



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN
MICROBIOLOGIA MEDICA ED IMMUNOLOGIA

XX CICLO

**I RETROELEMENTI NELLA TUMORIGENESI.
RUOLI DISTINTI DI LINE-1 E HERV-K NELLA
PROGRESSIONE TUMORALE**

ELISA ORICCHIO

Docente Guida/Tutor: Prof. Paola Sinibaldi Vallebona
Dott. Corrado Spadafora

Coordinatore: Prof. Enrico Garaci

L'analisi quantitativa, così avara di emozioni,
greve come il granito, diventa viva, vera, utile inserita in un'opera
seria e concreta....
inquadrate in un piano, una tessera di un mosaico

Sbagliare non è più un infortunio vagamente comico...
Sbagliare è come quando si va su una roccia, un misurarsi,
un accorgersi, uno scalino in su che ti rende più valente, più adatto

Primo LEVI
"Il sistema Periodico"

INDICE

RIASSUNTO	pag.1
ABSTRACT	pag. 2
PAROLE CHIAVE	pag. 3
INTRODUZIONE	
Gli elementi mobili del genoma	pag. 4
Retrovirus endogeni	pag. 6
Sine e Line-1	pag. 8
Implicazioni funzionali del LINE-1	pag. 9
L'inibizione dell'RT endogena riduce la proliferazione cellulare e promuove il differenziamento nelle cellule trasformate	pag.11
MATERIALI E METODI	
Colture cellulari	pag. 16
Produzione dei vettori retrovirali ed infezione cellulare.	pag. 17
Immunofluorescenza indiretta	pag. 18
RT-PCR Semiquantitativa	pag. 19
Analisi per Western Blot	pag. 20
Produzione di vettori adenovirali e purificazione	pag. 21
Titolazione dei virus	pag.23
Inoculo di cellule tumorali e trattamento degli animali	pag.23

RISULTATI

Il trattamento con nevirapina riduce la proliferazione delle cellule tumorali, ma non di quelle normali pag. 25

L'espressione del LINE-1 è ridotta in cellule A375 di melanoma infettate con un vettore retro virale che esprime siRNA specifico per il LINE-1 pag. 26

L'inibizione dell'espressione del LINE-1 riduce la proliferazione cellulare e induce il differenziamento pag. 28

Herv-K non ha un ruolo nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare pag. 29

Le cellule A375 interferite per il LINE-1 o per HERV-K hanno una ridotta tumorigenicità pag. 30

Sviluppo di un sistema di vettori adenovirali finalizzato per la terapia genica pag. 31

Utilizzo dei vettori *in vivo*: dati preliminari pag. 32

DISCUSSIONE pag. 33

BIBLIOGRAFIA pag. 38

RIASSUNTO

I retroelementi sono sequenze altamente ripetute disperse nel genoma, che codificano per una Trascrittasi Inversa (RT). Cellule e tessuti caratterizzati da una elevata capacità di proliferazione e un basso grado di differenziamento (come cellule tumorali o embrionali) esprimono alti livelli di RT che al contrario è scarsamente espressa in tessuti terminalmente differenziati.

E' noto da precedenti studi condotti nel nostro laboratorio che il trattamento di diverse linee cellulari tumorali con due inibitori non nucleosidici della RT, la nevirapina ed l'efavirenz, induce una riduzione della proliferazione e della tumorigenicità in *in vitro* ed *in vivo* e ne promuove il differenziamento (Mangiacasale et al., 2003; Sciamanna et al., 2005; per una review Sinibaldi-Vallebona et al., 2006).

In questo lavoro ho dimostrato che gli inibitori della RT, inibiscono la proliferazione solo in delle cellule tumorali mentre non hanno alcun effetto significativo sulle cellule normali. Inoltre, utilizzando la tecnica dell'RNA interference (RNAi) ho identificato due famiglie di retroelementi, LINE-1 e HERV-K, che hanno ruoli diversi nella tumorigenesi. Infettando cellule di melanoma A375 con vettori retrovirali adeguatamente ingegnerizzati allo scopo, ho prodotto due linee cellulari in cui l'espressione di questi due retroelementi sia stabilmente interferita. Le cellule interferite per il LINE-1 hanno una ridotta proliferazione, una morfologia alterata ed un'espressione alterata di alcuni geni che regolano la proliferazione e il differenziamento. Al contrario, le cellule A375 interferite per HERV-K non mostrano nessun cambiamento *in vitro*.

A differenza di quanto osservato *in vitro*, entrambe le linee cellulari inoculate in topi nudi atimici hanno una ridotta tumorigenicità rispetto alle cellule della linea parentale.

Infine, allo scopo di sviluppare una possibile terapia genica differenziativa dei tumori, ho sviluppato un sistema di vettori adenovirali in sostituzione di quelli retro virali; i primi infatti offrono una serie di vantaggi rispetto ai vettori retrovirali, primo fra tutti il fatto che queste sequenze rimangono in forma episomale consentendo quindi di ripetere l'infezione diverse volte allo scopo di migliorarne l'efficienza

ABSTRACT

Retroelements are sequences highly repeated present in all eucaryotic genomes and they encode for a RT that is expressed at high levels in cells and tissue types characterized by a high proliferative potential and a low degree of differentiation (e.g. embryonic tissues and tumor cells), whereas low RT levels are generally found in terminally differentiated, non pathological tissue.

Previous studies have showed that inhibition of endogenous RT, using pharmacological inhibitors, (nevirapine and efavirenz) reduces proliferation and promotes differentiation of human tumorigenic cell lines and strongly antagonizes tumor progression in murine models (Mangiacasale et al., 2003 Sciamanna et al., 2005; reviewed by Sinibaldi-Vallebona et al., 2006). In this work I have showed that the RT inhibitors, in contrast to what observed in tumorigenic cells, does not exert any effect on normal cells. In addition, I using a RNA interference approach (RNAi), I assessed the different roles of two retroelements LINE-1 and HERV-K in tumorigenesis and tumor progression. Using retroviral vectors, I produced two cell lines, derived from A375 melanoma cells, stably interfered for the expression of these elements. The cells in which LINE-1 expression was interfered exhibit a reduced proliferation and significant changes in morphology, suggestive of that a differentiation was activated. Moreover, these cells showed a reduced tumorigenicity when injected in nude mice. Instead, cells in which HERV-K expression was interfered the rate of proliferation and differentiation remain unchanged compared to the parental A375 cells. However, *in vivo* essays their tumorigenic potential was found to be reduced.

Finally, aiming at the development of a novel gene therapy approach for cancer differentiation I developed an adenoviral delivery system which offers several advantages compared to retroviruses, most important the fact that adeno-delivered sequences remain as non-integrated episomes and the infection can be repeated several times to improve the efficiency of infection.

PAROLE CHIAVE

Retrotrasposoni

Retrovirus Endogeni

Proliferazione cellulare

Differenziamento

Tumorigenesi

INTRODUZIONE

▪ **Gli elementi mobili del genoma**

Nel 2001 è stata completato il sequenziamento del genoma umano ed è inaspettatamente emerso che i geni costitutivi dell'intero organismo sono solo 1,2% del genoma mentre circa il 45% è formato da elementi trasponibili (International Human Genome Consortium 2001). Finora l'interesse scientifico, è stata focalizzato sui geni codificanti per proteine e sul loro ruolo biologico nella cellula, mentre gli elementi trasponibili sono stati tradizionalmente considerati come DNA parassita o DNA "spazzatura" (Bannert & Kurth, 2004) senza una funzione biologica definita.

Gli elementi trasponibili, sequenze mobili in grado di spostarsi nel genoma, sono stati scoperti negli anni '50 da Barbara McClintock, ma fino agli anni '70 questa scoperta non ha avuto dalla comunità scientifica la rilevanza che avrebbe dovuto avere in quanto ritenuti elementi parassiti privi di qualsiasi funzione.

Tuttavia, la scoperta che gli elementi trasponibili rappresentino la principale componente del genoma umano ne ha rinnovato l'interesse e richiamato ulteriori studi.

Gli elementi trasponibili si distinguono in trasposoni (2,8% del genoma) e retrotrasposoni (42,2% del genoma): i primi si mobilizzano sulla base di un meccanismo di "cut and paste", mentre i retrotrasposoni traspongono per mezzo di un RNA intermedio.

Solitamente il processo di retrotrascrizione avviene in due fasi: una prima fase comprende la trascrizione, maturazione e traduzione dell'mRNA che codifica, oltre che per altri geni, anche per la trascrittasi inversa (RT) e una seconda fase in

cui la RT come enzima utilizza il suo RNA come stampo per retrotrascriverlo in una copia di cDNA che poi andrà ad integrarsi nel genoma.

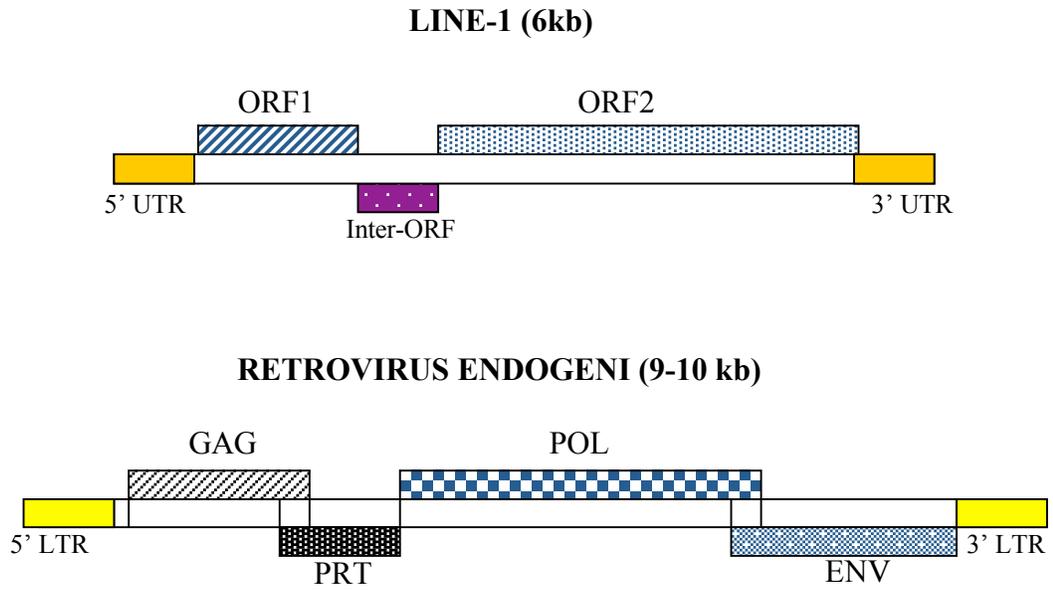
I retroelementi si distinguono in due grandi gruppi: i retrotrasposoni alle cui estremità si trovano sequenze LTR (Long Terminal Repeats) – in questa categoria sono inclusi i retrovirus endogeni (ERVs) (8,3% del genoma) - ed i retrotrasposoni non-LTR che comprendono i LINE (Long Interspersed Elements) e SINE (Short Interspersed Elements) (33.9% del genoma). Sia i LINE che gli ERVs sono retrotrasposoni autonomi in grado, cioè, di retrotrasporre in modo indipendente in quanto portatori del gene che codifica l'RT; al contrario, i SINE sono delle piccole sequenze di circa 300 pb che non codificano per nessuna proteina e utilizzano la RT fornita dai LINE per retrotrasporre (J. Hasler, T. Samuelsson and K. Strub, 2007) Fig.1;

Come si vede dalla figura 1 l'organizzazione strutturale degli ERVs è analoga a quella dei retrovirus infettivi, costituita essenzialmente da tre geni codificanti *Gag* – una proteina del capsido virale di 76 Kda necessaria perché le particelle mature siano infettive, *Prf/Pol* - proteasi e trascrittasi inversa, quest'ultima formata da una polimerasi e un'integrasi, e *Env* - una proteina del capsido.

L'organizzazione degli elementi LINE è completamente differente rispetto a quella degli HERV essendo costituita da due Open Reading Frames (ORF1 + ORF2); la prima ORF codifica un RNA binding protein, mentre ORF2 codifica oltre all'RT anche una endonucleasi (EN).

La differenza di sequenza che si evidenzia nelle diverse famiglie di retroelementi è probabilmente dovuta ad una diversa origine ancestrale che viene fatta risalire ad eventi infettivi da parte di retrovirus avvenuti nel corso dell'evoluzione. In seguito

Retrotrasposoni Autonomi



Retrotrasposoni non autonomi

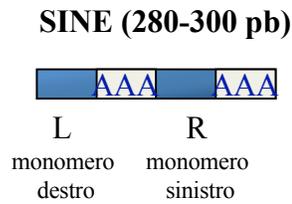


Fig. 1: Struttura delle tre principali famiglie di retroelementi: LINE-1, retrovirus endogeni e sequenze SINE.

alle infezioni, le sequenze retrovirali si sono integrate come provirus fissandosi nel genoma della linea germinale e sono state trasmesse di generazione in generazione in maniera mendeliana. Tali sequenze nel corso dell'evoluzione hanno subito notevoli mutazioni della sequenza primaria che ne hanno alterato la capacità codificante fino al punto da non essere più in grado di formare dei virus replicativi, ma si è sviluppato un rapporto di simbiosi con l'ospite (Bannert N. and Kurth R., 2004; Dewannieux et al. 2007).

