

## S.C. Trasferimento Genico

**Identificazione dei geni implicati nell'insorgenza e progressione dei gliomi e sviluppo di modelli animali per il saggio di bersagli terapeutici dei tumori cerebrali maligni**

*Linea di ricerca:* 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

*Programma:* c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Paolo Malatesta

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Arrigo Massa

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* glioblastoma; microRNA; PDGF-B, EGFR, modelli murini di cancerogenesi; cellule staminali tumorali

*Altri Enti coinvolti:* Dip. di Patologia Sperimentale, Università degli Studi di Bologna (L. Menotti)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; Compagnia di San Paolo

### *Background*

I tumori cerebrali rappresentano circa il 2% di tutti i tipi di cancro; fra di essi i gliomi sono i più frequenti (86%) e tra loro il glioblastoma è la forma più comune e più aggressiva. Nonostante la sua frequenza relativamente bassa, questo tumore è responsabile del 4% di tutte le morti causate dal cancro in quanto, nonostante le cure, la sopravvivenza mediana è di 14 mesi.

La prognosi tipicamente infausta dei gliomi è dovuta alla loro spiccata tendenza ad infiltrarsi, che ne rende virtualmente impossibile una completa rimozione chirurgica e alla loro alta radio- e chemio-resistenza che vanifica tutti gli attuali approcci terapeutici. La sfida rappresentata da questi tumori è resa più ardua dalla mancanza di adeguate conoscenze sulla loro eziologia molecolare e la conseguente scarsità di modelli animali accurati in cui possano essere provate nuove terapie. Recentemente abbiamo dato un contributo significativo a questo campo sviluppando un modello murino di glioma, basato sulla trasduzione del PDGF-B nei precursori neurali embrionali. Il modello mima abbastanza fedelmente l'insorgenza di una mutazione somatica all'interno di una popolazione normale ed ha il vantaggio che le cellule trasdotte possono essere facilmente distinte da quelle non trasdotte grazie all'espressione di una proteina fluorescente (GFP o DsRed). Questo rende il tumore facile da identificare e caratterizzare.

L'analisi di questo modello ci ha permesso di dimostrare che i tumori indotti dal PDGF-B vanno incontro ad un processo di progressione da basso ad alto grado in modo altamente riproducibile. I tumori indotti dal PDGF-B possono anche essere coltivati in vitro e mantengono il loro potenziale tumorigenico, essendo in grado di rigenerare un tumore con elevata efficienza quando ritrapiantate nel cervello di un topo adulto. Anche solo 100 cellule sono sufficienti per rigenerare, nel 50% dei casi, un tumore entro 50 giorni dal trapianto. Le cellule in coltura possono essere facilmente manipolate con la trasfezione o la trasduzione virale prima del trapianto e rappresentano, come i gliomi primari indotti con le iniezioni embrionali, un modello di formazione dei gliomi particolarmente adatto alla valutazione di nuovi approcci terapeutici.

Analisi del trascrittoma basate sull'uso di microarray hanno mostrato che i tumori indotti da PDGF-B hanno tratti tipici dei precursori oligodendrogliali ed esprimono geni tipici delle cellule staminali e dei progenitori neurali, fra cui Sox2 e Olig2. Sox2 è uno dei geni fondamentali espressi nelle cellule staminali ed è uno dell'insieme dei quattro geni la cui trasduzione è sufficiente a conferire staminalità. In collaborazione con altri ricercatori IST (Prof. G. Corte) abbiamo recentemente mostrato che Sox2 è essenziale per la proliferazione e il mantenimento delle cellule di glioma ma non è ancora chiaro se la sua sovraespressione possa di per sé dare origine ad una neoplasia.

Olig2 è un fattore di trascrizione noto per il suo ruolo critico nello sviluppo della linea oligodendrogliale e di alcuni sottotipi neuronali. Olig2 è noto per regolare la proliferazione delle cellule staminali e alcuni dati indicano che possa avere un ruolo anche nelle cellule staminali maligne ma il suo ruolo non è attualmente del tutto compreso e sarà oggetto di indagine con questo progetto.

Un altro gene coinvolto nella regolazione del comportamento dei precursori neurali che ha un ruolo importante nei gliomi è il gene Btg2. Btg2 è responsabile del controllo della modalità di divisione (simmetrica/asimmetrica) dei precursori neurali durante la neurogenesi. Di recente abbiamo dimostrato che esso è uno dei geni coinvolti nella progressione dei gliomi da basso ad alto grado (Calzolari et al., 2008. Neoplasia 10, 1373-82) ma il meccanismo tramite il quale esso agisca non è conosciuto.

Oltre alla sovra-stimolazione dei componenti della via del PDGF-B, è noto che i gliomi umani mostrano spesso (almeno il 25% dei casi) l'espressione di una forma aberrante e costitutivamente attiva del recettore EGFR1, detta EGFRvIII. Fino ad ora, tuttavia, non è stato completamente chiarito se tale recettore aberrante possa essere direttamente causa della trasformazione neoplastica né se la proliferazione dei tumori in cui esso è fortemente espresso dipenda strettamente dalla sua espressione. Tale fenomeno di dipendenza (addiction) si osserva chiaramente nel caso dei gliomi indotti con PDGF-b e può dare eventuali indicazioni sulle possibilità di trattamento dei gliomi.

## Programmazione 2009-2011

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

Il presente studio ha come obiettivo principale l'identificazione e caratterizzazione dei geni la cui modulazione aberrante può provocare insorgenza e progressione dei gliomi al fine di individuare nuovi bersagli terapeutici.

Nello svolgimento del progetto verranno contestualmente perseguiti i seguenti obiettivi secondari:

- Capire se un'espressione alterata di SOX2 può contribuire alla formazione del glioma utilizzando il modello murino.
- Chiarire se OLIG2 è essenziale per la continua crescita (divisioni asimmetriche) dei gliomi murini in vivo e in vitro.
- Identificare dei geni a valle di OLIG2 per cercare potenziali bersagli farmacologici.
- Chiarire il ruolo del gene BTG2 nella progressione dei gliomi indotti dal PDGF-B.
- Analizzare il ruolo di altri geni identificati tramite analisi di microarray che sono modulati durante la progressione dei gliomi indotti da PDGF-B e analisi della trattabilità farmacologica dei loro prodotti proteici.
- Costruire e caratterizzare nuovi modelli animali di glioma basati sull'espressione aberrante di oncogeni come EGFRvIII e HER2.
- Saggiare l'efficienza di strategie terapeutiche sperimentali basate sull'uso di virus oncolitici "riprogrammati" (in collaborazione con la Dott.ssa Menotti del Dip. di Patologia Sperimentale dell'Università degli Studi di Bologna)

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

L'identificazione di nuove molecole responsabili della genesi e della progressione di tumori cerebrali ha applicazioni potenzialmente importanti.

I gliomi, nonostante rappresentino il 2% circa di tutti i tumori, sono responsabili di più del 4% di tutte le morti causate da tumore. Per raccogliere la sfida rappresentata dalla loro prognosi infausta, è essenziale approfondire la conoscenza dei bersagli cellulari e dei difetti molecolari responsabili della formazione dei gliomi. Questo è lo scopo di questo studio. In considerazione del fatto che gli approcci terapeutici basati sul silenziamento genico hanno già raggiunto i trial clinici di fase 2, l'identificazione di bersagli molecolari il cui silenziamento abroga o induce fortemente le proprietà tumorigeniche dei gliomi ad alti grado potrà portare in un tempo relativamente breve a nuove strategie per combattere questa malattia. Poiché si prevede che Olig2 abbia un ruolo importante nell'induzione e nel mantenimento del glioblastoma, esso potrebbe rivelarsi un bersaglio possibile per tali approcci terapeutici. L'identificazione di geni modulati da questo fattore di trascrizione, inoltre, serviranno da potenziali biomarcatori per migliorare le attuali possibilità di diagnosi e, a loro volta, potranno rivelarsi bersagli molecolari potenziali di un silenziamento genico terapeutico.

Inoltre, i risultati dello screening mediante microarray dei bersagli Olig2 porteranno ad identificare alcune molecole la cui attività potrebbe essere direttamente modulata con farmaci più "classici" invece che con vettori genetici.

In termini di trasferibilità, la conoscenza che ci proponiamo di acquistare sarà anche utile per una classificazione funzionale dei gliomi. È importante notare che finora i gliomi sono stati classificati in base alla loro istopatologia e all'espressione di pochi marcatori specifici del tipo cellulare. Tuttavia si riconosce che ciascun sottotipo di glioma, come per esempio il glioblastoma, comprende in realtà diverse specie di patologie causate da lesioni molecolari diverse con una diversa suscettibilità ai trattamenti. L'identificazione di oncogeni e soppressori dei tumori potrebbe diventare la base di una classificazione molecolare più solida che potrebbe aiutare a selezionare approcci terapeutici più mirati. A lungo termine, l'identificazione di queste molecole, la cui alterazione provoca la formazione di un glioma, potrebbe portare alla definizione di nuovi bersagli molecolari di terapie specifiche.

### *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

1) Un vettore retrovirale che esprime sia il gene SOX2 sia eGFP verrà prodotto e impacchettato in cellule ecotropiche Phoenix-E. I sopranatanti virali verranno iniettati, in utero, nei ventricoli telencefalici di embrioni di topo E-14, infettando così i progenitori neurali che rivestono la cavità ventricolare. La topina gravida verrà lasciata partorire i cuccioli operati, il 75% dei quali di solito sopravvive al procedimento.

I topi iniettati saranno sacrificati da 2 a 4 mesi dopo la nascita o non appena si manifestano segni di disturbo neurologico. I loro cervelli, fissati, congelati e criosezionati, saranno esaminati alla ricerca di lesioni tumorali, mediante criteri istologici standard e mediante immunocolorazione con diversi anticorpi. Per filtrare eventuali tratti fenotipici fuorvianti dovuti a disordini di sviluppo, che potrebbero essere una conseguenza della superattivazione prenatale di SOX2, i vettori retrovirali saranno utilizzati per infettare i precursori neurali murini in vitro. Le cellule trasdotte saranno poi isolate al FACS e saggiate per l'attività tumorigenica in vivo, iniettandole nel cervello di topi adulti usando come controllo cellule trasdotte con la sola GFP.

Qualunque tumore ottenuto con questi due metodi verrà reiniettato nel cervello di topi adulti per controllare la capacità delle cellule di produrre tumori secondari. I tumori saranno caratterizzati mediante immunocolorazione e PCR per stabilire l'espressione di molecole e di geni noti per essere importanti nei gliomi.

2) Per valutare il ruolo di OLIG2 nei gliomi, eseguiremo esperimenti di perdita di funzione nelle cellule di oligodendroglioma murino indotto dal PDGF-B. Produrremo quindi vettori che esprimono la eGFP insieme ad un microRNA artificiale in grado di silenziare il gene OLIG2 murino. I vettori verranno usati per trasdurre le colture derivate dai gliomi murini indotti da PDGF-B.

Le cellule trasdotte saranno valutate per la loro capacità di dare origine a tumori in vivo, iniettandole nel cervello di topi wild-type e saggiando la frequenza e il decorso della progressione dei tumori risultanti. Gli esperimenti saranno eseguiti con almeno due colture indipendenti, trapiantando gruppi di 15 animali. Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Mayer saranno confrontate con i controlli usando il test Log-Rank.

