

# Consuntivo progetti RC 2006-2008

## S.C. Trasferimento Genico

### Identificazione di marcatori delle cellule staminali del glioblastoma e di geni responsabili della loro tumorigenicità

*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:* Giorgio Corte

*Partecipanti:* Antonio Daga, Maria Cristina Capra, Daniela Marubbi, Alice Melotti, Marzia Perera

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* cellule staminali tumorali; glioblastoma; protooncogeni; geni oncosoppressori

*Altri Enti coinvolti:* Divisione di Neurochirurgia, A.O. San Martino, Genova (R. Spaziante)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute; MIUR PRIN; Fondazione CARIGE

#### *Background*

I tumori maligni cerebrali rappresentano il 2% di tutti i tumori e i gliomi circa l'86% dei tumori cerebrali. I gliomi sono classificati in quattro stadi e il glioblastoma (stadio IV) è il più aggressivo e il più comune dei gliomi ed è responsabile del 4% di tutte le morti per tumore ogni anno. La sopravvivenza mediana dei pazienti affetti da glioblastoma è di circa dieci mesi; con la terapia chirurgica e la radio-chemioterapia, la sopravvivenza mediana è prolungata di circa sette mesi rispetto ai pazienti non trattati. È necessario quindi trovare nuove terapie che incrementino in modo sostanziale la sopravvivenza dei pazienti con glioblastoma. Secondo una recente ipotesi, confermata da evidenze sperimentali in diversi tipi di tumore, nelle neoplasie solo una percentuale di cellule tumorali mantiene le caratteristiche di staminalità, è scarsamente proliferante e genera sia nuove cellule staminali che cellule non più staminali ma attivamente proliferanti. La popolazione staminale è però la sola in grado di dare origine ad un nuovo tumore se trapiantata in un animale immunodeficiente. Le terapie antineoplastiche convenzionali spesso non sono in grado di eliminare completamente il tumore poiché, colpendo soprattutto le cellule che proliferano velocemente, risparmiano almeno una parte di cellule staminali. La massa neoplastica si riduce così di dimensioni ma conserva una riserva di cellule staminali che, dopo un periodo di latenza, danno origine ad una nuova massa neoplastica. Per eliminare radicalmente il tumore appare quindi decisivo isolare e caratterizzare le cellule staminali, identificare i meccanismi molecolari responsabili del mantenimento della staminalità, con l'obiettivo di trovare nuove e più efficaci strategie terapeutiche.

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

1. Migliorare le conoscenze sul glioblastoma per individuare nuovi bersagli per la diagnosi e la terapia di questo tumore a prognosi gravissima: 1.1) Identificazione di marcatori fenotipici e genetici delle cellule staminali di glioblastoma per consentire l'isolamento e lo studio di questa sottopopolazione altamente maligna e tumorigenica; 1.2) Individuazione di nuovi bersagli terapeutici che consentano di colpire in modo selettivo queste cellule.

#### *Beneficiari*

I pazienti con neoplasie cerebrali e la comunità scientifica.

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

- Isolamento e caratterizzazione di cellule staminali di glioblastoma umano. Nel nostro laboratorio abbiamo ottenuto colture di cellule di glioblastoma derivate da frammenti prelevati da pazienti durante la rimozione chirurgica del tumore, grazie alla collaborazione con la Clinica di Neurochirurgia dell'Università di Genova diretta dal Prof. Spaziante. Queste cellule sono coltivate in un mezzo chimicamente definito, in assenza di siero e con fattori di crescita idonei alla coltura di progenitori neurali, EGF e bFGF. Le cellule di glioblastoma così isolate sono in grado di crescere per un periodo di tempo indefinito sia come neurosfere che in adesione su piastre rivestite di matrigel e sono clonogeniche, caratteristiche tipiche delle cellule staminali. In modo analogo ai progenitori neurali immaturi rispondono a stimoli differenziativi in vitro, generando cellule che sono però, diversamente dalla controparte normale, solo parzialmente differenziate. Dai risultati ottenuti possiamo individuare colture con alta o bassa capacità differenziativa. Le colture sono state inoltre caratterizzate per l'espressione di marcatori di staminalità come CD133, Sox2, Nestina, Bmi1, Nanog e Oct4.

- Tumorigenicità delle cellule staminali di glioblastoma. Le colture cellulari derivate da espunti di glioblastoma sono state trapiantate in topi immunodeficienti. Tutte le colture fino ad oggi testate sono in grado di formare un tumore che ha le caratteristiche istologiche del tumore originario, conservando la capacità migratoria tipica del tumore da cui originano. Le cellule tumorali espuntate dagli xenotrapianti e trapiantate in topi secondari conservano le caratteristiche di tumorigenicità e migrazione a dimostrazione formale della loro capacità di autorinnovamento.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

In tal modo abbiamo ottenuto un modello murino di glioblastoma umano che utilizza cellule primarie, evitando gli svantaggi derivati dall'uso di linee con caratteristiche fenotipiche e genetiche alterate dai numerosi passaggi in coltura e non più sovrapponibili a quelle del tumore in vivo.

Le colture cellulari da noi ottenute formano tumore solo se inoculate in numero superiore a 100.000 per topo. Riducendo il numero di cellule iniettate la percentuale di topi attecchiti si riduce in modo proporzionale, questo dato indica che la percentuale di cellule staminali è bassa e che la maggior parte delle cellule sono parzialmente differenziate e non in grado di attecchire.

- Silenziamento di Sox2 nelle cellule staminali di glioblastoma. Allo scopo di identificare geni responsabili del mantenimento della staminalità nelle cellule di glioblastoma, abbiamo preso in considerazione il gene Sox2, gene che, nel topo, è in grado di mantenere lo stato proliferativo dei precursori neurali e di impedirne il differenziamento. Il silenziamento del gene Sox2 nelle cellule di glioblastoma è stato ottenuto usando la tecnica dell'RNA interference mediata da vettori retrovirali contenenti le sequenze complementari al gene Sox2 nel contesto di un microRNA naturale, il miRNA 155. Sono state utilizzate scelte quattro diverse sequenze localizzate in diversi punti dell'RNA messaggero di Sox2, e analizzata la loro capacità di silenziare l'espressione della proteina corrispondente. Sono stati utilizzati i due vettori che si sono dimostrati efficaci nel bloccare l'espressione genica; l'utilizzo di due vettori permette di escludere effetti off-target. È stato analizzato l'effetto del silenziamento di Sox2 sulla proliferazione, clonogenicità e tumorigenicità delle cellule di glioblastoma derivate da tre pazienti. Il silenziamento di Sox2 riduce la proliferazione in vitro delle cellule tumorali di circa il 30% rispetto al controllo, così come è ridotta l'espressione di Ki67, un marcatore di proliferazione ( $12\% \pm 2$  Vs  $50\% \pm 3$ ). L'effetto del silenziamento viene abolito dalla contemporanea espressione forzata di un gene Sox2 non silenziabile, dimostrando la specificità di tale effetto. La clonogenicità in vitro delle cellule silenziate risulta ridotta come è ridotta la dimensione dei cloni ( $31 \pm 4/81 \pm 5$ ), indicativa di una perdita di staminalità delle cellule tumorali silenziate. L'effetto in vivo è stato analizzato paragonando la tumorigenicità delle cellule di glioma infettate con un vettore di controllo con quelle infettate con i vettori in grado di silenziare l'espressione di Sox2. Mentre tutti i topi iniettati con le cellule di controllo hanno sviluppato tumori di dimensioni tali da provocare l'insorgenza di sintomi neurologici evidenti entro 120 giorni dall'impianto, nessuno dei topi trapiantati con cellule di glioma nelle quali è stato inattivato Sox2 hanno sviluppato un tumore entro 240 giorni. Abbiamo quindi dimostrato che Sox2 è essenziale per il mantenimento della tumorigenicità delle cellule di glioblastoma.

### *Elenco pubblicazioni:*

Bajetto A.-Barbieri F.-Dorcaratto A.-Barbero S.-Daga A.-Porcile C.-Ravetti J.-Zona G.-Spaziante R.-Corte G.- Schettini G.-Florio T.

Expression of CXC chemokine receptors 1/5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem. Int.* 49:423/432, 2006

Colombo E.-Giannelli S.-Galli R.-Tagliafico E.-Froni C.-Tenedini E.-Ferrari Se.-Ferrari St.-Corte G.-Vescovi A.-Cossu G.-Broccoli V.

Embryonic stem derived versus somatic neural stem cells: a comparative analysis of their developmental potential and molecular phenotype. *Stem Cells* 24:825/834, 2006

De Haas T.-Oussoren E.-Grajkowska W.-Perek M.-Popovic M.-Zadavec L.-Perera M.-Corte G.-Wirhths O.-Van Sluis P.-Pietsch T.-Troost D.-Baas F.-Versteeg R.-Kool M.