RETROVIRUS ENDOGENI

I retrovirus endogeni sono stati classificati in 22 famiglie (HERV-K; HERV-W; HERV-L ecc.), dal tipo di tRNA isoaccettore che viene utilizzato come primer nel processo di retrotrascrizione.

Approfonditi studi sui livelli di espressione degli HERV in diversi tessuti sono stati compiuti negli ultimi anni grazie allo sviluppo di nuovi sistemi di analisi come Microarray e Real Time RT-PCR. Questi studi hanno evidenziato come le diverse famiglie di HERV siano quasi ubiquitariamente espresse a livelli basali in maniera tessuto specifica. In particolare un incremento dei livelli di espressione degli HERV è stato rilevato in tessuti di origine placentare, embrionale o in tumori.

La maggior parte degli HERV sono pertanto trascrizionalmente attivi, ma non sono infettivi e non sono in grado di formare delle particelle retrovirali, in quanto le sequenze codificanti le proteine retrovirali sono spesso troncate o pesantemente mutate.

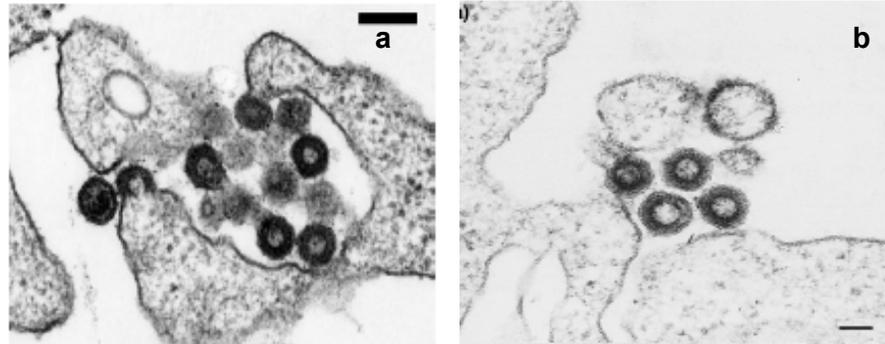
E' stato dimostrato che, ad esempio, HERV-E, HERV-F e HERV-W sono trascrizionalmente attivi in tutti i tessuti ad eccezione del retto e dell'ovario, mentre HERV-H è espresso preferenzialmente proprio in questi tessuti (Seifarth et al.,

2004). La famiglia degli HERV-W è invece espressa in maniera predominante nella placenta e, a questo proposito, è interessante rilevare che il gene *env* di HERV-W codifica la sincizina, una proteina che riveste un ruolo biologico fondamentale nella funzione placentare (Okahara et al., 2004). Inoltre HERV-W è espresso anche in diversi tipi di tumore come quello del pancreas, della prostata, dello stomaco o della pelle (Yi Jm et al., 2004).

La famiglia degli HERV-K è l'unica famiglia, formata da 50-60 copie provirali, altamente conservate nel corso dell'evoluzione ed in grado di codificare tutte le proteine retrovirali necessarie per la formazione della particella retrovirale matura. HERV-K è espresso a livello basale e in molti tessuti normali come il muscolo, la pelle o il cervello, mentre è fortemente espresso in diversi tipi di tumori come il teratocarcinoma (Loewer et al, 1984; Herbst et al., 1998), il tumore alla mammella (Wang-Johanning et al., 2003), il carcinoma della prostata (Muster et al., 2003; Buescher et al., 2005), i tumori della linea germinale e nel melanoma. In cellule tumorali di teratocarcinoma (Bannert and Kurth., 2004) e di melanoma, ma non in melanociti o in linfonodi normali, sono state viste per microscopia elettronica la presenza di particelle retrovirali di HERV-K mature rilasciate per gemmazione nel supernatante (Fig. 2 A)(Bannert and Kurth., 2004) dove è stata riscontrata un'attività di RT. (Muster et al., 2003) (Fig.2 B).

La capacità di HERV-K di formare delle particelle retrovirali mature è spesso legata al corretto splicing del mRNA di *env* che avviene esclusivamente in cellule tumorali (Buscher et al. 2005; Lower 1999). Il trascritto full length di *env* in seguito a splicing alternativo codifica per due differenti proteine *env* e *rec* entrambe necessarie per la formazione del capsido delle particelle retrovirali mature (Galli et al., 2005). Quale sia la relazione che intercorre tra l'espressione di *env*, la

A



B

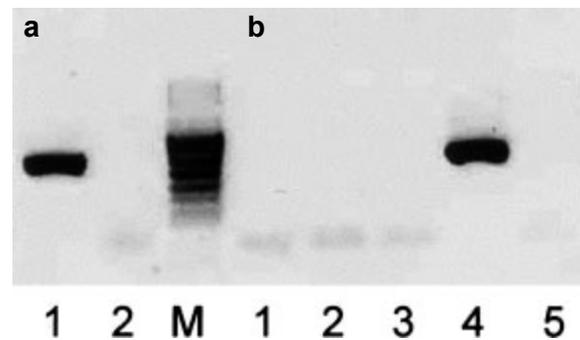


Fig. 2 A) Analisi per microscopia elettronica di particelle di HERV-K a) prodotte e b) rilasciate in cellule di teratocarcinoma. (Bannert and Kurth, 2003)
B) Presenza di particelle retrovirali nel supernatante di cellule di melanoma a) 1) RT-PCR con primer specifici per l'amplificazione di pol sul supernatante di cellule di melanoma 518A2 2) controllo dell'assenza di DNA contaminante. M marker di peso molecolare . b) amplificazione per PCR di DNA genomico con primer specifici per pol 1;2) controllo senza DNA, 3) DNA genomico di cellule MDBK ; 5) controllo negativo senza Taq polimerasi. (Muster et al., 2003)

formazione di particelle virali e lo sviluppo tumorale non è stata ancora chiarita, ma ci sono diversi studi per cercare di stabilire se l'espressione di HERV-K può essere un target nella diagnosi dello stadio del tumore.

SINE e LINE-1

La classe dei retrotrasposoni non-LTR, comprende sia gli elementi autonomi LINE (Long Interspersed Element) che le sequenze SINE (Short-1 Interspersed Element) che utilizzano la RT dei LINE-1.

Nel genoma umano le sequenze SINE sono principalmente rappresentate dagli elementi Alu (chiamate così per via della loro sensibilità all'enzima di restrizione Alu) tali sequenze caratterizzano i genomi dei primati. Nell'uomo gli elementi Alu hanno una lunghezza variabile da 150 a 300 bp ed ammontano a $1,2 \times 10^6$ copie costituendo circa il 10% dell'intero genoma. Le sequenze Alu possono influire sull'architettura del DNA, non solo per la loro capacità di retrotrasporre, ma anche perché possono indurre eventi di ricombinazione omologa non allelica favorendo delezioni o duplicazioni di grandi regioni cromosomiali (Hasler et al., 2007 and Jurka et al., 2004). Negli ultimi anni è stato dimostrato un ruolo importante degli Alu nella regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale, infatti queste sequenze possono influire sul processo di splicing alternativo determinando la produzione di proteine differenti, ma possono anche regolare l'espressione di miRNA favorendo o bloccando il processo di trascrizione del miRNA stesso (Borchert et al. 2006).

A differenza delle sequenze Alu, gli elementi LINE-1 hanno una lunghezza completa di circa 6 Kb e sono presenti in circa 500000 copie nel genoma umano anche se la maggior parte degli elementi sono troncate nella regione 5'; di fatto,

solo 80-100 copie di LINE-1 sono full-length e capaci di retrotrasporre (Brouha et al., 2003).

La trascrizione del LINE-1 è regolata dalla presenza di un promotore interno alla regione 5'UTR presente solo negli elementi intatti, si estende per la lunghezza dell'elemento e termina in prossimità del 3'UTR.

Tra la regione 5'UTR e la regione 3'UTR ci sono 2 sequenze codificanti ORF1 e ORF2 separate da un spacer non codificante di 63pb. ORF1 codifica una proteina p40 in grado di legare l'RNA la cui funzione, sebbene non sia stata ancora completamente definita, sembra sia di svolgere un ruolo nel processo di retrotrascrizione per l'assemblaggio di complessi ribonucleoproteici (Martin SL., 2006). ORF2 è lunga circa 3800 pb e codifica una proteina di 150 KDa con tre domini conservati: un dominio amminoternale con attività endonucleasica (EN), un dominio centrale che codifica la RT e uno zinc-finger C-terminale (Fanning & Singer, 1987).

Il processo di retrotrascrizione del LINE-1 si può dividere in due fasi: una prima fase in cui il LINE-1 è trascritto e l'mRNA è trasportato nel citoplasma dove viene tradotto e una seconda fase in cui RT e p40 formano complessi ribonucleoproteici col loro stesso mRNA che sono rilocalizzati nel nucleo. L'attività endonucleasica introduce dei tagli su un'elica del DNA genomico in una regione ricca in AT, (la sequenza di consensus è solitamente TTTT/A) e la RT utilizza questo sito come primer per iniziare la retrotrascrizione dell' RNA. (Luan DD et al., 1993) (Fig.3).

Implicazioni funzionali di LINE-1

Gli eventi di retrotrasposizione in cellule somatiche terminalmente differenziate sono rari, tuttavia quando avvengono possono produrre importanti conseguenze

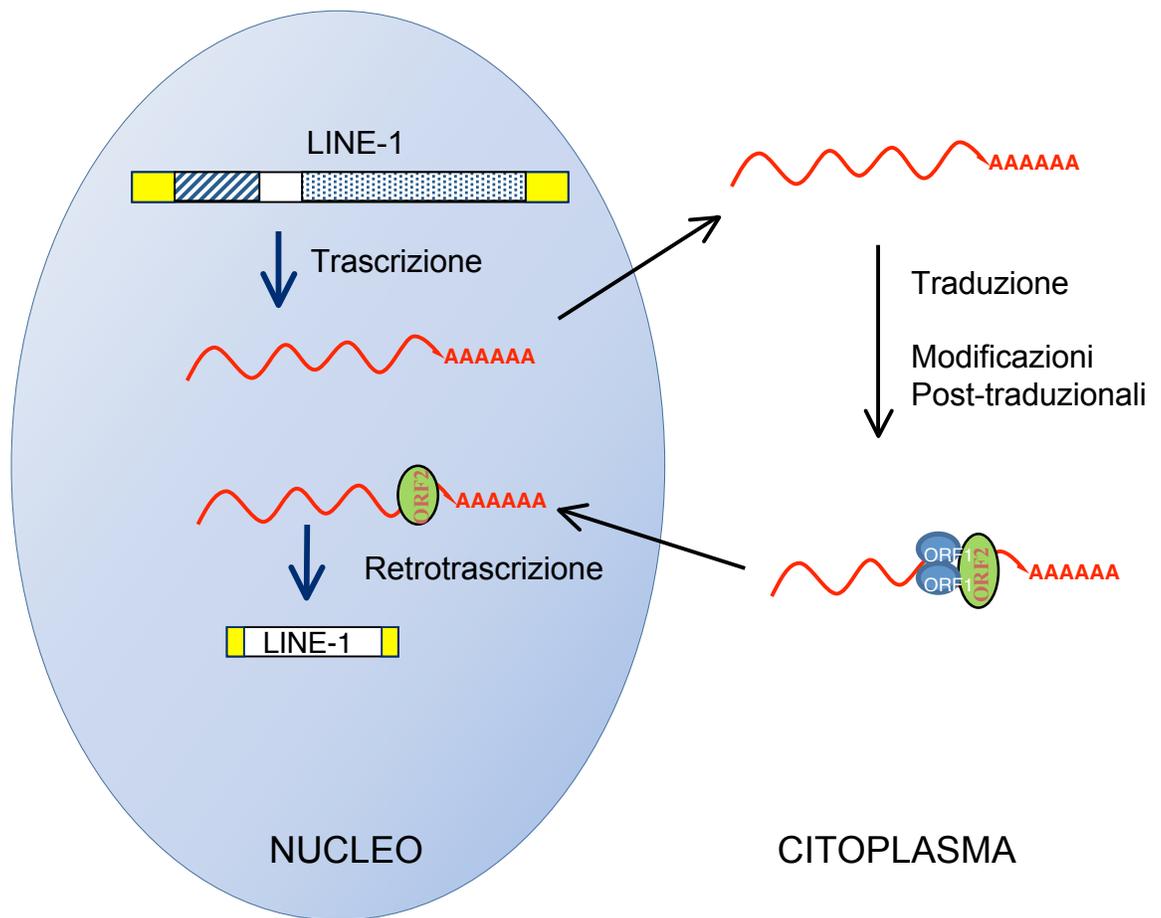


Fig. 3 Meccanismo di retrotrasposizione. L'elemento LINE-1 è trascritto, l' mRNA viene trasportato nel citoplasma. ORF1 e ORF2 sono tradotte, si associano loro stesso mRNA, il complesso ribonucleoproteico è rilocalizzato nel nucleo e retrotrascritto.