Per FOXG1 eseguiremo gli stessi esperimenti descritti sopra per OLIG2.

3) Per identificare i geni bersaglio a valle di OLIG2 useremo gli stessi vettori retrovirali di silenziamento descritti sopra per trasdurre almeno tre colture indipendenti di gliomi murini indotti dal PDGF-B. Il profilo di espressione genica sarà analizzato utilizzando i microarray Affymetrix. La sotto- o la sovr'espressione di geni rilevanti sarà confermata mediante qRT-PCR.

4) I geni candidati che saranno identificati saranno analizzati per il loro ruolo nella gliomagenesi, sia in vitro sia in vivo, sovraesprimendoli o silenziandoli nelle cellule di glioma murino e valutando i loro effetti sulla tumorigenicità dopo

## Programmazione 2009-2011

trapianto nel cervello di topi adulti. Gli esperimenti verranno eseguiti con almeno due colture indipendenti, trapiantando gruppi di 15 animali. Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Mayer verranno confrontate con i controlli usando il test Log-Rank.

5) Per controllare se la reintroduzione di BTG2 è sufficiente ad abrogare il fenotipo maligno dei tumori ad alto grado indotti da PDGF-B, produrranno un vettore retrovirale esprimente la sequenza codificante di BTG2 insieme al gene reporter eGFP. Questo vettore verrà usato per trasdurre almeno tre colture indipendenti derivate da oligodendrogliomi indotti da PDGF-B. La dinamica della proliferazione in vitro e la tumorigenicità in vivo sarà analizzata come descritto precedentemente. Per stabilire se la perdita di funzione di BTG2 è di per sé in grado di conferire alle cellule un fenotipo di alto grado, produrranno un vettore retrovirale che coesprime PDGF-B e un micro RNA artificiale diretto contro BTG2. Questo vettore sarà usato per valutare se il silenziamento di BTG2 influenza la frequenza e il tempo di comparsa di tumori ad alto grado. L'analisi sarà eseguita iniettando un pool di 15 embrioni come descritto sopra

### *Track record*

Appolloni I.-Calzolari F.-Corte G.-Perris R.-Malatesta P.  
Six3 controls the neural progenitor status in the murine CNS.  
Cereb. Cortex. 18(3):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(12):1373/1382, 2008

Malatesta P.-Appolloni I.-Calzolari F.  
Radial glia and neural stem cells.  
Cell Tissue Res. 331(1):165/178, 2008

Pinto L.-Mader MT.-Irmeler M.-Gentilini M.-Santoni F.-Drechsel D.-Blum R.-Stahl R.-Bulfone A.-Malatesta P.-Beckers J.-Götz M.  
Prospective isolation of functionally distinct radial glial subtypes--lineage and transcriptome analysis.  
Mol. Cell. Neurosci. 38(1):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 124(10):2251/2259, 2009

Gangemi.-R.M.-F. Griffero.-D. Marubbi.-M. Perera.-M.C. Capra.-P. Malatesta.-G.L. Ravetti.-G.L. Zona.-A. Daga.-Corte G.  
SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity.  
Stem Cells 27(1):40/48, 2009

**Knock-out nel topo delle sequenze regolatorie site al 3'UTR del gene Pitx2, un essenziale regolatore della proliferazione cellulare**

*Linea di ricerca:* 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

*Programma:* c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Paola Briata

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Roberto Gherzi

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* Pitx2; microRNA; AU-rich element binding proteins

*Altri Enti coinvolti:* Alexander Fleming Biomedical Reserch Center, Vari, Grecia (D. Kontoyiannis, A. Kotsoni); University of California, San Diego, CA, USA (M.G. Rosenfeld, M. Trabucchi)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva ai fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Istituto Superiore di Sanità

### *Background*

Il gene che codifica per Pitx2, proteina con omeodominio della classe di bicoid, è mutato in pazienti affetti dalla sindrome di Axenfeld-Rieger (ARS) che si manifesta con alterazioni di cuore, denti, camera anteriore dell'occhio, ombelico e dismorfismi faciali (Lin CR et al, Nature 1999). Anche se il fenotipo del topo knock-out per Pitx2 ricapitola

## Programmazione 2009-2011

solo in parte le anomalie della ARS, l'analisi di tali topi ha dimostrato il ruolo essenziale di Pitx2 nello sviluppo cranio-faciale, del cuore, dell'occhio, dell'ipofisi e del polmone (Lin CR et al, Nature 1999). Pitx2 si è dimostrato essenziale nel controllare la proliferazione di specifici lineage cellulari (Lin CR et al, Nature 1999 - Kiousi C et al, Cell 2002). Abbiamo dimostrato che Pitx2, oltre ad attivare la trascrizione di geni che regolano la proliferazione (es. ciclina D1, D2), causa stabilizzazione degli mRNA degli stessi geni a seguito di attivazione della via di segnalazione che fa capo a Wnt (Kiousi C et al, Cell 2002 - Briata P et al, Mol Cell. 2003). Inoltre l'mRNA di Pitx2 viene stabilizzato da Wnt tramite sequenze ricche in AU (ARE) site nel tratto 3' non-tradotto (3'UTR) (Briata P et al, Mol Cell. 2003). Abbiamo anche dimostrato che Pitx2 è necessario per la stabilizzazione del suo stesso RNA e di quelli che codificano per le cicline D1 e D2 (Briata P et al, Mol Cell. 2003). Tale effetto è ottenuto, in parte, tramite la modulazione della funzione della ARE-binding protein (ARE-BP) HuR. Inoltre, abbiamo dimostrato che Pitx2 ed HuR appartengono allo stesso complesso (Briata P et al, Mol Cell. 2003 - Gherzi R et al, submitted).

E' stato dimostrato con sicurezza negli ultimi anni che il controllo della degradazione dell'mRNA in risposta a stimoli originati dalla attivazione di distinte vie di segnalazione cellulare cambia in modo rilevante l'espressione genica (Hao S et al, Nat Immunol 2009). Le ARE localizzate nel 3'UTR di molti trascritti a breve emivita promuovono la deadenilazione, il decapping e la degradazione di tali trascritti mentre le ARE-BP costituiscono i fattori agenti in trans responsabili della modulazione della velocità di degradazione degli stessi trascritti (Garneau NL et al, Nat Rev Mol Cell Biol 2007).

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA non codificanti che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Vengono sintetizzati a partire da precursori di dimensioni maggiori in seguito all'intervento sequenziale dei complessi multiproteici comprendenti gli enzimi Drosha e Dicer. I miRNA controllano molti aspetti della biologia delle cellule quali lo sviluppo embrionale, il differenziamento, la proliferazione, la morte e il metabolismo cellulare e sono stati implicati in gravi patologie quali il cancro (Visone R et al, Am J Pathol 2009). I miRNA esercitano principalmente una regolazione negativa sull'espressione dei geni bersaglio e sono stati negli ultimi anni oggetto di intenso studio. Approcci bioinformatici e sperimentali indicano che un singolo miRNA può avere numerose decine di geni bersaglio, fino ad alcune centinaia. Quindi, numerose condizioni fisiopatologiche possono essere controllate dai miRNA. Alcuni miRNA possono regolare fasi cruciali dello sviluppo tramite la repressione di un singolo gene bersaglio mentre la maggioranza dei miRNA esercita i propri effetti tramite la riduzione dell'espressione di un gran numero di geni bersaglio che, nel loro complesso, producono modificazioni di un determinato fenotipo cellulare. I miRNA selezionano i loro geni bersaglio nell'ambito di un complesso multiproteico, il RISC (Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). Il bersaglio di un determinato miRNA viene selezionato in base alla complementarità più o meno perfetta tra la sua sequenza e quella del miRNA. I siti di legame per i miRNA sono di solito situati nel 3'UTR dell'mRNA anche se possono essere presenti anche al 5'UTR o nella regione codificante (Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008).

E' stato recentemente dimostrato che alcune ARE-BP, interagendo con le loro sequenze target (le ARE), svolgono un ruolo importante anche nella regolazione dell'interazione tra miRNA e geni bersaglio. Tra queste ARE-BP ricordiamo HuR e TTP (Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008).

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

Il progetto avrà due principali obiettivi:

- Obiettivo 1. Studiare, in un modello animale, il contributo del 3'UTR e delle ARE-BP che vi si legano al controllo dell'espressione di Pitx2 e, come conseguenza, alla sua funzione.

Allo scopo di studiare la rilevanza biologica delle ARE situate nel 3'UTR di Pitx2, abbiamo già realizzato in laboratorio il knock-out del 3'UTR nel topo. Esperimenti pilota di "in vitro degradation" realizzati usando mutanti per delezione del 3'UTR di Pitx2 hanno permesso di concludere che la gran parte dei 461 nt di cui il 3'UTR consta (una sequenza ricca di U che noi abbiamo dimostrato essere responsabile della breve emivita dell'mRNA di Pitx2) è in grado di conferire instabilità al trascritto. Quindi, abbiamo disegnato una strategia per ottenere la delezione di questa regione nelle cellule staminali di topo. Abbiamo ottenuto topi eterozigoti privi del 3'UTR di Pitx2 (Pitx2Delta3'/+) e, allo scopo di ottenere topi omozigoti per tale delezione, abbiamo incrociato tra loro i topi eterozigoti Pitx2Delta3'/+. Su un totale di 47 topi appartenenti a 5 nidiate, abbiamo trovato 29,7% wild-type (WT) e 70,3% eterozigoti. Quindi, abbiamo potuto concludere che la delezione del 3'UTR di Pitx2 in entrambi gli alleli è letale nel corso dello sviluppo.

- Obiettivo 2: verificare la possibilità che il 3'UTR di Pitx2 sia bersaglio di miRNA e identificare i miRNA responsabili del controllo della sua espressione.

Un'analisi bioinformatica ha rivelato la presenza, nel 3'UTR di Pitx2, di siti di legame per miRNA quali miR-140, miR-876-3p, miR-21, miR-141 e miR-181.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Il progetto che proponiamo rappresenta la logica prosecuzione di un progetto iniziato nel 2004 e volto ad indagare il ruolo funzionale di Pitx2, un regolatore essenziale della proliferazione cellulare, e il controllo della sua espressione.

L'espressione del gene Pitx2 è finemente regolata nel corso dello sviluppo embrionale normale. Abbiamo dimostrato in linee cellulari in coltura che il 3'UTR di Pitx2 fornisce un contributo molto significativo al controllo dell'espressione del gene. Tuttavia, gli studi nelle linee cellulari non sono stati in grado di fornire informazioni sui fattori (miRNA e proteine) che controllano l'espressione e la funzione di Pitx2 agendo sul suo 3'UTR e, di conseguenza, nemmeno sui segnali che modificano la funzionalità di tali fattori nel corso dello sviluppo embrionale e del differenziamento cellulare. Abbiamo, quindi, ideato un modello animale allo scopo di dare una risposta alle questioni aperte e siamo stati ispirati, in fase progettuale, dal lavoro del gruppo guidato dal Dr. D. Kontoyannis (un collaboratore esterno a questo progetto). In un lavoro pubblicato sulla rivista Immunity, Kontoyannis e colleghi hanno descritto gli effetti del knock-out di una regione al 3' UTR di TNF e hanno dimostrato con successo l'importanza biologica dei meccanismi dipendenti dal 3'UTR nella regolazione dell'espressione di TNF nel corso della risposta immunitaria fisiologica e patologica.

