

- 2) Tafani M, Schito L, Anwar T, Indelicato M, Sale P, Di Vito M, Morgante E, Beraldi R, Makovec F, Letari O, Caselli G, Spadafora C, Pucci B, Russo MA. Induction of autophagic cell death by a novel molecule is increased by hypoxia. *Autophagy*. 2008 4, 1042-1053.
- 3) Spadafora C. A reverse transcriptase-dependent mechanism plays central roles in fundamental biological processes. *Syst Biol Reprod Med*. 2008 Jan-Feb;54(1):11-21.
- 4) Spadafora C. Sperm-mediated 'reverse' gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. *Hum Reprod*. 2008 23, 735-740.
- 5) Sciamanna I, Vitullo P, Curatolo A, Spadafora C. Retrotransposons, reverse transcriptase and the genesis of new genetic information. *GENE* (sottomesso per la pubblicazione)
- 6) Oricchio E, Sciamanna I, Spadafora C. Non-nucleosidic Reverse Transcriptase Inhibitors Antagonize Human LINE-1 Retrotransposition in Tumor Cells. *PLoS ONE* (sottomesso per la pubblicazione).

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 12 - Prof. Paola Sinibaldi Vallebona, Università Tor Vergata, Roma

I tumori sono malattie caratterizzate dall'eccessiva ed incontrollata crescita e diffusione di cellule, che sono andate incontro ad un differenziamento anomalo quanto a caratteristiche strutturali e biologiche. Anche se in tempi recenti sono enormemente aumentate le conoscenze relative alle cellule e ai meccanismi molecolari che stanno alla base del processo di cancerogenesi, la terapia rimane ancora inefficace soprattutto nei confronti degli stadi più avanzati della neoplasia, caratterizzati da un elevato numero di alterazioni sia genetiche che molecolari. Per poter identificare una terapia e comunque controllare lo sviluppo del tumore, è necessario conoscere come questo prende origine e si sviluppa ed in quest'ottica la capacità di indurre sperimentalmente tumori negli animali ha fornito l'opportunità di studiare vari aspetti del processo cancerogenetico, relativamente all'inizio della trasformazione ed alla sua successiva progressione.

Il progetto si è incentrato inizialmente sulla caratterizzazione istologica delle varie fasi di progressione tumorale che portano alla comparsa di adenocarcinoma del colon in ratti ceppo BDIX; sottoposti a trattamento con il cancerogeno chimico 1,2-dimetilidrazina 2HCI (DMH). Le sezioni istologiche ottenute da tessuto colico prelevato a partire dal 14° giorno dall'ultima somministrazione del cancerogeno hanno evidenziato la comparsa del tumore come focolaio a livello della sottomucosa, con tendenza a progredire infiltrando il tessuto mucoso, con zone di iperplasia o formazioni polipoidi a seconda della zona osservata.

La presenza di tessuto tumorale su sezioni ottenute da tumori comparsi all'11a settimana dalla sospensione del trattamento con DMH è stata inoltre confermata da colorazione immunohistochimica eseguita utilizzando due distinti anticorpi policlonali contro epitopi nonapeptidici, che in nostri precedenti studi avevamo dimostrato essere specifici per adenocarcinoma sia nell'uomo che nel ratto.

La positività all'analisi immunohistochimica risulta maggiore in sezioni ottenute da tumori in fase ulteriore di progressione (26^a settimana) (Figura 1).



Figura 1.

Poiché tra le molecole incluse nel presente progetto, capaci di interferire con la risposta infiammatoria coinvolta nella progressione tumorale, erano contemplati anche inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI) (studio condotto in collaborazione con l'U.O. Spadafora) siamo andati ad indagare in quale fase della progressione tumorale risultasse la comparsa di tale proteina. La colorazione immunohistochimica ne ha evidenziato una marcata espressione in corrispondenza della 26a settimana dalla sospensione del trattamento con DMH (Figura 2)