nel genoma inducendo mutazioni ed eventi di ricombinazione con cambiamenti sia strutturali che funzionali (Ostertag and Kazazian., 2001). L'inserzione di elementi mobili all'interno di esone genico può, ad esempio, in modo simile ad un "knocking-out" naturale alterare profondamente o silenziare l'espressione di un gene, mentre inserzioni in prossimità di geni ne possono modulare l'espressione in modo epigenetico (Martin and Whitelaw 2001; Kazazian et al., 1998; Nekrutenko and Li., 2001). La trascrizione genica può essere ulteriormente alterata se la sequenza retrotransposonica neo inserita introduce nuovi siti di splicing che alterino il processo di maturazione del mRNA (Feuchter-Murthy et al., 1993), le sequenze riconosciute dai fattori di trascrizione e da recettori ormonali (Maj A, et al. 2005) o nuovi promotori. Dal momento che ognuno di questi eventi generato da una retrotrasposizione può rivelarsi catastrofico per il funzionamento della cellula si sono evoluti diversi meccanismi per bloccare gli eventi di retrotrasposizione. A questo scopo, nelle cellule terminalmente differenziate le sequenze LINE-1 sono ipermetilate e preferenzialmente accumulate in regioni eterocromatiche del genoma la cui espressione è mantenuta repressa (Kondo and Issa., 2003) e l'attività RT è assente o rimane a livelli basali (Medstrand and Blomberg., 1993). Non sempre e non in tutti i tessuti l'espressione di LINE-1 è fisiologicamente repressa: per esempio, nella fase iniziale dello sviluppo embrionale l'espressione di LINE-1 e l'attività della RT aumentano notevolmente, in seguito alla progressiva ed attiva de-metilazione del genoma nelle cellule embrionali l'espressione del LINE-1 è favorita (Schultz et al., 2006). Nel corso dello sviluppo embrionale murino infatti tra lo stadio di 1 cellula e lo stadio di 4-8 cellule avviene una consistente demetilazione dei LINE-1 seguita da una elevata espressione in concomitanza con l'attivazione genica embrionale (EGA).

Sia l'espressione di LINE-1 che RT svolgono un ruolo fondamentale nei primi stadi dello sviluppo embrionale, come dimostrato in precedenti studi condotti nel nostro laboratorio; infatti l'inibizione farmacologica della RT (Pittoggi et al., 2003) o il silenziamento dell'espressione LINE-1 mediante microiniezione di oligonucleotidi L1-mirati nel nucleo maschile dello zigote (Beraldi et al., 2006), determinano entrambi un arresto irreversibile dello sviluppo embrionale allo stadio di 2-4 cellule precludendo la possibilità di impianto e di ulteriore sviluppo dell'embrione. Nel loro insieme queste osservazioni suggeriscono un possibile coinvolgimento dei retrotrasposoni, e dei geni che li costituiscono, nel controllo del programma di sviluppo attraverso la modulazione dell'espressione genica embrionale.

Inoltre un incremento dell'espressione LINE-1 e dell'attività della RT è stato osservato in seguito all'esposizione della cellula a fattori di stress come shock termico, cicloesimide, agenti genotossici (Hagan et al., 2003), ma anche indotto in svariate patologie come l'emofilia, l'arteriosclerosi, la schizofrenia e i tumori (Ostertag and Kazazian, 2001; Chen JM., 2005). A questo proposito, si è visto che l'overespressione di LINE-1 è particolarmente marcata in diversi tipi di tumori sia umani che murini (Martin and Branciforte, 1993; Brattahuer and Fanning del 1992).

Sulla base di quanto detto, emerge pertanto che LINE-1 è espresso ad alti livelli sia negli embrioni che nei tumori; è infatti noto fin dalla seconda metà del XIX secolo che embrioni e tumori hanno in comune caratteristiche istologiche e che, come si è visto più recentemente, condividono anche numerose caratteristiche cellulari, biochimiche e molecolari, quali un'elevata capacità proliferativa, un basso livello differenziativo, una generale ipometilazione del genoma ed analogie dell'espressione genica.

L'INIBIZIONE DELL'RT ENDOGENA RIDUCE LA PROLIFERAZIONE CELLULARE E PROMUOVE IL DIFFERENZIAMENTO NELLE CELLULE TRASFORMATE

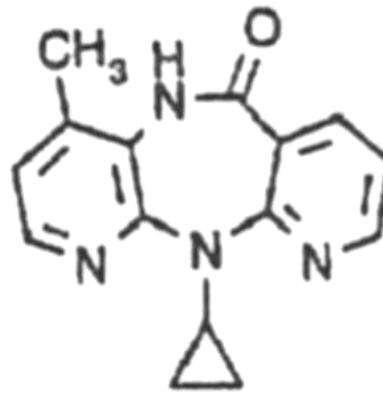
Sulla base di quanto detto, nel corso degli ultimi anni, il nostro laboratorio ha focalizzato i suoi sforzi su uno studio finalizzato alla comprensione del potenziale ruolo della RT nella genesi dei tumori e nella progressione tumorale. L'approccio sperimentale scelto è stato di inibire l'attività della RT endogena nelle cellule tumorali e di valutarne gli eventuali effetti sulla proliferazione e sul differenziamento.

Da una serie di lavori sviluppati in questa prospettiva (Mangiacasale et al., 2003; Sciamanna et al., 2005; Landriscina et al., 2005) è emerso che l'inibizione farmacologica dell'attività RT - presente in diverse linee cellulari tumorali sia umane che murine indipendentemente dall'origine istologica del tumore – provoca una drastica riduzione della proliferazione cellulare e contemporaneamente ne induce il differenziamento. A questo scopo sono stati utilizzati due inibitori non nucleosidici della RT, correntemente impiegati nella terapia antiretrovirale dell'AIDS, nevirapina ed efavirenz (Fig. 4A), i quali hanno dimostrato, in questa circostanza, di essere in grado di inibire non solo la RT di HIV ma anche quella endogena presente nelle diverse linee cellulari sia murine che umane (Fig 4B) (Mangiacasale et al., 2003).

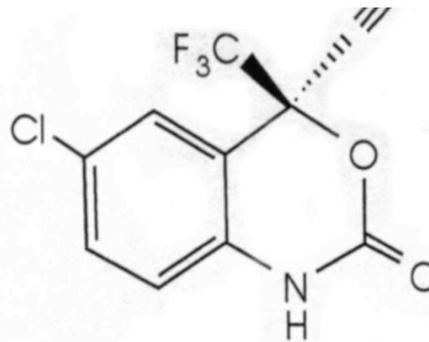
E' interessante osservare come l'abbassamento della proliferazione, che segue l'inibizione di RT, non sia dovuto ad un effetto citotossico ma piuttosto ad un rallentamento della progressione del ciclo cellulare, dato che l'esposizione ai due

A

NEVIRAPINA



EFAVIRENZ



B

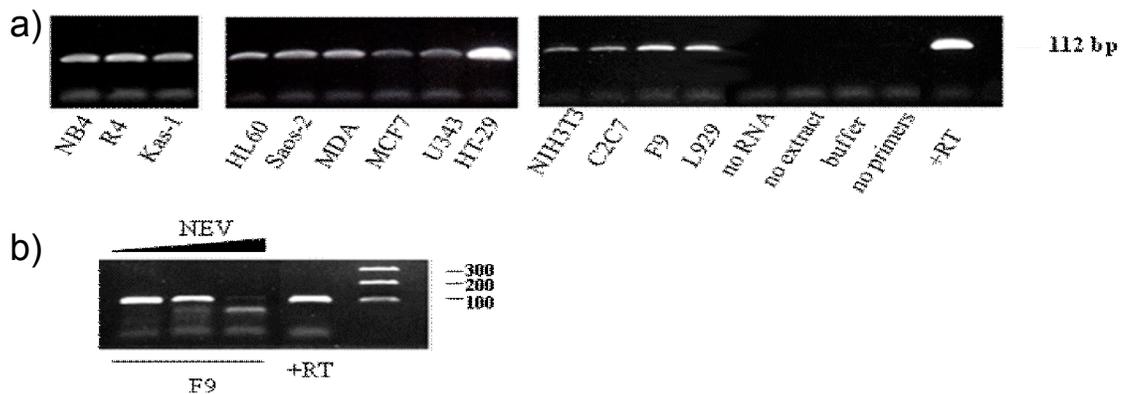


Fig. 4 A) Struttura chimica di Nevirapina ed Efavirenz, due inibitori non nucleosidici della Trascrittasi Inversa B) Test di attività della Trascrittasi Inversa a) su diverse linee cellulari umane e murine b) su cellule F9 trattate con 1, 10 e 100 μ M nevirapina (Mangiacasale et al., 2003)

inibitori determina un accumulo delle cellule in fase G1/G0 ed un parallelo abbassamento dei livelli di espressione della Ciclina D. L'alterazione dell'espressione genica interessa non solo geni coinvolti nella proliferazione cellulare, come la ciclina D, c-myc o Bcl2, ma anche geni del differenziamento tessuto specifici. Ad esempio cellule PC3 di carcinoma prostatico, in seguito a trattamento con nevirapina sono indotte ad esprimere due marcatori specifici del differenziamento dell'epitelio della prostata quali PSA (antigene specifico della prostata) e AR (recettore degli androgeni). E' rilevante come l'espressione di AR renda sensibili alla terapia ormonale tumori prostatici che invece sono originariamente resistenti, (Sciamanna et al., 2005). Similmente, cellule del carcinoma tiroideo anaplastico - incapaci di legare lo iodio necessario per la sintesi degli ormoni tiroidei - in seguito al trattamento con nevirapina, ri-esprimono il recettore TSH, ristabilendo la capacità assorbire iodio e di sintetizzare gli ormoni tiroidei (Landriscina et al., 2005). Anche in questo caso, la ristabilita capacità cellulare di legare lo iodio consente l'utilizzo dello iodio radioattivo (I^{131}) a scopo terapeutico in un tumore che, come già detto, è originariamente resistente a questo tipo di trattamento terapeutico. Inoltre, anche le cellule del melanoma, resistenti alla maggior parte dei trattamenti chemioterapici convenzionali, in seguito al trattamento con nevirapina o efavirenz tendono a differenziare formando dei prolungamenti simil-dendritici e mostrando una ridotta capacità invasiva (Sciamanna et al., 2005). In questo caso, le caratteristiche differenziate sono associate all'espressione dell'e-caderina, un proteina responsabile delle interazioni cellula-cellula che è solitamente espressa nei melanociti differenziati, ma non nelle cellule tumorali (Hsu et al., 2000).

Gli effetti indotti dagli inibitori RT su diverse linee cellulari tumorali *in vitro*, hanno avuto un riscontro positivo anche in studi *in vivo*, trattando con efavirenz topi nudi atimici inoculati con diverse linee cellulari tumorali umane, quali A375 (melanoma), PC3 (carcinoma della prostata), H69 (microcitoma), HT29 (carcinoma del colon). Dopo circa un mese di trattamento nei topi cui è stato somministrato il farmaco la progressione dei tumori è notevolmente rallentata rispetto a quella degli animali controllo (Sciamanna et al. 2005). Anche se studi sistematici non sono stato ancora effettuati, gli inibitori di RT sembrerebbero avere ricadute positive anche nei trattamenti umani come emerge da alcuni casi sporadici riportati in letteratura (Landriscina et al., 2006; Modoni et al., 2007). In entrambi i casi, il trattamento con nevirapina ha prodotto la scomparsa, o la riduzione, di lesioni metastatiche da un carcinoma primario tiroideo inducendo anche la sensibilità al trattamento con I¹³¹. Retrospectivamente, questi dati sono in buon accordo con osservazioni epidemiologiche condotte negli ultimi anni su pazienti affetti da HIV che hanno sviluppato forme tumorali come il Sarcoma di Kaposi o il Linfoma di Burkitt. In seguito a trattamento con terapia antiretrovirale (highly active antiretroviral therapy, HAART) di cui fanno parte sia la nevirapina che l'efavirenz - si è osservato in molti pazienti una riduzione delle dimensioni del tumore e/o una diminuzione delle lesioni tumorali (Levine AM., 2006; Di Lorenzo G., et al 2007). In generale, questi effetti sono stati attribuiti ad una migliorata risposta immunitaria dei pazienti trattati, ma, alla luce di quanto esposto sopra, potrebbero essere anche dovuti ad una diretta azione inibitoria degli inibitori retrovirali sull'attività della RT endogena nei tumori. Il cocktail di farmaci utilizzato nella terapia antiretrovirale di HIV comprende diversi inibitori di RT retrovirale sia inibitori nucleosidici (NRTI) che non nucleosidici della RT (NNRTI): i primi interferiscono

con la neo-sintesi del genoma virale bloccando il processo di retro-trascrizione vero e proprio, mentre gli inibitori non nucleosidici legandosi in prossimità del sito catalitico bloccano direttamente l'attività enzimatica.

