

ATTI PARLAMENTARI

XVI LEGISLATURA

CAMERA DEI DEPUTATI

Doc. XXVII
n. 15

RELAZIONE CONCLUSIVA

SUI RISULTATI DEL PROGETTO ONCOTECNOLOGICO FINALIZZATO A SVILUPPARE TERAPIE ONCOLOGICHE INNOVATIVE SU BASE MOLECOLARE

*(Articolo 2, comma 1, del decreto-legge 23 aprile 2003, n. 89, convertito, con modificazioni,
dalla legge 20 giugno 2003, n. 141)*

Predisposta dall'Istituto superiore di sanità

Presentata dal Ministro del lavoro, della salute e delle politiche sociali

(SACCONI)

Trasmessa alla Presidenza l'11 novembre 2009

PAGINA BIANCA

INDICE

SINTESI DEL PROGRAMMA E DEI RISULTATI SCIENTIFICI	Pag.	5
---	------	---

Progetti

(I)	Le basi metodologiche per una chemioterapia anti-tumorale mirata: il saggio dell'Edr nel carcinoma ovario ed in altre neoplasie	»	9
(II)	Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi	»	14
(III)	Le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi anti-apoptotici: le basi cellulari della farmacoresistenza tumorale	»	22
(IV)	(A) Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative	»	28
	(B) Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di NF-KB e di scavengers di radicali liberi in modelli murini di cancro del colon, della mammella e della prostata	»	43
(V)	Regolazione del turnover di BLC2 RNA mediante RNA antisenso	»	53
(VI)	Sviluppo di nuove terapie antitumorali basate sui farmaci anti-retrovirali inibitori della proteasi di HIV e inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, da soli o combinati: studi preclinici in vitro ed in vivo	»	57

PAGINA BIANCA

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" relazionato 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). E' 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-apoptica 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 più 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 più espressi nei tumori ovarici rispetto al tessuto ovarico normale.

Di grande importanza, poiché 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 più 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 è stata sperimentata in vivo in animali con trapiantati tumori ovarici umani chemioresistenti, la tossina è 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 è descritto nei manoscritti allegati come bibliografia a questo resoconto e che citano come fonte di supporto l'Istituto Superiore di Sanità (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 chinasi 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 embrionali 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.

Espressione di FEZ1 in carcinomi mammari primitivi

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

Nei campioni selezionati abbiamo esaminato il livello di espressione di FEZ1 in 441 preparati istologici di carcinoma mammario (CM) (più 16 controlli positivi) mediante l'utilizzo di "tissue micro-array". Ciascun caso, classificato secondo il particolare istotipo, è corredato di storia clinica, eventuale terapia somministrata e follow-up.

Il 100% (16/16) dei tessuti mammari normali ha mostrato positività per l'espressione di FEZ1. Il 54,7% (241/441) dei casi esaminati è negativo per FEZ1, nel 19% (84/441) dei casi si osserva un'espressione moderata, mentre soltanto il 26,3% (116/441) mostra una diffusa positività per FEZ1, con differenze significative tra i vari istotipi. In particolare, i 340 casi di carcinoma duttale infiltrante risultano per il 55,38% (188/340) negativi, per il 20,80% (71/340) moderatamente positivi e per il 23,82% (81/340) positivi; i 21 casi di carcinoma tubulare infiltrante sono per il 47,60% negativi (10/21), per il 4,80% (1/21) moderatamente positivi e per il 47,60% (10/21) positivi; i 15 casi di carcinoma midollare sono per il 46,66% (7/15) negativi, per il 20% (3/15) moderatamente positivi e per il 33,33% (5/15) positivi; i 4 casi di carcinoma mucinoso sono per il 25% (1/4) negativi e per il 75% (3/4) positivi; i 4 casi di carcinoma cribriforme sono per il 75% (3/4) negativi e per il 25% (1/4) positivi; i 38 casi di carcinoma lobulare infiltrante sono per il 63,15% (24/38) negativi, per il 15,80% (6/38) moderatamente positivi e per il 21,05% (8/38) positivi; i 13 casi di carcinoma misto duttale/lobulare sono per il 54% (7/13) negativi, per il 23% (3/13) moderatamente positivi e per il 23% (3/13) positivi; i 3 casi di carcinoma tubulo-lobulare sono per il 33% (1/3) negativi e per il 66,6% (2/3) positivi; infine i 3 casi di carcinoma micropapillare sono per il 100% (3/3) positivi.

E' evidente che l'alterazione dell'espressione di FEZ1 è strettamente associata ai diversi tipi di carcinoma mammario: utilizzando il test del χ^2 abbiamo individuato un'associazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra l'assenza di Fez1 e i vari istotipi esaminati.

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

Generazione del clone stabile in cellule derivate da carcinoma mammario (MCF-7) negative per FEZ1. Per generare un clone stabile in questa linea cellulare abbiamo utilizzato un sistema basato sul repressore Tet di *E.Coli* (TetR) che controlla negativamente i geni dell'operon sul transposone Tn 10. TetR blocca la trascrizione di tali geni legandosi alle sequenze dell'operatore Tet (TetO) in assenza di tetraciclina.

Le cellule MCF-7 FEZ1 +/+ e -/-, ottenute come sopra descritto sono state trattate con Taxolo dissolto in dimetilsulfoxide (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) in mezzo completo per 6,12,18,24,48,72 ore a differenti concentrazioni (0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM). La concentrazione finale di dimetilsulfoxide è stata mantenuta al di sotto di 0.05% così da non esercitare un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare. Ad ogni time-point le cellule sono state tripsinizzate e contate usando un emocitometro. Per saggiare la chemiosensibilità al taxolo dei cloni FEZ1 positivi è stato utilizzato un MTS-assay ed un electron coupling reagent (PMS), specificatamente il "Cell Titer 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay kit" (Promega). Questi esperimenti hanno dimostrato come la presenza di Fez1 determini una maggiore sensibilità al Taxolo.

Studio dei meccanismi molecolari alla base della resistenza al Taxolo in cellule in cui il gene FEZ1/LZTS1 non è funzionante

Per comprendere quali siano i meccanismi di funzionamento del gene *FEZ1/LZTS1* (di seguito LZTS1) e la loro implicazione nella resistenza ai Taxani abbiamo utilizzato un modello murino in cui il gene *LZTS1* è stato inattivato nella linea germinale (Topo Knock-out) ed abbiamo utilizzato cellule derivate dai vari genotipi ottenuti per le analisi molecolari. Attraverso questi studi, riassunti in questo report,

siamo stati in grado di identificare i meccanismi molecolari attraverso i quali *Lzts1* potrebbe interferire con l'azione dei Taxani. Infatti, abbiamo osservato che la perdita di questa proteina altera la divisione mitotica rendendo inefficace l'azione di questi farmaci.

Generazione del modello murino

Per identificare il locus cromosomico murino del gene *LZTS1*, abbiamo analizzato una libreria di DNA genomico murino derivata dal ceppo 129/Sv, utilizzando come sonda il cDNA murino del gene. Una volta identificata la regione genomica questa è stata utilizzata per la generazione di un vettore di targeting, che dopo essere stato linearizzato, è stato trasferito tramite elettroporazione in cellule embrionali staminali murine che sono state selezionate tramite l'utilizzo di geneticina (G418). Successivamente le cellule positive sono state trasferite nella blastocisti di topi del ceppo C57BL/6J e quindi in utero di femmine pseudo-gravide, per la generazione di topi chimerici dando luogo a tre genotipi (+/+, +/- e -/-). La progenie ottenuta è stata osservata per 24 mesi. In animali con un'età compresa tra 8 e 24 mesi, l'esame istologico ha messo in evidenza che 0 topi su 11 con genotipo omozigote wild-type (+/+), 12 topi su 20 con genotipo eterozigote (+/-) e 9 topi su 9 con genotipo omozigote knock-out (-/-) sviluppavano tumori in diversi organi (Fig.1 E-I). I tumori più frequenti erano tumori mammari, con prevalente differenziazione duttale, carcinomi epatici e tumori dei tessuti molli (sarcomi).

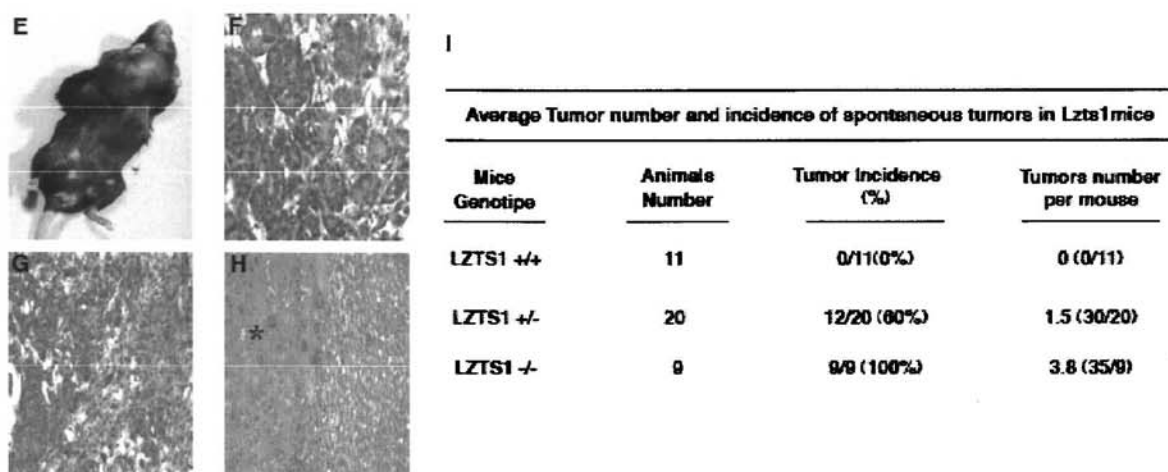


Figura 1. Sviluppo di tumori spontanei nei vari genotipi LZTS1. E. Aspetto macroscopico di tumore mammario in un topo *Lzts1* -/-. F. Ematossilina e Eosina, che mette in evidenza la struttura duttale del carcinoma mammario descritto in E. G. Sarcoma della coscia. H. Epatocarcinoma. I. Tabella riassuntiva dei tumori e della loro frequenza nei vari genotipi.

Studio delle cellule derivate da topi omozigoti wild-type e omozigoti Knock-out per *Lzts1*

I nostri precedenti studi avevano messo in evidenza come *Lzts1* fosse implicato nel controllo e nella progressione del ciclo cellulare. Per verificare il meccanismo di funzionamento di questo gene abbiamo derivato dai topi generati, come sopra descritto, fibroblasti embrionali murini (di seguito MEF) e ne abbiamo studiato le caratteristiche che vengono di seguito riassunte:

1. Crescita dei MEFs derivati dai Ko più lenta per incremento di apoptosi spontanea (Fig. 2A)
2. Normale transizione attraverso le fasi G1-S e S-G2 del ciclo cellulare (Fig. 2B)
3. Ridotta accumulazione delle cellule -/- rispetto alle +/+ nella fase G2/M del ciclo cellulare dopo sincronizzazione in doppio blocco di Timidina. (Fig. 2C)

Queste caratteristiche suggeriscono due ipotesi: 1) Le cellule *-/-* hanno una progressione più lenta tra la fase S e la fase G₂; 2) Le cellule *-/-* hanno una uscita dalla fase M più veloce.

Per comprendere quale ipotesi fosse quella reale le cellule *+/+* e *-/-* sono state cresciute in presenza di 5'-bromodeossiridina (BrdU), in modo da marcare la fase S. Dopo aver rimosso la BrdU abbiamo aggiunto Nocodazolo, un farmaco che blocca le cellule in prometafase e abbiamo raccolto le cellule dopo 3, 12 e 18 ore. Come mostrato in Figura 3A l'analisi per FACS ha messo in evidenza che le cellule *-/-* positive per BrdU progrediscono normalmente dalla fase S alla fase G₂/M ma si accumulano meno in prometafase (Fig. 3A). Infatti dopo 12-18 ore di trattamento con il nocodazolo il 10% delle cellule *+/+* contro il 25% di cellule *-/-* erano nella fase G₁/S suggerendo che le cellule Ko uscivano più velocemente dalla mitosi.

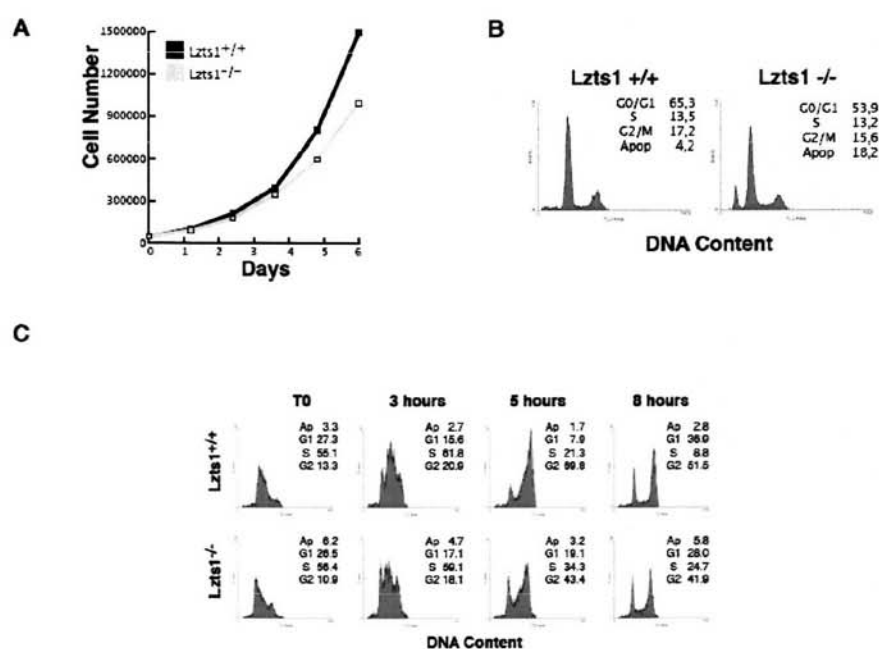


Figura 2. Caratteristiche dei MEF. **A.** Curve di crescita in cui sono comparate cellule *+/+* (box neri) e cellule *-/-* (box grigi). **B.** Analisi FACS delle cellule come in **A.** **C.** Analisi FACS delle cellule *+/+* e *-/-* sincronizzate nella fase G₁/S attraverso doppio blocco in Timidina e rilasciate per i tempi indicati.

Per studiare in maggior dettaglio il ruolo di Lzts1 nella progressione mitotica abbiamo analizzato le cellule wild-type e knock-out per l'espressione della fosfoproteina MPM2 e nella loro distribuzione lungo le fasi del ciclo cellulare. Per fare questo abbiamo isolato, tramite mitotic shake-off un uguale quantità di cellule Wt e Ko (Fig. 3B). L'analisi del contenuto di DNA (Fig.3C) e dell'espressione della fosfoproteina MPM2 (Fig.3D) ha messo in evidenza che le cellule Wt arrestate in prometaphase con il Nocodazolo completano la fase M in 90 minuti mentre le cellule Ko in 60 minuti. Dati che suggeriscono una fase mitotica più veloce nelle cellule Ko.

Una volta stabilito che l'assenza di Lzts1 interessa principalmente la transizione tra profase ed anafase abbiamo esplorato quali ne fossero gli effetti sull'attività di CDK1 durante la fase M. Attraverso numerosi esperimenti abbiamo verificato che l'assenza di Lzts1 correla con una ridotta attività chinastica di Cdk1 che causa una riduzione della durata della fase M accompagnata ad un incremento di cromosomi mal segregati (Fig.3E).

Studio di cellule derivate da carcinomi mammari primitivi attraverso l'utilizzo di small-interference RNA (Si-RNA)

Per validare i dati ottenuti nello studio del modello murino abbiamo utilizzato cellule primarie derivate da carcinomi mammari.

Derivazione di cellule primarie da carcinoma mammario

Per ottenere cellule derivate da carcinoma mammario abbiamo utilizzato il metodo di Lasfargues.

Da carcinomi mammari (n.135) inviati al nostro dipartimento di anatomia patologica per esami di routine è stato prelevato a fresco un frammento di tessuto neoplastico. Il tessuto è stato immediatamente immerso in mezzo di cultura, il MCDB 170 secondo il protocollo di Hammond, Ham e Stampfer, acquistato dalla GIBCO e supplementato con Pennicillina (1.5IU/ml), Streptomicina (1.5µg/ml), Insulina (5µg/ml), Idrocortisone (1.4×10^{-7} M), EGF (10ng/ml), Etanolamina (1.0×10^{-4} M), Trasferrina (5µg/ml), Prolattina Ovina (1µg/ml) e Prostaglandina E₁ (2.5×10^{-8} M). In tutti i casi (135) il rimanente tessuto è stato fissato in formalina per stabilire la quantità e l'istotipo del tumore messo in cultura.

Per verificare che ogni cultura cellulare fosse in realtà costituita da cellule epiteliali, abbiamo utilizzato un approccio immunocitochimico tramite utilizzo di anticorpo per Pan Citocheratina e per antigene epiteliale di membrana (EMA). A maggior conferma della natura delle cellule è stata eseguita microscopia elettronica. Da 135 tumori analizzati abbiamo ricavato 5 linee cellulari, che presentavano il 100% delle cellule positive per citocheratina ed EMA. Da un punto di vista morfologico tutte le linee ottenute presentavano caratteri di malignità (pleomorfismo cellulare, inversione del rapporto nucleo/citoplasma, elevata attività mitotica e crescita in sospensione).

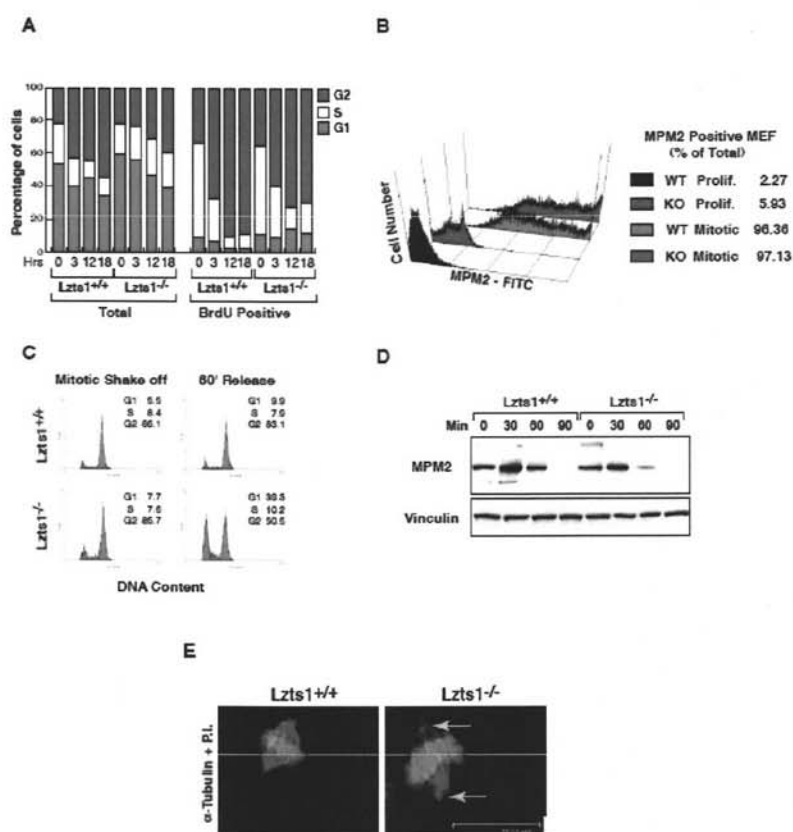


Figura 3. A. Studio della fase S in cellule marcate con BrdU. **B.** Espressione della fosfoproteina MPM2 in cellule ciclanti ed isolate per mitotic shake-off nei due genotipi. **C.** Analisi FACS delle cellule isolate per mitotic shake-off e rilasciate per 60 minuti. **D.** Analisi della fosfoproteina MPM2 in cellule isolate per mitotic shake-off e rilasciate per i tempi indicati. **E.** Studio della divisione mitotica in cellule +/+ e -/-. I cromosomi mal segregati sono indicati dalle frecce gialle.

Determinazione dell'espressione del gene LZTS1 nelle cellule primarie derivate da carcinoma mammario

La determinazione della espressione proteica di LZTS1 nelle cellule ottenute al punto precedente abbiamo utilizzato tecniche standard di Western-blot, impiegando un nuovo anticorpo monoclonale da noi

generato. Come mostrato in figura 3 due delle cinque linee generate non mostravano l'espressione del gene (Fig3).

Inibizione dell'espressione del gene LZTS1 tramite l'utilizzo di si-RNA

Per verificare quale fosse l'effetto della perdita di espressione di LZTS1 in culture primarie di carcinoma mammario abbiamo utilizzato si-RNA.

L'RNA interference è un processo biologico in cui l'introduzione di un RNA a doppio filamento determina la degradazione di un RNA complementare portando quindi a silenziamento genico.

Per sopprimere l'espressione del gene abbiamo utilizzato dei custom-design si-RNA acquistati presso la Qiagen. Come mezzo di trasfezione è stato utilizzato HiPerfect come da istruzioni del produttore. A 24 ore dopo la trasfezione le cellule sono state staccate e le proteine estratte come da protocolli standard. L'analisi dell'effetto di soppressione è stata eseguita tramite tecniche convenzionali di western-blot. L'utilizzo combinato di due si-RNA a 24hrs dopo la trasfezione determina una scomparsa totale della espressione proteica.

Determinazione degli effetti del Taxolo in cellule in cui l'espressione di LZTS1 è stata inibita.

