

RELAZIONE
SULLO STATO DI REALIZZAZIONE DEL PROGETTO ON-
COTECNOLOGICO DA PARTE DELL'ISTITUTO SUPE-
RIORE DI SANITA' FINALIZZATO A SVILUPPARE TERAPIE
ONCOLOGICHE INNOVATIVE SU BASE MOLECOLARE

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

Presentata dal Ministro della salute

(STORACE)

Comunicata alla Presidenza il 9 febbraio 2006

SOMMARIO

—

<i>Sommario</i>	<i>Pag.</i>	5
-----------------------	-------------	---

PROGETTI

(I) Le basi metodologiche per una chemioterapia anti-tumorale mirata: il saggio dell'« extreme drug resistance » (EDR) nel carcinoma ovarico ed in altre neoplasie	»	7
(II) Genetica molecolare della farmacoresistenza neoplastica e dell'oncogenesi	»	16
(III) Le cellule neoplastiche primitive e i meccanismi anti-apoptotici: le basi cellulari della farmacoresistenza tumorale .	»	23
(IV) Il microambiente tumorale		
(A) Identificazione di nuovi modulatori dell'angiogenesi tumorale per lo sviluppo di strategie anti-angiogeniche innovative	»	30
(B) Infiammazione e progressione tumorale: effetto di inibitori di NF-kB e di « scavengers » di radicali liberi in modelli murini di cancro del colon, della mammella e della prostata	»	38
(V) Regolazione del turnover di Bcl-2 RNA mediante RNA antisenso	»	46
(VI) Sviluppo di nuove terapie antitumorali basate sui farmaci antiretrovirali inibitori della proteasi di HIV e inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa, da soli o combinati: studi preclinici in vitro ed in vivo	»	50

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 di affrontare diverse aree scientifico-strategiche in cinque sottoprogetti multipolari, ai quali afferiscono laboratori afferenti all'ISS, agli IRCCS ed i centri di ricerca universitari ed extra-universitari. Un aspetto fondamentale dell'intero programma è rappresentato dalla sinergia tra i diversi gruppi di ricerca, sia nell'ambito di uno stesso sottoprogetto, sia tra sottoprogetti diversi. Questi ultimi, infatti, sono focalizzati su aree limitrofe ed interconnesse, e prevedono spesso una stretta interazione operativa.

I sottoprogetti sui diversi aspetti genetici, molecolari e cellulari delle neoplasie si svolgono in parallelo ad un sottoprogetto clinico (sottoprogetto I), focalizzato sullo sviluppo del test in vitro di resistenza delle cellule tumorali ai chemioterapici antiblastici a dosaggi assai elevati (test "extreme drug resistance", EDR). Lo studio mira a determinare in maniera conclusiva la capacità del test EDR di predire la combinazione ottimale di farmaci da adottare in ciascun paziente. Questo sottoprogetto, inizialmente focalizzato sui tumori ovarici, verrà 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 della struttura ed espressione genica nelle cellule tumorali, anche mediante l'uso dei "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).

Studi di biologia cellulare e molecolare che mirano ad ottimizzare le terapie anti-tumorali in modelli preclinici, sia attraverso l'impiego di cellule staminali neoplastiche (sottoprogetto III), sia interferendo con la neangiogenesi e il microambiente tumorale (sottoprogetto IVA).

L'allestimento di una serie di modelli sperimentali che permettano di ottimizzare l'impiego di molecole antiflogistiche nella terapia delle neoplasie della mammella, della prostata e del colon-retto (sottoprogetto IVB).

L'utilizzo di sequenze antisense per la modulazione dell'espressione di Bcl2 nei linfomi follicolari a cellule B: 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).

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).

Durante il periodo 2004-2005, i diversi sottoprogetti hanno affrontato le diverse tematiche con notevole successo.

Nel **sottoprogetto I** è stato messo a punto il test EDR sul carcinoma dell'ovaio, che è stato eseguito con successo in più di 200 pazienti. Ciò ha permesso l'attivazione di uno studio clinico multicentrico, che ha come obiettivo la comparazione tra la chemioterapia standard e quella basata sui risultati del test EDR in una casistica randomizzata di carcinomi dell'ovaio. La presenza di un platino-derivato insieme al farmaco selezionato sulla base del test è considerata obbligatoria, per assicurare il trattamento antineoplastico migliore ad ogni paziente reclutato.

Nel **sottoprogetto II** è stata indagata la farmacoresistenza mediata dalla perdita di espressione di nuovi fattori di soppressione tumorale (FEZ1, WWOX, Fhit) nei carcinomi renali e mammari, nonché i relativi meccanismi di azione. È stato inoltre documentato l'aumento di espressione di recettori (claudina 3, 4) della enterotossina di clostridium perfringens in carcinomi ovarici, particolarmente in quelli chemioresistenti. Questi risultati

appaiono importanti per lo sviluppo di nuove terapie nei carcinomi renali, mammari e ovarici, basati sull'impiego di terapie molecolari e di enterotossine ingegnerizzate.

Il **sottoprogetto III** è stato focalizzato sulle cellule primitive ("staminali") neoplastiche che sono a bassa frequenza (< 1-2%) nella popolazione tumorale, ma costituiscono la sorgente cellulare delle neoplasie e l'unica popolazione tumorigenica. Inoltre, sono spesso resistenti alla radio-chemioterapia convenzionale, e sono quindi alla base delle recidive e ricorrenze tumorali.

I risultati ottenuti nel I anno sono di grande rilievo sia per la patogenesi che per la terapia oncologica. Sono state infatti isolate e caratterizzate dai tumori del colon, del cervello, della tiroide, dello stomaco, della mammella e dell'ovaio le cellule "staminali" neoplastiche. Queste cellule possono essere coltivate in vitro indefinitivamente sotto forma di sfere tumorali, che sono in grado di riprodurre nell'animale da esperimento la neoplasia del paziente di origine. Con analoga metodologia possono essere generate le sfere staminali dei corrispondenti tessuti normali (seppure le difficoltà tecnologiche sono in questo caso maggiori). In definitiva, le sfere delle cellule staminali tumorali forniscono degli eccellenti modelli in vitro e in vivo, sia per lo studio dei meccanismi oncogenetici staminali, sia per lo sviluppo e la validazione di terapie tumorali innovative, a carattere eradicante.

Il **sottoprogetto IVA** ha fornito delle informazioni di rilievo sull'inibizione della angiogenesi tumorale, tramite l'impiego di modelli sperimentali sofisticati basati sull'analisi di 12.000 geni effettuata in cellule microvascolari di tessuti diversi, stimulate o meno con FGF2. Queste analisi hanno permesso di identificare una serie di geni che costituiscono potenziali bersagli terapeutici per bloccare l'angiogenesi e la metastatizzazione tumorale (fattori di crescita e loro recettori, proteine coinvolte nel segnale intracellulare, proteasi e proteine della matrice extracellulare). Inoltre è stato studiato 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. Infine, sono stati sviluppati dei modelli murini di "knock-out condizionale" per geni-chiave nella angiogenesi, quali i recettori dei fattori di crescita vasculoendoteliali, ovverosia delle isoforme del VEGF (Flt1, Flk1, Flt4), e i fattori "downstream" a tali recettori (ad esempio, Akt2). Questi modelli potranno fornire informazioni importanti sui meccanismi della neangiogenesi tumorale e dei relativi "targets" terapeutici.

Il **sottoprogetto IVB** ha fornito una serie di dati sperimentali che dimostrano come i principali componenti della risposta infiammatoria (specificamente iNOS e COX2, che attivano NF-KB) siano attivi nelle cellule dei tumori della prostata e del colon in progressione. Sono state quindi poste le basi per una terapia farmacologia antinfiammatoria mirata in queste neoplasie, specificamente in modelli sperimentali tumorali di tipo transgenico o da carcinogeni chimici.

Il **sottoprogetto V** ha fornito una serie di dati sperimentali che permetteranno di ottimizzare la terapia dei linfomi B follicolari attraverso la creazione di trascritti antisense per Bcl2 e la regolazione dell'attività trascrizionale di questo gene. In particolare sono stati individuati una serie di trascritti antisense nel database delle sequenze EST non ancora identificate. Inoltre è stata individuata una nuova proteina umana (TINO) che svolge un'azione regolatoria negativa sui livelli post-trascrizionali di Bcl2. La modulazione di Bcl2 verrà valutata terapeuticamente sui linfomi follicolari chemoresistenti, anche in combinazione con farmaci convenzionali.

I dati ottenuti nel **sottoprogetto VI** hanno validato l'effetto anti-angiogenico ed anti-tumorale degli inibitori delle proteasi dell'HIV ed hanno dimostrato l'effetto antitumorale degli inibitori della trascrittasi inversa (nevinaprina, efavirenz). Questi ultimi hanno determinato in vitro ed in vivo un rallentamento della proliferazione e un marcato processo differenziativo nelle cellule tumorali, con regressione neoplastica in modelli sperimentali di microcitoma, melanoma, carcinoma del colon e della prostata.

**(I) LE BASI METODOLOGICHE PER UNA CHEMIOTERAPIA ANTI-TUMORALE
MIRATA: IL SAGGIO DELL' "EXTREME DRUG RESISTANCE" (EDR) NEL
CARCINOMA OVARICO ED IN ALTRE NEOPLASIE**

Responsabile Scientifico: C. Peschle, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Centri partecipanti

Ugo Testa

Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare
Istituto Superiore di Sanità – Roma

Sergio Pecorelli, Alessandro Santin
Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia
Università di Brescia, Brescia

Francesco Cognetti, Carlo Sbiroli, Gianluigi Ferretti
Istituto Regina Elena, Roma

Giovanni Scambia
Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia
Università Cattolica, Roma

Piergluigi Benedetti Panici, Roberto Angioli
Università La Sapienza, Roma

Sandro Pignata, Stefano Greggi
Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia
Istituto per lo Studio e la Cura dei Tumori "Fondazione G. Pascale", Napoli

Emilio Piccione
Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia
Università Tor Vergata, Roma

(I) Il “trial” clinico dell’EDRA nel carcinoma ovarico

Durante questo anno di attività sono state raccolte numerose biopsie da pazienti provenienti dai centri partecipanti al protocollo: Istituto Regina Elena, Università degli studi di Brescia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Universitario Campus Biomedico, Fondazione Pascale di Napoli che hanno permesso di meglio definire la metodologia di prelievo del campione ed i profili di chemioresistenza. L’analisi collegiale di questi dati e l’ulteriore approfondimento del protocollo di studio ha provocato la modifica del protocollo stesso e la stesura di alcune raccomandazioni relative ai campioni prelevati e la formulazione di due emendamenti.

Sono state eseguite diverse modifiche rispetto al protocollo iniziale:

La presenza di un platino-derivato insieme al farmaco selezionato sulla base del test è considerata obbligatoria, per assicurare il trattamento antineoplastico migliore ad ogni paziente reclutato. Sono stati aggiunti due farmaci supplementari nel braccio sperimentale: ciclofosfamide ed etoposide. Il dosaggio e i tempi di somministrazione di ogni doppietta (platino + farmaco test-selezionato) saranno come segue:

Cisplatin 75 mg/m² d 1 q 21 plus Paclitaxel 175 mg/m² d 1 q 21
Carboplatin AUC 6 d 1 q 21 plus Paclitaxel 175 mg/m² d 1 q 21
(du Bois A, JNCI 2003; GOG0182-ICON5)

Cisplatin 75 mg/m² d 1 q 21 plus Gemcitabine 1250 mg/m² d 1,8 q 21
Carboplatin AUC 6 d 8 q 21 plus Gemcitabine 1000mg/m² d 1,8 q 21
(Belpomme D, Gynecol Oncol 2003; GOG0182-ICON5)

Cisplatin 75 mg/m² d 1 q 21 plus Docetaxel 75 mg/m² d 1 q 21
Carboplatin AUC 5-6 d 1 q 21 plus Docetaxel 75 mg/m² d 1 q 21
(Dieras V, Cancer Chemother Pharmacol 2004; Pfisterer J, Gynecol Oncol 2004, Vasey PA, BJC 2001)

Cisplatin 60 mg/m² d 1 q 28 plus Doxorubicina Liposomiale 50 mg/m² d 2 q 28
Carboplatin AUC 5 d 1 q 21 plus Doxorubicina Liposomiale 30 mg/m² d 1 q 21
(Lyass O, Clin Cancer Res 2001; GOG0182-ICON5; MITO-2)

Cisplatin 75 mg/m² d 1 q 21 plus Cyclophosphamide 750 mg/m² d 1 q 21
Carboplatin AUC 5 d 1 q 21 plus Cyclophosphamide 750 mg/m² d 1 q 21
(Piccart MJ, JNCI 2000; Willemse PHB, Int J Gynecol Oncol 1992)

Cisplatin 100 mg/m² d 1 q 21 plus Etoposide 100 mg/m² d 1-3 q 21
Carboplatin AUC 5 (300 mg/m²) plus Etoposide 100 mg/m² d 1-3 q 21
(Pujol JL, JNCI 2001; Kosmidis PA, Semin Oncol 1994)

Cisplatin 50 mg/m² d 5 q 21 plus Topotecan 0.75 mg/m² d 1-5 q 21
Carboplatin AUC 5 d 3 q 21 plus Topotecan 1.25 mg/m² d 1-3 q 21
(Rowinsky EK, JCO 1996; GOG0182-ICON5)

Se il tumore risulterà estremamente resistente al platino, sarà scelto un singolo farmaco al quale il tumore mostrerà bassa resistenza. Se più di un farmaco mostrerà la stessa bassa resistenza, sarà selezionato il farmaco con il più alto tasso di risposta segnalato in letteratura.

L’aggiustamento statistico per interval debulking surgery è già menzionato nel protocollo (“...The sample size will be increased according to the number of patients who

eventually will undergo interval debulking surgery”, pagina 22). Il criterio di correzione statistica sarà applicato per tutte le altre variabili discusse:

a) malattia residua misurabile vs non misurabile (minimal vs gross residual disease), essendo l'endpoint principale dello studio il PFS a 24 mesi

b) inizio della chemioterapia precoce vs tardivo: nel vecchio protocollo è scritto tra le 2 e le 8 settimane e si è proposto di correggere utilizzando la dicitura “patients will have to undergo radical debulking surgery within 6 weeks of random assignment (6 settimane è riportato nello studio di du Bois ed Ozols; nello studio ICON3 è scritto “as soon as possibile after surgery”)

L'utilità del second-look laparoscopico è maggiormente stressata (leggi “will be strongly recommended at the end of chemotherapy”)

Se un paziente reclutato nel braccio sperimentale subirà la chirurgia d'intervallo, l'analisi del test di estrema resistenza sarà ripetuta ed il tumore cimentato nuovamente con un'altra doppietta di farmaci che comprendono un platino-derivato ed un farmaco test-selezionato.

