

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

### S.S. Oncologia Traslazionale Pediatrica

#### Identificazione di geni per la predisposizione al neuroblastoma

*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:* Gian Paolo Tonini

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* neuroblastoma; ereditarietà familiare; analisi di linkage; predisposizione genetica; geni candidati; espressione genica

*Altri Enti coinvolti:* Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma (L. Longo); Istituto G. Gaslini, Genova (M. Conte, R. Ravazzolo, I. Ceccherini); Università di Bologna (M. Seri, G. Romeo); Philadelphia Children's Hospital, Philadelphia, USA (J. Maris, M. Devoto)

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica osservazionale

*Area di interesse:* prevenzione primaria/secondaria

*Soggetti cofinanziatori:* Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

#### *Background*

I tumori ereditari devono essere sempre considerati in termini di predisposizione al cancro. Le mutazioni che intervengono a carico di un gene malattia possono essere già presenti nelle cellule germinali e segregare nei membri di famiglie con malattia ricorrente. Queste famiglie rappresentano, pertanto, un ottimo modello per la ricerca di geni mutati che predispongono alla malattia. La presenza di mutazioni specifiche che inattivano geni candidati per posizione, funzione o espressione e che segregano nei membri di una famiglia, rappresenta la conferma che questi possano essere i geni predisponenti a una specifica malattia. Da 10 anni nel nostro laboratorio è iniziato il reclutamento di famiglie con neuroblastoma ricorrente, in collaborazione con altri gruppi italiani e europei. Fino ad oggi, sono state reclutate per lo studio 6 famiglie, di cui 4 informative.

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

Identificazione dei geni associati alla predisposizione al NB.

Obiettivi secondari: a) raccolta di famiglie con neuroblastoma ricorrente; b) analisi dei pedigrees; c) raccolta dei campioni di sangue periferico dei membri familiari; d) analisi del genotipo per mezzo di SNPs

#### *Beneficiari*

Il presente progetto potrà avere benefici per i pazienti affetti da neuroblastoma.

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

18 famiglie informative per l'analisi di linkage sono state stratificate, in modo da identificare un gruppo geneticamente più omogeneo, seguendo criteri clinico-biologici, quali istologia del tumore, amplificazione del proto-oncogene MYCN, stadio della malattia. Sulla base di questi criteri non è stato, però, possibile ottenere risultati significativi, in quanto si è persa potenza statistica nelle analisi. Il locus identificato sul 2p è in linkage in 13 famiglie sulle 18 analizzate e contiene circa 100 geni nell'intervallo con valori di lod score più elevati (>3). La condizione di NB ricorrente nelle famiglie che non risultano essere in linkage con questo locus deve, quindi, essere spiegata da almeno un altro gene, il quale mappa in un differente locus, tuttora ignoto. Sulla base di queste osservazioni ipotizziamo che un modello mendeliano di ereditarietà monogenica sia inappropriato per il NB. Riteniamo, invece, che un modello di tipo oligogenico possa spiegare l'esistenza di più loci che, interagendo geneticamente tra loro, abbiano un ruolo causale e/o modificatore del fenotipo nella stessa o in diverse famiglie. L'analisi del genotipo per mezzo di SNPs e il calcolo del valore del LOD score ha permesso di identificare il gene ALK come possibile candidato gene predisponente. L'analisi di mutazioni di ALK ha permesso di dimostrare l'esistenza di mutazioni funzionali del gene e associare le mutazioni alla predisposizione del NB.

#### *Elenco pubblicazioni:*

Longo L.-Panza E.-Schena F.-Seri M.-Devoto M.-Romeo G.-Bini C.-Pappalardo G.-Tonini G.P.-Perri P.  
Genetic predisposition to familial neuroblastoma: identification of two novel genomic regions at 2p and 12p.  
Hum. Hered. 63:205/211, 2007

Longo L, Borghini S, Schena F, Parodi S, Albino D, Bachetti T, Da Prato L, Truini M, Gambini C, Tonini GP, Ceccherini I, Perri P.  
PHOX2A and PHOX2B genes are highly co-expressed in human neuroblastoma.  
Int. J. Oncol. 33:985/991, 2008

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

Mosse' Y.-Laudenslager M.-Longo L.-Cole K.-Wood A.-Attiyeh E.- Laquaglia M.-Sennett R.-Lynch J.-Perri P.-Laureys G.-Speleman F.- Kim C.-Hou C.-Hakonarson H.-Torkamani A.-Schork N.-Brodeur G.- Tonini G.P.-Rappaport E.-Devoto M.-Maris J.  
Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene.  
Nature 455:930/935, 2008

### **Analisi dei profili di espressione genica per mezzo di microarray ad alta densità di sequenze oligonucleotidiche e studio del microambiente tumorale**

*Linea di ricerca:* 1 - Oncologia Predittiva

*Programma:* d - Nuove tecniche di diagnostica biologica e molecolare (test genetici e genetic counselling, DNA microarrays e profili di espressione genica)

*Responsabile:* Gian Paolo Tonini

*Partecipanti:* Paola Scaruffi, Simona Coco, Sara Stigliani, Federica Del Grosso

*Durata:* 2007-2008

*Parole chiave:* tumori solidi; neuroblastoma; microarray; microRNA; microambiente tumorale

*Altre strutture IST:* S.S. Epidemiologia Molecolare (S. Bonassi, S. Moretti); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini)

*Altri Enti coinvolti:* D.O.Bi.G., Università degli Studi di Genova (F. Valdora); Divisione di Ematologia/Oncologia Pediatrica (A. Garaventa), Divisione di Anatomia Patologica (C. Gambini), Laboratorio Biologia Molecolare (L. Varesio), Istituto G. Gaslini, Genova

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica osservazionale

*Area di interesse:* diagnostica

*Soggetti cofinanziatori:* AIRC; MIUR; Regione Liguria; Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

