

## S.S. Embriogenesi e Tumorigenesi su Modelli Animali

### **Involgimento dei geni Dlx nello sviluppo di metastasi ossee**

*Linea di ricerca:* 1 - Oncologia Predittiva

*Programma:* c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica (proto-oncogeni, geni oncosoppressori, meccanismi di instabilità genomica, virus oncogeni)

*Responsabile:* Ottavia Barbieri

*Partecipanti:* Simonetta Artigiano

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* homeobox; metastasi; osso; tumori mammari; tumori prostatici; marcatori

*Altre strutture IST:* S.S. Genomica Funzionale

*Altri Enti coinvolti:* CNRS, Parigi (G. Levi); Telethon (G. Merlo); Dip. di Biologia, Università di Genova (P. Manduca)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Telethon; MIUR

#### *Background*

La maggioranza dei tumori mammari e prostatici metastatizzano alle ossa, mentre, ad esempio, solo il 30% delle neoplasie mammarie genera metastasi polmonari. La comprensione dei meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno è fondamentale per poter sviluppare nuove strategie terapeutiche. È stato ipotizzato che le cellule dei tumori mammari metastatizzano alle ossa grazie all'espressione di diversi geni tipici degli osteoblasti (es.: Osteocalcina, BoneSialoProtein) e/o alla produzione di fattori che possono stimolare il rimodellamento osseo (es.: parathyroid hormone-related peptide, PTHrP, ed endotelina, ET-1) provocando a loro volta il rilascio di altri fattori che possono funzionare da chemoattrattanti o angiogenici, come il frammento del procollagene di tipo I (C3). Le cellule neoplastiche presentano diverse caratteristiche riconducibili a quelle di cellule indifferenziate o immature, ed è sempre più evidente che i geni normalmente coinvolti nello sviluppo embrionale o nel mantenimento dello stato indifferenziato vengono spesso ri-espressi dalle neoplasie. I geni omeotici fanno parte di questa categoria ed in particolare ci sono numerose evidenze che associano l'espressione anormale dei geni della famiglia dei Dlx con tumori umani sia solidi che ematologici. Generalmente questa categoria di geni non agisce nel senso degli oncogeni o degli oncosoppressori classici ma, agendo come fattori di trascrizione, la loro deregolazione probabilmente predispone la cellula alla trasformazione neoplastica.

#### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo generale del progetto riguarda l'analisi dell'espressione dei geni Dlx nelle metastasi sia umane che murine. In particolare abbiamo:

- studiato la via di segnalazione coinvolta, con lo studio dell'espressione di alcuni geni candidati, quali ET-1, Msx1 e 2, dHand e BMP4 per capire i meccanismi di homing e di sviluppo di metastasi osteoblastiche o osteolitiche da parte delle cellule tumorali;
- studiato in vitro ed in vivo la risposta ad ET-1;
- completato l'analisi dell'espressione dei geni Dlx5 e Dlx6 durante lo sviluppo embrionale e la formazione del craniofacciale, degli arti e degli organi sessuali;
- in collaborazione con la Prof.ssa Manduca dell'Università di Genova abbiamo svolto analisi sulla presenza del frammento C3 del procollagene di tipo I.

#### *Beneficiari*

Comunità scientifica; Servizio Sanitario Nazionale.

#### *Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

Negli ultimi anni abbiamo studiato il ruolo dei geni Dlx nello sviluppo embrionale. In particolare, Dlx5 e 6 sono importanti anche per un corretto sviluppo dell'apparato scheletrico e la loro assenza provoca gravi malformazioni e l'assottigliamento delle ossa. Inoltre abbiamo verificato che nel modello murino SHFM-1 (Split-hand/split-foot malformation) dovuto alla mancanza di funzione di questi geni, il difetto agli arti che si osserva è associato ad un difetto agli organi genitali (ipospadia), suggerendo un ruolo dei Dlx anche nella formazione dell'uretra e ipotizzando un'origine molecolare comune per queste malformazioni congenite. Il dosaggio di questi geni durante lo sviluppo degli organi genitali ci ha confermato che la loro espressione controlla anche la steroidogenesi. Inoltre, poiché questi due geni sono sulla via di segnalazione di ET-1, abbiamo studiato l'interazione tra geni Dlx ed ET-1 durante lo sviluppo dell'apparato scheletrico.

Poiché ET-1 è pesantemente coinvolta nello sviluppo di metastasi ossee, abbiamo deciso di studiare il ruolo di questi omeogeni nella formazione e crescita di metastasi ossee sperimentali. Allo scopo abbiamo inoculato per via intracardiaca nei topi nudi linee di tumori mammari umani che originano metastasi osteolitiche (MDA-MB231, MDA-MB435) e osteoaddensanti (T47D e ZR1), e una linea di tumore prostatico che provoca tumori osteolitici (PC3). I

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

noduli metastatici cresciuti in vari organi sono stati prelevati ed inclusi per studi di ibridazione in situ ed immunoistochimica. Le cellule MDA-MB231 in coltura o cresciute nel sottocute nei topi non esprimono i geni Dlx5 o 6, tuttavia le metastasi ottenute dall'inoculo intracardiaco esprimono entrambi i geni indipendentemente dall'organo interessato. Inoltre questi due geni non sono espressi nei campioni di tessuto mammario normale umano, mentre sono indotti in presenza del tumore. Tramite analisi per microarray su numerosi casi di carcinoma mammario umano, abbiamo rilevato un'espressione alternativa di Dlx2 e Dlx5 che correla con la prognosi. La presenza di Dlx5 (e la contemporanea assenza di Dlx2) nei campioni è infatti correlata con un'alta probabilità di formazioni di metastasi, mentre l'evento contrario correla con l'assenza di metastasi nei pazienti analizzati.