Nei criteri di inclusione è stato aggiunto: “peritoneal carcinomatosis with epithelial cancer histology without the evidence of any other possible primary malignancy”

La parte statistica è stata cambiata in virtù di alcuni suggerimenti e delle modifiche nel disegno dello studio: il TTP a 12 mesi è stato modificato a 24 mesi. Il PFS calcolato a 12 mesi per Carboplatino-Taxolo varia dal 70% (ICON3, stadio I-IV, ma preponderante III, Carbo AUC 6 con GFR secondo Cockcroft) all' 80% (stadio IIB-IV, Ozols con Carbo AUC 7.5 e GFR secondo Jelliffe, du Bois con Carbo AUC 6 e GFR secondo Jelliffe e Paclitaxel 185 mg/m²). Tuttavia, nei tre studi lo stesso PFS a 24 mesi diventa 40% (International Collaborative Ovarian Neoplasm Group Paclitaxel plus carboplatin versus standard chemotherapy with either single-agent carboplatin or cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in women with ovarian cancer: the ICON3 randomised trial. *Lancet*. 2002 Aug 17;360(9332):505-15; du Bois A, Luck HJ, Meier W, Adams HP, Mobus V, Costa S, Bauknecht T, Richter B, Warm M, Schroder W, Olbricht S, Nitz U, Jackisch C, Emons G, Wagner U, Kuhn W, Pfisterer J; Arbeitsgemeinschaft Gynakologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Sep 3;95(17):1320-9; Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, Mannel RS, DeGeest K, Hartenbach EM, Baergen R; Gynecologic Oncology Group. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 1;21(17):3194-200).

D'altronde, nello studio di Loizzi et al recentemente pubblicato (Loizzi V, Chan JK, Osann K, Cappuccini F, Di Saia PJ, Berman ML. Survival outcomes in patients with recurrent ovarian cancer who were treated with chemoresistance assay-guided chemotherapy. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Nov;189(5):1301-7) in pazienti con carcinoma ovarico ricorrente platino-sensibile “...the 1-year progression-free survival was 68% for patients treated by EDRA-based therapy compared with 16% for patients chosen as control (0.0002 respectively). Tale differenza, nel setting di malattia in ripresa, risulta essere molto più ampia di quello scelto come significativa nel nostro disegno statistico.

Foglio informativo, consenso informato e schede raccolta dati sono state modificate in accordo al protocollo.

External Review Board of Pathologists: è stata proposta l'istituzione di un collegio dei patologi dei vari centri partecipanti, e l'aggiunta di un consulente esterno (Prof. Pratt, Barcellona) con il compito di effettuare un'ulteriore revisione istopatologica a campione

E' stata rilevata da tutti i partecipanti la necessità di un monitoraggio dei dati raccolti dai vari centri partecipanti. Il centro dati studi clinici dell'IRE che gestisce la

randomizzazione dei pazienti e la raccolta delle CRF offre la sua disponibilità ad effettuare tale attività.

E' in via di definizione una ulteriore stesura del protocollo che affronta la problematica della farmacovigilanza secondo la normativa vigente. In tale contesto è da incorporare anche il decreto ministeriale del 17.12.2004 che regola le sperimentazioni cliniche con sponsor no profit.

La partecipazione al protocollo è stata allargata a numerosi centri (vedi elenco allegato) alcuni dei quali hanno già ottenuto l'approvazione del proprio CE di riferimento e per altri dei quali siamo ancora in attesa.

In data 4 maggio 2005 è stata arruolata la prima paziente.

(II) Attività delle U.O.: rendiconto esemplificativo della U.O. di Brescia

Il carboplatino ed il paclitaxel sono i due farmaci dimostratisi più attivi in associazione nella chemioterapia di prima linea del carcinoma epiteliale dell'ovaio e in Italia sono registrati per tale indicazione.

La chemioterapia antitumorale con tali farmaci rappresenta lo standard per il trattamento medico del carcinoma ovarico. Tuttavia è stato dimostrato che circa il 25% delle pazienti sono resistenti a questa chemioterapia (resistenza ai farmaci immediata o sviluppata entro 6 mesi dalla fine del trattamento). Il test Extreme Drug Resistance (EDR) ha dimostrato di essere in grado di predire in vitro tale resistenza con il 99% di accuratezza.

L'obiettivo del presente studio è di dimostrare che il tempo alla progressione della malattia potrà essere migliorato utilizzando un trattamento antitumorale individualizzato in base ai risultati del test EDR rispetto alla chemioterapia standard. Inoltre l'impiego di questo test nella pratica clinica potrebbe in futuro evitare l'utilizzo di farmaci inefficaci, ottimizzando la terapia di salvataggio.

STATO DI AVANZAMENTO DELLO STUDIO

Tale protocollo di studio è stato approvato dal Dipartimento Materno Infantile e Tecnologie Biomediche dell'Università degli Studi di Brescia in data 28/04/04 e dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia in data 17/06/04.

Dalla data dell'approvazione sono stati eseguiti prelievi di campioni di tessuto di carcinoma ovarico primitivo che sono stati analizzati presso il Laboratorio di riferimento dello Studio per la stima della percentuale di successo del test e dei profili di chemioresistenza al platino e al taxolo*. Tessuto neoplastico ovarico, oltre a tessuto ovarico prelevato da controlli sani in corso di intervento per altra patologia benigna, è stato inoltre conservato ed analizzato al fine di identificare nuovi marcatori diagnostici e prognostici del carcinoma ovarico mediante studio dei profili di espressione genica utilizzando la tecnologia dei microarrays. Da questo studio sono stati evidenziati geni che differenziano in modo significativo le neoplasie ovariche sierose papillifere (la variante più comune) dai tessuti epiteliali ovarici sani. Alcuni di essi, grazie alla loro elevata sensibilità e specificità, potrebbero rappresentare nuovi biomarcatori dotati di grande potenziale diagnostico per lo screening precoce e la terapia delle pazienti con cancro dell'ovaio sieroso papillifero. I geni di maggior interesse sono stati validati dal punto di vista trascrizionale tramite la Quantitative Real Time PCR e dal punto di vista proteico con colorazione immunohistochimica. Sono ora in corso studi che, sulla base di questi promettenti risultati, estenderanno la casistica anche agli altri istotipi tumorali ovarici e valuteranno l'eventuale secrezione dei suddetti antigeni tumorali nel siero delle pazienti, per verificarne la validità come biomarcatori diagnostici e prognostici.

Nel corso dell'anno 2004 il nostro Centro ha inoltre partecipato a Riunioni Operative tenutesi presso l'Istituto Superiore di Sanità per l'aggiornamento scientifico del protocollo e dell'assetto organizzativo dello studio:

Durante tali incontri sono state apportate modifiche al braccio sperimentale (da chemioterapia "single agent" sulla base dei risultati EDR a chemioterapia "multi agent" con platino + chemioterapico selezionato sulla base del test EDR) sulla base dell'evidenza che l'impiego del platino in pazienti affette da carcinoma ovarico è oggi mandatorio, ad eccezione dei casi in cui la neoplasia risulti "estremamente resistente" al platino sulla base dell'EDR; sono stati aggiunti due farmaci nel braccio sperimentale: ciclofosfamide e etoposide; è stato inoltre definito il timing dell'esecuzione del test EDR, identificando nella chirurgia d'intervallo un momento indispensabile nell'iter terapeutico di pazienti non ottimamente citoridotte in corso di intervento primario durante il quale è stata posta indicazione ad un eventuale secondo prelievo di tessuto per test EDR. E' infine stata inclusa la categoria IDR (Intermediate Drug Resistance) in quella LDR (Low Drug Resistance), per cui la resistenza ai farmaci verrà definita in 2 gruppi anzichè nei 3 precedentemente stabiliti: EDR e non-EDR (IDR + LDR)

*I dati clinici dei casi inviati sono di seguito riportati:

1. Data di nascita: 13/07/20
Età alla diagnosi: 83
22/07/04 ricovero per tumescenza pelvica + k renale
CA 125 preoperatorio = neg
17/02/04 chirurgia primaria TR=?
diagnosi: k ovaio stadio IIIA G3 + k rene cell chiare G2-3
07/04/04-19/08/04 Chemioterapia di prima linea: Carboplatino 6 cicli
risposta a terapia primaria: progressione
27/09/04: DID
2. Data di nascita: 07/09/59
Età alla diagnosi: 44
03-03-2004 ricovero per algie pelviche, riscontro ecografico di tumescenza pelvica in paziente già isterectomizzata per patologia benigna
CA 125 preoperatorio =94, CA19.9 preoperat =57, CA 15.3 preoperat =91
05-03-2004 chirurgia primaria TR<0,5 cm
diagnosi: adenocarcinoma a cellule chiare stadio IIIC
CA 125 postoperatorio =64, CA19.9 postoperat=19 CA 15.3 postoperat=32
Chemioterapia adiuvante in corso (completati 4 cicli): Taxolo 175 mg/mq - Carboplatino AUC 5
3. Data di nascita: 19/04/43
Età alla diagnosi: 66
05-03-2004 ricovero per riscontro ecografica di tumescenza abdomino-pelvica
CA125 preoperatorio = 288, CA15.3 preoperatorio= 33
08-03-2004 chirurgia primaria, TR=0
diagnosi: tumore sierosopapillare borderline stadio IIIA per citologia positiva
CA125 postoperatorio = 93
Follow up
4. Data di nascita: 25/12/1965
Età alla diagnosi: 34
25-09-2000 ricovero per algie addominali, riscontro ecografico di tumescenza pelvica
CA 125 preoperatorio =2326 CA19.9 preoperatorio =1134
03-10-2000 chirurgia primaria TR<0,5 cm

diagnosi: tumore epiteliale ovarico borderline a componente mista mucinosa e a cellule chiare stadio III
CA 125 postoperatorio =87, CA19.9 postoperatorio =53
Chemioterapia adiuvante 5 cicli: Taxolo 175 mg/mq - Carboplatino AUC 5
01-02-2001 Second Look LPT
Riposta patologica: completa
04-07-2002 recidiva pelvica (CA 125=2329)
trattamento recidiva: Chemioterapia 9 cicli: Taxolo 175 mg/mq - Carboplatino AUC 5
Ottobre 2003 rialzo CA125 (73) 379
Dicembre 2003: seconda recidiva: pelvica e lomboaortica
terapia seconda recidiva: Chemioterapia 3 cicli: Carboplatino-Gemzar
risposta: malattia stabile
15/03/04 intervento per EDRA
Chemioterapia successiva a EDR: Caelix - Gemzar

5. Data di nascita: 09/11/48
Età alla diagnosi: 55
11/03/04 ricovero per carcinoma ovarico
CA 125 preoperatorio >10.000
16/03/04 chirurgia primaria (TAHBSO), TR<1 cm
diagnosi: k ovaio sieroso papillare G3
31/01/04-15/10/04 Chemioterapia di prima linea: Taxolo Carboplatino 9 cicli (8 pre, 1 post-second-look)
28/09/04 second look LPS
risposta patologica: completa
6. Data di nascita: 12/05/67
Età alla diagnosi: 32
06-12-2002 chirurgia primaria (presso altra sede): enucleazione cisti ovarica
Diagnosi: riscontro occasionale di adenocarcinoma ovarico a cellule chiare, staging incompleto
CA 125 preoperatorio = 38
Chemioterapia adiuvante: Carboplatino 6 cicli
CA 125 a fine chemioterapia= negativo
07-2002 LPT (presso altra sede): annessiectomia sinistra, omentectomia infracolica, linfadenectomia pelvica sinistra e lomboaortica, appendicectomia, biopsie peritoneali multiple
(Esame istologico: carcinoma a cellule chiare associata a cisti endometriosa G3)
diagnosi: carcinoma a cellule chiare Stadio IIIA TR=0
Chemioterapia adiuvante: Taxolo 6 cicli
12-2003 Second Look LPS
risposta patologica: progressione
30-01-2004 chemioterapia di seconda linea: doxorubicina + ET743 (1 ciclo), interrotta per tossicità epatica
17-03-2004 open-LPS per EDR (Spedali Civili)
Chemioterapia terza linea:: Taxolo - Carboplatino 2 cicli
Risposta: progressione
27-05-04 dimissione in condizioni preterminali
7. Data di nascita: 21/02/59
Età alla diagnosi: 45

13-03-2004 (Spedali Civili) ricovero per algie addominali, distensione addominale e riscontro di ascite di ndd + massa intraepatica ipervascolarizzata di 3,5 cm all'eco addome
CA 125 preoperatorio =450 CA15.3 preoperatorio =264
23-03-2004 chirurgia primaria TR=5-10 cm
Diagnosi: cistoadenocarcinoma sieroso-papillifero Stadio VI (epatico) G3
CA 125 postoperatorio =175 CA15.3 postoperatorio =135
Chemioterapia adiuvante: Taxolo Carboplatino
Negativizzazione del CA125 dopo il 2° ciclo di terapia

8. Data di nascita: 08/11/41
Età alla diagnosi: 59
04/2000 diagnosi di k ovaio
04/2000 chirurgia primaria (TAHBSO), TR?
diagnosi: k ovaio sieroso G3
poi Chemioterapia di prima linea: Taxolo Platino 6 cicli
10/2000 second look LPT, TR=0,5 cm
poi Chemioterapia di seconda linea: PAC
07/2002 LPT esplorativa TR<1 cm
poi Chemioterapia di terza linea: ciclofosfamide
17/12/03 LPT TR macro
poi Chemioterapia di quarta linea: vinorelbina
06/04/04 LPS prelievo per EDR
03/05/04-11/02/05 carbo gem 7 cicli: regressione completa alla TC
14/01/05-20/05/05 gem 5 cicli (20/05/05: 1° gg 5° ciclo)
9. Data di nascita: 31/10/58
Età alla diagnosi: 45
05-04-2004 (Spedali Civili) ricovero per riscontro ecografico di tumescenza pelvica e localizzazioni secondarie epatiche in paziente con pregressa ovariectomia destra per patologia benigna
CA 125 preoperatorio =2843, CA15.3 preoperatorio=169
14-04-2004 chirurgia primaria TR<1 cm
Diagnosi: carcinoma sieroso-papillare Stadio IV (epatico) G3
CA 125 postoperatorio =1137
Chemioterapia adiuvante: Taxolo Carboplatino
10. Data di nascita: 04/03/48
Età alla diagnosi: 56
08-06-2004 ricovero per tumescenza pelvica
CA 125 preoperatorio = 1537
16/06/04 chirurgia primaria, TR=5-10 cm
08/07/04-07/12/04 Chemioterapia di prima linea: Taxolo Carboplatino 6 cicli
negativizzazione ca125: dopo 2° ciclo
29/09/04 chirurgia d'intervallo, TR=0
risposta a terapia primaria: parziale macroscopica
30/12/04: dimissione dopo ultimo ciclo CT
11. Data di nascita: 25/03/31
Età alla diagnosi: 72
22/01/04 ricovero per tumescenza pelvica
CA 125 preoperatorio = 1094

02/02/04 chirurgia primaria, TR=5-10 cm
diagnosi: k ovaio sieroso papillifero stadio IIIC G3
13/02/04-28/05/04 Chemioterapia di prima linea: Taxolo Carboplatino 6 cicli
negativizzazione ca125: dopo 3° ciclo
05/07/04 second look TR=0 (invio x EDR)
risposta a terapia primaria: no change
25/08/04-21/02/05 chemioterapia seconda linea topotecan 9 cicli
risposta a chemioterapia seconda linea: progressione
da 21/03/05 chemioterapia terza linea VP16 per os
16/05/05 dimissione dopo 3° ciclo VP16, in lenta progressione

(III) Il saggio in vitro dell'EDR tumorale: studi biologici

Durante l'anno 2004 e l'inizio del 2005 sono state processate 211 neoplasie ginecologiche femminili (148 carcinomi dell'ovaio, 44 carcinomi della cervice uterina, 10 carcinomi endometriali e 9 carcinomi della vulva) al fine di allestire un test in vitro di chemioresistenza/chemiosensibilità. Il test di chemioresistenza in vitro è stato realizzato secondo la metodologia dell'Extreme Drug Resistance Assay (EDRA).

