

Sintesi del programma e dei risultati scientifici

Il Programma Oncotecnologico è stato ideato e realizzato allo scopo di potenziare lo sviluppo di nuove e più efficaci terapie anti-tumorali, sulla base delle più recenti acquisizioni della tecnologia biomedica.

Il Programma, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ha affrontato diverse aree strategico-scientifiche in sei progetti multipolari, ai quali hanno partecipato laboratori afferenti all'ISS e a diversi IRCCS e centri di ricerca universitari ed extra-universitari. Un aspetto fondamentale dell'intero programma è rappresentato dalla sinergia tra i gruppi di ricerca, sia nell'ambito di uno stesso progetto, sia tra progetti diversi. Questi ultimi, infatti, sono focalizzati su aree limitrofe ed interconnesse, e hanno previsto una stretta interazione operativa.

I diversi progetti si sono occupati di vari aspetti genetici, molecolari e cellulari delle neoplasie e sono stati svolti in parallelo ad uno studio clinico (sottoprogetto I) volto a sviluppare un test di laboratorio (test dell' "extreme drug resistance", EDR) capace di predire la combinazione ottimale di farmaci chemioterapici da somministrare a ciascun paziente. In particolare, i sottoprogetti hanno previsto:

- Strategie basate sull'analisi genomica delle cellule tumorali, mediante l'uso dei cosiddetti "gene arrays", allo scopo di (a) identificare i meccanismi molecolari della farmaco-resistenza e di (b) sviluppare farmaci mirati, in grado di colpire selettivamente le cellule tumorali, limitando gli effetti secondari sulle cellule normali (Sottoprogetto II).
- Studi di biologia cellulare e molecolare volti ad ottimizzare le terapie anti-tumorali sia grazie al "targeting" della componente neoplastica staminale (Sottoprogetto III), sia interferendo con la neangiogenesi e il microambiente tumorale (Sottoprogetto IVA).
- L'allestimento di una serie di modelli sperimentali per ottimizzare l'impiego di molecole antiflogistiche nelle neoplasie della mammella, della prostata e del colon-retto (Sottoprogetto IVB).
- L'utilizzo di sequenze antisense per la modulazione dell'espressione di un gene anti-apoptotico (Bcl2) rilevante nei linfomi a cellule B follicolari (Sottoprogetto V).
- Un approccio innovativo di terapia antitumorale basato sull'uso di farmaci anti-retrovirali, inibitori della proteasi di HIV e della trascrittasi inversa (Sottoprogetto VI).

I risultati scientifici ottenuti nell'ambito di ciascuno dei suddetti sottoprogetti sono stati considerevoli, determinando il successo dell'intero Programma. Di seguito verrà esposta una sintesi delle più rilevanti acquisizioni ottenute nell'ambito di ciascuna area di ricerca, cui farà seguito una descrizione dettagliata per ciascun gruppo di lavoro relativa all'attività svolta nel periodo compreso tra il 2004 ed il 2008.

L'attività di ricerca del **Progetto I** ("Le basi metodologiche per una chemioterapia anti-tumorale mirata: il saggio dell'EDR nel carcinoma ovarico ed in altre neoplasie") è stata realizzata su due filoni differenti: il primo ha riguardato il test EDR su campioni di carcinoma ovarico, quale attività di supporto laboratoristico ad uno studio clinico multicentrico; il secondo è stato rivolto allo studio dell'efficacia di un inibitore del proteasoma (Bortezomib), di un ligando di recettori di morte cellulare (TRAIL) e di un peptide che mima l'azione della proteina pro-apoptotica Smac/DIABLO sia su linee cellulari di carcinoma ovarico che su cellule tumorali primarie.

Per quanto riguarda il test EDR, questo è stato eseguito con successo in più di 270 pazienti affette da carcinoma dell'ovaio. Ciò ha permesso l'attivazione di uno studio clinico multicentrico, che ha come obiettivo la comparazione tra la chemioterapia standard e quella basata sui risultati del test, in una casistica randomizzata di carcinomi dell'ovaio. In particolare, il trattamento di prima linea per il carcinoma epiteliale dell'ovaio, costituito dai due chemioterapici carboplatino e paclitaxel, si dimostra inefficace in circa il 25% delle pazienti a causa di un fenomeno di chemioresistenza immediata o sviluppata entro 6 mesi dalla fine del trattamento. Il test EDR ha dimostrato di essere in grado di predire *in vitro* tale resistenza con il 99% di accuratezza. Inoltre, i risultati del test EDR sono stati associati con i profili di espressione genica mediante tecnologia microarrays, al fine di identificare nuovi marcatori diagnostici, prognostici e predittivi del carcinoma ovarico e di comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base della chemio resistenza. I risultati di questi studi,

successivamente validati con tecniche di “Quantitative Real Time PCR” e mediante analisi immunoistochimica, hanno indicato in particolare l'importanza prognostica di due geni, il gene della mammaglobin B (*MAM-B*) e il gene *TROP2*, la cui espressione è significativamente più elevata nei tumori dell'ovaio rispetto all'epitelio ovarico sano, sia a livello di mRNA che di proteina. Sebbene i dati conclusivi relativi allo studio clinico non sono ancora noti, i risultati degli studi di espressione genica appaiono incoraggianti e motivano la prosecuzione degli studi sulla biologia tumorale allo scopo di individuare i markers predittivi della risposta alla chemioterapia e della prognosi (sopravvivenza libera da recidiva e globale), con le ovvie ricadute cliniche nel management di queste pazienti, anche se al momento non è ancora possibile una introduzione routinaria di tale metodiche nella pratica clinica quotidiana.

Promettenti sono anche i risultati del secondo filone di ricerca, che dimostrano l'efficacia del Bortezomib nell'indurre la morte per apoptosi in cellule di carcinoma dell'ovaio resistenti ai comuni chemioterapici, e l'effetto sinergico del farmaco con TRAIL. Piuttosto modesto invece si è rivelata l'azione di peptidi analoghi alla proteina Smac/DIABLO in cellule di carcinoma ovarico. Sono state d'altra parte raccolte evidenze che mostrano un spiccata azione pro-apoptotica di un triterpene sintetico, CDDO-Imidazolido (CDDO-Im), su cellule di carcinoma ovarico. Gli studi sul meccanismo d'azione del CDDO-Im hanno evidenziato che l'induzione dell'apoptosi implica deplezione del Glutatione ridotto (GSH) e l'attivazione della caspasi-8.

