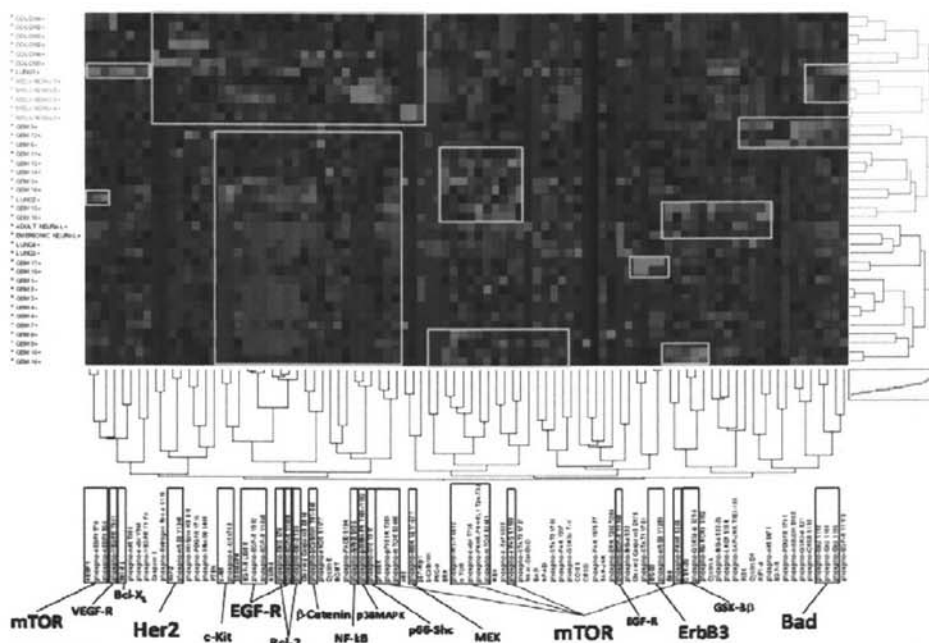


definire i networks molecolari attivati nella componente staminale dei tumori esaminati. Gli esperimenti di fosfoproteomica sono stati condotti nel corso dell'ultimo anno su popolazioni altamente purificate di cellule staminali derivate da tumori del colon, del polmone, da glioblastoma e melanoma, e sulla progenie costituita da cellule tumorali differenziate. I risultati di tali esperimenti sono incoraggianti in quanto mostrano chiaramente che alcuni pathway sono attivati in modo specifico nella componente staminale in modo tumore-specifico.



**Figura 3.** "Heat map" ottenuta sulla base degli esperimenti di Reverse Phase Array su CSCs di diversi tipi tumorali. I riquadri in giallo indicano specifiche "pathway signatures".

L'inibizione di pathways aberranti responsabili della sopravvivenza cellulare può portare alla morte per apoptosi e aumentare l'efficacia dei trattamenti chemioterapici convenzionali. Un pannello di circa 300 inibitori specifici di vie di trasduzione del segnale, e una libreria di 800 composti citotossici (NCI Mechanistic Set) verranno impiegati in saggi di citotossicità sulle CSCs, e i composti più interessanti saranno utilizzati in combinazione con i farmaci chemioterapici convenzionali al fine di valutare possibili effetti sinergici. I modelli animali basati sull'inoculo di CSCs ingegnerizzate per applicazioni di imaging come sopra descritto forniranno il supporto per gli studi sull'effetto *in vivo* degli inibitori più efficaci *in vitro*.

### Publicazioni

- 1) Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Larocca LM, Peschle C, De Maria R. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ.* 2006 Jul;13(7):1238-41.
- 2) Ricci-Vitiani L, Pedini F, Mollinari C, Condorelli G, Bonci D, Bez A, Colombo A, Parati E, Peschle C, De Maria R. Absence of caspase 8 and high expression of PED protect primitive neural cells from cell death. *J Exp Med.* 2004 Nov 15;200(10):1257-66.
- 3) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Signore M, Biffoni M, Pallini R, Parati E, Peschle C, De Maria R. Human neural progenitor cells display limited cytotoxicity and increased oligodendrogenesis during inflammation. *Cell Death Differ.* 2007 Apr;14(4):876-8.
- 4) Ricci-Vitiani L, Casalbore P, Petrucci G, Lauretti L, Montano N, Larocca LM, Falchetti ML, Lombardi DG, Gerevini VD, Cenciarelli C, D'Alessandris QG, Fernandez E, De Maria R, Maira G,