Prendendo in considerazione l'intera casistica di carcinomi dell'ovaio e della cervice uterina è stato possibile allestire un test EDRA utilizzabile a fini clinici nel 54% dei casi di carcinoma dell'ovaio e nel 35% dei casi di carcinoma della cervice uterina. L'insuccesso nella realizzazione del test EDRA è stata dovuta in larga misura alla scarsa disponibilità di materiale biotico tumorale (< 1 gr di tessuto tumorale). Infatti, se vengono analizzati solo i casi per i quali era disponibile almeno 1 gr di tessuto biotico tumorale le percentuali di successo salgono ad oltre l'80% sia per il carcinoma ovarico che per quello della cervice uterina.

Pertanto, nell'ambito del protocollo clinico che è stato intrapreso a partire dall'01/05/2005 è stato inserito fra i criteri clinici di eleggibilità, la disponibilità di materiale biotico tumorale uguale o superiore ad 1 gr.

L'analisi del profilo di chemioresistenza in vitro ha mostrato che nel carcinoma dell'ovaio viene riscontrata EDR (Extreme Drug Resistance) ai derivati del platino nel 4 ed 8% dei casi (rispettivamente per il cisplatino ed il carboplatino) ed ai derivati del taxolo nel 20-33% dei casi (rispettivamente per il taxotere e per il paclitaxolo). Nel carcinoma della cervice uterina viene riscontrata EDR per il cisplatino nel 3% dei casi e per il taxolo nel 20% dei casi. Queste osservazioni hanno avuto delle importanti ricadute per quanto ha riguardato le opzioni terapeutiche prescelte nell'ambito del protocollo clinico di fase III che è basato sull'apporto laboratoristico fornito dal test EDRA.

In parallelo sono state intraprese delle attività di ricerca aventi come obiettivo precipuo di valutare la sensibilità di cellule di carcinoma ovarico ad un inibitore del proteosoma, il VELCADE, di recente introdotto in terapia oncologica. Questo inibitore, in particolare quando aggiunto insieme al ligando di morte cellulare TRAIL, è in grado di indurre morte cellulare, anche in cellule che presentano un elevato profilo di chemioresistenza.

E' stato inoltre intrapreso uno screening di analisi del profilo di attivazione dei recettori tirosinchinasici nel carcinoma ovarico. L'assay utilizzato consente di studiare lo stato di fosforilazione dei vari recettori tirosinchinasici. I casi finora studiati hanno indicato un profilo di attivazione riproducibile che implica costantemente la presenza del recettore del fattore di crescita epidermico e dell'insulina costitutivamente attivati in tutti i casi sinora analizzati. Inoltre risultano frequentemente attivati in maniera costitutiva anche i recettori beta del PDGF e il recettore ERB4.

Pubblicazioni

Testa U., Pasquini L., Petrucci E. In vitro assays of tumor chemesensitivity and chemoresistance. *Drugs of the Future*, 29: 1035-1042, 2004

Budget**I° anno**

Finanziamento Totale	€ 700.000 *
-----------------------------	--------------------

Questo budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo (in particolare per il test EDR), per le apparecchiature (potenziamento delle attrezzature per il test EDR), per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget è stato suddiviso tra le diverse U.O. partecipanti, indicate a pag. 5.

II° anno

Finanziamento totale	€ 810.000 **
-----------------------------	---------------------

Questo budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo (in particolare per il test EDR), per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget verrà suddiviso tra le diverse U.O. indicate a pag. 5, coerentemente al primo anno di attività

III° anno

Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.

* € 800.000 - € 100.000 (slittati al II° anno)

** € 710.000 + € 100.000 (residuo del I° anno)

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

Responsabili Scientifici: C.M. Croce, Ohio University, Columbus, USA
C. Peschle, G. Marziali, F. Facchiano, Istituto
Superiore di Sanità

U.O. Associate: A.D. Santin, Università di Brescia/University of
Arkansas, Little Rock, USA
A. Vecchione, Università La Sapienza, Roma

(I) Nuovi geni di soppressione tumorale alterati nella farmacoresistenza

Per quanto concerne il ruolo di FEZ1 nell'oncogenesi e nella farmacoresistenza, in questo primo anno è stato studiato questo soppressore tumorale nei carcinomi renali ad alta aggressività, in associazione ad una serie di fattori oncogenici e anti-oncogenici. 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 linfonodali (1).

Parallelamente, abbiamo caratterizzato un nuovo gene di soppressione tumorale chiamato WWOX, un ossidoreduttasi che contiene un dominio WW, localizzato nel FRA16D, uno dei più attivi siti fragili del genoma umano. L'espressione del WWOX è risultata alterata nei tumori della mammella, della prostata, dell'ovaio, del polmone, del pancreas e dello stomaco a causa di trascritti aberranti o, più raramente, di mutazioni puntiformi (2-6). Inoltre abbiamo confermato l'attività soppressoria di WWOX nei confronti dei carcinomi pancreatici, mostrando come la riespressione di questo gene impedisca l'espansione clonale del tumore (4). I nostri dati preliminari mostrano che l'assenza di WWOX conferisce una maggiore resistenza all'azione dei maggiori farmaci antitumorali in linee cellulari tumorali di prostata, pancreas e stomaco. Allo scopo di comprendere il meccanismo d'azione di WWOX, abbiamo cercato dei partner proteici di WWOX che ne potessero mediare l'azione antitumorale. A questo proposito, uno dei candidati più promettenti sembra essere costituito da p73, una proteina della famiglia di p53 che possiede una analoga attività di controllo della tumorigenesi e che potenzia l'azione proapoptotica di WWOX (5). Infine, abbiamo dimostrato che il primo dominio WW di WWOX lega ad alta affinità AP-2 gamma, un fattore di trascrizione frequentemente amplificato nel carcinoma della mammella. I nostri dati mostrano chiaramente come WWOX sequestri AP-2 gamma nel citoplasma, bloccando la potente attività oncogenica svolta da quest'ultimo a livello nucleare (6).

Questi risultati ci permetteranno di ottimizzare le strategie di terapia genica su una serie di carcinomi ad elevato impatto socio-sanitario.

Pubblicazioni

• Vecchione A, Galetti TP, Gardiman M, Ishii H, Giarnieri E, et al: Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical study of 11 cases. BMC Urol 2004, 4: 11-19

- Matsuyama A, Croce CM, Huebner K. Common fragile genes. *Eur J Histochem.* 2004;48(1):29-36.
- Aqeilan RI, Kuroki T, Pekarsky Y, Albagha O, Trapasso F, et al. Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 May 1;10(9):3053-8.
- Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, et al. The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 1;10(7):2459-65.
- Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, Palamarchuk A, Letofsky J, et al. Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Mar 30;101(13):4401-6.
- Aqeilan RI, Palamarchuk A, Weigel RJ, Herrero JJ, Pekarsky Y, Croce CM. Physical and functional interactions between the Wwox tumor suppressor protein and the AP-2gamma transcription factor. *Cancer Res.* 2004 Nov 15;64(22):8256-61.

(II) Le enterotossine nel trattamento dei tumori ovarici chemoresistenti

Il cancro epiteliale dell'ovaio rimane la neoplasia ginecologica gravata dalla piu' alta letalita'. 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 priorita'.

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 piu' espressi nei tumori ovarici rispetto al tessuto ovarico normale (*Santin et al., Int. J. Cancer, 112;14-25;2004*).

L'espressione di questi geni e' 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 piu' elevati di Claudina 3 e Claudina 4 rispetto ai tumori ovarici chemiosensibili.

Poiche' 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 abbiamo esposto alla CPE numerosi tumori ovarici sierosi papilliferi (la variante istologica piu' 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 esprimenti 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 e' descritta nel manoscritto sottocitato "Treatment of Chemotherapy-Resistant Human Ovarian Cancer Xenografts in C.B-17/SCID Mice by Intraperitoneal Administration of Clostridium Perfringens Enterotoxin (CPE)".

(III) Ruolo di FEZ1 nella resistenza farmacologica al taxolo**Espressione di FEZ1 in carcinomi mammari primitivi**

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

1.2 Preparazione dei campioni: Per la preparazione dei campioni è stata sfruttata la tecnologia tissue-microarray. Gli array sono stati prodotti attraverso un tissue-arrayer manuale (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) partendo da campioni di tessuto depositati. Con questo sistema, abbiamo ottenuto vetrini contenenti 252 casi diversi ciascuno.

Analisi immunoistochimica di FEZ1, ER e PR: 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".

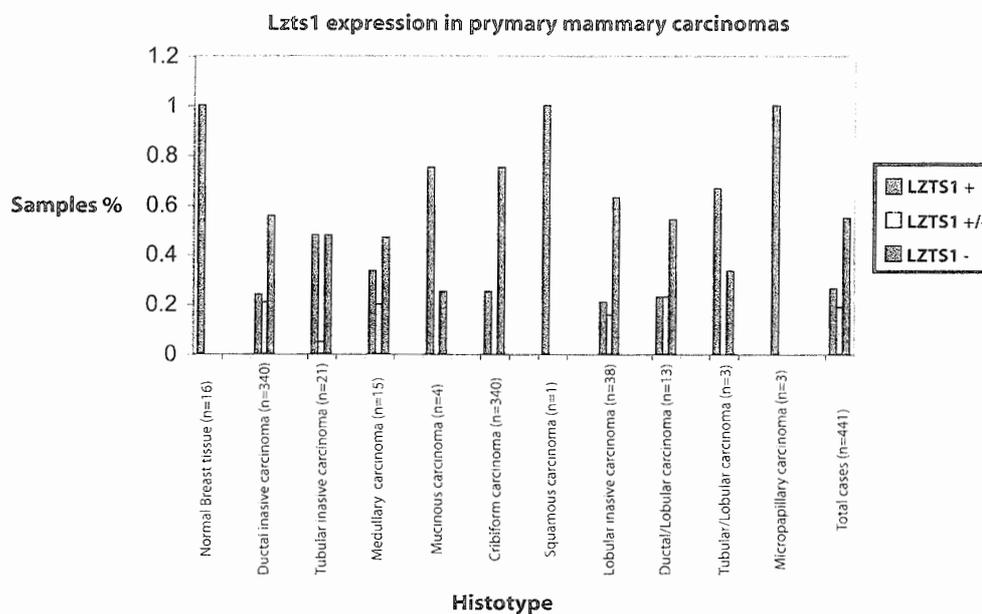
Ciascun caso, classificato secondo il particolare istotipo, è corredato di storia clinica, eventuale terapia somministrata e follow-up.

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.

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 ($p < 0.05$).

(Tab. 1)



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

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

2.1 Generazione del clone stabile in cellule derivate da carcinoma mammario (MCF-7) negative per FEZ1.

Per generare un clone stabile in questa linea cellulare abbiamo utilizzato un sistema basato sul repressore Tet di E.Coli (TetR) che controlla negativamente i geni dell'operon sul transposone Tn 10. TetR blocca la trascrizione di tali geni legandosi alle sequenze dell'operatore Tet (TetO) in assenza di tetraciclina.

La realizzazione del sistema prevede una doppia trasfezione stabile che includa sia il plasmide regolatore che il response plasmid. Per far questo, abbiamo prima generato un clone stabile contenente il plasmid regolatore (pTet-Off). Le cellule target (MCF-7) sono state cresciute fino ad 80% confluenza in mezzo completo e trasfettate con il plasmide Tet-Off. Quindi sono state selezionate 48h dopo trasfezione in G418, la cui concentrazione ottimale è stata calcolata mediante kill-curve. Dopo 2 settimane di selezione, comparse le colonie di resistenza, queste sono state isolate e diluite fino ad arrivare 30 singoli cloni, ciascuno sottoposto a screening per identificare quello con massima induzione e minimo background. Lo screening prevede una trasfezione provvisoria con un vettore reporter, pTRE2-Luc: i cloni sono stati espansi fino all'80% di confluenza, quindi tripsinizzati ed 2/3 sono stati utilizzati per lo screening, essendo trasfettati con pTRE2-Luc e piastrati in due pozzetti di una 6-well plate. Dopo 24 ore, in uno dei pozzetti è stata aggiunta doxiciclina, un derivato della tetraciclina e, dopo 48 ore, è stato compiuto il saggio di induzione. Sono stati selezionati i cloni con maggiore inducibilità e minore background.

Il cDNA full-length di FEZ1 è stato clonato mediante RT-PCR da cDNA di tessuto cerebrale umano (CLONTECH) e sequenziato. Quindi è stato sub-clonato nel vettore Tet-Off inducibile portatore di una resistenza alla puromicina, pTRE-Puro, e trasfettato nei cloni precedentemente selezionati. Compiuta la stessa procedura di selezione sopra esposta (ma con puromicina) i cloni sono stati mantenuti in coltura con doxiciclina per mantenere spenta la trascrizione di FEZ1 (Fig.1).

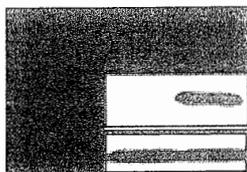


Fig. Esempio di clone inducibile per Fez1. Western Blot per Fez1 pannello superiore e per B-actina, pannello inferiore. Dox+: Le cellule sono mantenuti in coltura con Doxicillina. Dox-: Le cellule sono mantenuti in coltura in assenza di Doxicillina.