Il **Progetto II** intitolato “Genetica molecolare della farmaco resistenza neoplastica e dell'oncogenesi” ha fornito dati rilevanti per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per la cura dei carcinomi renali, mammari e ovarici. In particolare, è stata indagata la farmaco resistenza mediata dalla perdita di espressione di alcuni fattori di soppressione tumorale, nonché i relativi meccanismi d'azione. Nel carcinoma del dotto collettore del rene, che rappresenta una variante molto aggressiva dei tumori renali, i geni di soppressione tumorale *FEZ1*, *FHIT* e *p27* sono spesso assenti o poco espressi. Inoltre, è stato caratterizzato un nuovo gene oncosoppressore chiamato *WWOX*, la cui assenza conferisce maggiore resistenza all'azione dei farmaci anti blastici in diversi tipi di tumore. Anche l'assenza del gene *FEZ1* è strettamente associata a fenomeni di resistenza ai comuni chemioterapici. Questo è stato dimostrato in modo consistente nel tumore della mammella che, in assenza di *FEZ1* dimostra una particolare resistenza ai taxani. Questi risultati aprono la strada allo sviluppo di strategie di terapia genica che potrebbero consentire di superare il problema della chemioresistenza in tumori ad alto impatto socio-sanitario.

Informazioni di estrema importanza sono state fornite dagli studi sui carcinomi ovarici attraverso l'esecuzione dei profili di espressione genica che hanno confrontato le cellule ovariche normali con quelle tumorali. Da questi studi sono emersi dati estremamente rilevanti dal punto di vista terapeutico. In particolare, è emerso che due recettori di membrana denominati Claudina 3 e Claudina 4 sono 40 volte più espressi nei tumori ovarici, particolarmente in quelli chemio resistenti, rispetto al tessuto ovarico normale. Dato che questi due recettori costituiscono i recettori naturali per la tossina prodotta dal batterio *Clostridium perfringens*, si può pensare che essi possano essere degli efficaci bersagli terapeutici per la terapia dei tumori ovarici resistenti alla chemioterapia basata sull'impiego di enterotossine ingegnerizzate. In accordo con questa ipotesi, la somministrazione intraperitoneale di questa enterotossina si è dimostrata efficace in un modello preclinico di tumore ovarico umano chemioresistente.

Il **Progetto III** (“Le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi anti-apoptotici: le basi cellulari della farmaco resistenza tumorale”) è stato focalizzato sullo studio delle “cellule staminali tumorali”, popolazione cellulare, con caratteristiche di staminalità, responsabile dell'insorgenza e del mantenimento del tumore. Presenti a bassa frequenza all'interno della massa tumorale, queste cellule sono spesso resistenti alla radio-chemioterapia convenzionale, e sono quindi alla base delle recidive e ricorrenze tumorali. I risultati ottenuti nell'ambito di quest'area di ricerca sono di grande rilievo sia per la patogenesi che per la terapia oncologica. Sono state isolate cellule staminali tumorali dai tumori del cervello, del colon, del polmone, e da altri tumori solidi, e sono state messe a punto le condizioni sperimentali necessarie per espandere *in vitro* tali cellule. L'aspetto più interessante è che le cellule

staminali tumorali possono essere coltivate in laboratorio indefinitamente sotto forma di sfere tumorali, che sono in grado di riprodurre nell'animale da esperimento la neoplasia del paziente di origine. In definitiva, le cellule staminali tumorali forniscono degli eccellenti modelli sia *in vitro* sia *in vivo*, per lo studio dei meccanismi ontogenetici staminali, e per lo sviluppo e la validazione di terapie tumorali innovative, a carattere eradicante. Grazie a questa scoperta, sono stati realizzati modelli murini innovativi che permettono di riprodurre fedelmente la neoplasia umana e di seguirne lo sviluppo nell'animale senza sacrificarlo, grazie ad un sistema di "imaging" *in vivo*. Un secondo filone della ricerca ha riguardato lo studio dell'espressione dei microRNA, una famiglia di piccoli geni che agisce nel controllo dell'espressione di altri geni attraverso la regolazione della traduzione. In particolare, grazie all'impiego di array di microRNA sono stati confrontati i livelli di espressione di centinaia di microRNA nelle cellule staminali tumorali rispetto alla controparte di cellule differenziate. I risultati di tali analisi, unitamente a quelli di studi funzionali volti a delucidare il ruolo di singoli microRNA in relazione alla tumorigenicità, potranno rivelarsi estremamente utili per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative basate sul trasferimento genico.

Nell'ambito del **Progetto IVA** ("Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative") è stato approfondito lo studio dell'attività anti-angiogenica di target molecolari quali *Drm/gremlin*, *HMGB1* e *PTX3*, identificati mediante l'analisi di 12.000 geni effettuata in cellule micro vascolari di tessuti diversi; è stato identificato il meccanismo d'azione anti-angiogenico dei derivati del trans-resveratrolo; ed è stato messo a punto un nuovo modello di studio dell'angiogenesi in *Zebrafish*. Inoltre, è stato studiato il meccanismo responsabile dell'azione anti-angiogenetica degli inibitori delle proteasi dell'HIV, che si sono dimostrati in grado di far regredire le lesioni angioproliferative in modelli di sarcoma di Kaposi. Infine sono stati sviluppati dei fattori di crescita vasculoendoteliali, ovvero delle isoforme del VEGF (*Flt1*, *Flk1*, *Flt4*), e i fattori "downstream" a tali recettori (ad esempio *Akt2*). Questi modelli potrebbero fornire informazioni importanti sui meccanismi della neoangiogenesi tumorale e dei relativi "target" terapeutici. Un altro filone della ricerca ha valutato l'uso di inibitori della proteasi di HIV (*HIV-PI*) *indinavir* e *saquinavir*, quali farmaci anti-tumorali ed anti-angiogenici. A tale scopo sono stati condotti studi preclinici *in vitro* ed *in vivo* utilizzando linee tumorali di diversi tumori solidi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che entrambi i farmaci, a dosi simili alle concentrazioni rilevate nei pazienti trattati, hanno bloccato l'invasione di tutte le linee neoplastiche, inibendo significativamente l'angiogenesi tumorale, come dimostrato da una significativa riduzione della densità micro vascolare. La valutazione degli effetti di analoghi dei farmaci utilizzati in modelli preclinici consentirà di identificare farmaci dotati di migliore indice terapeutico e di sviluppare terapie più efficaci in grado di combinare le azioni anti-angiogeniche e anti-proliferative degli *HIV-PI*.