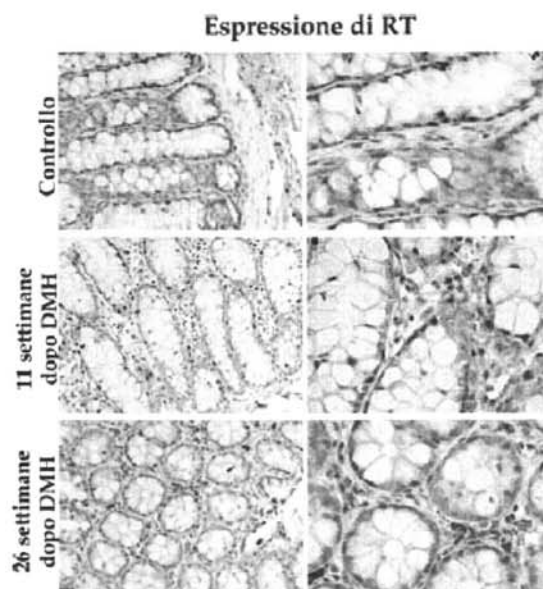


Figura 2.

Sempre nell'intento di caratterizzare le varie fasi di progressione del tumore indotto chimicamente sulle stesse 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, così come descritto dalla letteratura. Le colorazioni immunohistochimiche hanno evidenziato una riduzione dell'espressione di E-caderina nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale di controllo, ed una modificata localizzazione di β -catenina, che nel tessuto tumorale risulta a localizzazione citoplasmatica e raramente nucleare mentre nel tessuto normale di controllo presenta un'esclusiva localizzazione a livello delle giunzioni cellula-cellula (Figura 3).

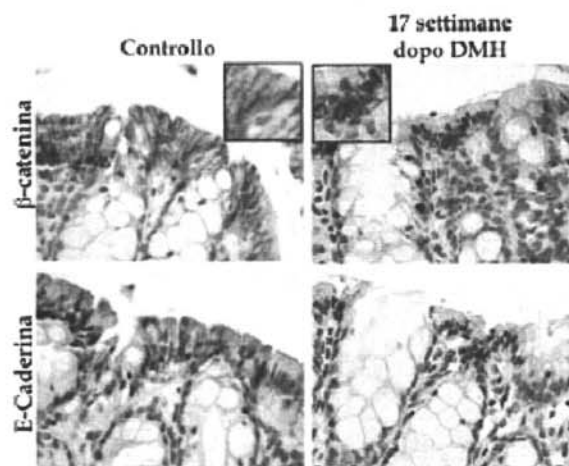


Figura 3.

Altro obiettivo dello studio è stato quello di dimostrare se il controllo della risposta flogistica è in grado di rallentare la comparsa di metastasi epatiche in un modello animale di adenocarcinoma coloretale del ratto.

A tal fine cellule della linea DHD/K12 TRB, originariamente ottenute da adenocarcinoma di colon indotto in ratto singenico del ceppo BDIX, mediante trattamento con 1,2 dimetilidrazina-2HCl (DMH) sono state inoculate in quantità comprese tra 2 a 12×10^6 cellule nella vena splenica di ratti maschi del ceppo BDIX di 6-7 settimane e di peso compreso tra i 250-300 gr al fine di individuare un protocollo sperimentale da utilizzare per lo studio delle molecole oggetto dello studio.

Subito dopo l'inoculazione, la milza è stata rimossa, per evitare sviluppo del tumore nella sede di incolo.

Tutti gli animali iniettati in vena splenica 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.

Sulla base di prove preliminari era 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 precedentemente ipotizzata, si era rivelata di difficile esecuzione in questo tipo di animale. Sono stati quindi allestiti piccoli gruppi di animali (5 per ciascun trattamento) che sono stati trattati con i dosaggi stabiliti. Le sostanze però non risultavano gradite agli animali che non provvedevano quindi ad abbeverarsi. Si è quindi fatto ricorso alla somministrazione delle sostanze attraverso gavage, che ha però creato una notevole condizione di stress negli animali che ci ha costretto a sopprimerli prima del completamento dello studio. I dati che sono stati ottenuti dalla misurazione del numero e delle dimensioni delle metastasi epatiche al momento del sacrificio degli animali, hanno suggerito una scarsa se non nulla attività antitumorale, relativamente a questo modello preclinico di metastasi.