Alla luce di questi risultati complessivi, nevirapina ed efavirenz grazie al loro effetto anti-proliferativo e differenziativo potrebbero essere annoverati come potenziali farmaci utilizzabili in una nuova terapia differenziativa dei tumori. In particolare, questo approccio sembra essere più efficace nel trattamento di metastasi o di tumori refrattari alle terapie convenzionali, come il carcinoma della prostata ormone-resistente o il tumore tiroideo anaplastico.

In questo contesto si inquadra il lavoro che io ho svolto nell'ambito di questa tesi di dottorato che era finalizzato allo sviluppo di una terapia genica – in sostituzione del trattamento farmacologico con inibitori RT - il cui target è stato il silenziamento dell'espressione dei retrotransposoni LINE-1 quali sorgente di attività RT nei tumori umani.

MATERIALI E METODI

Colture Cellulari

Cellule A375 (ATCC-CRL-1619), HO-1 di melanoma e melanociti FM516 sono stati coltivati in terreno D-MEM complementato con il 10% di Siero fetale bovino, 2 mM di L-glutamina, e antibiotici. Cellule pancreatiche normali LT2 sono state messe in coltura in terreno SCR016 della Chemicon complementato con diversi fattori di crescita (SCR015 Chemicon), mentre cellule Bx-PC3 di carcinoma del pancreas sono state coltivate in terreno RPMI. Fibroblasti fetali embrionali WI-38 e la loro controparte trasformata WI-38/VA13 sono stati cresciuti in MEM complementato con il 10% di siero fetale bovino, 2 mM di L-glutamina, e antibiotici. Tutte le linee cellulari sono state mantenute in un incubatore umidificato a 37°C e 5% di CO₂.

Gli esperimenti in cui sono state utilizzate le cellule HO-1, FM516, LT2 e Bx-PC3 sono stati condotti nel laboratorio del Prof. P.B. Fisher presso la Columbia University, New York (NY USA). Le cellule WI-38/VA13 ci sono state fornite dal Prof. T. Misteli (National Institute of Health, NIH, Bethesda USA).

Tutte le linee cellulari sono state seminate in piastre da 6 pozzetti alla stessa densità (5×10^4 cellule per pozzetto), trattate con Nevirapina 350 μ M e DMSO 0,2% e contante nella camera di Burker dopo 96h di trattamento. La conta per ogni campione è stata ripetuta per due volte. La Nevirapina è stata purificata dalle compresse di Viramun (Boeringher-Ingelheim) disponibili commercialmente, come descritto in Pittoggi et al., 2003.

Produzione dei vettori retrovirali ed infezione cellulare.

Un'oligonucleotide di 19 pb GAGAACGCCACAAAGATAC complementare alla sequenza 1492-1511 degli elementi LINE-1 attivi descritti nel lavoro Brouha et al.,2003 (in supplementar information fig.6) e un oligonucleotide di 17 pb GATCCCCTTTTTGGAAA (Scrambled), che non riconosce nessuna sequenza specifica nel genoma sono stati clonati in un vettore pS-neo/EGFP (Oligoengine, Seattle, WA, USA, PRT-0006), precedentemente digerito con due enzimi di restrizione *Bgl*II e *Hind*III, abbiamo così ottenuto rispettivamente due plasmidi: pS-L1i in grado di interferire con l'espressione del LINE-1 e pS-Scr utilizzato come controllo negativo. Per interferire con l'espressione di HERV-K, abbiamo invece clonato un oligonucleotide di 19 pb TCCCAGTAACGTTAGAACC, disegnato sulla sequenza 1877-1896 nella regione codificante per GAG di HERV-K (numero di accesso AF164617), in un vettore pS-puro (Oligoengine PRT-0002), sempre digerito precedentemente con due enzimi di restrizione *Bgl*II e *Hind*III.

Le particelle virali sono state prodotte in cellule packaging Phoenix piastrate 24h prima della trasfezione (6×10^5 flask da 25 cm²). Le cellule sono state trasfettate con 2 µg di DNA di ogni costrutto (pS-neo, pS-puro, pS-L1i, pS-H-Ki e pS-Scr) e come carrier della trasfezione è stata utilizzata la lipofectamina (Lipofectamine Reagent, GibcoBRL, San Giuliano Milanese, Italia); la trasfezione è stata fatta seguendo il protocollo consigliato dalla ditta produttrice.

Dopo 48h dalla trasfezione, il supernatante delle cellule è stato raccolto, centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti e filtrato attraverso un filtro con dei pori di 0,45 µm.

Le cellule A375 sono state infettate in presenza di polybrene 4 µg/ml per 12h dopodiché il terreno di coltura è stato sostituito e le cellule sono state selezionate

in base alla resistenza all'antibiotico espressa dal plasmide. Le cellule infettate con il vettore pS-puro e pS-H-Ki sono state selezionate in presenza di puromicina (SIGMA) 0,5 $\mu\text{g/ml}$ per 48h, mentre le cellule infettate con il vettore pS-neo, pS-L1i e pS-Scr sono state selezionate in presenza di G418 600 $\mu\text{g/ml}$ (Invitrogen) per 7 giorni. Le cellule sono state mantenute in coltura in presenza di puromicina a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ e di G418 200 $\mu\text{g/ml}$ e ogni 96h sono state contate con la camera di Burker e ripiastrate alla stessa densità.

Immunofluorescenza indiretta

Le cellule sono state seminate su vetrino coprioggetti sterilizzato con il calore, dopo 24h sono state pre-permeabilizzate per 8 minuti con la soluzione CSK I composta da 0,5% Triton-X100, 10 mM PIPES, 100mM KCl, 300 mM saccarosio, 1 mM EGTA e 3 mM MgCl_2 e fissate con Formaldeide al 4% per 10 minuti.

Le cellule fissate sono state incubate per 30 minuti a 37°C in una camera umida con siero di capra al 20% poi per 1 ora con l'anticorpo policlonale anti-L1-EN diluito 1:40 (Ergun et al., 2004) o con anti-env di HERV-K(Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA) diluito 1:70. I vetrini sono stati lavati per tre volte con PBS contenente TWEEN 0,05% e incubati per 30 minuti rispettivamente con anticorpi anti-chicken e anti-rabbit coniugati con la rodamina (Jackson Immunoresearch Laboratories, Westgrove, PA, USA) diluiti 1:600. I nuclei sono stati colorati con 4,6 diamidino-2-fenilindole (DAPI) 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Dopo un paio di lavaggi in PBS, i vetrini coprioggetti sono stati montati su vetrini portaoggetti con il Vectashield (Vector Laboratories). I preparati cellulari sono stati analizzati al microscopio (Leica, Milano, Italy, TCS4D) attrezzato per acquisire l'epiluminescenza con una camera raffreddata (Coolsnap).

RT-PCR Semiquantitativa

L'analisi dell'espressione genica è stata condotta estraendo il RNA dalle cellule lisate in TRIZOL (Invitrogen), seguendo il protocollo consigliato dalla ditta produttrice. L'RNA estratto è trattato con DNAsi Amplification Grade (Invitrogen) per 15 minuti a temperatura ambiente, l'enzima viene inattivato mettendo il campione di RNA per 10 minuti a 65°C e poi subito in ghiaccio. I cDNA vengono sintetizzati a partire da 250 ng di RNA iniziale utilizzando il Kit Themoscript (Invitrogen) con oligo dT, la reazione di cDNA sintesi avviene in un volume finale di 20 µl.

Per ogni reazione di PCR vengono utilizzati 2 µl di cDNA, sono amplificati con Taq Platinum DNA Polymerase kiy (Invitrogen) e 30 pmol di oligo specifici (MWGBiotech, Ebersberg, Germany). Ogni reazione di PCR è iniziata con un primo step a 94°C per 2 minuti, seguito da cicli formati da 30 sec a 94°C, 30 sec tra 54-58 °C e 1 minuto a 72°C. Ogni coppia di oligo è stata utilizzata per successive amplificazioni in serie in un numero di cicli variabile da 25 a 31.

I prodotti di PCR sono frazionati su gel d'agarosio 1%, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e ibridati con un oligo interno marcato terminalmente con [³²P]γ-ATP per 16h a 42°C.

Gli oligo utilizzati per innescare l'amplificazione senso (F) e antisenso (R), e l'oligo interno utilizzato per l'ibridazione sono i seguenti;

C-myc PCR prodotto di amplificazione di 633 bp; F, 5'-gtcacacccttctcccttcg-3'; R, 5'-tgtgctgatgtgtggagacg-3'; INT, 5'-agagaagctggcctcctacc-3'

Cyclin D1 PCR prodotto di amplificazione di 720 bp; F, 5'-ccctcgggtgcctacttcaa-3'; R, 5'-tcctcctcttctcctcctc-3'; INT 5'-cgcacgatttcattgaacac-3'

Gapdh PCR prodotto di amplificazione di 590 bp; F, 5'-aggggtctacatggcaactg-3';
R, 5'-accagaagactgtggatgg-3'; INT, 5'-gtcagtggtggacctgacct-3'

α-5 integrin PCR prodotto di amplificazione di 519 bp F, 5'-cccaatgaaggctggaactc-
3'; R, 5'-agtgatgagatggtcccgct-3'; INT, 5' -caagttcattcagcaaggca-3'

Mda-7 PCR prodotto di amplificazione di 620 bp F, 5'-ccccagaaaactgtgggaagc-3';
R, 5'-aaaccgctgtgtgcactgt-3'; INT, 5' caactgcaaccagtcaga-3'

Orf1 LINE-1 PCR prodotto di amplificazione di 498 bp F, 5'-
agaaatgagcaaagcctcca-3'; R, 5'-gcctggtggtgacaaaatct-3': INT 5'
taagggcagccagagagaaa-3'

Orf2 LINE-1 PCR prodotto di amplificazione di 339 bp F, 5'-
tccagcagcacatcaaaaag-3'; R, 5'-ccagttttgcccattcagt-3'; INT 5'-
aaagaacaaagctggaggca-3'

HERV-K pol PCR prodotto di amplificazione di 890 bp F, 5'-
tgtggaaatgaccagacaa-3'; R, 5'-ttgacactgggtgcaatgtt-3'; INT 5'-
atgtcacatggaaacaggca-3'

HERV-K env PCR prodotto di amplificazione di 434 bp F, 5'-tggcctcacaccacattaga-
3'; R, 5'gcaatgcaactcctgctaca-3'; INT 5'-ctggtgagagcaagagaggg-3'

Lamin A/C PCR prodotto di amplificazione di 319 bp F, 5'-acatggagatccacgcctac-
3'; R, 5'ggtgatggagcaggtcatct-3'; INT 5'-atggagatgatcccttgctg-3'

Analisi per Western Blot

Le cellule sono state raccolte in PBS con 0,1 mM PMSF e inibitori di proteasi (1mM pepstatina e 1 mM Leupetina) e lisate in Trizol (Invitrogen). L'estrazione delle proteine è stata fatta seguendo le indicazioni della ditta. La concentrazione delle proteine è stata stabilita utilizzando un saggio colorimetrico Comassie (Pierce). Per ogni campione 20 µg di estratto proteico totale è stato frazionato su gel di acrilammine NuPAGE Novex (Invitrogen), trasferito su membrana di nitrocellulosa. Il filtro viene pre-ibridato con TBS-TWEEN-latte al 5% per 30 minuti a temperatura ambiente e poi lasciato ad ibridare tutta la notte a 4°C con anticorpo policlonale EN-L1 diluito 1:40 o con un anticorpo anti-tubulina (SIGMA T5168) diluito 1:1000 in TBS-TWEEN-latte al 5%. Come anticorpi secondari sono stati utilizzati un anti-chicken HRP-coniugato (Jackson Immunoresearch Laboratories 703-035-155) o un anti-mouse HRP-coniugato (Biorad, Segrate, MI Italia). Il segnale è stato visualizzato utilizzando un sistema di rivelazione della chemiluminescenza (ECL-Plus; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Produzione di vettori adenovirali e purificazione

Per ottenere un vettore adenovirale in grado di interferire e con l'espressione del LINE-1 abbiamo inizialmente clonato l'oligonucleotide interferente di 19 pb GAGAACGCCACAAAGATAC in un vettore p-Siren (Clontech cat n° 631527), e un oligonucleotide Scrambled come controllo negativo (Clontech cat n° 632457); questi plasmidi è stati successivamente digeriti con due enzimi di restrizione *Pi-Sce* e *I-Ceu-I* (Clontech). Per ottenere il genoma adenovirale ricombinato con la sequenza interferente o con la sequenza scrambled, 1 µg di plasmide digerito è stato incubato con il genoma 750 µg di DNA adenovirale (Adeno-X Clontech) e

l'enzima DNA ligase per una notte a 16°C. I vettori pAdeno-L1 e pAdeno-Scr, sono stati digeriti con PacI (Invitrogen) per liberare le sequenze ITR (Sequenze ripetute terminali) che contengono l'origine di replicazione del DNA adenovirale e consentono la replicazione del vettore una volta che è stato trasfettato on cellule HEK-293.