Le cellule primarie, ottenute come sopra descritto sono state trattate con Taxolo coniugato con un fluorocromo dissolto in dimetilsulfossido (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) in mezzo completo per 24 ore ad una concentrazione di 1 nM. Le cellule sono state quindi fissate ed analizzate con un microscopio invertito con luce a fluorescenza. La mancata espressione di LZTS1 determina un mancato legame delle molecole di Taxolo alle strutture microtubulari determinando una colorazione diffusa nel citoplasma. Il meccanismo per il quale la mancanza di Lzts1 determina un anomalo legame delle molecole del taxano alla componente microtubulare sono in corso di definizione.

Pubblicazioni

- 1) H. Ishii, K. Mimori, Y. Yoshikawa, M. Mori, Y. Furukawa, A. Vecchione. Differential roles of E-type cyclins during transformation of murine E2F-1-deficient cells. *DNA and Cell Biology* 24:173-179, 2005.
- 2) Ishii H, Mimori K, Inageta T, Murakumo Y, Vecchione A, Mori M, Furukawa Y. Components of DNA Damage Checkpoint Pathway Regulate UV Exposure-Dependent Alterations of Gene Expression of FHIT and WWOX at Chromosome Fragile Sites. *Mol Cancer Res.* 3:130-138, 2005.
- 3) Vecchione A, Baldassarre G, Ishii H, Nicoloso MS, Belletti B, Petrocca F, Zanesi N, Fong LY, Battista S, Guarnieri D, Baffa R, Alder H, Farber JL, Donovan PJ, Croce CM. Fez1/Lzts1 Absence Impairs Cdk1/Cdc25C Interaction during Mitosis and Predisposes Mice to Cancer Development. *Cancer Cell.* 2007 Mar 13;11(3):275-289.
- 4) F. Petrocca, R. Visone, M. Rapazzotti Onelli, Manisha Shah, M.S. Nicoloso, I. De Martino, D. Iliopoulos E. Pilozzi, C.G LIU, M. Negrini, L. Cavazzini, S. Volinia, H. Alder, L.P Ruco, G. Baldassarre, C.M. Croce, A. Vecchione. E2F1-regulated MicroRNAs impair TGFβ-dependent cell cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 13:272-286, 2008.

**(III) LE CELLULE NEOPLASTICHE PRIMITIVE E I MECCANISMI ANTI-APOPTOTICI:
LE BASI CELLULARI DELLA FARMACORESISTENZA TUMORALE****U.O. 05 – Responsabile Scientifico:****Ruggero De Maria, ISS****U.O. 06 – Responsabili scientifici:****Carlo Croce, Ohio University, Columbus,
USA/ Cesare Peschle, ISS****Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 05 - Prof. Ruggero De Maria, Dipartimento di
Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, ISS**

Questa linea di ricerca del programma oncotecnologico si è proposta di isolare e caratterizzare le cellule staminali neoplastiche (CSCs) presenti in una serie di tumori solidi, con l'obiettivo di studiare i meccanismi cellulari e molecolari alla base della farmaco resistenza delle neoplasie. L'inefficacia delle terapie antineoplastiche e la tendenza a recidivare mostrate dalla maggioranza dei tumori potrebbero infatti essere dovute alla resistenza della popolazione staminale verso i trattamenti chemioterapici convenzionali. Pertanto, le cellule staminali tumorali rappresentano il bersaglio elettivo per nuovi farmaci ad azione mirata ed offrono un vantaggio potenzialmente rivoluzionario nel trattamento del cancro in quanto la loro eliminazione potrebbe portare all'eradicazione del tumore.

Nella prima fase della ricerca, la nostra attenzione si è focalizzata sui tumori cerebrali come il glioblastoma (GBM). Uno dei primi studi ha riguardato la chemiosensibilità delle CSCs isolate da GBM e l'identificazione in tali cellule dei possibili meccanismi di chemioresistenza. Abbiamo dimostrato che le cellule staminali di GBM mostrano una marcata resistenza ad un'ampia gamma di chemioterapici comunemente utilizzati in terapia ed abbiamo escluso la possibilità che questo sia dovuto ad una ridotta concentrazione intracellulare dei farmaci, imputabile ad un ridotto *uptake* o a meccanismi di estrusione attiva degli agenti somministrati (1). Parallelamente e sulla base di uno studio ultimato nel corso del primo anno di attività (2) relativo ai meccanismi molecolari di resistenza all'apoptosi in cellule staminali neurali (NSCs) abbiamo valutato l'effetto dell'infiammazione su tali cellule. In particolare abbiamo valutato l'ipotesi che le NSCs siano in grado di indurre apoptosi nelle cellule immunitarie infiltranti, in particolare linfociti T e monociti, attraverso un fenomeno conosciuto come immunoprivilegio. E' emerso che le citochine infiammatorie non solo sono prive di tossicità nei confronti delle NSCs, ma possono perfino favorire l'eliminazione di cellule del sistema immunitario. Le citochine infiammatorie TNF- α , IL-1 β e IFN- γ promuovono l'espressione di diversi ligandi di morte sulle NSCs, in particolare di TRAIL e TLA1. In esperimenti di co-coltura, le NSCs pretrattate con citochine infiammatorie si sono dimostrate efficaci nell'indurre apoptosi di cellule monocitarie, innescando l'attivazione di una serie di recettori di morte. Questi risultati (3) hanno evidenziato in particolare il ruolo del TNF- α nella citotossicità mediata dalle NSCs. L'importanza del microambiente ed in particolare delle citochine infiammatorie per le NSCs è stata evidenziata da un altro studio, nel quale abbiamo dimostrato che la combinazione di TNF- α , IL-1 β e IFN- γ è in grado di influenzare il fenotipo di NSCs murine inducendone il differenziamento verso la linea astrocitaria (4).

In linea con l'importanza che il microambiente esercita sul processo di differenziamento dei progenitori neurali, abbiamo dimostrato che anche le cellule staminali di GBM esibiscono un potenziale di differenziamento mesenchimale in modo del tutto analogo alle cellule staminali della cresta neurale. In generale, la cellula che dá origine ai tumori del cervello rimane oggetto di dibattito sebbene diverse evidenze sperimentali suggeriscano che l'evento di trasformazione neoplastica riguardi cellule staminali o progenitori neurali. Lo studio condotto (5) evidenzia l'esistenza di due classi di CSCs in questo tipo di tumore sulla base del loro potenziale differenziativo. Sulla base dei risultati ottenuti è possibile ipotizzare che almeno un gruppo di GBM derivi da una cellula staminale della cresta neurale che in appropriate condizioni ambientali possa esprimere la propria multipotenzialità, mentre negli altri casi la

cellula di origine sarebbe una cellula precursore più differenziata e “committed” verso il differenziamento astrocitario.

Infine, uno dei risultati più interessanti sul GBM, che conferma l'importanza di focalizzare l'attenzione sulla popolazione di cellule staminali in questo tumore, deriva da uno studio prospettico condotto su pazienti affetti da GBM, volto ad esplorare le potenzialità prognostiche delle CSCs (6). Abbiamo valutato la correlazione tra il potenziale di crescita *in vitro* delle CSCs isolate da 44 pazienti e la progressione della malattia. E' stato anche valutato il valore prognostico del marcatore di membrana CD133 e dell'indice proliferativo delle CSCs (Ki67). I risultati di tale analisi hanno indicato chiaramente che la generazione *in vitro* di CSCs e la coespressione di CD133 e Ki67 in tali cellule rappresentano fattori prognostici indipendenti significativi, suggerendo non solo che l'analisi delle CSCs può predire la sopravvivenza dei pazienti con GBM ma confermando il peso che tale sottopopolazione ha nel determinare il decorso della malattia, anche in considerazione dell'intrinseca resistenza di tali cellule ai trattamenti convenzionali.

Oltre alle ricerche condotte sul glioblastoma come descritto, l'attività di ricerca di questa U.O. a partire dal secondo anno si è focalizzata sui due tumori cosiddetti “big killer” cioè tumore del colon e del polmone. La scelta di questi tumori è stata dettata sia da valutazioni riguardanti l'elevata incidenza nella popolazione e gli alti tassi di mortalità dei pazienti affetti, sia dalla disponibilità di un numero sufficiente di reperti chirurgici grazie all'esistenza di collaborazioni con reparti ospedalieri di chirurgia oncologica. Per ciascuno dei due tumori scelti, l'obiettivo primario è stato quello di identificare all'interno della massa tumorale la sottopopolazione cellulare con caratteristiche di staminalità e tumorigenicità in animali da esperimento.

L'utilizzo di un marcatore come il CD133 per isolare la popolazione tumorigenica del carcinoma del colon si è rivelato determinante per portare a termine la ricerca iniziata. La possibilità di separare le cellule tumorali sulla base dell'espressione di tale marker ha consentito infatti di dimostrare la capacità tumorigenica di tale sottopopolazione, che rappresenta circa il 2,5% di tutta la popolazione tumorale, mediante esperimenti *in vivo* su topi immunocompromessi (SCID). Le cellule CD133+ sono state inoculate sottocute e dopo un periodo di tempo compreso tra le 4 e le 8 settimane hanno dato origine a tumori istologicamente molto simili a quelli del paziente. Abbiamo dimostrato che una quantità minima pari a 3000 cellule CD133+ è in grado di generare un tumore in topi SCID in contrapposizione ad inoculi fino a 10^5 cellule CD133- o a 10^6 cellule tumorali non separate che non hanno dato origine a tumore nell'animale (7). Lo stesso marcatore si è dimostrato efficace per l'isolamento di una rara popolazione di cellule tumorigeniche con caratteristiche di staminalità anche in diversi sottotipi di tumore di polmone (SCC, AC, LCNEC e SCLC), che nessun altro gruppo di ricerca è riuscito ad isolare ad oggi. In modo analogo al carcinoma di colon, abbiamo determinato la quantità minima di cellule CD133+ in grado di generare un tumore fenotipicamente identico al tumore primario in topi SCID, che per tutti i tipi istologici in esame è pari a 10^4 cellule (8). I risultati di questi esperimenti sono riassunti nella Figura 1a per il tumore al colon e 1b per il carcinoma al polmone.

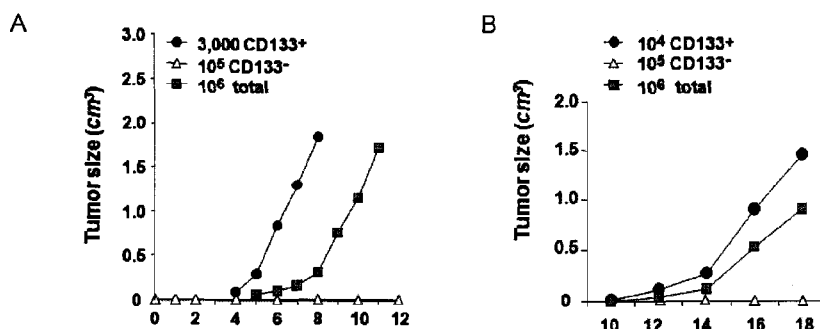


Figura 1. Analisi del potenziale tumorigenico delle cellule CD133+, CD133- e delle cellule tumorali totali ottenute a partire da campioni umani di (a) tumore del colon e (b) del polmone, in seguito ad inoculo sottocutaneo in topi immuno-compromessi. I dati riguardanti il volume dei tumori generati rappresentano la media di cinque esperimenti effettuati in triplicato.

L'analisi dei tumori generati nei modelli murini ha dimostrato che tali "xenograft" riproducono le caratteristiche istologiche dei rispettivi tumori umani di origine. Questi risultati mostrano quindi che sia nel tumore al colon che nel carcinoma al polmone, il potenziale tumorigenico è confinato alla sottopopolazione cellulare esprimente il CD133. Inoltre, il potenziale tumorigenico delle frazioni cellulari CD133+ viene mantenuto anche a seguito di trapianti in serie in modelli murini. In questi esperimenti i tumori generati hanno mantenuto la somiglianza fenotipica dei tumori umani di origine e l'aggressività di tali cellule aumenta con il numero dei trapianti.

Abbiamo inoltre messo a punto delle condizioni di coltura per espandere la popolazione cellulare tumorigenica isolata da tumori al colon e al polmone. Cellule ottenute in seguito alla dissociazione per via meccanica dei tumori umani sono state messe in coltura in presenza di un terreno privo di siero e contenente i fattori di crescita EGF e b-FGF. In queste condizioni, le cellule sono cresciute in maniera esponenziale dando origine ad aggregati cellulari sferoidali (tumorsfere), anch'esse esprimenti alti livelli del marker CD133. Queste sfere, trapiantate sottocute nei modelli murini SCID, sono in grado di originare tumori fenotipicamente simili al tumore umano di origine. Gli studi *in vivo* hanno quindi confermato il potenziale tumorigenico delle sfere, che riescono a riprodurre il tumore parentale anche dopo essere state mantenute in coltura per più di un anno come cellule indifferenziate.

I modelli animali ottenuti rappresentano il "gold standard" tra i modelli tumorali disponibili per studi preclinici di farmaci antitumorali. Tali modelli sono stati potenziati grazie alla trasduzione delle cellule staminali tumorali con vettori lentivirali codificanti per proteine reporter fluorescenti (es. GFP, RFP) e/o luminescenti (luciferasi) che permettono di tracciare le cellule in vivo mediante un opportuno sistema strumentale di *imaging* (IVIS 100, Xenogen). Grazie a tale manipolazione è possibile pertanto visualizzare nell'animale (senza sacrificarlo) sia la massa tumorale che si forma nella sede di inoculo che eventuali formazioni metastatiche. La Fig. 2 mostra un esempio dell'applicazione di tale tecnica di *imaging in vivo*. Questi modelli animali sono stati ottenuti anche per gli altri tipi di tumore per i quali il nostro laboratorio ha disponibilità di CSCs.

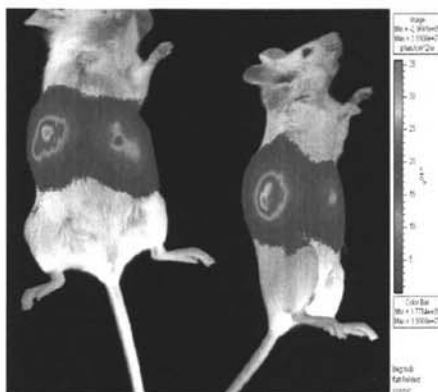


Figura 2. Cellule staminali tumorali di colon, trasdotte con vettori virali codificanti per la Green Fluorescent Protein (GFP) e la luciferasi, sono state inoculate nella milza dell'animale e dopo 4 settimane circa hanno dato origine a metastasi in sede epatica. Mediante un sistema di *imaging in vivo* è stato possibile monitorare la crescita tumorale.

Uno degli obiettivi principali del progetto consisteva nell'analisi delle vie di trasduzione del segnale coinvolte nella morte cellulare effettuato sulle cellule primitive neoplastiche. Rispetto a questo obiettivo, le nuove tecnologie *high throughput* (ad alta processività) rappresentano una risorsa fondamentale per il riconoscimento di pathways aberranti nelle neoplasie e per la conseguente individuazione di terapie molecolari innovative basate sull'uso di inibitori specifici. In particolare, le analisi di fosfoproteomica effettuate tramite Reverse Phase Array (in cui i campioni sono immobilizzati su un supporto inerte e saggiate con centinaia di diversi anticorpi diretti contro proteine fosforilate) ci hanno permesso di ottenere rilevanti informazioni sull'andamento dei flussi di segnali intracellulari e di

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.

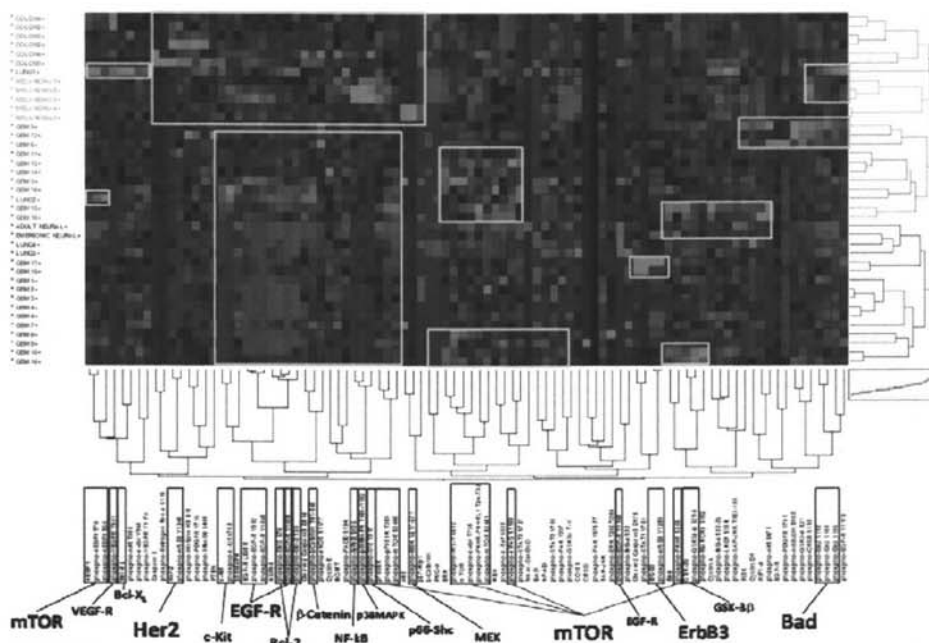


Figura 3. "Heat map" ottenuta sulla base degli esperimenti di Reverse Phase Array su CSCs di diversi tipi tumorali. I riquadri in giallo indicano specifiche "pathway signatures".

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, 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.

Pubblicazioni

- 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

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

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

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 δ , 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.

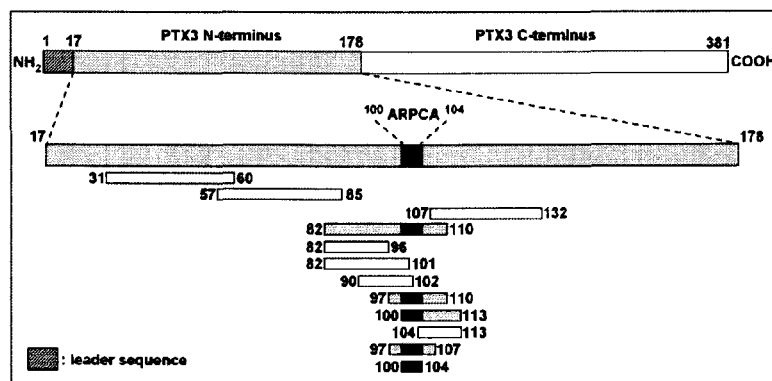
Obiettivo 3: Creazione di nuovi strumenti farmacologici per inibire i meccanismi angiogenetici

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

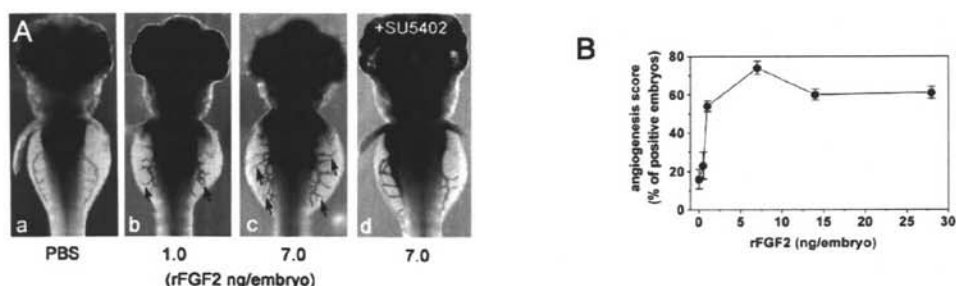
e biologici. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la regione amino terminale di PTX3 (NH₂-PTX3) è quella candidata al ruolo di *FGF2-binding domain*. In questa stessa porzione, grazie all'utilizzo della "risonanza plasmonica di superficie" (BIAcore®), è stata identificata una zona di 29 aa (dall'aa 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 NH₂ 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 poterle 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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. α v β 3 Integrin-dependent antiangiogenic activity of resveratrol stereoisomers. *Mol Cancer Ther*, 7: 3761-3770, 2008.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sozzani S, Rusnati M, Riboldi E, Mitola S, Presta M. Dendritic cell-endothelial cell cross-talk in angiogenesis. *Trends Immunol*, 28: 385-392, 2007.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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

vitro anche in assenza dell'integrina $\alpha_v\beta_3$, in quanto è possibile ottenere concentrazioni assolute di MMP-2 attiva e pre-MMP-2 in grado di fare procedere la reazione con cinetiche misurabili (Stetler-Stevenson et al., J Biol Chem 1989; Crabbe et al., Eur J Biochem 1993). Per chiarire se indinavir e saquinavir interferiscano con lo step di attivazione autoproteolitica di MMP-2, l'enzima purificato o presente nei supernatanti di cellule HT1080 (Toschi et al., Mol Biol Cell 2001) è stato incubato con il dominio catalitico di MT1-MMP o con p-APMA, una molecola che, come MT1-MMT, è in grado di convertire pro-MMP-2 nella forma pre-attiva (Stetler-Stevenson et al., J Biol Chem 1989; Crabbe et al., Eur J Biochem 1993; Atkinson SJ et al., J Biol Chem 1995; Will H et al., J Biol Chem 1996). La pre-MMP-2 così generata viene convertita nella forma completamente attiva da molecole di MMP-2 attiva presenti nelle preparazioni enzimatiche purificate o nei supernatanti (Stetler-Stevenson et al., J Biol Chem 1989; Crabbe et al., Eur J Biochem 1993; Atkinson SJ et al., J Biol Chem 1995; Will H et al., J Biol Chem 1996). I risultati di questi esperimenti hanno indicato che MMP-2 latente viene convertita nella forma attiva nell'arco di 15 ore. Tuttavia, indinavir o saquinavir (10 μ M) non hanno determinato alcuna alterazione nella reazione attivazione di MMP-2. Questi dati indicano che indinavir e saquinavir non intervengono direttamente nel processo di attivazione proteolitica di MMP-2, ed hanno perciò suggerito che indinavir e saquinavir interferiscano con il legame di pre-MMP2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$. Allo scopo di verificare questa ipotesi, è stato studiato l'effetto di preparazioni purificate di $\alpha_v\beta_3$ sull'attivazione autoproteolitica di MMP-2. Questi esperimenti hanno mostrato che $\alpha_v\beta_3$ inibisce la reazione di attivazione di MMP-2, poiché il legame di pre-MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$ in vitro crea un impedimento sterico che protegge pre-MMP-2 dall'azione di MMP-2. Quando indinavir o saquinavir sono stati aggiunti alle miscele di reazione non è stato evidenziato alcun effetto sulla cinetica di proteolisi, indicando che gli HIV-PI non interferiscono direttamente con il legame di pre-MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$. Sono attualmente in corso esperimenti volti a validare questi risultati in un sistema sperimentale in cui l'integrina $\alpha_v\beta_3$ viene adsorbita a supporti solidi per valutare gli effetti degli HIV-PI sul legame tra pre-MMP-2 e l'integrina immobilizzata (Deryugina et al., Exp cell Res, 2001).