2.2 Determinazione della sensibilità al taxolo, in vitro.

La determinazione della sensibilità al taxolo è in corso. Le cellule MCF-7 FEZ1 +/+ e -/-, ottenute al punto 2.1 vengono trattate con Taxolo dissolto in dimetilsulfoxide (Sigma, St.Louis, Missouri, USA) in mezzo completo per 6,12,18,24,48,72 ore a differenti concentrazioni (0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM). La concentrazione finale di dimetilsulfoxide è stata mantenuta al di sotto di 0.05% così da non esercitare un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare. Ad ogni time-point le cellule verranno tripsinizzate e contate usando un emocitometro. Per saggiare la chemiosensibilità al taxolo dei cloni FEZ1 positivi e negativi verrà usato un MTS-assay ed un electron coupling reagent (PMS), specificatamente il "Cell Titer 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay kit" (Promega).

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* 24:173:179, 2005.
- Ishii H, Mimori K, Inageta T, Murakumo Y, Vecchione A, Mori M, Furukawa Y. Components of DNA Damage Checkpoint Pathway Regulate UV Exposure-Dependent Alterations of Gene Expression of FHIT and WWOX at Chromosome Fragile Sites. *Mol Cancer Res.* 3:130-138, 2005.
- Vecchione A., Ishii H., Baldassarre G., Belletti B., Fong L.Y.Y., et al. Disruption of the *Fez1/Lzts1* tumor suppressor gene in mice causes loss of G2/M phase checkpoint and increased susceptibility to carcinogenesis. Submitted 2005

Budget**I° anno**

Finanziamento totale	€ 750.000
-----------------------------	------------------

Questo budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget è stato suddiviso tra le diverse U.O. partecipanti, indicate a pag. 14.

II° anno

Finanziamento totale	€ 680.000
-----------------------------	------------------

Questo budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget verrà suddiviso tra le diverse U.O. indicate a pag. 14, coerentemente al primo anno di attività.

III° anno. Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.

**(III) LE CELLULE NEOPLASTICHE PRIMITIVE E I MECCANISMI ANTI-APOPTOTICI:
LE BASI CELLULARI DELLA FARMACORESISTENZA TUMORALE**

Responsabili Scientifici: R. De Maria, Istituto Superiore di Sanità

C. Croce/C. Peschle, M. Valtieri, Ohio University,

Columbus, USA/Istituto Superiore di Sanità

(l) Le cellule staminali tumorali come bersaglio della terapia antineoplastica

Questa linea di ricerca del progetto oncotecnologico si propone di isolare, caratterizzare e coltivare le cellule staminali neoplastiche (CSC) presenti in una serie di tumori solidi. Si prevede che la valutazione diretta dell'azione citotossica di farmaci e biomolecole su queste cellule, che costituiscono l'unica popolazione cellulare tumorigenica, permetterà un notevolissimo avanzamento delle conoscenze sui meccanismi alla base della farmacoresistenza e favorirà l'allestimento di terapie innovative.

Nella prima fase della ricerca abbiamo isolato cellule staminali tumorali a partire da tumori di origine diversa. La dissociazione meccanica o enzimatica dei pezzi operatori e la successiva coltura *in vitro* delle cellule ottenute, in assenza di siero e in condizioni che non permettono alle cellule di aderire alla piastra di coltura, ha consentito di selezionare cellule tumorali indifferenziate che crescono come aggregati sferici, simili agli sferoidi (tumorsfere) oppure come cellule singole in sospensione a seconda dei tessuti. I terreni di coltura sono stati ottimizzati per le cellule tumorali di diversi tessuti, modificando la composizione e/o la concentrazione di nutrienti e fattori di crescita specifici allo scopo di favorire la crescita e l'espansione delle cellule ottenute di origine diversa.

In questo modo sono state isolate ed espanse *in vitro* CSC da tumori del colon, del cervello, della tiroide, dello stomaco, del polmone, della mammella, dell'ovaio, del rene e della prostata. 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 la diagnosi delle diverse neoplasie, specifici per varie citocheratine o per antigeni tumorali, dimostrando una forte corrispondenza con i tumori di origine. Per alcuni tessuti è stato possibile ottenere le corrispondenti cellule staminali sane, in particolare per il rene e per la tiroide, che saranno molto utili per un confronto con le corrispondenti cellule tumorali ottenute dallo stesso paziente.

Nel caso delle sfere prodotte da glioblastomi, adenocarcinomi del colon, tumori follicolari o papillari della tiroide e tumori del polmone sono stati eseguiti esperimenti *in vivo* utilizzando come recipienti topi immunologicamente compromessi (Nudi, SCID e NOD/SCID). Le cellule staminali tumorali sono state inoculate sottocute e dopo un periodo variabile tra le 4 e le 8 settimane si sono dimostrate in grado di attecchire, riproducendo un tumore istologicamente molto simile a quello di partenza, a dimostrazione della loro capacità tumorigenica. Al momento stiamo effettuando studi volti a determinare la quantità minima di CSC, sufficiente a trasferire la malattia nell'animale ospite allo scopo di valutare il grado di staminalità delle cellule ottenute.

Inoltre, in questo primo anno di attività, sono state paragonate cellule staminali neurali normali con delle cellule staminali isolate da questo tumore. 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.

L'identificazione dei meccanismi molecolari che sono alla base della resistenza delle cellule staminali neurali normali all'infiammazione, che per altro si osserva frequentemente nella regione in cui si sviluppa il glioblastoma, ha stimolato lo studio dell'effetto dell'infiammazione sulle cellule staminali tumorali. Una delle ipotesi valutate consiste nella capacità delle cellule staminali tumorali di indurre apoptosi nelle cellule immunitarie infiltranti, in particolare linfociti T e monociti, attraverso un fenomeno conosciuto come

immunoprivilegio. E' infatti emerso che le citochine infiammatorie non solo sono prive di tossicità nei confronti delle CSC, ma possono perfino favorire la progressione tumorale attraverso l'eliminazione delle cellule immunitarie con attività antitumorale. Le citochine infiammatorie promuovono l'espressione di diversi ligandi di morte sulle CSC, in particolare di TRAIL, Fas ligand e TLA1. In esperimenti di co-coltura, le cellule staminali neurali tumorali pretrattate con le citochine infiammatorie si sono dimostrate molto efficaci nell'indurre apoptosi di cellule linfoidi e monocitarie, innescando l'attivazione di una serie di recettori di morte (manoscritto in preparazione).

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.

I nostri studi hanno anche portato alla individuazione di 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 trials 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 differenziate e staminali di glioblastoma di tutti i 10 pazienti da noi esaminati ha mostrato che TRAIL non ha alcuna azione citotossica su queste cellule. Tramite un'analisi dell'espressione dei geni che regolano la risposta terapeutica a TRAIL sono state 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 trials 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 (2).

Sempre in ambito di chemioresistenza, abbiamo dimostrato che l'interleuchina-4 è prodotta dai tumori della mammella, della prostata e della vescica dove agisce come fattore di crescita tumorale e di resistenza alla chemioterapia attraverso l'induzione di geni anti-apoptotici come Bcl-xL (3). L'analisi delle cellule staminali neoplastiche di tiroide, colon e mammella ha evidenziato che la produzione di IL-4 avviene anche al livello della cellula staminale tumorale dove promuove l'espressione di una serie di proteine antiapoptotiche, quali Bcl-xL, Bcl-2, Flip e PED. Per quanto concerne le cellule staminali tumorali tiroidee, sono stati condotti anche degli studi funzionali basati sull'impiego di anticorpi bloccanti l'IL-4 che hanno sensibilizzato le cellule staminali tumorali, prima resistenti, al taxolo e a TRAIL. Questi studi potrebbero fornire un'arma potenzialmente molto efficace per ridurre la tumorigenicità e aumentare la sensibilità a TRAIL e ai chemioterapici in queste neoplasie di particolare rilievo per il SSN.

Dal momento che la maggior parte degli agenti chemioterapici convenzionali utilizzati nella terapia del glioblastoma si è mostrata inefficace, sia in clinica, sia nella induzione di citotossicità sulle cellule staminali di glioblastoma, si è resa necessaria la sperimentazione di strategie terapeutiche innovative. L'isolamento ed espansione *in vitro* delle cellule staminali di glioblastoma ci ha permesso di valutare su queste cellule l'efficacia di agenti anti-tumorali innovativi, come gli inibitori delle istone deacetilasi e gli

inibitori del proteasoma. Tra gli inibitori delle istone deacetilasi è stato scelto SAHA poiché questo composto si è dimostrato privo di effetti collaterali in numerosi studi condotti su modelli murini. Inoltre in studi di Fase 1, saha ha mostrato bassa tossicità e ampia attività antitumorale sia per neoplasie ematologiche che per alcuni tumori solidi. I nostri studi *in vitro* mostrano un elevato effetto citotossico di SAHA sia sulle cellule primarie più differenziate che sulle cellule staminali di glioblastoma, che rappresentano i bersagli terapeutici più importanti. Il trattamento con SAHA determina variazioni nell'espressione di geni coinvolti nel ciclo cellulare, come aumento di p21 e diminuzione di survivina, e di geni pro- ed anti-apoptotici, come riduzione di Bcl-xL e aumento di TRAIL, provocando arresto della crescita e induzione di apoptosi nelle cellule staminali tumorali. Al momento stiamo analizzando il tipo di segnale apoptotico innescato da SAHA nelle cellule staminali di glioblastoma. Esperimenti preliminari suggeriscono un coinvolgimento sia del pathway estrinseco mediato dai recettori di TRAIL sia di quello intrinseco mitocondriale. Stiamo inoltre valutando il ruolo delle caspasi coinvolte nell'esecuzione del processo apoptotico indotto da SAHA, poiché il processo di morte non è inibito dagli inibitori delle caspasi 3 e 7, più frequentemente attivate in corso di apoptosi, suggerendo il coinvolgimento di altre caspasi, come la caspasi 2. Ci proponiamo di valutare l'efficacia di SAHA su xenotrapianti di glioblastoma ottenuti in topi SCID mediante inoculo di cellule staminali di glioblastoma, che rappresentano un ottimo modello pre-clinico per la valutazione dell'efficacia di strategie terapeutiche diverse, in quanto riproducono tumori istologicamente e biologicamente sovrapponibili a quelli umani.

Infine studi preliminari hanno mostrato una eccezionale attività citotossica sulle cellule staminali di glioblastoma, (anche a dosi molto basse, come 10^{-8} M), da parte del bortezomib, un farmaco inibitore del proteasoma, già ampiamente utilizzato in clinica per il trattamento del mieloma. Esperimenti preliminari su modelli murini di xenotrapianto di glioblastoma mostrano una notevole riduzione del tumore negli animali trattati con inibitori del proteasoma che in futuro prevediamo di associare agli inibitori dell'istone deacetilasi. Questi studi potrebbero fornire nuove armi terapeutiche per la cura dei tumori chemioresistenti.

Pubblicazioni:

- Ricci-Vitiani L, Pedini F, Mollinari C, Condorelli G, Bonci D, et al. Absence of Caspase 8 and High Expression of PED Protect Primitive Neural Cells from Cell Death. *Journal Experimental Medicine* 200:1257-66, 2004.
- Conticello C, Pedini F, Zeuner A, Patti M, Zerilli M, et al. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. *Journal of Immunology* 172:5467-77, 2004.
- Eramo A, Pallini R, Lotti F, Sette G, et al. Inhibition of DNA methylation sensitizes glioblastoma for TRAIL-mediated destruction (submitted).

(II) La genetica molecolare nella chemioresistenza delle cellule staminali neoplastiche

Durante il primo anno di attività, questa unità operativa si è occupata di identificare dei geni potenzialmente rilevanti nelle cellule primitive tumorali. Uno dei geni di interesse si è dimostrato l'HMGA1 (la prima proteina dell'*high mobility group A*), una proteina della cromatina che pur non avendo attività trascrizionale è in grado di regolare l'espressione di diversi geni. Il blocco di uno o due alleli del gene *hmga1* ha modificato l'espressione di un numero molto elevato di geni nelle cellule staminali embrionali. L'analisi con *microarrays* ha infatti dimostrato una variazione in positivo superiore a 4 volte di 87 geni e una variazione in negativo di 163 geni. Queste variazioni si sono dimostrate specifiche per le cellule primitive, non essendo rilevate nei tessuti differenziati (Martinez Hoyos J et al,

2004). Questi risultati sono particolarmente significativi alla luce della correlazione fra l'espressione di HMGA1 e la trasformazione neoplastica. E' stato infatti dimostrato che quest'ultima avviene a carico del pool di cellule primitive sia nel compartimento emopoietico che nel tessuto nervoso e mammario, dove sono state recentemente identificate cellule staminali cancerose responsabili della rigenerazione tumorale. Pertanto l'azione specifica dell'HMGA1 sulle cellule primitive probabilmente costituisce un fattore chiave nella tumorigenesi e lo studio dei geni regolati da HMGA1 potrebbe rivelarsi fondamentale per migliorare la comprensione del processo di trasformazione neoplastica. Su questa stessa linea, stiamo analizzando l'azione di soppressione tumorale dei geni F1H e Testin a livello delle cellule tumorigeniche alla base del cancro al polmone e allo stomaco (Zanesi N et al, 2005; Drusco A et al, 2005).

Parallelamente, abbiamo cercato di capire se esistano dei geni tumorali non conosciuti la cui alterazione possa essere alla base della predisposizione genetica a bassa penetranza che si osserva frequentemente in una serie di famiglie che non mostrano alterazioni genetiche dei principali fattori di soppressione tumorale conosciuti. Basandoci sul fatto che la delezione del 13q14 sia presente in un numero molto elevato di neoplasie, abbiamo identificato un importante gene di soppressione tumorale. Abbiamo infatti dimostrato che la mutazione della proteina soppressore di tumore 1 simile al fattore di ribosilazione dell'ADP (ARLTS1) è responsabile di una generale predisposizione ai tumori su base familiare. In uno studio effettuato su un campione di 216 pazienti con tumori sporadici (leucemia mieloide cronica, cancro alla tiroide, colon, mammella, polmone e pancreas) o con pancitopenia idiopatica (un disordine del sangue, generalmente associato ai tumori, caratterizzato dalla mancanza di piastrine ed globuli rossi e bianchi), uno di 109 pazienti con forme di cancro familiare e uno di controllo costituito da 475 persone sane o con patologie non tumorali, la frequenza di un polimorfismo G446A (Trp149Stop) che codifica per una ARLTS1 troncata era significativamente più frequente nei pazienti con tumore familiare. Inoltre l'espressione di ARLTS1 si è dimostrata ridotta a causa di una metilazione del suo promotore nel 25% dei tumori primari (Calin GA et al, 2005). La riespressione di ARLTS1 nelle cellule tumorali si è dimostrata in grado di promuovere l'apoptosi e di sopprimere l'azione tumorigenica di linee cellulari e di cellule primitive primarie di tumori del polmone, mentre la forma troncata si è dimostrata inefficace (Calin GA et al, 2005). I nostri dati preliminari indicano una diversa espressione genica in cloni di cellule primitive che esprimono la forma intera o la forma troncata di ARLTS1, a suggerire che questa mutazione associata ai tumori modifica l'espressione di una serie di geni coinvolti nei processi di cancerogenesi. Questi geni sembrano regolare anche la risposta farmacologia antitumorale, in quanto le cellule con ARLTS1 troncata rispondono meno ad una serie di farmaci antiblastici. Questi risultati saranno oggetto di approfondimento nei prossimi due anni del progetto, con l'obiettivo di valutare se particolari classi di farmaci siano più appropriati per la terapia dei pazienti che abbiano la mutazione di ARLTS1.

