

SENATO DELLA REPUBBLICA

————— XIV LEGISLATURA —————

Doc. CCXIV
n. 1

RELAZIONE

SULLO STATO DI REALIZZAZIONE DEL PROGETTO
ONCOTECNOLOGICO DA PARTE DELL'ISTITUTO
SUPERIORE DI SANITÀ FINALIZZATO A SVILUPPARE
TERAPIE ONCOLOGICHE INNOVATIVE SU BASE
MOLECOLARE

(Anno 2004)

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

Presentata dal Ministro della salute

(SIRCHIA)

—————
Comunicata alla Presidenza il 4 aprile 2005
—————

SOMMARIO

Il Programma Oncotecnologico mira a sviluppare nuove ed efficaci terapie anti-tumorali, sulla base delle più recenti acquisizioni della tecnologia biomedica. Il programma prevede l'esecuzione di diversi approcci scientifico-strategici, utilizzando collaborazioni multipolari tra laboratori afferenti all'ISS, agli IRCCS ed ai centri di ricerca universitari ed extra-universitari. Come dettagliato di seguito, il Programma ha già conseguito diversi risultati biomedici significativi, pubblicati su riviste scientifiche assai qualificate, e di conseguenza recensiti dai media nazionali ed internazionali.

- Il Sottoprogetto I è focalizzato sul test in vitro di resistenza delle cellule tumorali ai chemioterapici antitumorali a dosaggi assai elevati (test "extreme drug resistance", EDR), capace di predire la combinazione ottimale di farmaci da adottare in ciascun paziente. È iniziato uno studio clinico randomizzato multicentrico per valutare in forma conclusiva l'impatto clinico-terapeutico del test EDR. Questo sottoprogetto è inizialmente focalizzato sui tumori ovarici e verrà poi esteso a quelli della mammella e ad altre neoplasie solide, avvalendosi di nuove procedure di saggio automatizzato. L'applicazione estensiva di questo approccio di chemioterapia "mirata" condurrebbe ad evidenti benefici sul piano clinico-terapeutico e a una rilevante riduzione di spesa per il SSN.

Gli altri Sottoprogetti prevedono:

- Strategie basate sull'analisi genomica delle cellule tumorali, mediante l'uso dei cosiddetti "gene arrays" che consentiranno di (a) identificare i meccanismi molecolari della farmacoresistenza e (b) di sviluppare farmaci capaci di interferire specificamente a livello dei processi molecolari oncogenetici, limitando gli effetti secondari sulle cellule normali (Sottoprogetto II). In quest'ambito sono stati identificati dei nuovi marcatori prognostici e una serie di alterazioni molecolari responsabili della crescita tumorale e della bassa risposta alla chemioterapia che caratterizza una parte consistente dei carcinomi renali, mammari e ovarici. Inoltre sono stati proposti dei modelli preclinici molto promettenti per la cura di queste patologie.

- Studi di biologia cellulare e molecolare che mirano ad ottimizzare le terapie anti-tumorali in modelli preclinici, sia attraverso l'isolamento e l'utilizzo di cellule staminali neoplastiche (Sottoprogetto III), sia interferendo con la neangiogenesi e il microambiente tumorale (Sottoprogetto IVA). Questi studi hanno già fornito informazioni del massimo rilievo sulla patogenesi e sulla terapia dei tumori cerebrali, del colon, della tiroide e della mammella, per i quali è stato possibile allestire dei modelli sperimentali preclinici assai affidabili. Inoltre è stata proposta una nuova terapia biologica pro-apoptotica per la cura dei glioblastomi, tumori altamente maligni caratterizzati da una sopravvivenza media di appena un anno.

- L'allestimento di una serie di modelli sperimentali che permettano di ottimizzare l'impiego di molecole antiflogistiche nelle neoplasie della mammella, della prostata e del colon-retto (Sottoprogetto IVB). In quest'ambito sono stati messi a punto dei modelli sperimentali particolarmente sofisticati che permetteranno di sviluppare nuove terapie per delle condizioni patologiche che costituiscono un obiettivo primario della

ricerca oncologica, come l'insorgenza di metastasi epatiche nei carcinomi del colon-retto.

- L'utilizzo di sequenze antisense per la modulazione dell'espressione di bcl2 nei linfomi a cellule B follicolari: questa proposta si colloca nel quadro generale delle terapie con sequenze antisense, potenzialmente assai rilevanti sia a livello sperimentale, sia anche per l'applicazione clinica (Sottoprogetto V). Durante questo primo anno sono state disegnate una serie di molecole che verranno presto validate per essere utilizzate in terapia.

- Un approccio innovativo di terapia antitumorale, basata sull'uso di farmaci anti-retrovirali inibitori della proteasi di HIV e della trascrittasi inversa, da impiegare da soli o in combinazione in una serie di studi in vitro e in vivo (Sottoprogetto VI). In questo primo anno sono state ottenute una serie di evidenze sperimentali che confermano la potenziale efficacia terapeutica di questi inibitori sui tumori del polmone, del colon, della prostata e sul melanoma.

RELAZIONE ANNUALE SULLO STATO DI REALIZZAZIONE

SINTESI INTRODUTTIVA

Il sottoprogetto I intitolato "Le basi metodologiche per una chemioterapia anti-tumorale mirata: il saggio dell'*extreme drug resistance* nel carcinoma ovario ed in altre neoplasie" è stato dedicato alla messa a punto del test dell'*extreme drug resistance* (EDR). Questo test consiste nel valutare in vitro, in maniera clinicamente predittiva, il grado di chemioresistenza delle cellule tumorali del carcinoma ovarico nei confronti dei farmaci anti-tumorali comunemente utilizzati nel trattamento di questa neoplasia. Durante il 2004 questo test è stato eseguito su più di 150 casi di carcinoma dell'ovaio. I risultati del test nei casi finora analizzati ci hanno consentito di valutare il profilo di chemioresistenza in vitro del carcinoma ovarico: il 10% delle pazienti presenta una resistenza completa al cisplatino/carboplatino; il 35% delle pazienti presenta una resistenza completa al tavolo/taxotere. Sono anche disponibili anche tutti i profili di chemioresistenza anche per tutti gli altri farmaci utilizzati nella terapia del carcinoma ovarico. Queste osservazioni hanno avuto un ruolo fondamentale nel ridisegnare lo studio clinico controllato di fase III che verrà realizzato nell'immediato futuro e che si baserà nel paragonare la sopravvivenza in un gruppo di pazienti sottoposte a chemioterapia standard (carboplatino+taxotere) o a chemioterapia mirata in base ai risultati del test dell'EDR. In parallelo è stato possibile dimostrare che cellule primarie di carcinoma ovarico resistenti al cisplatino ed al tavolo sono sensibili all'azione di inibitori del proteosoma, quali MG132 e Velcade (quest'ultimo è già disponibile come farmaco utilizzabile in clinica). TRAIL è una citochina appena entrata in una serie di trias clinici di fase 1 per la sua azione antitumorale specifica e apparentemente priva di effetti collaterali. In una serie di esperimenti, è stato dimostrato che l'azione anti-tumorale degli inibitori del proteosoma viene considerevolmente potenziata da TRAIL. Queste osservazioni potrebbero rappresentare la base per lo sviluppo di trattamenti alternativi del carcinoma dell'ovaio, soprattutto delle forme chemioresistenti.

Il sottoprogetto II intitolato "Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi" ha fornito dei dati estremamente importanti per lo sviluppo di nuove terapie per la cura dei carcinomi renali, mammari e ovarici.

Attraverso un'analisi approfondita dei carcinomi del dotto collettore del rene, che rappresentano una variante molto aggressiva dei tumori renali, sono state individuate delle alterazioni responsabili della crescita tumorale e della bassa risposta alla chemioterapia che caratterizza questi tumori. In particolare, i geni di soppressione tumorale FEZ1, Fhit e p27 sono spesso assenti o poco espressi nella maggioranza di questi tumori. Pertanto si stanno costruendo una serie di vettori che consentano una efficace terapia genica per questi tumori per i quali non esistono in atto terapie risolutive.

L'assenza del gene di soppressione tumorale FEZ1 è strettamente associato alla resistenza al taxolo nei tumori della mammella. Per identificare i meccanismi molecolari alla base di questa resistenza alla terapia con taxani,

sono stati creati dei sofisticati modelli cellulari di carcinoma della mammella che permettono di modulare l'espressione di FEZ1 e di studiarne in maniera estremamente precisa l'azione antitumorale, in modo tale da fornire una serie di informazioni cruciali per l'identificazione di importanti bersagli farmacologici.

Informazioni di estremo rilievo 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. Inoltre, all'interno dei tumori ovarici sono stati confrontati quelli resistenti a quelli sensibili alla chemioterapia. Da questi studi sono emersi dei dati estremamente rilevanti dal punto di vista terapeutico. I tumori chemioresistenti hanno mostrato un'elevata espressione del gene c-erb-B2 e della corrispondente proteina HER2/neu. Se da una parte questa proteina conferisce una estrema aggressività e resistenza ai chemioterapici, questi dati suggeriscono di poter trattare efficacemente con l'Herceptin i tumori ovarici resistenti alla chemioterapia, dato che questo anticorpo specifico per HER2/neu viene utilizzato con successo nella terapia di alcuni tipi di carcinoma della mammella. Inoltre, sempre dall'analisi di questi profili genici, è emerso che, a differenza delle normali, le cellule di carcinoma ovarico esprimono claudina 3 e claudina 4, i recettori naturali della enterotossina del *Clostridium Perfringens*. Poiché un'espressione elevata di questi recettori conferisce grande sensibilità all'attività citotossica della tossina, mentre le cellule dei tessuti normali (che sono caratterizzate da una bassa espressione della claudina 3 e 4) sono insensibili al suo effetto citotossico, la somministrazione intraperitoneale di enterotossina del *Clostridium Perfringens* può rappresentare una nuova terapia altamente specifica e potenzialmente efficace per il trattamento dei tumori ovarici chemioresistenti. 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 sottoprogetto III intitolato "Le basi cellulari della farmacoresistenza tumorale: le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi anti-apoptotici" ha fornito durante il primo anno di attività dati e indicazioni di estremo rilievo sia per la patogenesi che per la terapia oncologica. Sono state infatti isolate dai tumori del colon, del cervello, della tiroide, dello stomaco, della mammella e dell'ovaio delle cellule indifferenziate che con ogni probabilità costituiscono la sorgente cellulare di queste neoplasie. Queste cellule sono state coltivate ed espanse in vitro in modo tale da poterne studiare l'espressione dei geni coinvolti nella cancerogenesi e nella risposta alla terapia citotossica. Inoltre, le putative cellule staminali neoplastiche di carcinoma della tiroide, del colon, della mammella e di glioblastoma sono state inoculate sottocute in topi immunodeficienti che dopo 4-6 settimane hanno mostrato la comparsa di un tumore istologicamente molto simile al tumore del paziente da cui sono state isolate queste cellule. La possibilità di riprodurre nell'animale il tumore che colpisce un singolo paziente costituisce uno strumento formidabile sia per studi diagnostici che per l'allestimento di modelli preclinici che consentano una validazione particolarmente affidabile delle terapie sperimentali.