Lo studio che proponiamo ci permetterà di definire il contributo della regolazione post-trascrizionale nel controllo dell'espressione del gene Pitx2 nel tempo e nello spazio. Soprattutto, il nostro progetto ci permetterà di identificare e analizzare contemporaneamente la funzione di ARE-BP e di miRNA che hanno Pitx2 come bersaglio comune. Tenendo

## Programmazione 2009-2011

conto della caratteristica dei miRNA di controllare simultaneamente l'espressione di molti trascritti bersaglio, saremo anche in grado di identificare e caratterizzare nuove vie di regolazione nell'ambito delle quali Pitx2 esercita una funzione di controllo. In conclusione, il nostro progetto ci consentirà di: 1) scoprire circuiti genici che controllano la velocità di degradazione e di traduzione dell'mRNA di Pitx2; 2) sviluppare nuovi strumenti (modelli animali e tecnologie) che permetteranno alla comunità scientifica di studiare il potenziale terapeutico di farmaci basati sulle conoscenze e le tecnologie relative all'RNA.

### *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

- Allo scopo di individuare lo stadio di sviluppo durante il quale gli embrioni omozigoti per l'allele Pitx2Delta3' muoiono, analizzeremo embrioni appartenenti a nidiate derivanti da incroci di topi eterozigoti per l'allele Pitx2Delta3' a differenti stadi di sviluppo (fra e8.5 ed e18.5) e realizzeremo una analisi statistica dettagliata. Una volta individuato lo stadio embrionale in cui si manifesta la letalità della mutazione, effettueremo l'analisi istologica degli embrioni mutanti e, in seguito, l'analisi immunostochimica utilizzando anticorpi diretti contro marcatori scelti ad hoc. Similmente, in collaborazione col laboratorio del Dr. D. Kontoyiannis, eseguiremo esperimenti di ibridizzazione in situ utilizzando sonde scelte ad hoc.

- Analizzeremo negli embrioni omozigoti ed eterozigoti l'espressione sia del trascritto wild-type sia del trascritto deletato di Pitx2. La nostra ipotesi prevede che la delezione del 3'UTR di Pitx2 provochi un cospicuo cambiamento della stabilità dell'RNA messaggero stesso e, conseguentemente, un cambiamento dei livelli della proteina.

- Verranno purificate mediante cromatografia di affinità (legame alla sequenza biotinilata del 3'UTR di Pitx2) le proteine che interagiscono con il 3'UTR di Pitx2. Dopo purificazione, tali proteine verranno identificate mediante spettrometria di massa (effettuata presso la UCSD in collaborazione col laboratorio del Dr. M.G. Rosenfeld).

- Allo scopo di verificare l'importanza dei miRNA nella regolazione dell'espressione di Pitx2, il 3'UTR di Pitx2 verrà clonato in un vettore reporter comprendente il gene Luciferasi (basato su pGL3, Promega) e transfettato in cellule HEK293 in cui l'espressione dell'enzima Dicer può venire transientemente ridotta in seguito al trattamento delle cellule con Doxyciclina (linea 2b2). La nostra ipotesi prevede che il knock-down di Dicer, riducendo i livelli di miRNA maturi, modifichi anche l'espressione del plasmide reporter. Se la nostra ipotesi si dimostrerà corretta, i miRNA identificati nell'analisi bioinformatica come potenziali regolatori dell'espressione di Pitx2 verranno sintetizzati e transfettati assieme al plasmide reporter (vedi sopra) in cellule HEK293 e HeLa. Verranno così misurati gli effetti dei miRNA transfettati sul reporter contenente il 3'UTR di Pitx2. Nel caso che l'analisi bioinformatica non venga confermata dagli esperimenti descritti e, allo scopo di completare l'identificazione di miRNA che interagiscono col 3'UTR di Pitx2, adotteremo una strategia basata sulla purificazione per affinità di miRNA che interagiscono con il 3'UTR di Pitx2 biotinilato. I miRNA interagenti col 3'UTR di Pitx2 verranno identificati mediante RNA deep sequencing (in collaborazione con il Dr. M.G. Rosenfeld).

Risultati attesi nel primo anno.

Nel corso del primo anno della ricerca verrà eseguita l'analisi sistematica degli embrioni derivati da incroci Pitx2Delta3'/+ x Pitx2Delta3'/+ allo scopo di individuare con precisione l'età gestazionale a cui avviene la morte in utero. Gli embrioni (omozigoti, eterozigoti e wild-type) verranno dissezionati, verrà effettuata una analisi istopatologica e i tessuti con rilevanza patologica verranno sottoposti ad analisi immunostochimica e ad ibridizzazione in situ (in collaborazione col laboratorio del Dr. Kontoyiannis). Sempre nei primi dodici mesi del progetto verrà definita la rilevanza funzionale dei miRNA individuati in silico nella regolazione di Pitx2. Verranno messe a punto le tecniche ed effettuati gli esperimenti nella linea cellulare 2b2 (derivativa di HEK293) in cui l'espressione di Dicer può essere abrogata mediante trattamento con Doxyciclina.

### *Track record*

Gherzi R.-Trabucchi M.-Ponassi M.-Ruggiero T.-Corte G.-Moroni C.-Chen C.-Y.-Khabar K.S.-Andersen J.S.-Briata P.  
The RNA-binding protein KSRP promotes decay of beta-catenin mRNA and is inactivated by PI3K-AKT signaling.  
PLoS Biol. 5:e5, 2006

Ruggiero T.-Trabucchi M.-Ponassi M.-Corte G.-Chen C.-Y.-Al-Haj L.-Khabar K.S.-Briata P.-Gherzi R.  
Identification of a set of KSRP target transcripts upregulated by PI3K-AKT signaling.  
BMC Mol. Biol. 8:28, 2007

Nechama M.-Ben-Dov I.Z.-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

Díaz-Moreno I.-Hollingworth D.-Frenkiel T.A.-Kelly G.-Martin S.-Howell S.-García-Mayoral M.-Gherzi R.-Briata P.-Ramos, A.  
Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding.  
Nat. Struct. Mol. Biol. 16: 238/246, 2009

Ruggiero T.-Trabucchi, M.-De Santa F.-Zupo S.-Harfe B.D.-McManus M.T.-Rosenfeld M.G.-Briata P.-Gherzi, R.  
LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages.  
FASEB J. Epub May 7, 2009

Trabucchi M.-Briata P.-García-Mayoral M.-Haase A.D.-Filipowicz, W.-Ramos A.-Gherzi, R.-Rosenfeld M.G.  
The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs.  
Nature 459: 1010/1014, 2009

# Programmazione 2009-2011

## Regolazione in cellule di mammifero della maturazione selettiva di un gruppo di microRNA da parte dell'RNA binding protein KSRP

*Linea di ricerca:* 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

*Programma:* c - Basi genetiche e molecolari della trasformazione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Roberto Gherzi

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Paola Briata

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* microRNA; proliferazione cellulare; topi knock-out

*Altri Enti coinvolti:* University of Alabama, Birmingham, AL, USA (Wei-Jye Lin, C.-Y. Chen); University of California, San Diego, CA, USA (M.G. Rosenfeld, M. Trabucchi); National Institute for Medical Research, London, UK (A. Ramos, D. Hollingworth)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva ai fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

### *Background*

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNA non codificanti che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale e sono stati oggetto, negli ultimi anni, di intenso studio (Bartel DP, Cell 2009). Vengono sintetizzati a partire da precursori di dimensioni maggiori in seguito all'intervento sequenziale dei complessi multiproteici comprendenti gli enzimi Drosha e Dicer (Bartel DP, Cell 2009 - Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). I miRNA controllano molti aspetti della biologia delle cellule quali lo sviluppo embrionale, il differenziamento, la proliferazione, la morte e il metabolismo cellulare (Bartel DP, Cell 2009 - Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). Approcci bioinformatici e sperimentali indicano che un singolo miRNA può avere numerose decine di geni bersaglio, fino ad alcune centinaia (Bartel DP, Cell 2009). E' comprensibile, quindi, che sia stato dimostrato che numerose condizioni fisiopatologiche possono essere controllate dai miRNA (Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). Alcuni miRNA possono regolare processi cellulari tramite la repressione di un singolo gene bersaglio mentre la maggioranza di essi esercita i propri effetti tramite la riduzione dell'espressione di un gran numero di geni bersaglio che, nel loro complesso, producono modificazioni di un determinato fenotipo cellulare. I miRNA selezionano i loro geni bersaglio nell'ambito di un complesso multiproteico, il RISC (Bartel DP, Cell 2009 - Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). Il bersaglio di un determinato miRNA viene selezionato in base alla complementarità più o meno perfetta tra la sequenza del miRNA e quella dei messaggeri (Bartel DP, Cell 2009 - Filipowicz W et al, Nat Rev Genet 2008). Salvo poche eccezioni, i siti di legame per i miRNA sono di solito situati nel 3'UTR dell'mRNA bersaglio.

Considerata l'importanza dei miRNA nello sviluppo embrionale e nel differenziamento cellulare, non sorprende che alterazioni della loro espressione siano correlate alla insorgenza e alla progressione del cancro (Visone R et al, Am J Pathol 2009). Studi comparsi negli ultimi due-tre anni hanno dimostrato che fluttuazioni nella espressione e, quindi, nella funzione dei miRNA, in seguito a specifiche condizioni ambientali, possono ascrivere, oltreché al meglio caratterizzato livello di controllo trascrizionale, anche a modificazioni della maturazione di singoli o gruppi di miRNA (Winter J et al, Nat Cell Biol 2009). In particolare, è stato dimostrato come blocchi o rallentamenti del processo maturativo possano portare a riduzione dell'espressione di miRNA e, conseguentemente, all'instaurarsi di condizioni patologiche quali il cancro (Thomson JM et al, Genes Dev 2006 - Reinke CA et al, Dev Cell 2008).

I miRNA vengono trascritti come precursori lunghi centinaia di nucleotidi (pri(mary)-miRNA) e la loro maturazione inizia, cotrascrizionalmente, ad opera di un complesso multiproteico comprendente, tra le altre, la endoribonucleasi Drosha e la proteina che lega RNA a doppio filamento DGCR8. Si formano pre(cursor)-miRNA che vengono trasportati attivamente nel citoplasma dove sono integrati in un altro complesso multiproteico comprendente, tra le altre, la endoribonucleasi Dicer e la proteina che lega RNA a doppio filamento TRBP. Si formano, così, miRNA "maturi" che vengono integrati nel complesso RISC nel cui ambito vanno a bersagliare specifici mRNA (van den Berg A et al, Biochim Biophys Acta 2008).

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

Il progetto avrà dunque due obiettivi strettamente correlati ma abbastanza indipendenti tra loro da impedire che il rallentamento o fallimento di uno dei due rallenti o impedisca la riuscita dell'altro.

Obiettivo 1. Studiare la regolazione della maturazione di una popolazione di precursori di miRNA in risposta ad attivazione di vie di segnalazione cellulare che influenzano la funzione di KSRP (il progetto verrà svolto in collaborazione con M. Trabucchi e M.G. Rosenfeld, UCSD, San Diego, CA).