Infine questa U.O. ha sviluppato delle ricerche sui microRNA, allo scopo di studiarne il ruolo nelle cellule primitive neoplastiche nei prossimi mesi. In particolare, 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 (Calin GA et al, 2005).

Dato che l'analisi di questi microRNA richiede un'elevata quantità di materiale (circa 20microgrammi/northern), non sempre disponibile per la comparazione delle cellule primitive neoplastiche con la controparte normale, 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 40basi, contenenti 368 sonde specifiche generate da 248 microRNA. 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 (Liu CG et al, 2004). Le analisi di espressione sono state confermate e validate tramite Northern blot. 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 (Calin GA et al, 2004).

Pubblicazioni:

- Martinez Hoyos J, Fedele M, Battista S, Pentimalli F, Kruhoffer M, et al. Identification of the genes up- and down-regulated by the high mobility group A1 (HMGA1) proteins: tissue specificity of the HMGA1-dependent gene regulation. *Cancer Res.* 64:5728-35, 2004.
- Zanesi N, Mancini R, Sevignani C, Vecchione A, Kaou M, et al. Lung cancer susceptibility in Fhit-deficient mice is increased by Vhl haploinsufficiency. *Cancer Res.* 65:6576-82, 2005.
- Drusco A, Zanesi N, Roldo C, Trapasso F, Farber JL, et al. Knockout mice reveal a tumor suppressor function for Testin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:10947-51, 2005.
- Calin GA, Trapasso F, Shimizu M, Dumitru CD, Yendamuri S, et al. Familial cancer associated with a polymorphism in ARLTS1. *N Engl J Med.* 352:1667-76, 2005.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:11755-60, 2004.
- Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9740-4, 2004.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:2999-3004, 2004.

Budget

I° anno

Finanziamento Totale	€ 700.000
-----------------------------	------------------

Questo budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget è stato suddiviso tra le diverse U.O. partecipanti, indicate a pag. 21.

II° anno

Finanziamento totale	€ 635.000
-----------------------------	------------------

Questo budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget verrà suddiviso tra le diverse U.O. indicate a pag. 21, coerentemente al primo anno di attività.

III° anno. Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.

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

Responsabili Scientifici: M. Presta, Università di Brescia

B. Ensoli, Istituto Superiore di Sanità

G. Condorelli/ F. Facchiano, Università "La Sapienza",
Roma/ Istituto Superiore di Sanità

(I) Nuovi modulatori dell'angiogenesi tumoraleScopo del progetto

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

Sintesi dei risultati ottenutiFase 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 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 (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 (vedi figura).

FGF2-REGULATED GENES						
	1G11	SIEC	MBE	MBE-3F3	MAE-3F2	MAE-3F2T
UP:	239	183	103	147	627	1144
DOWN:	216	178	134	1096	446	1270
	FGF2-treated			FGF2-transfected		

I geni coinvolti riguardano geni appartenenti alla famiglia dei fattori di crescita e loro recettori, proteine coinvolte nel signalling intracellulare, proteasi e proteine della matrice extracellulare. Tra i geni maggiormente e costantemente up-regolati da FGF2 rientra sicuramente il gene per l'osteopontina, proteina coinvolta nei processi immuno-

infiammatori e nella crescita e metastatizzazione tumorale, ed una serie di fattori chemiotattici per cellule dell'infiltrato infiammatorio (chemochine). Abbiamo inoltre identificato tra i geni indotti da FGF2 in cellule endoteliali in vitro ed in vivo la subunità p12 della DNA polimerasi δ , coinvolta nei processi di replicazione cellulare, e la proteina Drm/gremlin appartenente alla famiglia delle cysteine-knot proteins dotate di attività BMP antagonista. Per quanto riguarda p12, abbiamo condotto studi che hanno dimostrato come tale proteina sia necessaria per la replicazione cellulare indotta da FGF2 (Dell'Era P et al, 2005). Abbiamo inoltre studiato l'espressione di Drm/gremlin durante lo sviluppo embrionale in Zebrafish (Nicoli S et al, 2005) ed attualmente stiamo studiando l'impatto della sua overespressione in cellule staminali murine durante il processo di differenziamento dei corpi embrionali in vitro.

Utilizzando HIV-Tat come stimolo angiogenetico, abbiamo approfondito il ruolo dell'integrina $\alpha v \beta 3$ nel processo di angiogenesi, identificando alcuni dei segnali di trasduzione (focal adhesion kinase ed $\text{NF}\kappa\text{B}$) attivati dall'engagement di tale integrina durante l'angiogenesi indotta da Tat (Urbinati C et al, submitted)

Infine, dato il ruolo fondamentale giocato dalla risposta immunitaria nel modulare l'angiogenesi tumorale, abbiamo studiato il profilo angiogenetico di cellule dendritiche attivate da un ambiente citochinico di tipo Th2 (Ribaldi E et al, submitted)).

Fase 2: "Creazione di strumenti farmacologici per inibire i meccanismi pro-angiogenesi identificati".

Stante l'indubbia importanza di FGF2 nell'angiogenesi, da noi sottolineata in una recente monografia (Presta M et al, 2005), abbiamo condotto studi volti alla caratterizzazione di nuove eparine biotecnologiche a basso peso molecolare volte ad inibire l'attività angiogenetica di FGF2 (Presta M et al, 2005).

Abbiamo inoltre studiato alcuni derivati del trans-resveratrolo caratterizzati da una attività antiangiogenetica e di "vascular targeting" grazie alla loro capacità di destabilizzare i microtubuli delle cellule endoteliali (Belleri M et al, 2005).

Infine, anche sulla base dei nostri studi sopraccitati, abbiamo investigato la capacità antiangiogenetica di un nuovo peptico-mimetico in grado di fungere da nell'engagement dell'integrina $\alpha v \beta 3$ (Urbinati C et al, submitted).

Pubblicazioni:

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

- Nicoli S., Gilardelli C.N., Pozzoli O., Presta M. and Cotelli F. Regulated expression pattern of gremlin during zebrafish development. *Gene Expr Patterns* 5:539-44, 2005.

- Presta M., Dell'Era P., Mitola S., Moroni E., Ronca R. and Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:159-78, 2005.

- Presta M., Oreste P., Zoppetti G., Belleri M., Tanghetti E., et al Antiangiogenic activity of semisynthetic biotechnological heparins: low-molecular-weight-sulfated Escherichia coli K5 polysaccharide derivatives as fibroblast growth factor antagonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:71-6, 2005.

- Belleri, M., Ribatti D., Nicoli S., Cotelli F., Forti L., et al. Antiangiogenic and vascular-targeting activity of the microtubule-destabilizing trans-resveratrol derivative 3,5,4'-trimethoxystilbene. *Mol Pharmacol* 67:1451-9, 2005.

Manoscritti inviati per la pubblicazione:

- Ribaldi E., Musso T., Moroni M., Urbinati C., Bernasconi S., et al. Pro-angiogenic properties of alternatively activated dendritic cells. *Blood*, submitted

- Urbinati C., Bugatti A., Giacca M., Schlaepfer D., Presta M. and M. Rusnati $\alpha_v\beta_3$ integrin-dependent activation of focal adhesion kinase mediates NF κ B activation and motogenic activity by HIV-1 Tat in endothelial cells. J. Cell Science, submitted.
- Urbinati C., Mitola S., Tanghetti E., Kumar C., Waltenberger J., et al. Integrin alpha v beta 3 as a target for blocking HIV-1 Tat induced endothelial cell activation in vitro and angiogenesis in vivo. Arterios. Thromb. and Vascular Biol., submitted.

(II) Gli inibitori delle proteasi dell'HIV nella terapia anti-angiogenetica

Individuazione dei meccanismi d'azione degli HIV-PI, nuovi strumenti per bloccare l'angiogenesi e l'invasione tumorale.

Nostri studi precedenti hanno dimostrato che gli inibitori della proteasi di HIV (HIV-PI) indinavir e saquinavir sono in grado di inibire lo sviluppo di lesioni angioproliferative e di edema indotti in topi atimici mediante l'inoculazione di cellule di sarcoma di Kaposi (KS) o di bFGF, e l'angiogenesi indotta da basic fibroblast growth factor (bFGF) e/o vascular endothelial growth factor (VEGF) nella membrana corioallantoidea di pollo (Sgadari et al., Nat Med 2002, e dati non pubblicati). Tali effetti sono dovuti al blocco dell'invasione, ma non della proliferazione, di cellule endoteliali e di cellule KS ed all'inibizione dell'attivazione proteolitica della metalloproteasi della matrice di tipo 2 (MMP-2), un enzima che svolge un ruolo chiave nell'angiogenesi, nell'invasione tumorale e nella metastatizzazione (Sgadari et al, Nat Med, 2002; Sgadari et al., Lancet Oncol 2003; Monini et al., Nat Rev Cancer, 2004). Questo enzima viene attivato in seguito a due tagli proteolitici che convertono la forma latente di MMP-2 (pro-MMP-2) in una forma pre-attivata (pre-MMP-2) e, successivamente, nella forma attiva (MMP-2 attiva). Ciò ha suggerito che gli HIV-PI abbiano come target pathways che regolano la motilità cellulare e la produzione e/o l'attivazione di enzimi deputati alla degradazione e al rimodellamento della matrice extracellulare. Per chiarire quale degli step dell'attivazione di MMP-2 sia inibito da saquinavir ed indinavir, cellule endoteliali del cordone ombelicale (HUVEC) sono state mantenute per 8-15 ore in presenza di un terreno privo di fattori angiogenici e a basso tenore di siero, e successivamente esposte, in presenza od assenza di saquinavir od indinavir (10 μ M), ad agenti in grado di attivare MMP-2. A questo scopo, le cellule sono state incubate per 10 ore in un terreno privo di fattori di crescita e di siero per indurre l'attivazione di MMPs in risposta ad apoptosi, per 8-16 ore in presenza di bFGF (10-100 ng/ml), o per 8-16 ore in presenza di TPA (50 nM), un agente in grado di indurre l'attivazione di MMP-2 mediante l'induzione e l'attivazione di MT1-MMP, una metalloproteasi di membrana che media l'attivazione proteolitica di MMP-2. Dopo avere raccolto i supernanti cellulari, le cellule sono state lisate mediante shock ipertonico e ipotonico allo scopo di allontanare i depositi intercellulari di MMP-2 latente (zimogeno), e la percentuale di pro-MMP-2, pre-MMP-2 e MMP-2 attiva rilasciata nei supernatanti o associate alla membrana e alla matrice extracellulare sono state determinate mediante zimografia (Toschi et al., Mol Biol Cell 2001). Questi esperimenti hanno mostrato che indinavir e saquinavir agiscono inibendo la conversione autoproteolitica di pre-MMP-2 nella forma completamente attiva. Questo step, mediato da MT1-MMP, è noto richiedere il legame di pre-MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$, ed è catalizzato da molecole di MMP-2 (in forma attiva) presenti sulla membrana cellulare in prossimità dell'integrina. Perciò, questi risultati hanno indicato che gli HIV-PI agiscono, assai probabilmente, interferendo con il taglio autoproteolitico di MMP-2, con il legame di MMP-2 all'integrina $\alpha_v\beta_3$, e/o intervenendo sull'espressione o sull'attività dell'integrina stessa.

L'attivazione autoproteolitica di MMP-2 è dipendente suo dal legame all'integrina $\alpha_v\beta_3$, in quanto il processo di attivazione richiede la giustapposizione di molecole di MMP-2 attiva a pre-MMP-2. Ciò si realizza mediante l'aggregazione sulla membrana cellulare di un complesso di molecole comprendenti MT1-MMP, pro-MMP-2, pre-MMP-2 e integrina

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

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

nei lamellipodi e negli invadopodi. Questi processi mediano non solo la migrazione cellulare ma anche l'attivazione autoproteolitica di MMP-2.

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

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

L'angiogenesi, l'invasione delle cellule tumorali e l'attivazione di MMP-2 sono richieste per la crescita di tutti i tumori. I nostri dati indicano, perciò, che gli HIV-PI potrebbero essere usati per la terapia non solo del KS ma di tumori con elevata incidenza e prevalenza nella popolazione umana.

Abbiamo perciò valutato l'azione degli HIV-PI sulla crescita di tumori indotti in topi nudi inoculando linee cellulari umane derivate da carcinoma del polmone, della mammella, del colon e del fegato. La somministrazione mediante gavage intragastrico di indinavir o saquinavir, a dosi paragonabili a quelle utilizzate in pazienti infettati da HIV (Deeks et al JAMA 1997; Sgadari et al Nat Med. 2002), ha inibito significativamente la crescita di questi tumori ($p < 0.01$). Sulla base di questi risultati abbiamo analizzato la capacità di indinavir e saquinavir di bloccare l'angiogenesi tumorale (Sgadari et al., Nature Medicine 2002). Sia indinavir che saquinavir hanno indotto una significativa riduzione della microvascolatura tumorale.

Inoltre, entrambi i farmaci, a dosi simili alle concentrazioni di valle rilevate nei pazienti trattati, hanno bloccato l'invasione di tutte le linee neoplastiche. Tuttavia mentre l'indinavir non ha mostrato effetti sulla crescita basale delle linee testate, il saquinavir ad alte dosi ha promosso un blocco della crescita e della sopravvivenza cellulare di tutte le linee tumorali.

Questi dati sono in accordo con studi recenti indicanti che, a dosi elevate, il ritonavir ed il saquinavir inibiscono l'attività del proteasoma (Andrè et al Proc Natl Acad Sci 1998; Tovo AIDS 2000; Piccinini et al AIDS 2001; Pati et al., Blood 2002, Gaedicke et al. Cancer Res 2002).