#### *Background*

Lo sviluppo tumorale coinvolge la regolazione dell'espressione di molti geni. Grazie all'introduzione della tecnologia dei microarray è possibile studiare in un unico esperimento la modulazione di decine di migliaia di geni importanti per lo sviluppo e la progressione del tumore. La tecnologia dei microarray permette di caratterizzare, quindi, la cosiddetta "signature" di ogni tumore, di migliorare la classificazione e la stratificazione prognostica e di identificare i target molecolari che possono essere potenziali bersagli per terapie innovative. I Tumori Neuroblastici (NTs) sono definiti come: Neuroblastomi (NB), Ganglioneuroblastomi Schwannian stroma-rich (GNBi-SR), Ganglioneuroblastomi nodulari (GNBn-SR), Ganglioneuromi (GN). Essi sono composti di cellule neuroblastiche (Nb) con quantità variabili di cellule Schwanniche stromali (SS). L'istologia tumorale è predittiva dell'outcome dei pazienti e i pazienti con ganglioneuroblastoma o ganglioneuroma hanno una migliore prognosi rispetto a quelli con neuroblastoma. Inoltre i NTs mostrano una variabile eterogeneità genetica. Nonostante siano stati descritti diversi profili di espressione genica dei NTs, solo pochi sono stati riportati distinguendo le due componenti cellulari.

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

L'obiettivo generale del progetto è l'identificazione di una signature genetica tumore-specifica in grado di definire i subset di tumori e di individuare potenziali nuovi marcatori molecolari per la predizione del decorso clinico di malattia. Parallelamente, essendo il neuroblastoma un tumore embrionale che deriva dalle cellule della cresta neurale, ci siamo proposti l'obiettivo di analizzare il profilo di espressione genica nelle cellule della cresta neurale nell'embrione di topo durante i diversi stadi dello sviluppo.

#### *Beneficiari*

I risultati di questo studio hanno permesso di ottenere una dettagliata caratterizzazione molecolare dei tumori neuroectodermici, a livello delle singole componenti cellulari, rappresentando la base scientifica per la comprensione dei meccanismi alla base dell'interazione tumore-microambiente. Il presente progetto potrà quindi avere dei benefici per i pazienti affetti dalle forme di più aggressive di tumori neuroectodermici, poiché si auspica che in futuro si potranno sviluppare terapie innovative mirate.

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

Nell'ambito dell'attività di ricerca per il periodo 2006-2008 abbiamo eseguito l'analisi dei profili di espressione genica nelle varianti istologiche di neuroblastoma mediante la tecnologia Affymetrix GeneChip. Complessivamente abbiamo valutato il profilo di espressione genica in 9 ganglioneuroblastomi intermixed ad istologia favorevole, in 10 neuroblastomi stroma-poor ad istologia sfavorevole ed in aree microdissezionate mediante Laser Capture Microdissection (LCM), al fine di analizzare popolazioni cellulari omogenee di Nb e SS. L'analisi dei dati mediante la SAM (Significance Analysis of Microarrays) e la teoria dei giochi ha permesso di selezionare rispettivamente 84 e 50 differenzialmente espressi nei due tipi istologici. I dati di microarray sono stati confermati mediante validazione in real-time PCR. Il clustering gerarchico ha correttamente raggruppato i differenti istotipi, identificando 2 cluster di geni.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

L'analisi di Gene Ontology ha indicato che i neuroblastomi stroma-poor ad istologia sfavorevole e i Nb esprimono prevalentemente l'espressione di geni associati alla replicazione cellulare, lo sviluppo del sistema nervoso e a pathway anti-apoptotici. Al contrario, nei ganglioneuroblastomi le cellule SS mostrano l'attivazione di geni coinvolti nella comunicazione intercellulare e nell'apoptosi. I risultati dei nostri studi hanno, inoltre, dimostrato una bassa eterogeneità intratumorale a livello di mRNA sia nei ganglioneuroblastomi intermixed ad istologia favorevole che nei neuroblastomi stroma-poor ad istologia sfavorevole. L'analisi statistica dei risultati di microarray mediante la combinazione di SAM e teoria dei giochi ha permesso di identificare una segnatura di 16 geni il cui livello di espressione è in grado di distinguere correttamente i ganglioneuroblastomi intermixed ad istologia favorevole dai neuroblastomi stroma-poor ad istologia sfavorevole. Dei 16 geni, 5 sono over-espressi nei neuroblastomi stroma-poor ad istologia sfavorevole e codificano per proteine nucleari (*CENPF*, *EYA1*, *PBK*, *TOP2A*, *TFAP2B*), mentre solo 1 degli 11 geni altamente espressi nei ganglioneuroblastomi intermixed codifica per un recettore nucleare (*NR4A2*).

Parallelamente è stato effettuato lo studio dei profili di espressione genica in embrioni di topo a diversi stadi dello sviluppo embrionale. I risultati hanno dimostrato che 11 geni implicati nei processi di riparo del DNA sono down-regolati nelle cellule della cresta neurale nel corso del normale sviluppo embrionale murino, fino a diventare silenti nel midollare del surrene del topo adulto. L'elevato livello di espressione di tali geni negli stadi embrionali precoci potrebbe contribuire al mantenimento dell'integrità del DNA, suggerendo che la loro deregolazione potrebbe essere associata all'insorgenza di patologie tumorali che originano dalle creste neurali, quali il neuroblastoma.

### *Elenco pubblicazioni:*

Tonini G.P.-Pistoia V.

Molecularly guided therapy of neuroblastoma: a review of different approaches.  
Curr. Pharm. Des. 12:2303/2317, 2006

Scaruffi P.-Coco S.-Cifuentes F.-Albino D.-Nair M.-Defferrari R.-Mazzocco K.-Tonini G.P.

Identification and characterization of DNA imbalances in neuroblastoma by high resolution oligonucleotide array comparative genomic hybridization.  
Cancer Genet. Cytogenet. 177:20/29, 2007

Albino D.-Scaruffi P.-Moretti S.-Coco S.-Truini M.-Di Cristofano C.-Cavazzana A.-Stigliani S.-Bonassi S.-Tonini G.P.