Nostre osservazioni precedenti (Briata P et al, Mol Cell 2005 - Gherzi R et al, PLoS Biol 2006) indicano come la capacità di KSRP di favorire la degradazione di alcuni mRNA inerentemente labili venga regolata dalla sua fosforilazione in distinti residui. Per esempio, la fosforilazione in Thr 692 da parte di MAPK p38, che avviene nelle prime fasi del differenziamento di mioblasti C2C12, inibisce la capacità di KSRP di interagire ad alta affinità con mRNA codificanti per fattori miogenici, aumentando, di conseguenza, l'espressione di quest'ultimi e favorendo il differenziamento dei mioblasti in miotubi (Briata P et al., Mol Cell 2005). La fosforilazione di KSRP in Ser 193 da parte

## Programmazione 2009-2011

di AKT produce uno "svolgimento" strutturale del primo dominio KH (in cui è situata la Ser 193), crea un sito di legame per la proteina multifunzionale 14-3-3zeta e modifica sia la localizzazione subcellulare di KSRP sia la sua capacità di interagire con il complesso multiproteico exosoma che è responsabile della degradazione 3'>5' di mRNA (Gherzi R et al, PLoS Biol 2006 - Díaz-Moreno I et al, Mol. Biol 2009 - Chen CY et al, Cell 2001). A ciò consegue una stabilizzazione del trascritto codificante per beta-catenina ed un accumulo di questa proteina nel nucleo delle cellule (Gherzi R et al, PLoS Biol 2006).

Nostri dati non pubblicati indicano che KSRP viene fosforilata anche da altre proteine cinasi (MAPK JNK, AMPK, GSK3beta, ad esempio) in altri domini funzionali.

Alla luce della nostra recente osservazione che KSRP regola la maturazione di una popolazione di precursori di miRNA (Trabucchi M et al, Nature 2009 - Ruggiero T et al, FASEB J 2009), analizzeremo in dettaglio i rapporti tra modificazioni post-traduzionali di KSRP e cambiamenti della maturazione di specifici miRNA indotta da attivazione di vie di segnalazione cellulari.

Obiettivo 2. Analisi del fenotipo di topi *Ksrp*<sup>-/-</sup> (in collaborazione con Wei-Jye Lin e C.Y. Chen, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA).

Topi in cui entrambi gli alleli del gene *Ksrp* sono stati deleti in seguito a ricombinazione omologa sono stati generati in collaborazione col laboratorio di Ching-Yi Chen (UAB) e sono da pochi mesi disponibili. Un'analisi preliminare condotta su fibroblasti derivati da embrioni (MEF) ha dimostrato una maggiore proliferazione cellulare nei MEF derivati da animali *Ksrp*<sup>-/-</sup> rispetto ai controlli wild-type. Tale fenotipo è perfettamente in linea con la funzione di KSRP di favorire la maturazione di *let-7a* di cui è stato ampiamente descritto un ruolo anti-proliferativo (Büssing I et al, Trends Mol Med 2008) e che, in esperimenti preliminari è stata osservata. Inoltre, dati estremamente preliminari (data la giovane età della colonia) suggeriscono una tendenza a sviluppare cancro gastrico da parte dei topi *Ksrp*<sup>-/-</sup>.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Fino a poco più di un anno fa la regolata maturazione non veniva considerata rilevante nell'ambito del controllo dell'espressione dei miRNA. Quindi, la funzione dei miRNA sembrava dipendesse soltanto dal controllo della trascrizione dei pri-miRNA e dall'efficienza di targeting delle forme mature. D'altra parte, nel suo complesso, la regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica è giunta all'attenzione della comunità scientifica solo da una decina d'anni. Negli scorsi due anni alcuni laboratori pionieri hanno dimostrato che il controllo della maturazione dei precursori dei miRNA è uno step essenziale nel controllo della loro espressione e della loro funzione. E' un concetto emergente che la maturazione sregolata di alcuni miRNA può portare, in ultima analisi, a trasformazione cellulare. Il nostro e alcuni altri laboratori hanno proposto un nuovo modello di studio basato sulla ipotesi che, come nel caso della regolazione trascrizionale, esista un interscambio di complessi multiproteici comprendenti o co-attivatori o co-repressori della maturazione dei miRNA e che la prevalenza degli uni sugli altri determini, come risultato finale, i livelli di miRNA maturi.

Ci risulta che lo studio che qui proponiamo sia il primo ad indagare il meccanismo con cui segnali cellulari di vario tipo possano influenzare la composizione dei complessi maturativi per varie "popolazioni" di miRNA. Per quanto riguarda il topo knock-out per KSRP, esso rappresenta il primo modello animale disponibile in cui si possano indagare gli effetti della mancata espressione di un regolatore della maturazione dei miRNA.

### *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

Per quanto concerne l'obiettivo 1, intendiamo procedere come descritto di seguito.

Useremo come modello di studio, tra i miRNA regolati da KSRP, il controllo della maturazione di pri-*let-7a-1* (come paradigma di miRNA implicati nel controllo della proliferazione cellulare) e pri-miR-155 (esempio di miRNA che svolge una funzione specializzata nel contesto di un ben definito tipo cellulare, i macrofagi):

1.1 Maturazione di pri-*let-7a-1*. Cellule HEK293 verranno transfettate transientemente con vettori di espressione codificanti per forme costitutivamente attive di proteine cinasi coinvolte in alcune delle principali vie di segnalazione (MKK3 e MKK6, JNKK, ASK1, AKT1/2) e, in parallelo, verrà effettuato knock-down di JNK1/2, p38, ERK1/2, AKT1/2. In primo luogo verrà determinato sperimentalmente (saggi di cinasi in vitro o uso di anticorpi fosfo-specifici) il grado di attivazione o di spegnimento di ogni singola via di segnalazione. Sarà, quindi, valutata l'efficienza di maturazione di pri-*let-7a-1*. Sulla base dei risultati di questi esperimenti, nel caso in cui l'attivazione forzata di una via di segnalazione modifichi la maturazione di pri-*let-7a-1*, le cellule verranno co-transfettate con il vettore di espressione per la cinasi in causa e, a seconda del risultato ottenuto, verrà effettuata overespressione di KSRP (nel caso si sia osservato un arresto maturativo) o silenziamento di KSRP (nel caso si sia osservato un incremento della maturazione di pri-*let-7a-1*). Entrambe le strategie sono mirate a superare l'azione (inibitoria o attivatoria) della fosforilazione sulla funzione di KSRP. Se verrà individuata una potenziale pathway di controllo della maturazione di pri-*let-7a-1* che includa KSRP, verranno effettuati esperimenti di fosforilazione in vitro utilizzando sia enzimi sia KSRP ricombinanti purificati. Eventuali siti di fosforilazione in KSRP verranno mappati mediante spettrometria di massa (Gherzi R et al, PLoS Biol 2006 – parte di una collaborazione col laboratorio di Jens Andersen, Copenhagen).

1.2 Maturazione di pri-miR-155. Abbiamo dimostrato che, in macrofagi murini, LPS induce la maturazione di pri-miR-155 in maniera dipendente da KSRP (12). Poiché LPS attiva numerose vie di segnalazione (15), il nostro obiettivo sarà identificare quale(i) di queste vie regola la maturazione di pri-miR-155 in maniera KSRP-dipendente. A tale scopo, useremo sia inibitori farmacologici sia knock-down tramite siRNA di specifiche vie di segnalazione. Con tali modalità verrà inibita la segnalazione che procede tramite MAPK JNK, p38, ERK1/2, e NFkB. In primo luogo verrà determinato sperimentalmente (saggi di cinasi in vitro, uso di anticorpi fosfo-specifici, "reporter assays" nel caso della segnalazione di NFkB) il grado di attivazione o di spegnimento di ogni singola via di segnalazione. Una volta identificata la via (o le vie) di segnalazione responsabile(i) del controllo della maturazione di pri-miR-155 indotta da LPS, verranno condotti esperimenti per valutare il coinvolgimento di KSRP (e, se necessario, i siti di fosforilazione di KSRP) analogamente a quanto descritto al punto 1.1.

# Programmazione 2009-2011

Per quanto concerne l'obiettivo 2, procederemo come descritto di seguito.

2.1 MEF verranno derivati da topi wild-type e da topi Ksrp-/- appartenenti alla stessa nidiata e sarà analizzata simultaneamente (mediante microarray) l'espressione di miRNA e di geni coinvolti nella proliferazione cellulare. Sulla base dei risultati ottenuti, verranno effettuati esperimenti di "gain of function" o "loss of function" allo scopo di definire il ruolo di KSRP e dei suoi bersagli molecolari nel controllo della proliferazione dei MEF.

2.2 Nel corso dei mesi verrà analizzata la colonia di topi Ksrp-/- allo scopo di effettuare una analisi statistica relativa all'incidenza di cancro gastrico (ed, eventualmente, di altre neoplasie). I cancri gastrici, e le eventuali nuove patologie, verranno sottoposte ad analisi istologica ed immunohistochimica. Contemporaneamente verrà analizzata l'espressione di miRNA (mediante microarray) nella parete gastrica di topi wild-type e di topi Ksrp-/- appartenenti alla stessa nidiata. Sulla base dei risultati ottenuti si analizzerà il ruolo di KSRP nel controllo della maturazione di miRNA la cui espressione risulti ridotta negli animali Ksrp-/- . Verrà misurata nei tessuti patologici l'espressione dei miRNA differenzialmente espressi nella lesione rispetto alla contigua area sana.

Risultati attesi nel corso del primo anno.

Per l'obiettivo 1, ci proponiamo di mettere a punto le transfezioni nei due sistemi cellulari che abbiamo scelto; verrà analizzata l'efficienza delle protein cinasi transfettate e del silenziamento o inibizione farmacologica degli stessi enzimi. Otterremo dati sulla funzione di MAPK p38 e AKT di regolare la maturazione di pri-let-7a-1.

Per l'obiettivo 2, la colonia di topi Ksrp-/- verrà analizzata nel tempo per individuare neoplasie gastriche (e in altre sedi). Verranno isolati MEF da topi wild-type e Ksrp-/- appartenenti alla stessa nidiata, mantenuti in coltura e il loro RNA analizzato mediante microarray per individuare i miRNA differenzialmente espressi che verranno successivamente validati.