Il **Progetto IVB** ("Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di *NF-KB* e di scavengers di radicali liberi in modelli murini di carcinoma del colon, carcinoma mammario e carcinoma della prostata") ha fornito una serie di dati sperimentali che hanno dimostrato come i principali componenti della risposta infiammatoria (specialmente *iNOS* e *COX2*, molecole che attivano il fattore di trascrizione *NF-KB*) siano attivi nelle cellule dei tumori della prostata e del colon. Sono state quindi poste le basi per una terapia farmacologica antiinfiammatoria mirata in queste neoplasie, specificatamente in modelli sperimentali tumorali di tipo transgenico o da carcinogeni chimici. Sono stati inoltre condotti esperimenti su linee cellulari al fine di valutare il ruolo dell'ipossia nell'induzione della risposta infiammatoria nelle cellule tumorali. I risultati di tali esperimenti suggeriscono che il trattamento ipossico aumenta la capacità migratoria e dunque l'invasività delle cellule tumorali e che l'espressione del fenotipo infiammatorio in cellule tumorali può essere bloccato da inibitori specifici di *NF-KB* (*CR-3294*). I possibili sviluppi di tale ricerca sono quelli di passare a sperimentazioni anche sull'uomo (fase I-III), in collaborazione con un'industria farmaceutica interessata a valutare l'effetto di un proprio farmaco nel rallentare la progressione tumorale.

Oltre alla valutazione dell'effetto di inibitori di *NF-KB*, una parte dell'attività di ricerca nell'ambito di questo progetto è stata dedicata allo studio del ruolo della *Trascrittasi Inversa (RT)* nella progressione tumorale ed in particolare allo studio degli effetti dell'inibitore dell'*RT* *efavirenz (EfV)*. I risultati ottenuti

hanno mostrato l'azione antagonizzante la progressione tumorale di Efv, che è non solo dose dipendente ma dipendente anche dalle modalità di somministrazione del farmaco. Il risultato meno atteso ma forse più interessante è che Efv esercita una potente azione differenziante sul tessuto tumorale, suggerendo il potenziale utilizzo di questo farmaco in una terapia del cancro ad approccio differenziativo.

Il **Progetto V** ("Regolazione del turnover di Bcl2 RNA mediante RNA antisenso") ha fornito una serie di dati sperimentali che permetteranno di ottimizzare la terapia dei linfomi B follicolari attraverso la creazione di trascritti antisenso per *Bcl2* e la regolazione dell'attività trascrizionale di questo gene anti-apoptotico. In particolare, sono stati individuati una serie di trascritti antisenso nel database delle sequenze EST non ancora identificate. E' stata inoltre valutata la sensibilità e specificità di due tecniche molecolari che consentano un'analisi accurata del trascritto antisenso in esame. Ancora, sono stati studiati i meccanismi di turnover dell'RNA di Bcl2 ed i potenziali strumenti per la sua regolazione, anche in combinazione con farmaci convenzionali. Tra gli altri, è stata individuata una nuova proteina (TINO) che svolge un'azione regolatoria negativa sui livelli post-trascrizionali di Bcl2. La modulazione di Bcl2 è stata valutata terapeuticamente sui linfomi chemoresistenti, anche in combinazione con farmaci convenzionali.

Nell'ambito del **Progetto VI** ("Sviluppo di nuove terapie basate sui farmaci anti-retrovirali inibitori della proteasi di HIV e inibitori della trascrittasi inversa, sia soli o combinati: studi preclinici in vitro e in vivo") sono stati effettuati estesi studi *in vitro* ed *in vivo* per valutare l'efficacia antineoplastica e gli effetti anti-metastatici di un inibitore delle proteasi dell'HIV (indinavir) e della trascrittasi inversa (efavirenz). I risultati hanno evidenziato delle differenze nell'efficacia di tali farmaci imputabili al tipo di tumore trattato. La sperimentazione condotta permettono di concludere che i farmaci antiretrovirali, siano essi inibitori della proteasi di HIV o inibitori della trascrittasi inversa, sono in grado di esercitare attività antitumorale, in particolare nell'adenocarcinoma di colon e nel melanoma. L'attività antiproliferativa, associata a scarsa tossicità ed a marcata attività differenziante, sembra indicare tali farmaci come eccellenti antitumorali. Nei confronti del melanoma poi, in cui la nostra ricerca confermano la presenza di retrovirus endogeni umani (HER-K) riattivati, farmaci che associano proprietà antiretrovirale ed antitumorale sembrano rappresentare farmaci di elezione. Non è inoltre trascurabile il fatto che i farmaci che abbiamo preso in esame, siano già ampiamente utilizzati nella terapia dell'AIDS e che le dosi utilizzate corrispondono a quelle attualmente impiegate nelle terapie HAART. Ciò ne permetterebbe l'impiego, senza necessità di ulteriori studi di tossicità, in patologie, come il melanoma, che al momento risultano prive di terapia farmacologica.

**(I) LE BASI METODOLOGICHE PER UNA CHEMIOTERAPIA ANTI-TUMORALE MIRATA:
IL SAGGIO DELL'EDR NEL CARCINOMA OVARIO ED IN ALTRE NEOPLASIE****U.O. 01 – Responsabili Scientifici:****Cesare Peschle, ISS
Ugo Testa, ISS
Francesco Cognetti, IFO
Sergio Pecorelli, Università di Brescia****Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 01 – Prof. Cesare Peschle e Dr. Ugo Testa,
Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, ISS**

Nel corso del periodo compreso tra il 2004 e il 2008 è stato messo a punto, validato e utilizzato il test dell' "Extreme Drug Resistance" (EDR) in supporto dello studio clinico intitolato "Il valore predittivo del test Extreme Drug Resistance" relazionata dal Prof. Cognetti (vedi sotto). In tale ambito si sono distinte due fasi di attività: una prima rivolta alla validazione del test dell'EDR; una seconda indirizzata all'esecuzione del suddetto test nei prelievi bioptici di pazienti affette da carcinoma ovarico ed arruolate nel sopra menzionato studio clinico.