Le prime fasi della neoangiogenesi sono mediate dalla degradazione della membrana basale, e dalla sua sostituzione con una "matrice provvisoria" a cui aderiscono le cellule endoteliali che sono divenute polarizzate e che cominciano a migrare. Abbiamo perciò studiato gli effetti di indinavir e saquinavir sull'adesione di cellule HUVEC seminate su substrati della lamina basale e della matrice provvisoria. Questi esperimenti hanno indicato che l'adesione di cellule HUVE a laminina e perlecano, due substrati della membrana basale che agiscono da ligandi di $\alpha_v\beta_3$, è fortemente inibita in presenza di saquinavir, mentre questo effetto è abolito se le cellule sono mantenute in presenza di ioni manganese, un forte attivatore delle integrine di membrana. Al contrario, indinavir aumenta significativamente l'adesione al perlecano ed al fibrinogeno e alla protrombina, due componenti fondamentali della matrice provvisoria che agiscono da ligandi di $\alpha_v\beta_3$, ed anche questo effetto è abolito in presenza di ioni manganese. Questi esperimenti hanno dimostrato che indinavir e saquinavir agiscono interferendo con il legame delle integrine a molecole della matrice extracellulare. Ulteriori studi sono stati effettuati per valutare gli effetti degli HIV-PI sullo "spreading" delle cellule piastrate su substrati della matrice extracellulare, un processo tramite il quale le cellule creano progressivi contatti con la matrice. Questo processo è dipendente dalla rilocalizzazione di integrine ad alta affinità e di MMPs nei lamellipodi e negli invadopodi. Questi esperimenti hanno mostrato che saquinavir inibisce significativamente lo spreading di cellule endoteliali su tutti i substrati, mentre indinavir inibisce lo spreading su protrombina, fibrinogeno e laminina. Perciò i dati ottenuti fino ad ora indicano che gli HIV-PI esercitano le proprie azioni anti-angiogeniche e anti-invasive interferendo con il legame di integrine ai substrati, particolarmente ai ligandi di $\alpha_v\beta_3$, e con l'attivazione e/o rilocalizzazione di integrine nei lamellipodi e negli invadopodi. Questi processi mediano non solo la migrazione cellulare ma anche l'attivazione autoproteolitica di MMP-2.

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

Studi recenti hanno indicato che il ritonavir ed il saquinavir utilizzati a dosi elevate, simili o superiori ai livelli plasmatici di picco misurabili nei pazienti trattati con questi farmaci ("livelli terapeutici di picco"),

sono in grado di modulare l'attività del proteasoma (Andrè et al Proc Natl Acad Sci 1998; Tovo AIDS 2000; Piccinini et al AIDS 2001; Pati et al., Blood 2002, Gaedicke et al. Cancer Res 2002). Il proteasoma controlla molteplici pathway cellulari, tra i quali il turnover delle proteine, l'eliminazione di proteine aberranti, l'apoptosi, la degradazione dei prodotti di geni oncosoppressori, l'emivita e l'attività di proteine che regolano il ciclo cellulare, e la maturazione proteolitica e l'attivazione di NF- κ B. Al fine di indagare anche questo meccanismo d'azione, abbiamo analizzato gli effetti di concentrazioni di farmaco simili o superiori ai livelli terapeutiche di picco, sulla crescita, la sopravvivenza e la capacità invasiva in linee cellulari umane derivate da carcinomi del polmone, della mammella, del colon e del fegato, tumori che hanno elevata incidenza e prevalenza nella popolazione umana. I risultati ottenuti negli esperimenti di crescita hanno dimostrato che l'indinavir, qualsiasi fosse la dose utilizzata, non ha indotto alcun effetto sulla crescita basale delle linee testate; al contrario, alte dosi di saquinavir promuovono un blocco della crescita e della sopravvivenza cellulare di tutte le linee tumorali. Nei saggi di invasione, effettuati utilizzando le camere di Boyden, abbiamo rilevato che entrambi i farmaci, già a dosi simili alle concentrazioni di valle rilevate nei pazienti trattati, sono in grado di bloccare l'invasione di tutte le linee neoplastiche. Al fine di analizzare più approfonditamente gli effetti delle dei farmaci sull'attività del proteasoma abbiamo quindi studiato se il trattamento con indinavir e saquinavir sia in grado di indurre l'accumulo di I κ B α e di p21, la cui degradazione è noto essere mediata dal proteasoma. I risultati ottenuti hanno dimostrato che elevate concentrazioni di saquinavir, ma non di indinavir, bloccano la degradazione di I κ B α indotta da TNF α ed inducono un accumulo di p21 nelle cellule tumorali di mammella, fegato e polmone, in modo simile all'epoxomicina, noto inibitore dell'attività proteasomica (Toschi et al, submitted). Questi risultati indicano che concentrazioni di indinavir e saquinavir simili a quelle presenti nel plasma di pazienti possono indurre inibizione della crescita tumorale grazie alla loro capacità di bloccare l'angiogenesi e l'attività delle metalloproteasi della matrice, come dimostrato anche dai dati ottenuti negli esperimenti in vivo (vedi Progetto 5). Inoltre, questi dati indicano che concentrazioni di saquinavir simili o superiori ai livelli plasmatici di picco possono interferire con l'attività del proteasoma. Questi dati suggeriscono il testing di analoghi del saquinavir in modelli preclinici per identificare farmaci dotati di migliore indice terapeutico e sviluppare terapie più efficaci in grado di combinare le azioni anti-angiogeniche e anti-proliferative degli HIV-PI.

Dati recenti hanno indicato che il rischio di ricorrenza dopo ablazione chirurgica per la neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) in pazienti donne HIV-infette è consistentemente diminuito in seguito all'introduzione della terapia antiretrovirale combinata (HAART). Il rischio di progressione del CIN a carcinoma invasivo della cervice è altamente accresciuto dall'infezione della mucosa genitale da parte di human papilloma virus (HPV) di tipologie oncogene. Questi virus sono in grado di alterare il ciclo cellulare delle cellule epiteliali e la loro differenziazione inibendo o attivando l'espressione di p53, Rb o p21 ed il loro turn-over mediante il proteasoma. Studi recenti hanno inoltre indicato che inibitori dell'angiogenesi e delle MMP sono in grado di bloccare o ridurre la progressione di CIN in modelli murini transgenici di CIN in cui le lesioni vengono indotte, tramite somministrazione di estrogeni, grazie all'espressione delle proteine E6 ed E7 (topi CIN K14-HPV16/E2) (Girando et al JCI 2004). Alla luce di questi dati si è deciso di ampliare l'analisi degli effetti di indinavir e saquinavir verificando la loro attività anti-tumorale e antiangiogenica tramite studi volti a valutare il loro effetto a) sulla proliferazione, invasione ed espressione di MMPs in linee cellulari derivate da tumori della cervice contenenti il virus (HPV-16, -18) in forma integrata (Progetto 3); b) sul mantenimento e l'espressione del genoma di HPV in linee cellulari contenenti il menoma virale in forma epitomale (HPV-16, HPV-18, HPV-31) (Progetto 3); e c) sullo sviluppo, la regressione e la progressione del CIN nel modello murino transgenico (Progetto 5).

In collaborazione con il Prof. Giovanni Barillari (Università "Tor Vergata") sono stati condotti esperimenti di proliferazione ed invasione su linee cellulari di carcinoma della cervice (CaSki ed HeLa, contenenti rispettivamente sequenze di HPV-16 e HPV-18) coltivate in presenza di indinavir e saquinavir fino a 96 ore alla dose di 10 μ M. I risultati ottenuti sulle cellule HeLa hanno indicato che sia indinavir che saquinavir non hanno effetti sulla proliferazione delle cellule tumorali, mentre inibiscono in modo tempo-dipendente la loro capacità invasiva. Per quanto riguarda le cellule CaSki, nessuno dei 2 farmaci ha

effetti sulla proliferazione cellulare, mentre il solo saquinavir ha una debole attività anti invasiva. Al fine di studiare il meccanismo dell'attività anti-invasiva di questi HIV-PI è stata analizzata l'espressione di MMP-2 ed MMP-9 mediante RT-PCR in cellule CaSki ed HeLa trattate indinavir o saquinavir (10µM). I risultati ottenuti indicano che indinavir e saquinavir sono in grado di ridurre l'espressione di MMP-2 rispettivamente del 25% e del 50% in cellule HeLa, mentre nelle cellule CaSki si è rilevata una riduzione di MMP-2 (25%) solo in seguito al trattamento con saquinavir. Ulteriori esperimenti sono attualmente in corso con un clone cellulare ottenuto da una lesione umana di CIN2 in cui il ceppo oncogeno HPV-31 è in forma episomale.

Al fine di comprendere gli effetti degli HIV-PI sul mantenimento delle forme episomali del virus, le cellule CIN 2 contenenti HPV-31 sono state inizialmente coltivate in un terreno commerciale (KG-media – Lonza, Walkersville, MD, USA), ed in parallelo, in presenza di fibroblasti "feeder" con un terreno precedentemente messo a punto e ricco di fattori di crescita (E-media). Le cellule coltivate con il medium commerciale sono andate in maggioranza incontro a morte portando però alla selezione di una sotto-popolazione di cellule caratterizzate da integrazione di DNA virale. Questi dati confermano la selezione/espansione di cloni con integrazioni virali preesistenti ed escludono il verificarsi di successive integrazioni random come descritto per HPV-16 (Pett MR et al PNAS, 2006). Questi dati indicano che questo modello può essere utilizzato per studiare gli effetti degli HIV-PI sul mantenimento delle forme virali episomali, l'integrazione del DNA e la trasformazione cellulare virus-mediata.

Attualmente sono in allestimento esperimenti su cellule CIN2 coltivate con i due tipi di terreno in presenza o meno di fibroblasti "feeder" e di HIV-PI. Si stanno inoltre predisponendo culture organotipiche di cellule CIN sulle quali verificare l'efficacia degli HIV-PI.

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

L'angiogenesi, l'invasione delle cellule tumorali e l'attivazione di MMP-2 sono necessarie per la crescita di tutti i tumori. I dati ottenuti recentemente dal nostro laboratorio sull'attività anti-angiogenica ed anti-tumorale degli HIV-PI indicano che questi farmaci potrebbero essere usati per la terapia di tumori con elevata incidenza e prevalenza nella popolazione umana.

Abbiamo perciò valutato l'azione degli HIV-PI sulla crescita di tumori indotti in topi nudi inoculando linee cellulari umane derivate da carcinoma del polmone, della mammella, del colon e del fegato. La somministrazione mediante gavage intragastrico di indinavir o saquinavir, a dosi paragonabili a quelle utilizzate in pazienti infettati da HIV (Deeks et al JAMA 1997; Sgadari et al Nat Med. 2002), ha inibito significativamente la crescita di questi tumori ($p < 0.01$). Abbiamo quindi studiato il meccanismo di inibizione della crescita tumorale mediante valutazione della densità microvascolare, di marcatori della proliferazione cellulare e del ciclo cellulare, e dell'attività metalloproteasica nei tumori indotti sperimentalmente nei topi inoculati con le linee tumorali. Il trattamento con entrambi gli HIV-PI ha significativamente inibito l'angiogenesi tumorale, come dimostrato da una significativa riduzione della densità microvascolare osservata in tutti i tumori analizzati. Mediante esperimenti di zimografia in situ effettuati in parallelo ad analisi immunostochimiche, abbiamo inoltre dimostrato che sia indinavir che saquinavir inibiscono fortemente l'attività enzimatica di MMP-2. D'altra parte non abbiamo rilevato alcun effetto significativo sulla crescita tumorale o sull'apoptosi (Toschi et al, *submitted*). Questi esperimenti indicano che concentrazioni di indinavir e saquinavir simili a quelle presenti stabilmente nel plasma di pazienti inducono inibizione della crescita tumorale in vivo grazie alla loro capacità di bloccare l'angiogenesi e l'attività metalloproteasica.

Per verificare il potenziale anti-tumorale ed anti-angiogenico degli HIV-PI nel bloccare la progressione di lesioni CIN-2/3 o la loro insorgenza sono stati condotti esperimenti nel modello murino di CIN K14-HPV16/E2 in collaborazione con il Dr Enrico Giraudo (Università di Torino). Gli animali (12 per gruppo) sono stati trattati con dosi di saquinavir o indinavir simili (1X) o superiori (3X) a quelle utilizzate in soggetti HIV⁺ (35mg/Kg/day per indinavir, e 25.5 mg/Kg/day per il saquinavir). Entrambi i farmaci sono stati somministrati tramite gavage intragastrico una volta al giorno per 6 settimane. I trattamenti con indinavir 1X e 3X sono stati ben tollerati dagli animali, mentre il saquinavir 3X ha dato evidenti segni di tossicità. I risultati ottenuti indicano che sia il saquinavir che l'indinavir sono in grado di ridurre sia lo

sviluppo che la progressione tumorale. L'analisi in immunofluorescenza effettuata con un marcatore selettivo per le cellule endoteliali (Meca32) dei tessuti provenienti dagli animali trattati ha evidenziato che sia indinavir che saquinavir sono in grado di ridurre la densità vascolare e l'angiogenesi tumorale. In particolare, indinavir, alle dosi 1X e 3X, hanno ridotto la densità vascolare rispettivamente del 35% e del 53%, mentre saquinavir (dose 1X) ha indotto una riduzione del 44%. L'analisi degli effetti pro-apoptotici degli HIV-PI è stata fatta sui tessuti murini utilizzando un anticorpo capace di riconoscere specificamente la forma attivata della caspasi-3. I risultati ottenuti hanno evidenziato che indinavir alla dose 1X aumenta di 1.7 volte l'indice apoptotico, mentre alla dose 3X determina un aumento di 2.9 volte rispetto al controllo. Il trattamento con saquinavir 1X induce un aumento dell'indice apoptotico di 2.2 volte. In parallelo, le indagini sulla proliferazione cellulare, effettuate utilizzando un anticorpo anti-Ki-67, hanno mostrato che i farmaci mantengono pressoché invariati gli indici tumorali di proliferazione. Questi dati, nel loro insieme, indicano che gli HIV-PI hanno un'attività antitumorale e pro-apoptotica nel modello murino di CIN indotto da HPV. Successive indagini accerteranno se gli HIV-PI possano interferire anche con l'espressione di p16 e l'espressione e l'attivazione di MMPs e VEGF. Accanto al trattamento con indinavir e saquinavir, verrà utilizzato anche ritonavir quale booster.

I dati ottenuti nell'ambito di questi studi forniranno, attraverso la dimostrazione dell'efficacia in appropriati studi clinici, l'opportunità di sviluppare nuove strategie terapeutiche per la cura di forme tumorali frequenti in pazienti infettati o meno da HIV-1. L'utilizzo di questi farmaci caratterizzati da bassa tossicità e costo moderato, da soli od in combinazione con chemioterapici, potrebbe significativamente migliorare il trattamento dei pazienti e la loro qualità di vita.

Publicazioni

- 1) Monini P, Sgadari C, Toschi E, Barillari G, Ensoli B. Antitumor effects of antiretroviral activity. *Nat. Rev. Cancer*, 4:861-875, 2004.
- 2) Monini P, Toschi E, Sgadari C, Bacigalupo I, Palladino C, Carlei D, Barillari G, Ensoli B. The use of HAART for biological tumour therapy. *J. HIV Ther*, 11:53-56, 2006.
- 3) Monini P, Sgadari C, Grosso MG, Bellino S, Di Biagio A, Toschi E, Bacigalupo I, Sabbatucci M, Cencioni G, Salvi E, Leone P, Barillari G, Gatti G, Caratelli L, Ensoli B. and the Concerted Action on Kaposi's Sarcoma. Clinical course of classic Kaposi's sarcoma in HIV-negative patients treated with the HIV protease inhibitor indinavir. *AIDS*, 2009 Feb 20;23(4):534-8.
- 4) Toschi E, Sgadari C, Malavasi L, Bacigalupo I, Chiozzini C, Carnei D, Compagnoni D, Bellino S, Falchi M, Palladino C, Leone P, Barillari G, Ensoli B, Monini P. Human immunodeficiency virus protease inhibitors are effective against highly prevalent human tumors via a proteasome-independent block of angiogenesis and matrix metalloproteases. (sottomesso per la pubblicazione a *Int J Cancer*).

Publicazioni correlate all'argomento

- 1) Sgadari C, Barillari G, Toschi E, Carlei D, Bacigalupo I, Baccarini S, Palladino C, Leone P, Bugarini R, Malavasi L, Cafaro A, Falchi M, Valdembri D, Rezza G, Bussolino F, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi's sarcoma. *Nat. Med.*, 8:225-232, 2002.
- 2) Ensoli B. HIV protease inhibitors have specific anti-cancer effects. *Biomed. & Pharmacother.*, Vol. 56, No. 8, 2002.
- 3) Sirianni MC, Vincenti L, Topino S, Giovanetti A, Mazzetta F, Libi F, Scaramuzzi D, Andreoni M, Pinter E, Baccarini S, Rezza R, Monini P, Ensoli B. NK cell activity controls human herpesvirus 8 latent infection and is restored upon HAART in AIDS patients with regressing Kaposi's sarcoma. *Eur. J. Immunol.*, 32:2711-2720, 2002.
- 4) Toschi E, Sgadari C, Monini P, Barillari G, Bacigalupo I, Palladino C, Baccarini S, Carlei D, Grosso G, Sirianni MC, Ensoli B. Treatment of Kaposi's Sarcoma, an update. *Anti-Cancer Drugs*, 13:977-987, 2002.
- 5) Monini P, Sirianni MC, Ensoli B. Concomitant clearance of human herpesvirus 8 from blood and regression of leukopenia-associated aggressive classic Kaposi's sarcoma upon α -interferon

- therapy. *Oncol. Rev. J.*, issue 4, pp.18-20, 2002.
- 6) Sgadari C, Monini P, Toschi E, Baccarini S, Grosso MG, Moracci G, Malavasi L, Ensoli B. HIV Protease Inhibitors inhibit Kaposi's sarcoma by blocking angiogenesis and tumour cell invasion. *Haematologica*, (Meeting Supplement 1 to n. 11) 87:37-41, 2002.
 - 7) Monini P, Sgadari C, Barillari G, Ensoli B. The HIV protease inhibitors: anti-retroviral agents with anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-tumor activity. *J. Antimicrobial Chemother.*, 51:207-211, 2003.
 - 8) Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Monini P. The Fibroblast Growth Factors. In: *The Cytokine Handbook* (IV Edition, Chapter 31, Thomson A. and Lotze M. Eds.), Vol. II, pp.747-781, 2003.
 - 9) Barillari G, Sgadari C, Toschi E, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors as new treatment options for Kaposi's sarcoma. *Drug Res. Update*, 6:173-181, 2003.
 - 10) Sgadari C, Monini P, Barillari G, Ensoli B. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. *Lancet Oncol.*, 4:537-547, 2003.
 - 11) Alessandri G, Fiorentini S, Licenziati S, Bonafede M, Monini P, Ensoli B, Caruso A. CD8(+)CD28(-) T lymphocytes from HIV-1-infected patients secrete factors that induce endothelial cell proliferation and acquisition of Kaposi's sarcoma cell features. *J. Interferon Cytokine Res.*, 23:523-531, 2003.
 - 12) Sirianni MC, Libi F, Campagna M, Scaramuzzi D, Monini P, Ensoli B. Role of killer inhibitory receptors in human herpesvirus type 8 infection and KS development. In Monduzzi Eds., *International Proceedings Division, 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal (Canada), July 18 – July 23, 2004*, pp. 257-259.
 - 13) Sirianni M.C., Libi F., Campagna M., Rossi D., Capello D., Sciaranghella G., Carbone A., Simonelli C., Monini P., Gaidano G., and Ensoli B. Down-regulation of the major histocompatibility complex class I molecules by human herpesvirus type 8 and impaired natural killer cell activity in primary effusion lymphoma development. *Br. J. Haematol.*, 130:92-95, 2005.
 - 14) Garrafa E, Alessandri G, Benetti A, Turetta D, Corradi A, Cantoni AM, Cervi E, Bonardelli S, Parati E, Giulini SM, Ensoli B, Caruso A. Isolation and characterization of lymphatic microvascular endothelial cells from human tonsils. *J. Cell. Physiol.*, 207:107-113, 2006.
 - 15) Sgadari C, Toschi E, Bacigalupo I, Sabbatucci M, Palladino C, Carlei D, Barillari G, Ensoli B. Patogenesi del Sarcoma di Kaposi. In: *Tumori ed Infezioni da HIV. Patogenesi e studi clinici del GICAT (Italian)*. Milano: Biomedica, pp. 15-26, 2006.
 - 16) Simonelli C, Talamini R, Bearz A, Berretta M, Spazzapan S, Monini P, Sgadari C, Sartor I, Ensoli B, Tirelli U. Interleukin-2 continuous infusion and angiogenesis surrogate markers in metastatic renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.*, 17:1335-1336, 2006.

