecniche di RT-PCR, di immunoistochimica e di Western blotting.

(III) Nuovi farmaci antinfiammatori nella terapia del carcinoma sperimentale del colon

Primo obiettivo del progetto era quello di dimostrare il coinvolgimento della risposta flogistica nella progressione del cancro del colon chimicamente indotto da 1,2-dimetilidrazina in ratti ceppo BDIX.

Gli animali, trattati con 1,2-dimetilidrazina, somministrata s.c alla dose di 18mg/Kg secondo uno schema che prevede un trattamento a settimana per 5 settimane consecutive, sviluppavano adenocarcinoma del colon nel 100% degli animali. Nell'esperimento sono stati inclusi 20 ratti trattati con il cancerogeno ed altrettanti animali non trattati come controlli.

A partire dal 14° giorno dall'ultima somministrazione del cancerogeno e ad intervalli regolari di 14 giorni, 2 animali per ciascun gruppo sono stati sacrificati: il colon è stato prelevato, diviso longitudinalmente e ½ congelato in azoto, ½ fissato in formalina.

I campioni ottenuti sono stati analizzati per valutare la comparsa del tumore, che è risultato presente in tutti gli animali osservati a partire da 2 settimane dalla sospensione del trattamento.

Nelle sezioni istologiche si è evidenziato che la progressione del tumore, iniziata come focolaio tumorale nella sottomucosa (Figura 1A) raggiungeva una maggiore infiltrazione del tessuti mucoso con zone di iperplasia associate al tumore (Figura 1C) o a formazioni polipoidi (Figura 1B) a seconda della zona osservata.

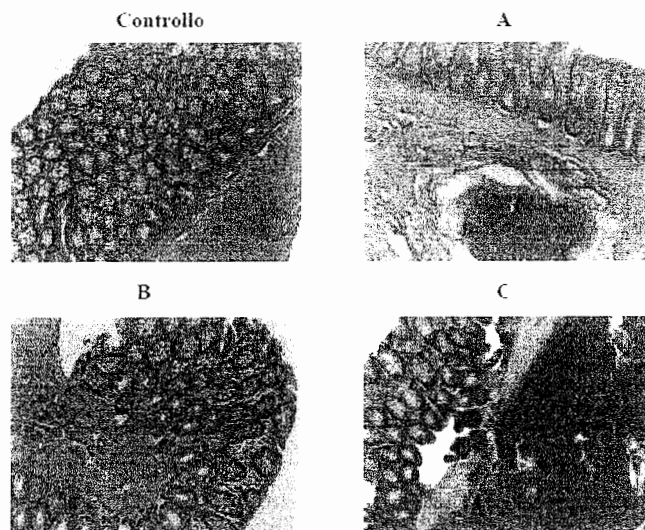


Figura 1

La colorazione immunoistochimica, eseguita utilizzando un anticorpo policlonale contro un epitopo nonapeptidico, che in nostri precedenti studi avevamo dimostrato specifico per adenocarcinoma sia nell'uomo che nel ratto, ha evidenziato una netta positività delle cellule tumorali (Figura 2A) con presenza di lesioni focali (Figura 2B) nei vari stadi di differenziamento.

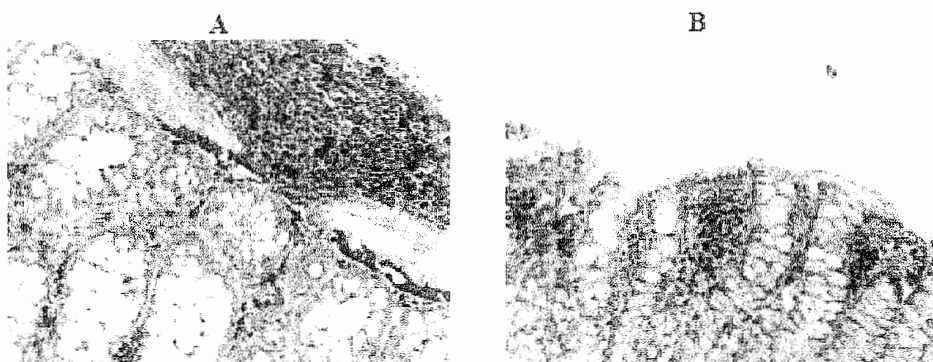


Figura 2

Sulle sezioni istologiche è stata inoltre messa a punto una tecnica di marcatura per E-caderina e β -catenina, entrambi markers di differenziamento delle cellule tumorali e di quelle di colon in particolare, che ha evidenziato una perdita di espressione dell'E-caderina ed un aumento dell'espressione della β -catenina in correlazione con la progressione del tumore.