Nell'ambito dell'attività laboratoristica condotta, in diretto supporto dello studio clinico, è stato realizzato un totale di 273 prelievi bioptici intraoperatori di carcinoma ovarico. In 217 casi (79.5 %) è stato possibile ottenere crescita *in vitro*, su agar, delle cellule tumorali e quindi è stato possibile ottenere un test EDR analizzabile ed utilizzabile ai fini clinici. E' importante notare che la percentuale di successo del test EDR si situa intorno all'80% ed quindi è del tutto paragonabile alle percentuali di realizzazione di questo test osservate presso i laboratori della Oncotech Inc., l'industria biotecnologia americana che ha implementato questo test a scopo clinico nello studio di alcune neoplasie, e che vanta la più ampia esperienza del test EDR.

Nella realizzazione del test EDR, nell'ambito del nostro studio, è stato valutato il profilo di chemiosensibilità/chemioresistenza dei campioni di carcinoma ovarico nei confronti di un ampio spettro di chemioterapici anti-tumorali (cisplatino, carboplatino, taxolo, taxotere, ciclofosfamide, etoposide, topotecan, doxorubicina, doxil, gemcitabina), che corrispondono a tutti quelli che sono utilizzati per il trattamento di questo tipo di neoplasia.

I profili di chemioresistenza ai vari chemioterapici hanno fornito la guida per il trattamento ottimale delle pazienti incluse nel braccio sperimentale, in cui la terapia segue gli esiti del test EDR. E' interessante notare che l'analisi dei profili di chemioresistenza dei 273 campioni di carcinoma ovarico da noi utilizzati ha mostrato l'esistenza di una condizione di Extreme Drug Resistance nel 25% dei casi per il cisplatino e nel 35% dei casi per il taxolo. I pazienti con questi profili di chemioresistenza, prognosticamente negativi, potrebbero avere beneficiato di trattamenti con altri chemioterapici.

A latere di questa progettualità principale sono stati condotti una serie di studi sperimentali diretti a valutare la sensibilità delle cellule di carcinoma ovarico nei confronti di una serie di agenti anti-tumorali di recente identificazione e che agiscono attraverso meccanismi diversi rispetto a quelli osservati per i chemioterapici anti-tumorali di comune utilizzo.

In tal senso, un primo studio è stato rivolto all'analisi degli effetti pro-apoptotici di un inibitore del proteasoma, Bortezomib, di recente introdotto nella terapia del mieloma multiplo. Gli studi condotti su linee cellulari di carcinoma ovarico hanno consentito di determinare i meccanismi molecolari attraverso i quali il Bortezomib induce la morte cellulare tramite apoptosi (1). L'effetto pro-apoptotico del Bortezomib risulta notevolmente potenziato se viene aggiunto il ligando di morte TRAIL (1). Queste osservazioni suggeriscono un uso potenziale del Bortezomib nel trattamento del carcinoma ovarico, anche in vista della capacità di questo inibitore di indurre apoptosi in cellule di carcinoma dell'ovaio resistenti ai comuni chemioterapici (1).

Un secondo studio ha analizzato l'effetto del Bortezomib su cellule primarie di carcinoma dell'ovaio, mostrando che: un'elevata percentuale di casi mostrano una chiara sensibilità all'azione pro-apoptotica del Bortezomib; l'effetto del Bortezomib viene potenziato dall'aggiunta di TRAIL ed anche da anticorpi agonisti monoclonali anti-TRAIL-R1 o anti-TRAIL-R2 (MAPATUMAMAB o LEXATUMAMAB) (2). E' interessante notare che l'effetto pro-apoptotico del Bortezomib è stato osservato anche sulle cellule

primarie di carcinoma ovarico risultate essere completamente chemioresistenti al Cisplatino ed ai derivati del Taxolo (2).

Un terzo studio è stato indirizzato all'analisi degli effetti di un peptide che mima l'azione biologica di smac/DIABLO, un antagonista delle proteine anti-apoptotiche XIAP e c-IAP. Questo tipo di composto induce, in maniera moderata, l'apoptosi in cellule di carcinoma ovarico; inoltre, gli effetti del peptide mimetico di smac/DIABLO risultano essere considerevolmente potenziati da TRAIL. Quest'azione pro-apoptotica viene esplicitata sia su linee cellulari che su cellule primarie di carcinoma ovarico, incluse anche quelle resistenti al cisplatino (3).

Attualmente stiamo esplorando l'effetto di un altro mimetico di smac/DIABLO valutandone l'effetto anti-tumorale su cellule di carcinoma ovarico in varie modalità: da solo, in combinazione con TRAIL ed in combinazione con chemioterapici standard, quali ad esempio il Taxolo [Petrucci et al., manoscritto in preparazione].

Un quarto studio si è concentrato sull'analisi degli effetti anti-tumorali di un triterpene sintetico, CDDO-Imidazolido, su cellule di carcinoma ovarico. Gli studi da noi condotti hanno mostrato una spiccata azione di questo composto su cellule di carcinoma ovarico (sia linee cellulari che cellule tumorali primarie). Gli studi sul meccanismo d'azione del CDDO-Im hanno evidenziato che l'induzione dell'apoptosi implica deplezione del Glutatione ridotto (GSH) ed attivazione della caspasi-8 (4). E' stato anche dimostrato un effetto inibitorio del CDDO-Im sull'attività del trasduttore di segnale Stat-3 ed è stato anche possibile dimostrare che il livello di sensibilità delle cellule di carcinoma ovarico al CDDO-Im è inversamente correlato ai livelli di Stat-3 costitutivamente attivato, presenti in queste cellule (4).

Publicazioni

- 1) Saulle E, Petronelli A, Pasquini L, Petrucci E, Mariani G, Biffoni M, Ferretti G, Scambia G, Benedetti-Panici P, Cognetti F, Humphreys R, Peschle C, Testa U. Proteasome inhibitors sensitize ovarian cancer cells to TRAIL induced apoptosis. *Apoptosis*. 2007 Apr;12(4):635-55.
- 2) Pasquini L, Petronelli A, Petrucci E, Saulle E, Mariani G, Biffoni M, Ferretti G, Scambia G, Benedetti-Panici P, Cognetti F and Testa U. Primary ovarian cancer cells are sensitive to the proapoptotic effects of proteasome inhibitors. *Int J Cancer*. In corso di stampa.
- 3) Petrucci E, Pasquini L, Petronelli A, Saulle E, Mariani G, Riccioni R, Biffoni M, Ferretti G, Benedetti-Panici P, Cognetti F, Scambia G, Humphreys R, Peschle C, Testa U. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL-mediated cell death of ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2007 May;105(2):481-92.
- 4) Petronelli A, Saulle E, Pasquini L, Petrucci E, Mariani G, Biffoni M, Ferretti G, Scambia G, Benedetti-Panici P, Greggi S, Cognetti F, Russo MA, Sporn M, Testa U. High sensitivity of ovarian cancer cells to the synthetic triterpenoid CDDO-Imidazolido. *Cancer Lett*. 2009 Sep; 18;282(2):214-28.