OTX1 and OTX2 expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65:176/186, 2006

Gangemi R.-Daga A.-Muzio L.-Marubbi D.-Cocozza S.-Perera M.-Verardo S.-Bordo D.-Griffero F.-Capra M.-Mallamaci A.-Corte G.

Effects of Emx2 inactivation on the gene expression profile of neural precursors. *Eur. J. Neurosci.* 23:325/334, 2006

Daga A.-Orengo A.-Gangemi R.-Marubbi D.-Perera M.-Comes A.-Ferrini S.-Corte G.

Glioma immunotherapy by IL/21 gene modified cell or by recombinant IL/21 involves antibody responses. *Int. J. Cancer* 121:1756/1763, 2007

Pastorino F.-Marimpietri D.-Brignole C.-Di Paolo D.-Pagnan G.-Daga A.-Piccardi F.-Cilli M.-Allen T.-Ponzoni M.

Ligand targeted liposomal therapies of neuroblastoma. *Curr. Med. Chem.* 14:3070/3078, 2007

Appolloni I.-Calzolari F.-Corte G.-Perris R.-Malatesta P.

Six3 controls the neural progenitor status in the murine CNS. *Cereb. Cortex* 18:553/562, 2008

Calzolari F.-Appolloni I.-Tutucci E.-Caviglia S.-Terrile M.-Corte G.-Malatesta P.

Tumor progression and oncogene addiction in a PDGF-B-induced model of gliomagenesis. *Neoplasia.* 10:1373/1382, 2008

Gangemi R.M.-Griffero F.-Marubbi D.-Perera M.-Capra M.C.-Malatesta P.-Ravetti G.-Zona G.-Daga A.-Corte G.

SOX2 silencing in glioblastoma tumor initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells Epub Oct 23, 2008*

Muraglia A.-Perera M.-Verardo S.-Liu Y.-Cancedda R.-Quarto R.- Corte G.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

DLX5 overexpression impairs osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells.  
Eur. J. Cell Biol. 87:751/761, 2008

Neumaier C.-Baio G.-Ferrini S.-Corte G.-Daga A.  
MR and iron magnetic nanoparticles. Imaging opportunities in preclinical and translational research.  
Tumori 94:226/233, 2008

Pastorino F.-Di Paolo D.-Piccardi F.-Nico B.-Ribatti D.-Daga A.- Baio G.-Neumaier C.-Brignole C.-Loi M.-Marimpietri D.-  
Pagnan G.- Cilli M.-Lepekhn E.-Garde S.-Longhi R.-Corti A.-Allen T.-Wu J.- Ponzoni M.  
Enhanced antitumor efficacy of clinical grade vasculature targeted liposomal doxorubicin.  
Clin. Cancer Res. 14:7320/7329, 2008

Ponassi R.-Biasotti B.-Tomati V.-Bruno S.-Poggi A.-Malacarne D.- Cimoli G.-Salis A.-Pozzi S.-Miglino M.-Damonte G.-  
Cozzini P.- Spyraiki F.-Campanini B.-Bagnasco L.-Castagnino N.-Tortolina L.- Mumot A.-Frassoni F.-Daga A.-Cilli M.-  
Piccardi F.-Monfardini I.- Perugini M.-Zoppoli G.-D'arrigo C.-Pesenti R.-Parodi S.  
A novel Bim/BH3 derived Bcl/X(L) inhibitor. Biochemical characterization, in vitro, in vivo and ex vivo anti leukemic  
activity.  
Cell Cycle 7:3211/3224, 2008

### Regolazione del turnover di mRNA instabili e cancro

*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:* Roberto Gherzi

*Partecipanti:* Paola Briata, Marco Ponassi

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* turnover del mRNA; beta-catenina; MAPK p38; Akt/PKB

*Altri Enti coinvolti:* Biochemistry and Molecular Genetics University of Alabama, Birmingham, AL (C.Y. Chen); Center for Experimental Bioinformatics, University of Southern Denmark, Odense, Danimarca (J.S. Andersen); Molecular Structure Division, National Institute for Medical Research, London, U.K. (A. Ramos); IFOM-IEO Campus, Milano (G. Natoli)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* AIRC, Istituto Superiore di Sanità

#### *Background*

Secondo studi apparsi nel corso degli ultimi anni, l'espressione di più del 50% del trascrittoma viene controllata regolando la velocità con cui l'mRNA viene degradato. La stabilità di uno specifico mRNA può venire regolata in risposta a differenti stimoli extracellulari e ciò consente rapidi aggiustamenti dell'espressione di alcuni geni. Geni la cui espressione viene regolata a livello di velocità del turnover sono tipicamente quelli codificanti per citochine, oncogeni e proteine implicate nella regolazione del ciclo cellulare. Gli elementi essenziali responsabili del controllo del turnover di trascritti instabili sono: 1) sequenze situate generalmente nel 3' non tradotto (3'UTR) di tali trascritti; 2) proteine che legano tali sequenze; 3) enzimi responsabili della degradazione degli mRNA instabili. Le più studiate tra le sequenze destabilizzanti sono le ARE (AU-rich elements) presenti nel 3'UTR della maggior parte dei trascritti labili. KSRP, una proteina contenente domini KH, lega sequenze ARE, recluta sugli mRNA target complessi multiproteici comprendenti enzimi ribonucleolitici e promuove la rapida degradazione di numerosi trascritti labili tra cui quelli codificanti per citochine (IL-2, TNF $\alpha$ , IL-6, ecc.), regolatori della proliferazione cellulare (ciclina D1 e D2, p21, beta-catenina), oncogeni (c-jun), fattori di trascrizione (Pitx2, miogenina), istoni (H3.3), enzimi (PP2A), proteine che legano RNA (hnRNP-A1, hnRNP-F, hnRNP-H), e ormoni (Paratormone). L'attività di KSRP è regolata da stimoli extracellulari mediante fosforilazione da parte di Serin/Treonin cinasi quali MAPK p38 e AKT. Abbiamo dimostrato che AKT fosforila KSRP in un unico residuo aminoacidico (Ser 193) situato nel primo dei quattro domini KH. Alla fosforilazione consegue l'interazione con la isoforma zeta della proteina multifunzionale 14-3-3 e l'incapacità di promuovere la degradazione di mRNA target quali beta-catenina.

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

Obiettivo generale: definire gli elementi molecolari della proteina KSRP che determinano la sua funzione di promuovere la rapida degradazione di mRNA instabili. Ottenere informazioni strutturali su tali elementi allo scopo di disegnare molecole in grado di interferire con la attivazione di KSRP e con la sua capacità di interagire sia con i trascritti target sia con gli enzimi ribonucleolitici.

Ulteriori obiettivi: 1 - Individuare il meccanismo con cui vie di segnalazione abnormemente attivate nel corso di trasformazione tumorale (Wnt/beta-catenina, MAPK p38, AKT/PKB), modulando la funzione di KSRP, determinano

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

specifiche risposte in termini di stabilizzazione o di destabilizzazione di trascritti inerentemente labili; 2 - Determinare se l'espressione di KSRP può essere regolata in talune circostanze e definirne il meccanismo.

### *Beneficiari*

Studi di ricerca preclinica volti ad indagare la possibilità di regolare l'espressione genica a livello posttrascrizionale regolando la funzione di proteine che causano la degradazione di trascritti labili. Ci si attende che l'avanzamento delle conoscenze ottenute abbia ricadute sul Sistema Sanitario Nazionale.

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

Nel corso del 2008 abbiamo compiuto sostanziali progressi nella comprensione del meccanismo molecolare mediante il quale la fosforilazione da parte di AKT modifica la capacità di KSRP di regolare l'emivita di beta-catenina e altri trascritti labili implicati nella proliferazione cellulare. In collaborazione con il Laboratorio di Andres Ramos (MRC Londra, UK), abbiamo dimostrato che la fosforilazione da parte di AKT del residuo S193 causa uno "svolgimento" strutturale del dominio KH1 di KSRP. Studi biofisici hanno dimostrato che il KH1, che è caratterizzato da una inusuale instabilità strutturale, una volta "svolto", può interagire con 14-3-3. L'interazione con 14-3-3 causa una localizzazione nucleare di KSRP che tiene lontana la proteina dai siti citoplasmatici in cui avviene la degradazione degli mRNA labili. E' importante notare che lo "svolgimento" strutturale del dominio KH1 di KSRP che consegue la fosforilazione da parte di KSRP è un evento reversibile. La localizzazione nucleare impedisce a KSRP di reclutare sugli mRNA target gli enzimi citoplasmatici responsabili della rapida degradazione degli mRNA stessi. Abbiamo, inoltre, definito che il ruolo di KH1, nell'ambito di KSRP, non è quello di interagire con gli mRNA target di KSRP ma di modulare, con le sue modificazioni conformazionali, la funzione dell'intera proteina rispondendo a segnali extracellulari. Gli studi svolti hanno dimostrato che KSRP è una proteina modulare che, proprio in base a questa sua prerogativa strutturale, è in grado di legare distinte sequenze di RNA e di svolgere diverse funzioni sul metabolismo dell'RNA (vedi progetto di ricerca linea 1 programma c, responsabile Paola Briata). I risultati ottenuti permettono di ipotizzare che la localizzazione nucleare di KSRP possa dirigere la proteina verso differenti funzioni e lasciano supporre che KH1 possa rappresentare un interruttore molecolare che, in base alle mutevoli esigenze della cellula, indirizza KSRP alla funzione più necessaria in un determinato momento.