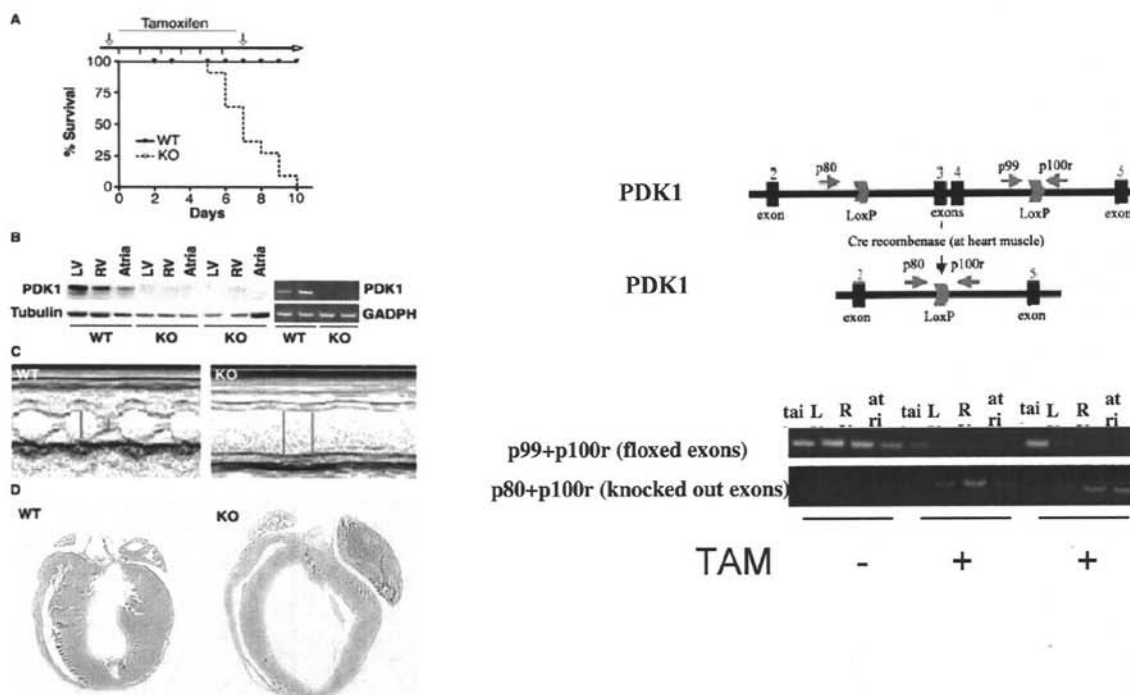
Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 09 – Prof. Gianluigi Condorelli, Parco Scientifico San Raffaele, Roma

Nei primi due anni di attività lo scopo delle nostre ricerche è stato quello di creare modelli di animali geneticamente modificati per il pathway a monte o valle di Akt. Per schematizzare i risultati sin qui ottenuti, presentiamo il seguente schema:

Gene	Costrutto	Cellule ES	Chimere	Topo	Ricombinazione cardiaca
PDK-1				si	Si
AKT-2	Si	si	si	no	
4E-BP1				si	No
CAMK 2delta	Si	si	si	si	Si
CAMK2delta nuc	Si	si	si	si	Si
mTOR	Si	si	si	si	No
mTOR KI-TAG	Si	si	si	si	In corso

Tabella 1: risultati dei transgenici nei primi due anni di attività.

I topi PDK-1 e 4E-BP1 sono stati ottenuti rispettivamente dai laboratori di Dario R. Alessi, University of Dundee, United Kingdom e Nahum Sonenberg, McGill University, Montreal, Canada. Il topo PDK-1 è stato modificato nel nostro laboratorio in modo da rendere tessuto-specifica ed inducibile la ricombinazione. Pertanto, un topo contenente un allele PDK-1 costitutivamente distrutto e l'altro "floxo" è stato incrociato con un topo in cui l'enzima CRE fuso ad un recettore degli estrogeni modificato (ER) in modo da renderlo sensibile ed attivabile al tamoxifene e sotto espressione guidata



dal promotore della miosina alfa cardiaca. Il risultato di queste ricombinazioni è riportato nella figura 1.

Figura 1. Scompenso cardiaco causato dall'assenza di PDK-1

Nella figura 1 si osserva come l'assenza di PDK-1 nel cuore determina uno scompenso cardiaco acuto in quanto nel corso di pochi giorni si registra una dilatazione cardiaca con riduzione marcatissima della contrattilità miocardica, a dimostrazione del ruolo fondamentale giocato dal pathway di Akt nel modulare la funzionalità cardiaca.

Per quanto concerne invece i topi Akt-2, l'interesse del nostro gruppo su questa molecola nasce dall'evidenza che v'è un'alta espressione di questo gene nell'endotelio. Questo progetto però è al momento fermo allo stadio di chimere, ovvero l'animale contenente chimere Akt-2 lox non ha prodotto eterozigoti con l'allele loxato. Speriamo che nei prossimi mesi ciò avvenga poiché il modello sarebbe estremamente importante per studi oncologici, oltre che cardiologici.

Il topo 4E-BP1 invece è stato ottenuto dal laboratorio del Professor Nahum Sonenberg, un leader nel campo del controllo della translazione, ovvero della sintesi proteica a partire dall'mRNA. La proteina 4E-BP1 si lega ad un iniziatore della translazione e riduce l'efficienza di questo fenomeno. Questo topo non è stato fatto con la tecnologia CRE-LOX ma è costitutivo. Abbiamo ottenuto importanti dati preliminari con questo topo sia per quanto riguarda la proliferazione delle cellule delle arterie sia per quanto riguarda la comprensione del ruolo della traslazione nello scompenso cardiaco e sono oggetto di lavori sottomessi a giudizio editoriale in questo momento.

I topi CAMK2delta sono stati generati in quanto volevamo chiarire il ruolo di CAMK a seguito di effetti biologici che sono successivi all'attivazione di Akt non solo nei cardiomiociti ma anche in altri tipi cellulari. I risultati del KO purtroppo sono stati un po' deludenti in quanto eliminando il gene

CAMK2delta evidentemente aumentano altre isoforme di CAMK che riverberano l'effetto biologico di CAMK 2delta, come indicato nella figura 2.

In modo simile al topo CAMK2delta, abbiamo generato un topo in cui la localizzazione nucleare di CAMK2 avrebbe dovuto essere eliminata attraverso il knockout di un esone che specifica per il segnale di localizzazione nucleare. I dati che abbiamo ottenuto dimostrano che siamo riusciti a distruggere l'esone contenente il segnale di localizzazione nucleare, ma che vi sono altre forme di CAMK nucleari che by-passano questo effetto.

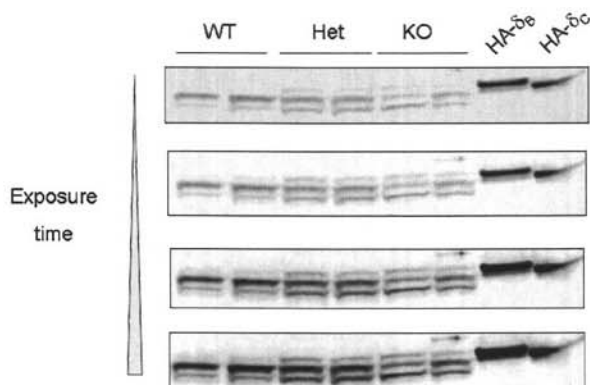


Figura 2. Creazione di topi KO per CAMK2Delta

Infine, abbiamo generato topi knockin e knockout per il gene mTOR. Nel primo caso, abbiamo modificato il gene in modo da rendere il suo prodotto fuso con il gene GFP e quindi da localizzarlo anche in microscopia vitale ed in vivo nell'animale in toto. Oltre al GFP, v'è un ulteriore peptide che serve ad identificare il gene modificato attraverso tecniche d'immunoprecipitazione e di Western blotting. Lo schema del costrutto utilizzato e l'espressione di questo transgene sono riportati nella figura 3. mTOR è un gene fondamentale per una serie di funzioni cellulari, tra cui la sintesi proteica, il metabolismo cellulare degli acidi grassi e delle proteine, l'angiogenesi, la crescita cellulare. Questa molecola però è difficilmente studiabile perché è grande circa 350.000 kd e forma complessi molecolari anche superiori al milione di kd. Pertanto, è necessario un approccio alternativo a quello classico che consenta di studiare le proteine che in differenti fasi della crescita cellulare si legano ad mTOR modificandone la funzione. Il knockin dovrebbe consentire di studiare questo prodotto genico in modo "naturale", non con modelli di overespressione, che spesso sono forieri di artefatti.

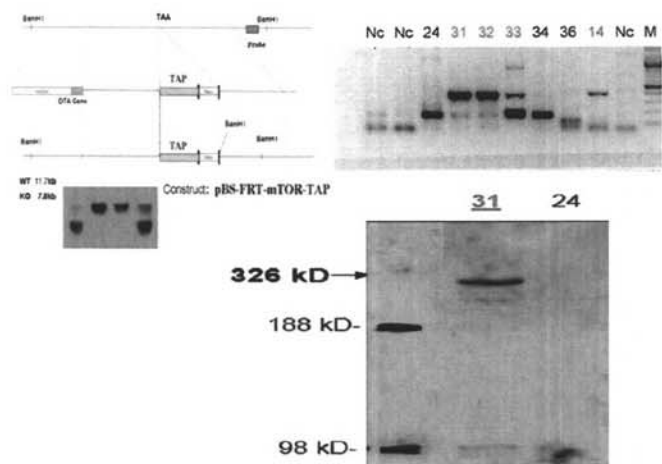


Figura 3. Generazione del topo knockin TAP-TAG mTOR.

Un ultimo ulteriore modello è rappresentato dal topo knockout di mTOR. Per necessità, siamo stati costretti a disegnare un topo knockout con tecniche di ricombinazione omologa CRE-LOX in quanto mTOR è essenziale per la sopravvivenza cellulare e quindi la ricombinazione omologa classica darebbe fenotipi non compatibili con la sopravvivenza. Pertanto, stiamo seguendo lo stesso protocollo che abbiamo utilizzato per PDK-1.

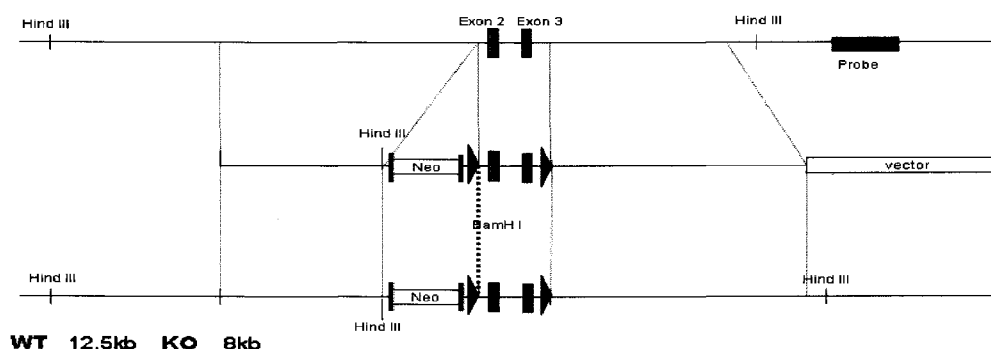


Figura 4. Mappa del targeting vector floxato per la generazione del topo mTOR knockout.

Nel corso del terzo anno abbiamo caratterizzato estensivamente tre modelli di animale transgenico, precedentemente descritti nel II anno: i topi PDK1 KO ed i topi mTOR KO, entrambi inducibili e tessuto specifico. Inoltre, in questi ed in altri modelli messi a punto negli scorsi anni, abbiamo eseguito una serie di esperimenti atti a determinare il ruolo dell'angiogenesi nelle patologie miocardiche.

TOPI PDK1 KO

I risultati di questa linea di ricerca, che è stata svolta con il modello descritto nella rendicontazione dell'anno precedente, hanno determinato la sorprendente scoperta che il signaling di AKT controlla la maturazione del canale tipo L del calcio (LTCC) sulla membrana cellulare attraverso la fosforilazione della subunità beta. L'assenza della molecola PDK1 nei cardiomiociti porta ad uno scompenso cardiaco nel giro di pochi giorni, con la morte che sovraggiunge nell'arco di una settimana. Il nostro studio si è concentrato però su un particolare fenomeno biologico, di seguito descritto.

Il pathway dell'insulina/IGF1/PDK1/AKT è stato suggerito migliorare l'inotropismo cardiaco ed aumentare l'handling del calcio attraverso gli effetti sulla proteina chinasi AKT. Nonostante ciò, il meccanismo molecolare è sconosciuto. Nel nostro studio abbiamo determinato che l'assenza di PDK1 porta ad una riduzione dell'attività di AKT, che a sua volta non fosforila più la subunità beta 2 dell'LTCC; questo comporta una dissociazione della b-2 dalla subunità alfa-1 (il canale vero e proprio), ed un'esposizione delle sequenze PEST (coinvolte nella degradazione delle proteine) dello stesso. Pertanto, la subunità a1 viene degradata dal sistema lisosomiale cellulare. Quando invece PKD-1/AKT sono attivi, la fosforilazione della subunità b-2 fa sì che questa diventi una proteina "chaperona" per il canale alfa-1, che va a completa maturazione sulla membrana cellulare. Questa è una nuova funzione del pathway di AKT, che pertanto non è solo coinvolto in effetti anti-apoptotici o angiogenetici ma anche di regolazione del calcio, elemento essenziale per l'accoppiamento eccitazione-contrazione e per la proliferazione cellulare.

TOPI mTOR KO

La nostra ricerca si è concentrata su questa molecola in quanto mTOR è una proteina d'interesse per il ruolo che gioca nella patogenesi dei tumori e per il possibile ruolo che la stessa gioca nella regolazione dell'omeostasi del cardiomiocita. Abbiamo studiato pertanto il ruolo di mTOR e del suo substrato 4E-BP1 generando topo knockout inducibili per mTOR e studiando topi 4E-BP1 knockout costitutivi; questi

modelli possono essere utilizzati anche per studi sulla proliferazione cellulare, visto il ruolo critico giocato da queste molecole in questo processo.

Il KO costitutivo di mTOR provoca mortalità durante la vita embrionale a causa di alterazioni della crescita cellulare nei compartimenti embrionali ed extra-embriionali subito dopo l'impianto degli embrioni. Al fine di bypassare questo problema, abbiamo sviluppato un topo mutante condizionale di mTOR in cui questo gene può essere deletato nei cardiomiociti in modo tessuto specifico e temporalmente regolato utilizzando dei topi mutanti che esprimono la ricombinasi Cre fusa con subunità del recettore degli estrogeni attivabile attraverso il tamoxifene, sotto il controllo del promotore della catena pesante alfa della miosina (α -MHC). Abbiamo pertanto generato un allele mTOR floxato omozigote; per arrivare ad ottenere una delezione cardiomiocita-specifica, abbiamo incrociato i topi con l'allele "floxed" mTOR condizionale con i topi α -MHC-MerCreMer al fine di ottenere i topi α -MHC-MerCreMer/mTOR^{flox/flox}.

Dopo una sostanziale quantità di lavoro e modificando più volte strategie, siamo stati in grado di ottenere un modello cardiaco specifico ed inducibile di mTOR KO.

Al momento stiamo caratterizzando la funzione cardiaca di questo modello, che stiamo studiando intensamente. Speriamo di chiarire il ruolo di mTOR nella regolazione di molti aspetti della biologia del cardiomiocita, che includono l'angiogenesi, l'apoptosi e la fibrosi.

Dopo aver indotto la perdita di mTOR con la ricombinasi Cre nel miocardio post-natale abbiamo determinato che questa induce scompenso cardiaco, non dopo 1 settimana, come precedentemente descritto per PDK1 quanto piuttosto dopo 4 settimane. Questo fenomeno era accompagnato soprattutto da autofagia ed apoptosi. I topi muoiono dopo sei settimane di somministrazione di tamoxifene.

I meccanismi alla base dello scompenso cardiaco da ridotta espressione di mTOR sono oggetto di ulteriori studi da parte del nostro gruppo. Va sottolineato che in questo grant abbiamo studiato due molecole bersaglio di farmaci antitumorali; ciò a sottolineare il dilemma della terapia anti-tumorale, che se da una parte distrugge le cellule tumorali, dall'altra ha un effetto dannoso sulle cellule cardiache, che può portare anche a scompenso cardiaco irreversibile. Abbiamo pertanto determinato che farmaci d'impiego nella terapia antitumorale possono avere ripercussioni molto negative sulla funzionalità cardiaca. La generazione di modelli animali in cui i geni bersaglio di questi farmaci è stata modificata consente di sperimentare trattamenti antitumorali meno tossici per le malattie cardiache.

Publicazioni

- 1) Elia L, Contu R, Quitavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, Cimino V, De Marinis L, Frustaci A, Catalucci D, Condorelli G. Reciprocal regulation of microRNA-1 and IGF-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. (sottomesso per la pubblicazione a Circulation)
- 2) Catalucci D, Ceci M, Latronico MVG, Young H, Gallo P, Santonastasi M, Bellacosa A, Brown JH, Condorelli G. (2009). Akt overexpression increases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling by direct phosphorylation of phospholamban at Thr-17. (sottomesso per la pubblicazione a J. Biol. Chem.)
- 3) Catalucci D, Zhang D-H, DeSantiago J, Picht E, Alessi DR, Dalton N, Peterson KL, Bers DM, Brown JM, Condorelli G. (2009). Akt controls cardiac inotropism through regulation of L-Type Calcium Channel assembly. The Journal of Cell Biology, 184:923-33.
- 4) Catalucci D, Gallo P, Condorelli G. (2009). MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease. Circulation Genetics. In corso di stampa.
- 5) Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. Nat Rev. Cardiol. (2009). 6(6):419-29.
- 6) Riccio G, Esposito G, Leoncini E, Contu R, Condorelli G, Chiariello M, Laccetti P, Hrelia S, D'Alessio G, De Lorenzo C. (2009): Cardiotoxic effects, or lack thereof, of anti-ErbB2 immunoagents FASEB J.;23(9):3171-8.
- 7) Latronico MV, Condorelli G. (2009). RNA silencing: small RNA-mediated posttranscriptional regulation of mRNA and the implications for heart electrophysiology. J Cardiovasc Electrophysiol. Feb;20(2):230-7.
- 8) Gallo P, Latronico MVG, Gallo P, Grimaldi S, Borgia F, Jones P, Gallinari P, De Francesco R, Ciliberto G, Steinkühler C, Esposito G, Condorelli G. (2008). Inhibition of Class I Histone

- Deacetylase with an Apicidine Derivative Prevents Cardiac Hypertrophy and Failure. *Cardiovasc. Res.*;80(3):416-24
- 9) Catalucci D, Bang ML, Condorelli G. (2008). Deciphering the beta-adrenergic response in human embryonic stem cell-derived-cardiac myocytes: closer to clinical use. *Br J Pharmacol.* 153 :625-6.
 - 10) Catalucci D, Latronico MVG, Ellingsen O, Condorelli G (2008): Physiological hypertrophy: how and why. *Frontiers in Biosciences*, 13:312-24.
 - 11) Catalucci D and Condorelli G. (2008). microRNA MicroRNAs Control Gene Expression: Importance for Cardiac Development and Pathophysiology : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1123:20-9.
 - 12) Latronico MVG, Catalucci D, Condorelli G. (2008). Heart failure: Targeting transcriptional and post-transcriptional control mechanisms of hypertrophy for treatment. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(9):1643-8.
 - 13) Latronico MVG, Catalucci D, Condorelli G. (2008). MicroRNA and cardiac pathologies. *Physiol Genomics*, 34(3):239-42.
 - 14) Latronico MVG and Condorelli G. (2008). On the road to the definition of the cardiac miRNome in human disease states. *Journal Molecular Cellular Cardiology*, 45(2):162-4.
 - 15) Condorelli G, Dimmeler S. (2008). MicroRNAs: components of an integrated system controlling cardiac development, physiology and disease pathogenesis. *Cardiovasc Res.* 79(4):551-2.
 - 16) Novelli V, Viviani Anselmi C, Roncarati R, Malovini A, Bellazzi R, Bronzini R, Marchese G, Condorelli G, Montenero A, Puca AA. (2008). Association of rs2200733 at 4q25 with atrial flutter / fibrillation diseases in Italian population. *Heart*, 94(11):1394-6.
 - 17) Ceci M, Gallo P, Santonastasi M, Grimaldi S, Latronico MVG, Pitisci A, Missol-Kolka E, Scimia MC, Catalucci D, Hilfiker-Kleiner D, Condorelli G. (2007). Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice b2 increasing angiogenesis and reducing apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 14(5):1060-2.

(IVB) INFIAMMAZIONE E PROGRESSIONE TUMORALE: EFFETTO DI INIBITORI DI NF-KB E DI SCAVENGERS DI RADICALI LIBERI IN MODELLI MURINI DI CA DEL COLON, CA MAMMARIO E CA DELLA PROSTATA.

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 10 - Prof. Matteo Russo, Università "La Sapienza", Roma

Obiettivi

1. Dimostrare che in tumori umani e in modelli murini di Ca della mammella, di ca della prostata e ca del colon, i principali componenti della risposta infiammatoria sono attivi nelle cellule tumorali dei tumori in progressione.
2. Che in questi stessi animali inibitori di NF-kB e scavengers di radicali liberi sono in gradi di bloccare o rallentare la progressione di questi stessi tumori.
3. Dimostrare che inibitori di NF-kB sono capaci di inibire l'insorgenza del fenotipo proinfiammatorio in cellule tumorali sottoposte ad ipossia.