Relazione attività scientifica svolta dall'U.O. 01 - Prof. Francesco Cognetti, Istituto Regina Elena - Istituti Fisioterapici Ospedalieri (IFO), Roma

Nell'ambito dello studio clinico "Il valore predittivo del test Extreme Drug Resistance", nel primo biennio si è proceduto alla stesura definitiva del protocollo clinico che dalla prima versione del 24.08.03 ha incluso successivamente quattro emendamenti tra i quali uno sostanziale riguardante il trattamento da somministrare alla pazienti randomizzate al braccio sperimentale. Il protocollo che sta ancora attualmente reclutando è la versione del 22.03.06.

E' stata attivata una polizza assicurativa a copertura dei rischi connessi allo studio e sono state parallelamente espletate tutte le procedure con i Comitati Etici per l'attivazione dello studio e degli emendamenti presso i centri partecipanti allo studio. Sono stati poi chiariti alcuni aspetti organizzativi contattando le ditte farmaceutiche produttrici dei farmaci utilizzati nel protocollo fuori indicazione per ottenerne la fornitura gratuita. Nella fase iniziale si è osservata una certa difficoltà nell'arruolamento delle pazienti, sia per la complessità dello studio sia per problemi tecnici legati ai prelievi ed ai test. Lo studio ha cominciato poi a procedere in modo più spedito.

I centri attivi, che hanno ottenuto l'approvazione del proprio Comitato Etico sono sette (vedi sotto). Le pazienti arruolate al 31.12.08 sono 102, così distribuite:

- Istituto Regina Elena di Roma (Divisione Chirurgia Ginecologica, Divisione Oncologia Medica A) – 19 pazienti
- Policlinico Umberto I di Roma (Università La Sapienza, Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia) – 34 pazienti
- Istituto Pascale di Napoli (Divisione di Ginecologia Oncologica) – 14 pazienti
- Brescia (Università, Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia) – 9 pazienti
- Bari (Policlinico, Divisione di Oncologia Medica) – 15 pazienti
- Policlinico Gemelli (Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia) – 11 pazienti
- Università di Roma Tor Vergata – 0 pazienti

Si è verificato 1 evento serio avverso (neutro-piastripenia severa) a seguito dell'utilizzo di carboplatino-gemcitabina. Tale evento è stato risolto nel corso del ricovero ospedaliero.

Il Centro dati dell'IRE ha effettuato almeno una visita presso i centri partecipanti per monitorare l'andamento dello studio e correggere eventuali deviazioni sistematiche dal protocollo.

Parallelamente, le tecniche di laboratorio per l'esecuzione del test Extreme Drug Resistance, grazie all'expertise dei ricercatori responsabili del progetto presso l'ISS, garantiscono l'attendibilità e la riproducibilità del test stesso ed un sempre minor numero di test non valutabili. Infatti, dalla tabella allegata è possibile evidenziare il numero di campioni ed il numero di test valutabili.

CENTRO		CAMPIONI		
		Pervenuti	Test non val.	Arruolate
01	I.R.E. - Roma (coordinatore)	68	13	19
02	Pol. Umberto I - Roma	74	17	34
03	Università di Brescia	21	5	9
04	Università degli studi di Bari	26	7	15
05	Policlinico Gemelli - Roma	36	5	11
06	Università Tor Vergata – Roma	4	1	0
07	Fondazione Pascale - Napoli	44	8	14
TOTALE		273	56	102

Per molte pazienti (115) il test ha dato risultati valutabili ma non sono state arruolate principalmente per questi motivi: 27 hanno rifiutato lo studio, 10 non erano eleggibili per età, 21 per istologia, 5 erano pazienti al primo stadio, 7 soffrivano di gravi patologie concomitanti, 1 paziente è deceduta, 8 non sono state arruolate per motivi tecnico-organizzativi e 36 per motivi non specificati.

Al dicembre 2008 risultano randomizzate 102 pazienti (54 vs 48), non sono eleggibili 3 pazienti (2 casi e 1 controllo).

Nel braccio sperimentale sono state trattate:

9 pazienti in monochemioterapia

- 4 con Taxolo
- 2 con Doxorubicina
- 1 con Gemcitabina
- 2 con Topotecan

28 pazienti in combinazione con il Carboplatino

- 6 con Taxolo
- 5 con Doxorubicina
- 3 con Gemcitabina
- 12 con Topotecan
- 2 con Ciclofosfamide

10 pazienti in combinazione con il Cisplatino
 2 con Gemcitabina
 8 con Topotecan

Stadio FIGO	Controllo	EDRA
IIb	1 (1.9%)	1 (2.2%)
IIc	2 (3.8%)	1 (2.2%)
IIIa	0	1 (2.2%)
IIIc	43 (81.1%)	37 (80.4%)
IV	7 (13.2%)	6 (13.0%)
PS		
0	42 (79.2%)	35 (76.1%)
1	9 (17.0%)	10 (21.7%)
2	2 (3.8%)	1 (2.2%)
RESIDUO		
Nessun residuo	24 (45.3%)	24 (52.2%)
<=1 cm	13 (24.5%)	12 (26.1%)
>1 cm	14 (26.4%)	9 (19.6%)
Non operata	2 (3.8%)	1 (2.2%)

Cicli di terapia	Mediana	Note
Controllo	mediana 6 (1-6)	90 % pazienti con almeno 4 cicli
Sperimentale	mediana 6 (1-6)	77 % pazienti con almeno 4 cicli

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 01 - Prof. Sergio Pecorelli, Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Università di Brescia

Il protocollo, approvato dal Dipartimento Materno Infantile e Tecnologie Biomediche dell'Università degli Studi di Brescia e dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia nel 2004, ha avuto come obiettivi: a) dimostrare che il tempo alla progressione della malattia potrebbe essere migliorato utilizzando un trattamento antineoplastico individualizzato in base ai risultati del test EDR rispetto alla chemioterapia standard, onde evitare l'utilizzo di farmaci inefficaci ed ottimizzare la terapia di salvataggio. b) associare i risultati dei test EDR con i profili di espressione genica dei tumori ovarici per cercare di comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base della chemio resistenza e migliorare le strategie terapeutiche.