Attraverso l'impiego di cellule primarie di glioblastoma è stata individuata una possibile strategia terapeutica per la cura di questi tumori che sono considerati incurabili e conducono invariabilmente alla morte i pazienti che ne sono affetti pochi mesi dopo la diagnosi. Tramite un'analisi dell'espressione dei geni che regolano la risposta terapeutica a TRAIL sono stati individuate le alterazioni dei mediatori della morte cellulare espressi in modo alterato nei glioblastomi. La ridotta espressione di caspasi 8 e del recettore 1 di TRAIL è stata trovata associata all'aumentata espressione di PEA-15/PED, un gene che inibisce la morte cellulare. Queste alterazioni sono responsabili della refrattarietà a TRAIL di questi tumori. In una serie di esperimenti in vitro e in vivo, è stato possibile rimuovere queste alterazioni e rendere sensibile a TRAIL i glioblastomi tramite l'impiego di decitabina, un inibitore delle metiltrasferasi attualmente utilizzato in trias di fase II per la terapia di tumori ematologici. L'impiego combinato di decitabina e TRAIL ha permesso di curare topi trapiantati con glioblastomi di origine umana.

Infine sono stati condotti una serie di studi sul ruolo dei microRNA nella tumorigenesi, specificamente a livello delle cellule staminali neoplastiche. Questi piccoli RNA si legano a specifiche sequenze complementari presenti in una serie di RNA messaggeri che per lo più non sono ancora stati identificati. In questo primo anno è stato dimostrato un coinvolgimento dei microRNA nella leucemia linfocitica cronica di tipo B dove miR-15 e miR-16 sono frequentemente assenti o poco espressi nel 68% dei pazienti analizzati. Dato che l'analisi di questi microRNA richiede un'elevata quantità di materiale biologico, spesso non disponibile, è stato messo a punto un microarray di oligonucleotidi di lunghezza di 40basi, contenenti 368 sonde specifiche per microRNA umani e murini. 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. Pertanto in futuro potremo utilizzare 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. Tramite l'impiego di questo chip, è stata analizzata l'espressione dei microRNA nelle cellule staminali neurali confrontandole con le staminali neoplastiche di glioblastoma. I microRNA espressi in maniera differenziale sono attualmente oggetto di studio. La possibilità di utilizzare i microRNA in vivo potrebbe offrire un eccezionale strumento terapeutico per la terapia dei tumori, a livello delle cellule staminali neoplastiche.

Nell'ambito del **sottoprogetto IVA** intitolato "Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative" è stato svolto un notevole lavoro preparatorio per lo sviluppo di nuove terapie basate sull'inibizione della neoangiogenesi tumorale. Sono state analizzate cellule microvascolari di cervello, polmone e sottocute, paragonandole a cellule macrovascolari di aorta, attraverso una analisi di 12.000 diversi geni. Inoltre il fattore angiogenetico FGF2, di estrema rilevanza nella neoangiogenesi tumorale, è stato espresso in cellule micro- e macrovascolari che sono poi state analizzate per l'espressione di 22.000 diversi trascritti. Questi studi hanno permesso di identificare una serie di geni che

costituiscono potenziali bersagli terapeutici per bloccare l'angiogenesi e la metastatizzazione tumorale. I geni coinvolti appartengono alla famiglia dei fattori di crescita e dei loro recettori, oppure codificano per proteine coinvolte nel segnale intracellulare, proteasi e proteine della matrice extracellulare. Tra i geni maggiormente e costantemente indotti dall'FGF2 rientra sicuramente il gene per l'osteopontina, proteina coinvolta nella crescita e metastatizzazione tumorale.

Per quanto riguarda la creazione di strumenti farmacologici per inibire i meccanismi pro-angiogenesi identificati, sono state caratterizzate nuove eparine biotecnologiche a basso peso molecolare, che inibiscono l'attività angiogenetica di FGF2, e una serie di derivati del trans-resveratrolo, caratterizzati da una attività antiangiogenetica basata sulla capacità di destabilizzare i microtubuli delle cellule endoteliali.

Inoltre è stato individuato il meccanismo responsabile dell'azione anti-angiogenetica degli inibitori delle proteasi dell'HIV (indinavir e saquinavir) che si sono dimostrati in grado di far regredire le lesioni angioproliferative in modelli di sarcoma di Kaposi. Una serie di studi molecolari e cellulari hanno dimostrato che questi composti non agiscono direttamente sulle proteasi della matrice, ma esercitano le proprie azioni anti-angiogeniche e anti-invasive interferendo con il legame delle integrine ai substrati, con la loro attivazione e/o con la loro rilocazione nei lamellipodi e negli invadopodi. Inoltre è stato evidenziato che l'integrina $\alpha_v\beta_3$ è un bersaglio preferenziale di questi farmaci, spiegando così, almeno in parte, la loro capacità di inibire l'attivazione autoproteolitica delle proteasi della matrice.

Infine, sempre per quanto concerne gli studi sulla neoangiogenesi, sono stati generati dei vettori che consentiranno di creare topi con espressione tessuto-specifica ed inducibile dei vari recettori del VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) e dell'angiopoietina-2, consentendo un approccio sistematico nel knocking out dei geni fondamentali per l'angiogenesi e la vasculogenesi. Il motivo per il quale è stato utilizzato il sistema Cre-lox è dovuto alla mortalità embrionale del knockout costitutivo.

Questo tipo di studi potrebbe fornire delle informazioni fondamentali per lo sviluppo di terapie antitumorali basate sull'inibizione dell'angiogenesi e della formazione delle metastasi.

Il sottoprogetto IVB intitolato "Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di NF- κ B e di scavengers di radicali liberi in modelli murini di carcinoma del colon, mammario e della prostata", ha fornito una serie di dati che dimostrano come i principali componenti della risposta infiammatoria siano attivi nelle cellule dei tumori della prostata in progressione. Infatti, le proteine classicamente espresse nei leucociti durante l'infiammazione (iNOS e COX-2) sembrano essere indotte gradualmente durante la trasformazione tumorale delle cellule prostatiche. Nell'ipotesi che queste proteine infiammatorie contribuiscano alla trasformazione e alla crescita tumorale, è stato eseguito un trattamento in vivo con inibitori di NF- κ B e con scavengers di radicali liberi in tre modelli murini. A questo scopo sono stati predisposti ed espanse le colonie di due ceppi di topi transgenici predisposti al carcinoma mammario e al cancro prostatico. E' stato eseguito

un lavoro preliminare allo scopo di controllare, mediante un esame temporale, l'insorgenza del tumore nell'organo bersaglio e la presenza di eventuali metastasi in organi distanti. Questo obiettivo è stato perseguito mediante un'autopsia sistematica e lo studio istologico dei linfonodi regionali dell'organo-bersaglio e dei principali organi distanti. Gli studi iniziali sono stati condotti sui modelli del topo transgenico per il carcinoma mammario e nel cancro del colon del ratto trattato con un cancerogeno chimico (DMH - 1,2 dimetil-idrazina). Non si hanno ancora risultati sull'obiettivo di questo protocollo. I trattamenti dovrebbero terminare tra marzo e aprile del 2005. In questo stesso modello con DMH - 1,2 dimetil-idrazina si vuole inoltre dimostrare che il controllo della risposta flogistica rallenta la comparsa di metastasi epatiche. Pertanto è stato effettuato uno studio preliminare che utilizza l'inoculazione nella vena splenica di cellule tumorali di ratto singenico per indurre comparsa delle metastasi epatiche, in funzione della quantità delle cellule inoculate. Questo modello permetterà di valutare in maniera affidabile la capacità degli inibitori in esame di bloccare la diffusione metastatica al fegato dei tumori del colon.

Il sottoprogetto V intitolato "Regolazione del turnover di Bcl2 mediante RNA antisense" ha fornito una serie di dati sull'individuazione di trascritti antisense per Bcl2 nel database delle sequenze EST non ancora identificate. Inoltre è stato effettuato un minuzioso lavoro preliminare per la realizzazione di una RT-PCR filamento-specifica e per la valutazione dell'espressione dell'RNA antisense e di Bcl2 nel linfoma follicolare. I meccanismi molecolari del turnover dell'RNA messaggero di Bcl2 sono stati analizzati in relazione all'interazione della regione 3'UTR con le diverse proteine di legame ARE. Utilizzando il sistema dei tre ibridi è stata individuata una nuova proteina umana che interagisce con l'ARE di bcl-2 denominata TINO. È stato dimostrato che il legame di TINO all'ARE di bcl-2 svolge un'azione regolatoria negativa sui livelli post-trascrizionali di bcl-2. Infine, sono stati disegnati una serie di oligoribonucleotidi che permettono di regolare il turnover di Bcl2. In seguito alla validazione di questi nucleotidi, si procederà a valutare la loro attività antitumorale, anche in combinazione con farmaci citotossici convenzionali.

Il sottoprogetto VI intitolato "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" ha fornito una serie di dati in vitro e in vivo che hanno validato l'effetto anti-angiogenico ed anti-tumorale degli inibitori delle proteasi dell'HIV. Inoltre è stata esaminata, in linee tumorali di vario tipo, l'azione degli inibitori della trascrittasi inversa sulla proliferazione di cellule di carcinoma polmonare e di adenocarcinoma coloretale, melanoma e carcinoma prostatico. L'esposizione di queste cellule ad inibitori farmacologici della trascrittasi inversa (nevirapina ed efavirenz) ha mostrato un drastico rallentamento della proliferazione e l'induzione di un processo differenziativo caratterizzato da cambiamenti morfologici e dalla comparsa di specifici marcatori.

Infine è stato condotto uno studio *in vivo* con efavirenz, in topi nudi inoculati con cellule tumorali umane di microcitoma, melanoma, colon carcinoma e carcinoma prostatico. Come osservato *in vitro*, anche *in vivo* il trattamento degli animali con efavirenz ha rallentato o bloccato del tutto la crescita dei quattro tipi di tumore. Questi risultati suggeriscono che gli inibitori della trascrittasi inversa possono costituire un'importante risorsa farmacologica nella terapia dei tumori solidi.

RELAZIONE DETTAGLIATA SULL'ATTIVITA' DEI SOTTOPROGETTI

Sottoprogetto I

U.O. 01: Le basi metodologiche per una chemioterapia anti-tumorale mirata: il saggio dell'EDR nel carcinoma ovarico ed in altre neoplasie Responsabile Scientifico: Cesare Peschle

L'attività di ricerca svolta durante il 2004 è stata rivolta essenzialmente alla messa a punto del test dell'extreme drug resistance (EDR). Questo test consiste nel valutare in vitro, in maniera clinicamente predittiva, il grado di chemioresistenza delle cellule tumorali del carcinoma ovarico nei confronti dei farmaci anti-tumorali comunemente utilizzati nel trattamento di questa neoplasia. Il test viene effettuato utilizzando un pezzo di tessuto tumorale ottenuto durante la rimozione chirurgica dello stesso, che viene dapprima ridotto in piccoli pezzi e successivamente digerito con enzimi che disaggregano la matrice extracellulare in modo da ottenere una sospensione cellulare composta da cellule isolate e da piccoli ammassi di cellule tumorali. Le cellule tumorali così isolate vengono coltivate in vitro in agar 0.8%, una condizione che consente la crescita selettiva delle cellule tumorali, in assenza ed in presenza dei vari farmaci utilizzati nella terapia del carcinoma ovarico. Dopo tre giorni di coltura viene aggiunta della timidina triziata e dopo altri due giorni di coltura vengono raccolte le cellule e vengono misurati i livelli d'incorporazione della timidina radioattiva nel DNA delle cellule tumorali. Se i farmaci hanno inibito la proliferazione delle cellule tumorali si osserva una forte diminuzione dei livelli d'incorporazione della timidina, mentre se essi non hanno inibito la proliferazione delle cellule tumorali i livelli d'incorporazione di timidina risulteranno simili a quelli osservati nel controllo.