Dall'avvio del presente progetto ad oggi sono molto aumentate le conoscenze sui meccanismi di azione dei cancerogeni chimici ed in particolare della DMH per cui certamente il modello di cancerogenesi chimica è quello che ci potrebbe fornire il maggior numero di informazioni relativamente ai processi di trasformazione tumorale e alla correlazione con i processi infiammatori. Purtroppo questo modello comporta difficoltà di attuazione in quanto l'utilizzo di cancerogeni chimici è altamente rischioso anche per gli operatori e per il personale che svolge attività presso lo stabulario, comportando notevoli difficoltà nell'utilizzazione di questo modello per lo studio della correlazione tra attività antinfiammatoria e progressione tumorale.

In collaborazione con l'U.O. diretta dal Dott. Spadafora abbiamo pertanto focalizzato il nostro studio sull'obiettivo del presente Progetto di Ricerca che era rivolto a definire: a) il pattern di espressione della Trascrittasi Inversa (RT) endogena nella progressione tumorale e b) dimostrare che il controllo negativo dell'RT è in grado di rallentare la progressione dei tumori. A tale scopo, avevamo originariamente iniziato la sperimentazione utilizzando lo stesso ceppo di transgenici (FVB/N.TG(MMTVPyVT) 34M(T/X) per studiare gli effetti dell'inibitore dell'RT Efavirenz sulla crescita del tumore mammario. I risultati ottenuti suggerivano che il trattamento con Efavirenz alla concentrazione di 20 mg/kg era in grado di inibire la progressione tumorale e di ridurre l'indice mitotico nelle fasi iniziali e intermedie della crescita ma che tali effetti tendevano a ridursi negli stadi più avanzati del tumore ed i due parametri a conformarsi a quelli dei controlli non trattati. Lo studio è quindi stato rivolto a valutare se l'effetto di inibizione della crescita tumorale, evidenziato nel trattamento *in vivo* con Efavirenz, risultasse essere dose-dipendente. I risultati sono riportati nella relazione scientifica dell'U.O. 11.

Pubblicazioni

- 1) De Luca A, Moroni N, Serafino A., Pastore A, Pedersen JZ, Petruzzelli R, Farrace MG, Pierimarchi P, Moroni G, Federici G, Sinibaldi Vallebona P, Lo Bello M. Treatment of doxorubicin resistant MCF7/DX cells with nitrosoglutathione enhances glutathionylation and may overcome drug resistance. (sottomesso per la pubblicazione su PNAS).

- 2) Serafino A, Pierimarchi P, Pittoggi C, Andreola F, Mercuri L, Zonfrillo M, Rasi G, Sinibaldi Vallebona P. Differentiation therapy: in vitro evidence making cyanidin-3-O- β -glucopyranoside useful for prevention and treatment of melanoma. *Int. J. Molecular Medicine*:18, Sup. 1 2006.
- 3) Sinibaldi Vallebona P, Rasi G, Pierimarchi P, Bernard P, Guarino E, Guadagni F, Garaci E. Vaccination with a synthetic nonapeptide expressed in human tumors prevents colorectal cancer liver metastases in syngeneic rats. *Int. J. Cancer* 110, 70-75, 2004.
- 4) Serafino A, Sinibaldi Vallebona P, Lazzarino G, Tavazzi B, Rasi G, Pierimarchi P, Andreola F, Moroni G, Galvano G, Garaci E. Differentiation of human melanoma cells induced by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *Faseb J*, 18(15); 1940-2, 2004.

(V) REGOLAZIONE DEL TURNOVER DI BCL2 RNA MEDIANTE RNA ANTISENSO**U.O. 13 – Responsabile Scientifico: Angelo Nicolin, Università di Milano****Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 13 - Prof. Angelo Nicolin, Dipartimento di Farmacologia, Università di Milano****Espressione di RNA antisenso complementare a bcl-2 mRNA**

Sono stati identificati RNA in orientamento antisenso responsabili di specifiche trasformazioni neoplastiche. Tra i primi nel definire le funzioni di RNA non codificanti, lo studio si è sviluppato nell'approfondire le caratteristiche degli RNA regolatori.

