

## 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, Antonio Daga

*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 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.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 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.

### *Risultati e prodotti 2010*

Nell'anno in corso abbiamo ultimato gli esperimenti volti a chiarire il ruolo di Olig2 (e il coinvolgimento di Pax6 e ID4) nel nostro modello murino di glioblastoma. I relativi dati sono stati raccolti in un manoscritto che è stato di recente sottomesso ad una rivista internazionale. Tali dati mostrano che non solo Olig2 è fondamentale per il mantenimento della capacità tumorigenica in vivo delle cellule di glioblastoma, ma che è sotto il controllo di Pax6, il quale se sovraespresso, provoca l'abbattimento dei livelli di Olig2 stesso. Pax6, tuttavia, al contrario di Olig2, è in grado di indurre le cellule iniziatrici di glioma a differenziare verso fenotipi più maturi. Inoltre Olig2 è in grado di regolare l'espressione di ID4 e abbiamo dimostrato che una sovraespressione di ID4 nelle cellule di glioblastoma è sufficiente a mimare gli effetti indotti dal silenziamento di Olig2.

Durante questo anno abbiamo inoltre dimostrato che il proteoglicano di membrana NG2, sebbene in letteratura sia noto agire come co-recettore del PDGFR, non è necessario per la formazione e la progressione dei gliomi indotti da PDGF-B. La sovraespressione di PDGF-B in embrioni knock-out per il gene NG2 o in cellule di topo wild-type ingegnerizzate per la sovraespressione di un microRNA diretto contro il messaggero di NG2 è sufficiente ad indurre gliomi murini di alto grado del tutto simili ai tumori generati negli embrioni wild-type. Questo risultato suggerisce cautela nei confronti di approcci terapeutici mirati contro NG2 proposti da alcuni gruppi. I risultati sono stati pubblicati su rivista internazionale nel corso del 2010.

Nel contempo, in collaborazione con la Dott.ssa Menotti dell'Università di Bologna, abbiamo utilizzato il nostro modello di glioblastoma per saggiare l'efficienza di una nuova viroterapia basata su HSV ricombinanti con specifico tropismo. Abbiamo potuto dimostrare che tali vettori sono oncolitici ed in grado, anche in vivo, di infettare e uccidere solo le cellule di glioblastoma che esprimono HER2 inducendo un aumento significativo della mediana del tempo di sopravvivenza rispetto ai topi di controllo iniettati con sole cellule di glioblastoma non trattate (125 giorni rispetto a 55).

Al fine di generare nuovi modelli murini di glioma abbiamo utilizzato i vettori esprimenti la forma mutante del recettore EGFRvIII prodotti alla fine del 2009 per trasdurre i precursori telencefalici di topo. Questi esperimenti hanno dimostrato che la sovraespressione di EGFRvIII genera tumori con minore efficienza e maggiore latenza rispetto alla sovraespressione di PDGF-B. Attualmente stiamo caratterizzando i primi tumori ottenuti sia da un punto di vista molecolare sia per quanto riguarda il loro grado di malignità e la loro tumorigenicità in vivo. Nel corso del prossimo anno utilizzeremo questi tumori per saggiare l'efficacia terapeutica di un altro vettore oncolitico ricombinante specifico per il recettore EGFRvIII.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Quest'ultimo vettore è già stato da noi impiegato in vitro su cellule staminali di glioma umano derivate da pazienti grazie alla collaborazione con il Dott. Daga (ricercatore IST presso la s.c. Trasferimento genico). Questo esperimento ha mostrato che il vettore è in grado di infettare tutti i gliomi umani finora saggiati ma con una grande variabilità sia nell'efficienza di infezione sia nella capacità dei virus di propagarsi da una cellula all'altra.