Identification of low intratumoral gene expression heterogeneity in neuroblastic tumors by genome wide expression analysis and game theory.  
Cancer 113:1412/1422, 2008

### **Costruzione di prototipi di nanopore array per la definizione di espressione genica su scale temporali del millisecondo per singolo poro**

*Linea di ricerca:* 1 - Oncologia Predittiva

*Programma:* d - Nuove tecniche di diagnostica biologica e molecolare (test genetici e genetic counselling, DNA microarrays e profili di espressione genica, proteomica)

*Responsabile:* Gian Paolo Tonini

*Partecipanti:* Paola Scaruffi, Sara Stigliani, Simona Coco

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* tumori solidi; microarray; marcatori molecolari prognostici; arrayCGH; espressione genica, nanopore-array

*Altri Enti coinvolti:* Dipartimento di Fisica, Università di Genova e Laboratorio Nanomed, Centro Biotecnologie Avanzate di Genova (U. Valbusa, V. Mussi); Technobiochip S.c.a.r.l., Pozzuoli, Napoli

*Tipologia progetto:* tecnologie abilitanti

*Area di interesse:* diagnostica

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR FIRB; Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

### *Background*

Il progetto Genoma Umano ha permesso di identificare nuovi geni e sequenze EST (Expressed Sequence Tag) che, una volta caratterizzate, completeranno la decodificazione del genoma umano (<http://www.ornl.gov/hgmis/>). Nuove tecnologie sono state sviluppate per l'analisi del genoma, in grado di analizzare decine di migliaia di geni in un singolo esperimento come per esempio quella dei microarray, basata sul principio secondo cui filamenti di DNA a singola catena ancorati a supporti rigidi si possono ibridare con DNA complementare. I microarray sono impiegati per caratterizzare i profili di espressione genica, per rilevare polimorfismi o mutazioni, per identificare SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), per individuare perdite o guadagni di materiale genetico o un cambiamento nel numero di copie di un gene.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

Recentemente è stata proposta la tecnologia dei nano-pori per l'analisi del genoma (Howorka S. et al. *Biotechnol.* 19:636-639, 2001; Vercoutere W. et al. *Nat. Biotechnol.* 19:248-252, 2001; Wang H. and Branton D., *Nature* 19:622-623, 2001). Un nanoporo proteico di alfa-emolisina è alloggiato in un doppio strato lipidico, immerso in una fase liquida in presenza di un campo elettrico. Nel nano-poro si sistema una sequenza oligonucleotidica (probe). Se nella fase liquida si trova la molecola ad essa complementare (target), si forma un duplex di probe-target che altera la conduttività del sistema, determinando una variazione di corrente. Sono stati creati sistemi per sequenziare frammenti di DNA ed identificare mutazioni puntiformi ed è potenzialmente possibile applicare tale tecnologia anche all'analisi di espressione genica e di SNPs di cellule umane normali e neoplastiche. Il metodo è estremamente semplice, elegante e di facile impiego e soprattutto consente la caratterizzazione degli acidi nucleici con una scala temporale del millisecondo. Si può prevedere che lo sviluppo di un sistema di nano-pori in fase solida e non in membrane biologiche, possa avere una vasta applicazione nella diagnostica delle neoplasie e delle altre patologie genetiche. Un recente lavoro (Li J. et al., *Nature* 412:166-169, 2001) dimostra che fasci ionici ad energie di qualche KeV consentono la realizzazione di membrane di SiO<sub>2</sub> o di SiN con pori di dimensioni di pochi nanometri, aprendo la strada alla costruzione di membrane solide a multipori.

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

Costruzione di un prototipo di nanopore-array per la rapida identificazione di trascritti genici e SNP in campioni biologici.

### *Beneficiari*

Il presente progetto consentirà la produzione di un dispositivo che potrà essere utilizzato per la valutazione di marcatori molecolari con significato prognostico e/o consentire un migliore inquadramento del paziente nelle categorie di rischio e la conseguente personalizzazione della terapia. Inoltre, l'identificazione di SNP associati alla suscettibilità ad alcune malattie o alla diversa risposta alla terapia farmacologica consentirà di effettuare un fingerprinting dei pazienti, al fine di valutare la predisposizione a patologie e la risposta ai farmaci.

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

1) Funzionalizzazione del nanoporo. Sono state eseguite prove di funzionalizzazione chimica su diversi substrati (allumina, nitruro di silicio, platino depositato su nitruro di silicio), con diversi protocolli. Dopo deposizione manuale di oligonucleotidi ammino-modificati, i risultati sono stati valutati mediante microscopia a forza atomica e microscopia in fluorescenza (con oligonucleotide marcati con fluoroforo). Hanno dato buoni risultati sia la funzionalizzazione del platino che del nitruro di silicio, in quanto entrambi sono in grado di legare covalentemente le molecole di DNA aminomodificato solo dopo loro funzionalizzazione chimica, garantendo una buona specificità di legame. Sono state eseguite anche prove di ibridazione in fluorescenza, che hanno dimostrato un legame specifico tra molecola probe legata al substrato e molecola target.

2) Prove in cella. Sono state effettuate misure di corrente su singolo nanoporo alloggiando la membrana in un prototipo di cella di misura. La corrente è stata quantificata sul nanoporo prima e dopo la sua funzionalizzazione per ottimizzare le condizioni sperimentali.

È stato, inoltre, acquisito lo Spotter piezoelettrico per la deposizione automatizzata di centinaia di diversi probe sulle membrane nanoforate.