Studi compiuti in collaborazione col Laboratorio di Gioacchino Natoli (IEO/IFOM, Milano) hanno permesso di individuare un nuovo meccanismo di regolazione della funzione di KSRP. Abbiamo visto che in macrofagi derivati da midollo osseo di topo (BMM), l'esposizione a lipopolisaccaride della parete batterica (LPS) causa una sostanziale riduzione dell'espressione di KSRP. Dati preliminari in corso di ulteriore validazione indicano che KSRP è bersaglio di un microRNA la cui espressione è fortemente accresciuta da LPS in BMM.

### *Elenco pubblicazioni:*

Chou C.-Mulky A.-Maitra S.-Lin W.-Gherzi R.-Kappes J.-Chen C.

Tethering KSRP, a decay promoting AU rich element binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay.  
Mol. Cell. Biol. 26:3695/3706, 2006

Bevilacqua A.-Ghisolfi L.-Franzi S.-Maresca G.-Gherzi R.-Capaccioli S.-Nicolin A.-Canti G.

Stabilization of cellular mRNAs and upregulation of proteins by oligoribonucleotides homologous to the Bcl2 ARE motif.  
Mol. Pharmacol. 71:531/538, 2007

Garcia Mayoral M.-Hollingworth D.-Masino L.-Diaz I.-Kelly G.-Gherzi R.-Chou C.-Chen C.-Ramos A.

The structure of the C terminal KH domains of KSRP reveals a noncanonical motif important for mRNA degradation.  
Structure 15:485/498, 2007

Gherzi R.-Trabucchi M.-Ponassi M.-Ruggiero T.-Corte G.-Moroni C.-Chen C.-Khabar K.-Andersen J.-Briata P.

The RNA binding protein KSRP promotes decay of beta/catenin mRNA and is inactivated by PI3K/AKT signaling.  
PLoS Biol. 5:82/95, 2007

Ruggiero T.-Trabucchi M.-Ponassi M.-Corte G.-Chen C.-Al Haj L.-Khabar K.-Briata P.-Gherzi R.

Identification of a set of KSRP target transcripts upregulated by PI3K/AKT signaling.  
BMC Mol. Biol. 8:28;1/28;15, 2007

Nechama M.-Ben Dov I.-Briata P.-Gherzi R.-Naveh Many T.

The mRNA decay promoting factor K/homology splicing regulator protein post transcriptionally determines parathyroid hormone mRNA levels.  
FASEB J. 22:3458/3468, 2008

Diaz-Moreno I.-Hollingworth D.-Frenkiel T.-Kelly G.-Martin S.-Howell S.-Garcia-Mayoral M.F.-Gherzi R.-Briata P.-Ramos A.

Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localisation and explains mRNA decay regulation.  
Nat. Struct. Mol. Biol., in press

### **Screening in vivo di geni implicati nella formazione dei gliomi**

*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)

# Consuntivo progetti RC 2006-2008

*Responsabile:* Paolo Malatesta

*Partecipanti:* Arrigo Massa

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* glioma; oncosoppressori; oncogeni; glioblastoma; stem cells; PDGF

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* AIRC

## *Background*

I gliomi sono tumori intracranici di origine gliale, incurabili a causa della sede di insorgenza, delle caratteristiche di motilità e della resistenza ai più diversi approcci terapeutici. I gliomi vengono suddivisi, seguendo una classificazione di tipo istopatologico, in gliomi di natura astrocitaria (astrocitomi grado I-IV), oligodendrocitaria (oligodendrogliomi grado I-IV) e mista. Fra i più importanti problemi da risolvere per sperare di migliorare la prognosi e le terapie c'è la classificazione su base molecolare dei gliomi, che potrebbe permettere una selezione più appropriata dei trattamenti. Ulteriori acquisizioni sicuramente necessarie per una lotta efficace a queste patologie sono l'identificazione delle possibili lesioni primarie che generano il glioma e le lesioni che ne causano la progressione. Importante è anche la definizione delle vie molecolari che presiedono alla tumorigenicità e invasività di tali tumori. Come è noto, i gliomi sono frutto di un processo "multi-step" e l'analisi della sua eziologia dal punto di vista genetico è spesso complicata dall'accumulazione di più mutazioni che avvengono durante la progressione della trasformazione tumorale. Fra gli aspetti più importanti da chiarire c'è il rapporto fra lesione primaria e lesioni secondarie, soprattutto in funzione della possibilità che, indipendentemente da queste ultime, il tumore resti fondamentalmente dipendente dalla lesione che lo ha provocato ("oncogene addiction").

Il presente progetto si è proposto di individuare nuovi geni a carico dei quali avvengono le lesioni primarie che causano i gliomi e di sviluppare nuovi modelli animali che mimino più da vicino le controparti umane di tali forme tumorali, così da fornire degli strumenti più idonei di quelli attualmente disponibili per la validazione preclinica di nuove terapie.

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

Gli originali obiettivi proposti in fase di programmazione sono stati perseguiti dando la priorità maggiore a quelli che, nello svolgimento del progetto, si sono dimostrati più promettenti. Questo ha comportato il fatto che rispetto agli obiettivi numero 1 e 2 (individuazione di nuovi potenziali soppressori tumorali [1] e nuovi potenziali oncogeni [2] coinvolti nell'insorgenza dei gliomi attraverso lo screening di due "library") abbiano acquisito carattere preponderante l'obiettivo 3 (ovvero la caratterizzazione in vivo del ruolo nei gliomi di geni candidati scelti in base alla loro importanza nel controllo della proliferazione cellulare dei progenitori neurali e delle cellule staminali neurali adulte) e l'obiettivo 5 (ovvero l'ottenimento e la validazione di nuovi modelli murini dei gliomi umani).

Gran parte degli esperimenti volti al perseguimento degli obiettivi 1 e 2 sono stati effettuati, ma vista la loro stessa natura, non è facile stimare i tempi per la validazione dei risultati ottenuti, come dettagliato nel consuntivo delle attività.

## *Beneficiari*

- La comunità scientifica ed in particolare il settore dell'oncologia sperimentale.

- A più lungo termine i pazienti affetti da glioma che potranno usufruire di diagnosi più precise e di conseguenza di terapie più mirate.

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

In questi tre anni di attività il gruppo si è occupato della costruzione di due "library", una di sovraespressione e una di silenziamento, finalizzate all'individuazione di nuovi oncogeni e nuovi oncosoppressori coinvolti nell'eziologia dei gliomi. Si è inoltre occupato di caratterizzare un modello murino di glioma basato sulla sovraespressione di PDGF-B, mettendone in luce le caratteristiche come modello di progressione tumorale e individuando geni che sono importanti per il mantenimento del fenotipo tumorale.

Come specificato già nella relazione 2007 a livello delle attività previste per il 2008, gli sforzi si sono maggiormente concentrati sugli obiettivi 3 e 5 perché più promettenti e realizzabili, alla luce dei risultati ottenuti nel corso del progetto. Lo screening delle "library" e il lavoro di validazione dei geni isolati è tuttavia continuato, utilizzando primariamente la trasduzione in animali transgenici mutanti per l'oncosoppressore TP53. Tale screening ha portato fino ad ora all'isolamento di 5 potenziali nuovi soppressori tumorali (Neurexin3, Frzd8, Keratin2, TCB9B, Rab11fip) e un potenziale nuovo oncogene AFAP1, i quali, tuttavia, non si sono rivelati in grado di dare luogo a tumore quando silenziati o, rispettivamente, sovraespressi, in assenza di ulteriori lesioni molecolari. Esperimenti mirati alla loro validazione sono tuttora in corso.