Primo obiettivo

In tumori umani, ottenuti dopo intervento chirurgico in pazienti selezionati e opportunamente caratterizzati, è stato dimostrato mediante immunostochimica che alcune proteine, funzionalmente importanti nella risposta infiammatoria, sono abbondantemente presenti nelle cellule tumorali. In particolare, in tumori della prostata in tessuti normali e di Iperplasia Prostatica Benigna (BPH) e nel tessuto mammario normale (ottenuto da interventi di mastoplastica) e in oltre 60 ca mammari a varia malignità, sono stati studiati alcuni recettori-sensori di danno capaci di attivare NF-kB, enzimi inducibili, classici produttori di mediatori e di effettori, NOS e COX inducibili (iNOS e COX-2), e una tipica proteina di fase acuta, legata alle cellule, la pentraxina-3. L'immunostaining per tutte queste proteine appariva fortemente aumentato nei carcinomi, mentre nelle lesioni benigne e nei tessuti normali era scarso o assente.

Questo è stato confermato dall'analisi effettuata mediante western blotting eseguito su frazioni omogenee di tessuto ottenute da laser-capture microdissection. E' stato anche possibile evidenziare che le bande specifiche apparivano diminuite o assenti anche nel tessuto normale ospite del tumore, adiacente o lontano dal tumore. Infine, dalle stesse frazioni microdissezzate, è stato estratto mRNA e, mediante real-time PCR, è stato possibile dimostrare che i geni delle suddette proteine sono molto attivi nei tumori maligno progrediti, mentre la loro trascrizione appare bassa o assente nelle lesioni benigne e nel tessuto normale. Questo ha suggerito che la risposta infiammatoria potrebbe essere attivata nelle cellule trasformate, come accade nei leucociti attivati, e contribuire con i suoi vari geni alla progressione verso il tumore maligno.

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

Secondo obiettivo

E' stato iniziato il trattamento in vivo con inibitori di NF-kB (CR-3294), con scavengers di radicali liberi e con inibitori della mammalian reverse transcriptase (anti-RT) in due modelli murini. Il lavoro preliminare è stato di controllare, mediante un time-course, l'insorgenza del tumore nell'organo bersaglio e la presenza di eventuali metastasi in organi distanti. Questo è stato perseguito mediante un'autopsia sistematica e lo studio istologico dei linfonodi regionali dell'organo-bersaglio e dei principali organi distanti.

Si stanno studiando per prima i modelli del topo transgenico per il ca mammario e del ca del colon nel ratto trattato con un cancerogeno chimico (DMH-1,2 dimetil-idrazina).

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

del mancato ampliamento della colonia. La causa determinata è stata la presenza precoce di tumori alle vescicole seminali che rendevano sterili i maschi.

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

Risultati nel modello di ca mammario del topo transgenico MMT.

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

Animali transgenici di controllo non trattati.

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

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

Animali transgenici trattati con anti-RT.

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

Animali transgenici trattati con inibitore di NFkB

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

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

Descrizione macroscopica

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

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

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

Istopatologica e analisi molecolare.

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

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

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

Terzo obiettivo

In esperimenti preliminari abbiamo dimostrato che linee cellulari, normali e tumorali, derivate da tumori mammari e prostatici, sottoposti ad anossia (time-course e dose-dipendenza), esprimono una serie di geni tipici della risposta infiammatoria e riparativa (RAGE, P2X7, iNOS, COX-2, Pentraxin-3, varie

citochine) attraverso l'attivazione del fattore inducibile dall'ipossia HIF-1 α e, probabilmente, attraverso la transattivazione di NF- κ B. Sulla base di questi risultati abbiamo studiato l'effetto di CR-3294 sull'espressione dei geni proinfiammatori su cellule in trattamento ipossico.

Sono stati condotti studi di dose-dipendenza e time-course dimostrando che tale espressione veniva inibita proporzionalmente in presenza di varie concentrazioni di CR-3294 a cominciare dall'espressione dei sensori di danno (RAGE e P2X7) e poi successivamente dagli effettori (iNOS, COX-2, Pentraxin-3 e citochine).

Inoltre, si è visto che il trattamento ipossico evidenziava o aumentava la capacità di degradare la ECM (invasività) e di migrare attivamente in risposta a stimoli chemiochinici in un sistema a due camere separate da una membrana di ECM.

Questo suggerisce che a) l'espressione del fenotipo infiammatorio tumorale sembra legato prima all'attivazione di HIF-1 α e poi di NF- κ B e che 2) l'espressione di tale fenotipo può essere bloccato da inibitori specifici di NF- κ B (CR-3294).

Quarto obiettivo

In esperimenti preliminari con cellule staminali isolate da glioblastomi e da ca mammari è stato confermato il ruolo dell'ipossia nell'accensione della risposta infiammatoria nelle cellule trasformate.

E' stato visto che l'entità dell'attivazione supera di molto la stessa risposta vista nelle linee tumorali differenziate derivate da glioblastomi e ca mammari.

Inoltre, si è visto che il trattamento ipossico evidenziava oppure aumentava fortemente (rispetto alle linee cellulari tumorali di cui sopra) la capacità di degradare la ECM (invasività) e di migrare attivamente in risposta a stimoli chemiochinici in un sistema a due camere separate da una membrana di ECM.

Prodotti finali di questo progetto.

Diversi manoscritti (almeno 5) sono in diverse fasi di pubblicazione. Due altri manoscritti sono in forma di Internal Report e in preparazione per essere sottomessi a riviste internazionali.

Una industria farmaceutica (ROTTA Farmaceutici, Milano) è interessata a finanziare un progetto per una sperimentazione in animali e poi nell'uomo (fase I-III) di inibitori di NF- κ B come farmaci per bloccare o rallentare la progressione tumorale.

Pubblicazioni

- 1) Tafani M, Schito L, Anwar T, Indelicato M, Sale P, Di Vito M, Beraldi R, Makovec F, Letari O, Caselli G, Spadafora C, Pucci B and Russo MA. The Anti-Tumoral Effect of a Novel Molecule Through Autophagic Degradation of HIF-1 α . *Autophagy*, (2008), 4:8, 1-12.
- 2) Ravenna L, Sale P, Di Vito M, Russo A, Salvatori L, Tafani M, Mari E, Sentinelli S, Petrangeli E, Gallucci M, Di Silverio F, and Russo MA. Up-regulation of the Inflammatory-Reparative Response in Human Prostate Carcinoma. *Prostate* (2009) In corso di stampa.
- 3) Ravenna L, Verdina A, Ppincipessa L, Faraglione C, Salvatori L, Caporuscio F, Russo MA, Petrangeli E. Hypoxic regulation of HIF and NF- κ B signaling in prostate and mesotelioma cell lines. *FEBS J*, (2009), 276 (suppl):337-338.
- 4) Tafani M, Russo A, Di Vito M, Sale P, Gentileschi Stefano, Bragaglia Roberto, Marandino Ferdinando, Garaci Enrico and Russo Matteo A. Upregulation of Proinflammatory gene as adaptation to hypoxia in MCF7 cells and in human mammary invasive carcinoma microenvironment. (sottomesso per la pubblicazione).
- 5) Di Vito M, Frati A, Adriana xx, Sale P, Tafani M, Mari M, Bastianello S, Santoro A, Raco A, Pallini R, Delfini R, De Maria R, Russo MA. Proinflammatory gene expression in hypoxic stem cells from human glioblastoma and in solid glioblastoma microenvironment. (sottomesso per la pubblicazione).

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 11 - Dr. Corrado Spadafora, SBGSA, ISSObiettivi

- Dimostrare che la risposta flogistica è coinvolta nella progressione di tumori spontanei in animali transgenici predisposti al ca mammario e al cancro prostatico.
- Definire il pattern di espressione della Trascrittasi Inversa (RT) endogena nella progressione tumorale in animali transgenici predisposti al ca mammario e al cancro prostatico.
- Dimostrare che il controllo negativo dell'RT è correlato con la risposta flogistica e rallenta la progressione dei tumori.

1. Inibitori di NF- κ B in modelli murini di carcinoma mammario.

Il nostro contributo a questa parte del Progetto è consistito essenzialmente nell'acquisto dei topi transgenici del ceppo (FVB/N.TG(MMTV-PyVT)34M(T/X), spontaneamente predisposti al carcinoma mammario, nell'espansione della colonia, nella tipizzazione degli individui, nel trattamento farmacologico e nel rilevamento degli effetti del trattamento sulla progressione tumorale. Questo modello murino ha consentito di valutare gli effetti antitumorali in vivo della molecola CR 3294 che attiva l'autofagia degradando l' HIF-1a e inibisce l'invasività e la crescita tumorale. Questi risultati sono stati oggetto di una pubblicazione nel 2008.

2. Espressione della Trascrittasi Inversa endogena nella progressione tumorale.

(N.B. Questa parte del lavoro è stata svolta in stretta collaborazione con l'U.O. 12)

Gli obiettivi principali della nostra UO consistevano: a) nel definire il pattern di espressione della Trascrittasi Inversa (RT) nella progressione tumorale e b) nel dimostrare che il controllo negativo dell'RT rallenta la progressione dei tumori. A questo scopo, avevamo originariamente iniziato la sperimentazione utilizzando lo stesso ceppo di transgenici (FVB/N.TG(MMTV)PyVT) 34M(T/X) per studiare gli effetti dell'inibitore dell'RT efavirenz (efv) sulla crescita tumorale mammaria. Nel complesso, i risultati suggerivano che il trattamento con efv (20 mg/kg) antagonizza la progressione tumorale e riduce l'indice mitotico soprattutto nelle fasi iniziali e intermedie della crescita ma che negli stadi avanzati questi effetti tendevano a ridursi ed i due parametri a conformarsi a quelli dei controlli non trattati. Nel corso dell'ultimo anno abbiamo esteso questo studio trattando gli animali con due diverse dosi di farmaco – 20 mg/kg o 60 mg/kg – per rispondere al quesito se gli effetti inibitori fossero dose-dipendenti. I risultati riassunti nella Fig.1 dimostrano una significativa risposta dose2 dipendente in quanto i tumori di animali trattati con 60 mg/kg (Fig. 1B) sono mediamente più piccoli del 30-35% rispetto a quelli dei topi trattati con 20 mg/kg (Fig. 1A). Questi risultati in generale suggeriscono una stretta correlazione dose inibitori RT-crescita tumorale.

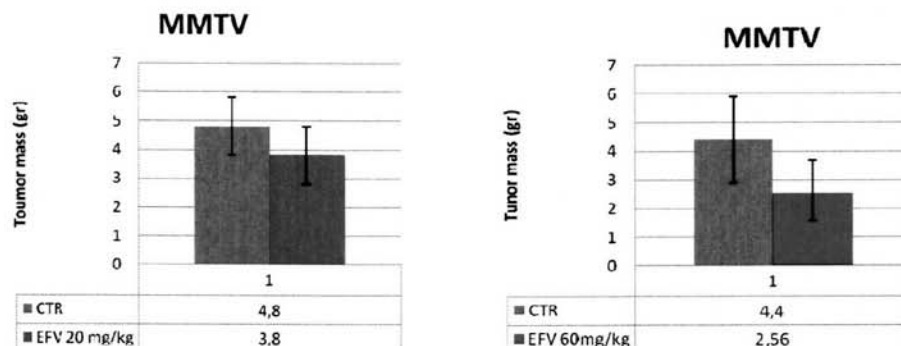


Figura 1.

Nell'intraprendere un ulteriore approfondimento, abbiamo tuttavia, preferito rinunciare al ceppo (FVB/N.TG(MMTV-PyVT)34M(T/X) ed utilizzare il più convenzionale sistema inoculando cellule tumorali in topi nudi. Il motivo principale di questa decisione è stata l'estrema variabilità individuale che caratterizza la crescita dei tumori nei topi mutanti MMTV-PyVT, per cui è difficile raccogliere un numero statisticamente sufficiente di animali in cui la crescita sia sincrona. Abbiamo pertanto deciso di valutare gli effetti antitumorali

dell'efavirenz sul sistema dei topi nudi (parzialmente immunodepressi) inoculati sottocute con cellule di melanoma umano (A-375). 5x10⁶ cellule A-375 sono state inoculate in ciascun topo e 10 giorni dopo si è iniziato il trattamento con efv secondo il seguente schema:

efv 2x30mg/kg due dosi di 30 mg/giorno

efv 60mg/kg una dose di 60 mg/giorno

efv 90mg/kg una dose di 90 mg/giorno

I risultati sono riassunti nella Fig. 2; ogni punto delle curve rappresenta il valore medio di 5 topi. L'andamento delle curve mostra non solo una dose dipendenza – la dose maggiore ha più efficacia – ma anche che la modalità di somministrazione del farmaco gioca un ruolo significativo nel controllo della crescita del tumore. Infatti, la stessa dose di 60 mg/Kg è più efficace se somministrata in due dosi da 30 mg nell'arco della giornata piuttosto che in una unica soluzione.

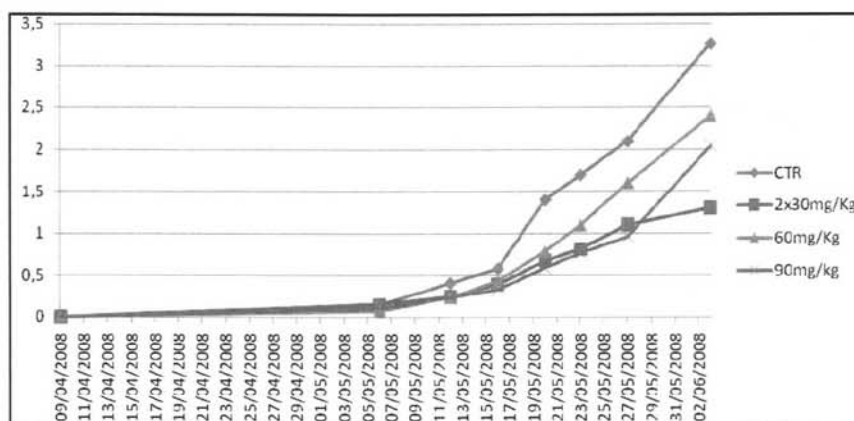


Figura 2.

I topi sono stati quindi sacrificati per prelevare i tumori da cui sono state estratte le proteine totali successivamente analizzate per Western blot utilizzando anticorpi diretti contro specifici marcatori tumorali. In particolare, è stata rilevata che: a) l'espressione di S-100 (Fig. 3A) e di Melan A (Fig. 3B) è marcatamente ridotta nei tumori di animali trattati rispetto ai controlli non trattati, b) la down regulation dei marcatori è dose dipendente e c) anche in questo caso, a parità di dose, è più efficace quella in due somministrazioni.

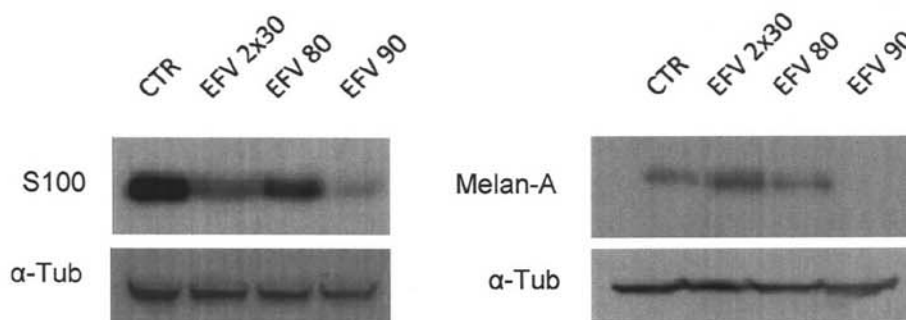


Figura 3.

Come mostrato in Fig. 4, i livelli di espressione dei due marcatori tumorali S-100 e Ki-67 sono stati anche rilevati per immunistochemica su sezioni di tumori prelevati da animali non trattati (CTR) e da quelli trattati (EFV). L'espressione dei due marcatori, rivelata dai è fortemente down regolata nei tumori di animali trattati con efv in paragone a quelli degli animali di controllo.

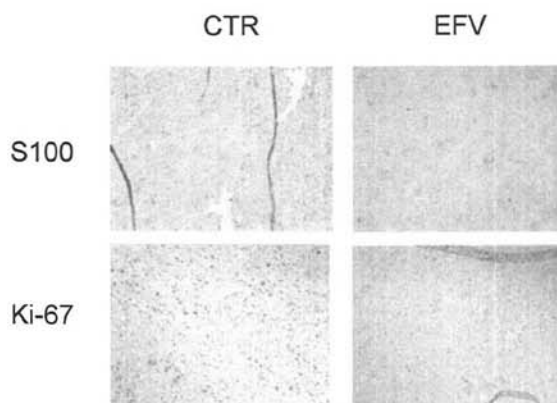


Figura 4.

E' interessante notare che quantità crescenti di melanina, considerate un marcatore di differenziamento del melanoma, sono rilevabili in estratti cellulari di tumori. La **Fig. 5** mostra che le frazioni non solubili ottenute dopo l'estrazione delle proteine dai tessuti tumorali (le frazioni solubili sono state analizzate per Western blot per rilevare l'espressione di **S-100** e **Melan-A**, vedi sopra) sono visibilmente e progressivamente arricchite con **melanina** in funzione del trattamento con efv: la **melanina** non è espressa nei tumori di animali non trattati (CTR) mentre la sua espressione è progressivamente aumentata in seguito al trattamento con quantità crescenti di efv.

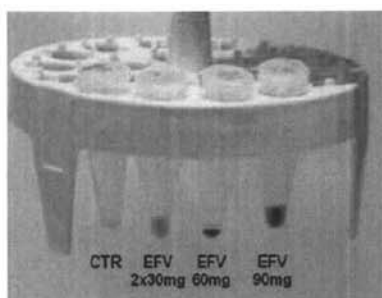


Figura 5.

In conclusione, due dosi di efv (2x30 mg/giorno) sono più efficaci che una singola dose (60 mg/giorno). 2x30 mg/giorno antagonizza più efficacemente la progressione tumorale, riduce significativamente l'espressione dei marcatori tumorali e stimola la produzione di melanina, un marcatore del differenziamento del melanoma.

La marcata down regolazione dei due marcatori tumorali e la up regolazione della melanina suggeriscono il potenziale futuro utilizzo dell' efavirenz in una terapia differenziativa del cancro, del melanoma in particolare.

Pubblicazioni

- 1) Oricchio E, Sciamanna I, Beraldi R, Tolstonog GV, Schumann GG, Spadafora C. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. *Oncogene*. 2007 26, 4226-4233.

- 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)

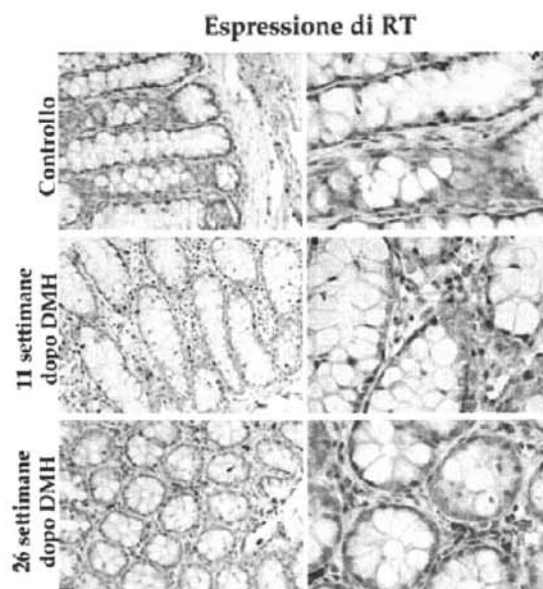


Figura 2.

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).

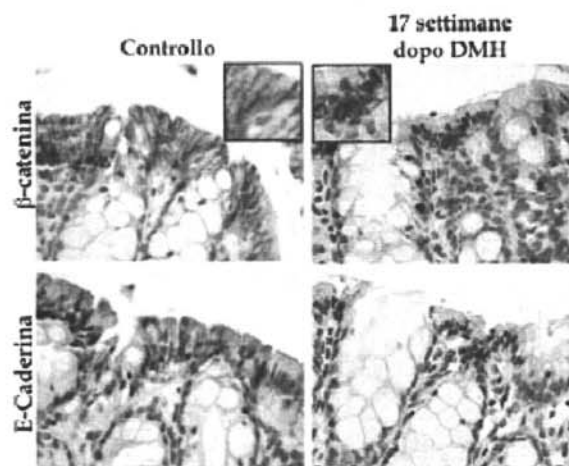


Figura 3.

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 inoculo.

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.