Dopo le prime prove promettenti con la funzionalizzazione su platino depositato e su nitruro di silicio direttamente, abbiamo deciso di procedere alla realizzazione del prototipo mediante funzionalizzazione diretta del nitruro. In questo modo si ottiene una procedura più semplice e con meno passaggi in vista soprattutto del prodotto finale. I chip precedentemente nanoforati vengono funzionalizzati e poi trasferiti in cella di misura. Gli elementi fondamentali dell'apparato di misura sono una cella costituita da due serbatoi contenenti una soluzione ionica (tipicamente KCl 1 M), comunicanti solo attraverso il nanoporo, e due elettrodi (filì di argento clorurato Ag/AgCl) per l'applicazione di una tensione e la rilevazione della corrente. La cella, realizzata in polimero (PDMS), è posizionata su un tavolo antivibrante all'interno di una doppia gabbia di Faraday in modo da ridurre il rumore elettrico e meccanico. Le misure di corrente ionica sono realizzate inserendo il chip nanoforato nella cella di misura e applicando una differenza di potenziale tra i due elettrodi immersi in soluzione. In particolare vengono applicate delle rampe di tensione e registrate delle rampe di corrente in modo da ricostruire le curve tensione-corrente. Da queste ultime, con un fit lineare è possibile ricavare una stima della resistenza R del nanoporo; dalla resistenza R del nanoporo si può ricavare una stima del suo diametro efficace. Quando la corrente è stata misurata sullo stesso chip in giorni successivi è stata evidenziata una diminuzione della corrente e un contemporaneo aumento della resistenza, quindi un restringimento del diametro efficace. Fino alla completa chiusura in alcuni casi. Pertanto per garantire la stabilità nel tempo del chip funzionalizzato si è resa necessaria l'introduzione di un passaggio di disattivazione dei gruppi funzionali che non hanno reagito alla fine della procedura di funzionalizzazione. La procedura finale di funzionalizzazione dei substrati consta pertanto dei seguenti passaggi:

- pre-trattamento dei chip nanoforati con aminopropiltriethossi-silano
- attivazione del substrato con 1,4-fenilene-diisotiocianato
- incubazione con oligonucleotidi 45-mer (sonde)
- disattivazione del substrato
- conservazione a 4°C sottovuoto

La funzionalizzazione provoca un restringimento delle dimensioni del nanoforo, ossia una riduzione del diametro efficace misurabile attraverso le misure di corrente in cella, cioè un aumento della resistenza elettrica. Dunque la funzionalizzazione con molecole probe si ottiene una riduzione di diametro del nanoporo.

La presenza delle molecole probe dopo la funzionalizzazione è stata anche verificata tramite imaging SEM.

Sono state condotte misure di ibridazione statica tra nanopori funzionalizzati con sonde fluorescenti e target anch'essi marcati in fluorescenza; queste misure hanno evidenziato che i nostri substrati funzionalizzati sono in grado di funzionare come biosensori.

Sono in corso misure di corrente con buffer diversi da KCl, in particolare con buffer di ibridazione classici, opportunamente modificati per minimizzare la formazione di bolle che andrebbero a ostruire il nanoporo. Queste prove

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

sono finalizzate all'ottenimento delle condizioni opportune per procedere a misure di ibridazione dinamiche in cella di misura con target non marcati: l'avvenuta ibridazione sarà evidenziata dalla variazione della corrente misurata.

### Diagnostica avanzata dei tumori solidi pediatrici: neuroblastoma

*Linea di ricerca:* 1 - Oncologia Predittiva

*Programma:* d – Nuove tecniche di diagnostica biologica e molecolare (test genetici e genetic counselling, DNA microarrays e profili di espressione genica)

*Responsabile:* Gian Paolo Tonini

*Partecipanti:* Paola Scaruffi, Simona Coco, Sara Stigliani Carla De Vecchi

*Durata:* 2007-2008

*Parole chiave:* neuroblastoma; microarray; arrayCGH; marcatori molecolari prognostici; gene expression

*Altre strutture IST:* S.S. Epidemiologia Molecolare (S. Bonassi, S. Moretti); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini, E. Margallo)

*Altri Enti coinvolti:* Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma (K. Mazzocco, R. Defferrari); Divisione di Ematologia/Oncologia Pediatrica (A. Garaventa, B. De Bernardi), Divisione di Anatomia Patologica (C. Gambini), Laboratorio di Oncologia (A. Pezzolo), Istituto G. Gaslini, Genova; Dipartimento di Oncologia ed Ematologia Pediatrica, Università/Children's Hospital di Colonia, Germania

*Tipologia progetto:* clinico-epidemiologica osservazionale

*Area di interesse:* diagnostica

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR; Regione Liguria; Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

#### *Background*

L'identificazione delle alterazioni genetiche dei tumori riveste un ruolo importante sia per conoscere la biologia della cellula neoplastica sia per sviluppare nuovi mezzi diagnostici e terapeutici. E' dimostrato, infatti, che in diversi tipi di tumori, quali tumore della mammella, linfoma, neuroblastoma, alterazioni genetiche non casuali sono significativamente associate all'aggressività del tumore. Nel neuroblastoma sono state identificate alcune mutazioni non casuali quali l'amplificazione dell'oncogene *MYCN* e la delezione del cromosoma 1p36 associate alla aggressività e progressione del tumore. Tali alterazioni sono degli utili marcatori biologici per valutare il rischio di recidiva tumorale nel paziente. Presso la nostra struttura, riconosciuta come Centro Nazionale di Riferimento per la biologia molecolare del neuroblastoma, vengono eseguite, secondo le linee guida dei protocolli europei (Ambros IM et al. J Clin Oncol. 2003 Jun 1;21(11):2077-84), le valutazioni dell'amplificazione di *MYCN* e della delezione del cromosoma 1p36 nei tumori di tutti i pazienti italiani affetti da questa patologia. Tale valutazione si svolge secondo le seguenti fasi:

- arrivo e conservazione dei campioni tumorali presso il Laboratorio
- valutazione morfologica e preparazione dei campioni per le analisi citogenetiche e molecolari
- estrazione del DNA
- analisi di FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) con sonde per la regione subtelomeric del cromosoma 1p36 e dell'oncogene *MYCN*
- analisi molecolare della perdita di eterozigosi per i loci D1S76 e D1S80 per mezzo di PCR e gel elettroforesi
- produzione di un referto elettronico con i risultati delle analisi
- invio dei risultati al centro di riferimento.

Il nostro laboratorio si occupa da anni di raccogliere, conservare e classificare materiale biologico da pazienti affetti da neuroblastoma. Il tessuto tumorale, il sangue periferico, il midollo, il DNA ed gli RNA estratti da tumore vengono conservati in banche biologiche nelle opportune condizioni di temperatura ed utilizzati a scopi diagnostici e di ricerca. Tutte le informazioni anagrafiche e biologiche riferite ai campioni sono raccolte e organizzate in un unico database che comprende, per ogni paziente, anche l'intera gamma di materiale disponibile. Esso rappresenta, quindi, uno strumento di qualità per una rapida ed efficiente fruizione dei campioni conservati presso il Laboratorio.