### *Pubblicazioni*

Calzolari F.-Malatesta P.  
Recent insights into PDGF induced gliomagenesis.  
Brain Pathol. 20:527/538, 2010

Terrile M.-Appolloni I.-Calzolari F.-Perris R.-Tutucci E.- Malatesta P.  
PDGF/B driven gliomagenesis can occur in the absence of the proteoglycan NG2.  
BMC Cancer 10:550;1/550;14, 2010

### *Presentazioni a congressi*

Appolloni I.-Calzolari F.-Malatesta P.  
Pdgf-b addiction in a murine model of oligodendroglioma  
ISCO congress, Dresden, Germany, March 17-19, 2010. Cellular Oncology 32(3):215-216, 2010

Barilari M.-Calzolari F.-Appolloni I.-Caviglia S.-Malatesta P.  
Studying a PDGF-B induced murine model of glioma. EMBO Practical Course on Analysis and Informatics of Transcriptomics Data"  
EMBL-EBI, Hinxton, Cambridge, CB10 1SD, UK, 18 - 23 Ottobre 2010

Gambini E.-Reisoli E.-Appolloni I.-Malatesta P.  
Modello murino per la viroterapia dei tumori cerebrali maligni.  
83° Convegno Nazionale SIBS, Genova 21-23 ottobre 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Nel corso del 2011 prevediamo di ultimare l'analisi dei gliomi derivati dalla sovraespressione di EGFRvIII. In primo luogo questa analisi servirà a chiarire fino a che punto tale modello differisca da quello basato sulla sovraespressione del PDGF-b. In secondo luogo, il modello basato su EGFRvIII sarà usato per saggiare in vitro e in vivo l'efficacia della viroterapia basata sui vettori HSV con tropismo modificato, diretti contro EGFRvIII e prodotti dalla Dott.ssa Menotti dell'Università di Bologna.

Lo studio dell'efficacia di questi ultimi vettori verrà proseguito anche sul pannello di cellule iniziatrici di glioma ottenute da paziente dal Dott. Daga (IST), che, da quest'anno, prenderà parte al progetto.

Gli studi degli ultimi due anni hanno evidenziato che l'espressione di Olig2 è necessaria per il mantenimento della capacità tumorigenica dei tumori indotti da PDGF-B. Nel corso del 2011 vorremmo sfruttare queste conoscenze per cercare nuovi potenziali farmaci per il glioma in grado di abbattere l'espressione di Olig2 sfruttando una library di farmaci a nostra disposizione. I candidati individuati saranno poi validati con esperimenti in vitro e in vivo per studiare l'effetto del farmaco sulle cellule di glioma.

Nel corso dei due anni passati abbiamo dimostrato che il PDGF-B è necessario non tanto per favorire la proliferazione quanto la migrazione delle cellule di glioma. Una nostra attuale ipotesi di lavoro si basa sul fatto che questo sia dovuto alla capacità del PDGF-B di bloccare il processo di inibizione della migrazione indotto normalmente dal contatto cellula-cellula. Dall'analisi di microarray abbiamo trovato una de-regolazione dell'espressione di varie molecole coinvolte nell'adesione cellulare e nel corso del 2011 prevediamo di analizzare a fondo il ruolo svolto da queste molecole nella gliomagenesi.

<b>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</b>
--

*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:* Giorgia Travaini, Arrigo Massa

*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)

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

*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 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

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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.