Durante il 2004 abbiamo eseguito questo test su più di 150 casi di carcinoma dell'ovaio. Questo studio ci ha consentito di mettere a punto il test presso il nostro laboratorio e di validarlo ai fini di un suo possibile utilizzo di supporto all'attività clinica. In particolare, è stato possibile eseguire il test nel 78% dei casi analizzati: l'insuccesso era dovuto in circa il 90% dei casi alla disponibilità di quantità troppo limitate di tessuto tumorale e nel 10% ad una vitalità cellulare non ottimale. I risultati del test nei casi finora analizzati ci hanno consentito di valutare il profilo di chemioresistenza in vitro del carcinoma ovarico: il 10% delle pazienti presenta una resistenza completa al cisplatino/carboplatino; il 35% delle pazienti presenta una resistenza completa al tavolo/taxotere. Sono anche disponibili anche tutti i profili di chemioresistenza anche per tutti gli altri farmaci utilizzati nella terapia del carcinoma ovarico. Queste osservazioni hanno avuto un ruolo fondamentale nel ridisegnare lo studio clinico controllato di fase III che verrà realizzato nell'immediato futuro e che si baserà nel paragonare la sopravvivenza in un gruppo di pazienti sottoposte a chemioterapia standard (carboplatino+taxotere) o a chemioterapia mirata in base ai risultati del test dell'EDR.

In parallelo, una serie di ricerche di laboratorio è stata attivata. Nell'ambito di un primo filone di ricerca abbiamo determinato che la frazione di cellule CD44⁺/CD24⁻ contiene le cellule che sono in grado di generare in vitro colonie

di cellule tumorali attivamente proliferanti; studi successivi chiariranno se queste cellule sono in grado di sviluppare in vivo il tumore dopo inoculo in topi immunodeficienti. Nell'ambito di un secondo filone di ricerca è stato possibile dimostrare che cellule primarie di carcinoma ovarico resistenti al cisplatino ed al taxolo sono sensibili all'azione di inibitori del proteosoma, quali MG132 e Velcade (quest'ultimo è già disponibile come farmaco utilizzabile in clinica). L'azione anti-tumorale degli inibitori del proteosoma viene considerevolmente potenziata da TRAIL, una citochina che attiva due potenti recettori di morte cellulare. È interessante notare che le cellule di carcinoma dell'ovaio sono resistenti a TRAIL, ma in seguito al trattamento con inibitori del proteosoma vengono rese sensibili alla sua azione citolitica. Quest'azione permissiva degli inibitori del proteosoma sull'azione citotossica di TRAIL sembra essere dovuta in larga misura ad un'inibizione dell'espressione di molecole anti-apoptotiche della famiglia IAP. Questa interpretazione è direttamente supportata dall'osservazione che l'effetto degli inibitori del proteosoma viene mimato da piccoli peptidi che fungono da inibitori delle proteine IAP. Queste osservazioni potrebbero rappresentare la base per lo sviluppo di trattamenti alternativi del carcinoma dell'ovaio, soprattutto delle forme chemioresistenti.

Sottoprogetto II

U.O. 02: Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi

Responsabile Scientifico: Carlo M. Croce

In questo primo anno è stato studiato il ruolo di FEZ1 nel carcinoma renale. Il carcinoma del dotto collettore del rene rappresenta una variante rara, ma molto aggressiva del carcinoma renale. Ha origine dall'epitelio del dotto di Bellini, nella porzione distale del nefrone. 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 così selezionati undici pazienti sottoposti a nefrectomia radicale per la presenza di carcinoma al dotto collettore del rene. Tutti i pazienti hanno avuto diagnosi documentata del carcinoma e nessuno di loro è stato sottoposto a terapia sistemica prima dell'asportazione del tumore. L'espressione dei cinque markers è stata valutata in associazione con l'analisi del decorso clinico (metastasi e stadio) con il test di Fisher. Per l'analisi sulla sopravvivenza è stato usato il metodo di Kaplan/Meier.

L'analisi immunohistochemica è stata ottenuta mediante procedure standard: le sezioni in paraffina sono state deparaffinate, reidratate con concentrazioni decrescenti di etanolo e montate. Per l'analisi sono stati utilizzati gli anticorpi anti-FEZ1, anti-Fhit, anti-p53, anti-p27, anti-Bcl2.

I risultati mostrano che FEZ1 è non rilevabile o ridotta nel 64% dei casi. Fhit è assente nel 27% dei casi, mentre l'overespressione di p53 è stata osservata nel 36% dei casi. L'analisi ha mostrato inoltre che p27 è assente in 5 degli 11 casi (45,5%). In 5 dei sei positivi p27 sembra espressa solo al livello citoplasmatico, mentre solo in uno è rilevabile anche al livello nucleare. L'espressione di Bcl2 è presente nel 36% dei tumori considerati. Inoltre vi è

una correlazione ($P= 0.06$) tra perdita e riduzione dell'espressione di Fez e la presenza di metastasi lisonodali (1). Questi risultati ci permetteranno di ottimizzare le strategie di terapia genica sul carcinoma renale.

Pubblicazioni:

Vecchione A, Galetti TP, Gardiman M, Ishii H, Giarnieri E, Pagano F, Gomella LG, Croce CM, Baffa R.:Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical study of 11 cases. BMC Urol 2004, 4: 11-19

U.O. 03: Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi
Responsabile Scientifico: Alessandro D. Santin

Il cancro epiteliale dell'ovaio rimane la neoplasia ginecologica gravata dalla più alta letalità. Sebbene la maggioranza delle pazienti con cancro ovarico inizialmente risponda alla chirurgia e alla chemioterapia adiuvante basata sulla combinazione standard con Carboplatino e Taxolo, quasi il 90% sviluppa una recidiva neoplastica e inevitabilmente muore per malattia resistente alla chemioterapia. La scoperta di nuove terapie efficaci per il trattamento del tumore ovarico resistente alle terapie convenzionali rimane un'altissima priorità.

Attraverso lo studio dei profili di espressione genica basati sulla simultanea analisi di oltre 10,000 geni, il nostro gruppo di ricerca ha recentemente identificato una serie di geni altamente e differenzialmente espressi nei tumori ovarici. Tra questi geni quelli codificanti per i recettori di membrana denominati Claudina 3 e Claudina 4 sono risultati oltre 40 volte più espressi nei tumori ovarici rispetto al tessuto ovarico normale (*Santin et al., Int. J. Cancer, 112;14-25;2004*).

Nell'ambito del programma di ricerca oncotecnologico l'espressione di questi geni è stata ulteriormente studiata utilizzando metodiche quantitative (real time-PCR), e semiquantitative (immunoistochimica) in una serie di tumori ovarici sensibili o resistenti alla chemioterapia. Di grande importanza, i tumori resistenti alla chemioterapia sono risultati esprimere livelli significativamente più elevati di Claudina 3 e Claudina 4 rispetto ai tumori ovarici chemiosensibili.

Poichè queste due proteine appartenenti alla famiglia delle giunzioni serrate 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, questi recettori di membrana possono rappresentare dei nuovi bersagli terapeutici altamente efficaci per la terapia dei tumori ovarici umani resistenti alla chemioterapia.

In supporto a questa ipotesi nell'ambito del programma di ricerca oncotecnologico, abbiamo esposto alla CPE numerosi tumori ovarici sierosi papilliferi (la variante istologica più comune di tumore dell'ovaio), primari, metastatici e resistenti alla chemioterapia esprimenti alti livelli di Claudina 3 e/o di Claudina 4 *in vitro* e abbiamo scoperto che senza alcuna

eccezione, ma a differenza dei tessuti normali non esprimono alti livelli di Claudina 3 e Claudina 4, questi tumori sono altamente sensibili alla citolisi mediata dalla CPE (lisi cellulare del 100% delle cellule neoplastiche ovariche esposte alla tossina).

La completa caratterizzazione dei recettori Claudina 3 e Claudina 4 come nuovi biomarkers per il trattamento innovativo del cancro ovarico resistente alla chemioterapia è descritta nel manoscritto allegato, attualmente in considerazione per pubblicazione dalla rivista *Cancer Res*.

Pubblicazioni:

Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Canè S, Gokden M, Roman, JJ, O'Brien T, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J, Pecorelli S. Discrimination between uterine serous papillary carcinomas and ovarian serous papillary tumors by gene expression profiling. *Br. J. Cancer* 90: 1814-1824, 2004.

Santin AD. Role of immunohistochemical expression of HER2/neu in high grade ovarian cancer. *Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas, Volume 4, Molecular pathology, Gastrointestinal Carcinoma, and Ovarian Carcinoma*. Edited by M.A. Hayat. In press.

Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Canè S, Gokden M, Roman, JJ, O'Brien T, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J, Pecorelli S. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int. J Cancer*. 112; 14-25;2004.

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*, in press.

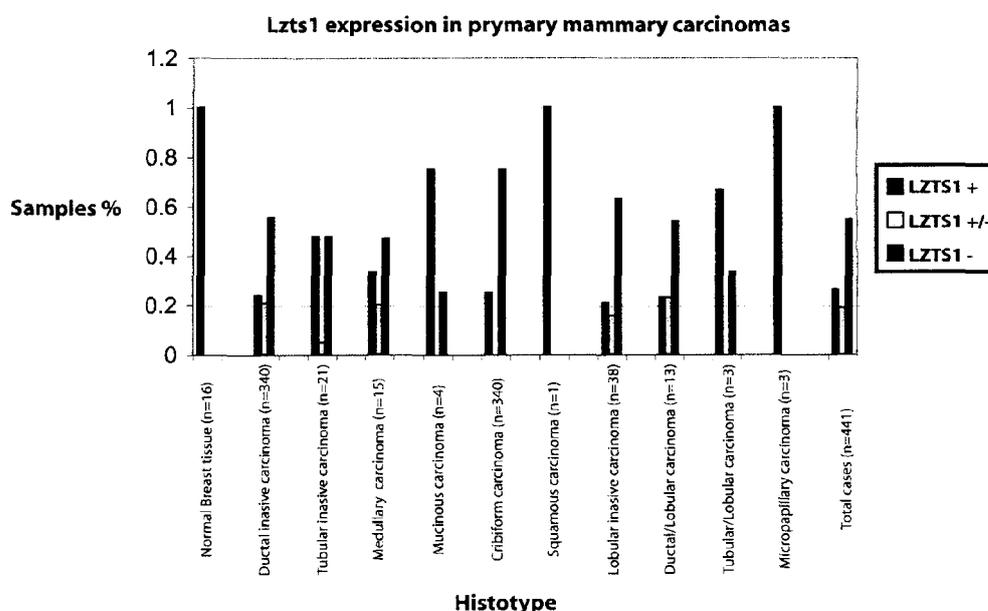
U.O. 04: Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi
Responsabile Scientifico: A. Vecchione

Valutazione dell'espressione di FEZ1, ER e PR in carcinomi mammari primari: 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 una 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. (Tab. 1)



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 ed i vari istotipi esaminati.