L'applicazione del software AntiHunter ha permesso di identificare i potenziali trascritti antisenso del gene bcl-2 mediante data-mining in una banca dati di EST. A questo scopo, è stata eseguita dapprima una ricerca mediante BLASTN (oppure MEGABLAST) vs. il database delle EST e, successivamente, sono state ottenute tutte le sequenze depositate che hanno un orientamento antisenso rispetto al gene bcl-2. Questo software verrà utilizzato anche per verificare se i potenziali trascritti antisenso vengano espressi in maniera specifica nei linfomi follicolari con traslocazione 14;18. I dati acquisiti sono a disposizione e costituiscono la base per successive ricerche.

Considerando la grande difficoltà ad amplificare e quindi studiare filamenti di RNA e definirne l'orientamento, un notevole impegno è stato indirizzato allo scopo di realizzare una RT-PCR filamento-specifica. Attraverso vari approcci, come descritto nella relazione di II anno, si sono identificate condizioni ottimali per poter identificare in modo definito l'orientamento antisenso degli RNA non codificanti scoperti nell'ambito del progetto.

Più recentemente RNA ottenuto da linfociti normali e da linfociti linfomatosi portatori della traslocazione 14;18, sono stati analizzati con tecnica microarray. I risultati di diversi esperimenti sembrano indicare la presenza di alcuni corti RNA in aggiunta all'RNA antisenso complementare alla regione di giunzione 14;18. Una più approfondita analisi dei risultati e l'eventualità di utili comparazioni tra linfociti normali e tumorali è ancora in corso.

Meccanismi molecolari del turnover di bcl-2 RNA

Il nostro laboratorio, leader nello studio dei meccanismi che regolano la degradazione dei singoli messaggeri, ha identificato nella rispettiva proteina l'elemento regolatorio dose-dipendente ed ha ipotizzato un meccanismo di feed-back negativo. Nel corso del progetto è stato dimostrato che la proteina è in grado di interagire esclusivamente con le sequenze regolatorie ARE del gene rilevante. L'interazione funzionale proteina-RNA, analizzata a livello molecolare mediante diverse tecniche univocamente ha invece dimostrato la non diretta relazione tra le due molecole. Le interazioni molecolari con varie tecnologie inclusi i processi di silenziamento, di binding e di co-immunoprecipitazione hanno rivelato l'interazione di Bcl2 con la proteina stabilizzante HuR (Fig.1).

Un apporto importante è derivato dagli studi mediante trasfezione di Bcl2 mutato in vari domain del 3' UTR per riconoscere il domain rilevante per l'azione regolatoria in trans. In questo ambito risultati rilevanti anche per la comprensione dei meccanismi degli altri RNA regolatori sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di plasmidi reporter. L'insieme di tecnologie avanzate ha consentito di stabilire un quadro definito sui meccanismi che regolano l'espressione degli RNA e quindi sui livelli di espressione genica. Lo studio ha anche potuto stabilire una gerarchia nell'azione di alcune proteine regolatorie molto utile per il disegno di sistemi sintetici di controllo.

In una ricerca parallela, utilizzando il sistema dei tre ibridi è stata individuata una nuova proteina umana che interagisce con l'ARE di bcl-2 denominata TINO. 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. Sono state concluse le analisi mediante elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa di altre proteine

regolatorie in grado di interagire con l'ARE di bcl-2. E' stata quindi individuata una nuova proteina che lega e stabilizza il messaggero di Bcl2, la ζ -cristallina, risultata over-espressa in linee di leucemia linfocitica.