### *Risultati e prodotti 2010*

Abbiamo dimostrato che cellule stromali midollari indifferenziate, o differenziate come i fibroblasti e gli osteoblasti, sono in grado di prolungare significativamente la sopravvivenza delle cellule leucemiche in Leucemia linfatica cronica B. Alcuni fattori solubili rilasciati dalle stromali midollari potrebbero avere un ruolo chiave nel mantenimento e nell'espansione del clone leucemico sia a livello del midollo osseo che dei linfonodi. I nostri studi indicano che, oltre a CXCL12, anche HGF, prodotto dalle stromali midollari e dagli osteoblasti, è un fattore importante capace di inibire l'apoptosi delle cellule leucemiche. Abbiamo osservato, infatti che il recettore per HGF, c-MET, è espresso ad alti livelli sulle B leucemiche di linfatica cronica e che l'interazione HGF/c-MET è in grado di attivare la fosforilazione di STAT3 (pSTAT3) in TYR705, un pathway correlato ad aumentata sopravvivenza cellulare. pSTAT3 risultava inoltre attivato in seguito a co-cultura con stromali midollari o con una linea osteoblasto-simile suggerendo che HGF prodotto da queste cellule potesse innescare questa via di segnale. Esperimenti di inibizione con un inibitore farmacologico della tirosin-chinasi c-MET (SU11274) o con un anticorpo anti-HGF così come gli esperimenti di silencing di HGF (siRNA-HGF) hanno confermato che HGF è responsabile dell'aumentata sopravvivenza della leucemia indotta da alcuni tipi di mesenchimali stromali. Il pre-trattamento delle cellule leucemiche con un inibitore specifico (cpd188) della fosforilazione di STAT3 inibiva inoltre il prolungamento della sopravvivenza indotto dal trattamento con HGF o da co-cultura con la linea osteoblasto-simile dimostrando quindi che il segnale innescato da HGF effettivamente utilizza questa via. Altri possibili pathways di segnale sono stati da noi studiati ed abbiamo dimostrato che HGF è anche capace di attivare la fosforilazione di AKT mentre la fosforilazione di ERK1/2 è attivata da CXCL12 ma non da HGF. A questo riguardo è interessante notare che abbiamo osservato che i fibroblasti producono CXCL12 in grande quantità ma poco HGF mentre gli osteoblasti secernono molto HGF e basse quantità di CXCL12. I nostri studi suggeriscono quindi che stromali mesenchimali differenziate verso osteoblasti o fibroblasti potrebbero sostenere la sopravvivenza del clone leucemico attraverso fattori e vie di segnale differenti: gli osteoblasti producendo molto HGF attiverebbero preferenzialmente la via di STAT3 e di PI3K/AKT mentre i fibroblasti indurrebbero preferenzialmente la via MEK/ERK1/2 attraverso la secrezione di CXCL12.

### *Pubblicazioni*

Baio G.-Fabbi M.-Salvi S.-De Toterò D.-Truini M.-Ferrini S.- Neumaier C.E.  
Two step in vivo tumor targeting by biotin conjugated antibodies and superparamagnetic nanoparticles assessed by magnetic resonance imaging at 1.5 T.  
Mol. Imaging Biol. 12:305/315, 2010

De Toterò D.-Capaia M.-Fabbi M.-Croce M.-Meazza R.-Cutrona G.-Zupo S.-Loiacono F.-Truini M.-Ferrarini M.-Ferrini S.  
Heterogeneous expression and function of IL/21R and susceptibility to IL/21 mediated apoptosis in follicular lymphoma cells.  
Exp. Hematol. 38:373/383, 2010

Giannoni P.-Narcisi R.-De Toterò D.-Romussi G.-Quarto R.-Bisio A.  
The administration of demethyl fructulin A from *Salvia corrugata* to mammalian cells lines induces anoikis, a special form of apoptosis.  
Phytomedicine 17:449/456, 2010

Giannoni P.-Scaglione S.-Quarto R.-Narcisi R.-Parodi M.-Balleari E.-Barbieri F.-Pattarozzi A.-Florio T.-Ferrini S.-Corte G.-de Toterò D.  
HGF-c-MET interaction prolongs chronic lymphocytic leukemic cells survival through STAT3 phosphorylation: potential role of mesenchymal cells in the disease.  
Haematologica, submitted

### *Presentazioni a congressi*

De Toterò D.- Capaia M- Canevari S- Orengo AM- De Cecco L- Fabbi M- Cutrona G- Zupo S,-Ferrarini M- Ferrini S.  
Role of cytokines in lymphoid neoplasia cell survival.  
Cellular Oncology, 32: 168/169, 2010