Nei prossimi mesi, gli studi saranno volti a determinare gli effetti di indinavir e saquinavir sui livelli di apoptosi e proliferazione cellulare nei tumori xenogenici indotti in topi nudi. Valuteremo, inoltre, l'impatto della biodisponibilità e, mediante PET, della distribuzione tissutale di questi farmaci nell'inibizione della crescita tumorale.

Pubblicazioni

- Monini P., Sgadari C., Toschi E., Barillari G., and Ensoli B. Antitumor effects of antiretroviral activity. Nat. Rev. Cancer, 4:861-875, 2004.
- Sgadari C., Toschi E., Carlei D., Malavasi L., Bacigalupo I., et al. Proteasome-independent block of angiogenesis and tumor cell invasion by HIV protease inhibitors. (submitted)

(III) Modelli sperimentali di terapia anti-angiogenetica

La nostra unità, nel periodo di tempo che è intercorso dal precedente rendiconto, ha portato avanti i modelli di topo con ricombinazione omologa inducibile che erano stati descritti nelle versioni precedenti.

1) *topi PDK knockout*. Come descritto in precedenza, PDK controlla l'attivazione di Akt. Brevemente, ricordiamo che Akt è una proteina che media gli effetti del VEGF nell'angiogenesi e la maturazione delle cellule CD34+ verso la linea endoteliale. Poiché esistono 3 forme di Akt, abbiamo deciso di utilizzare PDK per inibire il signaling di Akt. Pertanto abbiamo creato un topo eterozigote per PDK, in cui un allele è completamente eliminato mentre l'altro ha un esone che può essere floxato. Abbiamo poi incrociato questo topo con un topo che esprime una forma di CRE attivabile con la tetraciclina a livello cardiomiocitico. Abbiamo determinato l'evento ricombinazione omologa con analisi

genomica e proteica (per PRC e per western blot, rispettivamente). E' stato dimostrato che il sistema funziona perfettamente in quanto, somministrando ai topi tetraciclina, s'induceva la scomparsa della proteina a seguito di riarrangiamento genico.

Pertanto, questi topi sono disponibili per studi atti a determinare il ruolo del pathway di Akt ("downstream" a VEGF receptor) nell'ematopoiesi ed in oncologia. Il mio gruppo li renderà disponibili per questi settori mentre studierà il ruolo di PDK/Akt nel cuore.

2) *topi Akt2 knockout*. Akt 2 gioca un ruolo critico nell'ematopoiesi, dove alcuni studi indicano essere il gene più importante tra i 3 Akt. L'approccio per generare questi topi è stato già descritto in precedenza, mentre qui preme sottolineare lo stato di avanzamento dei lavori. Siamo riusciti ad ottenere eterozigoti con il gene floxato, il che significa che la chimera ha generato eterozigoti. Questi animali debbono essere incrociati con topi che esprimono FLP in modo da togliere la cassetta NEO, che può interferire con l'espressione genica.

3) *topi CAMK 2delta*: questo gene sembra giocare un ruolo critico nello sviluppo delle cellule T. Possiamo annunciare di aver generato un topo che manca del segnale di localizzazione nucleare dell'enzima CAMKd. Pertanto, gli effetti nucleari di questo gene possono essere studiati. Contemporaneamente, stiamo generando topi in cui la funzione di CAMK manca del tutto. Abbiamo generato cellule ES con ricombinazione omologa ma non siamo riusciti ad ottenere chimere perchè la facility in questo periodo ha avuto problemi. Pertanto, si ripeterà l'iniezione delle cellule per ottenere le chimere.

4) *Topi FLT-1*. Abbiamo ottenuto le cellule con ricombinazione omologa, ma, per lo stesso motivo di cui sopra, abbiamo dovuto aspettare per la generazione di chimere.

5) *Topi FLT-4*. Purtroppo il costruito non ha funzionato nel generare ricombinazione omologa nelle ES. Pertanto, lo stiamo rifacendo dall'inizio.

6) *Topi FLK-1*. Abbiamo fatto il costruito e dobbiamo generare le ES con ricombinazione omologa.

Abbiamo in programma anche la generazione di topi Tie-2 per cui si è iniziato il costruito.

Budget**I° anno**

Finanziamento totale	€ 250.000
-----------------------------	------------------

Questo budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget è stato suddiviso tra le diverse U.O. partecipanti, indicate a pag. 28.

II° anno

Finanziamento totale	€ 225.000
-----------------------------	------------------

Questo budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget verrà suddiviso tra le diverse U.O. indicate a pag. 28, coerentemente al primo anno di attività.

III° anno. Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.

**(IVB) INFIAMMAZIONE E PROGRESSIONE TUMORALE.
EFFETTO DI INIBITORI DI NF-KB E DI “SCAVENGERS” DI RADICALI LIBERI IN
MODELLI MURINI DI CANCRO DEL COLON, DELLA MAMMELLA E DELLA
PROSTATA**

Responsabili Scientifici: M.A. Russo, Università La Sapienza

C. Spadafora, Istituto Superiore di Sanità

P. Sinibaldi Vallebona, Università Tor Vergata

(I) Ruolo dei mediatori dell'infiammazione nella progressione neoplasticaObiettivi di questo progetto

1.-Dimostrare che in tumori umani e in modelli murini di Ca della mammella, di ca della prostata e ca del colon, i principali componenti della risposta infiammatoria sono attivi nelle cellule tumorali dei tumori in progressione.

2.-Che in questi stessi animali inibitori di NF-kB e scavengers di radicali liberi sono in gradi di bloccare o rallentare la progressione di questi stessi tumori.

Lavoro svolto nel periodo fino ad aprile 2005.Primo obiettivo

In tumori umani, ottenuti dopo intervento chirurgico in pazienti selezionati e opportunamente caratterizzati, è stato dimostrato mediante immunocistochemica che alcune proteine, funzionalmente importanti nella risposta infiammatoria, sono abbondantemente presenti nelle cellule tumorali. In particolare, in tumori della prostata in tessuti normali e di Iperplasia Prostatica Benigna (BPH) e nel tessuto mammario normale (ottenuto da interventi di mastoplastica) e in oltre 60 ca mammari a varia malignità, sono stati studiati alcuni recettori-sensori di danno capaci di attivare NF-kB, enzimi inducibili, classici produttori di mediatori e di effettori, NOS e COX inducibili (iNOS e COX-2), e una tipica proteina di fase acuta, legata alle cellule, la pentraxina-3. L'immunostaining per tutte queste proteine appariva fortemente aumentato nei carcinomi, mentre nelle lesioni benigne e nei tessuti normali era scarso o assente. Questo è stato confermato dall'analisi effettuata mediante western blotting eseguito su frazioni omogenee di tessuto ottenute da laser-capture microdissection. E' stato anche possibile evidenziare che le bande specifiche apparivano diminuite o assenti anche nel tessuto normale ospite del tumore, adiacente o lontano dal tumore. Infine, dalle stesse frazioni microdissezzate, è stato estratto mRNA e, mediante real-time PCR, è stato possibile dimostrare che i geni delle suddette proteine sono molto attivi nei tumori maligno progrediti, mentre la loro trascrizione appare bassa o assente nelle lesioni benigne e nel tessuto normale. Questo ha suggerito che la risposta infiammatoria potrebbe essere attivata nelle cellule trasformate, come accade nei leucociti attivati, e contribuire con i suoi vari geni alla progressione verso il tumore maligno.

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

Pubblicazioni

• DiVito M., Sale P., Realacci M., Gradini R., Russo A., et al. Prostate cancer and Inflammation as studied by laser-capture microdissection, molecular biology and immunohistochemistry. Submitted

• Russo A., Sale P., DeVito M., Gentileschi S., Gradini R., et al. Pro-inflammatory genes in human normal mammary tissues, benign proliferative lesions and carcinoma. An immunohistochemistry and molecular biology study. Submitted

Secondo obiettivo

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

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

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

determinate è stata la presenza precoce di tumori alle vescicole seminali che rendevano sterili i maschi.

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

Risultati nel modello di ca mammario del topo transgenico MMT.

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

Animali transgenici di controllo non trattati.

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

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

Animali transgenici trattati con anti-RT

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

Animali transgenici trattati con inibitore di NFkB

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

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

Descrizione macroscopica

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

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

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

Istopatologica e analisi molecolare.

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

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

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

(II) Gli inibitori della trascrittasi inversa e dell'infiammazione nella terapia del carcinoma mammario e prostatico

Il primo obiettivo della nostra UO è stato quello di predisporre e di espandere le colonie dei due ceppi di topi transgenici ottenuti dal National Cancer Institute (NCI). Questi topi sono naturalmente predisposti al cancro mammario (FVB/N.TG(MMTV-

PyVT)34M(T/X) e prostatico B6-TG(TRAMP)8247 Ng(T/X) e sono correntemente utilizzati in questo progetto di ricerca come modelli sperimentali sia dalla nostra UO che da quella di Matteo Russo.

Gli animali positivi sono identificati due/tre settimane dopo la nascita utilizzando campioni di DNA estratto da un frammento di coda da ognuno dei nuovi nati che sono analizzati per PCR diretta usando una coppia di oligonucleotidi specifici.

In breve:

- I topi femmine del ceppo (FVB/N.TG(MMTV-PyVT)34M(T/X)) sviluppano un tumore mammario rilevabile ad esame istologico a partire dalla 8^a settimana di vita e palpabile tra la 12^a-13^a settimana. Lo sviluppo del tumore causa la morte degli animali intorno alla 16^a settimana.

- Abbiamo fino ad ora selezionato 15 animali positivi di questo ceppo che sono stati suddivisi in tre gruppi: a) 8 di diversa età sono stati utilizzati per gli studi di immunoistochimica utilizzando un anticorpo anti Trascrittasi Inversa (RT) allo scopo di stabilire l'espressione di RT in rapporto alla comparsa della lesione tumorale, b) 3 sottoposti a trattamento col farmaco anti infiammatorio CR3294.HCL e c) 4 sottoposti al trattamento con l'inibitore di RT Efavirenz. Entrambi i gruppi di animali sono trattati farmacologicamente a partire dal primo mese di vita. Dagli ultimi due gruppi, animali sono stati soppressi alla 12sima settimana ed alla 16sima settimana ed i tumori espianati sono stati utilizzati per esami istologici ed istochimici usando anticorpi specifici allo scopo di verificare eventuali effetti esercitati dai farmaci sulla crescita tumorale. Dati preliminari suggeriscono che: a) negli animali non trattati, l'RT è fortemente espressa nella lesione tumorale conclamata della ghiandola mammaria mentre è assente nello stesso tessuto normale; b) alla 12 settimana, i trattamenti con inibitori di RT e con l'anti infiammatorio rallentano marcatamente la progressione tumorale rispetto al controllo. Inoltre, i topi trattati non presentano invasioni metastatiche in organi vicini e non hanno linfonodi coinvolti come invece avviene nei controlli non trattati; c) l'analisi dei reperti biotipici alla 16 settimana sono ancora parziali e tutt'ora in corso. Tuttavia all'esame macroscopico appare come se la crescita tumorale abbia ripreso vigore nonostante i trattamenti. Sulla base di questi primi dati, emerge l'efficacia dei due trattamenti nel contrastare la crescita tumorale; questo effetto è tuttavia più rilevante nelle fasi iniziali ed intermedie della progressione tumorale, mentre è ridotta nella fase più avanzata.

- I topi del ceppo B6-TG(TRAMP)8247 Ng(T/X) sono poco fertili. Sono nati in tutto 15 animali che devono ancora essere selezionati per identificare i positivi. Lo sviluppo del tumore prostatico è inoltre molto più lento (circa 6 mesi) in paragone all'altro ceppo. Sarà necessario pertanto aumentare le nidiate per raggiungere il numero di animali maschi positivi richiesti per lo svolgimento del programma.

Attività da svolgere nel II° anno del Programma

- Variazione dei dosaggi dei farmaci: i protocolli correntemente adoperati prevedono l'uso di dosi fisse dei due farmaci selezionate arbitrariamente prima dell'inizio della sperimentazione. Sulla base dei dati iniziali, ci proponiamo di aumentare le dosi soprattutto con lo scopo di controllare la crescita tumorale nelle fasi avanzate/terminali.

- Analisi biochimiche-molecolari sui tumori espianati da topi trattati: allo scopo di caratterizzare a livello molecolare gli effetti dei farmaci sui tumori, ci proponiamo di esaminare l'espressione genica dei tumori trattati rispetto ai controlli. In particolare ci focalizzeremo sulla comparsa di eventuali marcatori del differenziamento e sull'espressione di geni coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare. Questo studio verrà effettuato sia su espianati della 12 settimana, quando la crescita tumorale è sotto il controllo farmacologico, sia su campioni della 16 quando questo controllo è attenuato.

- Cinetica dell'espressione di RT in rapporto alla genesi tumorale: ci proponiamo inoltre di stabilire l'eventuale relazione temporale tra comparsa di RT (come proteina) e l'insorgere della lesione tumorale. Questo studio verrà effettuato utilizzando espianati da

animali in cui la lesione sia a stadi molto precoci o addirittura ancora assenti. A tale scopo, utilizzeremo tecniche di RT-PCR, di immunoistochimica e di Western blotting.

(III) Nuovi farmaci antinfiammatori nella terapia del carcinoma sperimentale del colon

Primo obiettivo del progetto era quello di dimostrare il coinvolgimento della risposta flogistica nella progressione del cancro del colon chimicamente indotto da 1,2-dimetilidrazina in ratti ceppo BDIX.

Gli animali, trattati con 1,2-dimetilidrazina, somministrata s.c alla dose di 18mg/Kg secondo uno schema che prevede un trattamento a settimana per 5 settimane consecutive, sviluppavano adenocarcinoma del colon nel 100% degli animali. Nell'esperimento sono stati inclusi 20 ratti trattati con il cancerogeno ed altrettanti animali non trattati come controlli.

A partire dal 14° giorno dall'ultima somministrazione del cancerogeno e ad intervalli regolari di 14 giorni, 2 animali per ciascun gruppo 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 valutare 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, iniziata come focolaio tumorale nella sottomucosa (Figura 1A) raggiungeva una maggiore infiltrazione del tessuti mucoso con zone di iperplasia associate al tumore (Figura 1C) o a formazioni polipoidi (Figura 1B) a seconda della zona osservata.