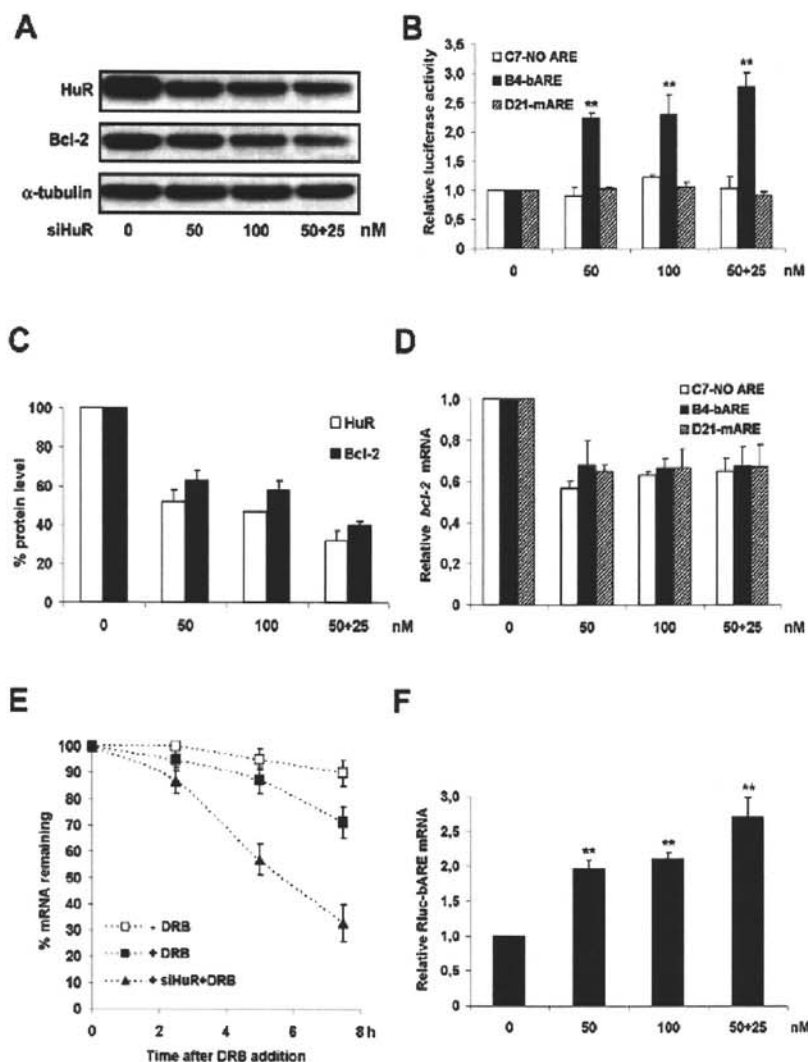


Fig. 1. Aumento specifico dell'attività del bARE-reporter silenziando HuR. (A) Cloni HEK293 stabilmente trasfettati con costrutti reporter sono stati trattati con siHuR come indicato in Figura ed i livelli di HuR e Bcl-2 sono stati valutati mediante analisi di Western Blot. (B) L'attività del reporter 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).

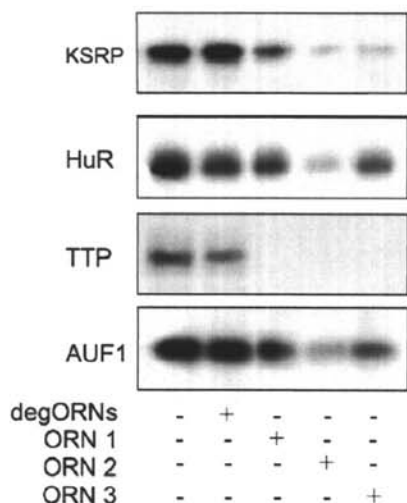


Fig. 2. Spiazzamento delle AUBPs da parte degli ORN in orientamento senso. L'esperimento di UV-crosslinking evidenzia la competizione tra ORNs e AUBPs per il legame al trascritto bARE marcato radioattivamente.

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).

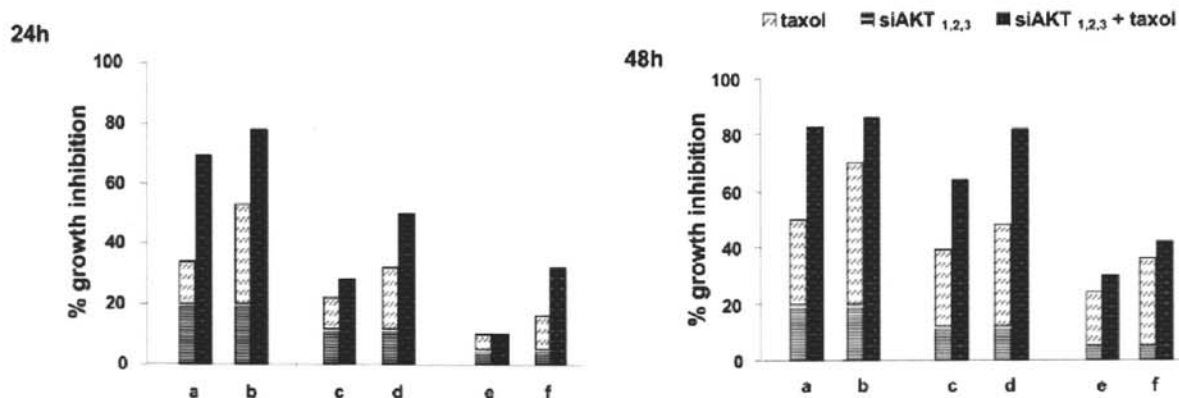


Fig. 3. Effetto sinergico di siAKT e taxolo in cellule di prostata PTEN^{-/-}. Le colonne nei grafici si riferiscono a: a-b, LNCaP; c-d, PC3; e-f, DU-145; a,c,e, siAkt_{1,2,3} e 10 nM taxolo; b,d, f, siAkt_{1,2,3} e 30nM taxolo. La prima colonna di ciascuna coppia mostra l'effetto di ciascun farmaco 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.

Pubblicazioni

- 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).

(VI) SVILUPPO DI NUOVE TERAPIE ANTITUMORALI BASATE SUI FARMACI ANTIRETROVIRALI INIBITORI DELLA PROTEASI DI HIV E INIBITORI NON NUCLEOSIDICI DELLA TRASCRITTASI INVERSA, DA SOLI O COMBINATI: STUDI PRECLINICI IN VITRO ED IN VIVO

U.O. 14 – Responsabile Scientifico: Barbara Ensoli, ISS

U.O. 15 – Responsabile Scientifico: Paola Sinibaldi Vallebona, Università Tor Vergata, Roma

U.O. 16 – Responsabile Scientifico: Corrado Spadafora, ISS

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 14 - Dr.ssa Barbara Ensoli, Centro Nazionale AIDS, ISS

Nostri studi recenti hanno mostrato che una classe di farmaci antiretrovirali, gli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI), hanno attività antiangiogenica ed antitumorale in modelli sperimentali *in vitro* ed *in vivo*.

In particolare abbiamo dimostrato che il trattamento con HIV-PI a dosi paragonabili a quelle utilizzate nell'uomo è in grado di bloccare lo sviluppo di lesioni angioproliferative e l'edema indotti mediante l'inoculazione in topi nudi di cellule primarie derivate da pazienti con sarcoma di Kaposi (KS) o da ibridi somatici tra cellule endoteliali e una linea cellulare da carcinoma del polmone umane. Questo effetto è associato alla formazione di ampie zone di necrosi all'interno delle lesioni con marcata riduzione dell'angiogenesi, dell'edema e dell'infiltrazione di cellule fuse rispetto agli animali di controllo (Sgadari et al. Nature Medicine 2002; Sgadari et al., Lancet Oncology 2003, Toschi et al., Anticancer Drug 2002; Monini et al., J Antimicrobial Therapy 2003). Questi effetti degli HIV-PI sono stati osservati sia in animali trattati prima dell'inoculo delle cellule KS, sia nei topi trattati a partire dal momento dell'inoculo, suggerendo che gli HIV-PI siano in grado di bloccare lo sviluppo e di indurre la regressione delle lesioni. Come indicato dall'osservazione istologica delle lesioni simil-KS dei topi trattati con HIV-PI, abbiamo inoltre dimostrato che questi farmaci sono in grado di inibire l'angiogenesi indotta da fattori angiogenici, mediante il blocco dell'invasione cellulare e dell'attivazione della metalloproteasi della matrice-2, sia in topi atimici che nella membrana corioallantoidea di pollo, in assenza di effetti tossici e con una efficacia simile a quella del taxolo, un chemioterapico dotato di effetti anti-tumorali e anti-angiogenici (Sgadari et al., Nat Med 2002; Sgadari et al., Lancet Oncology 2003, Toschi et al., Anticancer Drug 2002; Monini et al., J Antimicrobial Therapy 2003; Toschi et al., *submitted*).

Sulla base di questi dati è stata avviata una sperimentazione clinica multicentrica di fase II per valutare l'attività di Indinavir come monoterapia in pazienti con CKS iniziale o avanzato. I risultati dell'analisi ad interim hanno indicato che il trattamento con Indinavir è ben tollerato ed induce un'elevata frequenza di risposta nei soggetti con CKS iniziale; al contrario nel CKS avanzato e complicato, il trattamento con indinavir induce una temporanea stabilizzazione di malattia, generalmente seguita da progressione. La risposta al trattamento richiede elevati livelli plasmatici di farmaco ed è associata ad una significativa diminuzione del numero di cellule endoteliali circolanti e alla stabilizzazione dei livelli plasmatici di MMP e di fattori angiogenici, quali il bFGF (Monini et al., AIDS 2009). Questi dati sono coerenti con l'azione dei farmaci ad azione anti-angiogenica, i quali sono in grado di bloccare la crescita dei tumori iniziali ma non dei tumori avanzati, la cui vascolatura è già differenziata e stabilizzata ed indicano che nel CKS avanzato il trattamento con Indinavir potrebbe essere efficace in associazione a chemioterapia convenzionale e/o come terapia di mantenimento dopo riduzione della massa tumorale. Sulla base di questi dati, è stata avviata un nuovo studio clinico di fase II per il trattamento del CKS avanzato con Indinavir in associazione a chemioterapia. Lo studio prevede un trattamento di induzione debulking con indinavir associato a Vinblastina e Bleomicina, ed una fase di mantenimento con Indinavir in monoterapia.

I nostri studi hanno inoltre indicato che un altro bersaglio potenzialmente efficace per la terapia dei tumori sono le RT cellulari, espressa negli embrioni di topo, in cellule progenitrici e in linee cellulari trasformate (Pittoggi et al., Mol. Reprod. Dev., 2003; Mangiacasale et al., Oncogene, 2003). L'inibizione della RT mediante trattamento con NNRTI, determina una riduzione della crescita di linee indifferenziate e tumorali in vitro ed in vivo, ne promuove il differenziamento cellulare ed induce una riprogrammazione dell'espressione genica, suggerendo che questo enzima abbia un ruolo chiave in processi cellulari fondamentali quali la proliferazione ed il differenziamento cellulare (Mangiacasale et al., Oncogene, 2003). Questi risultati indicano che gli HIV-PI e gli NNRTI rappresentano potenti molecole dotate di attività antiangiogenica e antitumorale e che agiscono su fasi diverse del processo di crescita tumorale. Pertanto è importante analizzare la possibilità di un loro uso da soli od in combinazione per la terapia dei tumori che insorgono sia in individui HIV⁺ che sieronegativi.

Il presente progetto, che viene svolto in collaborazione con le U.O. 16 e 17, è articolato nei seguenti obiettivi: 1) gli effetti antitumorali e/o antimetastatici *in vivo* degli HIV-PI ed NNRTI, usati da soli od in associazione, in modelli di tumori sperimentali indotti nel topo dall'inoculazione di linee tumorali umane e murine; 2) gli effetti antitumorali e/o antimetastatici *in vivo* degli HIV-PI ed NNRTI, usati da soli od in associazione, in un modello di tumore sperimentale indotto nel ratto da una linea di carcinoma del colon singenico; 3) gli effetti degli HIV-PI e/o NNRTI, da soli od in associazione, sulla proliferazione, invasione, differenziamento ed espressione genica in vitro delle linee tumorali utilizzate negli studi *in vivo*.

a) Valutazione degli effetti antiangiogenici ed antitumorali di indinavir ed efavirenz, da soli od in associazione, in modelli di tumori sperimentali indotti nel topo dall'inoculazione di linee tumorali umane.

Inizialmente, sono stati effettuati esperimenti preliminari per testare la tossicità di indinavir o efavirenz, 2 dei farmaci appartenenti rispettivamente alla classe degli HIV-PI ed NNRTI più usati nella pratica clinica, nei ceppi di topi successivamente utilizzati per i modelli tumorali sperimentali (nu/nu inbred, SCID e C57BL, femmine, 5-6 settimane di età, Harlan) (5/10 animali per gruppo) e a dosi paragonabili a quelle utilizzate in pazienti HIV⁺. L'indinavir (Merck Sharp & Dohme, 70 mg/kg/die, ovvero 1.36 mg/topo/die) o l'efavirenz (Bristol Myers Squibb, 10 mg/kg/die, ovvero 0,2 mg/topo/die), diluiti ciascuno in 0.4 ml di soluzione salina, sono stati somministrati giornalmente mediante gavage intragastrico. Topi di controllo sono stati trattati con lo stesso volume di soluzione salina. Dato che alcuni dei modelli tumorali che ci si propone di utilizzare nei topi atimici prevedono un irraggiamento subletale degli animali (400 Rad) per favorire l'attecchimento tumorale, questi esperimenti di tossicità sono stati effettuati anche in topi nudi irradiati. La somministrazione dei farmaci è stata proseguita fino a 10 settimane senza che negli animali trattati, sia irradiati che non, siano stati osservati segni di tossicità d'organo o sistemica, quali perdita di peso o alterazioni comportamentali.

È stata, quindi, valutata l'efficacia di indinavir o efavirenz in topi immunocompetenti C57BL inoculati con cellule di melanoma murino singenico B16, clone F10 (6 animali/gruppo). Gli animali hanno iniziato il trattamento giornaliero con indinavir o efavirenz per os alle dosi sopra indicate e dopo 2 giorni sono stati inoculati sottocute con 1×10^6 cellule B16-F10. In queste condizioni sperimentali è stata osservata la comparsa di tumori sottocutanei al sito di inoculo dopo circa 5 giorni. Il trattamento è stato proseguito per 12 giorni dopo l'inoculo delle cellule tumorali, fino a che i tumori degli animali di controllo non hanno raggiunto dimensioni tali da interferire con le attività vitali degli animali ($2-3 \text{ cm}^2$), che sono stati quindi sacrificati. Sia il trattamento con indinavir che con efavirenz ha inibito fortemente la crescita tumorale in assenza di significativa tossicità sistemica. Per valutare gli effetti del sistema immune sull'attività antitumorale di indinavir ed efavirenz, l'esperimento è stato eseguito anche in topi immunocompromessi. A tale scopo topi SCID sono stati trattati con indinavir o efavirenz per os alle dosi indicate sopra; dopo 2 giorni gli animali sono stati inoculati sottocute con cellule B16-F10. Il tempo di comparsa e la cinetica di crescita dei tumori è stata molto simile. Al sacrificio, i tumori degli animali trattati con inibitori sono risultati di dimensioni molto ridotte rispetto a quelli di controllo.

Avendo con questi esperimenti preliminari verificato che questa linea tumorale è sensibile sia al trattamento con indinavir che con efavirenz sia nel modello singenico immunocompetente che in animali

immunocompromessi, stiamo attualmente valutando l'effetto dei 2 farmaci somministrati in combinazione.

È stato, inoltre, effettuato un esperimento per valutare l'effetto del trattamento con HIV-PI o NNRTI in un tumore caratterizzato da alta incidenza nell'uomo, quale il carcinoma del colon. A tale scopo gli animali sono stati trattati con indinavir o efavirenz, e 2 giorni dopo sono stati inoculati sottocute, previo irraggiamento subletale, con una linea di carcinoma umano del colon (cellule SW480, 3×10^6 cellule/topo). Il trattamento è stato proseguito per 63 giorni. Entrambi i farmaci hanno avuto un effetto modesto ma sensibile sulla crescita del tumore, suggerendo che anche in questo modello tumorale umano è utilizzabile per valutare gli effetti antitumorali del trattamento combinato con i 2 farmaci.

Gli effetti antitumorali del trattamento con HIV-PI e NNRTI in associazione sono stati studiati in un altro modello di tumore umano ad alta incidenza nell'uomo, quello del carcinoma della mammella. A tale scopo gli animali sono stati trattati con indinavir e/o efavirenz, e 2 giorni dopo sono stati inoculati sottocute, previo irraggiamento subletale, con una linea di carcinoma umano della mammella (cellule MDA-MB-231, 1×10^6 cellule/topo). Il trattamento è stato proseguito per 53 un totale di giorni. Sebbene il trattamento con i 2 farmaci somministrati separatamente abbia inibito modestamente la crescita di questo modello tumorale allogeneo, la somministrazione combinata di indinavir ed efavirenz ha avuto un effetto anti-tumorale additivo.

L'analisi istologica ed immunoistochimica dei modelli tumorali studiati è attualmente in corso. In particolare stiamo valutando l'entità dell'angiogenesi, della proliferazione e dell'apoptosi tumorale nei tumori dei topi trattati con indinavir e/o efavirenz rispetto ai controlli trattati con salina, mediante analisi immunoistochimica di marker endoteliali (CD31), di proliferazione e del ciclo cellulare (Ki67) e con TUNEL test. A tuttora è stata effettuata l'analisi dei marcatori dell'endotelio vascolare e dei fattori angiogenici nei tumori indotti dalla linea di melanoma murino B16, sia nel modello singenico che nel topo immunocompromesso, tuttavia, questo tipo di indagine è stata resa difficoltosa dalla presenza di necrosi emorragica all'interno delle masse tumorali, probabilmente a causa degli elevati livelli di VEGF, fattore angiogenico noto per indurre edema e stravaso ematico, prodotti dalle cellule tumorali stesse. L'analisi proseguirà quindi nei modelli tumorali di carcinoma del colon e della mammella.

Recenti evidenze della letteratura indicano che gli HIV-PI sono in grado di modulare la risposta immune e l'infiammazione associata a tumori. Infatti, è stato dimostrato che questi farmaci sono in grado di inibire l'apoptosi di linfociti T e cellule progenitrici ematopoietiche, le risposte infiammatorie NF- κ B-mediate e l'attivazione di cellule dendritiche, e di modulare le risposte immuni T-citotossiche. Per determinare se il blocco della crescita tumorale osservato con HIV-PI e/o NNRTI sia in parte dovuto agli effetti di questi farmaci sulla risposta immune, abbiamo utilizzato un modello di immunità umorale e cellulare in uso nel nostro laboratorio basato su topi immunocompetenti immunizzati con la proteina Tat. A tale scopo, topi Balb-c sono stati trattati giornalmente mediante gavage intragastrico con un cocktail di farmaci antiretrovirali contenente NNRTI (efavirenz) od HIV-PI (kaletra, costituito dall'associazione di lopinavir con ritonavir, uno degli ultimi farmaci di questa classe ad essere entrato nella pratica clinica), a dosi comparabili a quelle utilizzate nell'uomo. Due giorni dopo i topi hanno cominciato un protocollo di immunizzazione con la proteina Tat (7.5 μ g, 2 priming per via intradermica seguiti da un boost per via sottocutanea in associazione ad adiuvante, ogni 15 giorni), continuando il trattamento con i farmaci per 45 giorni. Risultati preliminari di questo esperimento indicano che né il trattamento con HIV-PI né con NNRTI hanno effetti sensibili sulla risposta immune umorale (produzione di IgG e IgM specifiche, tipo di epitopi specifici riconosciuti), e sulla risposta immune cellulare (studiata mediante valutazione ELISpot della produzione di IFN- γ , IL2 e IL4 da parte degli splenociti dei topi immunizzati. L'analisi statistica di questi dati è in corso. I risultati di questi esperimenti suggeriscono che l'azione antitumorale di HIV-PI e NNRTI non sia mediata da effetti sulla risposta immune.

Infine, è stata valutata la capacità di indinavir di bloccare la progressione di lesioni di neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) o la loro insorgenza in un modello di topo transgenico per le proteine E6 ed E7 di HPV, in collaborazione con il Dr Enrico Giraudo (Università di Torino). Questo topo transgenico sviluppa lesioni CIN in seguito a trattamento con estrogeni (Girando et al JCI 2004). Gli animali (12 per gruppo) sono stati trattati con indinavir alle dosi convenzionali o 3X più alte di quelle utilizzate in pazienti HIV⁺ (35mg/Kg/day). Il farmaco è stato somministrato tramite gavage intragastrico una volta al giorno per 6 settimane. I trattamenti 1X e 3X sono stati ben tollerati dagli animali senza evidenziare alcun

segno di tossicità. I risultati ottenuti mostrano come l'indinavir sia in grado di ridurre l'incidenza tumorale. L'analisi in immunofluorescenza effettuata con il mAb anti-Meca32, marker selettivo per le cellule endoteliali, ha evidenziato che nei tessuti provenienti dagli animali trattati con indinavir vi è una forte riduzione della densità vascolare e l'angiogenesi tumorale. In particolare, la dose 1X ha ridotto la densità vascolare rispettivamente del 35% e quella 3X del 53%. L'analisi degli effetti pro-apoptotici degli HIV-PI è stata fatta sui tessuti murini utilizzando un anticorpo capace di riconoscere specificamente la forma attivata della caspasi-3. I risultati ottenuti hanno evidenziato che indinavir alla dose 1X aumenta di 1.7 fold l'indice apoptotico, mentre alla dose 3X determina un aumento di 2.9 fold rispetto al controllo. In parallelo, le indagini sulla proliferazione cellulare, effettuate utilizzando un anticorpo anti-Ki-67, hanno mostrato che i farmaci mantengono pressoché invariati gli indici tumorali di proliferazione. Tutti questi dati, nel loro insieme, ci fanno pensare che indinavir già da solo abbia un ottimo potenziale antitumorale e pro-apoptotico nel modello murino di topo transgenico esprimente HPV. Successive indagini accerteranno se questo HIV-PI possa interferire anche con l'espressione di p16 e l'espressione e l'attivazione di MMPs e VEGF. Studi di tossicità in vivo con efavirenz da solo od in associazione con HIV-PI sono in fase di allestimento.

b) Valutazione degli effetti degli HIV-PI e/o NNRTI, da soli od in associazione, sulla proliferazione, invasione, differenziamento ed espressione genica in vitro delle linee tumorali utilizzate negli studi in vivo.