- Peschle C, Parati E, Pallini R. Influence of local environment on the differentiation of neural stem cells engrafted onto the injured spinal cord. *Neurol Res.* 2006 Jul;28(5):488-92.
- 5) Ricci-Vitiani L, Pallini R, Larocca LM, Lombardi DG, Signore M, Pierconti F, Petrucci G, Montano N, Maira G, De Maria R. Mesenchymal differentiation of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ.* 2008 Sep;15(9):1491-8.
  - 6) Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL, Signore M, Lombardi D, Todaro M, Stassi G, Martini M, Maira G, Larocca LM, De Maria R. Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 15;14(24):8205-12.
  - 7) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007 Jan 4;445(7123):111-5.
  - 8) Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008; 15(3):504-14.

#### **Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 06 - Prof. Carlo Croce, Ohio University, Columbus, USA**

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

L'analisi di questi microRNA richiede un'elevata quantità di materiale (circa 20 microgrammi/northern) e tecniche autoradigrafiche che comportano l'uso di radioisotopi. Per superare tale limitazione ed analizzare l'espressione di microRNA in campioni di tessuto umano, spesso di dimensioni ridotte abbiamo sviluppato un array di microRNA mettendo a punto un metodo che potesse superare i limiti imposti dalla lunghezza di questi RNA (18-22 nn).

E' stato così messo a punto un microarray di oligonucleotidi di lunghezza di 40 basi, contenenti 368 sonde specifiche generate da 248 microRNA (161 umani, 84 murini e 3 di *Arabidopsis*) 15 tRNA (8 umani e 7 murini). Queste sequenze corrispondono ai microRNA trovati in banca dati ([www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna](http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna), June 2003). Il chip è stato validato con diversi esperimenti rivelando con diverse quantità di RNA (da 2,5 a 20 microgrammi) un coefficiente di correlazione tra 0,97 e 0,98. Tali prove hanno dimostrato la riproducibilità degli esperimenti anche in presenza di ampie differenze nella quantità di RNA (2).

Le analisi di espressione sono state inoltre esaminate per Northern blot allo scopo di verificarne l'esattezza. Tutti i dati ottenuti su tessuti di diversa origine hanno confermato la validità del sistema. Pertanto abbiamo validato tale strumento per quantificare in tessuti neoplastici anche di dimensioni ridotte l'espressione dei microRNA valutandone così su vasta scala il ruolo svolto all'interno dei processi tumorigenici (3).

I microRNA sono stati analizzati nelle cellule staminali tumorali di diversi tipi tumorali in esperimenti paralleli ai sopracitati, con punti aggiuntivi relativi al differenziamento di queste cellule in tipi cellulari non staminali. I microRNA differenzialmente espressi dalle CSCs e nella progenie cellulare differenziata sono attualmente oggetto di studio. I dati preliminari mostrano che esiste un set conservato di miR la cui espressione risulta diminuita col progredire del differenziamento, e confermano l'espressione tumore-specifica di alcuni miR già descritti in letteratura come potenziali oncogeni.

**Publicazioni**

- 1) Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM.: MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101(32):11755-60.
- 2) Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM.: An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101(26):9740-4.
- 3) Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM.: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101(9):2999-3004.

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

<b>U.O. 07 – Responsabile Scientifico:</b>	<b>Marco Presta, Università di Brescia</b>
<b>U.O. 08 – Responsabili scientifici:</b>	<b>Barbara Ensoli, ISS</b>
<b>U.O. 09 – Responsabili scientifici:</b>	<b>Gianluigi Condorelli, Parco Scientifico San Raffaele, Roma</b>

**Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 07 - Dr. Marco Presta, Università di Brescia**

L'angiogenesi è un momento di fondamentale importanza nella crescita e progressione tumorale e pertanto l'endotelio tumorale può rappresentare un bersaglio ideale per nuovi approcci terapeutici nel paziente neoplastico. Numerosi studi preclinici e recenti osservazioni originate da trials clinici mirati hanno infatti dimostrato che l'inibizione dell'angiogenesi tumorale può determinare un rallentamento della crescita del tumore stesso, mediante una significativa riduzione dell'apporto di ossigeno, nutrienti e fattori di crescita. Questo effetto si è dimostrato ancor più significativo quando associato ad altre forme di terapia più convenzionale, come la chemioterapia o la radioterapia. L'approvazione da parte dell'FDA americano del primo farmaco antiangiogenetico per il trattamento di pazienti oncologici rappresenta sicuramente un punto importante per lo sviluppo di nuove terapie antineoplastiche. Appare quindi fondamentale, per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici atti ad inibire l'angiogenesi tumorale, identificare nuovi target molecolari espressi dall'endotelio durante la progressione neoplastica e la crescita metastatica.