Per produrre le particelle adenovirali, 1×10^6 cellule HEK-293 sono state piastrate 24h prima della trasfezione in piastre da 60 mm e sono state trasfettate rispettivamente con 1 μ g di pAdeno-L1 e pAdeno-Scr digerito utilizzando la lipofectamina (Invitrogen) secondo le indicazioni della casa produttrice.

Dopo una settimana dalla trasfezione le cellule muoiono per effetto citopatico dovuto alla replicazione virale, le cellule lisate vengono raccolte e centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti, il pellet risospeso in 500 μ l di PBS sterile e congelato e scongelato per tre cicli consecutivi, ricentrifugato e raccolto il supernatante.

Il 50% del lisato cellulare è utilizzato per infettare le cellule HEK-293 aggiungendolo direttamente nel mezzo di coltura. Una settimana dopo le cellule di nuovo sono morte, si raccoglie il lisato e si conserva a -20°C come Stock di Amplificazione Primaria.

Per preparare uno stock con un elevato titolo virale di Adeno-L1 e Adeno-Scr da poter utilizzare per gli studi sugli animali, abbiamo infettato, per ogni vettore virale, 8 piastre da 175 mm² di cellule HEK-293 semiconfluenti; dopo 4-5 giorni dall'infezione quando circa il 50% si è staccato dalla superficie della piastra, le cellule sono state raccolte congelate -80°C e scongelate a 37°C ciclicamente per tre volte. Per purificare l'Adeno-L1 e Adeno-Scr è stato utilizzato un Kit Clontech secondo le indicazioni della ditta. Le aliquote dei due adenovirus sono state conservate a -80°C.

Titolazione del virus

Per determinare il titolo virale per ogni virus sono stati seminati 12 pozzetti in una multiplastra con 5×10^5 HEK-293 cellule per pozzetto. Lo stock virale purificato è stato diluito in PBS con diluizioni seriali di 10 in 10 partendo da 10^{-2} fino a 10^{-6} . 100 μ l di diluizione virale è aggiunta goccia a goccia ad ogni pozzetto e le cellule sono incubate a 37°C al 5% di CO₂ per 48h. Dopo di che le cellule sono fissate con metanolo glaciale 100% per 10 minuti a -20°C e poi incubate con un anticorpo anti-Hexon (Clontech antibody diluito 1:1000 in PBS+BSA1% per 1h a 37°C. Dopo 3 lavaggi in PBS+BSA1%, le cellule sono state incubate con anticorpo anti-mouse HRP coniugato (Clontech) per 30 minuti a 37°C. Il segnale è stato rilevato utilizzando Soluzione DAB 10X diluita 1:10 con un buffer perossidasi e aggiunta alla cellule per 10 minuti a temperatura ambiente.

Al microscopio a contrasto di fase, utilizzando un obiettivo 20X, sono state contate il numero di cellule marrone/nero positive alla colorazione con l'anticorpo in almeno 3 campi per pozzetto.

Il calcolo del titolo virale espresso in pfu/ml è stato fatto seguendo la formula:

$$\frac{(\text{cellule infettate in ogni campo}) \times (\text{campi contati per ogni pozzetto})}{(\text{volume del virus (ml)} \times \text{il fattore di diluizione})}$$

Inoculo di cellule tumorali e trattamento degli animali

Topi nudi atimici di 5 settimane sono stati inoculati sottocute con 5×10^6 cellule di melanoma A375 di controllo, A375 pS-Scr, A375 pS-neo, A375 pS-puro, A375 pS-L1i and A375 pS-H-Ki diluite in 100 μ l di PBS. La crescita del tumore è stata misurata con il calibro due volte a settimana. Il volume del tumore è stato calcolato utilizzando la formula lunghezza x altezza x ampiezza (Umekita et al., 1996).

Gli animali trattati con i vettori adenovirali, sono stati inoculati sottocute con cellule A375 di melanoma, quando il tumore ha raggiunto la dimensione di 75mm^3 , gli animali sono stati divisi in due gruppi e trattati rispettivamente con Ad-Scr e Ad-L1i particelle virali a giorni alterni (10^7pfu/ml), diluite in $100\ \mu\text{l}$ di PBS e iniettate in loco sul tumore come descritto in Sarkar et al., 2005. Tutti gli animali sono stati trattati in accordo con le direttive della Comunità Europea.

RISULTATI

- **IL TRATTAMENTO CON NEVIRAPINA RIDUCE LA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE TUMORALI MA NON DI QUELLE NORMALI**

Precedenti studi condotti nel nostro laboratorio avevano dimostrato che il trattamento con Nevirapina ed Efavirenz, due inibitori della Trascrittasi Inversa, di diverse linee cellulari tumorali riduceva la proliferazione e ne induceva il differenziamento (Mangiacasale et al. 2003; Sciamanna et al., 2005).

Allo scopo di verificare se questi inibitori producessero conseguenze simili anche su cellule non tumorali, abbiamo confrontato gli effetti della Nevirapina su tre linee cellulari normali e tre corrispondenti linee tumorali con la stessa origine istologica: a) melanociti FM-516 e una linea cellulare di melanoma HO-1; b) cellule pancreatiche non tumorali LT2 e cellule espianate da un paziente affetto di tumore al pancreas Bx-PC3; c) una linea di fibroblasti embrionali WI-38 e gli stessi fibroblasti embrionali trasformati in vitro WI-38/VA13.

Le cellule sono state seminate alla stessa densità, trattate con Nevirapina (350 μ M) o con DMSO (controllo) e contate dopo 96h normalizzando rispetto al controllo. Come mostrato negli istogrammi della figura 5, in tutti e tre i sistemi le cellule tumorali trattate con Nevirapina mostrano una riduzione della proliferazione del 70% in paragone ai loro rispettivi controlli normali nei quali si ha una riduzione di circa il 20%, tuttavia considerata non significativa

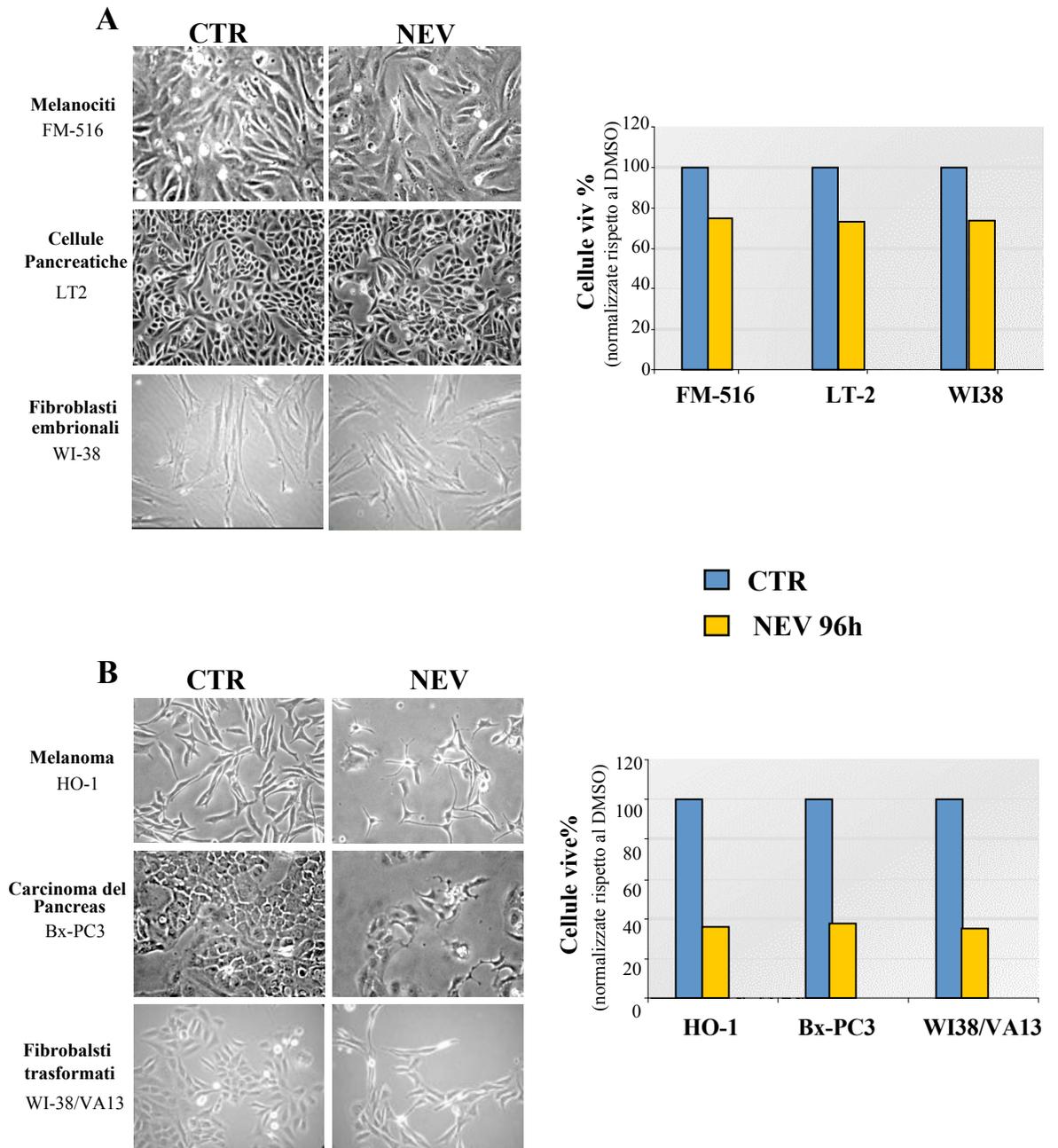


Fig.5: Effetto della nevirapina su diverse linee cellulari normali e tumorali

A: Foto al microscopio a contrasto di fase di cellule normali trattate con DMSO (CTR) e con nevirapina (NEV) per 96h.

B: Foto al microscopio a contrasto di fase di cellule tumorali trattate con DMSO (CTR) e nevirapina (NEV) per 96h.

I grafici mostrano la percentuale di cellule vive normalizzate rispetto al controllo considerato come 100.

Inoltre, la microscopia a contrasto di fase non rileva differenze significative tra le colture non tumorali esposte e non esposte alla Nevirapina (Fig 5 A) mentre tra le linee tumorali trattate nello stesso modo si evidenzia una notevole differenza sia nel numero di cellule tra i due campioni che nella morfologia. Questo è particolarmente evidente nella linea di melanoma HO-1 dove, in seguito a trattamento con nevirapina, si vede chiaramente anche un cambiamento morfologico (Fig 5A) caratterizzato da prolungamenti simil dendritici e una forma stellata assente nelle cellule di controllo che hanno una forma più rotondeggiante. Questi risultati suggeriscono pertanto che l'effetto della nevirapina si manifesta selettivamente sulla proliferazione delle cellule tumorali come un effetto citostatico e non citotossico in quanto il livello massimo di mortalità per apoptosi è del 15% in tutte le linee cellulari analizzate.

- **L'ESPRESSIONE DEL LINE-1 E' RIDOTTA IN CELLULE A375 DI MELANOMA INFETTATE CON UN VETTORE RETROVIRALE CHE ESPRIME siRNA SPECIFICO PER IL LINE-1.**

Dal lavoro precedentemente svolto nel mio laboratorio sappiamo che l'inibizione dell'attività RT codificata dal LINE-1 gioca un ruolo nella regolazione della proliferazione e differenziamento cellulare delle cellule tumorali. Questo è stato dimostrato riducendo in maniera specifica l'espressione del LINE-1 per RNAi in cellule A375 (Sciamanna et al., 2005).

Partendo da questi risultati abbiamo sviluppato un sistema di vettori retrovirali in grado di integrarsi nel genoma dell'ospite ed esprimere stabilmente un RNA a

doppia elica (dsRNA) di 19 pb complementare alla regione ORF1 del LINE-1, in grado di bloccarne l'espressione in maniera efficiente e stabile.