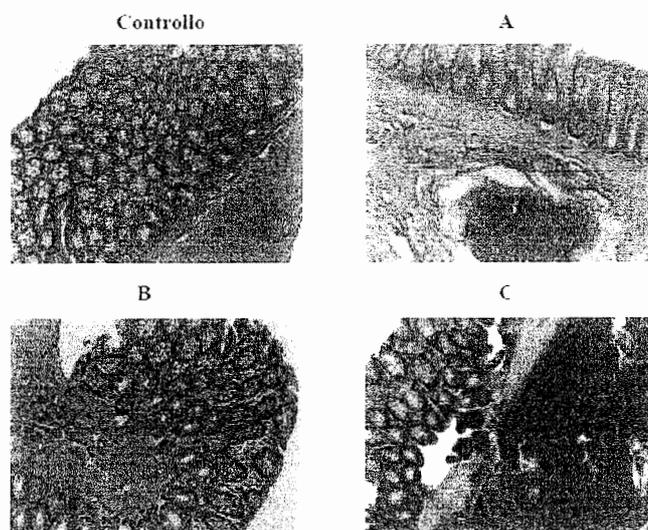


Figura 1

La colorazione immunoistochimica, eseguita utilizzando un anticorpo policlonale contro un epitopo nonapeptidico, che in nostri precedenti studi avevamo dimostrato specifico per adenocarcinoma sia nell'uomo che nel ratto, ha evidenziato una netta positività delle cellule tumorali (Figura 2A) con presenza di lesioni focali (Figura 2B) nei vari stadi di differenziamento.

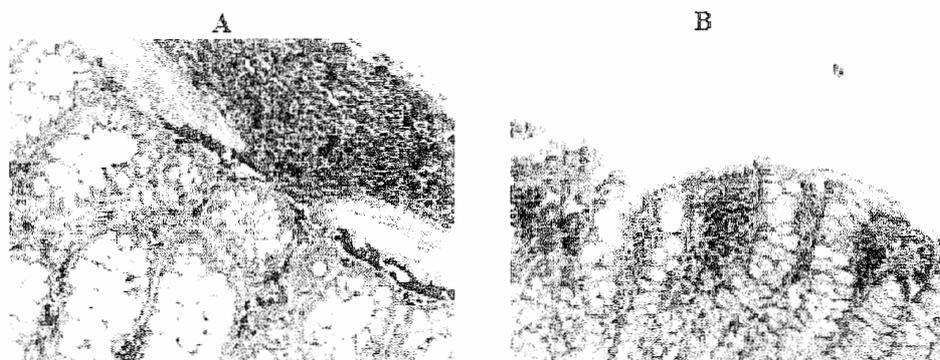


Figura 2

Sulle sezioni istologiche è stata inoltre messa a punto una tecnica di marcatura per E-caderina e β -catenina, entrambi markers di differenziamento delle cellule tumorali e di quelle di colon in particolare, che ha evidenziato una perdita di espressione dell'E-caderina ed un aumento dell'espressione della β -catenina in correlazione con la progressione del tumore.

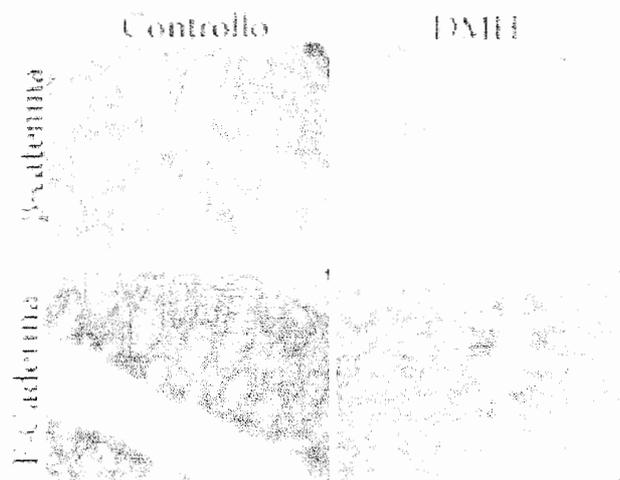


Figura 3

L'identificazione di marcatori del differenziamento tumorale verrà utilizzata successivamente per valutare l'efficacia di farmaci ad attività antinfiammatoria nella prevenzione dello sviluppo del tumore.

I campioni di tessuto di colon corrispondenti, che erano stati conservati congelati, sono stati in parte utilizzati per estrarre dalle lesioni tumorali acidi nucleici purificati, mediante uno sistema automatico che si fonda sulla tecnica di microdissezione laser con impiego di un BioRobot.

Secondo obiettivo dello studio era quello di 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.

Sulla base delle prove preliminari condotte è stato stabilito di scegliere la via orale quale via di somministrazione delle molecole Cyanidin-3-O- β -glucopyranoside (C-3-G) e CR3294, in quanto la somministrazione per gavage, che era stata ipotizzata, si è rivelata di difficile esecuzione in questo tipo di animale.

Budget**I° anno**

Finanziamento totale	€ 170.000
-----------------------------	------------------

Questo budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget è stato suddiviso tra le diverse U.O. partecipanti indicate a pag. 36.

II° anno

Finanziamento totale	€ 150.000
-----------------------------	------------------

Questo budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget verrà suddiviso tra le diverse U.O. indicate a pag. 36, coerentemente al primo anno di attività.

III° anno. Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.

(V) REGOLAZIONE DEL TURNOVER DI BCL-2 RNA MEDIANTE RNA ANTISENSO

Responsabile Scientifico: A. Nicolin, Università di Milano

1.1) Espressione di RNA antisense 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 antisense. Dopo estesa analisi del database delle EST sono state identificate, nell'ambito del gene bcl-2, alcune sequenze che rappresentano potenziali trascritti in orientamento antisense. 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, sviluppato in parallelo, si basa sull'uso di un primer contenente in 5' una sequenza Tag (20-mer) durante la sintesi del cDNA (tagged RT-PCR). Sono stati finora 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 antisense nel tumore 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. Tuttavia la determinazione in parallelo dell'RNA in orientamento senso e dell'RNA ectopico in orientamento antisense non ha portato a risultati soddisfacenti. Il risultato atteso prevedeva l'amplificazione della sequenza antisense solamente nelle linee linfomatose caratterizzate dalla traslocazione t(14;18) e nessuna amplificazione di bcl2 RNA in orientamento antisense nelle linee negative per la traslocazione. Anche con la tecnologia TaqMan la specificità di retro-trascrizione non è sufficiente per discriminare in modo netto tra due sequenze di RNA complementari.

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. L'interazione funzionale proteina-RNA è stata analizzata a livello molecolare. Studi approfonditi mediante two-hybrid system hanno dimostrato la probabile non diretta relazione tra le due molecole. Recentissimi lavori indicherebbero la mediazione di miRNA nel veicolare la proteina su specifici motivi del 3' UTR.

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 stanno concludendo la messa a punto di 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. Sono anche in corso studi per valutare le migliori condizioni di veicolazione degli siRNA. Anche in accordo con altri laboratori l'attività di silencing ottimale si riscontra mediante doppia somministrazione a 48 h di distanza.

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

3.1) Oligoribonucleotidi antisense

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. Sono stati caratterizzati alcuni parametri, come la curva dose-risposta, la specificità su sequenze ARE in mediante studi in sistemi cell-free. L'analisi del messaggero ha rivelato l'inibizione del processo di degradazione e la somministrazione degli oligoribonucleotidi ha dimostrato un aumento significativo dell'espressione di RNA per bcl2. La determinazione dei livelli proteici ha confermato l'aumento cellulare della proteina Bcl2 rispettando un effetto dose-risposta. Si è ottenuta definitiva documentazione che l'aumento è specifico per la proteina Bcl2.

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 agendo con probabile meccanismo decoy.

3.3) Terapie combinate

Gli studi di attività antitumorale in combinazione con farmaci citotossici è iniziata. L'obiettivo è di agire sulla cascata PI3K/AKT/mTOR che gioca un ruolo importante nel regolare la fosforilazione di Bcl2 e che potrebbe trovare sinergia con i farmaci ad azione sui microtubuli. In una seconda fase l'azione di oligoribonucleotidi o di siRNA attivi in modo opposto su bcl2 verranno saggiati.

Pubblicazioni

Donnini M, Lapucci A, Papucci L, Witort E, Jacquier A, et al. Identification of Tino: A new evolutionarily conserved bcl-2 AU-rich element RNA binding protein. J. Biol. Chem. 279: 20154-66, 2004.

Schiavone N, Donnini M, Nicolin A, Capaccioli S. Antisense oligonucleotide drug design. Curr Pharm Des. 10:769-84, 2004.

Ghisolfi L, Papucci L, Bevilacqua A, Canti G, Tataranni G, et al. Increased Bcl2 expression by antisense oligoribonucleotides targeting the ARE motif. Submitted

Budget

I° anno

Finanziamento totale	€ 80.000
----------------------	----------

Il budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

II° anno

Finanziamento totale	€ 75.000
----------------------	----------

Il budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni (incluse le missioni da e per gli USA) ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

III° anno. Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.

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

Responsabili Scientifici: B. Ensoli, Istituto Superiore di Sanità
P. Sinibaldi Vallebona, Università Tor Vergata, Roma
C. Spadafora, Istituto Superiore di Sanità

Background

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

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

I nostri studi hanno inoltre indicato che un altro bersaglio potenzialmente efficace per la terapia dei tumori sono le RT cellulari, espressa negli embrioni di topo, in cellule progenitrici e in linee cellulari trasformate (Pittoggi et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 2003; Mangiacasale et al., *Oncogene*, 2003). L'inibizione della RT mediante trattamento con NNRTI, determina una riduzione della crescita di linee indifferenziate e tumorali in vitro ed in vivo, ne promuove il differenziamento cellulare ed induce una riprogrammazione dell'espressione genica, suggerendo che questo enzima abbia un ruolo chiave in processi cellulari fondamentali quali la proliferazione ed il differenziamento cellulare (Mangiacasale et al., *Oncogene*, 2003).

Questi risultati indicano che gli HIV-PI e gli NNRTI rappresentano potenti molecole dotate di attività antiangiogenica e antitumorale e che agiscono su fasi diverse del processo di crescita tumorale. Pertanto è importante analizzare la possibilità di un loro uso da soli od in combinazione per la terapia dei tumori che insorgono sia in individui HIV⁺ che sieronegativi.

Il presente progetto, che viene svolto in collaborazione con altre 2 Unità operative coordinate dalla prof.ssa Paola Sinibaldi Vallebona, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Roma "Tor Vergata", e dal dr. Corrado Spadafora, Servizio Biologico per la Gestione della Sperimentazione Animale, ISS, è articolato nei seguenti obiettivi: 1) gli effetti antitumorali e/o antimetastatici in vivo degli HIV-PI ed NNRTI, usati da soli od in associazione, in modelli di tumori sperimentali indotti nel topo dall'inoculazione di linee tumorali umane e murine; 2) gli effetti antitumorali e/o antimetastatici in vivo degli HIV-PI ed NNRTI, usati da soli od in associazione, in un modello di tumore sperimentale indotto nel ratto da una linea di carcinoma del colon singenico; 3) gli effetti degli HIV-PI e/o NNRTI, da soli od in associazione, sulla proliferazione, invasione, differenziamento ed espressione genica in vitro delle linee tumorali utilizzate negli studi in vivo.

(I) Valutazione degli effetti antiangiogenici ed antitumorali di indinavir ed efavirenz in modelli sperimentali basati su linee tumorali umane

a) Modelli di tumori sperimentali indotti nel topo dall'inoculazione di linee tumorali umane.

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

È stata, quindi, valutata l'efficacia di indinavir o efavirenz in topi immunocompetenti C57BL inoculati con cellule di melanoma murino singenico B16, clone F10 (6 animali/gruppo). Gli animali hanno iniziato il trattamento giornaliero con indinavir o efavirenz per os alle dosi sopra indicate e dopo 2 giorni sono stati inoculati sottocute con 1×10^6 cellule B16-F10. In queste condizioni sperimentali è stata osservata la comparsa di tumori sottocutanei al sito di inoculo dopo circa 5 giorni. Il trattamento è stato proseguito per 12 giorni dopo l'inoculo delle cellule tumorali, fino a che i tumori degli animali di controllo non hanno raggiunto dimensioni tali da interferire con le attività vitali degli animali (2-3 cm²), che sono stati quindi sacrificati. Sia il trattamento con indinavir che con efavirenz ha inibito fortemente la crescita tumorale in assenza di significativa tossicità sistemica. Per valutare gli effetti del sistema immune sull'attività antitumorale di indinavir ed efavirenz, l'esperimento è stato eseguito anche in topi immunocompromessi. A tale scopo topi SCID sono stati trattati con indinavir o efavirenz per os alle dosi indicate sopra; dopo 2 giorni gli animali sono stati inoculati sottocute con cellule B16-F10. Il tempo di comparsa e la cinetica di crescita dei tumori è stata molto simile. Al sacrificio, i tumori degli animali trattati con inibitori sono risultati di dimensioni molto ridotte rispetto a quelli di controllo.

Avendo con questi esperimenti preliminari verificato che questa linea tumorale è sensibile sia al trattamento con indinavir che con efavirenz sia nel modello singenico immunocompetente che in animali immunocompromessi, stiamo attualmente valutando l'effetto dei 2 farmaci somministrati in combinazione.

Abbiamo, inoltre, valutato l'attività dei 2 farmaci, utilizzati da soli o in combinazione, nell'inibire la crescita di un tumore caratterizzato da un'alta incidenza nella popolazione umana, quale il carcinoma della mammella. A tale scopo gli animali sono stati trattati con indinavir e/o efavirenz, e 2 giorni dopo sono stati inoculati sottocute, previo irraggiamento subletale, con una linea di carcinoma umano della mammella (cellule MDA-MB-231, 1×10^6 cellule/topo). Il trattamento è stato proseguito per 53 un totale di giorni. Sebbene il trattamento con i 2 farmaci somministrati separatamente ha inibito modestamente la crescita di questo modello tumorale allogenico, la somministrazione combinata di indinavir ed efavirenz ha avuto un effetto anti-tumorale additivo. È in corso la valutazione dell'effetto del trattamento con indinavir e/o efavirenz in un modello di tumore sperimentale del colon (linea SW-480), un altro tumore ad alta incidenza dell'uomo.

L'analisi istologica ed immunohistochimica dei modelli tumorali studiati è attualmente in corso. In particolare stiamo valutando l'entità dell'angiogenesi, della proliferazione e dell'apoptosi tumorale in campioni ottenuti da topi trattati con indinavir e/o efavirenz rispetto ai controlli trattati con salina, mediante analisi immunohistochimica di marker endoteliali (CD31), di proliferazione cellulare (Ki67) e TUNEL test.

b) Valutazione degli effetti sulla proliferazione, invasione, differenziamento ed espressione genica in vitro delle linee tumorali utilizzate negli studi in vivo.