Per verificare gli effetti di indinavir sulla crescita delle cellule da carcinoma del colon (SW-480) e del melanoma murino (B16-F10), sono stati effettuati saggi di proliferazione basale su cellule coltivate in presenza di 0.1, 1 e 10 μM di farmaco per 4-5 giorni. Tali concentrazioni sono paragonabili a quelle osservate nel plasma di pazienti HIV⁺ trattati con dosi terapeutiche di indinavir. Questi esperimenti preliminari hanno dimostrato che l'indinavir non inibisce la proliferazione delle linee tumorali a nessuna delle concentrazioni testate. Successivamente sono stati effettuati esperimenti per valutare gli effetti dell'indinavir sulla capacità invasiva di queste linee tumorali. A tale scopo queste linee cellulari sono state coltivate per 5 giorni con indinavir (0.1, 1 e 10 μM) e quindi testate per la loro capacità di invadere una matrice extracellulare ricostituita (Matrigel) in risposta ad un fattore angiogenico (bFGF). Tali saggi sono stati effettuati utilizzando camere di Boyden. I risultati ottenuti hanno mostrato che il trattamento con indinavir è in grado di bloccare in maniera estremamente efficace l'invasione di entrambe le linee tumorali già a partire dalla dose 0.1 μM . Questi risultati suggeriscono che indinavir sia in grado di agire in modo selettivo sull'invasione delle cellule tumorali, uno degli step fondamentali per la crescita e progressione tumorale, così confermando i dati precedentemente ottenuti su cellule provenienti da Sarcoma di Kaposi e cellule endoteliali primarie (Sgadari et al., Nat Med 2002; Sgadari et al., Lancet Oncol 2003). Sono attualmente in corso analoghi esperimenti di proliferazione ed invasione sulla linea di carcinoma della mammella (MDA-MD-231).

Vari studi hanno dimostrato che, a dosi elevate, il ritonavir ed il saquinavir sono in grado di modulare l'attività del proteasoma (André et al Proc Natl Acad Sci 1998; Tovo AIDS 2000; Piccinini et al AIDS 2001; Pati et al., Blood 2002, Gaedicke et al. Cancer Res 2002). Tali effetti richiedono concentrazioni di farmaco simili o superiori ai livelli terapeutici di picco. Poiché il proteasoma controlla molteplici pathway cellulari, tra cui il turnover delle proteine, l'apoptosi, l'emivita e l'attività di proteine che regolano il ciclo cellulare, e la maturazione e l'attivazione di NF- κ B, per approfondire i meccanismi alla base dell'attività anti-tumorale dell'indinavir abbiamo analizzato gli effetti di concentrazioni di indinavir simili e superiori alle dosi terapeutiche di picco sulla crescita, la sopravvivenza e la capacità invasiva in vitro di cellule da carcinoma del colon (linea SW-480). I risultati ottenuti hanno dimostrato che il farmaco è in grado di bloccare l'invasione di questa linea neoplastica a tutte le concentrazioni testate, senza effetti sulla crescita basale o sulla sopravvivenza cellulare.

Si è quindi valutato se il trattamento di queste cellule tumorali con dosi elevate di indinavir possa influenzare l'accumulo di I κ B α e di p21, la cui degradazione è mediata dal proteasoma. I risultati ottenuti hanno dimostrato che elevate concentrazioni di indinavir non bloccano la degradazione di I κ B α indotta da TNF α ed non inducono un accumulo di p21 in queste cellule che si sono invece rivelate assai sensibili all'azione dell'epoxomicina, un noto inibitore del proteasoma (Toschi et al, submitted). Questi

risultati suggeriscono che concentrazioni di indinavir simili o superiori a quelle presenti nel plasma di pazienti possono indurre inibizione della crescita tumorale grazie alla loro capacità di bloccare l'angiogenesi con un meccanismo d'azione indipendente dal proteasoma.

Infine, abbiamo iniziato esperimenti preliminari di dose-finding per studiare gli effetti dell'efavirenz sulla proliferazione ed invasione delle linee tumorali già analizzate con indinavir. In particolare verranno testate concentrazioni di farmaco da 0.1, 1, 10 e 25 μM per identificare le dosi alle quali si ottiene la massima risposta e le dosi subottimali da utilizzare successivamente negli esperimenti di associazione con indinavir.

Parallelamente agli esperimenti in vivo sul modello murino di neoplasia CIN, in collaborazione con il Prof. Giovanni Barillari (Università "Tor Vergata") sono stati inoltre condotti esperimenti di proliferazione ed invasione su linee cellulari di carcinoma della cervice (CaSki ed HeLa, rispettivamente contenenti HPV-16 e HPV-18) coltivate in presenza di indinavir alla dose di 10 μM per un periodo di 24, 48, 72 o 96 ore. I risultati ottenuti sulle cellule HeLa hanno indicato che indinavir non influenza la proliferazione, ma riduce in modo tempo-dipendente l'invasività cellulare. Il trattamento con la medesima dose di HIV-PI sulle cellule CaSki ha invece indicato che indinavir non ha alcuna efficacia su proliferazione o invasione. Allo scopo di comprendere quale meccanismo possa regolare l'inibizione di invasione determinata da questi HIV-PI si è analizzata l'espressione, tramite RT-PCR, di MMP-2 ed MMP-9 in seguito al trattamento di queste linee cellulari con la dose 10 μM utilizzata nei saggi precedentemente descritti. I risultati ottenuti indicano che indinavir è in grado di ridurre l'espressione di MMP-2 rispettivamente del 25% in cellule HeLa. Nelle cellule CaSki, invece, non si è rilevata una riduzione di MMP-2 a carico dell'indinavir. Ulteriori esperimenti sono attualmente in corso con il clone di cellule CIN2 9E in cui HPV-31 è in forma episomale coltivato in presenza di fibroblasti feeder e, in parallelo, in colture organotipiche.

I dati ottenuti nell'ambito di questi studi forniranno, attraverso la dimostrazione dell'efficacia in appropriati studi clinici, l'opportunità di sviluppare nuove strategie terapeutiche per la cura di forme tumorali frequenti in pazienti infettati o meno da HIV-1. L'utilizzo di questi farmaci caratterizzati da bassa tossicità e costo moderato, da soli od in combinazione con chemioterapici, potrebbe significativamente migliorare il trattamento dei pazienti e la loro qualità di vita.

Pubblicazioni

- 1) Monini P, Sgadari C, Toschi E, Barillari G, Ensoli B. Antitumor effects of antiretroviral activity. *Nat. Rev. Cancer*, 4:861-875, 2004.
- 2) Monini P, Toschi E, Sgadari C, Bacigalupo I, Palladino C, Carlei D, Barillari G, Ensoli B. The use of HAART for biological tumour therapy. *J. HIV Ther*, 11:53-56, 2006.
- 3) Monini P, Sgadari C, Grosso MG, Bellino S, Di Biagio A, Toschi E, Bacigalupo I, Sabbatucci M, Cencioni G, Salvi E, Leone P, Barillari G, Gatti G, Caratelli L, Ensoli B. Concerted Action on Kaposi's Sarcoma. Clinical course of classic Kaposi's sarcoma in HIV-negative patients treated with the HIV protease inhibitor indinavir. *AIDS*, 2009 Feb 20;23(4):534-8.
- 4) Toschi E, Sgadari C, Malavasi L, Bacigalupo I, Chiozzini C, Carnei D, Compagnoni D, Bellino S, Falchi M, Palladino C, Leone P, Barillari G, Ensoli B, Monini P. Human immunodeficiency virus protease inhibitors are effective against highly prevalent human tumors via a proteasome-independent block of angiogenesis and matrix metalloproteases. (sottomesso per la pubblicazione a *Int J Cancer*).

Pubblicazioni correlate all'argomento

- 1) Sgadari C, Barillari G, Toschi E, Carlei D, Bacigalupo I, Baccarini S, Palladino C, Leone P, Bugarini R, Malavasi L, Cafaro A, Falchi M, Valdembri D, Rezza G, Bussolino F, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi's sarcoma. *Nat. Med.*, 8:225-232, 2002.

- 2) Ensoli B. HIV protease inhibitors have specific anti-cancer effects. *Biomed. & Pharmacother.*, Vol. 56, No. 8, 2002.
- 3) Sirianni MC, Vincenti L, Topino S, Giovanetti A, Mazzetta F, Libi F, Scaramuzzi D, Andreoni M, Pinter E, Baccharini S., Rezza R, Monini P, Ensoli B. NK cell activity controls human herpesvirus 8 latent infection and is restored upon HAART in AIDS patients with regressing Kaposi's sarcoma. *Eur. J. Immunol.*, 32:2711-2720, 2002.
- 4) Toschi E, Sgadari C, Monini P, Barillari G, Bacigalupo I, Palladino C, Baccharini S, Carlei D, Grosso G, Sirianni MC, Ensoli B. Treatment of Kaposi's Sarcoma, an update. *Anti-Cancer Drugs*, 13:977-987, 2002.
- 5) Monini P, Sirianni MC, Ensoli B. Concomitant clearance of human herpesvirus 8 from blood and regression of leukopenia-associated aggressive classic Kaposi's sarcoma upon α -interferon therapy. *Oncol. Rev. J.*, issue 4, pp.18-20, 2002.
- 6) Sgadari C, Monini P, Toschi E, Baccharini S, Grosso MG, Moracci G, Malavasi L, Ensoli B. HIV Protease Inhibitors inhibit Kaposi's sarcoma by blocking angiogenesis and tumour cell invasion. *Haematologica*, (Meeting Supplement 1 to n. 11) 87:37-41, 2002.
- 7) Monini P, Sgadari C, Barillari G, Ensoli B. The HIV protease inhibitors: anti-retroviral agents with anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-tumor activity. *J. Antimicrobial Chemother.*, 51:207-211, 2003.
- 8) Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Monini P. The Fibroblast Growth Factors. In: *The Cytokine Handbook (IV Edition, Chapter 31, Thomson A. and Lotze M. Eds.)*, Vol. II, pp.747-781, 2003.
- 9) Barillari G, Sgadari C, Toschi E, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors as new treatment options for Kaposi's sarcoma. *Drug Res. Update*, 6:173-181, 2003.
- 10) Sgadari C, Monini P, Barillari G, Ensoli B. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. *Lancet Oncol.*, 4:537-547, 2003.
- 11) Alessandri G, Fiorentini S, Licenziati S, Bonafede M, Monini P, Ensoli B, Caruso A. CD8(+)CD28(-) T lymphocytes from HIV-1-infected patients secrete factors that induce endothelial cell proliferation and acquisition of Kaposi's sarcoma cell features. *J. Interferon Cytokine Res.*, 23:523-531, 2003.
- 12) Sirianni MC, Libi F, Campagna M, Scaramuzzi D, Monini P, Ensoli B. Role of killer inhibitory receptors in human herpesvirus type 8 infection and KS development. In Monduzzi Eds., *International Proceedings Division, 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal (Canada), July 18 – July 23, 2004*, pp. 257-259.
- 13) Sirianni MC, Libi F, Campagna M, Rossi D, Capello D, Sciaranghella G, Carbone A, Simonelli C, Monini P, Gaidano G, Ensoli B. Down-regulation of the major histocompatibility complex class I molecules by human herpesvirus type 8 and impaired natural killer cell activity in primary effusion lymphoma development. *Br. J. Haematol.*, 130:92-95, 2005.
- 14) Garrafa E, Alessandri G, Benetti A, Turetta D, Corradi A, Cantoni AM, Cervi E, Bonardelli S, Parati E, Giulini SM, Ensoli B, Caruso A. Isolation and characterization of lymphatic microvascular endothelial cells from human tonsils. *J. Cell. Physiol.*, 207:107-113, 2006.
- 15) Sgadari C, Toschi E, Bacigalupo I, Sabbatucci M, Palladino C, Carlei D, Barillari G, Ensoli B. Patogenesi del Sarcoma di Kaposi. In: *Tumori ed Infezioni da HIV. Patogenesi e studi clinici del GICAT (Italian)*. Milano: Biomedica, pp. 15-26, 2006.
- 16) Simonelli C, Talamini R, Bearz A, Berretta M, Spazzapan S, Monini P, Sgadari C, Sartor I, Ensoli B, Tirelli U. Interleukin-2 continuous infusion and angiogenesis surrogate markers in metastatic renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.*, 17:1335-1336, 2006.

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 15 - Prof.ssa Paola Sinibaldi Vallebona, Università Tor Vergata, Roma

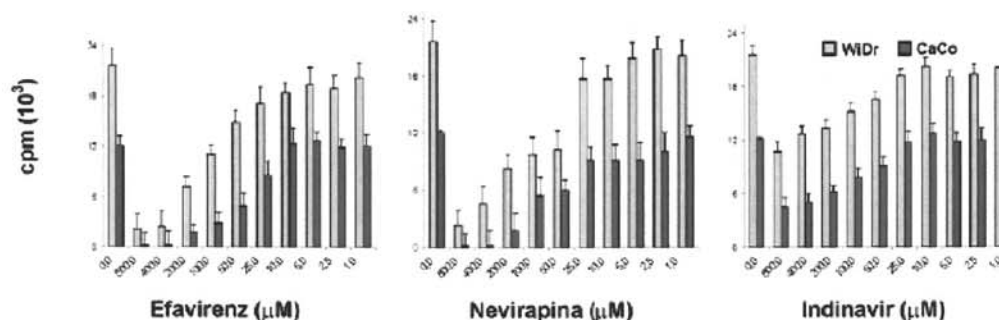
La trasformazione tumorale è un processo multifattoriale che vede coinvolte sia funzioni proprie della cellula che fattori microambientali. La chemioterapia tradizionale, rivolta all'eliminazione selettiva delle

cellule neoplastiche, è stata oggi parzialmente affiancata da terapie innovative, che tendono ad inibire la progressione del tumore, agendo su processi associati al suo sviluppo.

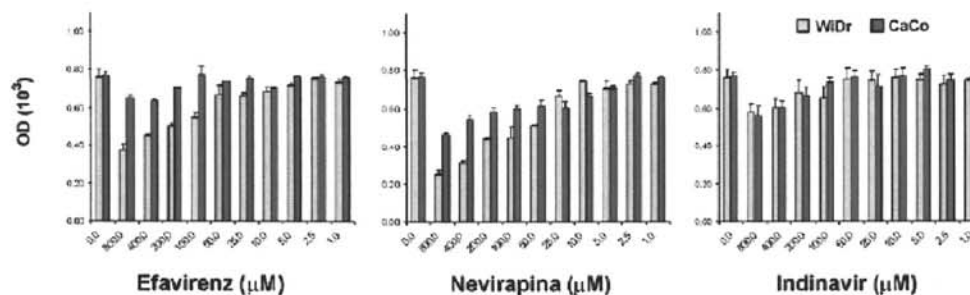
È' acquisizione recente che farmaci ad attività antiretrovirale, inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) ed inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI) siano anche in grado di esercitare attività anti-proliferativa nei confronti di cellule tumorali.

Nel presente progetto è stata preliminarmente indagata l'attività antitumorale di tali farmaci, su modelli preclinici, che rappresentano la fase di studio preliminare alla sperimentazione clinica sull'uomo. Successivamente siamo andati a saggiare l'efficacia anti-proliferativa (**Figura 1A**) e l'attività citotossica (**Figura 1B**) di Indinavir, Efavirenz e Nevirapina su due linee di adenocarcinoma del colon di derivazione umana (WiDr e CaCo). I tests eseguiti hanno evidenziato per Nevirapina ed Efavirenz un elevato effetto anti-proliferativo, maggiore rispetto a quello indotto da Indinavir. Tutte e tre le molecole analizzate hanno però dimostrato di possedere una ridotta attività citotossica. La linea cellulare CaCo è risultata maggiormente inibita nella proliferazione ma meno sensibile all'effetto citotossico esercitato dai farmaci,

A)



B)



rispetto alla linea WiDr (Tabella 1).

Figura 1. Effetto su **A)** proliferazione cellulare e **B)** metabolismo cellulare.

	CaCo	CaCo	WiDr	WiDr
	CC ₅₀ (μM)	PIC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	PIC ₅₀ (μM)
Efavirenz	2450.00	81.66	672.28	296.65
Nevirapina	1037.81	138.44	445.27	248.06
Indinavir	1373.61	474.86	1604.58	667.02

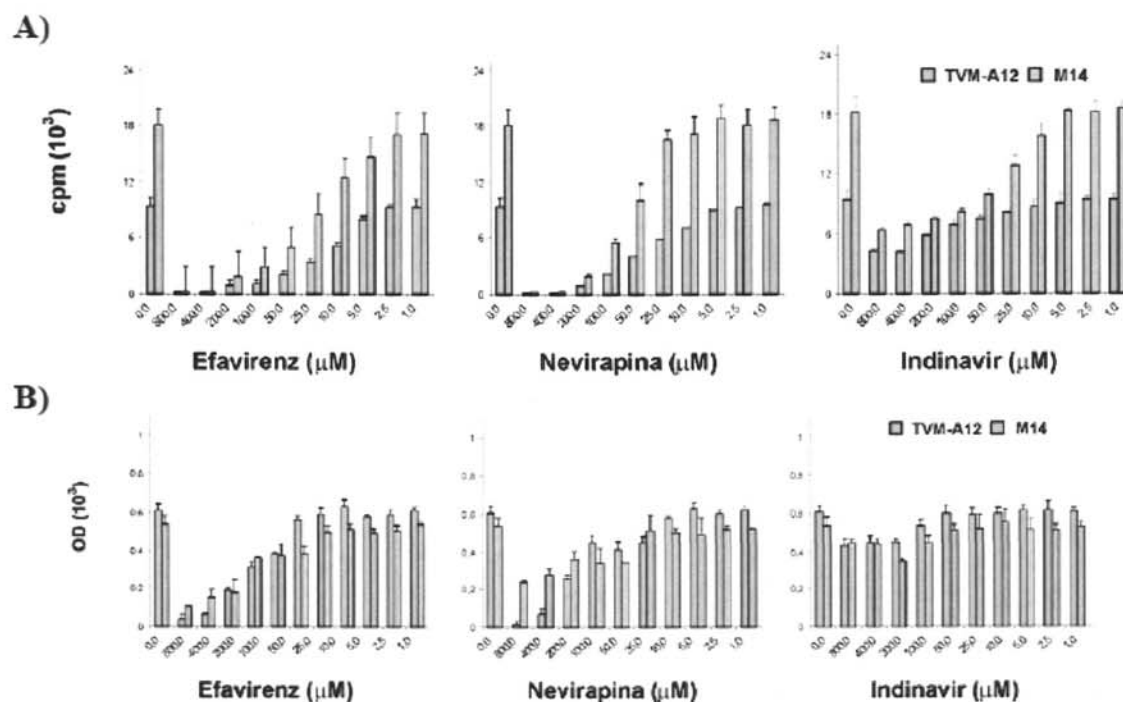
CC₅₀= Citotoxic concentration 50 calcolata mediante MTS assay

PIC₅₀= Proliferating inhibitory concentration 50 calcolata mediante incorporazione di timidina triziata

Tabella 1

Sulla base di nostri recenti studi sul coinvolgimento di un retrovirus endogeno umano (HERV-K) nel processo di progressione del melanoma, avevamo proposto come ulteriore obiettivo del presente

progetto quello di indagare l'efficacia sia di HIV-PI che di NNRTI nei confronti di cellule di melanoma. A tal fine è stata valutata l'attività anti-proliferativa (Figura 2A) e citotossica (Figura 2B) esercitata da Nevirapina, Efavirenz ed Indinavir nei confronti di due linee cellulari di melanoma umano (TVM-A12 e M14), in cui avevamo in precedenza dimostrato la presenza di un retrovirus endogeno, appartenente alla famiglia degli HERV-K. I dati ottenuti, riportati in Tabella 2 confermano quanto abbiamo già descritto



per le linee di adenocarcinoma del colon umano.

Figura 2. Effetto su: **A)** proliferazione cellulare e **B)** metabolismo cellulare.

	TVM-A12	TVM-A12	M14	M14
	CC ₅₀ (μM)	PIC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	PIC ₅₀ (μM)
Efavirenz	271.31	82.29	320.06	111.27
Nevirapina	286.68	175.53	547.17	187.97
Indinavir	1128.00	561.13	1935.00	352.82

CC₅₀= Citotoxic concentration₅₀ calcolata mediante MTS assay

PIC₅₀= Proliferating inhibitory concentration₅₀ calcolata mediante incorporazione di timidina triziata

Tabella 2

Poiché i dati ottenuti evidenziavano che gli NNRTI era quelli che maggiormente inibivano l'attività proliferativa cellulare, pur non inducendo un marcato effetto tossico, evidenziabile come variazione del metabolismo cellulare, siamo andati a verificare se l'inibizione della capacità replicativa potesse essere attribuita ad in potenziale effetto differenziante, come peraltro avevamo in precedenza già dimostrato nei confronti di un'altra linea di melanoma umano (A-375).

L'osservazione (mediante microscopia ottica, elettronica a scansione e confocale) conferma come entrambi i farmaci antiretrovirali, inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, siano in grado di modificare il fenotipo, in modo rapido (già dopo 4-5 gg dal trattamento), facendo acquisire alle cellule di melanoma umano una morfologia simil-dendritica, un'aumentata capacità adesiva al substrato ed una riorganizzazione del citoscheletro. In Figura 3 sono riportate le immagini relative al trattamento della

linea cellulare di melanoma umano TVM-A12 con il farmaco nevirapina. Nessun effetto differenziante è stato invece riscontrato nelle colture trattate con Indinavir.

Nell'ambito dello studio condotto sulla linea di melanoma umano TVM-A12 abbiamo occasionalmente osservato che mantenendo la coltura in presenza di una bassa concentrazione di siero bovino fetale (1%) le cellule crescevano in sospensione, anche quando la concentrazione di siero veniva riportata ai valori standard (10%). Tale fenomeno veniva invece inibito se le colture in monostrato venivano addizionate con Efavirenz, Nevirapina od Indinavir. L'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione delle cellule con fenotipo modificato evidenziava inaspettatamente la presenza di particelle virali, identificate come appartenenti alla famiglia dei retrovirus endogeni umani HERV-K.