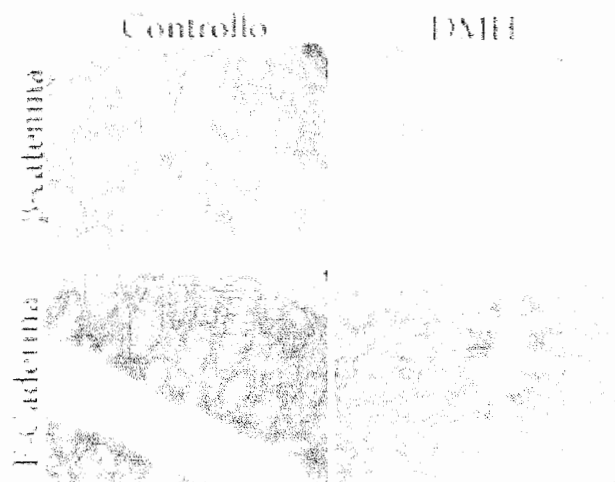


Figura 3

L'identificazione di marcatori del differenziamento tumorale verrà utilizzata successivamente per valutare l'efficacia di farmaci ad attività antinfiammatoria nella prevenzione dello sviluppo del tumore.

I campioni di tessuto di colon corrispondenti, che erano stati conservati congelati, sono stati in parte utilizzati per estrarre dalle lesioni tumorali acidi nucleici purificati, mediante uno sistema automatico che si fonda sulla tecnica di microdissezione laser con impiego di un BioRobot.

Secondo obiettivo dello studio era quello di dimostrare che il controllo della risposta flogistica rallenta la comparsa di metastasi epatiche in un modello animale di adenocarcinoma coloretale del colon.

Cellule della linea DHD/K12, originariamente ottenute da adenocarcinoma di colon indotto in ratto singenico del ceppo BDIX, mediante trattamento con 1,2 dimetilidrazina-2HCl sono state inoculate nella vena splenica di ratti maschi del ceppo BDIX di 6-7 settimane.

Gli animali sono stati suddivisi in gruppi riceventi quantitativi di cellule diversi (da 2 a 12×10^6 cellule). Al momento dell'inoculazione la milza è stata rimossa per evitare l'attecchimento del tumore nella sede di inoculo.

Tutti gli animali inoculati con il maggiore quantitativo di cellule (12×10^6) hanno sviluppato metastasi epatiche a partire da 14 gg dall'inoculo. Gli animali degli altri gruppi hanno egualmente sviluppato metastasi, ma in tempi successivi.

Lo studio preliminare di induzione della comparsa delle metastasi epatiche, in funzione della quantità delle cellule inoculate, ci ha permesso di individuare un protocollo sperimentale da utilizzare per lo studio di molecole, dotate di meccanismi di azione diversi, sempre rivolti ad inibire la risposta infiammatoria correlata alla progressione neoplastica.

Sulla base delle prove preliminari condotte è stato stabilito di scegliere la via orale quale via di somministrazione delle molecole Cyanidin-3-O- β -glucopyranoside (C-3-G) e CR3294, in quanto la somministrazione per gavage, che era stata ipotizzata, si è rivelata di difficile esecuzione in questo tipo di animale.

Budget**I° anno**

Finanziamento totale	€ 170.000
-----------------------------	------------------

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 ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget è stato suddiviso tra le diverse U.O. partecipanti indicate a pag. 36.

II° anno

Finanziamento totale	€ 150.000
-----------------------------	------------------

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 ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget verrà suddiviso tra le diverse U.O. indicate a pag. 36, 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.

(V) REGOLAZIONE DEL TURNOVER DI BCL-2 RNA MEDIANTE RNA ANTISENSEN

Responsabile Scientifico: A. Nicolin, Università di Milano

1.1) Espressione di RNA antisenso complementare a bcl-2 mRNA

1.1) Analisi in silico

Gli studi computazionali sono stati completati. In particolare, il software AntiHunter si è dimostrato uno strumento efficace per l'identificazione *in silico* di trascritti antisenso. Dopo estesa analisi del database delle EST sono state identificate, nell'ambito del gene bcl-2, alcune sequenze che rappresentano potenziali trascritti in orientamento antisenso. I dati acquisiti sono a disposizione e costituiscono la base per successive ricerche.

1.2) Modified strand-specific RT-PCR (Tag-PCR).

Sono stati utilizzati due diversi approcci allo scopo di realizzare una RT-PCR filamento-specifica. Il primo si basa sull'utilizzo di una retrotrascrittasi termostabile che, permettendo un *priming* ad alta temperatura durante la sintesi del cDNA consentirebbe di evitare o comunque ridurre gli appaiamenti aspecifici. Il secondo approccio, sviluppato in parallelo, si basa sull'uso di un primer contenente in 5' una sequenza Tag (20-mer) durante la sintesi del cDNA (tagged RT-PCR). Sono stati finora condotti gli esperimenti preliminari su trascritti sintetici di sequenza ed orientamento noto per determinare la specificità e la sensibilità delle due diverse metodologie.