Infine abbiamo svolto analisi sulla presenza del frammento C3 del procollagene di tipo I che, prodotto in grandi quantità nelle matrici ossee, è attivo come chemoattrattante per le cellule tumorali e come fattore pro-angiogenico. Il C3 potrebbe essere rilasciato durante l'osteolisi indotta dalla metastasi, richiamando altre cellule tumorali e/o favorendone la crescita stimolando l'angiogenesi.

### *Elenco pubblicazioni:*

Levi G.-Mantero S.,-Barbieri O.,-Cantatore D.,-Palaia L.,-Beverdam A.,-Genova F.,-Robert B.-Merlo G.R.  
Msx1 and Dlx5 act independently in development of craniofacial skeleton, but converge on the regulation of Bmp signaling in palate formation.  
Mech. Develop, 123:3/16, 2006

Vieux Rochas M.-Coen L.-Sato T.-Kurihara Y.-Gitton Y.-Barbieri O.-Le Blay K.-Merlo G.-Egger M.-Kurihara H.-Janvier P.-Levi G.  
Molecular dynamics of retinoic acid induced craniofacial malformations: implications for the origin of gnathostome jaws.  
PLoS ONE 2:e510;1/e510;10, 2007

Nishida H.-Miyagawa S.-Vieux-Rochas M.-Morini M.-Ogino Y.-Suzuki K.-Nakagata N.-Choi HS.-Levi G.-Yamada G.  
Positive Regulation of Steroidogenic Acute Regulatory Protein Gene Expression through the Interaction between Dlx and GATA-4 for Testicular Steroidogenesis.  
Endocrinology 149: 2090/2097, 2008

Palmieri D.-Astigiano S.-Barbieri O.-Ferrari N.-Marchisio S.-Ulivi V.-Volta C.-Manduca P.  
Procollagen I COOH terminal fragment induces VEGF/A and CXCR4 expression in breast carcinoma cells.  
Exp. Cell Res. 314:2289/2298, 2008

Suzuki K.-Haraguchi R.-Ogata T.-Barbieri O.-Alegria O.-Vieux M.-Nakagata N.-Ito M.-Mills A.-Kurita T.-Levi G.-Yamada G.  
Abnormal urethra formation in mouse models of split hand/split foot malformation type 1 and type 4.  
Eur. J. Hum. Genet. 16:36/44, 2008

Morini M.-Astigiano S.-Emionite L.-Mirisola V.-Levi G.-Barbieri O.  
Mutually exclusive expression of DLX2 and DLX5/6 in mammary carcinoma cells and metastasis.  
Cancer Letters, submitted

Vieux-Rochas M.-Mantero S.-Barbieri O.-Astigiano S.-Couly G.-Kurihara H.-Merlo GR.-Levi G.  
Spatio-temporal and quantitative regulation of the endothelin-1 pathway controls lower jaw morphogenesis: implications for the etiology of First Arch syndromes.  
Development, submitted

Visigalli D.-Palmieri D.-Strangio A.-Astigiano S.-Barbieri O.-Casartelli G.-Zicca A.-Manduca P.  
The carboxyl terminal trimer of procollagen I induces pro-metastatic changes and vascularization of breast cancer cells xenografts.  
Mol. Cancer, submitted

### **Cellule staminali tumorali ed interazione con l'ospite**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni ospite-tumore

*Programma:* f - Sviluppo preclinico e di fase I di terapie biologiche antitumorali: immunoterapia, immunoterapia adottiva, terapie "antisense", terapia antiangiogenica, terapia genica e terapia cellulare

*Responsabile:* Simonetta Astigiano

*Partecipanti :* Ottavia Barbieri

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* cancer stem cells; microambiente; metastasi

*Altri Enti coinvolti:* Istituto ITBA-CNR, Milano (I. Zucchi); Center for Comparative Medicine, UC Davis, USA (P. Damonte)

# Consuntivo progetti RC 2006-2008

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

## *Background*

Sempre più evidenze sperimentali e dati clinici suggeriscono che le cellule staminali sono alla base dello sviluppo di tumori solidi ed ematologici. I tumori derivati da cellule staminali contengono popolazioni gerarchiche in cui la maggior parte delle cellule sono differenziate mentre solo una minima parte mantiene la capacità di iniziare il processo neoplastico. Queste cellule, denominate tumor initiating cells o cancer stem cells (CSC), sono in grado di generare tumori anche a livello di singola cellula e potrebbero essere responsabili della formazione di metastasi e recidive. La caratterizzazione delle CSC e della loro relazione con il microambiente circostante è dunque fondamentale per lo sviluppo di nuove terapie antitumorali mirate alla completa eradicazione della malattia. Anche se attualmente le CSC sono studiate da molti ricercatori, la loro biologia e la loro completa caratterizzazione è ancora limitata poiché sono molto difficili da isolare dai tumori e stabilizzare in linee cellulari da poter studiare in vitro. In particolare non sono stati ancora ben definiti i markers di espressione di superficie delle CSC che sono state identificate.