Il vettore pSuper-Retro da noi utilizzato, oltre l'oligo interferente, è costituito dal genoma retrovirale, cui è stata tolta la regione replicativa, fornito alle estremità 5' e 3' di due sequenze LTR e del gene per la resistenza alla neomicina utile per la selezione delle cellule che sono state infettate con successo. Le particelle retrovirali mature sono state prodotte utilizzando delle cellule competenti Phoenix, che esprimono stabilmente i geni per la maturazione e l'assemblaggio delle particelle retrovirali e le rilasciano nel supernatant. Come mostrato schematicamente nella fig.6 cellule A-375 sono state infettate, selezionate ed utilizzate per saggiare i livelli di espressione di LINE-1 sia

per RT-PCR che per Immunofluorescenza e Western-Blot utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere la porzione endonucleasica della proteina codificata dall'ORF2 del LINE-1 (anti-L1 EN) (Ergun et al., 2004).

Come mostrato nella figura 7 A, la Trascrittasi Inversa (EN-L1 segnale in rosso) ha una distribuzione perinucleare nelle cellule di controllo infettate col solo vettore pS-Neo (pannelli a, b), mentre nelle cellule interferite (pS-L1i) i suoi livelli di espressione sono fortemente abbassati, e un debole segnale di fondo è appena rilevabile (pannelli c, d). In buon accordo con questi risultati, l'analisi per Western Blot ha confermato che nelle cellule interferite la quantità di RT è drasticamente ridotta di circa 70% rispetto alle cellule di controllo, sia della forma full length di 159 kDa che delle forme troncate a più basso peso molecolare riconosciute dall'anticorpo. (Ergun et al., 2004) (Fig. 7 B e C).

Come evidenziato dall'analisi per RT-PCR, si nota una forte parallela riduzione dei livelli di espressione dell'mRNA del LINE-1; sia per la regione ORF1 che ORF2,

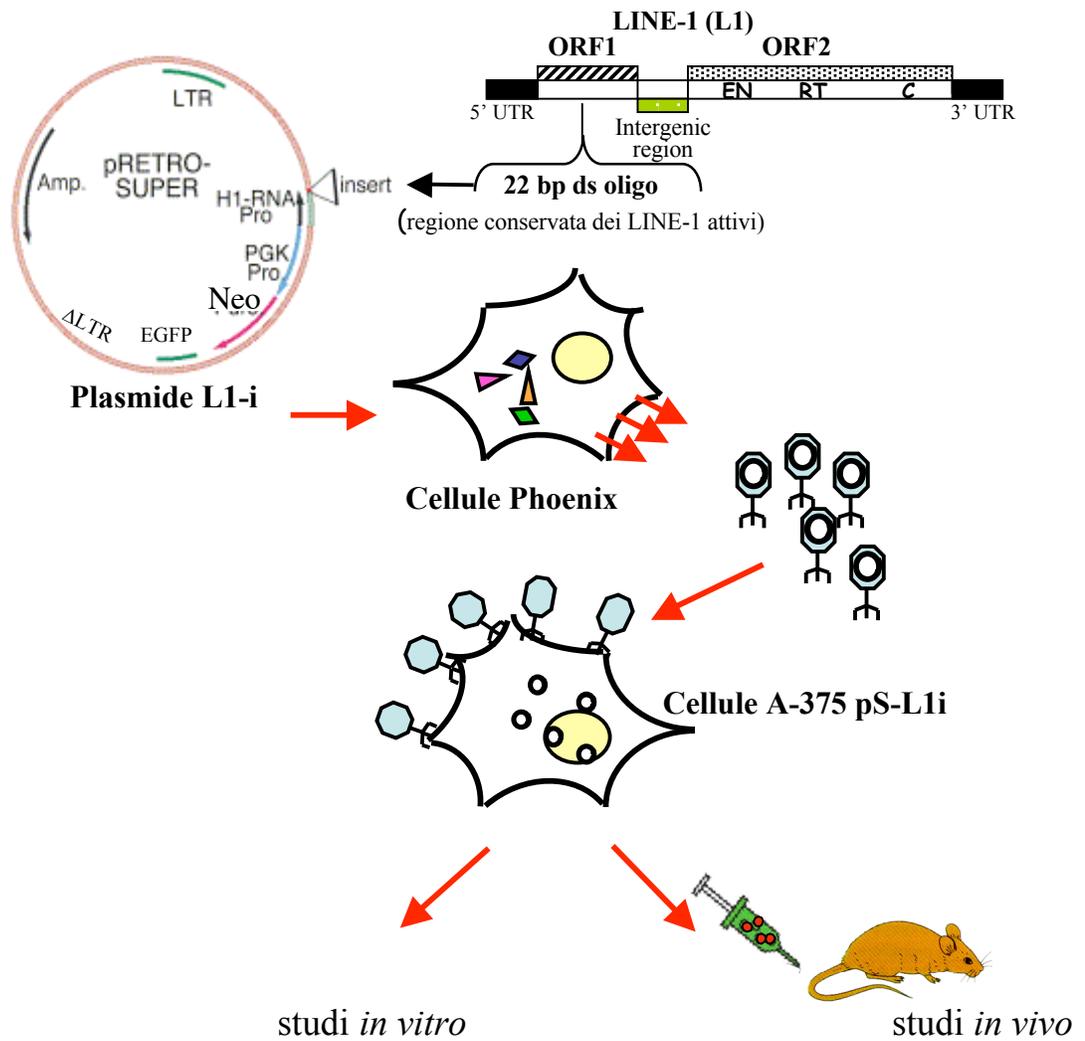


Fig.6: Modello sperimentale

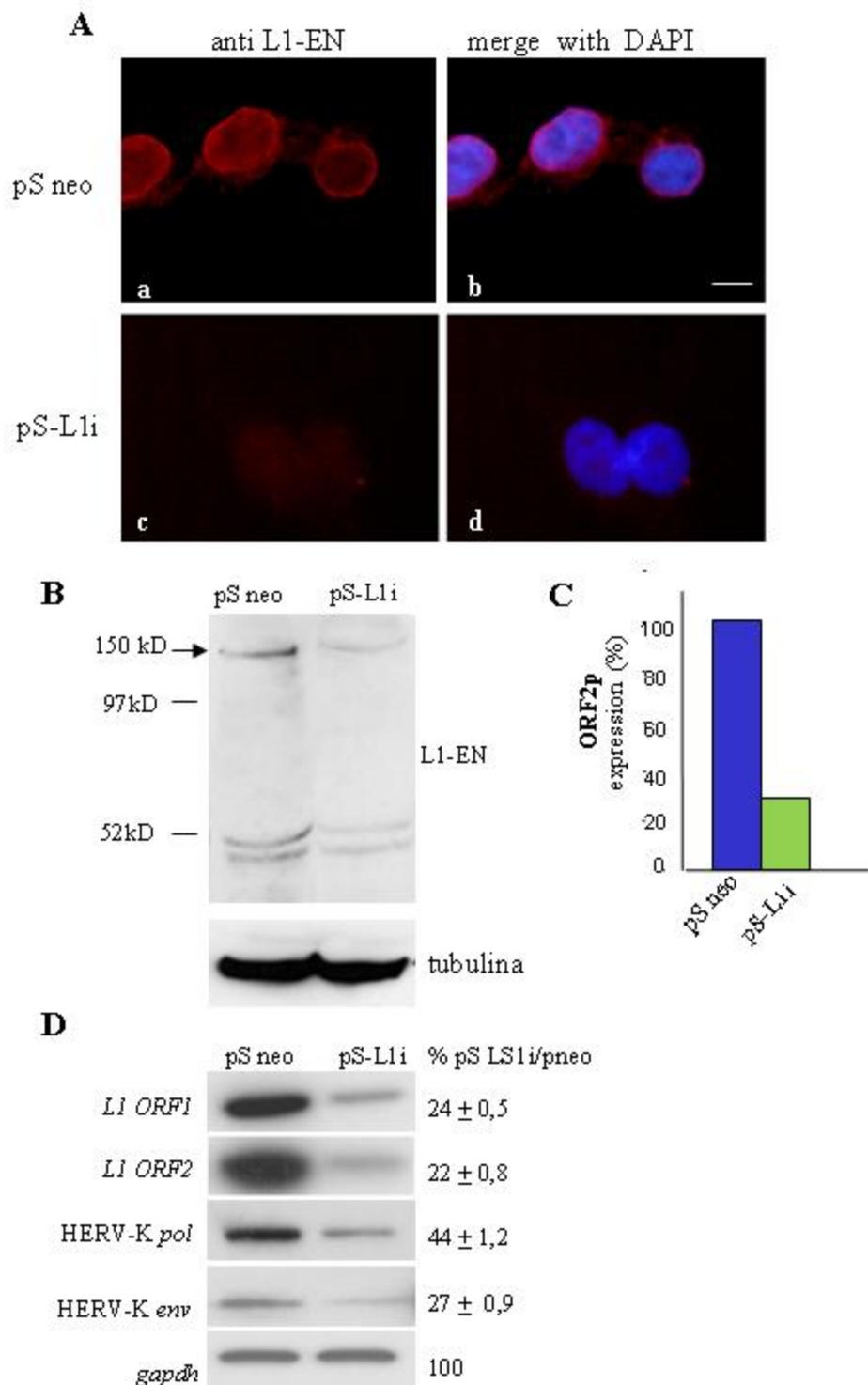


Fig 7: Cellule A375 interferite per l'espressione del LINE-1 utilizzando dei vettori retrovirali.

A) Immunofluorescenza su A375 pS-Neo (a, b) and A375 pS-L1i (c,d) con anticorpo L1-EN (in gradi di riconoscere l'endonucleasi dell' RT in rosso e il DNA colorato con DAPI (blue). Bars 10 mm

B) Analisi per Western Blot ibridato con anticorpo anti-L1-EN, la quantità di proteine è normalizzata con α -tubulina C) L'istogramma rappresenta l'analisi densitometrica delle bande di ORF2 normalizzata sul segnale della tubulina

D) Analisi per RT-PCR ORF1 e ORF2 del LINE-1; Pol ed Env di HERV-K e GAPDH da RNA estratto da cellule infettate con pS Neo e pS-L1i.

che si riducono di circa 80% nelle cellule pS-L1i rispetto al controllo pS-neo (Fig 7 D).

Inoltre, l'interferenza dell'espressione di L1 riduce anche l'espressione di un altro retroelemento il retrovirus endogeno K (HERV-K) che è fortemente espressa nel melanoma. Come mostrato nella Fig. 7 C, sia l'espressione di *pol* che di *env* di HERV-K è fortemente ridotta nelle cellule interferite per l'espressione del LINE-1 indicando chiaramente che l'inibizione del LINE-1 non solo influenza l'espressione di geni costitutivi (vedi Introduzione), ma anche di altre famiglie di retroelementi. La possibilità di un artefatto dovuto ad una interferenza crociata tra LINE-1 e HERV-K è esclusa poiché l'oligo di 19pb utilizzato per interferire l'espressione del LINE-1 non ha nessuna omologia di sequenza con HERV-K.

▪ **L'INIBIZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL LINE-1 RIDUCE LA PROLIFERAZIONE CELLULARE E INDUCE DIFFERENZIAMENTO.**

Gli effetti più vistosi indotti nelle cellule A375 interferite (pS-L1i) rispetto quelle di controllo (pS-neo) sono un rallentamento della proliferazione cellulare e dei cambiamenti morfologici associati, questi ultimi, all'induzione di un processo differenziativo.

Sia le cellule interferite che quelle di controllo sono state piastrate alla stessa densità e contate dopo 16, 23 e 33 giorni dall'infezione e le conte sono state normalizzate sulle cellule di linea A375 non infettate considerate come il 100%. Come si può vedere dai dati riportati nell'istogramma in Fig.8 con il passare dei giorni le cellule interferite hanno una ridotta proliferazione, valutata intorno al 70% rispetto sia alla linea parentale che alle cellule infettate con il vettore di controllo.