Nel corso di questo progetto, utilizzando tecniche di analisi del trascrittoma, abbiamo identificato nuovi geni coinvolti nel processo angiogenetico. Tra questi, i nostri studi hanno permesso di definire per la prima volta l'attività pro-angiogenetica di Drm/gremlin e di HMGB1 e di identificare il meccanismo angiogenetico indiretto di OPN, dovuto alla sua capacità di indurre la produzione di IL-1 in macrofagi attivati. Allo scopo di validare il ruolo dei geni identificati nel processo angiogenetico tumorale, abbiamo inoltre messo a punto due nuovi saggi che si basano sul modello animale dello Zebrafish. I modelli da noi sviluppati si caratterizzano per la loro semplicità di esecuzione, economia, e rapidità e rappresentano una valida alternativa ai modelli animali attualmente in uso che si basano sull'utilizzo soprattutto di roditori.

Nell'ambito dello sviluppo di nuovi farmaci antiangiogenetici, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sia su composti di origine naturale (derivati e stereoisomeri del resveratrolo, una fitoalessina presente nel vino rosso), peptidi e peptidomimetici inibitori della integrina  $\alpha v\beta 3$ , e di peptidi sintetici derivati dalla proteina PTX3. In particolare, i risultati ottenuti hanno indicato come il pentapeptide sintetico ARPCA sia dotato di una significativa attività angiostatica. Tale peptide pone le basi per lo sviluppo di future molecole peptidomimetiche dotate di attività antiangiogenetica.

**Scopo del progetto**

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

**Obiettivi**

- Identificazione dei modulatori dell'angiogenesi tumorale
- La validazione dei nuovi target molecolari identificati
- Creazione di nuovi strumenti farmacologici per inibire i meccanismi angiogenetici
- Identificazione di peptidi sintetici basati sulla sequenza di PTX3 dotati di attività anti-angiogenetica
- L'utilizzo del modello Zebrafish per l'identificazione di nuovi geni coinvolti nel processo angiogenetico

**Obiettivo 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 fibroblast growth factor-2 (FGF2). L'analisi dei risultati indica come FGF2 moduli l'espressione di numerosi geni in cellule endoteliali. Tale modulazione appare essere diversa per tipi endoteliali diversi, a conferma dell'eterogeneità dell'endotelio, e molto più marcata nei trasfettanti rispetto alle cellule stimulate con il fattore ricombinante. I geni coinvolti riguardano geni appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita e loro recettori, proteine coinvolte nel signalling intracellulare, proteasi e proteine della matrice extracellulare. Tra i geni maggiormente e costantemente up-regolati da FGF2 rientra sicuramente il gene per l'osteopontina, proteina coinvolta nei processi immuno-infiammatori e nella crescita e metastatizzazione tumorale, ed una serie di fattori chemiotattici per cellule dell'infiltrato infiammatorio (chemochine). Abbiamo inoltre identificato tra i geni indotti da FGF2 in cellule endoteliali *in vitro* ed *in vivo* la subunità p12 della DNA polimerasi  $\delta$ , coinvolta nei processi di replicazione cellulare, e la proteina Drm/gremlin appartenente alla famiglia delle cysteine-knot proteins dotate di attività BMP antagonista.

**Obiettivo 2. Validazione dei nuovi target molecolari identificati**

Tra i geni identificati dall'analisi del trascrittoma dell'endotelio in seguito all'esposizione al fattore di crescita angiogenetico FGF2, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla proteina della matrice/citochina osteopontina (OPN), sul fattore antagonista delle BMP denominato Drm/gremlin, e sulla proteina nucleare/citochina HMGB1. I nostri studi hanno permesso di definire per la prima volta l'attività pro-angiogenetica di Drm/gremlin e di HMGB1 e di identificare il meccanismo angiogenetico indiretto di OPN, dovuto alla sua capacità di indurre la produzione di IL-1 in macrofagi attivati.