Molto più proficua si è rivelata la caratterizzazione di un modello di glioma indotto mediante la sovraespressione in vivo del PDGF-B e quella del ruolo di una serie di geni candidati: Six3, Olig2 Pax6 e Sox2. L'analisi del modello murino di glioma ne ha dapprima permesso la sua classificazione come oligodendroglioma, permettendo di dimostrare che tumori con caratteristiche istopatologiche tipiche del glioblastoma possono invece rappresentare oligodendrogliomi di alto grado (Appolloni et al., in press e dati di microarray pubblicati in GEO GSE12836: PDGF-B induces a homogeneous class of oligodendrogliomas from embryonic neural progenitors). Un'analisi più approfondita ha mostrato come questi tumori vadano incontro a progressione da basso ad alto grado e che si prestano pertanto ad essere utilizzati come modello di progressione. L'analisi scaturita da questa osservazione ha portato all'identificazione di un possibile candidato responsabile della progressione stessa, il soppressore tumorale putativo PC3/Tis21 (Calzolari et al., 2008). I livelli di espressione di quest'ultimo gene sono coerentemente elevati in tutti i tumori a basso grado analizzati mentre

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

sono a livello basso in tutti i tumori ad alto grado. Da segnalare è anche l'osservazione che i tumori indotti dal PDGF-B mostrano invariabilmente il fenomeno denominato "oncogene addiction" che consiste nel rimanere strettamente dipendenti dallo stimolo che li ha indotti, anche dopo essere andati incontro a progressione (Calzolari et al., 2008). Questo fatto lascia sperare di poter contrastare la tumorigenicità di questi tipi di glioma andando ad inibire l'oncogene che ne ha indotto la formazione.

Gli esperimenti da noi effettuati hanno mostrato come gli oligodendrogliomi di alto grado siano dipendenti dall'espressione del fattore di trascrizione Olig2, il quale, se silenziato grazie ad un microRNA artificiale opportuno, provoca la perdita delle capacità tumorigeniche. Le cellule in cui avviene il silenziamento di Olig2 non sono capaci di riprodurre il tumore una volta iniettate nel cervello di topi adulti. Al contrario, le cellule di controllo, in cui non è stato introdotto alcun micro-RNA ovvero un microRNA "scrambled", danno invariabilmente luogo a tumori secondari che riproducono le caratteristiche dei primari da cui derivano, anche quando iniettate in numeri estremamente ridotti (<200 cellule/cervello).

Analogo all'effetto del silenziamento di Olig2, è quello della sovraespressione del gene Pax6, un fattore di trascrizione noto per essere implicato nei processi di differenziamento in senso neuronale delle cellule staminali neurali. In particolare, abbiamo dimostrato che la sovraespressione di Pax6 induce un netto abbattimento dei livelli di Olig2, sia nelle cellule tumorali, sia anche in contesti non patologici quali i precursori neurali in coltura, suggerendo che tale meccanismo regolativo sia di validità generale. La scoperta di tale meccanismo di repressione di Olig2 da parte di Pax6, insieme alla dimostrazione che Olig2 è fondamentale per la tumorigenicità delle cellule di oligodendroglioma, suggerisce che Pax6 agisca sulla tumorigenicità attraverso la regolazione negativa dell'espressione di Olig2.

### *Elenco pubblicazioni:*

Appolloni I.-Calzolari F.-Corte G.-Perris R.-Malatesta P.  
Six3 controls the neural progenitor status in the murine CNS.  
Cereb. Cortex 18:553/562, 2008

Calzolari F; Appolloni I; Tutucci E; Caviglia S; Terrile M; Corte G; Malatesta P.  
Tumor Progression and Oncogene Addiction in a PDGF-B-Induced Model of Gliomagenesis.  
Neoplasia 10:1373/1382, 2008

Gangemi R.M.-Griffero F.-Marubbi D.-Perera M.-Capra M.C.-Malatesta P.-Ravetti G.-Zona G.-Daga A.-Corte G.  
SOX2 silencing in glioblastoma tumor initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity.  
Stem Cells Epub Oct 23, 2008

Malatesta P.-Appolloni I.-Calzolari F.  
Radial glia and neural stem cells.  
Cell Tissue Res. 331:165/178, 2008

Pinto L.-Mader M.-Irmeler M.-Gentilini M.-Santoni F.-Drechsel D.- Blum R.-Stahl R.-Bulfone A.-Malatesta P.-Beckers J.-  
Gotz M.  
Prospective isolation of functionally distinct radial glial subtypes. Lineage and transcriptome analysis.  
Mol. Cell. Neurosci. 38:15/42, 2008

Appolloni I.-Calzolari F.-Tutucci E.-Caviglia S.-Terrile M.-Corte G.-Malatesta P.  
PDGF-B induces a homogeneous class of oligodendrogliomas from embryonic neural progenitors.  
Int. J. Cancer, in press

### **Regolazione post-trascrizionale dell'espressione di beta-catenina e di altri trascritti labili da parte delle vie di segnalazione Wnt/Pitx2 e PI3K/PKB**

*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:* Paola Briata

*Partecipanti:* Roberto Gherzi, Marco Ponassi

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* Wnt; Pitx2; PKB; beta-catenina; microRNA

*Altri Enti coinvolti:* Interferon and Cytokine Research Unit, King Faisal Specialist Hospital and Research Center, Riyadh, Saudi Arabia (K.S.A. Khabar); Netherlands Institute for Developmental Biology, Utrecht, The Netherlands (C.H. Clevers); University of California, San Diego, La Jolla, CA. (M.G. Rosenfeld, M. Trabucchi); Institute of Immunology BSRC "AL. FLEMING", Vari, Grecia (D. Kontoyiannis)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

*Soggetti cofinanziatori:* Telethon; Istituto Superiore di Sanità

### *Background*

Negli ultimi anni sono aumentati gli studi sulla regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale che si realizza attraverso 1) la modulazione del turnover di trascritti labili e 2) attraverso il silenziamento genico causato dall'attività dei micro-RNA (miRNA). Sono stati definiti gli elementi su cui si basa tale regolazione nelle cellule di mammifero: 1) sequenze ARE (A/U rich elements) situate generalmente nel 3' non tradotto (3'UTR) di tali trascritti; 2) proteine stabilizzanti o destabilizzanti che legano tali sequenze; 3) enzimi responsabili della degradazione degli mRNA instabili. Nel caso dei trascritti stabilizzati dall'attivazione della via di Wnt, come Pitx2 e beta-catenina, abbiamo dimostrato che il coordinato reclutamento di fattori stabilizzanti e il rilascio di fattori destabilizzanti è il meccanismo molecolare responsabile del fenomeno. Inoltre, abbiamo dimostrato che, in seguito ad attivazione della via PI3K/PKB, la proteina KSRP, che lega il 3'UTR dei trascritti instabili e ne favorisce la degradazione, viene fosforilata. In seguito a tale fosforilazione KSRP non è più in grado di svolgere la sua funzione di proteina destabilizzante sui suoi RNA target. Negli ultimi anni sono stati scoperti i microRNA (miRNA), corti RNA non codificanti che, appaiandosi con mRNA bersaglio, reprimono l'espressione genica essenzialmente a livello post-trascrizionale. I miRNA controllano aspetti fondamentali della vita delle cellule e sono stati implicati nello sviluppo di tumori. La concezione emergente sul controllo dell'emivita di trascritti labili, indica come sequenze ricche di AU (e le proteine che con esse interagiscono) e microRNA (e le proteine che ne determinano la formazione e funzione) svolgano un ruolo strettamente integrato e rappresentino un continuum di processi molecolari che permettono alla cellula di rispondere a vari segnali extracellulari modulando i livelli di traduzione di tali trascritti.

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

Comprensione del ruolo integrato della modulazione dell'emivita di trascritti labili e del silenziamento genico dovuto a miRNA, con particolare attenzione a miRNA la cui funzione è collegata con lo sviluppo di tumori.

### *Beneficiari*

Studi di ricerca preclinica volti a modificare l'espressione di miRNA coinvolti nello sviluppo di tumori, con conseguenti ricadute sul Servizio Sanitario Nazionale.