Nell'ambito della nostra struttura applichiamo la tecnologia dei microarray sia per studi di espressione genica che per eseguire la array Comparative Genomic Hybridization (aCGH), una tecnologia innovativa per l'analisi genetica, che permette di identificare con un unico esperimento regioni di perdita o amplificazione genica in tutto il genoma.

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

- Dettagliata conoscenza delle alterazioni genetiche frequentemente associate ai tumori neuroectodermici.
- Determinazione delle correlazione tra pattern di aberrazioni cromosomiche, profili di espressione genica e outcome del paziente, in modo da migliorare i criteri per la classificazione di pazienti ad alto rischio.
- Valutazione dell'utilizzo di alcuni marcatori molecolari quali fattori prognostici di malattia per il neuroblastoma metastatico ad alto rischio.
- Definizione di percorsi idonei per il trasferimento delle informazioni sperimentali alla clinica e la progettazione di approcci terapeutici modulati in base al profilo di alterazioni cromosomiche proprio del tumore.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

### *Beneficiari*

I risultati di questo studio hanno permesso una dettagliata caratterizzazione molecolare del neuroblastoma metastatico ad alto rischio e il riconoscimento delle varianti più aggressive di questo tumore. I geni che verranno identificati come geni associati al neuroblastoma metastatico ad alto rischio potranno essere utilizzati per definire categorie di pazienti ad alto rischio di progressione di malattia e per sviluppare strategie terapeutiche modulate sulla base delle caratteristiche genetiche del tumore. Il presente progetto avrà, quindi, dei benefici diretti per i pazienti affetti da neuroblastoma di stadio 4 poiché si auspica che in futuro gli approcci terapeutici più aggressivi potranno essere riservati ai pazienti che ricadranno nelle classi con rischio maggiore di progressione e recidiva della malattia.

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

Nell'anno 2008 sono state eseguite analisi su campioni di tessuto congelato, paraffinato e su strisci di midollo osseo. Per mezzo di FISH a doppio colore su nuclei interfascici sono state eseguite 130 analisi di *MYCN* e 110 analisi per la ricerca della delezione di 1p36.

Conclusa la fase dei controlli di qualità esterni, in accordo con le decisioni prese collegialmente dal gruppo ENQUA (European Neuroblastoma Quality Assessment), abbiamo utilizzato la tecnica MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification) per lo studio retrospettivo di pazienti arruolati nei protocolli terapeutici attualmente chiusi. Abbiamo analizzato il DNA di 76 pazienti arruolati nel protocollo terapeutico "Infant", 25 nel protocollo "Unresectable" e 32 nel protocollo LNESG1 (Localized Neuroblastoma European Study Group 1). I dati relativi a questi casi sono stati confrontati con quelli ottenuti con la metodologia dell'array-CGH con BAC, che consta in un'analisi pangenomica di ciascun tumore, effettuata nel Dipartimento di Oncologia Pediatrica dell'Istituto Curie di Parigi.

Sono stati inoltre studiati con questo approccio 32 DNA di neuroblastomi che presentano *MYCN* gain e 21 pazienti arruolati in protocolli attualmente in corso.

Per quanto riguarda l'identificazione dell'amplificazione di *MYCN* nel DNA circolante sono stati raccolti n. 50 campioni di plasma di pazienti all'esordio di malattia e n. 24 campioni di plasma di bambini sani come controllo. Di tali casi è stato estratto il DNA utilizzando un kit specifico per l'estrazione di DNA da siero (ditta Dia-chem s.r.l.). Le prime analisi sono state eseguite utilizzando, come controllo, il DNA di due campioni di linee cellulari di neuroblastoma, una amplificata e l'altra non amplificata. Sono state scelte le sequenze complete dei primer dei geni per *MYCN*, *IL1beta* (interleuchina 1 beta) e *MSTN* (miostatina) - gli ultimi due sono geni di riferimento localizzati sul cromosoma 2q - e i probe per provare la fattibilità di una multiplex PCR in Real Time PCR. I risultati hanno mostrato che l'accoppiamento *MYCN/IL1beta* funziona meglio di *MYCN/MSTN*; le analisi eseguite utilizzando la linea amplificata di neuroblastoma ha indirizzato lo studio sulla possibilità di procedere per reazioni singole e non in multiplex PCR.

In collaborazione con il Children's Hospital di Colonia sono stati analizzati 183 casi di neuroblastoma metastatici (100 stadi 4 da pazienti con età alla diagnosi superiore ai 12 mesi, 47 stadi 4S e 36 stadi 4 da pazienti con età alla diagnosi inferiore ai 18 mesi). I risultati conseguiti hanno permesso di identificare tre distinte *signature* molecolari: i) I neuroblastomi metastatici con comportamento clinico più aggressivo mostrano un pattern di aberrazioni cromosomiche principalmente caratterizzato da anomalie strutturali sbilanciate, associato alla up-regolazione a livello trascrizionale di geni coinvolti nell'induzione della proliferazione cellulare. ii) I neuroblastomi metastatici dei pazienti con outcome favorevole (follow-up medio > 3 anni) sono caratterizzati da aberrazioni cromosomiche sia strutturali che numeriche ed elevati livelli di espressione di geni associati al pathway dell'apoptosi e del differenziamento cellulare. iii) I neuroblastomi in stadio 4S sono caratterizzati prevalentemente da aberrazioni cromosomiche di tipo numerico e un'elevata espressione di geni associati allo sviluppo del sistema nervoso.