## *Track record*

Gherzi R.-Trabucchi M.-Ponassi M.-Ruggiero T.-Corte G.-Moroni C.-Chen C.-Y.-Khabar K.S.-Andersen J.S.-Briata, P. The RNA-Binding Protein KSRP Promotes Decay of beta-Catenin mRNA and Is Inactivated by PI3K-AKT Signaling. PLoS Biol. 5:e5, 2006

Bevilacqua A.-Ghisolfi L.-Franzi S.-Maresca G.-Gherzi R.-Capaccioli S.-Nicolin A.-Canti G. Stabilization of cellular mRNAs and up-regulation of proteins by oligoribonucleotides homologous to the Bcl2 adenine-uridine rich element motif. Mol. Pharmacol. 71:531/538, 2007

Garcia Mayoral M.F.-Hollingworth D.-Masino L.-Diaz-Moreno I.-Kelly G.-Gherzi R.-Chou C.F.-Chen C.Y.-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

Ruggiero T.-Trabucchi M.-Ponassi M.-Corte G.-Chen C.-Y.-Al-Haj L.-Khabar K.S.-Briata P.-Gherzi R. Identification of a set of KSRP target transcripts upregulated by PI3K-AKT signaling. BMC Mol Biol. 8:28, 2007

Nechama M.-Ben-Dov I.Z.-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.A.-Kelly G.-Martin S.-Howell S.-García-Mayoral M.-Gherzi R.-Briata P.-Ramos A. Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding. Nat. Struct. Mol. Biol. 16: 238/246, 2009

Ruggiero T.-Trabucchi, M.-De Santa F.-Zupo S.-Harfe B.D.-McManus M.T.-Rosenfeld M.G.-Briata P.-Gherzi R. LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages. FASEB J. Epub May 7, 2009

Trabucchi M.-Briata P.-Garcia-Mayoral M.-Haase A.D.-Filipowicz, W.-Ramos A.-Gherzi R.-Rosenfeld M.G. The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. Nature 459:1010/1014, 2009

**Studio delle interazioni tra cellule staminali mesenchimali e cellule leucemiche B : un potenziale modello per identificare markers prognostici e molecole target per il trattamento delle leucemie**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Ospite-Tumore

*Programma:* a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Daniela de Toterò

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Giorgio Corte, Arrigo Massa

# Programmazione 2009-2011

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* interazioni midollo osseo/leucemia; fattori di crescita; fattori prognostici; cellule staminali tumorali; target terapeutici

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini); S.C. Oncologia Medica C (M. Ferrarini)

*Altri Enti coinvolti:* Laboratorio Cellule Staminali, DIMES/CBA, Università di Genova (R. Quarto); Laboratorio di Farmacologia, DIMES, Università di Genova (T. Florio); Divisione Ematologia e Trapianto Midollo Osseo, A.O.U. San Martino, Genova (A. Bacigalupo); Dip. Ematologia, A.O.U. San Martino, Genova (R. Ghio); Policlinico Umberto I, Roma (R. Foà)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* diagnostica

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute

## *Background*

Il microambiente midollare può avere un ruolo di primaria importanza nello sviluppo di leucemie e linfomi come il mieloma multiplo (MM), la leucemia linfatica cronica B (CLL) e la leucemia linfoblastica acuta (ALL). A livello del midollo osseo (BM) l'ematopoiesi è sostenuta da un particolare microambiente composto da cellule stromali e le interazioni tra cellule stromali e cellule ematopoietiche sono critiche per il mantenimento delle staminali ematopoietiche. Oltre a cellule di origine ematopoietica, nel midollo osseo sono presenti anche cellule di origine mesodermica, cellule staminali mesenchimali, che possono differenziarsi verso diversi tipi cellulari (osteoblasti, fibroblasti, condrociti, cellule del tessuto muscolare liscio, cellule endoteliali e reticolari) e fornire varie citochine e chemochine importanti per il differenziamento ematopoietico. Nella leucemia linfatica cronica B (CLL) il BM costituisce un'area importante per l'espansione del clone leucemico e si ritiene sia il sito di malattia minima residua. Questa osservazione suggerisce che le cellule B leucemiche possano accedere a nicchie del BM normalmente accessibili solo alle normali staminali ematopoietiche. Conoscenze relative agli effetti esercitati da cellule mesenchimali, indifferenziate o differenziate, sulle B leucemiche di CLL sono piuttosto limitate ed attualmente non si sa se una parte di cellule che risiede a livello del BM possa costituire un particolare ambiente permissivo nei confronti della sopravvivenza di cellule leucemiche B e nel mantenimento dei loro progenitori. Abbiamo precedentemente descritto che IL-15, prodotta dalle cellule stromali del midollo osseo, induce proliferazione delle cellule B di CLL attraverso la fosforilazione della via MAPK (de Toter et al, Blood 2008.). Le cellule stromali midollari possono produrre anche altri fattori che contribuiscono all'espansione e all'homing di cellule maligne B e tra questi SDF-1 (CXCL-12) potrebbe avere un ruolo chiave. Recentemente abbiamo osservato che cellule stromali midollari indifferenziate prolungano la sopravvivenza di CLL ma, dopo differenziamento, solo alcuni lineages mantengono questa capacità: osteoblasti e fibroblasti, ma non cellule endoteliali o condrociti, sono in grado di sostenere la sopravvivenza della leucemia. Dati recenti indicano che le B leucemiche da casi di CLL con prognosi infausta, caratterizzati da positività per ZAP-70, CD38 e regione variabile della catena pesante delle immunoglobuline (IgVH) non mutata, mostrano aumentata espressione di geni che codificano per molecole di adesione o legate alla migrazione cellulare, suggerendo che il dialogo tra il microambiente e le B neoplastiche in CLL è di fondamentale importanza nella progressione della malattia. Un nuovo fattore che è stato di recente proposto come fattore prognostico di CLL, che correla con IgVH non mutate, è la lipasi lipoproteica (LPL), uno dei principali enzimi del metabolismo dei lipidi, secreta, insieme a leptina e adiponectina, dagli adipociti.

Un'analisi bioinformatica preliminare ed il confronto tra profili di espressione genica in diverse linee differenziate da mesenchima ci ha permesso di identificare 16 geni espressi a livelli significativamente più alti su quelle linee in grado di prolungare la sopravvivenza di CLL. Alcuni di questi geni codificano per fattori solubili e, verosimilmente, potrebbero essere coinvolti nella regolazione della espansione del clone leucemico a livello del midollo osseo. L'incremento della sopravvivenza delle B leucemiche in CLL, indotta dall'interazione con cellule del microambiente midollare, veniva infatti riscontrata anche senza il contatto diretto tra cellule e con solo l'aggiunta del mezzo di coltura ottenuto dai diversi tipi di linee mesenchimali.

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

Il progetto si propone di definire i vari fattori che vengono selettivamente prodotti da cellule mesenchimali che sostengono la sopravvivenza del clone leucemico. Attualmente abbiamo dimostrato che CXCL-12 e HGF sono secreti preferenzialmente da quei tipi cellulari mesenchimali (osteoblasti e fibroblasti) capaci di sostenere la sopravvivenza delle B leucemiche e che, effettivamente, ne prolungano l'emivita dopo aggiunta della sola proteina ricombinante "in vitro" (de Toter et al., submitted). Abbiamo intenzione di studiare se altre linee di origine mesenchimale, come ad esempio gli adipociti, presenti in abbondanza nel midollo osseo, siano in grado di aumentare l'indice di sopravvivenza delle B leucemiche e quali fattori siano mediatori di questa attività.

Poiché la nicchia osteoblastica è una delle principali nicchie coinvolte nel mantenimento e differenziamento di cellule ematopoietiche, e noi abbiamo osservato che sia le cellule primarie trabecolari da midollo osseo che una linea osteoblasto-simile sostengono in modo significativo la sopravvivenza delle cellule leucemiche in coltura anche per tempi lunghi, ci proponiamo di: i) determinare se la capacità di prolungare la sopravvivenza delle B leucemiche da parte del lineage osteogenico sia una proprietà intrinseca di questo lineage mesenchimale e venga mantenuta durante i differenti stadi di maturazione; ii) stabilire un modello "in vitro" basato su interazione CLL/microambiente midollare per determinare l'indice di sopravvivenza in un esteso numero di pazienti e potenzialmente identificare, tramite analisi con microarray, molecole con valore prognostico; iii) identificare in co-culture a lungo termine tra CLL/BMSC una sottopopolazione capace di perpetuare il clone leucemico (cancer stem cells) e caratterizzarla fenotipicamente e funzionalmente; iv) identificare pathways di signaling innescati dai fattori solubili principalmente coinvolti

## Programmazione 2009-2011

nell'interazione CLL/BMSC che potranno essere utilizzati come target terapeutici; v) definire un modello sperimentale in vivo di CLL nel topo, basato sulla mimesi di un microambiente osteogenico umano.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

I seguenti punti potranno avere un impatto nella pratica assistenziale:

- 1) Stabilire quali cellule mesenchimali indifferenziate o differenziate presenti a livello del midollo osseo, ed i fattori solubili da queste prodotti, hanno un ruolo chiave per l'espansione ed il mantenimento del clone leucemico. I risultati ottenuti potranno essere utilizzati al fine di disegnare nuovi farmaci che interferiscano con il cross-talk tra microambiente del midollo osseo e leucemia.
- 2) La correlazione tra saggio di interazione tra CLL/microambiente, profili di espressione genica delle B leucemiche in un'ampia casistica e follow up dei pazienti potrà permettere l'identificazione di nuovi marcatori prognostici che potranno facilitare la stadiazione della malattia ed essere predittivi del decorso clinico.
- 3) La caratterizzazione fenotipica/funzionale di cellule leucemiche staminali potrà permettere di identificarne la presenza in vivo con potenziale valore predittivo dell'evoluzione della malattia.

### *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

Attualmente stiamo studiando i pathways di signaling innescati dalla proteina ricombinante HGF e abbiamo intenzione di studiare se inibitori di HGF, commercialmente disponibili, sono in grado di bloccare i segnali attivatori indotti da HGF sulle B leucemiche. Esperimenti preliminari indicano che HGF induce fosforilazione di STAT3: inibitori farmacologici di STAT verranno anche utilizzati in test funzionali per determinare se sono in grado di bloccare l'aumento della sopravvivenza indotto dall'interazione con cellule stromali di midollo, o con osteoblasti, o con fibroblasti.

Stiamo inoltre determinando se altre popolazioni di origine mesodermica, come per esempio gli adipociti, che sono piuttosto abbondanti a livello del midollo osseo nell'uomo adulto, siano in grado di sostenere la sopravvivenza delle cellule leucemiche B in CLL. L'attività indotta da parte di adipochine prodotte dagli adipociti (leptina, adiponectina, visfatina, resistina) verrà anche saggiata direttamente in colture "in vitro" delle B leucemiche. Inoltre cercheremo di valutare eventuali differenze nella capacità di sostenere la sopravvivenza di cellule leucemiche B tra diverse linee umane tutte del lineage osteogenico ma rappresentative di differenti stadi di maturazione.

Un approccio biologico di interazione tra cellule staminali mesenchimali e leucemia verrà inoltre stabilito e utilizzato come modello per riclassificare un numero ampio di casi di CLL in due o più sottogruppi sulla base dell'incremento percentuale di sopravvivenza dopo co-cultura "in vitro". Osservazioni preliminari, infatti, suggeriscono che esistano significative differenze nell'interazione con il microambiente tra B leucemiche provenienti da casi caratterizzati da marcatori con prognosi infausta rispetto a quelli con prognosi favorevole. Abbiamo quindi stabilito in via preliminare un approccio biologico e ci proponiamo di studiare un vasto numero di casi di CLL. I risultati ottenuti da questo modello di interazione CLL/microambiente verranno analizzati insieme ai dati prognostici di malattia e follow up dei pazienti, ed all'analisi di espressione genica con microarray per identificare nuovi potenziali marcatori di malignità legati alle caratteristiche di adesività e di migrazione verso il midollo proprie di queste B leucemiche. Cercheremo inoltre di caratterizzare fenotipicamente e funzionalmente la presenza di cellule staminali leucemiche capaci di perpetuare la malattia (cancer stem cells). Indicazioni recenti mostrano infatti la presenza di cellule staminali anche in CLL, oltre a quelle precedentemente identificate in AML o in MM. Tuttavia attualmente non si conoscono specifici marcatori caratteristici di queste cellule. La potenziale determinazione di questi marcatori sarebbe molto utile al fine di predire il decorso della malattia o eventuali ricadute dopo trattamento farmacologico. Ci proponiamo infine di mettere a punto un modello animale di leucemia linfatica cronica B in topi immunocompromessi utilizzando supporti in bioceramica caricati con cellule di midollo umano stromale e cellule B leucemiche.