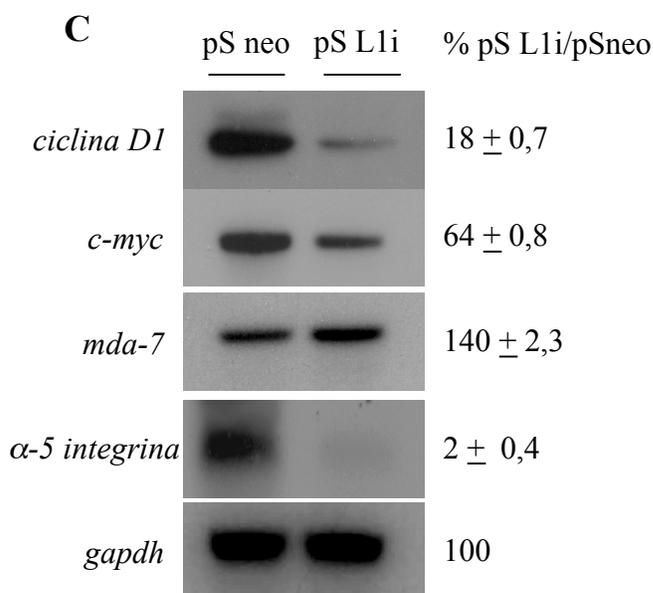
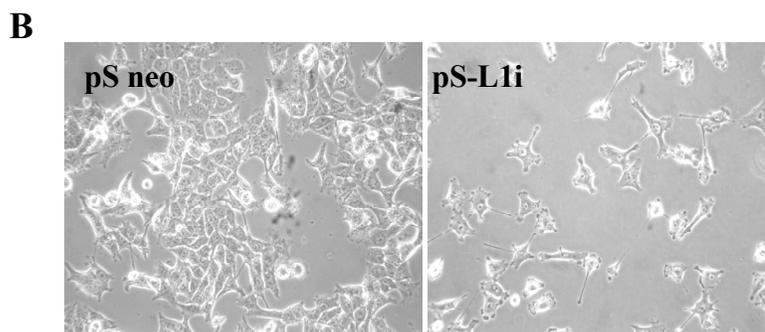
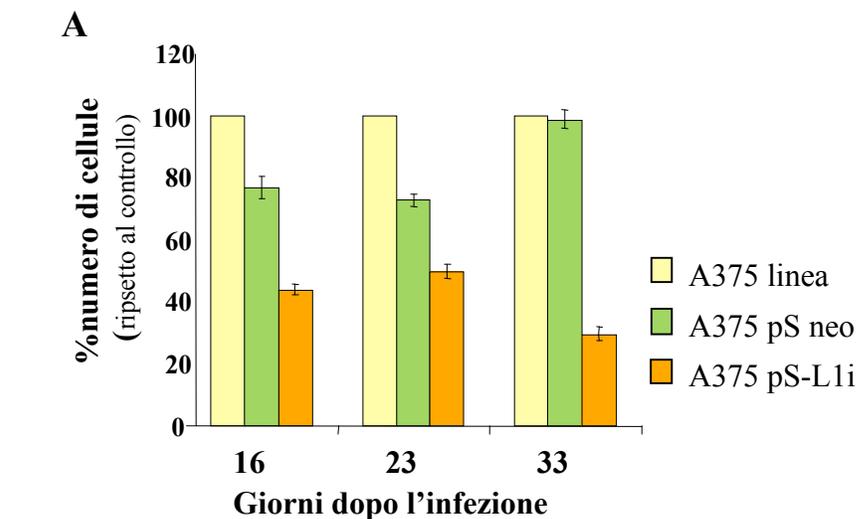


Fig.8: Effetti sulla proliferazione cellulare e sul differenziamento dell'interference del LINE-1.

A) Cellule A375 di linea, A375 pS-neo e pS-L1i sono state piastrate alla stessa densità e contate 16, 23 e 33 giorni dopo l'infezione. Il numero di cellule è stata normalizzato rispetto al controllo considerato come 100.

B) Foto di cellule A375 pS-neo e pS-L1i al microscopio a contrasto di fase

C) Analisi dell'espressione per RT-PCR semiquantitativa di diversi geni in cellule A375 pS-neo e pS-L1i dopo 14 giorni dall'infezione

Le cellule A375 pS-neo subiscono anch'esse una transitoria riduzione della proliferazione (intorno al 30%) nei primi giorni dopo l'infezione rispetto alla linea non infettata, ma a tempi più avanzati (33 giorni dall'infezione), quando si osserva l'effetto antiproliferativo è massimo, le A375 pS-neo riprendono a proliferare come la linea parentale (Fig.8 A). Il rallentamento della proliferazione cellulare è associato alla modulazione di alcuni geni come la ciclina D1 e c-myc, entrambi coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare (Sauter et al., 2002; Ross et al., 2006). La cui analisi di espressione rileva un abbassamento di circa 80% della ciclina D1 e del 40% di c-myc (Fig. 8 C).

Analogamente a quanto osservato con esperimenti di inibizione transitoria dell'espressione di LINE-1 (Sciamanna et al., 2005), le A375 pS-L1i mostrano tipici cambiamenti morfologici caratterizzati da prolungamenti simil-dendritici e da una forma stellata mentre le cellule pS-neo sono più rotondeggianti (Fig 8 B). In concomitanza, si è osservato un aumento dell'espressione di mda7 (melanoma differentiation agent-7) un marcatore del differenziamento dei melanociti (Dent et al., 2005) e un abbassamento dell'espressione della α -5 integrina (Quia et al., 2005), che a differenza di mda7, è solitamente espressa nelle cellule tumorali scarsamente differenziate (Fig.8 C).

▪ HERV-K NON HA UN RUOLO NEL CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE E DEL DIFFERENZIAMENTO CELLULARE

Per chiarire se anche altri retroelementi che codificano RT, come HERV-K, sono coinvolti nella regolazione della proliferazione e dell'induzione al differenziamento

abbiamo infettato cellule A375 con vettori retrovirali che esprime un oligo pS-H-Ki che interferisce con l'espressione di HERV-K.

Dall'analisi per immunofluorescenza, utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere le proteine envelope (ENV) di HERV-K, si può vedere che nelle cellule di controllo infettate col semplice vettore pS-puro, ENV è distribuita in maniera uniforme di sia nel nucleo che nel citoplasma mentre il segnale è abolito nelle cellule infettate col vettore interferente pS-H-Ki (Fig.9 A). L'efficacia dell'interference è ulteriormente confermata anche dall'analisi per RT-PCR che rileva un abbassamento dei livelli di espressione sia di *pol* che di *env* (Fig. 9 C). A differenza di quanto avviene nelle cellule A375 interferite per LINE-1, la soppressione dell'espressione di HERV-K non solo non ha alcun effetto significativo sulla proliferazione cellulare, in quanto sia le cellule pS-H-Ki che quelle pS-puro mostrano una riduzione di circa il 20% rispetto alla linea non infettata (Fig. 9 D) ma è anche ininfluenza sul differenziamento non inducendo alcun apprezzabile cambiamento morfologico. E' interessante anche notare che la soppressione di HERV-K non influisce sui livelli di espressione di ORF1 del LINE-1 (Fig. 9B e C) nè sui geni del differenziamento (*mda-7* e *a-5* integrina) (Fig. 9 C).

▪ **LE CELLULE A375 INTERFERITE PER IL LINE-1 O PER HERV-K HANNO UNA RIDOTTA TUMORIGENICITA'**

Allo scopo di stabilire se gli effetti dell'inibizione dell'espressione di LINE-1 e HERV-K *in vitro* fossero riscontrabili anche *in vivo*,

Per via intradermica abbiamo inoculato 5 gruppi di topi nudi atimici con cellule della linea parentale (CTR), con le cellule infettate con un vettore non-interferente

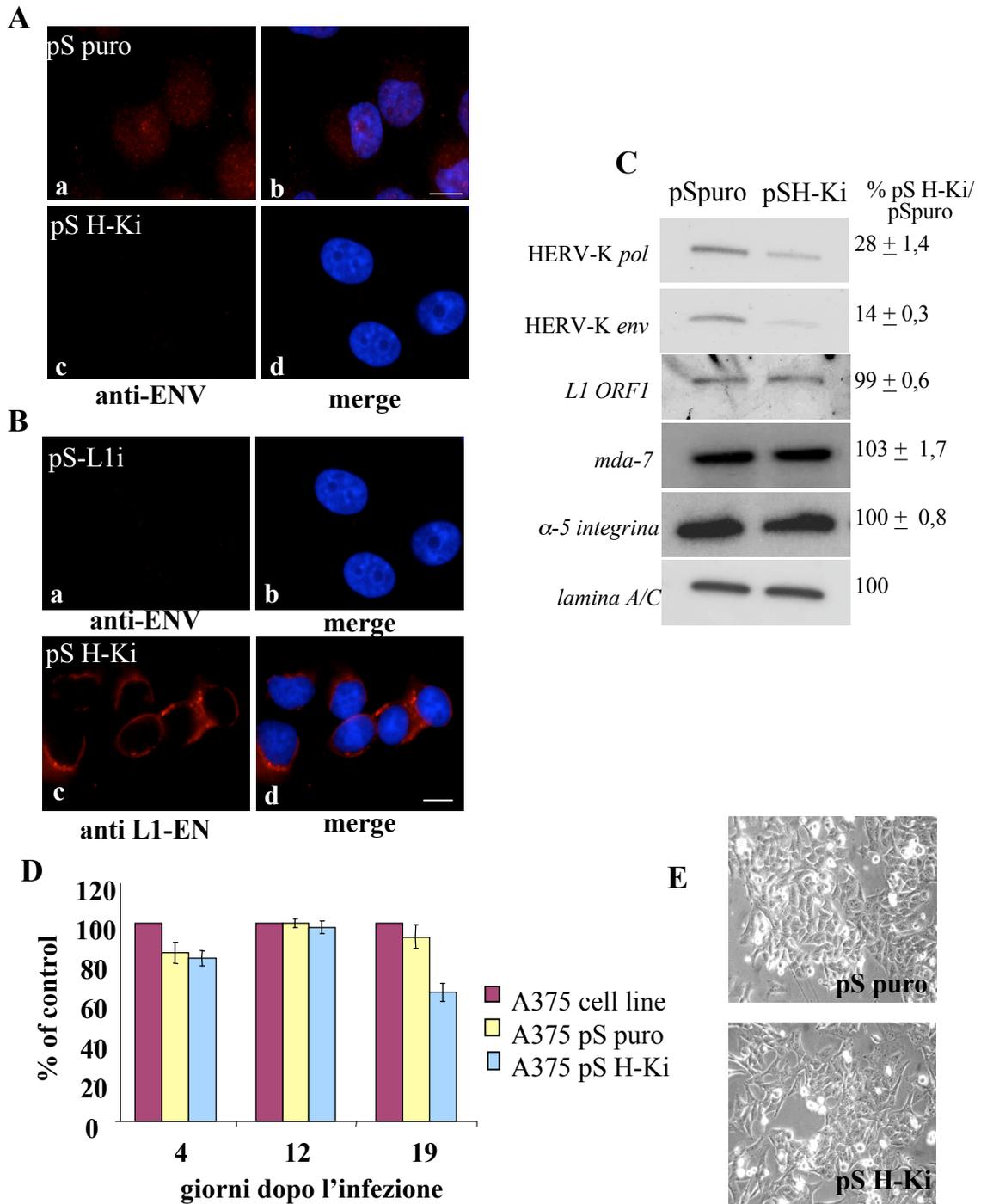


Fig.9: Effetto dell'RNAi di HERV-K su cellule A375 di melanoma

A) Immunofluorescenza con anticorpo anti-ENV di HERV-K e (in rosso) in cellule A375 pS-puro (a,b) e pS-H-Ki (c,d). **B)** Immunofluorescenza di cellule A375 pS-L1i (a,b) e pS-H-Ki (c,d) con anti-L1-EN (in rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI in blu e la barra è di 10 μ m.

C) Analisi per RT-PCR da RNA estratto da cellule A375 pS-puro e pS-H-Ki di diversi geni. La lamina è stata considerata come controllo della quantità di RNA dei diversi campioni. **D)** Cellule A375 di linea, A375 pS-puro e pS-H-Ki sono state piastrate alla stessa densità e contate 4, 12 e 19 giorni dopo l'infezione. Il numero di cellule è stato normalizzato rispetto al controllo considerato come 100

E) Foto di cellule A375 pS-puro e pS-H-Ki al microscopio a contrasto di fase

(pS-neo) o con un vettore che esprime un oligonucleotide non specifico "scrambled" (pS-Scr), con cellule A375 interferite per l'espressione del LINE-1 (pS-L1i) ed interferite per HERV-K (pS-H-Ki).

Come si può vedere dal grafico in figura 10, la crescita tumorale che è stata monitorata misurando il volume dei tumori a scadenze regolari, è fortemente ridotta nei topi inoculati con le cellule interferite per LINE-1 (linea celeste) e, anche se in misura minore, in quelli inoculati con le A375 pS-H-Ki (linea gialla) rispetto ai controlli inoculati con le cellule di controllo non infettate (linea viola), infettate col semplice vettore (linea rosa) e con l'oligo non specifico (linea rossa)

E' pertanto interessante notare che mentre l'interferenza di HERV-K non produce alcun effetto *in vitro*, induce al contrario una significativa riduzione della tumorigenicità quando le cellule crescono all'interno del topo.

▪ **SVILUPPO DI UN SISTEMA DI VETTORI ADENOVIRALI FINALIZZATO PER LA TERAPIA GENICA**

Nel corso degli ultimi anni, vettori adenovirali sono stati preferenzialmente utilizzati rispetto ai vettori retrovirali per trattamenti *in vivo*; in quanto le cui sequenze non si integrano nel genoma, ma rimangono in forma episomale consentendo infezioni multiple e ripetute.

Per questo abbiamo sviluppato un sistema di vettori adenovirali capaci di interferire l'espressione del LINE-1 analogamente a quanto finora descritto con i vettori retrovirali.