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

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

Pubblicazioni

- Monini P., Sgadari C., Toschi E., Barillari G., and Ensoli B. Antitumor effects of antiretroviral activity. Nat. Rev. Cancer, 4:861-875, 2004.
- Sgadari C., Toschi E., Carlei D., Malavasi L., Bacigalupo I., et al Proteasome-independent block of angiogenesis and tumor cell invasion by HIV protease inhibitors. Submitted.

(II) Valutazione degli effetti antiangiogenici ed antitumorali di indinavir ed efavirenz in modelli sperimentali tumorali di roditori

Primo obiettivo dello studio era quello di valutare gli 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).

In una prima serie di esperimenti abbiamo testato *in vitro* l'effetto di Efavirenz (da 5 a 15 μM) e Indinavir (da 0.1 a 10 μM), sulla crescita di cellule di carcinoma polmonare di Lewis, (LLC) somministrando il farmaco in una dose unica o ripetuta per 3 giorni consecutivi.

Le cellule, seminate alla concentrazione di 50.000/ml in piastre da 6 wells (2ml/well) sono state trattate con i farmaci, contenuti in un volume di 20 μl /well. I controlli sono stati addizionati di pari volume di terreno di coltura (CC) oppure di pari volume di diluente del

farmaco (C-DMSO). Le conte sono state eseguite al microscopio a 24, 48 e 72 ore dall'inizio del trattamento, previa colorazione con trypan blue.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che:

1) Efavirenz (trattamento singolo) inibisce significativamente la crescita cellulare in maniera dose-dipendente. L'effetto di inibizione non è associato a fenomeni di morte o ridotta vitalità cellulare e permane sino a tre giorni dopo la sospensione del trattamento

2) Efavirenz (1 trattamento/die per 3 giorni consecutivi) inibisce marcatamente la crescita cellulare in maniera dose-dipendente. L'effetto di inibizione è maggiore di quello osservato nel trattamento singolo, ma ugualmente non è associato a fenomeni di morte o ridotta vitalità cellulare. Il grado di inibizione della crescita cellulare oscilla dal 50 al 70% rispetto a CC e C-DMSO.

A seguito del trattamento con efavirenz non si osservano modificazioni apprezzabili della morfologia cellulare, evidenziabili al microscopio ottico, se non un lieve aumento delle dimensioni di una sottopopolazione cellulare; si evidenzia, tuttavia, una chiara tendenza delle cellule a formare un minor numero di clumps, rispetto alla loro normale attitudine.

3) Indinavir (trattamento singolo) induce un lieve effetto di inibizione della crescita cellulare a 24 ore di trattamento soltanto alla massima dose testata. Tale effetto viene perso nei giorni successivi, in cui si assiste ad una normale ripresa della crescita cellulare.

4) Indinavir (1 trattamento/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 incremento del numero delle cellule anche se non statisticamente significativo.

A seguito di trattamento con Indinavir non si riporta nessuna modificazione della morfologia cellulare.

5) Efavirenz (15 μ M) ed Indinavir (10, 1 e 0,1 μ M) in trattamento combinato. Non si evidenzia alcun effetto di inibizione della crescita cellulare mentre risulta che la combinazione dell'indinavir con efavirenz riduce l'effetto inibitorio, evidenziabile nel trattamento con il solo efavirenz. 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 successivo sono stati effettuati i trattamenti con i farmaci contenuti in un volume di 20 μ l/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:

1) Efavirenz (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) inibisce marcatamente la crescita cellulare in modo dose e tempo-dipendente. 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 (ancora in fase di studio).

2) Indinavir (1 tratt./die per 3 giorni consecutivi) non induce alcun effetto di inibizione sulla 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.

3) Efavirenz (15 μ M) ed Indinavir (10, 1 e 0,1 μ M) in trattamento combinato. Nelle prime 48 ore di trattamento non risulta inibizione della crescita ma piuttosto un lieve incremento; solo all'osservazione a 72 ore è evidenziabile una seppur minima riduzione della crescita cellulare.

4) Indinavir (10 μ M) ed Efavirenz (15, 10 e 1 μ M) in trattamento combinato. Come negli esperimenti di combinazione precedenti l'effetto di lieve inibizione è evidenziabile solo a 72 ore di trattamento.

E' stato successivamente condotto uno studio per verificare se un inibitore della RT (Efavirenz) ed un inibitore della proteasi di HIV (indinavir), usati da soli o in combinazione, potessero esercitare una azione antitumorale significativa, se somministrati a topi portatori di tumore.

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 monitorati, mediante palpazione nella zona di inoculo, per verificare la crescita del tumore. Sono stati quindi selezionati 27 animali con tumore di dimensioni simili (2-3 mm) che sono stati divisi in 4 gruppi sperimentali di 7 animali ciascuno ad eccezione del gruppo di controllo che conteneva solo 6 animali : 1) Gruppo di controllo; 2) Trattati con Efavirenz; 3) Trattati con Indinavir; 4) Trattati con Efavirenz ed Indinavir. I farmaci ed il diluente di controllo sono stati preparati secondo lo schema seguente e somministrati agli animali, mediante gavage intragastrico, quotidianamente a partire dal 7° giorno dall'inoculo.

Efavirenz (Bristol-Myers Squibb)

La dose somministrata per gavage intragastrico è stata di 0,2 mg/die/topo (10 mg/kg/die), in 0.2 ml di H₂O, preparata al momento dell'uso.

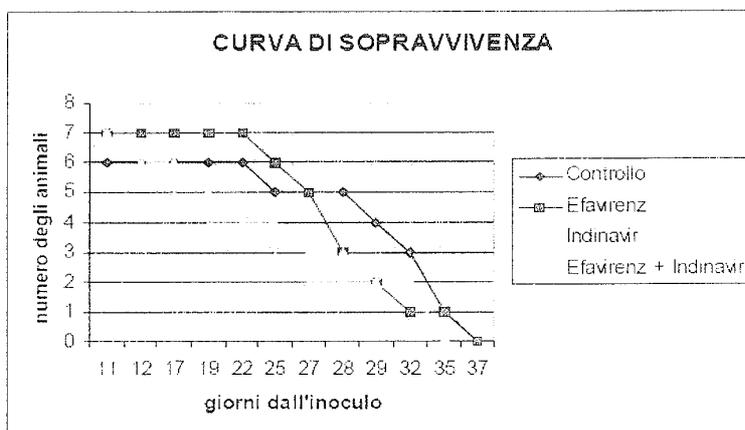
Indinavir (Crixivan-Merck)

La dose giornaliera somministrata per gavage intragastrico è stata di 1.36 mg/die/topo (70 mg/kg/die), in 0.4 ml di soluzione salina preparata una volta a settimana.

Gli animali sono stati monitorati relativamente alla dimensione del tumore, al peso e alla sopravvivenza

Sono qui di seguito riportati i dati relativi alle dimensioni dei tumori (diametro espresso in mm) di un esperimento rappresentativo.

	10gg	13gg	17gg	21gg	27gg
Controllo	3.33	7.50	11.41	15.00	22.00
Efavirenz	2.35	7.36	10.08	12.80	19.30
Indinavir	2.43	7.08	10.41	12.60	20.10
Efavirenz+Indinavir	2.57	7.00	9.90	12.20	23.00



Possiamo quindi concludere che il trattamento *in vitro* di cellule LLC (carcinoma polmonare di Lewis) e DHD/K12 (adenocarcinoma di colon di ratto) con l'inibitore dell' RT Efavirenz determina una marcata riduzione della crescita cellulare, che risulta essere dipendente dalla concentrazione del farmaco e dal tempo di trattamento. L'inibitore della proteasi di HIV Indinavir non esercita invece alcun effetto antiproliferativo, se non una minima inibizione sulla crescita della linea DHD/K12, ma solo alla concentrazione più elevata e a tempi di trattamento prolungati (72 ore).

La combinazione dei due farmaci non solo non evidenzia alcun effetto sinergico ma piuttosto riduce l'effetto inibitorio dell'Efavirenz. Anche la sperimentazione *in vivo* fornisce conferma dei dati su esposti.

(III) Valutazione degli effetti antitumorali degli inibitori della trascrittasi inversa nel melanoma, nel carcinoma prostatico e nel microcitoma

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), carcinoma prostatico (PC3) e microcitoma (H69). 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 (circa venti giorni); 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.

◦ Abbiamo recentemente iniziato esperimenti di RNAi (RNA interference) utilizzando un costrutto che esprime un oligonucleotide interferente contro il retroposone LINE-1. Questo studio è finalizzato a) identificare la famiglia di retroelementi che codifica l'RT coinvolto nel controllo della proliferazione e differenziamento delle cellule tumorali e b) chiarirne il ruolo ed il meccanismo molecolare. Abbiamo osservato che cellule A-375 dopo pochi giorni dalla trasfezione col costrutto interferente, smettono di proliferare e subiscono un cambiamento morfologico che suggerisce il differenziamento. Entrambe le nuove caratteristiche assunte dalle A-375 trasfettate sono identiche a quelle indotte nella stessa linea cellulare dagli inibitori farmacologici di RT. Questo risultato è fortemente indicativo che LINE-1 è il retroelemento codificante l'RT coinvolto nei processi biologici in esame.

◦ 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.

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. Questo studio si basa su precedenti risultati ottenuti indipendentemente dai due gruppi dai quali emergeva il potenziale antitumorale degli inibitori della RT su svariati

tumori umani (colon, prostata, microcitoma e melanoma) e quelli della proteasi essenzialmente sul Kaposi. La sperimentazione è in corso sia *in vitro*, su linee cellulari A-375 (melanoma), PC3 (prostata) e microcitoma (H69), che *in vivo* su modelli animali.

I risultati ottenuti fino ad ora suggeriscono che:

- In vitro, l'indinavir da solo ha una scarsa, o nulla, capacità antiproliferativa, testata a varie concentrazioni (0.1, 1 e 10 micromolare).

- In vitro, Indinavir (10 micromolare) in combinazione con efavirenz (15 micromolare) dimostrano una scarsa azione sinergica: la proliferazione delle A-375 è ridotta del 60% (solo efavirenz) e del 70% (indinavir+efavirenz) e la proliferazione delle PC3 dal 40% (solo efavirenz) al 50% (indinavir + efavirenz). In entrambi le linee cellulari, l'effetto osservato è riconducibile ad un aumento della morte cellulare indotta principalmente per apoptosi quando si usa la combinazione dei due farmaci. L'aumento dell'apoptosi cellulare è in effetti valutato intorno al 10% il che giustifica la corrispondente riduzione del numero di cellule. Nel complesso, questi dati suggeriscono che l'effetto sinergico si concretizza in un aumento della morte cellulare (10%), piuttosto che in un rallentamento della proliferazione.

- Nessun effetto sinergico sulla proliferazione e/o morte cellulare in vitro è stato al contrario 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. Anche il rate di morte cellulare rimane invariato nella combinazione di entrambi i farmaci.

- Studi finalizzati a valutare la motilità ed invasività delle linee tumorali esposte ai farmaci, singolarmente o in combinazione, è attualmente in corso ed i risultati non sono ancora disponibili.

- Gli studi in vivo sono attualmente in corso su modelli murini inoculati con tumori umani e trattati con efavirenz, indinavir e efavirenz + indinavir. Gli effetti dei farmaci sono stati inizialmente saggiati sulla progressione tumorale di cellule H69 (microcitoma umano) inoculate in topi nudi. I risultati di questa prima serie di esperimenti hanno: a) confermato l'efficacia dell'efavirenz nell'antagonizzare la progressione tumorale, come riportato sopra; b) dimostrato che l'indinavir da solo ha una scarsa o nulla efficacia nel contrastare la crescita tumorale nella fase iniziale. Tuttavia a stadi più avanzati, l'indinavir esercita un'azione di rallentamento della progressione tumorale che deve essere ulteriormente valutata e le cui modalità di azione devono essere approfondite; c) la combinazione efavirenz + indinavir non sembra esercitare un'azione sinergica, maggiore della somma degli effetti esercitati dai due composti individualmente. A vari stadi del trattamento farmacologico, tumori sono prelevati ed analizzati per determinarne le caratteristiche istologiche in paragone a quelli non trattati. Uno studio identico verrà esteso anche alle linee cellulari PC3 (carcinoma prostatico) e A-375 (melanoma).

Attività da svolgere nel II° anno del Progetto

- Riprogrammazione dell'espressione genica indotta dall'inibizione di RT: intendiamo chiarire i meccanismi attraverso i quali l'inibizione di RT endogena (sia farmacologica che per RNAi) induce una riprogrammazione reversibile dell'espressione genica cellulare. Ci proponiamo di paragonare i profili di espressione genica di cellule inibite e di controllo ottenuti per microarrays e quindi di esaminare i parametri di controllo epigenetici che vi potrebbero svolgere un ruolo.

- Inibizione dell'RT endogena per RNAi in modelli murini: l'efficacia dimostrata dall'RNAi contro il retroelemento LINE *in vitro* nel ridurre la proliferazione e nel promuovere il differenziamento, ci ha incoraggiato a testare questo sistema anche *in vivo* su modelli murini inoculati con tumori umani. Utilizzeremo a questo scopo un vettore retrovirale commercialmente disponibile, nel quale verrà impacchettato il costrutto interferente. Topi nudi inoculati con tumori umani saranno "infettati" con questi retrovirus e gli effetti sulla progressione tumorale saranno rilevati.

◦ Effetto inibitorio dell'indinavir a stadi avanzati della crescita tumorale: ci proponiamo di approfondire le modalità di azione dell'indinavir nel ritardare la crescita tumorale nella sua fase avanzata nel microcitoma e di estendere questo studio anche ad altri modelli di tumori. L'obiettivo di questo studio consiste nel valutare il possibile uso di questo farmaco in modo sequenziale all'efavirenz.

◦ Valutare l'effetto di questi farmaci sulla motilità delle cellule tumorali: in parallelo agli studi sopra riportati, ci proponiamo inoltre di valutare se gli inibitori di RT e di PI abbiano un effetto sulla motilità ed invasività delle cellule tumorali.

Budget**I° anno**

Finanziamento totale	€ 250.000
-----------------------------	------------------

Questo budget è stato utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget è stato suddiviso tra le diverse U.O. partecipanti indicate a pag. 48.

II° anno

Finanziamento totale	€ 225.000
-----------------------------	------------------

Questo budget verrà utilizzato per l'arruolamento di personale (ricercatori e tecnici), per l'acquisto di materiale di consumo, per le apparecchiature, per le missioni ed altre spese (convegni, assistenza ed analisi computeristica, ecc.).

Il budget verrà suddiviso tra le diverse U.O. indicate a pag. 48, coerentemente al primo anno di attività.

III° anno. Il budget del III° anno verrà eventualmente confermato, dopo valutazione ed approvazione del "Progress Report" sui risultati ottenuti nei due anni precedenti.