### *Elenco pubblicazioni:*

Defferrari R.-Tonini G.P.-Conte M.-Papio F.-Sementa A.-Valent A.-Schena F.-Perri P.-Mazzocco K.  
Concomitant *DDX1* and *MYCN* gain in neuroblastoma.  
*Cancer Lett.* 256:56/63, 2007

Landi S.-Gemignani F.-Neri M.-Barale R.-Bonassi S.-Bottari F.-Canessa P.-Canzian F.-Ceppi M.-Filiberti R.-Ivaldi G.-Mencoboni M.-Scaruffi P.-Tonini G.P.-Mutti L.-Puntoni R.  
Polymorphisms of glutathione/S-transferase M1 and manganese superoxide dismutase are associated with the risk of malignant pleural mesothelioma.  
*Int. J. Cancer* 120:2739/2743, 2007

Scaruffi P.-Coco S.-Cifuentes F.-Albino D.-Nair M.-Defferrari R.-Mazzocco K.-Tonini G.P.  
Identification and characterization of DNA imbalances in neuroblastoma by high resolution oligonucleotide array comparative genomic hybridization.  
*Cancer Genet. Cytogenet.* 177:20/29, 2007

Budhram Mahadeo V.-Irshad S.-Bowen S.-Lee S.-Samady L.-Tonini G.P.-Latchman D.  
Proliferation associated *Brn/3b* transcription factor can activate cyclin D1 expression in neuroblastoma and breast cancer cells.  
*Oncogene* 27:145/154, 2008

Schwab R.-Bussolari R.-Corvetta D.-Chayka O.-Santilli G.-Kwok J.-Amorotti G.-Tonini G.P.-Iacoviello L.-Bertorelle R.-Menin C.-Hubank M.-Calabretta B.-Sala A.  
Isolation and functional assessment of common, polymorphic variants of the *B/ MYB* proto oncogene associated with a reduced cancer risk.  
*Oncogene* 27:2929/2933, 2008

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

### Sviluppo di microchips a proteine per la rilevazione di markers di interesse diagnostico

*Linea di ricerca:* 1 - Oncologia predittiva

*Programma:* d - Nuove tecniche di diagnostica biologica e molecolare (test genetici e genetic counselling, DNA microarrays e profili di espressione genica, proteomica)

*Responsabile:* Gian Paolo Tonini

*Partecipanti:* Federica Del Grosso

*Durata:* 2007-2008

*Parole chiave:* neuroblastoma; marcatori molecolari prognostici; protein array; espressione proteica

*Altri Enti coinvolti:* Technobiochip S.c.a.r.l., Pozzuoli, Napoli; Università di Tor Vergata, Roma

*Tipologia progetto:* tecnologie abilitanti

*Area di interesse:* diagnostica

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR FAR

#### *Background*

Nell'ambito dello studio del neuroblastoma, la realizzazione di un Protein Chip diagnostico su basi elettrochimiche punta a soddisfare la necessità clinica di valutare simultaneamente l'espressione di un ampio pattern di marker proteici presenti sulla membrana, nel citosol, negli organuli e nel nucleo delle cellule che costituiscono il tumore, ottenendo con un solo test una notevole quantità di informazioni sullo stato proliferativo, differenziativo e di aggressività della cellula neoplastica. Un tale strumento permetterebbe di bypassare le difficoltà di esecuzione di un largo pannello di indagini a partire dall'esiguo materiale biologico proveniente dai piccoli pazienti e di mettere a disposizione delle diverse realtà ospedaliere coinvolte nella diagnosi e nella definizione di prognosi e protocolli terapeutici per il neuroblastoma un dispositivo che consente di descrivere a tutto tondo le caratteristiche del tumore in esame.

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

L'obiettivo del progetto è quello di realizzare un microchip multisensore in grado di effettuare screening rapidi e multipli di markers di interesse diagnostico; per far questo, è necessario sviluppare una tecnologia per l'implementazione dei microchip basata su sensori elettrochimici e sul principio della Kelvin probe, selezionare e valutare la specificità e la funzionalità di anticorpi selezionati diretti contro antigeni di interesse nel neuroblastoma, effettuare test di modificazione ed immobilizzazione degli anticorpi sul substrato, valutare la funzionalità del sensore in cellette a flusso ed implementare una matrice di sensori per la diagnosi di un quadro patologico completo.

#### *Beneficiari*

Strutture ospedaliere e centri di ricerca coinvolti nella diagnosi e nella terapia del neuroblastoma,

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

La parte biologica del progetto ha portato alla definizione e alla selezione di un pannello di coppie di anticorpi commerciali con alta specificità ed affinità verso antigeni di interesse diagnostico per i tumori neuroblastici. Tali anticorpi, valutati in immunoblot ed immunoprecipitazione, sono stati consegnati al nostro partner Technobiochip per procedere alla funzionalizzazione (modificazione e immobilizzazione sul supporto) sul prototipo di chip ad elettrodi screen printed in celle a flusso, basato su sistema a "sandwich" antigene/anticorpo, con rilevazione su base elettrochimica grazie allo sviluppo di specie reattive. Nel dettaglio, l'attività svolta si è focalizzata su:

- allestimento e mantenimento in coltura di linee cellulari di neuroblastoma e linee di controllo;
- estrazione di proteine totali e compartimentali da colture cellulari e da tumori congelati;
- valutazione di specificità e affinità e successiva selezione di alcuni anticorpi presenti in commercio diretti contro antigeni caratterizzanti il neuroblastoma: N-Myc, Fas, Caspasi 8, Bcl2, Bax, c-Kit, acetyl histone H4, Alk, P-Alk, RAG-1, RAG-2, CXCR5, CXCL13.

Uno degli obiettivi della sperimentazione è stato mettere a punto di un metodo di estrazione delle proteine efficiente, tale da permettere un legame antigene-anticorpo specifico per il maggior numero di anticorpi possibile tra quelli presi in considerazione per l'allestimento del Protein Chip. Infatti, nel prodotto finale è necessario che un unico lisato renda disponibili al legame, con gli anticorpi posizionati sul supporto, tutte le proteine contro cui gli anticorpi sono diretti.