De Toterò D.- Giannoni P.-Scaglione S.-Quarto R.-Narcisi R.-Parodi M.- Balleari E.- Monteghirfo S.- Barbieri F.- Pattarozzi A.- Florio T.-Ferrini S.-Corte G.  
Chronic lymphocytic leukemic (CLL) B cells express the HGF receptor (c-MET) and are supported in their survival by HGF-producing mesenchymal stromal cells.  
Haematologica: 95 (suppl. 2): 316, abs. 0758, 2010; 15th Congress of the European Hematology Association, June 10-13, 2010

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Alcuni studi sono attualmente in corso per studiare se CXCL12 e HGF aggiunti in coltura contemporaneamente alle cellule leucemiche possano avere attività sinergiche. Dati preliminari indicano un modesto effetto additivo ma ulteriori studi delle vie di segnale attivate da questi due fattori di crescita, somministrati singolarmente o insieme, potranno essere utili per comprendere meglio se esistano pathways di signaling separati o sovrapposti. Abbiamo infatti intenzione di indagare se la fosforilazione di STAT3 in TYR705 sia attivata anche dall'interazione CXCR4-CXCL12, oltre che da c-MET-HGF, come dimostrato. Inoltre poiché l'attivazione di c-MET oltre ad indurre segnali di sopravvivenza promuove spesso crescita invasiva del tumore abbiamo intenzione di studiare se HGF induca migrazione ed invasione anche di queste cellule B leucemiche. A tal fine verrà utilizzata sia HGF ricombinante che i mezzi condizionati derivati dalle colture delle diverse mesenchimali stromali precedentemente utilizzati (osteoblasti, fibroblasti, endoteliali, cellule stromali di midollo osseo, adipociti, MG63, HUVEC).

SU11274 un inibitore dell'attività tirosin-chinasi di c-MET si è dimostrato utile per contrastare il prolungamento della sopravvivenza delle cellule leucemiche indotta sia dal trattamento con la proteina ricombinante HGF sia dall'interazione con cellule stromali. Stiamo attualmente studiando l'efficacia di un altro inibitore di c-MET, PHA665752 e abbiamo intenzione di testare anche il flavopiridolo un farmaco che potrebbe ridurre i trascritti di c-MET sulle cellule leucemiche, come dimostrato nel mieloma multiplo. Inoltre abbiamo intenzione di dosare la presenza di HGF presente nel siero dei pazienti di Leucemia linfatica cronica B (N: 20-30 pazienti) poiché dati preliminari indicano quantità di HGF più elevate in questi rispetto ai controlli sani. Vorremo quindi stabilire se HGF viene prodotto dalle stesse B leucemiche o da particolari cellule presenti nel microambiente tumorale. A questo riguardo stiamo anche analizzando l'attività di un particolare subset di monociti, chiamate cellule nutrici (Nurse-like cells), che sono caratteristiche di questo tipo di leucemia e che vengono espanse nella coltura in vitro di cellule del sangue periferico. Riteniamo che questi studi ci permetteranno di chiarire se HGF possa estrinsecare la propria attività in diversi modi, quali la sopravvivenza, ma anche la migrazione o l'invasione attraverso l'attivazione di preferenziali vie di signaling. Lo studio inoltre dell'attività indotta da inibitori farmacologici per c-MET o pSTAT3 o del flavopiridolo potrà essere utile per sviluppare nuove strategie terapeutiche atte a bloccare interazioni tra microambiente e cellule neoplastiche che favoriscono l'espansione della leucemia.

### **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:* Antonio Daga

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Paolo Malatesta, 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:* Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; 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

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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. 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.