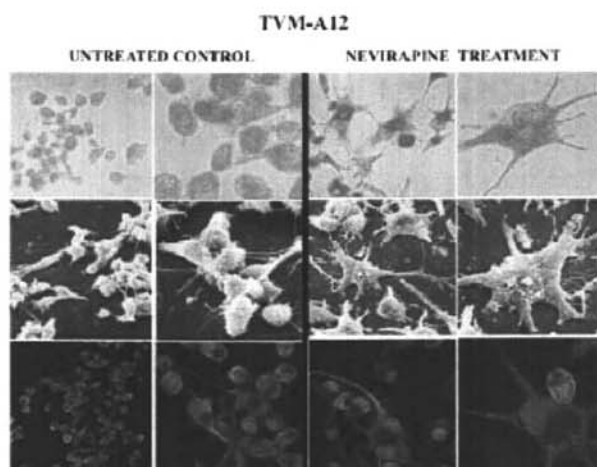


Figura 3

Sia sulla linea parentale di melanoma umano TVM-A12 che sulle cellule con crescita in sospensione (indicate come Clone 6) è stata valutata mediante Real Time PCR la capacità di Nevirapina, Efavirenz ed Indinavir di inibire l'espressione di HERV-K (Figura 4).

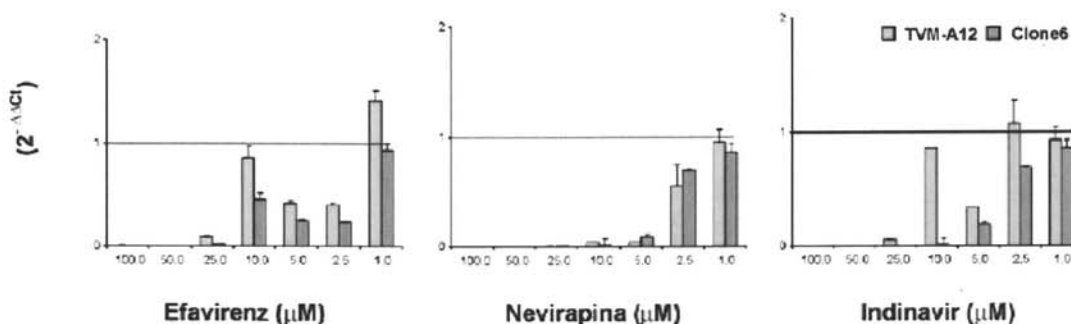


Figura 4

	TVM-A12	Clone 6
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
Efavirenz	11.37	8.01
Nevirapina	2.2	1.89
Indinavir	29.97	6.00

IC₅₀ = concentrazione inibitoria del 50% dell'espressione di HERV-K

Tabella 3

I dati riportati in Figura 4 evidenziano come Nevirapina sia il farmaco che presenta maggiore efficacia nell'inibire l'espressione virale ed Indinavir quello che risulta invece essere dotato di minore effetto. Le cellule del Clone 6, che corrispondono alla popolazione cellulare in cui il virus HERV-K risulta riattivato, sono ovviamente più sensibili all'inibizione dell'espressione del virus, rispetto alla linea parentale. Sugli stessi sistemi cellulari è stata anche valutata l'attività anti-proliferativa (Figura 5A) e citotossica (Figura 5B) esercitata dai farmaci oggetto dello studio.

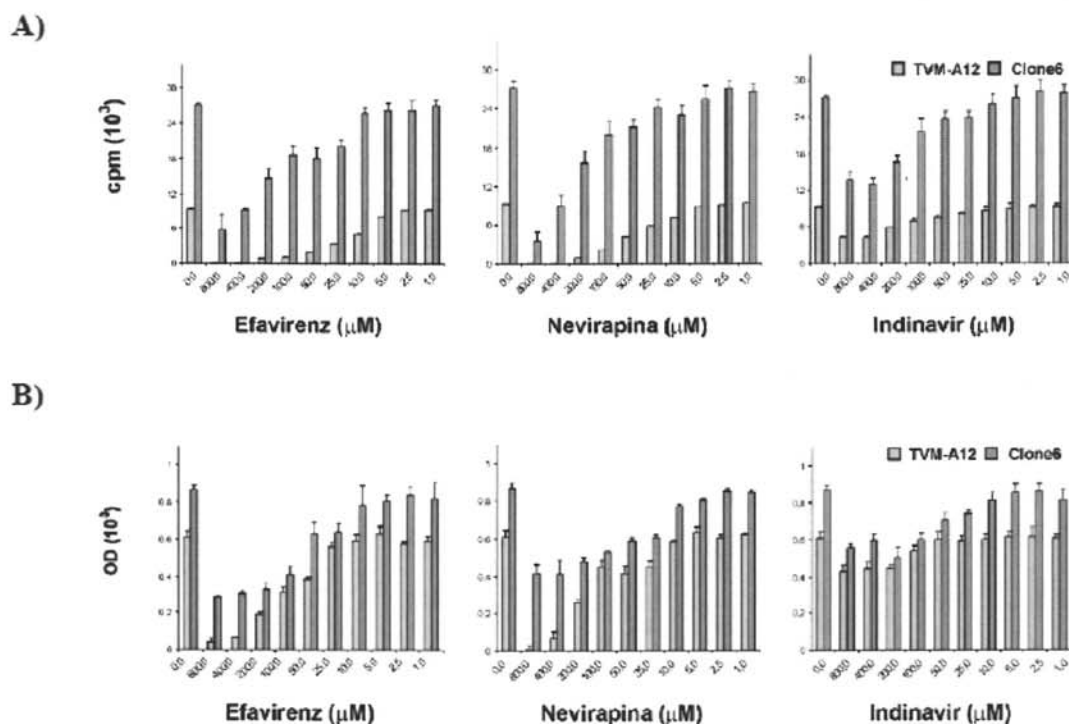


Figura 5. Effetto su: A) proliferazione cellulare e B) metabolismo cellulare.

	TVM-A12	TVM-A12	Clone 6	Clone 6
	CC ₅₀ (μM)	PIC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	PIC ₅₀ (μM)
Efavirenz	271.31	82.29	384.40	339.90
Nevirapina	286.68	175.53	560.75	358.54
Indinavir	1128.00	561.13	966.70	630.70

CC₅₀= Citotoxic concentration ₅₀ calcolata mediante MTS assay

PIC₅₀= Proliferating inhibitory concentration ₅₀ calcolata mediante incorporazione di timidina triaziata

Tabella 4

Confrontando poi le concentrazioni dei farmaci, attive nell'indurre attività citotossica ed antiproliferativa (Tabella 4), con quelle attive nell'inibire l'espressione virale (Tabella 3) risulta evidente come tutti e tre i farmaci possiedano un'elevata specificità antiretrovirale.

Conclusioni

La sperimentazione condotta ci permette di concludere che i farmaci antiretrovirali, siano essi inibitori della proteasi di HIV o inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, sono in grado di esercitare attività antitumorale, che sembra essere maggiore nei confronti delle cellule tumorali umane (adenocarcinoma di colon e melanoma) rispetto a quelle di derivazione murina o di ratto. L'attività anti-

proliferativa, associata a scarsa tossicità ed a marcata attività differenziante, sembrerebbe indicare tali farmaci come eccellenti antitumorali.

Nei confronti del melanoma poi, in cui nostri studi confermano la presenza all'interno delle cellule del tumore di retrovirus endogeni umani (HERV-K) riattivati, con ogni probabilità responsabili della progressione tumorale e della metastatizzazione, farmaci che associano proprietà antiretrovirale ed antitumorale sembrano rappresentare farmaci di elezione.

Risulta inoltre non trascurabile il fatto che tutti i farmaci che abbiamo preso in esame nello studio, sono 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 quali l'adenocarcinoma del colon e soprattutto il melanoma, che al momento non possiedono una terapia farmacologica soddisfacente.

Publicazioni:

- 1) Serafino A, Balestrieri E, Pierimarchi P, Matteucci C, Moroni G, Oricchio E, Rasi G, Mastino A, Spadafora C, Garaci E, Sinibaldi Vallebona P. The activation of human endogenous retrovirus K (Herv-K) is implicated in melanoma cell malignant cell transformation. *Exp Cell Res.* 2009 Mar 10;315(5):849-62.
- 2) Serafino A, Balestrieri E, Pierimarchi P, Matteucci C, Rasi G, Moroni G, Mastino A, Garaci E, Sinibaldi Vallebona P. Activation of human endogenous retrovirus-K and production of infectious virus-like particles in human melanoma cells. *Melanoma Research* 16: Sup. 1 September 2006.
- 3) Sinibaldi Vallebona P, Lavia P, Garaci E, Spadafora C. A role for endogenous reverse transcriptase in tumorigenesis and as a target in differentiating cancer therapy. *Gene, Chromosomes and Cancer* 45, 1-10, 2006.
- 4) Sciamanna I, Landriscina M, Pittoggi C, Quirino M, Mearelli C, Baraldi R, Mattei E, Serafino A, Cassano A, Sinibaldi Vallebona P, Garaci E, Barone C, Spadafora C. Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene* 24 (24) 3923-31, 2005.

Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 16 - Dr. Corrado Spadafora, SBGSA, ISS

1. Interazioni sinergiche antitumorali con inibitori della trascrittasi inversa (RT).

Questa parte del progetto, iniziata in collaborazione con la U.O. 14 (Barbara Ensoli), era originariamente finalizzata all'obiettivo di stabilire se gli inibitori non nucleosidici della RT (efavirenz, nevirapina) e gli inibitori delle proteasi (indinavir) fossero in grado di esercitare una sinergica e potenziata azione antitumorale se adoperati in combinazione. Lo studio è stato effettuato *in vitro*, su linee cellulari, ed *in vivo*, su topi nudi inoculati con cellule A-375 ed i risultati, riportati nei precedenti Progress Reports, sono stati sostanzialmente negativi. L'indinavir si è dimostrato poco efficace sia *in vitro* che *in vivo*, con l'eccezione nella fase di crescita terminale del tumore inoculato in topi nudi, e gli effetti osservati sono sostanzialmente equivalenti a quelli ottenuti con i soli inibitori non nucleosidici RT. Questo studio è stato successivamente esteso anche a combinazioni con inibitori nucleosidici di RT, come l'abacavir, ed in particolare sulla combinazione efavirenz/abacavir.

L'efavirenz (efv) e l'abacavir (abc) sono stati combinati a differenti concentrazioni ed i loro effetti testati sulla linea cellulare A-375 di melanoma umano dopo 96 ore di esposizione, come riassunto nella Fig. 1. In particolare, le combinazioni (efv 25 μ M + abc 75 μ M) e (efv 30 μ M + abc 75 μ M) hanno dimostrato un significativo effetto sinergico, che sostanzialmente annulla la proliferazione delle cellule esposte, rispetto agli effetti esercitati individualmente dai singoli composti. La Fig. 2 dimostra inoltre che, in concomitanza alla ridotta proliferazione, la combinazione delle due molecole - soprattutto efv 25 μ M + abc 75 μ M - induce morte cellulare. Al contrario, simili effetti non sono osservati su cellule non trasformate come i fibroblasti umani WI-38.

2. Sviluppo di una terapia genica finalizzata al silenziamento di LINE-1 utilizzando vettori virali.

Abbiamo riportato nei precedenti Reports gli effetti del silenziamento di LINE-1 per RNAi transitorio o permanente utilizzando un vettore retrovirale che esprime il piccolo RNA interferente diretto contro LINE-1. In entrambi i casi, la soppressione di LINE-1 tramite "RNA interference" provoca una ridotta proliferazione, una morfologia differenziata ed una minore tumorigenicità se le cellule interferite vengono inoculate in topi nudi. Questi dati sono stati oggetto di pubblicazioni negli anni precedenti. Allo scopo di valutare l'efficacia di tale approccio in esperimenti *in vivo* su modelli murini inoculati con tumori umani e per identificare il vettore virale più adatto a questo scopo, abbiamo esteso lo studio anche a vettori lentivirali ed adeno-associati (AAV). I lentivirus sono virus con genoma a RNA. Fanno parte della famiglia dei Retrovirus ma, a differenza dei retrovirus, sono in grado di infettare sia cellule in attiva divisione che cellule quiescenti. Allo scopo di ottenere un vettore lentivirale utilizzabile per terapia genica, abbiamo clonato all'interno del suddetto vettore lentivirale una sequenza oligonucleotidica di 19 bp che interferisce in maniera specifica con una porzione di sequenza dell'ORF1 della famiglia di LINE1 attiva in cellule umane. L'oligonucleotide di 19 bp è stato clonato all'interno del plasmide pLVTHM – che esprime anche il gene reporter GFP - ottenendo il vettore ricombinante pLVTHMshORF1h.

➤Proliferation assay (t: 96h):

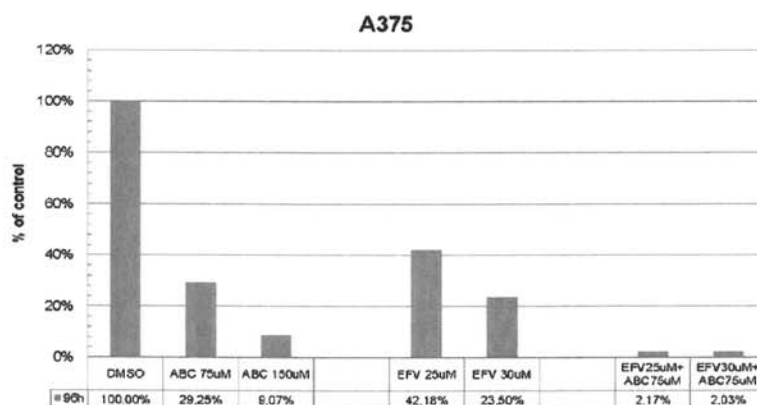


Figura 1

➤Cell death (t: 96h)

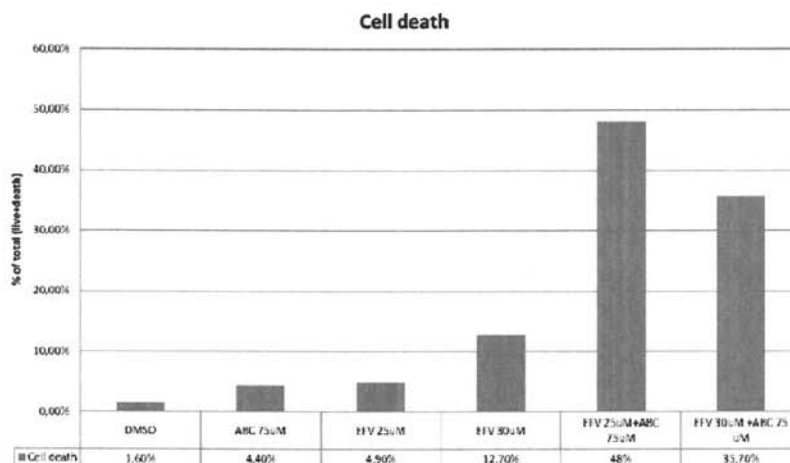


Figura 2.

Assieme al vettore lentivirale, lo stesso oligonucleotide di 19bp è stato clonato nel plasmide pAAV-MCS, ottenendo il vettore adenovirale ricombinante pAAV-shORF1h che verrà utilizzato per produrre dei vettori virali adeno-associati (AAV), virus con genoma a DNA a doppio filamento. In particolare, il vettore AAV ottenuto appartiene al sierotipo 2 (AAV2), il più efficiente per l'infezione della maggior parte dei tumori solidi e delle cellule del melanoma primario.

Entrambi i vettori sono stati utilizzati per un esperimento di trasfezione delle cellule 293T per verificare che il costrutto fosse in grado di esprimere correttamente l'oligonucleotide interferente, cosa che è stata confermata per Northern Blotting come riportato nella Fig. 3 (ultime due corsie).

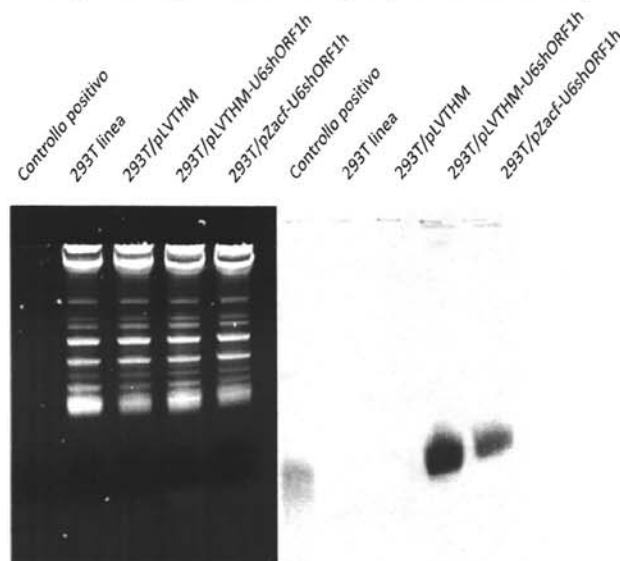


Figura 3

Il vettore lentivirale è stato utilizzato per produrre la progenie virale co-trasfettando le cellule 293T con il vettore ricombinante e i due vettori pCMV- Δ R8.2-dSaclI e pHCMVSV-G necessari per la produzione di particelle virali mature. Particelle lentivirali così ottenute contenenti il vettore lentivirale ricombinante LVTHM-shORF1h sono state testate infettando cellule A375.

Dal numero delle cellule GFP-fluorescenti, mostrato in **Fig. 4**, risulta che l'efficienza di infezione delle cellule A375 con il vettore virale è stato sufficientemente elevato. Tuttavia la fluorescenza tende a diminuire nel tempo indicando un probabile silenziamento della sequenza veicolata dal vettore. Esperimenti di RT-PCR sull'RNA delle cellule infettate, estratto in tempi diversi dall'infezione, confermano che non vi è silenziamento dell'ORF1 del retroelemento LINE1 nelle cellule infettate.

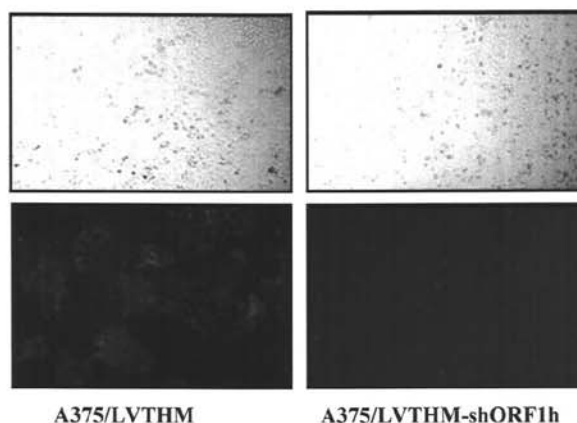


Figura 4

Lo stesso tipo di indagine è al momento in corso per valutare l'efficacia del vettore AAV2 ottenuto dal ricombinante pAAV-shORF1h.

3. Analisi per microarray del trascrittoma di cellule tumorali esposte ad inibitori RT.

Nell'ambito di questo programma avevamo caratterizzato l'alterazione dell'espressione dei "coding genes" in cellule di melanoma umano esposte ad inibitori dell'RT. In particolare, avevamo identificato circa 170 geni la cui espressione è fortemente modulata in seguito al trattamento rispetto alle stesse cellule non trattate. Estendendo il lavoro iniziato negli anni precedenti, nel corso del III° anno abbiamo investito una parte considerevole dei nostri sforzi in una ulteriore caratterizzazione della riprogrammazione del trascrittoma che segue l'inibizione dell' RT endogena. Paragonando i profili di espressione genica ottenuti attraverso nuovi screening per microarray di cellule A-375 esposte e non esposte a nevirapina ed efavirenz abbiamo identificato 20 microRNAs (miRNAs) ed oltre un centinaio di Ultra Conserved Coding Regions (UCRs) le cui espressioni sono fortemente modulate in seguito all'inibizione di RT. Questi nuovi risultati, in aggiunta a quelli precedentemente ottenuti, rivelano per la prima volta che la RT endogena svolge un ruolo regolativo non solo sull'espressione dei geni codificanti ma anche su quelli non codificanti e, più in generale, sull'intero trascrittoma nucleare. Questi risultati sono oggetto di un manoscritto in fase di completamento.

Pubblicazioni

- 1) Oricchio E, Sciamanna I, Beraldi R, Tolstonog GV, Schumann GG, Spadafora C. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. *Oncogene*. 2007 26, 4226-4233.
- 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 and Spadafora C. Retrotransposons, reverse transcriptase and the genesis of new genetic information. *GENE* (sottomesso per la pubblicazione)
- 6) Oricchio E, Sciamanna I and Spadafora C. Non-nucleosidic Reverse Transcriptase Inhibitors Antagonize Human LINE-1 Retrotransposition in Tumor Cells. (sottomesso per la pubblicazione a PLoS ONE)

ALLEGATO 1**Progetto di ricerca su terapie oncologiche innovative
(ONCOTECNOLOGIA)- RENDICONTO COMPLESSIVO**

Finanziamento ex art. 2 comma 1, d.l. 89/2003

IMPORTO COMPLESSIVO FINANZIAMENTO EURO 9.000.000

TITOLO DELLA RICERCA	FINANZIAMENTO utilizzato
Attività di coordinamento dell'Istituto Superiore di Sanità	505.004,00
Le basi metodologiche per una chemioterapia anti-tumorale mirata: il saggio dell'EDR nel carcinoma ovarico ed in altre neoplasie	2.220.000,00
Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi	2.160.000,00
Le basi cellulari della farmacoresistenza tumorale: le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi antiapoptici	2.015.000,00
Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative	699.999,00
Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di NF-kB e di "scavengers" di radicali liberi in modelli animali di cancro del colon, della mammella e della prostata	469.998,00
Regolazione del turnover di Bcl-2 RNA mediante RNA antisense	230.000,00
Sviluppo di nuove terapie antitumorali basate sui farmaci anti-retrovirali inibitori della proteasi di hiv e inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, da soli o combinati: studi preclinici in vitro ed in vivo	699.999,00
	€ 9.000.000,00