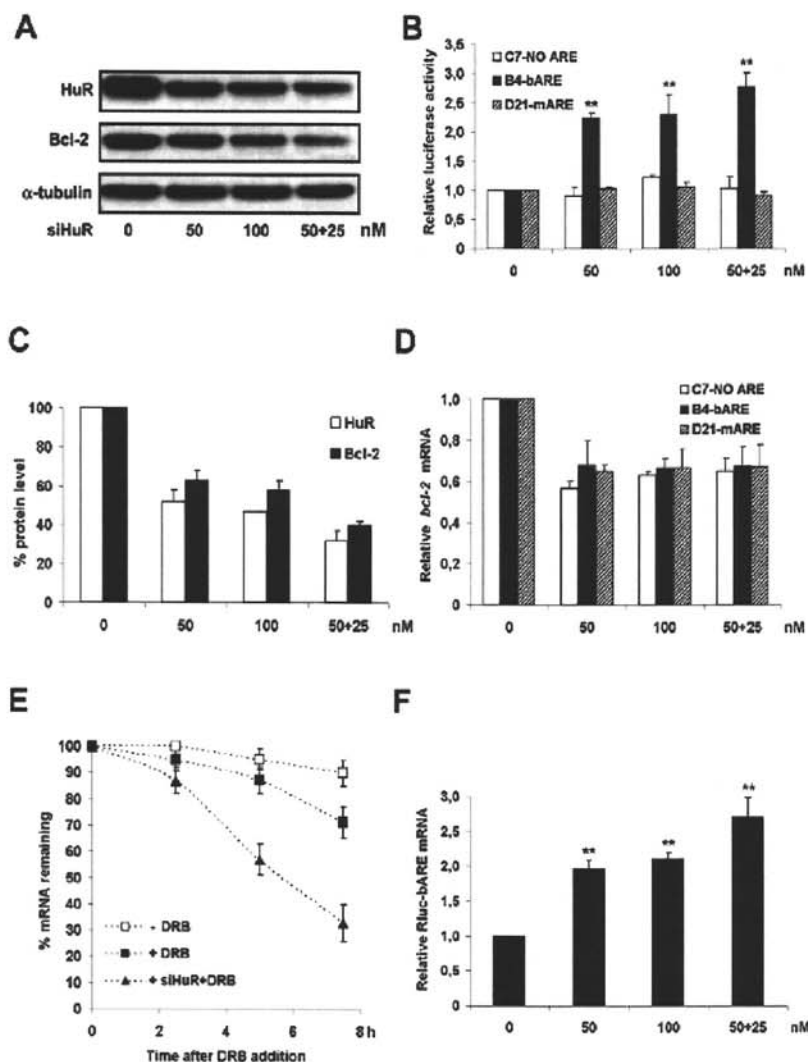


Fig. 1. Aumento specifico dell'attività del bARE-reporter silenziando HuR. (A) Cloni HEK293 stabilmente trasfettati ci costrutti reporter sono stati trattati con siHuR come indicato in Figura ed i livelli di HuR e Bcl-2 sono stati valutati mediante analisi di Western Blot. (B) L'attività del reporter mostra un aumento specifico dell'attività del costrutto bARE a seguito del silenziamento di HuR. (C) L'analisi densitometrica delle bande di Bcl-2 e HuR evidenzia la riduzione di entrambe le proteine in seguito al trattamento con siHuR. (D) Mediante RealTime quantitative RT-PCR si osserva la riduzione dell'mRNA endogeno di bcl-2 nelle cellule in cui HuR è silenziato. (E) La velocità di degradazione del messaggero di bcl-2 aumenta in presenza di siHuR. (F) I livelli di espressione del trascritto bARE-reporter aumentano nelle cellule trattate con siHuR.

Regolazione del turnover di bcl2-RNA con mezzi esogeni

Un nuovo ed originale sistema capace di aumentare l'espressione di un singolo gene è stato sviluppato con oligoribonucleotidi sintetici opportunamente stabilizzati. I risultati appaiono di grande interesse applicativo per la possibilità di up-regolare geni oncosoppressori.

In un sistema cellulare gli oligoribonucleotidi complementari (asORN) alla regione ARE di bcl2 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 mediante studi in sistemi cell-free. L'analisi del messaggero ha rivelato l'inibizione del processo di degradazione che ha determinato un aumento significativo dell'espressione di RNA per bcl2.

L'azione di stabilizzazione specifica ha inoltre prodotto un evidente fenotipo caratterizzato da marcata resistenza allo stimolo apoptotico ed all'induzione di processi differenziativi in cellule di neuroblastoma.

Sono stati disegnati e preparati 3 oligoribonucleotidi in orientamento senso (sORN) rispetto alla regione ARE dell'RNA di bcl2 che hanno dimostrato attività stabilizzante agendo con probabile meccanismo decoy. Essi sono in grado di stabilizzare il messaggero di Bcl2 legando le AUBPs in competizione con la sequenza in cis del messaggero (Fig. 2).