### *Risultati e prodotti 2010*

Lo scopo di questo progetto è di analizzare il significato dell'espressione dei geni OLIG2 e FOXG1 nelle cellule di glioma. Allo scopo sono stati usati gli approcci di perdita e guadagno di funzione mediante silenziamento genico od overespressione costitutiva dei geni candidati. L'analisi degli effetti del silenziamento è stata condotta principalmente sul gene target Olig2, poiché non abbiamo ancora individuato sequenze target utili per il silenziamento di Foxg1. Gli effetti del silenziamento di Olig2 sono stati studiati in vitro mediante analisi della proliferazione e clonogenicità. La ridotta espressione di Olig2 nei gliomi induce una riduzione contemporanea della proliferazione, della clonogenicità e un parziale differenziamento. Per esaminare i meccanismi molecolari responsabili di queste alterazioni abbiamo analizzato il profilo di espressione genica di quattro campioni di cellule staminali di glioma, 4 giorni dopo aver silenziato Olig2 e confrontati con il profilo di espressione derivante dagli stessi campioni silenziati con un virus di controllo. Olig2 è un fattore di trascrizione con attività inibitoria sulla trascrizione dei geni target, abbiamo quindi analizzato i geni la cui trascrizione è aumentata dal suo silenziamento. Fra i geni maggiormente indotti, abbiamo identificato i geni: phospholipid scramblase 4 (responsabile dell'esposizione in membrana della phosphatidylserine, un fosfolipide usato come marcatore di apoptosi), tryptophan 2,3-dioxygenase (marker di maturazione/differenziamento delle cellule neurali con attività antiproliferativa, oltre che enzima responsabile del catabolismo del triptofano e conseguente produzione di cataboliti ad attività immunosoppressiva), cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (ad attività oncosoppressiva), Neuroplastin (una glicoproteina sinaptica), solute carrier family 7 member 11 (un trasportatore di membrana che modula la sensibilità a chemioterapici), TP53INP1 (un gene proapoptotico target di p53), PHC3 (un candidato tumor suppressor), IFNAR3 (recettore dell'interferone alfa, beta e omega). Fra i geni downregolati dal silenziamento di Olig2 ci sono: adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit (molecola che media il ricircolo delle vescicole sinaptiche), ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (proteina della superficie mitocondriale la cui riduzione perturba il trasporto assonale e riduce la produzione mitocondriale di energia), solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6 (un trasportatore di zinco dipendente da STAT6, la cui downregolazione riduce la proliferazione e migrazione di cellule HELA), VGF (fattore che incrementa il metabolismo energetico e la proliferazione neuronale). Nel complesso questi dati indicano che sono regolati geni che controllano sia l'apoptosi che i processi di proliferazione/differenziamento.

### *Pubblicazioni*

Melotti A.-Daga A.-Marubbi D.-Zunino A.-Mutti L.-Corte G.

In vitro and in vivo characterization of highly purified human mesothelioma derived cells.  
BMC Cancer 10:54;1/54;9, 2010

Monticone M.-Bisio A.-Daga A.-Giannoni P.-Giaretti W.-Maffei M.- Pfeffer U.-Romeo F.-Quarto R.-Romussi G.-Corte G.-Castagnola P.

Demethyl fructulin A (SCO/1) causes apoptosis by inducing reactive oxygen species in mitochondria.  
J. Cell. Biochem. 111:1149/1159, 2010

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Nel corso del 2011 prevediamo di ultimare l'analisi dei geni regolati dal silenziamento di Olig2 dedotti dagli esperimenti con i microarray. La regolazione di un numero rappresentativo di geni candidati sarà confermata mediante RT-PCR e, quando possibile, mediante western blot o analisi citofluorimetrica. Prevediamo anche di ultimare l'analisi in vitro degli effetti del silenziamento di Olig2. Sarà analizzato l'effetto su proliferazione, differenziamento, clonogenicità e apoptosi/necrosi. Gli effetti indotti in vitro dal silenziamento di Olig2 saranno confermati in vivo, mediante trapianto ortotopico delle cellule silenziate e degli adeguati controlli non silenziati. Saranno analizzati: il tempo di sopravvivenza dei topi trapiantati, la capacità infiltrativa delle cellule tumorali nel circostante parenchima cerebrale murino, le dimensioni della massa neoplastica e il suo grado differenziativo.