Entro il primo anno ci attendiamo di stabilire nuove potenziali vie di signaling indotte da HGF in CLL come la fosforilazione del recettore tirosin chinasi MET, o fosforilazione di STAT5. Altre vie di signaling (ERK1/2, AKT, NFkB. JAK/STAT) saranno anche determinate in sistemi di co-cultura con cellule mesenchimali che sostengono la sopravvivenza del clone leucemico (fibroblasti, osteoblasti, adipociti). Inoltre determineremo la possibilità di inibire l'aumento della sopravvivenza indotta da BMSC sulle CLL con inibitori specifici per MET (SU11274) e per STAT3 (AG490). Studi sull'effetto degli adipociti sul prolungamento di sopravvivenza delle B leucemiche in CLL sono attualmente in corso sia utilizzando una linea murina di adipociti prodotta nel nostro laboratorio, sia cellule primarie umane differenziate "in vitro" e derivate da donatori sani. Esperimenti preliminari indicano che anche gli adipociti prolungano la sopravvivenza delle B leucemiche in CLL e pensiamo di stabilire entro l'anno i fattori capaci di mediare questo effetto. Determineremo inoltre se differenti linee, rappresentative di diversi stadi maturativi della linea osteogenica (MG63, HOS, SAOS), sono tutte capaci di sostenere la sopravvivenza delle CLL o agiscono in modo differenziale in dipendenza del loro stadio differenziativo. Riteniamo che questi studi nel loro insieme siano utili a chiarire i meccanismi di interazione tra cellule neoplastiche leucemiche e il microambiente circostante a livello del midollo osseo per identificare nuovi marker di prognosi della malattia e per fornire indicazioni atte a sviluppare nuove strategie terapeutiche.

### *Track record*

Baio G.-Fabbi M.-de Toterò D.-Ferrini S.-Cilli M.-Derchi L.-Neumaier C.

Magnetic Resonance Imaging at 1.5 T with immunospecific contrast agent in vitro and in vivo in a xenotransplant model.

MAGMA 19(6):313/320, 2006

De Toterò D.-Meazza R.-Ferrarini M.-Ferrini S.

Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells.

# Programmazione 2009-2011

Blood 107(9):3708/3715, 2006

Di Carlo E.-De Toter D.-Piazza T.-Fabbi M.-Ferrini S.  
Role of IL-21 in immune-regulation and tumor immunotherapy.  
Cancer Immunol. Immunother. 56(9): 1232/1334, 2007

de Toter D.-Meazza R.-Capaia M.-Fabbi M.-Azzarone B.-Balleari E.-Gobbi M.-Cutrona G.-Ferrarini 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(2):517/524, 2008

Baio G.-Fabbi M.-Salvi S.-de Toter D.-Truini M.-Ferrini S.-Neumaier C.  
Two step in vivo tumor targeting by biotin-conjugated antibodies and superparamagnetic nanoparticles assessed by magnetic resonance imaging at 1.5T.  
Mol. Imaging Biol. in press, 2009

## Cellule staminali di glioblastoma: analisi del ruolo di geni della staminalità

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

*Responsabile scientifico:* Giorgio Corte

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Antonio Daga, Maria Cristina Capra, Daniela Marubbi

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

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

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

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute; Compagnia di San Paolo

### Background

I gliomi rappresentano circa l'86% dei tumori cerebrali e sono clinicamente classificati in quattro stadi: il glioblastoma, o stadio IV, è il più aggressivo e il più comune dei gliomi. Il 90 % dei glioblastomi insorge dopo i 40 anni, con un picco d'incidenza fra la quinta e la settima decade di vita. Pur avendo un'incidenza relativamente bassa, il glioblastoma è responsabile del 4% di tutte le morti per tumore ogni anno. Nonostante il trattamento radio-chemioterapico, la maggior parte dei pazienti affetti da glioblastoma muore a circa un anno dalla diagnosi (sopravvivenza mediana di 14 mesi) e molto raramente si ha una sopravvivenza a lungo termine. Una delle ragioni della resistenza del glioblastoma alla terapia è la complessità del tumore stesso. E' un tumore altamente infiltrante e il carattere invasivo delle cellule tumorali fa pensare ad una riacquisizione da parte delle cellule neoplastiche delle capacità migratorie tipiche dei progenitori neurali durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale. Nonostante l'origine clonale del tumore, le cellule neoplastiche sono eterogenee, non solo istologicamente, ma anche per proliferazione, differenziamento e tumorigenicità. È stato dimostrato che non tutte le cellule tumorali sono in grado, se trapiantate in un opportuno animale da esperimento, di dare origine e mantenere una crescita tumorale. Per ottenere l'attecchimento di un tumore in vivo è necessario impiantare un elevato numero di cellule tumorali. Questa osservazione ha portato a formulare l'ipotesi dell'esistenza delle cellule tumorali staminali, o Tumor Initiating Cell (TICs), una sottopopolazione di cellule tumorali che mantiene le caratteristiche delle cellule staminali ed è in grado cioè di dividersi in modo asimmetrico, dando origine sia a nuove cellule staminali (self renewal) che ad una popolazione di cellule progenitrici in grado di dividersi velocemente per un breve periodo di tempo. Il cancro può essere quindi visto come un organo soprannumerario, nel quale persiste un'organizzazione gerarchica che deriva esclusivamente dalle cellule staminali. La popolazione staminale è in grado di dare origine ad un tumore se trapiantata in un animale immunodeficiente, mentre il resto delle cellule tumorali è differenziata, anche se in modo aberrante, ed incapace di iniziare la crescita tumorale in vivo. Negli ultimi anni sono state isolate e caratterizzate cellule staminali da diversi tumori liquidi e solidi. La presenza di TICs nel glioblastoma è stata dimostrata da diversi gruppi di ricerca, compreso il nostro. L'isolamento e la caratterizzazione di queste TICs è indispensabile sia per capire la progressione della malattia che per sviluppare o migliorare terapie antineoplastiche specifiche. Allo scopo di studiare le alterazioni responsabili del mantenimento della staminalità nelle cellule neoplastiche, negli anni precedenti, abbiamo isolato TICs, derivandole dal tessuto tumorale di pazienti affetti da glioblastoma. Le cellule primarie sono state coltivate in condizioni tali da mantenere inalterata la capacità differenziativa delle cellule tumorali. Abbiamo verificato che le cellule così isolate sono in grado di crescere per un periodo di tempo indefinito, sono parzialmente in grado di rispondere a stimoli differenziativi in vitro, sono in grado di sopravvivere anche in assenza di fattori di crescita e, se trapiantate in topi immunodeficienti, inducono la formazione di un tumore altamente infiltrante ed invasivo e che ha le caratteristiche istologiche del tumore originario.

## Programmazione 2009-2011

La maggior parte delle cellule di glioma esprime un fattore di trascrizione, SOX2, un gene che è normalmente espresso dalle cellule staminali somatiche di vari tessuti e dalle cellule staminali embrionali, ed è uno dei quattro geni che, se fatto esprimere nelle cellule somatiche differenziate, le converte in cellule staminali pluripotenti. Abbiamo in precedenza dimostrato che la maggior parte delle cellule di glioma proliferanti, KI67 positive, sono anche positive per SOX2. Inducendo differenziamento in vitro nelle cellule di glioma, l'espressione di SOX2 diminuisce e rimane sempre confinata nella frazione proliferante. Abbiamo quindi silenziato l'espressione di questo gene nelle TICs di glioma mediante l'espressione di un microRNA sintetico cocostronico con la GFP. In vitro, le cellule silenziate, verdi da GFP, proliferano meno rispetto al controllo portando ad una loro progressiva riduzione percentuale, fino alla scomparsa delle cellule silenziate. Allo stesso modo, se trapiantate ortotopicamente nel topo immunodeficiente, non sono in grado di formare un tumore, come se avessero perso la loro capacità di autorinnovamento. Quindi, nonostante tutte le mutazioni tumorigeniche accumulate dalle cellule di glioma, la loro capacità di formare tumori dipende dall'espressione di un gene normale, non mutato. Inoltre, silenziando SOX2 nelle cellule di glioblastoma si riduce l'espressione di altri fattori di trascrizione legati alla staminalità come OLIG2 e FOXG1.

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

Obiettivo generale del progetto è l'identificazione di geni espressi dalle TICs di glioblastoma che potranno essere target terapeutici per nuovi farmaci. Obiettivo secondario è la comprensione delle alterazioni molecolari responsabili dell'anomalo mantenimento delle caratteristiche di staminalità nelle cellule neoplastiche.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Il raggiungimento degli obiettivi permetterà di sviluppare una nuova terapia molecolare per questa patologia. La conferma della funzionalità in vivo nel modello animale di glioblastoma renderebbe il farmaco disponibile per la terapia della patologia umana.

### *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

In questo progetto intendiamo identificare i geni regolati da SOX2 allo scopo di individuare geni a valle, rilevanti per il mantenimento della tumorigenicità, che possano essere bersaglio di una terapia molecolare. Intendiamo anche analizzare il significato dell'espressione dei geni OLIG2 e FOXG1 nelle cellule di glioma e studiare gli effetti del loro silenziamento sulla proliferazione e sul mantenimento della tumorigenicità. A tale scopo saranno usati retrovirus codificanti per microRNA sintetici diretti contro tali geni. Come per SOX2, saranno analizzate le differenze del profilo trascrizionale fra le cellule di controllo e le cellule in cui è stato silenziato uno di questi fattori trascrizionali che si sia rivelato indispensabile per il mantenimento della tumorigenicità, con l'obiettivo di identificare, fra i geni da loro controllati, nuovi possibili target terapeutici.

Obiettivo del primo anno sarà identificare i geni a valle di SOX2 la cui espressione è indotta o repressa dal suo silenziamento nelle TICs di glioblastoma e analizzare l'effetto del silenziamento di OLIG2 e FOXG1.

1) Scopo di questo punto sarà definire molecularmente in quale modo SOX2 è essenziale per la proliferazione delle cellule di glioma, cioè identificare i meccanismi che permettono a SOX2 di controllare la divisione asimmetrica delle TICs di glioma e identificare quindi dei possibili target per nuovi approcci terapeutici. Abbiamo dimostrato che silenziando SOX2 nelle cellule di glioma si provoca una perdita di tumorigenicità e, in linea di principio, si può pensare ad una terapia con siRNA; per essere efficace sarebbe però indispensabile trasferire tutte le cellule tumorali. Riteniamo che sia invece possibile individuare, fra i geni regolati da SOX2, un candidato migliore che possa essere un target farmacologico per una terapia molecolare.

1.1) Sarà estratto RNA dalle cellule in cui è stato silenziato SOX2 e dalle cellule di controllo e analizzato il profilo di espressione genica mediante ibridazione di microarray Affymetix. Il livello di espressione dei geni rilevanti regolati da SOX2 sarà confermato mediante qRT-PCR e, quando possibile, mediante western blotting. Per i geni candidati sarà analizzato, sia in vitro che in vivo, il loro contributo funzionale alle proprietà staminali delle cellule di glioma con gli stessi metodi usati per SOX2.