L'estrazione di proteine totali dalle cellule in coltura in condizioni denaturanti è effettuata mediante lisi cellulare con RIPA Buffer in PBS in presenza di inibitori delle proteasi. L'estrazione con RIPA Buffer è particolarmente efficiente nella distruzione della membrana nucleare e massimizza perciò il recupero delle proteine del nucleo poiché il riconoscimento antigene-anticorpo che si realizza sul protein-chip in allestimento si basa sull'applicazione di proteine native, abbiamo eseguito anche l'estrazione di proteine native, sia da cellule in coltura che da tessuto, utilizzando un buffer di lisi non denaturante, oppure il Kit Mammalian Cell Extraction (MBL). Le proteine native possono essere direttamente utilizzate nella tecnica di immunoprecipitazione e, in seguito a denaturazione in loading buffer, in immunoblot. Per eseguire delle purificazioni differenziate ed ottenere proteine compartimentali, abbiamo utilizzato il kit ProteoExtract Subcellular Protome Extraction Kit (Merck, Germany) che consente, mediante una sola procedura, di separare a monte i diversi compartimenti cellulari ed ottenere contestualmente proteine nucleari, citoplasmatiche e di membrana. Utilizzando gli estratti proteici così ottenuti, abbiamo valutato e selezionato alcuni anticorpi, monoclonali e policlonali, destinati ad essere immobilizzati sul supporto solido del prototipo di Protein Chip. L'obiettivo è stato quello di individuare anticorpi che riconoscano esclusivamente il loro antigene, ovvero che non evidenzino bande aspecifiche in western blot.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

Anticorpi che, nonostante l'accurato set up dell'esperimento, abbiano dato origine a bandeggio multiplo non sono stati utilizzati.

Gli anticorpi che risultano specifici in immunoblot, utilizzato in prima battuta proprio perchè permette di valutare il corretto legame antigene/anticorpo in virtù della visualizzazione di una banda corrispondente al peso molecolare atteso, sono stati in seguito testati in immunoprecipitazione, con proteine native.

Il prototipo di chip prevede la deposizione sul supporto del pannello di anticorpi selezionati, diretti contro un epitopo dell'antigene in esame, tutti della stessa origine (es. mouse); è poi prevista l'applicazione in cellette a flusso del lisato da valutare, di un altro anticorpo per ogni antigene prodotto contro un epitopo diverso e prodotto in animale differente rispetto a quello che ha originato la controparte (quindi, non mouse, ma goat, ad esempio) e di un anticorpo secondario anti-goat coniugato a HRP in grado di originare una specie reattiva rilevabile con sistema elettrochimico. E' stato perciò necessario, anche nell'ottica di aumentare la specificità del riconoscimento in condizioni in cui sarà impossibile valutarla sulla base del peso molecolare e della carica elettrica, selezionare per ciascun antigene da rilevare 2 diversi anticorpi, generati in animali differenti, in grado di riconoscere coppie di epitopi del medesimo antigene. Gli anticorpi già selezionati ed i lisati cellulari sono stati affidati alla Technobiochip, che sta attualmente procedendo alle prove di funzionalizzazione del chip.

### Studio di nuovi farmaci atti ad indurre l'espressione di molecole pro-apoptiche nei tumori

*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:* Alessandro De Ambrosis

*Partecipanti:* Marco Musso, Federica Del Grosso

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* caspasi-8; chemioterapia; inibitori delle deacetilasi; neuroblastoma; apoptosi

*Altre strutture IST:* S.C. Terapia Immunologica (A.M. Orengo, M. Croce, S. Ferrini)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma

#### *Background*

La maggioranza dei tumori neuroectodermici metastatici è resistente alla terapia antineoplastica convenzionale. La mancata espressione delle caspasi, in particolare di caspasi-8, può essere la causa dell'insensibilità delle cellule tumorali ai farmaci antineoplastici. Abbiamo studiato l'espressione del gene caspasi-8 in linee cellulari di NB e identificato il suo sito d'inizio della trascrizione attivo in queste cellule. In seguito abbiamo valutato il ruolo di una sequenza ISRE, prossima al sito d'inizio della trascrizione, dimostrando che è essenziale nell'attivazione trascrizionale di caspasi-8 da parte d'interferon-gamma. Ulteriori studi ci hanno permesso di chiarire che il sito ISRE regola anche l'espressione costitutiva di questo gene. Inoltre l'immunoprecipitazione della cromatina ha evidenziato la presenza dei fattori trascrizionali IRF-1 e IRF2, affini alle sequenze ISRE, nella regione regolativa delle cellule che esprimono caspasi 8, mentre tali fattori non legano l'ISRE in cellule che non esprimono questo gene suggerendo un ruolo d'IRF1 e/o IRF2 nell'espressione sia costitutiva che indotta da interferon-gamma di caspasi 8.

Considerando che i fattori trascrizionali IRF2 e, in quantità minima anche IRF1, sono presenti anche in cellule derivate da NB che non esprimono caspasi 8, ci siamo chiesti se l'inibizione trascrizionale di questo gene sia dovuta a ragioni epigenetiche e se, di conseguenza, molecole che agiscono a livello epigenetico possano essere terapeutiche nel neuroblastoma.

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

*Obiettivo generale:*

Individuazione di molecole che agendo a livello epigenetico attivino i processi apoptotici, differenziativi e citotossici in linee cellulari di NB.

*Obiettivi secondari:*

- 1) Studio comparativo tra il trattamento di cellule di NB con i chemioterapici etoposide e doxorubicina rispetto al trattamento con molecole che agiscono a livello epigenetico.
- 2) Valutazione su linee cellulari di NB di doppi trattamenti con chemioterapici e farmaci epigenetici al fine di ridurre gli effetti tossici dei primi mantenendone l'efficacia.
- 3) Studio dei meccanismi regolativi della trascrizione del gene caspasi 8 in linee cellulari di NB.