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

1- Dati preliminari del nostro laboratorio e dati della letteratura facevano ipotizzare un coinvolgimento delle RNA binding protein coinvolte nella modulazione dell'emivita dei trascritti labili nell'espressione e nella funzione dei miRNA. Quindi, abbiamo voluto analizzare la funzione dell'RNA binding protein KSRP nella regolazione dell'espressione dei miRNA. In collaborazione con il Dr. M.G. Rosenfeld (UCSD, La Jolla), abbiamo analizzato una piattaforma di array di microRNA utilizzando RNA estratto da cellule di controllo e da cellule in cui l'espressione di KSRP è stata downregolata mediante siRNA. Abbiamo così identificato una classe di miRNA la cui espressione è ridotta in cellule in cui KSRP è stata downregolata. In particolare, abbiamo scoperto che la maturazione di questi miRNA, dai precursori alle forme mature, è modulata da KSRP. Tra questi miRNA abbiamo focalizzato maggiormente la nostra attenzione sulla famiglia let-7, considerata fondamentale per la regolazione di vari aspetti della proliferazione cellulare e la cui espressione è stata dimostrata notevolmente ridotta in vari tipi di tumore, in particolare quelli polmonari. Abbiamo dimostrato che KSRP si lega alla sequenza loop dei precursori dei miRNA bersaglio e, facilitando il legame di entrambi gli enzimi deputati al processing dei miRNA (Drosha nel nucleo e Dicer nel citoplasma), promuove la formazione dei miRNA maturi. Abbiamo anche indagato le conseguenze biologiche della maggiore formazione di let-7-a in seguito all'azione di KSRP e concluso che l'overespressione di KSRP produce un aumento della proliferazione cellulare in varie cellule in coltura. Inoltre, KSRP promuove la maturazione di un gruppo di miRNA cosiddetti "miogenici" in quanto favoriscono il differenziamento muscolare. La downregolazione di KSRP in mioblasti ha come risultato un blocco del processo differenziativo dei mioblasti in miotubi.

La scoperta della funzione essenziale di KSRP nella modulazione dei due step in cui avviene la maturazione di un gruppo di miRNA a partire dai loro precursori, apre la strada ad ulteriori ricerche volte a) allo studio della funzione di altre RNA binding protein nella maturazione e nella funzione di altre classi di miRNA; b) allo studio di condizioni fisiologiche e patologiche in cui la maturazione dei miRNA è alterata e all'indagine di quelle situazioni in cui il determinante principale dell'alterata maturazione è una modificata espressione o un malfunzionamento di KSRP.

2- Allo scopo di indagare in vivo il significato funzionale della regolazione dell'espressione del gene Pitx2 a livello post-trascrizionale abbiamo, in collaborazione con D. Kontoyiannis (Vari, Grecia), generato topi portanti una delezione nelle sequenze destabilizzanti localizzate nel 3'UTR di Pitx2. Per analizzare il fenotipo dei topi omozigoti per tale mutazione, abbiamo incrociato i topi eterozigoti tra loro e, sorprendentemente, abbiamo osservato che non nascono topi omozigoti (su 47 in 5 nidiate abbiamo trovato il 29.7% di topi wild type e il 70.3 % di topi eterozigoti) quindi, la delezione del 3'UTR di Pitx2 nella situazione omozigote è incompatibile con la vita. Abbiamo poi analizzato l'RNA di embrioni eterozigoti, rispetto a topi wild type, con esperimenti di PCR quantitativa utilizzando primer omologhi alla regione codificante del gene e osservato che nei topi eterozigoti per la delezione del 3'UTR l'espressione di Pitx2 è aumentata di 3-4 volte rispetto ai topi wild type. Quindi, l'effetto in vivo della delezione delle sequenze destabilizzanti del trascritto di Pitx2 consiste in un aumento della stabilità del trascritto stesso. Esperimenti sono in corso per identificare a quale stadio embrionale si arresta lo sviluppo dei topi omozigoti per la delezione nel 3'UTR di Pitx2 e per studiare il meccanismo molecolare che sta alla base di tale arresto di sviluppo.

### *Elenco pubblicazioni:*

Gherzi R.-Trabucchi M.-Ponassi M.-Ruggiero T.-Corte G.-Moroni C.-Chen C.-Khabar K.-Andersen J.-Briata P.  
The RNA binding protein KSRP promotes decay of beta/catenin mRNA and is inactivated by PI3K/AKT signaling.  
PLoS Biol. 5:82/95, 2007

Ruggiero T.-Trabucchi M.-Ponassi M.-Corte G.-Chen C.-Al Haj L.-Khabar K.-Briata P.-Gherzi R.  
Identification of a set of KSRP target transcripts upregulated by PI3K/AKT signaling.

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

BMC Mol. Biol. 8:28;1/28;15, 2007

Nechama M.-Ben Dov I.-Briata P.-Gherzi R.-Naveh Many T.

The mRNA decay promoting factor K/homology splicing regulator protein post transcriptionally determines parathyroid hormone mRNA levels.

FASEB J. 22:3458/3468, 2008

Diaz-Moreno I.-Hollingworth D.-Frenkiel T.-Kelly G.-Martin S.-Howell S.-Garcia-Mayoral M.F.-Gherzi R.-Briata P.-Ramos A.

Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localisation and explains mRNA decay regulation.

Nat. Struct. Mol. Biol., in press

### **Ruolo di oncogeni e geni soppressori tumorali nella trasformazione neoplastica di cellule staminali e progenitrici**

*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:* Patrizio Castagnola

*Partecipanti:* Paolo Pirani, Marco Ponassi

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* cellule staminali; oncogeni; tumor suppressors; apoptosi; senescenza; trasformazione neoplastica

*Altre strutture IST:* S.S. Citometria; S.C. Medicina Rigenerativa

*Altri Enti coinvolti:* DOBIG, Università di Genova (S. Tavella); Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università di Bari (C. T. Storlazzi); Dept. of Pathology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands (B. Carvalho); Department of Molecular and Human Genetics Baylor College of Medicine (Roy Morello); Università La Sapienza, Roma (C. Boitani)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* MIUR; Ministero della Salute; CIPE-Regione Liguria

#### *Background*

Le neoplasie sono malattie eterogenee caratterizzate da mutazioni di specifici geni e da instabilità genetica. Tuttora non è chiaro quali sono i rapporti tra queste alterazioni e quali cellule all'interno di un tessuto sono bersagli dei fenomeni oncogenetici. Recentemente è stato speculato che la trasformazione di cellule staminali e/o progenitrici, normalmente presenti in tutti i tessuti, possa essere all'origine di diverse neoplasie e in effetti per alcune di queste sono state prodotte delle evidenze sperimentali che supportano tale ipotesi. Inoltre la presenza nei tumori di cellule trasformate con caratteristiche staminali, quali tempi di raddoppiamento piuttosto lunghi, riveste un ruolo fondamentale nella resistenza alla chemio e radioterapia scarsamente efficaci su questo tipo di cellule. E' quindi evidente che una comprensione più profonda di quei meccanismi che portano in ultima analisi a quel processo comunemente denominato "life/death decision" nelle cellule staminali sia di fondamentale importanza per l'individuazione di nuovi bersagli terapeutici. E' noto che oncogeni e "tumor suppressor genes" sono regolatori chiave di questi meccanismi che possono estrinsecarsi in proliferazione da una parte o in differenziamento/apoptosi/senescenza dall'altro.

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

Gli obiettivi del progetto sono stati quelli di contribuire a comprendere i) come mutazioni dei proto oncogeni della famiglia Ras influenzino la "life/death decision" e la trasformazione neoplastica specificamente in cellule umane staminali/progenitrici; ii) quali relazioni esistono tra questi geni e i fenomeni di instabilità genetica in queste cellule.

#### *Beneficiari*

I pazienti affetti da tumori con mutazioni dei geni RAS e la comunità scientifica.

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

Nel corso del periodo in esame abbiamo studiato gli effetti funzionali di due mutazioni specifiche di KRAS conosciute per essere associate con differenze strutturali e prognostiche nel cancro coloretale (CRC). Usando una linea di cellule di CRC (Colo741) affetta da una mutazione BRAF e WT per KRAS, abbiamo inoltre mirato a studiare l'interazione di KRAS-BRAF. I profili di espressione genica per la condizione di controllo (KRASWT), KRASG12V e KRASG12D sono stati ottenuti dopo la selezione di cloni cellulari e mediante analisi dell'espressione dei costrutti transfettati mediante RT-PCR. L'analisi mediante qPCR è stata inoltre effettuata per confermare i dati di microarray. Questo studio ha permesso di evidenziare che la condizione di KRASG12V altera l'espressione di numerosi geni associati al ciclo cellulare,

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

all'apoptosi ed al metabolismo dell'azoto. Inoltre i nostri risultati hanno indicato una sopravvivenza e una proliferazione ridotte per la condizione di KRASWT. La condizione di KRASG12D, invece, è risultata essere caratterizzata da parecchi altri cambiamenti funzionali distinti come per esempio quelli relativi all'organizzazione della cromatina ed all'adesione cellula-cellula senza interessare i geni dell'apoptosi. Questi dati predicono che la mutazione di G12D possa essere quindi più facilmente selezionata in un contesto con BRAF mutato. Allo stesso tempo, la presenza della mutazione di KRASG12V, che induce l'angiogenesi via interleuchina 8, in quelle cellule che riescono a sfuggire all'apoptosi potrebbe conferire un fenotipo più aggressivo. I risultati conseguiti attraverso la nostra attività di ricerca sono in linea con osservazioni di altri autori che indicano che i CRCs con mutazione G12V sono associati ad una prognosi peggiore riguardo alle condizioni di G12D ed ai tumori con KRAS WT. Inoltre i nostri risultati possono contribuire ad identificare le vie dello sviluppo di CRC e nuovi biomarkers di importanza clinica.