1.2) Identificazione di almeno un gene, regolato da SOX2, che sia importante nel controllo della tumorigenicità delle cellule di glioma.

2) Analisi del contributo di OLIG2 e FOXG1 al mantenimento della staminalità delle TICs di glioma. Siccome l'espressione di questi due geni, essenziali per le cellule staminali neurali normali, è ridotta dal silenziamento di SOX2 nelle cellule di glioma, essi sono quindi dei buoni candidati come geni che possono mediare la crescita continua e la tumorigenicità. L'espressione dei due geni sarà silenziata, nelle TICs di glioma, mediante MicroRNA sintetici e sarà analizzato l'effetto in vitro e in vivo. In vitro sarà analizzato l'effetto sulla clonogenicità, proliferazione e differenziamento delle cellule silenziate. In vivo sarà analizzato l'effetto sulla tumorigenicità e sull'invasività dopo trapianto ortotopico in topi immunodeficienti.

Risultati attesi per il primo anno.

- Identificazione dei geni regolati da SOX2 nelle cellule di glioma. Validazione dei risultati mediante qRT-PCR.
- Costruzione e analisi funzionale di retrovirus per il silenziamento di FOXG1 e OLIG2. Verifica dell'efficacia su proliferazione e clonogenicità in vitro.

### *Track record*

Bajetto A.-Barbieri F.-Dorcaratto A.-Barbero S.-Daga A.-Porcile C.-Ravetti JL.-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(5):423/432, 2006

## Programmazione 2009-2011

De Haas T.-Oussoren E.-Grajkowska W.-Perek-Polnik M.-Popovic M.-Zdravec-Zaletel L.-Perera M.-Corte G.-Wirhth 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(2):176/186, 2006

Gangemi RM.-Daga A.-Muzio L.-Marubbi D.-Cocozza S.-Perera M.-Verardo S.-Bordo D.-Griffero F.-Capra MC.-Mallamaci A.-Corte G.  
Effects of Emx2 inactivation on the gene expression profile of neural precursors.  
Eur. J. Neurosci. 23(2):325/234, 2006

Daga A.-Orengo AM.-Gangemi RM.-Marubbi D.-Perera M.-Comes A.-Ferrini S.-Corte G.  
Glioma immunotherapy by IL-21 gene-modified cells or by recombinant IL-21 involves antibody responses.  
Int. J. Cancer. 121(8):1756/1763, 2007

Pastorino F.-Marimpietri D.-Brignole C.-Di Paolo D.-Pagnan G.-Daga A.-Piccardi F.-Cilli M.-Allen TM.-Ponzoni M.  
Ligand-targeted liposomal therapies of neuroblastoma.  
Curr. Med. Chem. 14(29):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(3):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(12):1373/1382, 2008

Pastorino F.-Di Paolo D.-Piccardi F.-Nico B.-Ribatti D.-Daga A.-Baio G.-Neumaier CE.-Brignole C.-Loi M.-Marimpietri D.-Pagnan G.-Cilli M.-Lepekkin EA.-Garde SV.-Longhi R.-Corti A.-Allen TM.-Wu JJ.-Ponzoni M.  
Enhanced antitumor efficacy of clinical-grade vasculature-targeted liposomal doxorubicin.  
Clin. Cancer Res. 14(22):7320/7329, 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 124(10):2251/2259, 2009

Castriconi R.-Daga A.-Dondero A.-Zona G.-Poliani PL.-Melotti A.-Griffero F.-Marubbi D.-Spaziante R.-Bellora F.-Moretta L.-Moretta A.-Corte G.-Bottino C.  
NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties.  
J. Immunol. 182(6):3530/3539, 2009

Gangemi RM.-Griffero F.-Marubbi D.-Perera M.-Capra MC.-Malatesta P.-Ravetti GL.-Zona GL.-Daga A.-Corte G.  
SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity.  
Stem Cells 27(1):40/48, 2009

Griffero F.-Daga A.-Marubbi D.-Capra MC.-Melotti A.-Pattarozzi A.-Gatti M.-Bajetto A.-Porcile C.-Barbieri F.-Favoni RE.-Lo Casto M.-Zona G.-Spaziante R.-Florio T.-Corte G.  
Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors.  
J. Biol. Chem. 284(11):7138/7148, 2009

Ropolo M.-Daga A.-Griffero F.-Foresta M.-Casartelli G.-Zunino A.-Poggi A.-Cappelli E.-Zona G.-Spaziante R.-Corte G.-Frosina G.  
Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures.  
Mol. Cancer Res. 7(3):383/392, 2009

**Disegno, sintesi e valutazione dell'efficacia di nanocarriers multifunzionali e atossici per il trasporto-distribuzione di molecole anti-PTK, fattori anti-angiogenetici e farmaci convenzionali, singoli o combinati, nel trattamento di modelli preclinici di mesotelioma pleurico maligno umano**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

*Responsabile scientifico:* Roberto E. Favoni

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Antonio Daga, Alice Melotti

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

# Programmazione 2009-2011

*Parole chiave:* mesotelioma pleurico; recettori PTK transmembrana; compounds anti-PTK e anti-angiogenetici; chemoterapici tradizionali; nanoparticelle drug-carriers.

*Altre strutture IST partecipanti:* S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi (M. Lo Casto); S.C. Nanobioteologie (C. Rosano); S.C. Genetica dei Tumori (M. Romani); Animal Facility (M. Cilli)

*Altri Enti coinvolti:* Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Genova (A. Spallarossa); Dip. Chimica Organica, Università di Messina (F.H. Kohnke); DOBIG, Università di Genova (T. Florio); DISCAFF/DFB Center, Università Piemonte Orientale A. Avogadro, Novara (G. Gaudino); Fondazione Maugeri, Pavia (L. Mutti)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* terapeutica/quality of life

*Soggetti cofinanziatori:* Astra-Zeneca; Eli-Lilly; Roche; Schering-Plough; Fondazione Maugeri

## *Background*

Il rapido sviluppo della biologia cellulare e molecolare ha prodotto una maggiore acquisizione dei principi fisiopatologici regolatori di varie malattie tra cui quelle neoplastiche. Inoltre, l'integrazione di nuove tecnologie con l'azione combinata di chimica e biologia ha scatenato la crescita esponenziale di nuove molecole mirate su bersagli preidentificati; l'armamentario terapeutico oggi disponibile spazia da farmaci a basso peso molecolare a macromolecole come proteine e plasmidi. Tuttavia, la complessità molecolare dei farmaci e la inaccessibilità di molti bersagli fisiologici pone, oltre al problema della specificità, quelli del trasporto e della loro distribuzione al sito d'azione a livelli terapeuticamente rilevanti classificando questi ostacoli tra i più seri e limitanti della chemioterapia. Pertanto, il "drug-targeting" sta evolvendo come il più auspicabile, ma di non facile realizzazione, goal nella disciplina della farmacodistribuzione. Affinare tale tecnica significa, potenzialmente, incrementare l'efficacia e ridurre la tossicità dei farmaci di corrente impiego clinico e di nuova generazione; alterandone la loro farmacocinetica e pilotandone la biodistribuzione se ne circoscrive l'azione devastante al tessuto maligno intaccando il minore numero possibile di cellule del tessuto sano. Nel presente progetto si pongono e, naturalmente, si limitano gli obiettivi alla preliminare determinazione della espressione/overespressione dei bersagli recettoriali ad azione tirosino-chinasica di fattori di crescita, cruciali nello sviluppo e crescita del mesotelioma pleurico maligno umano (hMPM), alla valutazione delle barriere biologiche e alla loro inibizione farmacologica, allo studio e affinazione di uno dei possibili approcci disegnati per bypassare tali barriere: lo sviluppo dei nanosistemi come potenziali trasportatori di molecole su bersagli specifici intracellulari.

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

Le indicazioni fornite dalla messa a punto di un sistema efficace basato sul trasporto di chemioterapici al sito tumorale mediante l'impiego di nanoparticelle dovrebbero produrre un utile riflesso sulla pratica clinica e il miglioramento della efficacia terapeutica del mesotelioma pleurico maligno. Colture cellulari in vitro di mesotelioma con varia tipologia istologica, derivate da pazienti esposti e non ad inalazione di microfibre di asbesto, verranno caratterizzate per la espressione/overespressione di fattori mitogeni e dei loro recettori specifici tirosino-chinasici transmembrana (particolarmente EGF-R, VEGF-R e PDGF-R). Le cellule verranno cimentate all'azione di nuovi compounds anti-PTK e fattori anti-angiogenetici, sia di impiego corrente che analogo-derivati di nuova sintesi, e di farmaci tradizionali, in singolo o in combinazione (una fase successiva prevede esperimenti in cavie nei quali i composti antitumorali verranno veicolati ai siti neoplastici indotti), con modalità standard e mediante specifici nanosistemi trasportatori studiati e preparati ad hoc. Si ipotizzano potenzialità traslazionali dati laboratorio/indicazioni cliniche.

## *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Industrie Farmaceutiche, Pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno (e, potenzialmente, da altre forme neoplastiche), SSN.

## *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

- Acquisizione di modelli idonei di linee cellulari stabilizzate o colture primarie di hMPM da effusioni pleuriche, tumori solidi, auto- o biopsie di pazienti prevalentemente asbesto-esposti. Il nostro Istituto collabora con Università, Ospedali, Istituti Scientifici dove esiste adeguata casistica.
- Caratterizzazione della espressione/overespressione e funzionalità dei recettori con dominio intracitoplasmatico tirosino-chinasico (classe PTK) (EGF-R, VEGF-R, PDGF-Rb, eventualmente IGF-I-R, bFGF-R).
- Studi sperimentali dell'attività biofarmacologica di compounds anti-PTK (Gefitinib, Erlotinib-HCl, Sorafenib, Zactima, Sunitinib, Imatinib, Everolimus), antagonisti di fattori di crescita e inibitori di angiogenesi (Genisteina, Endostatina, Suramina).
- Determinazione della potenzialità dei composti testati di influire sui pathways della trasduzione del segnale ed apoptotico.
- Selezione di farmaci tradizionali attualmente impiegati con scarsi risultati, causa la loro modesta attività, nei protocolli terapeutici del hMPM (doxorubicina, carboplatino, gemcitabina, fenretinide, taxani) e tests in combinazione con anti-PTK.
- Analisi isoblografica e calcolo del combination index per la determinazione di potenziali effetti additivi/sinergici dell'attività dei farmaci.
- Sintesi di nuovi composti anti-PTK, analoghi chimici di alcuni modelli di riferimento (Gefitinib, Zactima), ad attività superiore e verifica comparativa sui medesimi modelli cellulari.
- Disegno e preparazione di sistemi di nanocarriers specifici che, semplificando, consistono di particelle colloidali polimeriche, dimensionati a livello sub-micron (diametro inferiore a 100 nm), incapsulanti nella matrice polimerica, o adsorbito, o anche coniugato alla loro superficie (idrofilica per ridurre l'eliminazione da parte dei macrofagi), l'agente terapeutico di particolare interesse.

## Programmazione 2009-2011

- Valutazione della capacità di superare le barriere fisiologiche e guidare le molecole più attive ai compartimenti intracellulari e sui bersagli cellulari specifici del hMPM sia mediante diffusione passiva che tramite approccio di targeting ligando-mediato. Stima della loro efficacia comparata con la distribuzione farmacologia per diffusione spontanea.