Dalla data dell'approvazione, hanno aderito allo Studio e firmato il consenso informato un totale di 21 pazienti con carcinoma ovarico primitivo. Al momento dell'intervento chirurgico sono state eseguite, entro 30 min dall'espanto, le biopsie di tessuto tumorale ovarico che sono state inviate al Laboratorio di riferimento per l'esecuzione dei profili di chemioresistenza al platino e al taxolo. Poiché l'invio dei prelievi biotipici obbligatoriamente precedeva la valutazione dei preparati istologici da parte degli anatomopatologi, le pazienti, fino ad oggi arruolate presso il nostro Centro per le quali è stata confermata la diagnosi istologica di carcinoma ovarico e per le quali è stato possibile eseguire il test di chemio resistenza, sono il 40%. In 4 delle pazienti arruolate presso il nostro Centro il campione inviato non è risultato valutabile per presenza di un'eccessiva quantità di tessuto necrotico.

Tessuto neoplastico ovarico, oltre a tessuto ovarico prelevato da controlli sani in corso di intervento chirurgico per patologie benigne, è stato inoltre conservato, congelato a -80°C presso il laboratorio di

Medicina Molecolare "A. Nocivelli" dell'Università di Brescia. Tutti i campioni sono stati controllati da un anatomopatologo e solo le biopsie con una percentuale di cellule epiteliali tumorali superiore al 70% sono state utilizzate per l'estrazione dell'RNA e la successiva analisi dei profili di espressione genica, mediante la tecnologia dei microarrays (*Gene-Chip* U133A, Affymetrix), al fine di identificare nuovi marcatori diagnostici, prognostici e predittivi del carcinoma ovarico.

Da questo studio sono stati evidenziati geni che differenziano in modo significativo le neoplasie ovariche sierose papillifere (la variante più comune) dai tessuti epiteliali ovarici sani. Alcuni di essi, grazie alla loro elevata sensibilità e specificità, potrebbero rappresentare nuovi biomarcatori dotati di grande potenziale diagnostico per lo screening precoce e la terapia delle pazienti con cancro dell'ovaio sieroso papillifero.

Un totale di 901 geni si sono rivelati over-espresi in modo significativo nei carcinomi sierosi papilliferi dell'ovaio (OSPC) rispetto all'epitelio ovarico sano (HOSE). È interessante notare che molti dei geni up-regolati nei tessuti ovarici rappresentano proteine di membrana cellulare o secrete come ad esempio SCGB2A1 (mammaglobin B), laminin, claudin 3, 4 e 7, TROP1, TROP2, ladinin 1, S100A2, SERPIN 2, lipocalin 2, osteopontin, kallikrein 6, kallikrein 7 e kallikrein 10, matriptase (TADG-15) e stratifin. Conoscere la funzione molecolare di questi geni potrebbe chiarire alcuni aspetti riguardanti la carcinogenesi ovarica, oltre a fornire potenziali nuovi marcatori diagnostici e terapeutici per il tumore ovarico.

Una validazione dei dati ottenuti con l'analisi dei microarray è stata effettuata su alcuni geni di particolare interesse, quali ad es. la mammaglobin B ed il TROP2 avvalendosi delle tecniche di Quantitative Real Time PCR e della colorazione immunoistochimica (IHC).

Il gene della mammaglobin B (MAM-B) si è evidenziato in cima alla lista dei geni differenzialmente espressi negli OSPC rispetto alle HOSE (827 volte). Si è andati a valutare l'espressione della MAM-B, a livello genico e proteico, su una coorte di 106 pazienti con carcinoma ovarico a diverso grado e stadio, rappresentativa di tutti gli istotipi, e in metastasi omentali, con lo scopo di valutare il potenziale ruolo della MAM-B come marcatore clinicamente rilevante per il tumore dell'ovaio. L'espressione di MAM-B è stata trovata significativamente più elevata nei tumori epiteliali dell'ovaio (EOC) rispetto alle HOSE sia a livello di mRNA che di proteina.

Per studiare il valore predittivo della MAM-B come nuovo marcatore prognostico per EOC, la sua espressione genica e proteica è stata correlata con le caratteristiche clinico-patologiche e con la prognosi (sopravvivenza libera da recidiva e globale).

L'espressione di MAM-B si riduce in modo significativo con l'aumentare dello stadio, con il diminuire della differenziazione tumorale, con l'incremento della malattia residua, con la presenza di ascite ed in presenza di malattia diffusa al di fuori della cavità addominale o in presenza di metastasi linfonodali. In un'analisi uni-variata la presenza di MAM-B è risultata correlata con un andamento più favorevole: ridotto rischio di recidiva, di progressione e di morte per tumore. In un'analisi multivariata l'espressione di MAM-B (mRNA e proteina) è risultata fattori prognostico indipendente per l'intervallo libero da malattia. In sintesi MAM-2 caratterizza una forma di EOC meno aggressiva e correla con una prognosi favorevole

Uno studio analogo è stato eseguito per il gene TROP-2, analizzato su una casistica di 104 EOC a diversa istologia e su 24 HOSE. TROP-2 è stato trovato over-espreso nei tumori rispetto ai controlli e la presenza della proteina è risultata essere associata in modo significativo alla presenza di ascite e di metastasi linfonodali. Inoltre la presenza di TROP-2 in analisi multivariata è risultata marcatore prognostico indipendente di sopravvivenza più breve. In sintesi TROP-2 correla con un fenotipo tumorale più aggressivo e potrebbe rappresentare un nuovo marcatore prognostico.

Scopo finale di questa parte del progetto sarà di associare i risultati dei profili di espressione genica dei tumori ovarici con i test EDR per cercare di comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base della chemio resistenza e trovare delle "signature" che possano chiarire la progressione e la risposta al trattamento dei carcinomi ovarici, con le ovvie ricadute cliniche nel management di queste pazienti.