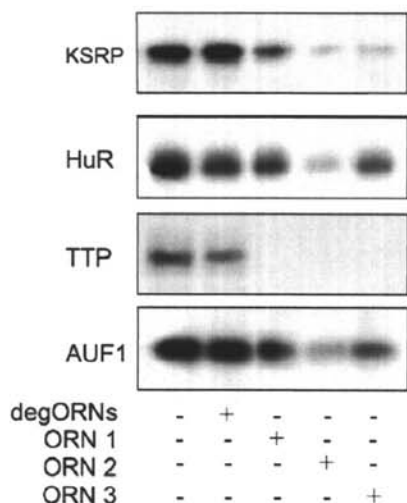


Fig. 2. Spiazzamento delle AUBPs da parte degli ORN in orientamento senso. L'esperimento di UV-crosslinking evidenzia la competizione tra ORNs e AUBPs per il legame al trascritto bARE marcato radioattivamente.

Un'altra marcata differenza riguarda l'azione "aspecifica" degli ORN senso. Infatti le AUBPs legano molte strutture ARE espresse in messaggeri diversi. Il confronto ORN senso-antisense appare di notevole interesse per la comprensione dei meccanismi che regolano i messaggeri. Per questi scopi è stato eseguito uno studio mediante microarray sugli RNA cellulari ottenuti dopo trattamento con ORN senso o antisense. La valutazione dei risultati appare complessa e non ancora conclusa.

Gli studi di attività antitumorale in combinazione con farmaci citotossici ha riguardato la cascata PI3K/AKT/mTOR che gioca un ruolo importante nel regolare la fosforilazione/inattivazione di Bcl2 e che potrebbe trovare sinergia con i farmaci ad azione sui microtubuli. Sono state utilizzate cellule di prostata umana con PTEN mutato o wild-type, in cui AKT risulta rispettivamente attivata in maniera costitutiva o normale. L'inibizione di AKT con siRNA in cellule con AKT attivata ha rivelato un effetto sinergico con i farmaci chemioterapici e nessuna sinergia nelle cellule con AKT espressa in modo regolato (Fig. 3).

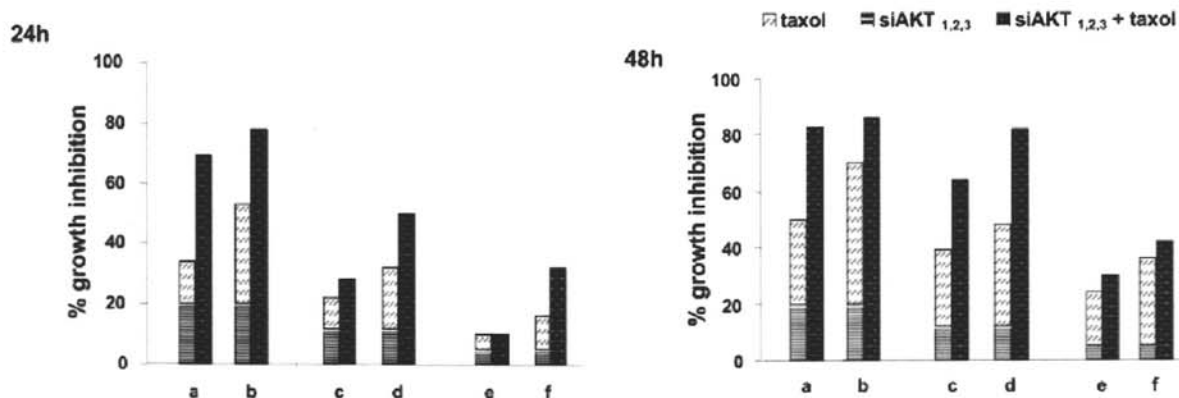


Fig. 3. Effetto sinergico di siAKT e taxolo in cellule di prostata PTEN^{-/-}. Le colonne nei grafici si riferiscono a: a-b, LNCaP; c-d, PC3; e-f, DU-145; a,c,e, siAkt_{1,2,3} e 10 nM taxolo; b,d, f, siAkt_{1,2,3} e 30nM taxolo. La prima colonna di ciascuna coppia mostra l'effetto di ciascun farmaco somministrato da solo (parte inferiore) e l'effetto additivo atteso (parte superiore). La seconda colonna mostra invece l'effetto ottenuto con la combinazione dei due farmaci. Il confronto tra la prima e la seconda colonna rappresenta quindi la sinergia tra i farmaci.