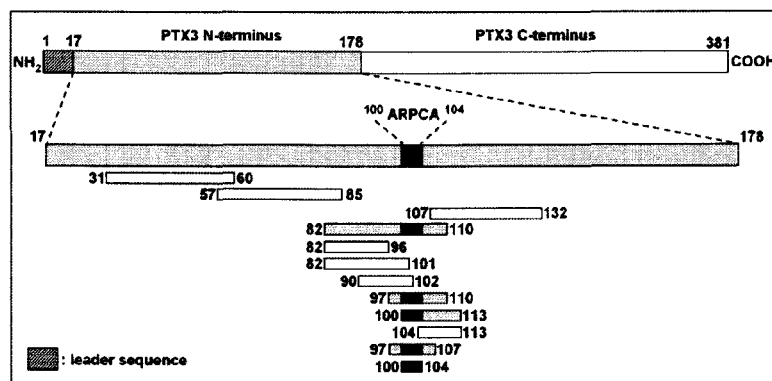
**Obiettivo 3: Creazione di nuovi strumenti farmacologici per inibire i meccanismi angiogenetici**

Stante l'indubbia importanza di FGF2 nell'angiogenesi, abbiamo condotto studi volti alla caratterizzazione di nuove eparine biotecnologiche a basso peso molecolare volte ad inibire l'attività angiogenetica di FGF2. Abbiamo inoltre studiato alcuni derivati del trans-resveratrolo caratterizzati da una attività antiangiogenetica e di "vascular targeting" dovuta alla loro capacità di destabilizzare i microtubuli delle cellule endoteliali. Per meglio comprendere le basi molecolari dell'attività anti-angiogenetica del resveratrolo e/o dei suoi derivati, abbiamo confrontato la capacità degli stereoisomeri *cis* e *trans* del resveratrolo nell'influenzare le diverse fasi del processo angiogenetico *in vitro* ed *in vivo*. I risultati ottenuti hanno dimostrato come l'isomero *trans* sia dotato di una capacità antiangiogenetica decisamente superiore all'isomero *cis* grazie alla sua capacità di inibire l'attività dell'integrina  $\alpha v \beta 3$ . Infine, anche sulla base dei nostri studi sopracitati, abbiamo investigato la capacità antiangiogenetica di un nuovo peptico-mimetico in grado di fungere da nell'engagement dell'integrina  $\alpha v \beta 3$ .

**Obiettivo 4: L'identificazione di peptidi sintetici basati sulla sequenza di PTX3 dotati di attività anti-angiogenetica**

Abbiamo approfondito lo studio dell'attività anti-angiogenetica della pentraxina lunga PTX3, da noi identificata come un antagonista selettivo dell'FGF2. A tale scopo, ci è parso interessante identificare il dominio funzionale di PTX3 responsabile della sua attività FGF2 antagonista. Sono state pertanto purificate le proteine di fusione NH2-PTX3/istidina e COOH-PTX3/istidina e utilizzate in saggi biochimici

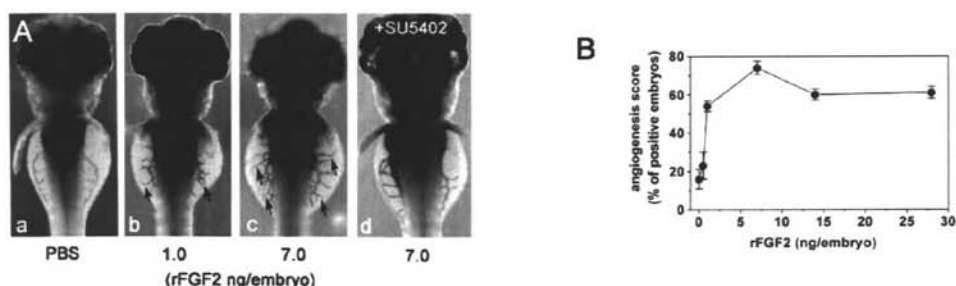
e biologici. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la regione amino terminale di PTX3 (NH<sub>2</sub>-PTX3) è quella candidata al ruolo di *FGF2-binding domain*. In questa stessa porzione, grazie all'utilizzo della "risonanza plasmonica di superficie" (BIAcore®), e' stata identificata una zona di 29 aa (dall'aa 82 all'aa 110) con attività FGF2 antagonista. Questi risultati sono poi stati supportati da ulteriori esperimenti che confermano la capacità della regione 82-110 di PTX3 di legare direttamente FGF2 *in vitro*, di inibire la proliferazione FGF2-dipendente di cellule endoteliali e di inibire la neovascolarizzazione indotta da FGF2 nella CAM. Successivamente, all'interno di questa porzione, abbiamo identificato la sequenza 97-110 con una capacità di legame ed un'attività FGF2 antagonista simili al peptide 82-110. Queste nostre osservazioni identificano una sequenza lineare di 14 aa all'interno della porzione NH<sub>2</sub> terminale di PTX3 con attività anti-angiogenetica. Nel loro complesso questi dati sottolineano una nuova e unica funzione della porzione amino terminale di PTX3. Abbiamo quindi voluto determinare la sequenza amino-acidica lineare minima responsabile dell'attività FGF2-antagonista del peptide 97-110. I risultati ottenuti hanno indicato come una sequenza pentapeptidica corrispondente alla sequenza PTX3(100-104) sia necessaria e sufficiente per esercitare tale attività. Il corrispondente peptide sintetico ARPCA si è rivelato un efficace antagonista angiostatico. Tale peptide pone le basi per lo sviluppo di future molecole peptidomimetiche dotate di attività antiangiogenetica.