### *Track record*

Bertino P.-Porta C.-Barbone D.-Germano S.-Busacca S.-Pinato S.-Tassi G.-Favoni R.-Mutti L.-Gaudino G.  
Preliminary data suggestive of a novel translational approach to mesothelioma therapy: Imatinib Mesylate with Gemcitabine or Pemetrexed.  
Thorax 62:690/695, 2007

Bertino P.-Piccardi F.-Porta C.-Favoni R.E.-Cilli M.-Mutti L.-Gaudino G.  
Imatinib Mesylate enhances therapeutic effects of Gemcitabine in human malignant mesothelioma xenografts.  
Clin. Cancer Res. 14(2):541/548, 2008

Pattarozzi A.-Gatti M.-Barbieri F.-Wurth R.-Porcile C.-Lunardi G.L.-Ratto A.-Favoni R.E.-Bajetto A.-Ferrari A.-Florio T.  
17beta-estradiol promotes breast cancer cell proliferation inducing SDF-1-mediated EGF-R transactivation: reversal by Gefitinib pre-treatment.  
Mol. Pharm. 73:191/202, 2008

Griffero F.-Daga A.-Marubbi D.-Capra M.C.-Melotti A.-Pattarozzi A.-Gatti M.-Bajetto A.-Porcile C.-Barbieri F.-Favoni R.E.-Lo Casto M.-Zona G.L.-Spaziante R.-Florio T.-Corte G.  
Different response of human glioma tumor-initiating cells to EGF-R kinase inhibitors.  
J. Biol. Chem. 248:7138/7148, 2009

### **Identificazioni di nuovi target terapeutici per l'induzione della morte cellulare e l'inibizione delle capacità invasive, di cellule staminali del glioblastoma multiforme**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

*Responsabile scientifico:* Patrizio Castagnola

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Marco Ponassi, Antonio Daga

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* glioblastoma; cancer stem cells; apoptosis; gene targeting; invasion

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

### *Background*

Il Glioblastoma Multiforme (GBM) è un tumore gliale scarsamente differenziato che insorge nel sistema nervoso centrale tuttora caratterizzato da una prognosi quod vitam infausta, nonostante l'utilizzo di moderne tecniche di radio e chemioterapia. E' opinione comune tra gli addetti del settore che, analogamente ad altre patologie tumorali, le cellule responsabili del mantenimento e della disseminazione a distanza siano cellule chemio e radioresistenti con caratteristiche staminali, denominante anche "Tumor Initiating cells" (TICs). Per questo motivo questa sottopopolazione cellulare di neoplasie sono diventate oggetto di uno studio molto intenso con l'obiettivo di riuscire a comprenderne i meccanismi di sopravvivenza, di differenziamento e di invasione/diffusione a distanza con il fine di mettere a punto degli strumenti terapeutici in grado di eliminarle o almeno di ridurre/controllare le loro capacità dannose per l'ospite. Con questo obiettivo abbiamo elaborato un progetto di ricerca che si prefigge un duplice scopo: identificare nuove molecole in grado di inibire i meccanismi molecolari responsabili della sopravvivenza e dell'invasione delle TICs di GBM.

In particolare, per le linee cellulari stabilizzate ottenute da Gliomi in generale, esiste una consistente letteratura che indica tra le vie di segnalazione necessarie per la sopravvivenza quella di NOTCH come una delle più importanti. Notch appare tra l'altro in grado di: indurre l'espressione di alcuni marcatori di staminalità in cellule di glioma e favorire la radioresistenza di GBM. E' quindi razionale ipotizzare che l'inibizione di questa via di segnalazione possa sfavorire la sopravvivenza e la resistenza alla terapia delle TICs di GBM. L'esistenza di inibitori diffusibili attraverso la plasmamembrana, in grado di bloccare un processo chiave per la generazione del frammento di NOTCH che agisce come regolatore trascrizionale, ci ha spinti a valutare, come primo obiettivo del progetto, la loro possibile efficacia nei confronti di TICs di GBM ed individuare esattamente i geni che possono mediarne gli eventuali effetti negativi sulla sopravvivenza.

Riguardo alla capacità di invasione delle TICs di GBM, è noto che purtroppo in pratica quasi tutti i pazienti affetti da questo tumore, nonostante una virtuale eliminazione della massa tumorale presente alla diagnosi mediante exeresi chirurgica, ricadono presentando a distanza di pochi mesi recidive omolaterali alla lesione, controlaterali o addirittura

## Programmazione 2009-2011

localizzazioni al midollo spinale. Questo comportamento biologico viene da parte di molti attribuito alle notevolissime capacità infiltrative delle TICs di GBM. In pratica anche quando il tumore alla presentazione sembra essere localizzato, sulla base dei vari strumenti diagnostici al momento disponibili, esistono già delle cellule che hanno invaso strutture più o meno vicine che non sono identificabili/localizzabili e che si renderanno responsabili delle recidive. Il secondo obiettivo di questo progetto è di comprendere meglio i geni coinvolti nel processo di invasione delle TICs di GBM per individuare nuovi "molecular targets" potenzialmente sfruttabili in campo terapeutico.

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

#### Obiettivo generale

Individuare i geni coinvolti nella sopravvivenza e invasione delle TICs di GBM per lo sviluppo di nuove terapie.

Obiettivi secondari: i) valutare la capacità di piccole molecole diffusibili attraverso la membrana plasmatica, noti come inibitori di proteasi, di provocare morte cellulare di TICs di GBM; ii) valutare se l'inibizione di NOTCH è in grado di interferire con la sopravvivenza delle TICs di GBM; iii) individuare nuovi inibitori di processi legati alla sopravvivenza delle TICs di GBM; iv) identificare i meccanismi molecolari associati all'invasione del SNC da parte delle TICs di GBM; v) valutare la possibilità di inibire l'invasione delle TICs di GBM attraverso l'inibizione dei geni associati all'invasione del SNC da parte delle TICs di GBM.

### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Il raggiungimento degli obiettivi su indicati permetterà lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, da testare in modelli animali di trapianto ortotopico di TICs di GBM, con le quali si potranno rendere potenzialmente disponibili nuovi farmaci per il trattamento dei pazienti affetti da GBM.

### *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

#### Attività del triennio 2009-2011

- Esecuzione del test MTT/Alamar Blue per l'individuazione della IC50 sulla sopravvivenza in vitro di almeno 2 inibitori della gamma secretase disponibili commercialmente su TICs di GBM ottenute da almeno 3 pazienti.
- Indagine dei meccanismi di morte cellulare provocata in vitro da almeno 2 inibitori della gamma secretase disponibili commercialmente, su TICs di GBM ottenute da almeno 3 pazienti, mediante uso di marcatori fluorescenti specifici per Necrosi/Apoptosi ed analisi al FACS.
- Esecuzione di analisi al FACS ad alta risoluzione, mediante marcatura del DNA, per l'individuazione degli effetti sul ciclo cellulare di almeno 1 inibitore disponibile commercialmente della gamma secretase, su TICs di GBM ottenute da almeno 1 paziente.
- Esecuzione di "immunoblot", per la valutazione dell'inibizione della generazione del frammento intracellulare di NOTCH (NICD), di almeno 2 inibitori disponibili commercialmente della gamma secretase su TICs di GBM ottenute da almeno 3 pazienti.
- Comparazione del profilo di espressione genica globale, determinato mediante piattaforma Affymetrix, ottenuto da almeno 2 inibitori disponibili commercialmente della gamma secretase su TICs di GBM di almeno 3 pazienti rispetto a campioni di controllo.
- Conferma sperimentale mediante Real Time PCR analysis della regolazione per almeno 6 geni individuati grazie al profilo di espressione genica globale.
- Comparazione del profilo di espressione genica globale, determinato mediante piattaforma Affymetrix, di TICs di GBM altamente infiltranti (da almeno 3 pazienti) rispetto a quello di TICs a bassa capacità infiltrativa (da almeno 3 pazienti), come determinato sulla base di studi già eseguiti presso la S.C. Trasferimento Genico, mediante trapianti ortotopici in topo.
- Esecuzione di test di convalida di almeno 3 geni identificati come potenziali targets terapeutici per nuovi farmaci in grado di ridurre/bloccare l'invasione di TICs di GBM, mediante transfezione di siRNA e verifica dell'invasività "in vitro" mediante test effettuato con camera di Boyden.
- Esecuzione di test di convalida, dei geni che superano il test in vitro, mediante shRNA espressi da lentivirus e verifica dell'invasività "in vivo" mediante modello murino di trapianto ortotopico.

#### Risultati attesi nel corso del primo anno

- Determinazione della concentrazione in grado di provocare morte cellulare in 50% in TICs di GBM di almeno 1 inibitore di gamma secretase.
- Determinazione del tipo di morte cellulare indotta in TICs di GBM da almeno 1 inibitore di gamma secretase.
- Determinazione degli effetti sul ciclo cellulare in TICs di GBM indotti da almeno 1 inibitore di gamma secretase.
- Individuazione dei geni regolati in TICs di GBM da almeno 1 inibitore di gamma secretase.
- Individuazione dei geni correlati all'invasione regolati in TICs di GBM in almeno 6 pazienti.

### *Track record*

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

Expression of CXCR 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

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

Glioma immunotherapy by IL-21 gene-modified cells or by recombinant IL-21 involves antibody responses.

*Int. J. Cancer* 121:1756/1763, 2007

Monticone M.-Biollo E.-Maffei M.-Donadini A.-Romeo F.-Storlazzi CT.-Giaretti W.-Castagnola P. Gene expression deregulation by KRAS G12D and G12V in a BRAF V600E context.

## Programmazione 2009-2011

Mol. Cancer. 7:92, 2008

Viale M.-Petrillo G.-Maccagno M.-Castagnola P.-Aiello C.-Cordazzo C.-Mariggì MA.-Jadhav SA.-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-butadiene.  
Eur. J. Pharmacol. 588(1):47/51, 2008

Castriconi R.-Daga A.-Dondero A.-Zona G.-Poliani PL.-Melotti A.-Griffero F.-Marubbi D.-Spaziante R.-Bellora F.-Moretta L.-Moretta A.-Corte G.-Bottino C.  
NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties.  
J. Immunol. 182:3530/3539, 2009

Gangemi RM.-Griffero F.-Marubbi D.-Perera M.-Capra MC.-Malatesta P.-Ravetti GL.-Zona GL.-Daga A.-Corte G.  
SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity.  
Stem Cells 27:40/48, 2009

Griffero F.-Daga A.-Marubbi D.-Capra MC.-Melotti A.-Pattarozzi A.-Gatti M.-Bajetto A.-Porcile C.-Barbieri F.-Favoni RE.-Lo Casto M.-Zona G.-Spaziante R.-Florio T.-Corte G.  
Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors.  
J. Biol. Chem. 284:7138/7148, 2009

Ropolo M.-Daga A.-Griffero F.-Foresta M.-Casartelli G.-Zunino A.-Poggi A.-Cappelli E.-Zona G.-Spaziante R.-Corte G.-Frosina G.  
Comparative analysis of DNA repair in stem and nonstem glioma cell cultures.  
Mol. Cancer Res. 7:383/392, 2009

Viale M.-Cordazzo C.-Cosimelli B.-De Toterò 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: toward new candidates.  
J. Med. Chem 22:259/266, 2009