## *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo principale del progetto è quello di caratterizzare le cellule staminali tumorali umane per identificare possibili targets terapeutici. In questi anni abbiamo completato solo alcuni obiettivi secondari che sono propedeutici al suo completamento:

- caratterizzazione della linea cellulare staminale mammaria di ratto LA7 che rappresenta un valido modello per l'identificazione di nuovi markers utili alla selezione delle CSC dai tumori mammari;
- messa a punto di nuovi sistemi di crescita e selezione in vivo delle CSC nel pannicolo adiposo umanizzato del topo nudo.

## *Beneficiari*

Comunità scientifica; Servizio Sanitario Nazionale.

## *Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008*

Abbiamo lavorato alla caratterizzazione in vivo di una linea cellulare (LA7) derivata da un adenocarcinoma mammario di ratto che ha caratteristiche di staminalità. Queste cellule sono capaci di differenziare in vitro in tutti i tipi cellulari presenti nella ghiandola mammaria normale, formando strutture che simulano sia morfologicamente che funzionalmente l'arborizzazione mammaria, come la formazione di dotti ed alveoli. In vivo le cellule LA7 formano tumori eterogenei, capaci di metastatizzare, in cui sono riconoscibili nuovamente tutti i tipi cellulari riscontrabili nell'organo di origine. Inoltre, una sola cellula LA7, se inoculata in topi immunodepressi, è in grado di formare un tumore eterogeneo, che è trapiantabile serialmente, dimostrando così capacità differenziative e di self renewal. Dai tumori in vivo è possibile isolare tre tipi cellulari distinti che presentano caratteristiche differenti. Oltre alle staminali si ritrovano cellule non in grado di crescere (terminalmente differenziate) e cellule con proprietà intermedie che sono in grado di generare tumori per un numero limitato di trapianti. Anche se il presente progetto è ancora in corso, i nostri dati suggeriscono che solo le cellule staminali tumorali possono dare origine alle metastasi, mentre le cellule progenitrici sono capaci di promuovere la crescita del tumore, compresa la sua capacità invasiva ma non sono capaci di formare metastasi a distanza. Inoltre dati preliminari sulla nostra linea cellulare indicano che alcune CSC possono rimanere dormienti nel tessuto mammario per lungo tempo (anche tre mesi) prima di avviare il processo proliferativo, offrendo un ottimo modello per studiare le recidive che, nel caso del cancro al seno, possono comparire anche dopo 20 anni dall'asportazione del tumore primario.

Parallelamente abbiamo messo a punto la tecnica per il trapianto di cellule tumorali umane nel pannicolo adiposo mammario del topo nudo, opportunamente umanizzato, una particolare metodologia che ci permetterà di selezionare le CSC umane del tumore della mammella.

## *Elenco pubblicazioni:*

Zucchi I.-Sanzone S.-Astigiano S.-Pelucchi P.-Scotti M.-Valsecchi V.-Barbieri O.-Bertoli G.-Albertini A.-Reinbold R.-Dulbecco R.

The properties of a mammary gland cancer stem cell.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:10476/10481, 2007

Cocola C.-Sanzone S.-Astigiano S.-Pelucchi P.-Piscitelli E.-Vilardo L.-Barbieri O.-Bertoli G.-Reinbold R.-Zucchi I.

A rat mammary gland cancer cell with stem cell properties of self renewal and multi lineage differentiation.

Cytotechnology 58:25/32, 2008

Rotondo R.-Mastracci L.-Piazza T.-Barisione G.-Fabbi M.-Cassanello M.-Costa R.-Morandi B.-Astigiano S.-Cesario A.-Sormani M.-Ferralzo G.-Grossi F.-Ratto G.B.-Ferrini S.-Frumento G.

Arginase 2 is expressed by human lung cancer, but it neither induces immune suppression, nor affects disease progression.

Int. J. Cancer 123:1108/1116, 2008

Tasso R.-Augello A.-Carida' M.-Postiglione F.-Tibiletti M.-Bernasconi B.-Astigiano S.-Fais F.-Truini M.-Cancedda R.-Pennesi G.

Development of sarcomas in mice implanted with mesenchymal stem cells seeded onto bioscaffolds.

Carcinogenesis Epub Oct 9, 2008

Zucchi I.-Astigiano S.-Bertalot G.-Sanzone S.-Cocola C.-Pelucchi P.-Bertoli G.-Stehling M.-Barbieri O.-Albertini A.-Schöler H.R.-Neel B.-Reinbold R.A.-Dulbecco R.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

Distinct populations of tumor initiating cells derived from a tumor generated by rat mammary cancer stem cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press