#### **Obiettivo 5. Utilizzo del modello Zebrafish per l'identificazione di nuovi geni coinvolti nel processo angiogenetico**

Zebrafish è un ottimo modello per lo sviluppo animale, inoltre la facile manipolazione degli embrioni e la loro completa trasparenza lo rendono ideale per lo studio del sistema vascolare. Nel corso di questo progetto sono state messe a punto nuove procedure sperimentali volte ad utilizzare il modello Zebrafish per lo studio dell'angiogenesi *in vivo* e di nuovi geni coinvolti nel processo angiogenetico stesso, mediato in particolare dall'attività FGF/FGFR. A tale scopo è stato sviluppato lo ZFYM (Zebrafish yolk membrane) assay. In questo modello l'inoculo di una proteina angiogenetica nello spazio perivitellino di Zebrafish consente di analizzare l'impatto angiogenetico sui vasi soprintestinali (SIV) che si sviluppano in questa sede.

Tale fenomeno viene inoltre ottenuto da fattori angiogenetici prodotti dall'inoculo di tumori mimando ciò che accade nell'angiogenesi tumorale, un fenomeno importante per la sopravvivenza e la progressione del tumore stesso. Abbiamo pertanto messo a punto un nuovo modello di xenotrapianto di cellule tumorali in embrioni di Zebrafish allo scopo di poterne studiare il processo angiogenetico. In particolare cellule endoteliali tumorigeniche altamente angiogenetiche ed over-esprimenti FGF2 umano sono state inoculate nel periderma dello yolk di zebrafish. Tali cellule sono in grado di indurre dopo sole 24 ore dall'inoculo una forte risposta angiogenetica. Al contrario cellule controllo non scatenavano questo fenotipo. I vasi di neoformazione indotti dallo xenotrapianto esprimono marcatori precoci endoteliali quali VE-CAD, KDR e FLI. Tale neovascolarizzazione può essere inibita dall'esposizione a diversi composti farmacologici o mediante disattivazione genica indotta dall'iniezione di "antisense morpholino oligonucleotidi" (MO). Xenotrapianti di tumori di mammifero in embrioni di Zebrafish possono quindi rappresentare un modello per l'individuazione di geni coinvolti nell'angiogenesi tumorale e di nuovi farmaci angiostatici.



Su questa base, abbiamo utilizzato il modello di Zebrafish per studiare l'impatto di geni indotti da FGF2 in cellule endoteliali sui meccanismi di angiogenesi tumorale. In particolare abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul gene calcitonin receptor-like receptor (*clrlr*) che codifica per l'adrenomedullina, un noto induttore dell'angiogenesi in numerosi tumori umani. I risultati, oggetto di pubblicazione, hanno dimostrato come *clrlr* giochi un ruolo importante nel differenziamento delle cellule endoteliali arteriose in zebrafish e come la down-modulazione della sua espressione genica mediante iniezione di opportuni MOs determini una inibizione dell'angiogenesi indotta dall'inoculo di cellule tumorale nell'embrione di zebrafish. In questo momento stiamo valutando con le stesse metodiche il ruolo dei gene FGF2-inducibili *Edg1* e *CXCR7*.