Al fine di individuare eventuali correlazioni tra l'espressione di FEZ1 e quella del recettore degli estrogeni (ER) o del recettore del progesterone (PR), abbiamo esaminato 351/441 casi per l'espressione di ER e 354/441 per quella di PR. Abbiamo visto che FEZ1 risulta espresso nel 39.1% (92/235) dei tumori ER positivi contro il 29.3% (34/116) dei tumori ER negativi e nel 46.9% (61/130) dei tumori PR positivi contro il 28.5% (64/224) dei tumori PR negativi. L'associazione tra il parametro FEZ1 ed i parametri ER e PR è stata analizzata mediante test χ^2 ed essa è risultata statisticamente significativa solo tra Fez1 e PR ($p < 0.05$).

I dati sopra esposti, globalmente, consentono di ipotizzare un ruolo fondamentale di FEZ1 nello sviluppo del carcinoma mammario.

Pubblicazioni:

Ishii H, Mimori K, Yoshikawa Y, Mori M, Furukawa Y, Vecchione A. Differential roles of E-type cyclins during transformation of murine E2F-1-deficient cells. *DNA and Cell Biology*, 24, 2005, in press.

Vecchione A, Ishii H, Baldassarre G, Belletti B, Fong LYY, Zanesi N, Murakumo Y, Fidanza V, Alder H, Donovan PJ, Baffa R, Croce CM. Disruption of the *Fez1/Lzts1* tumor suppressor gene in mice causes loss of G2/M phase checkpoint and increased susceptibility to carcinogenesis. Submitted 2005

Ishii H, Inageta KMT, Murakumo Y, Vecchione A, Mori M, Furukawa Y. Components of DNA Damage Checkpoint Pathway Regulate Ultraviolet Exposure-dependent Alterations of Gene Expression of *FHIT* and *WWOX* at Chromosome Fragile Sites. Submitted 2005.

Sottoprogetto III**U.O. 05: Le basi cellulari della farmacoresistenza tumorale: le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi anti-apoptotici**
Responsabile Scientifico: Ruggero De Maria

Nella prima fase della ricerca abbiamo ottenuto, tramite disgregazione meccanica ed enzimatica di tumori di diversa origine, seguita da coltura in vitro in assenza di siero, aggregati sferici di cellule tumorali indifferenziate. Queste sfere tumorali sono state prodotte da neoplasie del colon, del cervello, della tiroide, dello stomaco, della mammella e dell'ovaio. Le cellule contenute nelle sfere tumorali hanno mostrato il loro potenziale differenziativo in seguito a coltura in presenza di siero. Le cellule differenziate sono state caratterizzate con gli anticorpi monoclonali comunemente utilizzati per riconoscere le diverse neoplasie, specifici per varie citocheratine o per antigeni tumorali, dimostrando una forte corrispondenza con i tumori di origine.

Nel caso delle sfere prodotte da glioblastomi, adenocarcinomi del colon e tumori follicolari o papillari della tiroide sono stati eseguiti esperimenti in vivo utilizzando come recipienti topi immunologicamente compromessi.

Le cellule delle sfere tumorali ottenute da queste neoplasie si sono dimostrate capaci di attecchire nei topi nudi, riproducendo un tumore istologicamente molto simile a quelli di partenza, a dimostrazione della capacità tumorigenica di queste cellule contenute nelle tumosfere.

Inoltre, in questo primo anno di attività, sono state paragonate cellule staminali neurali normali con delle cellule staminali di glioblastoma. Le cellule staminali neurali sono di per se molto resistenti alla apoptosi, in quanto non hanno mostrato espressione di caspasi 8, un importante mediatore del segnale di morte cellulare, mentre hanno mostrato livelli molto elevati di PED, una proteina molto efficace nel proteggere queste cellule (1). La comparazione tra queste cellule ha dimostrato che le cellule staminali di glioblastoma crescono più rapidamente di quelle normali e sono molto poco sensibili alla chemioterapia. Questi dati sono in linea con l'andamento clinico della malattia e suggeriscono la possibilità di utilizzare i modelli sperimentali

di neoplasia basati sulle cellule staminali neoplastiche per mettere a punto nuove strategie terapeutiche.

Allo scopo di trovare dei punti deboli nelle cellule staminali di glioblastoma, è stata caratterizzata in queste cellule l'espressione dei geni che codificano per microRNA, piccole molecole di RNA non ancora perfettamente caratterizzate che interferiscono con l'espressione genica. I microRNA differenzialmente espressi dalle cellule staminali neurali normali e di glioblastoma sono attualmente oggetto di studio.

Infine è stata individuata una possibile strategia terapeutica per la cura dei glioblastomi. Questi tumori sono considerati incurabili e conducono invariabilmente alla morte i pazienti che ne sono affetti, pochi mesi dopo la diagnosi. TRAIL è una citochina appena entrata in una serie di trias clinici di fase 1 per la sua azione antitumorale specifica e apparentemente priva di effetti collaterali. Questa citochina rappresenta una eccellente risorsa terapeutica ed è stata proposta per la cura del glioblastoma. Tuttavia, a differenza di quanto è stato osservato sulle linee cellulari, l'analisi effettuata sulle cellule primarie e le staminali di glioblastoma di tutti i 10 pazienti da noi esaminati ha mostrato che TRAIL non ha alcuna azione citotossica sulle queste cellule. Tramite un'analisi dell'espressione dei geni che regolano la risposta terapeutica a TRAIL sono stati individuate le alterazioni dei mediatori della morte cellulare espressi in modo alterato nei glioblastomi. La ridotta espressione di caspasi 8 e del recettore 1 di TRAIL è stata trovata associata all'aumentata espressione di PEA-15/PED, un gene che inibisce la morte cellulare. Queste alterazioni sono responsabili della refrattarietà a TRAIL di questi tumori. In una serie di esperimenti in vitro e in vivo, abbiamo dimostrato che queste alterazioni sono dovute all'azione di metiltransferasi. Pertanto è stato possibile rimuovere queste alterazioni e rendere sensibile a TRAIL i glioblastomi tramite l'impiego di decitabina, un inibitore delle metiltrasferasi attualmente utilizzato in trias di fase II per la terapia di tumori ematologici. L'impiego combinato di decitabina e TRAIL ha permesso di curare topi immunodeficienti trapiantati con glioblastomi di origine umana.

Questi dati forniscono una nuova arma terapeutica per la cura dei tumori cerebrali maligni più frequenti e più aggressivi.

Pubblicazioni:

- 1) 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. *Journal Experimental Medicine* 200:1257-66, 2004.
- 2) Eramo A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Patti M, Bartucci M, Ricci Vitiani L, Stassi G, Larocca LM, Peschle C, De Maria R. Trail resistance of glioblastoma cells by epigenetic silencing of caspase-8. Submitted 2005.

U.O. 06: Le basi cellulari della farmacoresistenza tumorale: le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi anti-apoptotici
Responsabile Scientifico: Carlo M. Croce

Questa U.O. ha sviluppato delle ricerche sui microRNA, allo scopo di studiarne il ruolo nelle cellule primitive neoplastiche nei prossimi mesi. I microRNA costituiscono una famiglia di RNA di 18-22 nucleotidi che prendono parte a vari processi regolatori. Il ruolo svolto da 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 umani, 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 in futuro potremo utilizzare 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 (3-4).

Publicazioni:

1) Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM.: MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101(32):11755-60.

2) Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamlieel 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.

4) Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM.: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 200, ;99(24):15524-9.

Sottoprogetto IVA

U.O. 07: Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative **Responsabile Scientifico: Marco Presta**

Scopo del progetto

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

Sintesi dei risultati ottenuti

Nel corso del primo anno del progetto abbiamo condotto studi inerenti la Fase 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 FGF2 utilizzando la piattaforma Affymetrix ©.

In un primo set di esperimenti, cellule microvascolari murine di polmone 1G11 sono state stimulate per 0, 6 e 12 ore con FGF2 in assenza di siero. L'analisi del trascrittoma è stata condotta utilizzando il Gene chip Murine Genome U74 (Set version 2, Affymetrix) che interroga approssimativamente 12,000 diversi trascritti.

In un secondo set di esperimenti sono stati usati i seguenti tipi cellulari:

- cellule microvascolari murine di polmone 1G11 controllo e simulate per 10 ore con FGF2;
- cellule microvascolari murine di cervello MBE controllo e simulate per 10 ore con FGF2;
- cellule microvascolari murine isolate dal sottocute SIEC controllo e simulate per 10 ore con FGF2;
- cellule macrovascolari murine di aorta MAE controllo e simulate per 10 ore con FGF2;
- cellule microvascolari murine di polmone MBE trasfettate con FGF2 (clone MBE-3F3);

- cellule macrovascolari murine di aorta MAE trasfettate con FGF2 (cloni MAE-3F2 ed MAE-3F2T).

In questo caso l'analisi del trascrittoma è stata condotta utilizzando il Gene chip Murine Genome MOE430A set che interroga approssimativamente 22,000 diversi trascritti.

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. Parte di questi risultati sono già stati oggetto di pubblicazione.

Per quanto riguarda la Fase 2 "Creazione di strumenti farmacologici per inibire i meccanismi pro-angiogenesi identificati" abbiamo condotto studi volti alla caratterizzazione di nuove eparine biotecnologiche a basso peso molecolare volte ad inibire l'attività angiogenica di FGF2 e di derivati del trans-resveratrolo caratterizzati da una attività antiangiogenetica e di "vascular targeting" grazie alla loro capacità di destabilizzare i microtubuli delle cellule endoteliali. I risultati sono stati oggetto di pubblicazione.

Pubblicazioni:

Presta M, Oreste P, Zoppetti G, Belleri M, Tanghetti E, Leali D, Urbinati U, Bugatti A, Ronca R, Nicoli S, Moroni E, Stabile H, Camozzi M, Hernandez G, Mitola S, Dell'Era P, Rusnati M, Ribatti D. Anti-angiogenic activity of semi-synthetic biotechnological heparins: LMW sulfated *Escherichia coli* K5 polysaccharide derivatives as FGF2 antagonists. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 25:71-6, 2005.

Dell'Era P, Nicoli S, Peri G, Nieddu M, Ennas MG, and Presta M. FGF2-induced Upregulation of DNA polymerase- δ p12 subunit in endothelial cells. Oncogene, 24:1117-21, 2005.

Belleri M, Ribatti D, Nicoli S, Cotelli F, Forti L, Vannini V, Stivala LA, Presta M. Antiangiogenic and vascular targeting activity of the microtubule-destabilizing *trans*-resveratrol derivative 3,5,4'-trimethoxystilbene. Mol Pharmacol, Feb 9 2005; [Epub ahead of print].

U.O. 08: Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative
Responsabile Scientifico: Barbara Ensoli

Questa U.O. si è focalizzata sull'individuazione dei meccanismi d'azione degli HIV-PI, che costituiscono nuovi strumenti per bloccare l'angiogenesi e l'invasione tumorale (1-2).