Infine, una nostra ricerca volta ad identificare la co-presenza di mutazioni dei geni KRAS e TP53 in CRCs suddivisi per differenti gradi di aneuploidia, ha evidenziato come questa si verifichi solo nel 10% circa dei casi esaminati ed in tumori "near diploid" o "high aneuploid". Questi dati suggeriscono che queste due mutazioni sono solo raramente simultanee, non rappresentano un pathway sinergistico e che possono influenzare la comparsa di instabilità cromosomica.

### *Elenco pubblicazioni:*

Calistri D.-Rengucci C.-Seymour I.-Leonardi E.-Truini M.-Malacarne D.-Castagnola P.-Giaretti W.  
KRAS, p53 and BRAF gene mutations and aneuploidy in sporadic colorectal cancer progression.  
Cell. Oncol. 28:161/166, 2006

Iacopetta B.-Russo A.-Bazan V.-Dardanoni G.-Gebbia N.-Soussi T.-Kerr D.-Elsaleh H.-Soong R.-Kandioler D.-Janschek E.-Kappel S.-Lung M.-Leung C.-Ko J.-Yuen S.-Ho J.-Leung S.-Crapez E.-Duffour J.-Ychou M.-Leahy D.-O'donoghue D.-Agnese V.-Cascio S.-Di Fede G.-Chieco Bianchi L.-Bertorelle R.-Belluco C.-Giaretti W.-Castagnola P.-Ricevuto E.-Ficorella C.-Bosari S.-Arizzi C.-Miyaki M.-Onda M.-Kampman E.-Diergaarde B.-Royds J.-Lothe R.-Diep C.-Meling G.-Ostrowski J.-Trzeciak L.-Guzinska K.-Zalewski B.-Capella' G.-Moreno V.-Peinado M.-Lonnroth C.-Lundholm K.-Sun X.-Jansson A.-Bouzourene H.-Hsieh L.-Tang R.-Smith D.-Allen T.-Khan Z.-Shorthouse A.-Silverman M.-Kato S.-Ishioka C.  
Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an international collaborative study.  
Ann. Oncol. 17:842/847, 2006

Morello R.-Bertin T.-Chen Y.-Hicks J.-Tonachini L.-Monticone M.-Castagnola P.-Rauch F.-Glorieux F.-Vranka J.-Bachinger H.-Pace J.-Schwarze U.-Byers P.-Weis M.-Fernandes R.-Eyre D.-Yao Z.-Boyce B.-Lee B.  
CRTAP is required for prolyl 3/hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta.  
Cell 127:291/304, 2006

Pagano A.-Tonachini L.-Monticone M.-Tortelli F.-Castelnuovo M.-Randazzo N.-Tavella S.-Di Marco E.-Cancedda R.-Castagnola P.  
Proliferative arrest and activation of apoptosis related genes in Rolly Protein silenced cells.  
Gene 382:79/87, 2006

Tavella S.-Biticchi R.-Morello R.-Castagnola P.-Musante V.-Costa D.-Cancedda R.-Garofalo S.  
Forced chondrocyte expression of sonic hedgehog impairs joint formation affecting proliferation and apoptosis.  
Matrix Biol. 25:389/397, 2006

Monticone M.-Tonachini L.-Tavella S.-Degan P.-Biticchi R.-Palombi F.-Puglisi R.-Boitani C.-Cancedda R.-Castagnola P.  
Impaired expression of genes coding for reactive oxygen species scavenging enzymes in testes of Mtrf1/Chppr deficient mice.  
Reproduction 134:483/492, 2007

Marcoli M.-Candiani S.-Tonachini L.-Monticone M.-Mastrogiacomo M.-Ottonello A.-Cervetto C.-Paluzzi P.-Maura G.-Pestarino M.-Cancedda R.-Castagnola P.  
In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells.  
Pharmacol. Res. 57:374/382, 2008

Monticone M.-Biollo E.-Maffei M.-Donadini A.-Romeo F.-Storlazzi C.T.-Giaretti W.-Castagnola P.  
Gene expression deregulation by KRAS G12D and G12V in a BRAF V600E context.  
Mol. Cancer Epub Dec 16, 2008

Viale M.-Petrillo G.-Maccagno M.-Castagnola P.-Aiello C.-Cordazzo C.-Mariggio' M.-Jadhav S.-Bianchi L.-Leto G.-Rizzato E.-Poggi A.-Spinelli D.  
Sensitivity of different resistant tumour cell lines to the two novel compounds  
(2Z,4E)/2/methylsulfanyl/5/(1/naphthyl)/4/nitro/2,4 /pentadienoate and  
(1E,3E)/1,4/bis(2/naphthyl)/2,3/dinitro/1,3/buta diene.  
Eur. J. Pharmacol. 588:47/51, 2008

Viale M.-Cordazzo C.-Cosimelli B.-De Toter D.-Castagnola P.-Aiello C.-Severi E.-Petrillo G.-Cianfriglia M.-Spinelli D.  
Inhibition of MDR1 Activity in vitro by a Novel Class of Diltiazem Analogues: towards New Candidates"  
J. Med. Chem., in press

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

### Studio del ruolo di citochine pro- e anti-apoptotiche in sindromi linfoproliferative B per lo sviluppo di nuove terapie

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

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

*Responsabile:* Daniela De Toterò

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* sindromi linfoproliferative B; citochine; apoptosi; immunoterapia

*Altre strutture IST:* S.C. Terapia Immunologica (M. Fabbi, S. Ferrini); S.C. Oncologia Medica C; S.C. Immunologia

*Altri Enti coinvolti:* Università di Genova (M. Gobbi, R. Ghio)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Italia/USA

#### *Background*

Nelle sindromi linfoproliferative B le cellule del microambiente che circondano il tumore possono inviare particolari segnali capaci di influenzarne la crescita e allungarne il tempo di sopravvivenza. A questo riguardo la leucemia linfatica cronica B (LLC-B) è un esempio prototipo poiché il clone leucemico B CD5+ tende progressivamente ad accumularsi oltre che nel sangue periferico anche a livello dei linfonodi e del midollo osseo non solo a causa di difetti genetici propri della stessa B leucemica ma anche in seguito ad interazioni cellula-cellula o in risposta a particolari citochine presenti nell'ambiente circostante. Vari fattori possono quindi influenzare la crescita del clone leucemico e tra questi abbiamo inizialmente dimostrato il blocco della via apoptotica indotta dal triggering di FAS, nonostante livelli di espressione di questo recettore e dell'intero complesso DISC (death inducing signaling complex) comparabili a quelli di cellule sensibili all'apoptosi come Jurkat (de Toterò et al. The Hematology Journal 2004). In LLC-B inoltre abbiamo descritto la presenza di peculiari subsets T con fenotipo CD3+/CD8+/CD30+ che producono IL-4 con attività anti-apoptotica sulle B leucemiche, oppure espansioni oligoclonali CD8+ che esprimono recettori di killing inibitori o attivatori (KIR/KAR) che potrebbero modulare il riconoscimento di antigeni tumore-associati (de Toterò et al. Haematologica 2002). Recentemente abbiamo infine analizzato risposta e vie di signaling indotte sulle B leucemiche da citochine quali IL-15 e IL-21 che appartengono alla stessa famiglia con catena gamma comune ai loro recettori. Abbiamo così dimostrato che queste due citochine hanno effetti antagonisti poiché IL-21 induce apoptosi mentre IL-15 ne prolunga l'indice di sopravvivenza e che IL-21 è inoltre capace di contrastare l'effetto anti-apoptotico di IL-15.

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

Valutazione del ruolo di citochine in sindromi linfoproliferative B. Valutazione dell'attività pro- o anti-apoptotica di IL-15 e IL-21 in LLC-B e linfomi follicolari per lo sviluppo di nuove terapie. Valutazione dell'interazione di cellule B leucemiche con cellule appartenenti al microambiente circostante il tumore e in particolare con cellule T che potrebbero modulare l'espansione della malattia.

#### *Beneficiari*

Pazienti affetti da malattie B linfoproliferative quali LLC-B e linfoma follicolare, attraverso lo sviluppo di nuove terapie antitumorali (es. utilizzo di IL-21).