#### Publicazioni

- 1) Nicoli S, Tobia C, Gualandi L, De Sena G, Presta M. Calcitonin receptor-like receptor guides arterial differentiation in zebrafish. *Blood*, 111: 4965-4972, 2008.
- 2) Nicoli S, De Sena G, Presta M. Fibroblast Growth Factor 2-induced angiogenesis in zebrafish: the zebrafish yolk membrane (ZFYM) angiogenesis assay. *J Cell Mol Med*, *Epub ahead of print*, 2008.
- 3) Mitola S, Moroni E, Ravelli C, Andres G, Belleri M, Presta M. Angiopoietin-1 mediates the pro-angiogenic activity of the bone morphogenic protein antagonist *Drm*. *Blood*, 112: 1154-1157, 2008.
- 4) Margosio B, Rusnati M, Bonezzi K, Cordes BL, Annis DS, Urbinati C, Giavazzi R, Presta M, Ribatti D, Mosher DF, Taraboletti G. Fibroblast growth factor-2 binding to the thrombospondin-1 type III repeats, a novel antiangiogenic domain. *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 700-709, 2008.
- 5) Belleri M, Ribatti D, Savio M, Stivala LA, Forti L, Tanghetti E, Alessi P, Coltrini D, Bugatti A, Mitola S, Nicoli S, Vannini V, Presta M.  $\alpha$ v $\beta$ 3 Integrin-dependent antiangiogenic activity of resveratrol stereoisomers. *Mol Cancer Ther*, 7: 3761-3770, 2008.
- 6) Andres G, Leali D, Mitola S, Coltrini D, Camozzi M, Corsini M, Belleri M, Hirsch E, Schwendener R A, Christofori G, Alcamì A, Presta M. A Pro-inflammatory Signature Mediates FGF2-induced Angiogenesis. *J Cell Mol Med*, *Epub ahead of print*, 2008.
- 7) Ponticelli S, Marasco D, Tarallo V, Albuquerque RJ, Mitola S, Takeda A, Stassen JM, Presta M, Ambati J, Ruvo M, De Falco S. Modulation of angiogenesis by a tetrameric tripeptide that antagonizes vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem*, 283: 34250-34259, 2008.
- 8) Stabile H, Mitola S, Moroni E, Belleri M, Nicoli S, Coltrini D, Peri F, Pessi A, Orsatti L, Talamo F, Castronovo V, Waltregny D, Cotelli F, Ribatti D, Presta M. Bone morphogenic protein antagonist *Drm/gremlin* is a novel proangiogenic factor. *Blood*, 109: 1834-1840, 2007.
- 9) Sozzani S, Rusnati M, Riboldi E, Mitola S, Presta M. Dendritic cell-endothelial cell cross-talk in angiogenesis. *Trends Immunol*, 28: 385-392, 2007.
- 10) Rusnati M. and Presta M. Fibroblast growth factors/fibroblast growth factor receptors as targets for the development of anti-angiogenesis strategies. *Curr Pharm Des*, 13: 2025-2044, 2007.
- 11) Ribatti D, Vacca A, Rusnati M, Presta M. The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18: 327-334, 2007.
- 12) Presta M, Camozzi M, Salvatori G, Rusnati M. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *J Cell Mol Med*, 11: 723-738, 2007.
- 13) Poliani P, Mitola S, Ravanini M, Ferrari-Toninelli G, D'Ippolito C, Notarangelo L, Bercich L, Wagener C, Memo M, Presta M, Facchetti F. CEACAM1/VEGF cross-talk during neuroblastic tumour differentiation. *J Pathol*, 211: 541-549, 2007.
- 14) Nicoli S. and Presta M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat Protoc*, 2: 2918-2923, 2007.

- 15) Nicoli S, Ribatti D, Cotelli F, Presta M. Mammalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. *Cancer Res*, 67: 2927-2931, 2007.
- 16) Margosio B, Rusnati M, Bonezzi K, Cordes BL, Annis DS, Urbinati C, Giavazzi R, Presta M, Ribatti D, Mosher DF, Taraboletti G. Fibroblast growth factor-2 binding to the thrombospondin-1 type III repeats, a novel antiangiogenic domain. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007.
- 17) Leali D, Moroni E, Bussolino F, Presta M. Osteopontin overexpression inhibits in vitro re-endothelialization via integrin engagement. *J Biol Chem*, 2007.
- 18) Naldini A, Leali D, Pucci A, Morena E, Carraro F, Nico B, Ribatti D, Presta M. Cutting Edge: IL-1beta mediates the proangiogenic activity of osteopontin-activated human monocytes. *J Immunol*. 2006;177:4267-4270.
- 19) Mitola S, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Sparatore B, Pedrazzi M, Melloni E, Presta M. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol*. 2006;176:12-15.

#### **Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 08 - Dr.ssa Barbara Ensoli, CNAIDS, ISS**

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). 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 formazione di metastasi (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 µM), 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