Nostri studi precedenti hanno dimostrato che gli HIV-PI indinavir e saquinavir sono in grado di bloccare lo sviluppo e di indurre la regressione di lesioni angioproliferative e dell'edema indotti mediante l'inoculazione di cellule KS o bFGF in topi atimici, e l'angiogenesi indotta da bFGF e/o VEGF nella membrana corioallantoidea di pollo (Sgadari et al., Nat Med 2002, e dati non pubblicati). Tali effetti, già evidenti a concentrazioni di farmaco simili alla concentrazione di valle presente nel plasma dei pazienti trattati (0.1-1 μM), sono dovuti al blocco dell'invasione, ma non della proliferazione, di cellule KS ed endoteliali, ed all'inibizione dell'attivazione proteolitica di MMP-2, proteasi che svolge un ruolo chiave nell'angiogenesi, nell'invasione tumorale e nella metastatizzazione (Sgadari et al, Nat Med, 2002; Sgadari et al., Lancet Oncol 2003; Monini et al., Nat Rev Cancer, 2004). Ciò suggerisce che i PI abbiano come target pathways fondamentali 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 per inibire i processi di attivazione basale di MMP-2, 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. Dopo avere raccolto i supernanti cellulari, le cellule sono state lisate mediante shock ipertonico/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 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 alla forma completamente attiva, uno step che, come descritto in precedenza, è mediato dal legame di pre-MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$ ed è catalizzato da MMP-2 attiva presente sulla membrana cellulare. 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 $\alpha_v\beta_3$, od intervenendo sull'espressione o sull'attività dell'integrina stessa.

Studi precedenti hanno dimostrato che l'attivazione autoproteolitica di MMP-2 può avvenire in vitro anche in assenza dell'integrina $\alpha_v\beta_3$, in quanto è possibile ottenere concentrazioni assolute di 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-MMP, 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). In queste condizioni, 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 veniva completamente convertita nella forma attiva nell'arco di 15 ore. Tuttavia, indinavir o saquinavir (10 μ M) non hanno determinato alcuna alterazione nella reazione di maturazione di MMP-2, indicando che questi HIV-PI non sono in grado di intervenire nel processo di attivazione autoproteolitico di MMP-2. Questi dati hanno suggerito, perciò, che indinavir e saquinavir inibiscano l'angiogenesi e l'invasione cellulare interferendo 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 l'aggiunta di $\alpha_v\beta_3$ alla reazione di attivazione di MMP-2 era in grado di inibirne la maturazione, suggerendo che il legame di MMP-2 o MT1-MMP all'integrina $\alpha_v\beta_3$ abbia effetti protettivi, probabilmente mediati da impedimento sterico, quando le molecole recettoriali e le proteasi coinvolte non sono opportunamente aggregate sulla superficie cellulare. Tuttavia, indinavir o saquinavir (10 μ M) non hanno mostrato alcun effetto sulla cinetica di proteolisi, indicando che gli HIV-PI non interferiscono direttamente con il legame di MMP-2 e/o MT1-MMP 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).

Questi risultati suggeriscono che indinavir e saquinavir non abbiano come target diretto MMP-2, nè siano in grado di inibire il legame di MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$ o di bloccare specifici step proteolitici coinvolti nell'attivazione di questa proteasi della matrice. Al contrario, i dati ottenuti indicano che gli HIV-PI potrebbero interferire con il trafficking, la localizzazione di membrana o, in generale, l'espressione o l'attività di $\alpha_v\beta_3$ e/o altre integrine coinvolte nell'angiogenesi e nell'invasione cellulare, in particolare, $\alpha_5\beta_1$.

Successivamente, poichè gli eventi che preludono alla polarizzazione e alla locomozione cellulare prevedono l'intervento di recettori integrinici che, una volta attivati si colocalizzano con MMP-2, MT1-MMP, altre metalloproteasi e recettori per fattori di crescita (Monsky et al., Cancer Res, 1993; Brooks et al., Cell, 1996; Nakahara et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1997; Kiosses et al., Nat Cell Biol, 2001), siamo andati a studiare se gli HIV-PI intervengano modificando uno degli step coinvolti nei processi che precedono e regolano la

motilità cellulare. A tale riguardo abbiamo inizialmente analizzato gli effetti di indinavir e saquinavir sull'adesione di cellule HUVEC seminate su collagene IV, laminina, perlecano (tre substrati della membrana basale e ligandi di $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_v\beta_3$, rispettivamente). Dai risultati ottenuti si evidenzia che l'adesione è fortemente inibita in presenza di saquinavir e 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 a fibrinogeno e protrombina, le due principali componenti della matrice provisionale, e al perlecano, ed anche questo effetto è abolito in presenza di ioni manganese. Tali dati preliminari sembrano quindi dimostrare che gli HIV-PI esercitano le proprie azioni anti-angiogeniche e anti-invasive interferendo con il legame di integrine ai substrati, con la loro attivazione e/o con la loro rilocalizzazione nei lamellipodi e negli invadopodi, e che l'integrina $\alpha_v\beta_3$ è un bersaglio preferenziale di questi farmaci, spiegando così, almeno in parte, la loro capacità di inibire l'attivazione autoproteolitica di MMP-2.

Ulteriori studi sono attualmente in corso ai fini di valutare gli effetti che gli HIV-PI possono avere sullo spreading cellulare, sulla distribuzione ed il trafficking delle integrine e la loro colocalizzazione con le MMPs. Si prevede inoltre l'analisi di eventuali effetti degli HIV-PI sui meccanismi molecolari di signaling, correlati con i processi di adesione e spreading, innescati dal binding integrinico a vari substrati presenti nella matrice extracellulare.

Pubblicazioni

1. Monini P., Sgadari C., Toschi E., Barillari G., and Ensoli B. Antitumor effects of antiretroviral activity. *Nat. Rev. Cancer*, 4:861-875, 2004.
2. Sgadari C., Toschi E., Carlei D., Malavasi L., Bacigalupo I., Palladino C., Compagnoni D., Bugarini R., Falchi M., Barillari G., Monini P. and Ensoli B. Submitted.

U.O. 09: Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative **Responsabile Scientifico: Gianluigi Condorelli**

Generazione di animali transgenici per la comprensione del ruolo dei recettori del VEGF e del pathway a valle nel differenziamento dell'emoangioblasto con il sistema Cre/Lox. PRIMI 6 MESI DI LAVORO

TABELLA 1: Aggiornamento per topo knockout

	Targ.Const	ES Transf.	Clone Selec.	Chimera Gener.	Floxed Het.	Loxed Het.
FLK-1	+	-	-			
FLT-1	+	+	-			
FLT-4	+	+	+			
TIE-2	-	-	-			
AKT-2	+	+	+			

Legenda della tabella:

Targ. Constr: generazione del vettore bersaglio;

ES Transf: trasfezione dei cloni ES;

Clone Selec: Selezione dei cloni di ES;

Chimera Gener: generazione di topi chimera;

Floxed Het: generazione di topi eterozigoti in cui neo non e' stato rimosso;

Loxed Het: generazione di topi eterozigoti in cui la cassetta neo e' stata rimossa.

La procedura consiste in:

1) disegnare il costrutto gene targeting. Per far ciò si deve tirar fuori la sequenza del cDNA dal data base NCBI, fare un blast contro il genoma di topo per ottenere la sequenza e la struttura del gene (bordi introne-esone). Si deve inoltre fare una mappa di restrizione. Sulla base della mappa si disegna poi il probe e si testano i siti di restrizione per Southern blot ed infine si disegna una mappa per la strategia di knockout targeting;

2) fare il costrutto attraverso il cloning molecolare. Si fa una PCR di tutti i frammenti, si clonano nel vettore TOPO, si sequenziano i frammenti, si subclonano nel vettore designato (come mostrato nelle figure);

3) dopo che il costrutto e' fatto, si sequenza tutto e si da' alla facility delle cellule staminali dell'UCSD, dove si fa un'elettroporazione per inserire il targeting construct;

4) fare uno screening dei cloni ES resistenti alla neomicina. Usiamo l'analisi al Southern Blot per screenare la ricombinazione omologa nelle cellule ES;

5) validare i cloni positivi con un Southern blot piu' grande e fare una mappa cromosomica prima dell'iniezione nella blastocisti;

6) Iniezione nella blastocisti per ottenere chimere;

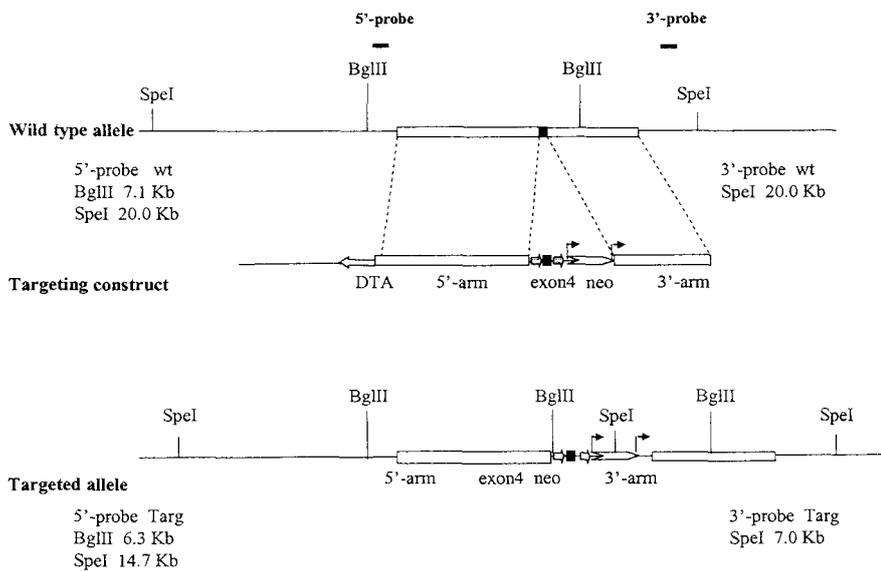
7) Breeding per ottenere la trasmissione in linea germinale del vettore targeting; breeding per rimuovere il gene neo.

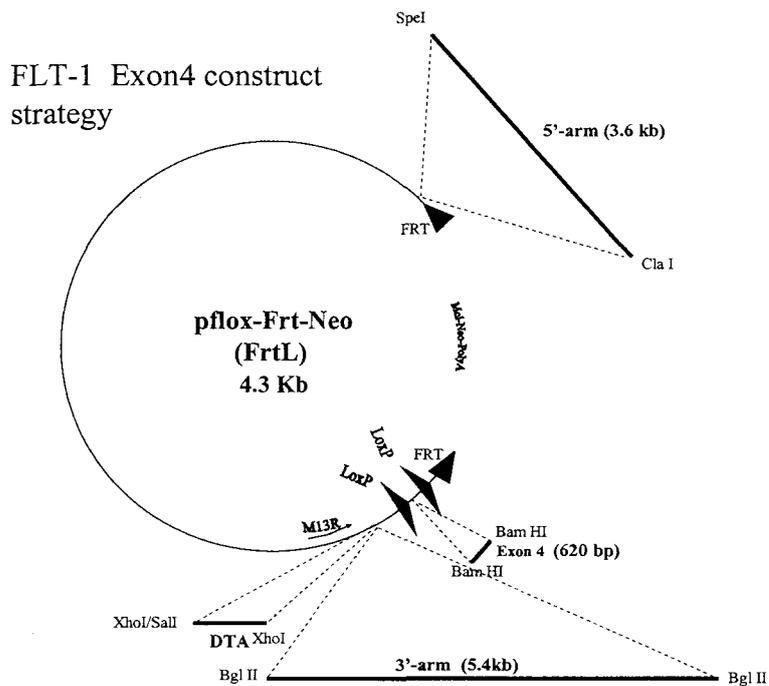
FLT-1 genome (chromosome 5)

164,593 bp

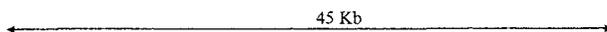
166 Kb genome, 31 exons.
Exon 4 encodes Ig-like C2 type (domain 2).