Publicazioni

- 1) Donnini M, Lapucci A, Papucci L, Witort E, Jacquier A, Brewer G, Nicolin A, Capaccioli S, Schiavone N. Identification of Tino: A new evolutionarily conserved bcl-2 AU-rich element RNA binding protein. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:20154-66.
- 2) Schiavone N, Donnini M, Nicolin A, Capaccioli S. Antisense oligonucleotide drug design. *Curr Pharm Des.* 2004; 10:769-784.
- 3) Asnaghi L, Bruno P, Priulla M, Nicolin A. mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol Res.* 2004; 50:545-549.
- 4) Asnaghi L., Calastretti A., Bevilacqua AM., D'Agnano I., Gatti G., Canti G., Capaccioli S., Nicolin A. Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. *Oncogene* 2004; 29:5781-5791.
- 5) Ghisolfi L, Papucci L, Bevilacqua A, Canti G, Tataranni G, Lapucci A, Schiavone N, Capaccioli S and Nicolin A. Increased Bcl2 expression by antisense oligoribonucleotides targeting the adenine-uridine-rich element motif. *Mol Pharmacol.* 2005; 68:816-821.
- 6) Bevilacqua A, Ghisolfi L, Franzi S, Maresca G, Gherzi R, Capaccioli S, Nicolin A, Canti G. Stabilization of cellular mRNAs and up-regulation of proteins by oligoribonucleotides homologous to the Bcl2 adenine-uridine rich element motif. *Mol Pharmacol.* 2007; 71: 531-8.
- 7) Moncini S, Bevilacqua A, Venturin M, Fallini C, Ratti A, Nicolin A, Riva P. The 3' untranslated region of human Cyclin-Dependent Kinase 5 Regulatory subunit 1 contains regulatory elements affecting transcript stability. *BMC Mol Biol.* 2007; 8:111.
- 8) Papucci L, Witort E, Bevilacqua A, Donnini M, Lulli M, Borchi E, Khabar KS, Tempestini A, Lapucci A, Schiavone N, Nicolin A, Capaccioli S. Impact of targeting the AU-rich element of bcl-2 mRNA with oligoribonucleotides on apoptosis, cell cycle and neuronal differentiation in SHSY-5Y cells. *Mol Pharmacol.* 2007; 73:498-508.
- 9) Bruno P, Calastretti A, Priulla M, Asnaghi L, Scarlatti F, Nicolin A, Canti G. Cell survival under nutrient stress is dependent on metabolic conditions regulated by Akt and not by autophagic vacuoles. *Cell Signal.* 2007; 19:2118-2126.
- 10) Priulla M., Calastretti A., Bruno P., Azzariti A., Paradiso A., Canti G, Nicolin A. Preferential Chemosensitization of PTEN-Mutated Prostate Cells by Silencing the Akt Kinase Prostate 2007; 67:782-789.
- 11) Azzariti A, Porcelli L, Gatti G, Nicolin A, Paradiso A. Synergic antiproliferative and antiangiogenic effects of EGFR and mTor inhibitors on pancreatic cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75:1035-1144.
- 12) Gatti G, Maresca G, Natoli M, Florenzano F, Nicolin A, Felsani A, D'Agnano I. MYC prevents apoptosis and enhances endoreduplication induced by paclitaxel. *PLoS ONE.* 2009; 4:e5442.
- 13) Ghisolfi L, Calastretti A, Franzi S, Canti G, Donnini M, Capaccioli S, Nicolin A and Bevilacqua A. B Cell Lymphoma (Bcl)-2 Protein is the major determinant in Bcl-2 Adenine-Uridine Rich-Element turnover overcoming hur activity . *J. Biol. Chem.* 2009;284(31):20946-55.
- 14) Lapucci A, Lulli M, Amedei A, Papucci L, Witort E, Perna F, Bertolini F, Brewer G, Nicolin A, Morello D, Schiavone N, Donnini M, Capaccioli S. Bcl-2 Over-Expression in T Cell Acute Lymphocytic Leukemias Results from Increased Binding of the New mRNA Binding Protein ζ - Crystallin to the AU-Rich Element of Bcl-2 mRNA. (sottomesso per la pubblicazione).