(II) GENETICA MOLECOLARE DELLA FARMACORESISTENZA NEOPLASTICA E DELL'ONCOGENESI

U.O. 02 – Responsabili scientifici:	Carlo Croce, Ohio University, Columbus, USA Cesare Peschle, ISS
U.O. 03 – Responsabile scientifico:	Alessandro Santin, Università di Brescia
U.O. 04 – Responsabile scientifico:	Vecchione, Università La Sapienza

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 02: Prof. Carlo Croce, Ohio University, Columbus, USA; Prof. Cesare Peschle, Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, ISS

Il carcinoma del dotto collettore del rene rappresenta una variante rara ma molto aggressiva di tumore renale. 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 selezionati undici pazienti sottoposti a nefrectomia radicale per la presenza di carcinoma al dotto collettore del rene. L'espressione dei cinque geni è stata valutata mediante analisi immunohistochimica ed è stata analizzata, mediante il test di Fisher, l'associazione con parametri clinici quali stadio del tumore e presenza di metastasi. Per l'analisi sulla sopravvivenza è stato usato il metodo Kaplan/Meier. I risultati hanno mostrato che FEZ1 non è espresso o presenta livelli di espressione ridotti nel 64% dei casi esaminati. FHIT è assente nel 27% dei casi, mentre l'overespressione di p53 è stata osservata nel 36% dei casi. L'analisi ha dimostrato che p27 è assente in 5 degli 11 casi (45.5%). L'espressione di Bcl2 è presente nel 36% dei tumori considerati. Inoltre è stata rilevata una correlazione ($P=0.06$) tra perdita e riduzione dell'espressione di FEZ1 e la presenza di metastasi linfonodali (1).

Parallelamente, abbiamo caratterizzato un nuovo gene di soppressione tumorale chiamato WWOX, un ossido reduttasi che contiene un dominio WW, localizzato nel FRA16D, uno dei più attivi siti fragili del genoma umano. L'espressione di 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). L'assenza di WWOX conferisce una maggiore resistenza all'azione dei maggiori chemioterapici 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 che ne potessero mediare l'azione antitumorale. Uno dei candidati più promettenti è parso essere 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 dominio WW di WWOX lega con alta affinità AP-2 gamma, un fattore di trascrizione fortemente amplificato nel carcinoma della mammella. I nostri risultati 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 permettono di ottimizzare le strategie di terapia genica su una serie di carcinomi ad elevato impatto socio-sanitario.

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 03 - Prof. Alessandro D. Santin, Università di Brescia

Il tumore ovarico rappresenta la più letale fra le patologie neoplastiche del tratto genitale femminile. A causa della mancanza di segni precoci della malattia e di efficaci test di screening, due terzi delle pazienti vengono diagnosticate con malattia neoplastica in stadio avanzato (stadi III e IV). Sebbene la maggioranza delle pazienti con cancro ovarico risponde inizialmente alla terapia chirurgica e chemioterapica, quasi il 90% sviluppa successivamente una recidiva neoplastica e muore affetta da

cancro resistente alla chemioterapia. Una maggiore comprensione delle basi molecolari del cancro ovarico e dello sviluppo della sua resistenza alla chemioterapia potrebbe quindi significativamente migliorare la diagnosi e il trattamento di questa malattia ed eventualmente portare allo sviluppo di nuove e piu' efficaci terapie contro il cancro ovarico refrattario alle terapie convenzionali.

La possibilità di effettuare con tecniche di high throughput una precisa caratterizzazione dei profili genomici e delle mutazioni geniche associate alla farmacoresistenza tumorale costituisce uno strumento fondamentale per acquisire le informazioni necessarie alla comprensione dell'oncogenesi e all'allestimento di terapie efficaci contro il cancro dell'ovaio. In accordo con questa ipotesi il nostro gruppo di ricerca ha recentemente valutato i profili di espressione di numerosi tumori ovarici e ha identificato una serie di geni altamente e differenzialmente espressi nei tumori ovarici caratterizzati da alta resistenza alla chemioterapia. Tra questi geni quelli codificanti per i recettori di membrana denominati Claudina 3 e Claudina 4 sono risultati tra le 40 e 100 volte piu' espressi nei tumori ovarici rispetto al tessuto ovarico normale.

Di grande importanza, poiche' le claudine 3 e 4 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, nell'ambito del programma di ricerca oncotecnologico questi recettori sono stati ulteriormente studiati come potenziali bersagli terapeutici per la terapia dei tumori ovarici umani resistenti alla chemioterapia.

Nei nostri studi abbiamo esposto alla CPE numerosi tumori ovarici sierosi papilliferi (la variante istologica piu' comune di tumore dell'ovaio), e altri tumori ginecologici resistenti alla chemioterapia esprimenti alti livelli di Claudina 3 e/o di Claudina 4 in vitro e abbiamo notato che 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. Di grande importanza clinica, quando la terapia intratumorale ed intraperitoneale a base di CPE e' stata sperimentata in vivo in animali con trapiantati tumori ovarici umani chemioresistenti, la tossina e' stata ben tollerata ed ha indotto un significativo allungamento della vita o la guarigione di questi animali dal tumore.

La completa caratterizzazione dei recettori Claudina 3 e Claudina 4 e di altri geni come nuovi biomarkers per il trattamento innovativo dei cancri ginecologici resistenti alla chemioterapia e' descritto nei manoscritti allegati come bibliografia a questo resoconto e che citano come fonte di supporto l'Istituto Superiore di Sanita' (ISS) nell'ambito del programma oncotecnologico.