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

Abbiamo dimostrato che IL-21, una nuova citochina della famiglia di IL-2, induceva "in vitro" apoptosi delle cellule B leucemiche di LLC-B, in particolare dopo attivazione "via" CD40 che aumentava sensibilmente l'espressione di IL-21R e di Bid, una molecola legata al pathway apoptotico. All'interno di un gruppo di 33 casi di CLL studiati IL-21R appariva tendenzialmente più espresso in casi con miglior prognosi di malattia, come indicato dall'analisi CD38, ZAP70 o indice di mutazioni somatiche di IgVH. In tutti i casi studiati, comunque, l'interazione CD40-CD40L tra cellule B e una linea murina transfettata con la molecola CD40L umana causava una significativa up-regolazione di IL-21R sulla membrana delle B leucemiche rendendole così sensibili all'azione apoptotica di IL-21. L'apoptosi indotta da IL-21 appariva mediata dall'attivazione di caspasi-8 e -3 e l'attivazione di caspasi 8 veniva anche confermata dalla presenza dei prodotti di cleavage di PARP, p27Kip1 e Bid, tutti substrati di caspasi-8 (De Toterò et al. Blood 2006). Al contrario IL-15, che appartiene sempre alla famiglia di IL-2, esercitava effetti opposti a IL-21, aumentando quindi l'indice di sopravvivenza delle B neoplastiche in LLC. Gli effetti antagonisti esercitati da IL-21 e IL-15 (apoptosi verso sopravvivenza) innescavano infatti 2 diversi pathways di signaling: IL-21 fosforilava principalmente JAK-1 e STAT-1 mentre IL-15 fosforilava principalmente JAK-3, STAT-3 e STAT-5. Inoltre IL-15, ma non IL-21, attivava la via ERK1/2 e, in accordo ai risultati di signaling osservati, la proliferazione indotta da IL-15 era bloccata dall'aggiunta di inibitore per ERK1/2 (UO126) o per JAK-3 (AG490) (de Toterò et al. Blood 2008). Da questi risultati appare evidente come citochine prodotte da cellule dell'ambiente circostante possano influenzare l'andamento e la progressione della malattia. Recentemente abbiamo studiato l'espressione di IL-21R e risposta a IL-21 in alcune linee di linfomi follicolari. Due linee mostravano alti livelli di espressione di IL-21R ma solo una di queste andava incontro ad apoptosi dopo trattamento con IL-21. La mancata induzione di apoptosi da parte di IL-21 nella linea di linfoma follicolare che pur

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

esprime alti livelli di IL21R sembra correlata ad una difettiva espressione di molecole di segnale del pathway apoptotico (manoscritto in preparazione).

Abbiamo inoltre studiato l'espressione di recettori di Killing inibitori o attivatori sulle cellule T CD8+ in pazienti di LLC-B poiché avevamo osservato e descritto precedentemente la presenza di peculiari sottopopolazioni T CD8+ che suggerivano l'esistenza di espansioni di cellule T antigene-specifiche per la leucemia. In 3 pazienti su 10 studiati abbiamo osservato coespressione di un recettore sia attivatorio che inibitorio di Killing (KAR/KIR) su una alta percentuale (circa la metà) di cellule T CD8+/TCRalpha/beta. Inoltre in un paziente le cellule co-esprimenti KIR/KAR erano TCRVbeta23. Questa particolare sotto-popolazione T CD8+/TCRalpha/beta23, analizzata nel corso di 5 anni, appariva stabilmente presente come percentuale a livello del sangue periferico del paziente, che pure si dimostrava stabile in termini di progressione di malattia e con marcatori prognostici favorevoli. Analizzate sia a livello bulk che clonale queste cellule T CD8+ non erano in grado di lisare le cellule B leucemiche ma tuttavia producevano livelli significativi di IFN gamma e tale secrezione era modulata dal recettore attivatorio (manoscritto in preparazione). Questi risultati suggeriscono che in alcuni pazienti con malattia stabile sarebbero presenti espansioni T CD8+ oligoclonali di cellule reattive contro la leucemia.

### *Elenco pubblicazioni:*

Baio G.-Fabbi M.-De Totero D.-Ferrini S.-Cilli M.-Derchi L.-Neumaier C.

Magnetic resonance imaging at 1.5T with immunospecific contrast agent in vitro and in vivo in a xenotransplant model. Magn. Reson. Mather. Phy. 19:313/320, 2006

De Totero D.-Meazza R.-Zupo S.-Cutrona G.-Matis S.-Colombo M.-Balleari E.-Pierri I.-Fabbi M.-Capaia M.-Azzarone B.-Gobbi M.-Ferrari M.-Ferrini S.

Interleukin/21 receptor (IL/21R) is up regulated by CD40 triggering and mediates preapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. Blood 107:3708/3715, 2006

Cafaggi S.-Russo E.-Stefani R.-Leardi R.-Caviglioli G.-Parodi Br.-Bignardi G.-De Totero D.-Aiello C.-Viale M.

Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N/trimethyl chitosan and a cisplatin/alginate complex. J. Control. Release 121:110/123, 2007

Di Carlo E.-De Totero D.-Piazza T.-Fabbi M.-Ferrini S.

Role of IL/21 in immune/regulation and tumor immunotherapy. Cancer Immunol. Immunother. 56:1323/1334, 2007

De Totero D.-Meazza R.-Capaia M.-Fabbi M.-Azzarone B.-Balleari E.-Gobbi M.-Cutrona G.-Ferrari M.-Ferrini S.

The opposite effects of IL/15 and IL/21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways. Blood 111:517/524, 2008

Viale M, Cordazzo C, Cosimelli B, de Totero D, Castagnola P, Aiello C, Severi E, Petrillo G, Cianfruglia M, Spinelli D. " Inhibition of MDR1 activity in vitro by a novel class of diltiazem analogues: towards new candidates. J. Med. Chem. Epub Dec 18, 2008

### *Capitoli di libro:*

De Totero D.-Ferrini S.

Apoptosis versus survival in chronic lymphocytic leukemia B cells: role of death receptors and of cytokines. In Focus on cell apoptosis research. Ed. Daniel W. Cho, pp. 172-202  
Nova Science Publishers, 2007

De Totero D.-Ferrini S.

Chronic lymphocytic leukemia: receptors and cytokines modulating apoptosis and survival. In Chronic lymphocytic leukemia: new research. Ed. Ines B Moreau, pp.191-219  
Nova Science Publishers, 2008

**Valutazione preclinica di inibitori di tirosina-chinasi somministrate singolarmente o in combinazione con agenti citotossici, in colture primarie e cellule stabilizzate di neoplasie pleuro-polmonari e mammarie umane**

*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:* Roberto E. Favoni

*Durata:* 2006-2008

*Parole chiave:* cell signalling; fattori crescita oncogene-derivati; molecole anti GF-Receptor-PTK; neoplasia polmonare, mesotelioma pleurico, carcinoma mammario

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

*Altre strutture IST:* S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi; Animal Facility; S.S. Tumori Polmonari

*Altri Enti coinvolti:* DOBIG, Università di Genova; DISCAFF e DFB Center, Università Piemonte Orientale "A. Avogadro", Novara; Fondazione Maugeri, Pavia

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica

*Soggetti cofinanziatori:* AstraZeneca; Eli-Lilly; Roche; Schering-Plough; Bayer; Fondazione Maugeri

### *Background*

Le fosfotirosino-chinasi recettoriali (RPTK), oltre ad avere un compito chiave nell'indurre chemioresistenza ad agenti citotossici, sono cruciali nel promuovere i *pathways* di biosegnali, frequentemente esasperati nei tessuti neoplastici, innescati dal legame di alcuni fattori di crescita (GF) polipeptidici autocrini (EGF, IGF-I, bFGF, PDGF-A e -B, VEGF), essenziali per lo sviluppo e la progressione del N-SCLC, BC ed altre neoplasie umane, al proprio recettore specifico (GF-RPTK) transmembrana. I più recenti approcci terapeutici alle affezioni neoplastiche considerano l'inibizione dei *pathways* a valle del binomio GF-RecettorePTK e del suo complesso "signalling machinery" come targets elettivi. Allo scopo, sono stati sviluppati vari inibitori di GF-RPTK; alcuni di essi, di sintesi relativamente recente e per certi aspetti ancora in fase di studio (Gefitinib o Iressa™ ex ZD1839; ZD6474; Trastuzumab; Erlotinib-HCl; Bevacizumab; Pemetrexed; PD153035; CO358774; STI571), sono in via di sperimentazione per verificarne l'attività sia in studi preclinici che clinici preliminari.