#### *Beneficiari*

Il presente progetto traslazionale potrà avere dei benefici per i pazienti affetti da neuroblastoma.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

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

Abbiamo confermato la funzione di IRF1 e IRF2 come attivatori trascrizionali del gene caspasi 8 mediante la tecnologia dell'RNA interference. Questi esperimenti hanno evidenziato che a una consistente diminuzione della quantità d'IRF1 o IRF2 ha corrisposto un calo di caspasi-8 verificato sia a livelli di mRNA sia di proteine. Abbiamo valutato, inoltre, il ruolo di IRF1 e IRF2 nell'induzione dell'espressione di caspasi 8 dovuta alla stimolazione delle cellule di NB con interferon-gamma dimostrando, in questo caso, che il solo IRF1 ne incrementa la trascrizione. Gli studi in corso, oltre a definire il ruolo primario dell'ISRE nella regolazione dell'espressione di caspasi-8, hanno anche suggerito che i due E boxes presenti nel promotore prossimale collaborano nel promuovere la trascrizione del gene caspasi 8 in linee cellulari derivate da NB. Questa regione, infatti, è capace di legare, in saggi in vitro, i fattori trascrizionali USF1, USF2, N-Myc. La mutazione sito specifica di entrambi gli E boxes, o di uno o l'altro separatamente, rende inoltre il promotore, diventato incapace di legare i fattori trascrizionali affini agli E boxes, meno attivo nel promuovere l'espressione del gene reporter rispetto al costruito non mutato. Questo esperimento ha dimostrato che i due E boxes sono coinvolti nella regolazione dell'espressione di caspasi-8. Considerando che i fattori trascrizionali IRF2, USF1, USF2 e, in quantità minima anche IRF1, sono presenti in cellule derivate da NB che non esprimono caspasi 8, ci siamo chiesti da cosa dipenda l'inibizione trascrizionale di questo gene che è una delle cause di resistenza alla chemioterapia nelle forme più gravi e spesso fatali di neuroblastoma. Trattando la linea cellulare SH-SY-5Y, deficiente per l'espressione di caspasi-8, con l'inibitore delle deacetilasi, trichostatina A (TSA), ne abbiamo ottenuto la trascrizione. E' di conseguenza possibile che la struttura della cromatina inibisca il legame dei fattori trascrizionali al promotore e la trascrizione del gene.

I nostri studi indicano che la repressione di caspasi-8 può dipendere da un meccanismo epigenetico che agisce o direttamente sul promotore del gene o indirettamente, promuovendo l'espressione o modificando a livello post-traduzionale un/dei fattori regolativi coinvolti nella trascrizione di caspasi 8.

TSA appartiene alla classe degli inibitori delle deacetilasi (HDI), oggi considerati promettenti farmaci per il trattamento del cancro. Diverse molecole oltre a TSA, come il sodio butirato e quelle di recente sintesi MS-275 e Vorinostat appartenenti alle HDI, hanno mostrato di indurre differenziamento cellulare, arresto della duplicazione e apoptosi di cellule cancerose in vitro ed in vivo. Alcuni nostri risultati ottenuti nel 2007 mostrano, analogamente, un aumento dell'espressione delle molecole proapoptotiche TRAIL e del suo recettore DR5 in linee cellulari derivate da NB trattate con TSA.

Abbiamo recentemente studiato l'attività antitumorale sul neuroblastoma della HDI MS-275, valutando la sua attività come singolo farmaco o in associazione con chemioterapici convenzionali, utilizzando la HDI come trattamento aggiuntivo rispetto ai farmaci citotossici etoposide e doxorubicina utilizzati nell'usuale chemioterapia del neuroblastoma metastatico, al fine di ridurre la dose efficace di questi chemioterapici e la relativa tossicità sui pazienti. Gli effetti di questa molecola, utilizzata sia singolarmente che insieme ai chemioterapici convenzionali, sono stati valutati su linee di NB in coltura. Abbiamo valutato la citotossicità dei farmaci trattando linee di NB, caratterizzate per l'espressione di molecole proapoptotiche, con MS-275 utilizzato singolarmente o insieme ai chemioterapici, a dosi minori o comparabili a quelle usate in vivo. Durante i trattamenti sono stati inoltre valutati l'indice di duplicazione cellulare e di apoptosi e diversi markers del differenziamento cellulare. Abbiamo isolato l'RNA totale dalle colture cellulari trattate e non trattate che sarà utilizzato in esperimenti di "gene expression profiling".

Abbiamo selezionato due linee cellulari sulla base della risposta buona o scarsa ai trattamenti, da utilizzare per produrre, mediante xenotrapianto in topi SCID, un modello animale di NB per testare in vivo i trattamenti farmacologici.

Abbiamo scelto la linea IMR-5 valutata come la più responsiva sia ai farmaci utilizzati singolarmente sia alle diverse combinazioni, mentre come linea cellulare meno responsiva ai chemioterapici la nostra scelta è ricaduta su SK-N-BE(2)C. La farmacoresistenza ai chemioterapici di questa linea è probabilmente dovuta alla mutazione di p53 che tuttavia non inibisce l'effetto citotossico di MS-275, infatti la sensibilità di SK-N-BE(2)C a MS-275 è stata osservata sia a dosi di farmaco diverse sia a diversi tempi dai trattamenti valutati, mentre solo in alcuni esperimenti la sua combinazione con i chemioterapici si è dimostrata più efficace del solo MS-275.

Nonostante la mutazione di p53 sia presente soltanto nel 2% dei neuroblastomi alla diagnosi, alterazioni del pathway di p53 potrebbero essere molto più frequenti nei neuroblastomi recidivanti come è stato recentemente proposto confrontando linee di NB stabilizzate da biopsie prelevate alla diagnosi e altre ottenute da NB recidivanti dopo chemioterapia ed evidenziando che metà delle linee cellulari ottenute da NB recidivanti presentano alterazioni dei meccanismi apoptogenici mediati da p53.

A nostro avviso è quindi rilevante studiare i meccanismi molecolari responsabili della farmacoresistenza di NB recidivanti che presentano alterazioni del pathway di p53 e sperimentare, a livello preclinico, un approccio farmacologico alternativo alla chemioterapia adottata attualmente.

### *Elenco pubblicazioni:*

De Ambrosis A.-Casciano I.-Croce M.-Pagnan G.-Radic L.-Banelli B.-Di Vinci A.-Allemanni G.-Tonini G.P.-Ponzoni M.-Romani M.-Ferrini S.

An interferon sensitive response element is involved in constitutive caspase/8 gene expression in neuroblastoma cells. Int. J. Cancer 120:39/47, 2006

De Lerma Barbaro A.-De Ambrosis A.-Banelli B.-Li Pira G.-Aresu O.-Romani M.-Ferrini S.-Accolla R.  
Methylation of CIITA promoter IV causes loss of HLA/II inducibility by IFN(gamma) in promyelocytic cells. Int. Immunol. 20:1457/1466, 2008