Pubblicazioni

- 1) Santin AD, Cane' S, Bellone S, Palmieri M, Siegel ER, Thomas M, Roman JJ, Burnett A, Cannon MJ, Pecorelli S. Treatment of Chemotherapy-Resistant Human Ovarian Cancer Xenografts in C.B-17/SCID Mice by Intraperitoneal Administration of Clostridium Perfringens Enterotoxin (CPE). *Cancer Res.* 65; (10) 4334-4342, 2005.
- 2) Santin AD, Zhan F, Cane' S, Bellone S, Palmieri M, Thomas M, Burnett A, Roman JJ, Cannon MJ, Shaughnessy J, Pecorelli S. Gene Expression Fingerprint of Uterine Serous Papillary Carcinoma: Identification of Novel Molecular Markers for Uterine Serous Cancer Diagnosis and Therapy. *Brit. J. Cancer.* 92:1561-1573, 2005.
- 3) Santin AD, Bellone S, Van Stedum S, Bushen W, Palmieri M, Siegel ER, De Las Casas LE, Roman JJ, Burnett A, Pecorelli S. Amplification of c-erbB2 Oncogene: a Major Prognostic Indicator in Uterine Serous Papillary Carcinoma. *Cancer.* 104(7):1391-7, 2005.
- 4) Bellone S, Watts K, Cane' S, Palmieri M, Cannon MJ, Burnett A, Roman JJ, Pecorelli S, Santin AD. High serum levels of Interleukin-6 in Endometrial Carcinoma are associated with Uterine Serous Papillary Histology; a highly aggressive and chemotherapy resistant variant of endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 98: 92-98;2005.
- 5) Santin AD, Diamandis EP, Bellone S, Palmieri M, Marizzoni M, Bandiera E, Papasakelariou C, Katsaros D, Burnett A, Pecorelli S. Overexpression of Kallikrein 10 (hK10) in Uterine Serous Papillary Carcinomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194(5):1296-302, 2006.
- 6) Bignotti E, Tassi RA, Calza S, Ravaggi A, Romani C, Rossi E, Falchetti M, Odicino FE, Pecorelli S, Santin AD. Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: Identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. *Gynecol. Oncol.* 103(2):405-16, 2006.

- 7) Bignotti E, Tassi RA, Calza S, Ravaggi A, Bandiera E, Rossi E, Donzelli C, Pasinetti B, Pecorelli S, Santin AD. Gene Expression Profile of Ovarian Serous Papillary Carcinomas: Identification of Metastasis-Associated Genes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196(3):245.e1-11, 2007.
- 8) Santin AD, Bellone S, Marizzoni M, Palmieri M, Siegel EE, McKenney JK, Hennings L, Comper F, Bandiera E, Pecorelli S. Overexpression of Claudin-3 and Claudin-4 receptors in Uterine Serous papillary Carcinoma; Novel Targets for a type-specific therapy using Clostridium Perfringens Enterotoxin (CPE). *Cancer.* 109;1312-22; 2007.
- 9) Tassi RA, Bignotti E, Rossi E, Falchetti M, Donzelli C, Calza S, Ravaggi A, Bandiera E, Pecorelli S, Santin AD. Overexpression of Mammaglobin B in Epithelial Ovarian Carcinomas. *Gynecol. Oncol.* 105;578-585;2007.
- 10) Santin AD, Bellone S, McKenney JK, Siegel EE, Thomas M, Hennings L, Roman JJ, Burnett A, Tognon G, Bandiera E, Pecorelli S. Overexpression of Clostridium perfringens Enterotoxin (CPE) Receptors Claudin-3 and Claudin-4 in Uterine Carcinosarcomas. *Clin. Cancer Res.* 13(11):3339-46, 2007.
- 11) Facchetti F, Lonardi S, Gentili F, Bercich L, Falchetti M, Tardanico R, Baronchelli C, Lucini L, Santin AD, Murer B. Diagnostic usefulness of the tight junction-associated protein Claudin 4 as negative mesothelioma marker in tissue and cytological specimens. *Virchows Archiv.* 451(3):669-80;2007.
- 12) Tassi RA, Bignotti e, Falchetti M, Ravanini M, Calza S, Ravaggi A, Bandiera E, Facchetti F, Pecorelli S, Santin AD. Claudin-7 Expression in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Int. J. Gynecol. cancer.* Int. J. Gynecol. Cancer 18:1262-1271; 2008.
- 13) Bignotti E, Ravaggi A, Tassi RA, Calza S, Rossi E, Falchetti M, Romani C, Bandiera E, Odicino FE, Pecorelli S, Santin AD. Trefoil factor 3: a novel serum marker identified by gene expression profiling in high-grade endometrial carcinomas. *British Journal of Cancer.* 99(5):768-73, 2008.
- 14) Tassi RA, Bignotti E, Rossi E, Falchetti M, Donzelli C, Calza S, Ravaggi A, Bandiera E, Pecorelli S, Santin AD. Overexpression of Mammaglobin B in Endometrial Carcinomas. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 18(5):1090-6, 2008.
- 15) Tassi RA, Bignotti e, Falchetti M, Ravanini M, Calza S, Ravaggi A, Bandiera E, Facchetti F, Pecorelli S, Santin AD. Claudin-7 Expression in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer,* 18, 1262-1271;2008.

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 04 - Prof. Andrea Vecchione, Università "La Sapienza", Roma

Recentemente attraverso una strategia di "positional cloning" abbiamo identificato un nuovo gene oncosoppressore *FEZ1/LZTS1* (Leucine Zipper Tumor Suppressor 1), localizzato sul braccio corto del cromosoma 8 (8p22), la cui espressione è alterata in numerose neoplasie tra cui quelle della vescica, del polmone, dell'esofago e della mammella. *FEZ1/LZTS1* è espresso ubiquitariamente nei tessuti normali presentando un trascritto di circa 7kb contenente un opening reading frame (ORF) di 1,7kb, codificante per una proteina di 67kD. L'introduzione di *FEZ1* in cellule Fez1 negative determina una soppressione della crescita con accumulo delle cellule stesse nella fase G2/M del ciclo cellulare. Fez1 interagisce con la kinasi p34^{cdc2} e la sua inattivazione risulta in un'anticipata defosforillazione di quest'ultima, con conseguente deregolazione del checkpoint G2/M del ciclo cellulare, risultante in una stimolazione della crescita. Lo studio dei fibroblasti embrionari di topo (MEF) derivati da topi Knock-out per Fez1, da noi generati, ha messo in evidenza come fibroblasti Fez1 -/- presentino una deregolazione del ciclo cellulare e siano resistenti al trattamento con taxolo (Paclitaxel) e ad altri agenti chemioterapici ad azione sulla componente microtubulare.

Dato che la presenza di Fez1 sembra essere indispensabile per una corretta risposta delle cellule al Paclitaxel, che determina una soppressione della dinamica dei microtubuli e siccome questo composto rappresenta uno degli agenti chemioterapici in prima linea nel trattamento di diverse neoplasie, abbiamo definito attraverso questo finanziamento l'espressione di questa proteina nei carcinomi mammari e i meccanismi molecolari che sono alla base della resistenza a taxani nei tumori in cui LZTS1 è perso. Le implicazioni cliniche e la trasferibilità al SSN di questo studio sono evidenti poiché è facile intuire come l'attestazione della sua espressione possa rappresentare un nuovo marker molecolare, che potrebbe poi essere strumentale nell'instaurare un regime di chemioterapia.