1.3) Quantitative Real Time PCR of the bcl-2 and IgH loci

L'espressione di RNA in antisenso nel tumour follicolare B è iniziata con la messa a punto del dosaggio di RNA di bcl2 con lo strumento Taqman. I risultati ottenuti hanno dimostrato l'affidabilità del metodo in termini di sensibilità e riproducibilità. Tuttavia la determinazione in parallelo dell'RNA in orientamento senso e dell'RNA ectopico in orientamento antisenso non ha portato a risultati soddisfacenti. Il risultato atteso prevedeva l'amplificazione della sequenza antisenso solamente nelle linee linfomatose caratterizzate dalla traslocazione t(14;18) e nessuna amplificazione di bcl2 RNA in orientamento antisenso nelle linee negative per la traslocazione. Anche con la tecnologia TaqMan la specificità di retro-trascrizione non è sufficiente per discriminare in modo netto tra due sequenze di RNA complementari.

2) Meccanismi molecolari del turnover di bcl-2 RNA

2.1) Ruolo della proteina BCL2

Lo studio è iniziato analizzando la specificità di regolazione da parte della proteina BCL2. E' stato dimostrato che la proteina è in grado di interagire esclusivamente con le sequenze regolatorie ARE del gene rilevante. L'interazione funzionale proteina-RNA è stata analizzata a livello molecolare. Studi approfonditi mediante two-hybrid system hanno dimostrato la probabile non diretta relazione tra le due molecole. Recentissimi lavori indicherebbero la mediazione di miRNA nel veicolare la proteina su specifici motivi del 3' UTR.

2.2) Studio di ARE-BP

E' stato precedentemente dimostrato che la regione 3'UTR del mRNA di bcl-2 interagisce con diverse ARE binding proteins (AUBPs). Utilizzando il sistema dei tre ibridi è stata individuata una nuova proteina umana che interagisce con l'ARE di bcl-2 denominata TINO (Donnini et al., 2004). Dati preliminari evidenziano che il legame di TINO all'ARE di bcl-2 svolge un'azione regolatoria negativa sui livelli post-trascrizionali di bcl-2. Esperimenti in corso stanno concludendo la messa a punto di condizioni sperimentali idonee per l'analisi mediante elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa di altre proteine regolatorie in grado di interagire con l'ARE di bcl-2.

2.3) Knock-down di proteine regolatorie

Sono stati disegnati siRNA compatibili per agire su mRNA di Tino, la proteina identificata recentemente dal ns gruppo. Sono anche in corso studi per valutare le migliori condizioni di veicolazione degli siRNA. Anche in accordo con altri laboratori l'attività di silencing ottimale si riscontra mediante doppia somministrazione a 48 h di distanza.

3) Regolazione del turnover di bcl2-RNA con mezzi esogeni

3.1) Oligoribonucleotidi antisenso

Sono stati disegnati e preparati 3 oligoribonucleotidi complementari (α ORN) ad ARE di bcl2, modificati in 2'orto-metil, per renderli stabili alla degradazione biologica. Sono stati utilizzati in un modello in vitro di degradazione di RNA. In questo sistema gli α ORN hanno rivelato una capacità di stabilizzare l'RNA di bcl2. Sono stati caratterizzati alcuni parametri, come la curva dose-risposta, la specificità su sequenze ARE in mediante studi in sistemi cell-free. L'analisi del messaggero ha rivelato l'inibizione del processo di degradazione e la somministrazione degli oligoribonucleotidi ha dimostrato un aumento significativo dell'espressione di RNA per bcl2. La determinazione dei livelli proteici ha confermato l'aumento cellulare della proteina Bcl2 rispettando un effetto dose-risposta. Si è ottenuta definitiva documentazione che l'aumento è specifico per la proteina Bcl2.

3.2) Oligoribonucleotidi senso

Sono stati disegnati e preparati 3 oligoribonucleotidi in orientamento senso (sORN) rispetto alla regione ARE dell'RNA di bcl2, modificati in 2'orto-metil, per renderli stabili alla degradazione biologica. Sono stati condotti i primi saggi in vitro. Gli sORN hanno dimostrato attività stabilizzante agendo con probabile meccanismo decoy.

3.3) Terapie combinate

Gli studi di attività antitumorale in combinazione con farmaci citotossici è iniziata. L'obiettivo è di agire sulla cascata PI3K/AKT/mTOR che gioca un ruolo importante nel regolare la fosforilazione di Bcl2 e che potrebbe trovare sinergia con i farmaci ad azione sui microtubuli. In una seconda fase l'azione di oligoribonucleotidi o di siRNA attivi in modo opposto su bcl2 verranno saggiati.

Pubblicazioni

Donnini M, Lapucci A, Papucci L, Witort E, Jacquier A, et al. Identification of Tino: A new evolutionarily conserved bcl-2 AU-rich element RNA binding protein. J. Biol. Chem. 279: 20154-66, 2004.

Schiavone N, Donnini M, Nicolin A, Capaccioli S. Antisense oligonucleotide drug design. Curr Pharm Des. 10:769-84, 2004.

Ghisolfi L, Papucci L, Bevilacqua A, Canti G, Tataranni G, et al. Increased Bcl2 expression by antisense oligoribonucleotides targeting the ARE motif. Submitted