FLT-1, Exon4





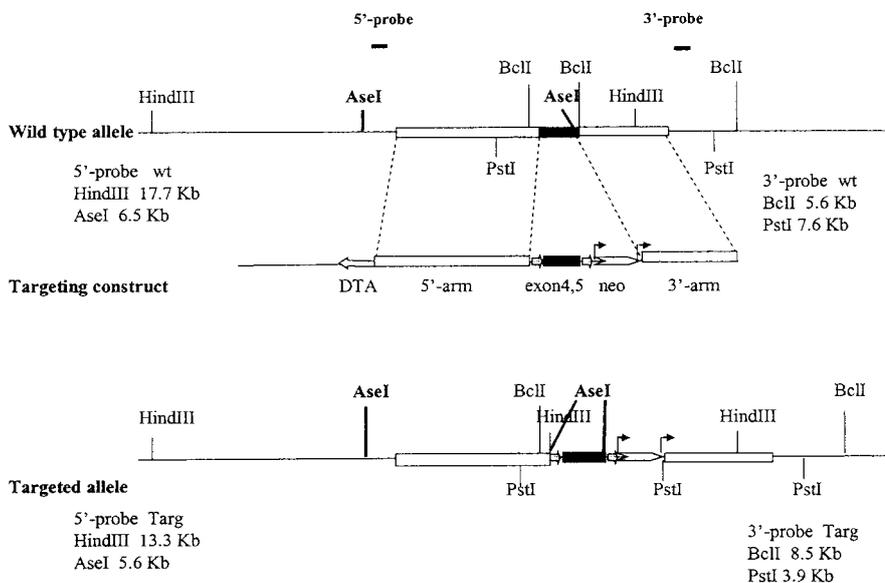
**FLK-1/KDR genome
(chromosome 5)**



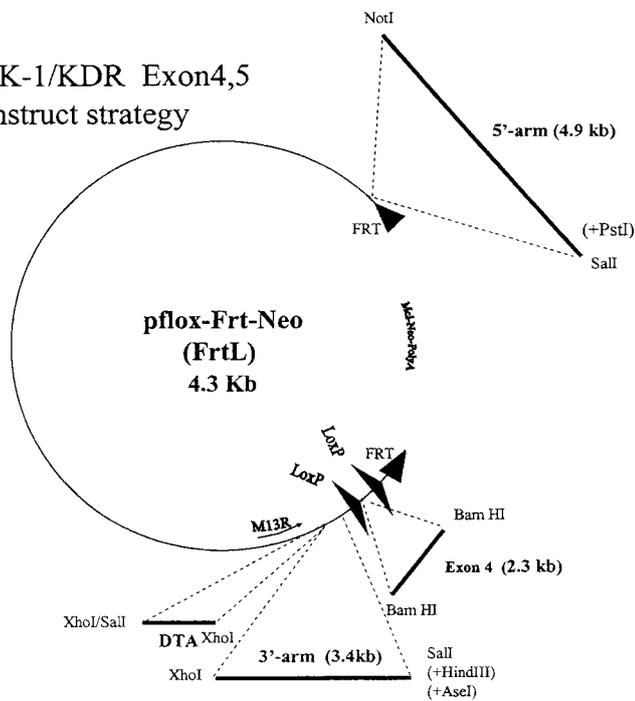
45 Kb genome, 29 exons.

Exon 4&5

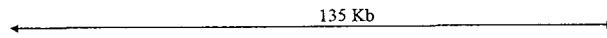
FLK-1/KDR, Exon4,5



FLK-1/KDR Exon4,5 construct strategy

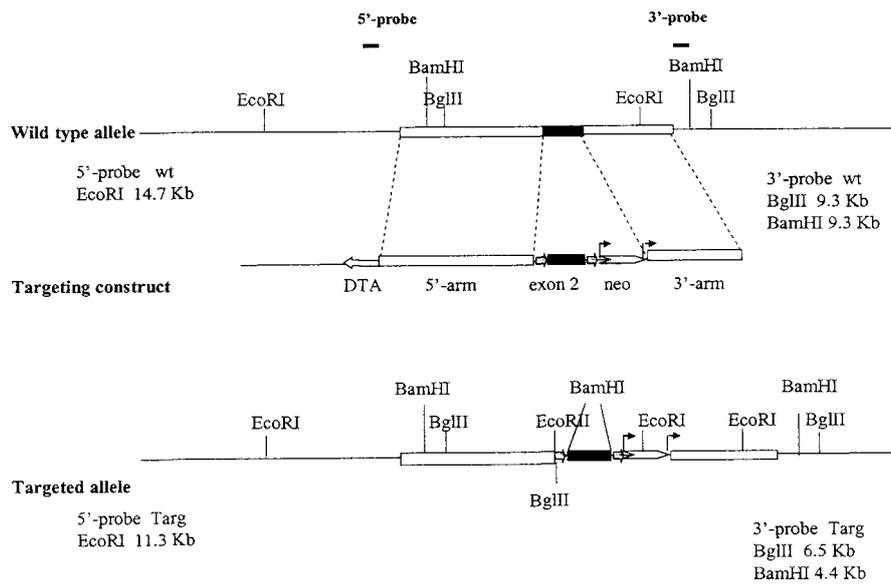


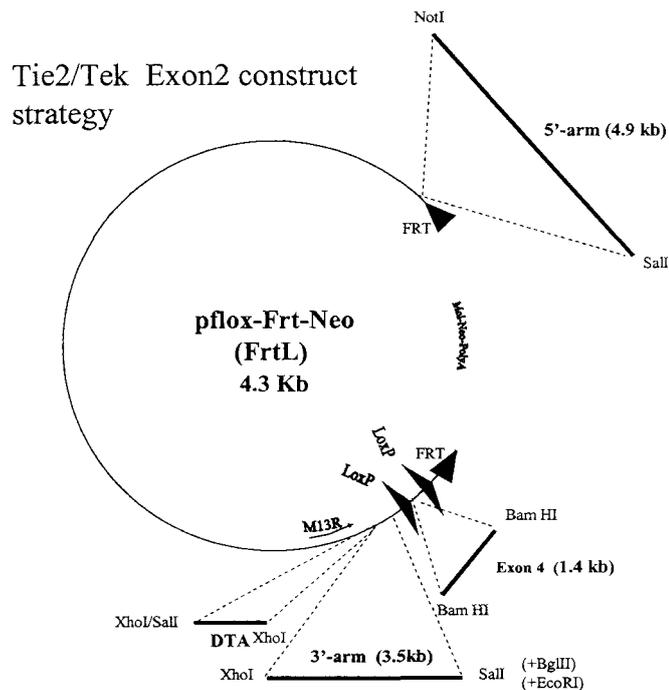
Tie2/Tek genome (chromosome 4)



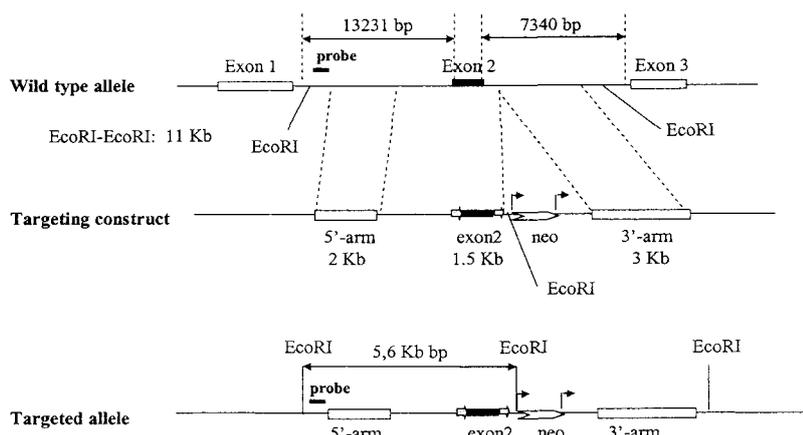
135 Kb genome, 23 exons.
Exon 2

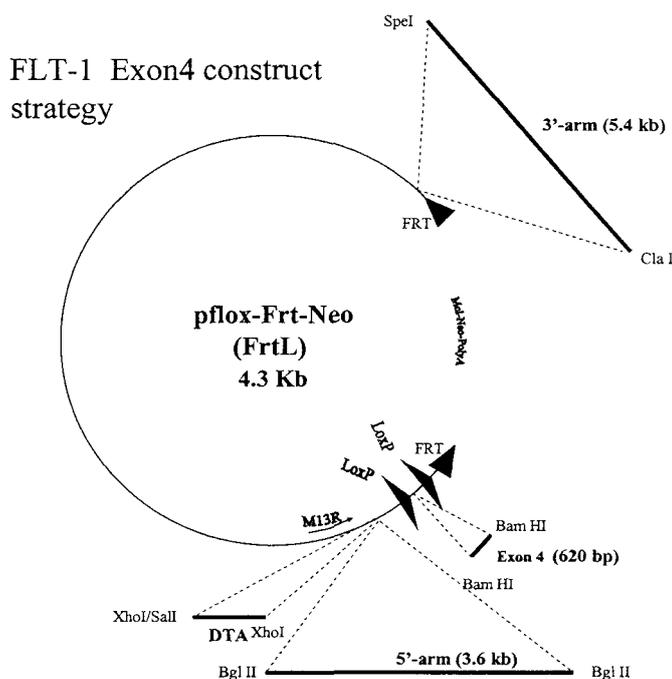
Tie2/Tek, Exon 2





Akt2





Sottoprogetto IVB

U.O. 10: Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di NF-κB e di "scavengers" di radicali liberi in modelli animali di cancro del colon, della mammella e della prostata Responsabile Scientifico: Matteo Russo

Gli obiettivi di questa UO consistono nel dimostrare (I) che 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 e (II) che in questi stessi animali inibitori di NF-κB e scavengers di radicali liberi sono in gradi di bloccare o rallentare la progressione di questi stessi tumori.

Primo obiettivo

In tumori umani, ottenuti dopo intervento chirurgico in pazienti selezionati e opportunamente caratterizzati, è stato dimostrato mediante immunostochimica che alcune maggiori proteine della risposta infiammatoria sono abbondantemente presenti nelle cellule tumorali. In particolare, in tumori della prostata in tessuti normali e di Iperplasia Prostatica Benigna (BPH) è stato studiato il recettore P2X7, un sensore di danno capace di attivare NF-κB, due 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'immunostain per tutte queste proteine fortemente appariva aumentato, 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 microdissezionate, 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 (1).