Prevediamo inoltre di concludere gli esperimenti di guadagno di funzione di Foxg1 nei gliomi iniziati nel corso del 2010. Come nel punto precedente, anche in questo caso sarà analizzata la sopravvivenza degli animali trapiantati con cellule di glioma esprimenti costitutivamente il gene candidato. I topi sono stati iniettati con quantità scalari di cellule di controllo od overesprimenti Foxg1, in modo da verificare il numero di cellule staminali tumorali presenti nelle due popolazioni cellulari. Nel caso i risultati di questi esperimenti confermeranno che, nei gliomi, l'espressione costitutiva di Foxg1 induce un incremento della staminalità, come verificato nelle cellule staminali murine, si procederà all'analisi dei meccanismi molecolari che mediano questi effetti. Allo scopo, le cellule staminali tumorali derivate dai tre diversi pazienti che produrranno i migliori risultati di incremento di staminalità, saranno usate per analizzare i profili di espressione genica mediante Human Gene 1.0 ST array.

L'analisi dei geni differenzialmente espressi fra cellule di controllo e cellule esprimenti costitutivamente Foxg1, permetterà di individuare i geni controllati da questo fattore di trascrizione, responsabili del mantenimento delle caratteristiche staminali nei tumori cerebrali.

**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:* Antonio Daga

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* M.C. Capra

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*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. Genetica ed epigenetica dei tumori (M. Romani); s.s. Animal facility (M. Cilli)

*Altri Enti coinvolti:* DOBIG, Università di Genova (T. Florio); DISCAFF/DFB Center, Università Piemonte Orientale A. Avogadro, Novara (G. Gaudino, L. Moro); 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.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

### *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.

### *Risultati e prodotti 2010*

E' stata analizzata l'attività antiproliferativa in vitro di alcuni inibitori di tirosino-chinasi recettoriali ed esaminato il coinvolgimento del pathway intracellulare in due linee di mesotelioma pleurico maligno umano (hMPM): IST-Mes2 e ZL55, istologia epiteliale, derivate da effusione pleurica e tumore solido, rispettivamente. I cinque principi attivi di più recente generazione, testati in vitro mediante esperimenti di chemiosensibilità (dose-response e time-course) sono: gefitinib ed erlotinib-HCl (anti EGFR), sorafenib e zactima (anti VEGFR) ed imatinib (anti PDGFR/bcr-abl). Tutte le molecole hanno manifestato [IC50], dopo 48 e 72 ore di esposizione (short-term assays), collocate nel range micromolare per entrambi i modelli cellulari. Il recettore EGFR (ad azione tirosino-chinasica, TK), la cui overespressione e quella del suo ligando fisiologico EGF ha un ruolo importante nello sviluppo dell'hMPM, risulta sintetizzato ad elevati livelli nelle IST-Mes2 e ZL55 e la sua attivazione da parte dell'EGF, sotto starvazione FBS, incrementa la crescita cellulare. Su queste basi abbiamo approfondito il pathway molecolare implicato in tale meccanismo stimolatorio, verificando l'abilità del gefitinib di prevenire l'attivazione del recettore EGFR-TK, EGF-stimolato, su entrambe le linee. E' stata successivamente approfondita l'analisi degli effettori a valle della porzione intracellulare del recettore dimostrando che EGF causa la fosforilazione delle molecole ERK1/2 ma non quella di Akt che sembrerebbe pertanto essere indipendente dal processo di fosforilazione innescato a livello ERK1/2. La cinetica di attivazione di ERK1/2, dopo esposizione ad EGF, è risultata comparabile al modello, tempo-dipendente, della sua translocazione citoplasma => nucleo altrettanto ridotta dal gefitinib. Appare altresì di particolare interesse l'incremento del numero di siti recettoriali/cellula, valutato mediante esperimenti di binding competitivo, indotto dal gefitinib e la formazione di omodimeri EGFR inattivi da parte del medesimo farmaco nelle cellule IST-Mes2. Nel loro insieme questi dati dimostrano che il gefitinib inibisce la sopravvivenza e proliferazione delle cellule di hMPM, prevenendo l'attivazione EGF-dipendente del pathway ERK1/2, mediante il blocco della fosforilazione dell'EGFR-TK e la stabilizzazione di dimeri EGFR inattivi. Abbiamo inoltre ottimizzato le condizioni per la coltura di cellule primarie di mesotelioma che permettono di espandere in vitro le cellule tumorali senza perdere la loro componente staminale e verificato la loro tumorigenicità mediante trapianto pseudo-ortotopico nel peritoneo di topi NOD/SCID. Le cellule di mesotelioma umano ripresevalate dal peritoneo dei topi sono state caratterizzate fenotipicamente per l'espressione di proteine di membrana e geni di staminalità.