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

Questo progetto si propone di valutare il livello di espressione dei RPTK in neoplasie umane e la loro funzionalità dopo attivazione; si intende altresì studiare l'influenza di vari agenti anti-RPTK nella formazione, nella modificazione sterica e/o nel promuovere l'inattivazione del complesso GF-RPTK; sarà oggetto di ricerca anche la determinazione dell'eventuale effetto concentrazione-tempo dipendente, il range di concentrazioni efficaci ed il tipo di attività farmacologica di tali compounds. I modelli ritenuti interessanti allo scopo sono colture primarie o linee cellulari stabilizzate in vitro derivate da mesotelioma pleurico maligno (MPM), carcinoma polmonare non microcitoma (N-SCLC) e adenocarcinoma mammario (BC) umani. In essi l'azione fisiologica di fattori mitogeni, mediata da specifici recettori transmembrana tirosino-chinasi-dipendenti (R-PTK) può risultare amplificata dalla loro singola o duplice overespressione o da mutazioni. Inoltre, verrà vagliata l'ipotesi che tali agenti in grado di inibire biomolecole rilevanti per la crescita e la vitalità cellulare possano modulare la medesima mediante la promozione diretta di fenomeni apoptotici, la inattivazione del recettore o la sensibilizzazione di cellule tumorali resistenti. Secondariamente, il progetto si propone una verifica delle potenzialità additive/sinergiche degli anti-RPTK somministrati, simultaneamente o sequenzialmente, unitamente a composti con diverso meccanismo d'azione e di impiego standard quali Gemcitabina, Pemetrexed, Cisplatino. Preliminarmente, abbiamo esaminato in dettaglio il complesso EGF/EGF-RPTK e l'anilinoquinazolina anti-EGF-RPTK Gefitinib nel hMPM.

### *Beneficiari*

Industrie farmaceutiche, pazienti affetti dalle forme neoplastiche esaminate, Servizio Sanitario Nazionale.

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

Per lo studio sono stati selezionati due modelli cellulari in vitro di hMPM: IST-Mes2 e ZL55. Il primo fu derivato da effusione pleurica (stabilizzato in linea continua e caratterizzato in IST) ed il secondo fu ottenuto da biopsia (Univ. Zurich) di due pazienti non sottoposti a chemioterapia, appartenenti al sottotipo istologico epiteliale ed entrambi con livello di espressione di EGF-R superiore ai corrispettivi tessuti normali. Le colture cellulari sono state esposte ad un *pool* di composti, per periodo breve (24-48 h) o prolungato (72-144 h) a 37°C. Esperimenti di chemiosensibilità per la determinazione delle  $[IC_{50}]$  dopo singola esposizione sono stati condotti mediante MTT *assay* sulle due linee in esame. I valori di  $[IC_{50}]$  rilevati con la molecola Gefitinib, rappresentativa dei composti antiEGF-RPTK, 20 e 10  $\mu$ M rispettivamente, descritti in dettaglio in precedenza, sono stati utilizzati, unitamente a loro frazioni o multipli, per i successivi approcci sperimentali. Esperimenti di *cell growth recovery*, condotti con medesimo protocollo, impiegando un range di concentrazioni da 0.05 a 2x delle rispettive  $[IC_{50}]$ , hanno permesso di evidenziare che l'effetto del Gefitinib fino alle concentrazioni di 25 e 15  $\mu$ M dopo 72 h esposizione è di tipo citostatico, dovuto più all'arresto della progressione del ciclo che ad una effettiva morte cellulare. Una attività pro-apoptotica, concentrazione-dipendente e con picco dopo 72 h di trattamento, è stata evidenziata in entrambe le linee cellulari mediante analisi FITC-AnnexinV/PI al citofluorimetro. Tali dati sono stati confermati, dopo esame al FACS, degli spostamenti nelle fasi del ciclo evidenziando progressivo accumulo delle cellule trattate in G0/G1 con conseguente riduzione della frazione in fase divisoria e mitotica ed incremento di quella in fase subG0/G1. Mediante analisi Western Blot, è stata valutata l'espressione basale e indotta da farmaci dei recettori di membrana (ad oggi su EGF-R), sulla fosforilazione delle PTK recettoriali e sulle proteine costituenti sia la cascata trascrittiva/mitogena: Ras, Raf, Mek, ERK1/2, che il *pathway* apoptotico (Akt). Il trattamento con EGF di colture di IST-Mes2 e ZL55, opportunamente siero/GF starvate, evidenzia una significativa fosforilazione dell'EGF-R (in Tyr 1173) e la attivazione della proteina ERK1/2-MAP kinase. Di contro, a livello Akt/PKB non è stata evidenziata alcuna fosforilazione EGF-indotta in entrambi i modelli cellulari. Il composto Gefitinib abolisce totalmente la attivazione dell'EGF-R e riduce sostanzialmente l'attivazione di ERK1/2. Gli studi di *binding competitivo* (RRA) per il recettore EGF, condotti in duplicato (incubando in simultanea il monostrato per 2 h a 4°C con quantità fissa di  $^{125}I$ -EGF, ca. 20.000 cpm, e concentrazioni crescenti di EGF non radioattivo, da 0.012 a 25.8 pmoli/0.4ml medium/well, in presenza o meno del 50%  $[IC_{50}]$  del farmaco in esame), hanno permesso di determinare, attraverso analisi Scatchard, la massima capacità di legame ( $B_{max}$ ), la costante di dissociazione ( $K_d$ ) ed il numero dei siti recettoriali/cellula. Le IST-Mes2 presentano valori basali di  $B_{max}$  nell'ordine di 58 pM,  $K_d = 0.64$  nM e siti/cellula =  $16 \times 10^4$ ; le ZL55 hanno evidenziato  $B_{max} = 118$  pM,  $K_d = 0.69$  nM e siti/cellula =  $27 \times 10^4$ . Le  $K_d$ , simili per i due modelli cellulari, indicano alta affinità e, quindi, bassa velocità di dissociazione ligando-recettore. Oltre al Gefitinib, i farmaci ad

## Consuntivo progetti RC 2006-2008

oggi testati in RRA sono le anilinochinazoline ZD6474 ed Erlotinib-HCl, la bis-aril urea Sorafenib e l'antimetabolita Gemcitabine. Le curve che indicano il legame specifico competitivo radioligando (cpm) vs. ligando (ng/ml) non radioattivo e la % dei campioni trattati vs. controlli indicano un generale e significativo incremento, in entrambe le linee cellulari, dei valori di  $B_{max}$  delle cellule trattate vs. quelle non esposte ai farmaci anti-PTK ed un conseguente aumento, molto significativo, del numero dei siti recettoriali. Ciò, si ipotizza, potrebbe derivare dalla induzione, da parte del farmaco, di dimeri recettoriali poi resi inattivi, come dimostrato da esperimenti di cross-linking chimico. Ulteriori esperimenti di *binding* seguendo diversi protocolli di trattamento (sequenziale, pre-esposizione, a 37°C, a t. ambiente) e concentrazioni di farmaco, decrescenti fino a 4 log inferiori alla  $[IC_{50}]$ , hanno fornito dati sovrapponibili. Rimangono, invece, pressoché costanti i valori della costante di dissociazione. Si dimostra che il *signalling* acceso dal legame EGF/EGF-RPTK che progredisce con l'attivazione di Ras, Raf, MEK ed ERK1/2 kinase potrebbe rappresentare una via chiave e preferenziale nella proliferazione del mesotelioma pleurico. Il blocco dell'attività kinasica recettoriale da parte del Gefitinib si estrinsecerebbe non solo spiazzando l'ATP dalla PTK, ma promuovendo la sua aggregazione in dimeri non attivabili.

### *Elenco pubblicazioni:*

Bertino P.-Porta C.-Barbone D.-Germano S.-Busacca S.-Pinato S.-Tassi G.-Favoni R.-Gaudino G.-Mutti L.  
Preliminary data suggestive of a novel translational approach to mesothelioma treatment: imatinib mesylate with gemcitabine or pemetrexed.  
Thorax 62:690/695, 2007

Bertino P.-Piccardi F.-Porta C.-Favoni R.-Cilli M.-Mutti L.-Gaudino G.  
Imatinib mesylate enhances therapeutic effects of gemcitabine in human malignant mesothelioma xenografts.  
Clin. Cancer Res. 14:541/548, 2008

Pattarozzi A.-Gatti M.-Barbieri F.-Wurth R.-Porcile C.-Lunardi G.-Ratto A.-Favoni R.-Bajetto A.-Ferrari A.-Florio T.  
17beta/estradiol promotes breast cancer cell proliferation inducing stromal cell derived factor/1 mediated epidermal growth factor receptor transactivation: reversal by gefitinib pretreatment.  
Mol. Pharmacol. 73:191/202, 2008