Pubblicazioni

1) Gradini Roberto, Realacci Massimo, Sale Patrizio, Frati Giacomo, Denora Paola, Russo Andrea, Petrangeli Elisa, Tafani Marco, Franco Di Silverio, Gallucci M, Mantovani A. and Russo Matteo A. Prostate cancer and Inflammation as studied by laser-capture microdissection, molecular biology and immunohistochemistry. Submitted, 2004

Secondo obiettivo

E' iniziato il trattamento in vivo con inibitori di NF-kB e con scavengers di radicali liberi in tre modelli murini. Il lavoro preliminare di questa UO 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).

Non si hanno ancora risultati sull'obiettivo di questo protocollo. I trattamenti dovrebbero terminare tra marzo e aprile del 2005.

U.O. 11: 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 **Responsabile Scientifico: Corrado Spadafora**

Obiettivi di questa UO

- 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.

Il primo obiettivo della nostra UO è stato quello di predisporre e di espandere le colonie dei due ceppi di topi transgenici, naturalmente predisposti al cancro mammario e prostatico, che verranno utilizzati nel corso di questo progetto di ricerca come modelli sperimentali dalla nostra UO e da quella di Matteo Russo.

A questo scopo sonostati ottenuti dal National Cancer Institute (NCI) verso la fine dello scorso mese di agosto:

A) 3 topi MASCHI mutanti: FVB/N.TG(MMTV-PyVT)34M(T/X). Le femmine eterozigoti positive di questo ceppo sviluppano spontaneamente e progressivamente un il tumore alla mammella a partire dal 60° giorno di vita.

Questi animali sono stati accoppiati con topine femmine del ceppo FVB/Ncr (X/X) wild type.

B) 3 topi FEMMINE mutanti: B6-TG(TRAMP)8247 Ng(T/X). I maschi eterozigoti positivi di questo ceppo sviluppano spontaneamente e progressivamente un tumore prostatico a partire dal 3° mese di vita in poi. Questi animali sono stati accoppiati maschi del ceppo C57BL/6Ncr (X/X) wild type.

Ad oggi sono nate tre nidiate dall'incrocio del ceppo MMTV/X (maschio) x X/X (femina) per complessivi 5 femmine (3 MMTV positive) e 9 maschi. Due/tre settimane dalla nascita, gli animali sono sottoposti a screening per l'individuazione dei MMTV/X positivi. A questo scopo si utilizza il DNA estratto da un frammento di coda da ognuno dei nuovi nati che è analizzato per PCR diretta usando una coppia di oligonucleotidi specifici. La prima delle tre femmine positive, è stata sacrificata all'ottava settimana e sottoposta ad autopsia per stabile l'eventuale insorgenza del tumore nell'organo bersaglio e la presenza di metastasi negli altri organi espianati. Gli altri due topi positivi verranno utilizzati per lo stesso scopo alla 10° e 12° settimana di vita per caratterizzare la progressione tumorale. Gli esami autoptici sono condotti dall'Uo di Matteo russo.

La colonia di questi mutanti è al momento in via di espansione. Ci proponiamo di ottenere un numero sufficiente di animali per caratterizzare l'attività di Trascrittasi Inversa (RT) in rapporto alla genesi e progressione tumorale ed iniziare il trattamento con inibitori della RT .

Dagli incroci TRAMP/X (femmina) x (X/X) maschio sono nati ad oggi 5 femmine ed un maschio. Lo screening di questi animali è in corso. E' da rilevare che questo ceppo sembra essere scarsamente fertile per cui sarà necessario aumentare le nidiate per raggiungere il numero di animali maschi positivi necessari allo svolgimento del programma.

U.O. 12: 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
Responsabile Scientifico: Paola Sinibaldi-Vallebona

Obiettivo specifico

1. Dimostrare che la risposta flogistica è coinvolta nella progressione del cancro del colon chimicamente indotto da 1,2-dimetilidrazina in ratti ceppo BDIX.

20 ratti del ceppo BDIX sono stati trattati con 1,2-dimetilidrazina (18mg/Kg) somministrata s.c. una volta a settimana per 5 settimane consecutive. Un eguale numero di animali sono stati utilizzati come controlli.

A partire dal 14° giorno dall'ultima somministrazione del cancerogeno e ad intervalli regolari di 14 giorni, tutti gli animali sono stati sacrificati: il colon è

stato prelevato, diviso longitudinalmente e ½ congelato in azoto, ½ fissato in formalina.

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

Nelle sezioni istologiche si è evidenziato che la progressione del tumore iniziava come focolaio tumorale nella sottomucosa fino a raggiungere una maggiore infiltrazione del tessuti mucoso, con zone di iperplasia associate al tumore o a formazioni polipoidi, a seconda della zona osservata.

La colorazione immunohistochimica eseguita utilizzando un anticorpo policlonale che in nostri precedenti studi si era dimostrato specifico per questo tumore, ha evidenziato una netta positività delle cellule tumorali, in tutti gli stadi di differenziamento.

Gli stessi campioni di materiale, mantenuto congelato, sono al momento allo studio per mettere a punto, mediante tecnica di microdissezione laser con impiego di un BioRobot, un sistema automatico per la purificazione degli acidi nucleici da estrarre dalle lesioni tumorali.

2. Dimostrare che il controllo della risposta flogistica rallenta la comparsa di metastasi epatiche in un modello animale di adenocarcinoma coloretale del colon.

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

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

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

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

Al momento sono in corso prove preliminari per stabilire la migliore via di somministrazione delle molecole Cyanidin-3-O- β -glucopyranoside (C-3-G) e CR3294 ai ratti del ceppo BD-IX.

Sottoprogetto V

U.O. 13: Regolazione del turnover di Bcl-2 RNA mediante RNA antisenso

Responsabile Scientifico: A. Nicolin

Lo studio si è sviluppato in 3 attività principali.

Attività 1: Espressione di RNA antisenso complementare a bcl-2 mRNA

1.1) Analisi in silico

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

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

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

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

L'espressione di RNA in antisenso nel tumour follicolare B è iniziata con la messa a punto del dosaggio di RNA di *bcl2* con lo strumento Taqman. I risultati ottenuti hanno dimostrato l'affidabilità del metodo in termini di sensibilità e riproducibilità.

Attività 2) Meccanismi molecolari del turnover di *bcl-2* RNA

2.1) Ruolo della proteina BCL2

Lo studio è iniziato analizzando la specificità di regolazione da parte della proteina BCL2. E' stato dimostrato che la proteina è in grado di interagire esclusivamente con le sequenze regolatorie ARE del gene rilevante.

2.2) Studio di ARE-BP

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

2.3) Knock-down di proteine regolatorie

Sono stati disegnati siRNA compatibili per agire su mRNA di Tino, la proteina identificata recentemente dal ns gruppo. Son anche in corso studi per valutare le migliori condizioni di veicolazione degli siRNA.

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

3.1) Oligoribonucleotidi antisenso

Sono stati disegnati e preparati 3 oligoribonucleotidi complementari (α ORN) ad ARE di *bcl2*, modificati in 2'orto-metil, per renderli stabili alla degradazione biologica. Sono stati utilizzati in un modello in vitro di degradazione di RNA. In questo sistema gli α ORN hanno rivelato una capacità

di stabilizzare l'RNA di bcl2. Non sono ancora stati caratterizzati alcuni parametri, come la curva dose-risposta, la specificità su sequenze ARE.

3.2) *Oligoribonucleotidi senso*

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

3.3) *Terapie combinate*

Gli studi di attività antitumorale in combinazione con farmaci citotossici sarà svolta nella parte terminale del progetto.

Publicazioni:

1. Donnini M, Lapucci A, Papucci L, Witort E, Jacquier A, Brewer G, Nicolin A, Capaccioli S, Schiamone N. Identification of TINO: a new evolutionarily conserved BCL-2 AU-rich element RNA-binding protein. *J Biol Chem* 2:20154-20166, 2004.
2. Asnagli L, Calastretti A, Bevilacqua A, D'Agnano I, Gatti G, Canti G, Delia D, Capaccioli S, Nicolin A. Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. *Oncogene*. 2004 Jul 29;23(34):5781-91.
3. Schiavone N, Donnini M, Nicolin A, Capaccioli S. Antisense oligonucleotide drug design. *Curr Pharm Des*. 2004;10(7):769-84.

Sottoprogetto VI

U.O. 14: 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

Responsabile Scientifico: Barbara Ensoli

I nostri studi indicano che gli HIV-PI bloccano l'angiogenesi e lo sviluppo di tumori in modelli preclinici, quali lesioni angiogeniche, KS ed altri tipi di tumori promossi in topi nudi rispettivamente dall'inoculo di fattori angiogenici, cellule KS umane primarie o linee di tumori umani. Questi effetti si osservano a concentrazioni di HIV-PI paragonabili a quelle presenti nel plasma di pazienti trattati, e sono dovuti alla capacità di questi farmaci di inibire l'attivazione proteolitica della metalloproteasi-2, un enzima chiave nell'angiogenesi e nella crescita ed invasione tumorale (Sgadari C et al, 2002; Sgadari C et al, 2003, Toschi E et al, 2002; Monini P et al, 2003; e dati non pubblicati). Gli NNTRI antagonizzano la genesi e la progressione tumorale sia *in vitro* che *in vivo* attraverso tre vie: a) riducendo la proliferazione; b) promuovendo il differenziamento e c) riprogrammando l'espressione genica (Mangiacasale R et al, 2003; Sciamanna et al, Submitted).

Poiché l'angiogenesi, così come la proliferazione e l'invasione delle cellule tumorali, l'attività proteolitica delle MMP, l'alterazione dell'espressione genica sono eventi chiave per lo sviluppo di tutti i tumori, l'obiettivo del presente progetto è di identificare e meglio chiarire i meccanismi di azione

antiangiogenici e/o antitumorali degli HIV-PI e degli NNRTI e valutare se hanno un effetto sinergico sia in studi in vivo che in vitro.

Questa U.O. si è quindi occupata della validazione degli effetti anti-angiogenici ed anti-tumorali degli HIV-PI in modelli animali, con risultati sinora assai incoraggianti.

U.O. 15: 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

Responsabile Scientifico: Paola Sinibaldi-Vallebona

Obiettivo 1: Valutazione degli effetti degli HIV-PI e/o NNRTI, da soli od in associazione, sulla proliferazione, citotossicità, differenziamento ed espressione genica in vitro di linee tumorali di vario tipo (topo e ratto).

Nella prima fase dello studio è stato testato *in vitro* l'effetto di efavirenz (a dosi comprese tra 5 e 15 μ M) e di indinavir (tra 0.1 e 10 μ M) sulla crescita di cellule di carcinoma polmonare di Lewis (3LL) e di adenocarcinoma coloretale di ratto (DHD/K12).

Le cellule della linea 3LL sono state seminate alla concentrazione di 50.000/ml in piastre da 6 wells (2ml/well) al giorno 0, in duplicato. Il giorno 1 sono stati effettuati i trattamenti con i farmaci in un volume di 20 μ l/wells. I controlli ricevevano pari volume di terreno di coltura (CC) oppure pari volume di diluente del farmaco (C-DMSO). Le conte cellulari venivano eseguite al microscopio quotidianamente a partire dal giorno 2 fino al giorno 4, usando la colorazione vitale con trypan blue.

I risultati preliminari hanno evidenziato che:

Efavirenz (trattamento singolo) inibisce significativamente la crescita cellulare in modo dose-dipendente. L'effetto di inibizione non è associato a fenomeni di morte o ridotta vitalità cellulare e si mantiene anche a tre giorni dalla sospensione del trattamento.