### *Pubblicazioni*

Favoni R.E.-Pattarozzi A.-Lo Casto M.-Barbieri F.-Gatti M.-Paleari L.-Bajetto A.-Porcile C.-Gaudino G.-Mutti L.-Corte G.-Florio T.

Gefitinib targets EGFR dimerization and ERK1/2 phosphorylation to inhibit pleural mesothelioma cell proliferation. *Curr. Cancer Drug Targets* 10:176/191, 2010

Melotti A.-Daga A.-Marubbi D.-Zunino A.-Mutti L.-Corte G.

In vitro and in vivo characterization of highly purified human mesothelioma derived cells. *BMC Cancer* 10:54; 1/54;9, 2010

Pinton G.-Thomas W.-Bellini P.-Manente A.-Favoni R.E.-Harvey B.- Mutti L.-Moro L.

Estrogen receptor beta exerts tumor repressive functions in human malignant pleural mesothelioma via EGFR inactivation and affects response to gefitinib. *PLoS One* 5(11):e14110; 1/e14110;10, 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Le cellule di hMPM in studio verranno cimentate all'azione di nuovi compounds anti-PTK e fattori anti-angiogenetici, sia di impiego corrente che analogo-derivati di nuova sintesi, nonché di farmaci tradizionali, in singolo o in combinazione. Sarà analizzata la [IC50] per ogni molecola e testata l'efficacia antiproliferativa in vitro. Una fase successiva prevede esperimenti di trapianto pseudo ortotopico in topi immunodeficienti, nei quali i composti antitumorali verranno veicolati ai siti neoplastici con modalità standard ed eventualmente mediante specifici nanosistemi trasportatori studiati e preparati ad hoc. Si attendono miglioramenti (sinergie) dell'azione farmacologica derivante dall'utilizzo combinato delle molecole; inoltre, si ipotizzano potenzialità traslazionali dei dati emersi in laboratorio. In parallelo, saranno usate le colture cellulari di mesotelioma da noi in precedenza derivate e coltivate in condizioni tali da arricchire in cellule staminali tumorali. In base ai dati di espressione genica, verranno testati farmaci mirati contro recettori di fattori di crescita o molecole delle vie di traduzione del segnale, come Gefitinib ed Erlotinib (EGFR), Sorafenib (PDGFRB), Sunitinib (PDGFRA-B, KIT), NVP-BE235 (PI3K), Bortezomib (NF-Kb) e Imatinib (PDGF), NK4 (HGF-MET). Per verificare il loro effetto inibente la staminalità, le colture cellulari di mesotelioma CSC esprimeranno luciferasi saranno trattate in vitro con i farmaci, singoli o in associazione, per una settimana e poi iniettati negli animali da esperimento.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

L'efficacia del trattamento sarà monitorata mediante in vivo imaging con lo strumento IVIS dopo somministrazione di luciferina agli animali trattati.