Efavirenz (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) inibisce marcatamente la crescita cellulare in modo dose-dipendente. L'effetto di inibizione è maggiore di quello osservato nel trattamento singolo, ma ugualmente non risulta associato a fenomeni di morte o ridotta vitalità.

A seguito del trattamento con efavirenz non si assiste a modificazioni della morfologia cellulare apprezzabili al microscopio, se non ad un lieve aumento delle dimensioni di una sottopopolazione cellulare; si evidenzia tuttavia una tendenza da parte di queste cellule, che di regola pur formando un monostrato abbastanza regolare tendono a formare clumps isolati, a fare meno clumps. Questi effetti meritano di essere meglio indagati (studio del ciclo cellulare e di eventuali fenomeni di apoptosi).

Indinavir (trattamento singolo) mostra, 24h dopo il trattamento, un lieve effetto di inibizione della crescita alla massima dose usata. L'effetto viene perso nei giorni successivi, ove si assiste alla normale ripresa della crescita cellulare.

Indinavir (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) Non si osserva miglioramento rispetto a quanto riferito per il trattamento singolo, anzi alcune dosi sembrano favorire, a tempi tardivi, un lieve aumento di proliferazione cellulare, che tuttavia non è statisticamente significativo.

Nessuna osservazione riguardo alla morfologia cellulare.

Studi di combinazione dei due farmaci sono al momento in corso

Relativamente alla linea DHD/K12 le cellule sono state seminate alla concentrazione di 25.000/ml in piastre da 24 wells (1ml/well) al giorno 0, in duplicato. Il giorno 1 sono stati effettuati i trattamenti con i farmaci in un volume di 20 µl/wells. I controlli sono stati aggiunti di un pari volume di terreno di coltura (CC) oppure di un pari volume di diluente del farmaco (C-DMSO). Le conte cellulari sono state eseguite al microscopio ottico quotidianamente a partire dal giorno 2 fino al giorno 4, usando la colorazione vitale con trypan blue.

I risultati preliminari indicano che:

Efavirenz (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) inibisce marcatamente la crescita cellulare in modo dose e tempo-dipendente. L'effetto di inibizione risulta maggiore in corrispondenza della minore densità cellulare e comunque correlato alle sottopopolazioni cellulari costituenti la linea. Ulteriori studi sono in corso per meglio definire queste osservazioni preliminari.

A seguito del trattamento con efavirenz non si evidenzia alcuna modificazione della morfologia cellulare, se non un lieve aumento delle dimensioni delle singole cellule ed un diverso contatto cellula-cellula (al momento ancora in fase di osservazione).

Indinavir (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) non induce alcun effetto di inibizione della crescita cellulare a nessuna delle dosi testate ed anzi, in corrispondenza dei tempi di più lunga esposizione, determina un incremento non significativo della proliferazione.

Il trattamento con indinavir non sembra indurre alcuna modificazione morfologica delle cellule.

Obiettivo 2: Valutazione degli effetti antitumorali in vivo degli HIV-PI ed NNRTI, usati da soli o in associazione, in un modello di tumore sperimentale indotto nel topo dall'inoculazione di linee tumorali murine di carcinoma polmonare di Lewis.

Sulla base dei risultati ottenuti *in vitro*, relativamente alla linea cellulare 3LL, abbiamo intrapreso uno studio per stabilire se gli inibitori della RT (efavirenz) e gli inibitori delle proteasi (indinavir), usati da soli o in combinazione, siano in grado di esercitare una azione anti-tumorale significativa, se somministrati a topi già portatori di tumore.

A tal fine abbiamo effettuato il seguente esperimento pilota:

Topi maschi C57Bl/6 di 18-20 g (Charles River, Calco, Como) sono stati inoculati s.c. nella regione del fianco dx con 250.000 cellule di carcinoma polmonare di Lewis (LLC) in un volume di 0.1ml di soluzione fisiologica al giorno 0.

Al giorno 7 gli animali sono stati esaminati, mediante palpazione nella zona di inoculo, per verificare la crescita del tumore. Sono stati quindi selezionati

soltanto gli animali che presentavano tumori con diametro simile (2-3 mm). Questi (N° 28) venivano quindi divisi in 4 gruppi sperimentali di 7 animali ciascuno: 1) Gruppo di controllo; 2) Trattati con Efavirenz (0,2 mg/die/topo); 3) Trattati con Indinavir (1,36 mg/die/topo); 4) Trattati con Efavirenz ed Indinavir.

I farmaci ed il diluente di controllo venivano preparati secondo lo schema seguente e somministrati agli animali, mediante gavage intragastrico, quotidianamente a partire dal giorno 7.

Efavirenz (Bristol-Myers Squibb)

La dose giornaliera somministrata per gavage intragastrico era di 0,2 mg/die/topo (pari a 10 mg/kg/die), in 0.2 ml di H₂O (la dose giornaliera utilizzata nei pazienti HIV+ è di 600 mg/die ovvero 8,5 mg/Kg/die)

0,2 mg di efavirenz corrispondono a 0,5 mg di polvere Sustiva presa dalla capsula (il più sterilmente possibile), che messi in 0.2 ml di H₂O corrispondono ad una soluzione 2,5 mg/ml.

Peso della capsula= 500 mg per 200 mg di efavirenz
500 mg EFV capsula/200 mg EFV= x mg capsula/ 0,2 mg EFV
x= 500 x 0,2 / 200 = 0,5 mg capsula EFV/topo/die

La sospensione è sempre stata preparata al momento dell'uso in condizioni di sterilità.

Poiché l'efavirenz è insolubile in soluzione acquosa (quella che si ottiene è una sospensione) deve sempre essere accuratamente miscelato prima di ogni somministrazione.

Indinavir (Crixivan-Merck)

La dose giornaliera somministrata per gavage intragastrico è di 1.36 mg/die/topo (70 mg/kg/die), in 0.4 ml di soluzione salina, corrispondente al doppio della dose giornaliera utilizzata nei pazienti HIV+ (2400 mg/die).

1.36 mg di indinavir corrispondono a 2.26 mg di polvere presa dalla capsula (il più sterilmente possibile), che messi in 0.4 ml di salina corrispondono ad una soluzione 5.65 mg/ml.

Peso della capsula = 657 mg per 400 mg di indinavir
657 mg IND capsula/400 mg IND= x mg capsula/ 1.36 mg IND
x = 657 x 1.36 / 400 = 2.23 mg capsula IND/topo/die

In genere viene preparata la soluzione che ci serve per un'intera settimana in tubo falcon sterile, conservandola al buio a 4°C; al termine della settimana l'avanzo viene scartato e la soluzione ripreparata.

Negli animali compresi nello studio sono stati registrati i seguenti parametri: crescita tumorale, peso corporeo e sopravvivenza.

L'esperimento è ancora in corso ed i risultati definitivi non ancora disponibili.

U.O. 16: 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

Responsabile Scientifico: Corrado Spadafora

Obiettivi di questa UO

- Chiarire il meccanismo di azione degli NNRT e caratterizzare il (i) substrato (i) RT bersaglio
- Definire il ruolo dell'RT endogena nei processi di proliferazione e differenziamento cellulare e nella genesi e progressione tumorale
- Identificare e meglio chiarire i meccanismi di azione antitumorali degli HIV-PI e degli NNRTI e valutare se hanno un effetto sinergico sia in studi in vivo che in vitro.

Primo obiettivo

Il nostro primo obiettivo è la caratterizzazione del ruolo della trascrittasi inversa endogena (RT) nella genesi e progressione tumorale e gli effetti della sua inibizione sulla crescita tumorale *in vitro* ed *in vivo*. Per questo studio abbiamo utilizzato come modelli sperimentali linee cellulari umane di melanoma (A-375) e carcinoma prostatico (PC3). L'esposizione di queste cellule ad inibitori farmacologici dell'RT (nevirapina ed efavirenz), causa un drastico rallentamento della proliferazione e l'induzione di un processo differenziativo caratterizzato da cambiamenti morfologici e dalla comparsa di specifici marcatori. In concomitanza, viene indotta un'ampia riprogrammazione dell'espressione genica. Queste caratteristiche sono stabilmente mantenute finché le cellule sono sotto l'azione dei farmaci; la rimozione degli inibitori di RT determina il ritorno delle cellule alle loro condizioni originali, ossia quelle pre-trattamento. La caratteristica della reversibilità suggerisce la natura epigenetica del fenomeno.

Lo studio *in vivo* è stato effettuato inoculando cellule tumorali umane in topi nudi e quindi trattando i topi con efavirenz. Le linee tumorali utilizzate come modello sono: H69 (microcitoma), A-375 (melanoma), HT29 (colon carcinoma) e PC3 (carcinoma prostatico).

Come osservato *in vitro*, anche *in vivo* il trattamento degli animali con efavirenz rallenta, o blocca del tutto, la crescita dei quattro tumori quando paragonati ad animali di controllo inoculati ma non trattati con l'inibitore di RT.

Questi risultati suggeriscono che l'RT endogeno è un nuovo potenziale target nella terapia antitumorale. Un manoscritto che è attualmente sotto revisione da una rivista internazionale con peer review (1):

1) Ilaria Sciamanna, Matteo Landriscina, Carmine Pittoggi, Michela Quirino, Cristina Mearelli, Rosanna Beraldi, Elisabetta Mattei, Annalucia Serafino, Alessandra Cassano, Paola Sinibaldi-Vallebona, Enrico Garaci, Carlo Barone and Corrado Spadafora. "Inhibition of Endogenous Reverse Transcriptase Antagonizes Human Tumor Growth" Submitted, 2004

Secondo obiettivo

In collaborazione col gruppo di Barbara Ensoli, abbiamo intrapreso uno studio per stabilire se gli inibitori della RT (efavirenz, nevirapina) e gli inibitori delle proteasi (indinavir) possano esercitare una sinergica e potenziata azione antitumorale se adoperati in combinazione. La sperimentazione è prevista sia *in vitro*, su linee cellulari A-375 e PC3, che *in vivo* su modelli animali.

I risultati ottenuti fino ad ora suggeriscono che:

1. L'indinavir da solo ha una scarsa, o nulla, capacità antiproliferativa, testata in un range di concentrazioni che va da 0.1 a 20 micromolare.

2. Indinavir (10 micromolare) in combinazione con efavirenz (15 micromolare) hanno una riproducibile azione sinergica riducendo la proliferazione delle A-375 dal 60% (solo efavirenz) a circa 70% (indinavir+efavirenz) e delle PC3 dal 40% (solo efavirenz) al 55% (indinavir + efavirenz). In tutte le combinazioni testate non si apprezza aumento di morte cellulare né per apoptosi né per necrosi.

3. Nessun effetto sinergico sulla proliferazione è al momento riscontrato nella combinazione indinavir+nevirapina: la nevirapina da sola riduce il rate di proliferazione di circa il 70% che rimane sostanzialmente invariato quando le cellule sono esposte alla combinazione dei due farmaci.

Gli studi finalizzati a valutare la motilità ed invasività delle linee tumorali esposte alle combinazioni degli inibitori sono attualmente in corso ed i risultati non sono ancora disponibili. Si prevede che gli studi *in vivo* inizieranno verso la fine del corrente mese di novembre.