Per ottenere un vettore adenovirale abbiamo inizialmente clonato in un plasmide

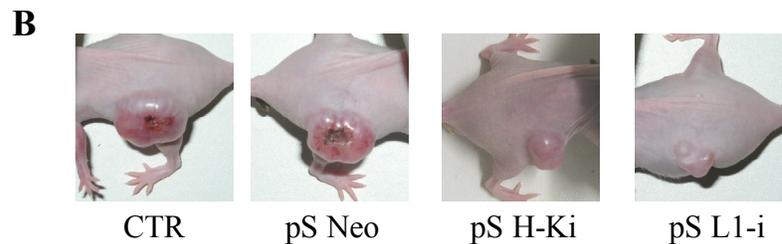
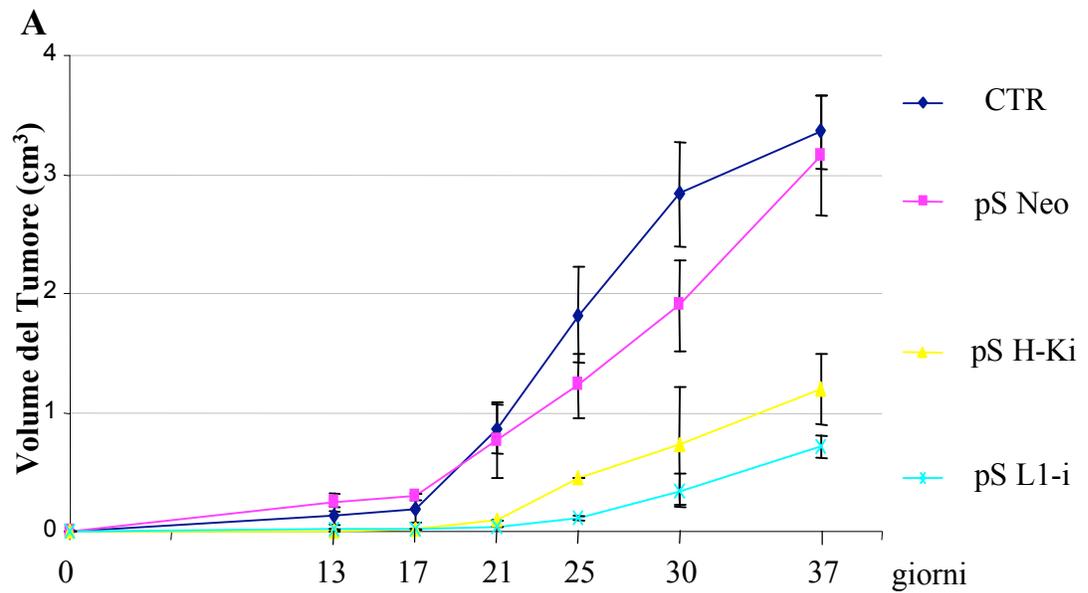


FIG. 10: Le cellule A375 interferite per il LINE-1 e per HERV-K inoculate in topi nudi a timici hanno una minore tumorigenicità.

A) La crescita del tumore è stata monitorata in topi inoculati con cellule A375 di linea (linea blu), cellule infettate con il vettore vuoto pS-neo (linea rosa), con pS-H-Ki (linea gialla) e con pS-L1i (linea celeste). Le curve mostrano la media dei volumi dei tumori di 5 animali misurati a diversi giorni dall'inoculo.

B) Foto rappresentative per ogni gruppo di animali delle dimensioni del tumore dopo 37 giorni dall'inoculo.

l'oligo specifico interferente, targhettato contro LINE-1 (L1i), che è poi stata integrata nel genoma adenovirale (Ad5) per ricombinazione non omologa. Con lo stesso criterio, in un altro plasmide è stata inserito un oligo "scrambled" non in grado di riconoscere alcuna sequenza specifica nel genoma (Scr). In seguito, sono state trasfettate con i due plasmidi aliquote di cellule HEK-293, che esprimono stabilmente i geni E1 necessari per la replicazione e propagazione del virus, dalle quali si è poi raccolto e purificato due popolazioni di particelle adenovirali Ad-L1 e Ad-Scr (Fig. 11 A).

Il titolo virale delle due preparazioni, che è stato valutato utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere una proteina del capsido adenovirale è di $4,6 \times 10^9$ pfu/ml e di $5,73 \times 10^9$ pfu/ml per Ad-Scr e per Ad-L1i, rispettivamente (Fig. 11 B).

Successivamente abbiamo verificato la capacità delle particelle adenovirali di infettare le cellule A375 di melanoma e di ridurre l'espressione di LINE-1 infettando A375 con 100 pfu/cell sia di Ad-scr che di Ad-L1i. Dopo 72h dall'infezione abbiamo valutato i livelli di espressione di LINE-1 per RT-PCR. Come si può vedere dalla figura 11C, le cellule infettate con Ad-L1i mostrano un notevole abbassamento dell'espressione del LINE-1 di circa il 70% sia della regione ORF1 che ORF2. Questo indica che i vettori adenovirali sono in grado di infettare le cellule A375 e il vettore Ad-L1i abbassa significativamente l'espressione del LINE-1.

UTILIZZO DEI VETTORI *IN VIVO*: DATI PRELIMARI

Per via intradermica, abbiamo inoculato topi nudi atimici con cellule A375 di melanoma e, quando i tumori hanno raggiunto una dimensione di 75mm^3 ,

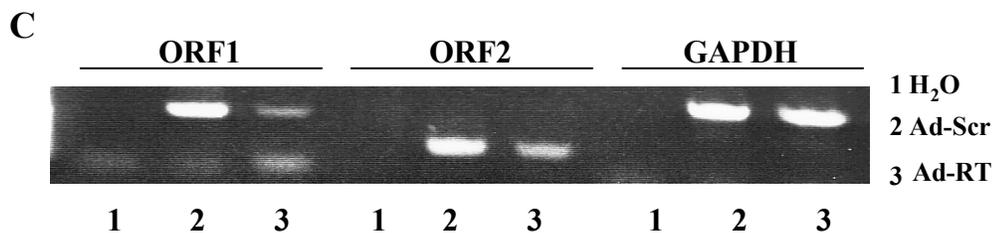
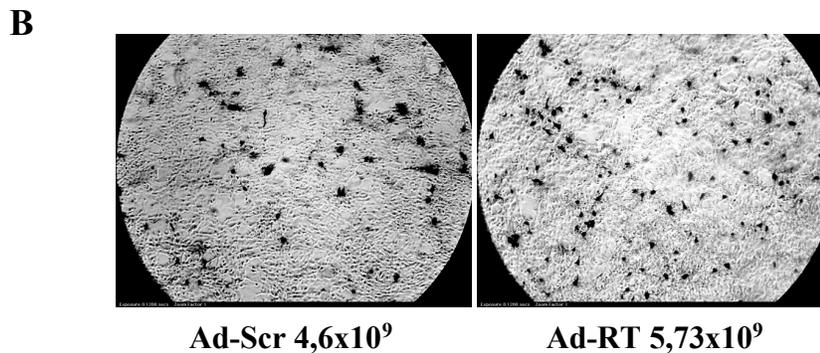
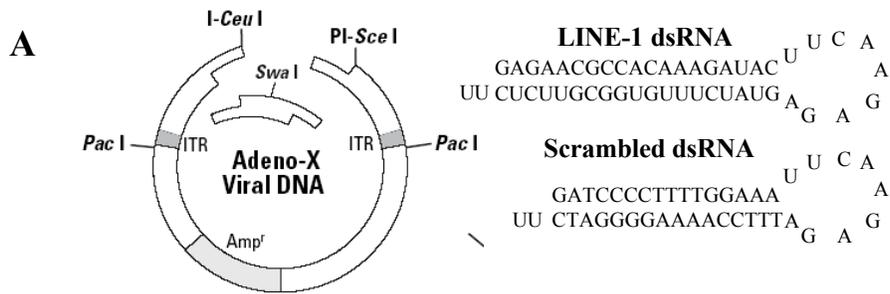


Fig. 11 Vettore Adenovirale: produzione e titolazione.

A) Un modello schematico che rappresenta il vettore adenovirale in cui sono stati clonati un oligo scrambled e un oligo in grado di interferire l'espressione del LINE-1.

B) Titolazione virale: Foto di cellule HEK-293 infettate con i vettori adenovirali Ad-Scr e Ad-RT ed immunocolorate con anticorpo anti-esone. La conta dei cellule infette colorate di nero consente di stabilire il titolo virale.

C) Analisi per RT-PCR semiquantitativa dei livelli di espressione del LINE-1 (ORF1 e ORF2) in cellule A375 di melanoma dopo 72h dall'infezione con Ad-Scr e Ad-RT (100pfu/ml). Il GAPDH è lo standard per valutare la quantità di RNA nei due campioni.

abbiamo suddiviso gli animali in due gruppi che sono stati trattati a giorni alterni con Ad-Scr e Ad-L1i iniettando 1×10^7 pfu (plaque forming units) per topo.

Le misure effettuate a scadenze regolari hanno dimostrato che le dimensioni dei tumori infettati con il vettore Ad-L1i sono mediamente inferiori (circa il 40%) rispetto a quelli infettati con Ad-Scr. (Fig. 12).

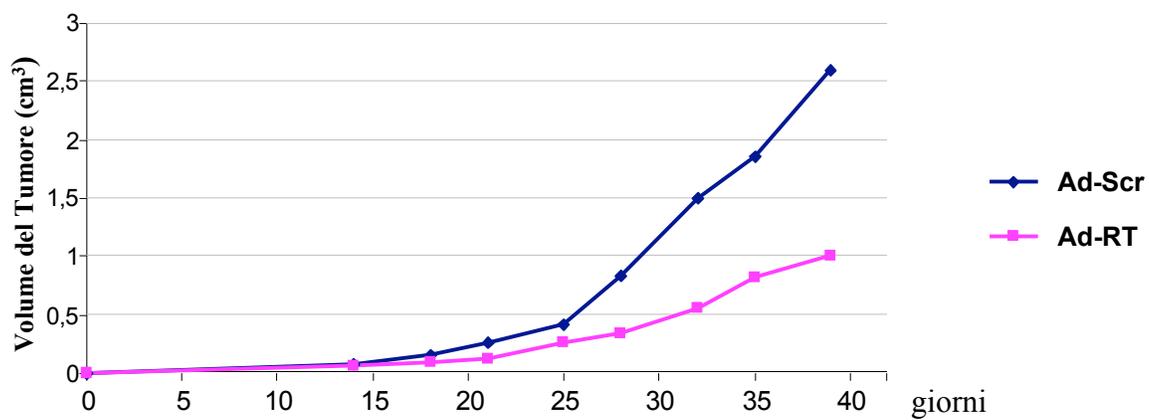


FIG. 12: Le cellule A375 inoculate in topi nudi atimici infettate con Ad-Scr e Ad-RT (10^7 pfu/ml).

La crescita del tumore è stata monitorata in topi infettati con Ad-Scr (linea blu), o con Ad-RT (linea rosa) Le curve mostrano la media dei volumi dei tumori di 4 animali misurati a diversi giorni dall'inoculo.

DISCUSSIONE

In questo lavoro ho dimostrato che i retroelementi LINE-1 e HERV-K hanno ruoli differenti nella progressione tumorale in quanto mentre l'inibizione del LINE-1 riduce la proliferazione e induce il differenziamento sia *in vivo* – in tumori umani inoculati in topi nudi - che *in vitro* – linee cellulari tumorali umane -, l'espressione di HERV-K non sembra essere rilevante nelle cellule in coltura ma ha un chiaro ruolo nel ridurre la tumorigenicità *in vivo*.

L'attivazione e l'over-espressione di diverse famiglie di retroelementi nei tumori è stata ampiamente descritta (Loewer et al, 1984; Chen JM., 2005) con particolare riferimento a LINE-1 e HERV-K (Buescher et al., 2005; Ostertag and Kazazian, 2001), ma non è stato tuttavia chiarito il loro ruolo nel processo di trasformazione tumorale. Pertanto, scopo principale di questo lavoro era quello di definire in termini comparativi quale fosse la funzione di queste due famiglie di retroelementi nella progressione tumorale.

A questo scopo, ho utilizzato un sistema di vettori retrovirali per produrre due linee cellulari di melanoma stabilmente interferite per l'espressione di HERV-K e del LINE-1.

Una prima differenza funzionale che è emersa tra le due famiglie riguarda la capacità di modulare l'espressione genica cellulare: infatti, mentre l'inibizione del LINE-1—non solo influisce sull'espressione di diversi geni che codificano per proteine, ma anche su altre famiglie degli stessi retroelementi come HERV-K (Fig. 7D e 8C), l'interferenza dell'espressione di HERV-K non modifica l'espressione di altri geni cellulari né quella di LINE-1 (Fig. 9C). Nel loro complesso, questi dati indicano che l'espressione delle diverse famiglie di retroelementi non è

indipendente, ma piuttosto sembra essere regolata da meccanismi molecolari organizzati in maniera gerarchica unidirezionali in cui l'espressione del LINE-1 controlla quella di HERV-K, ma non il contrario.

D'altra parte, l'interferenza di HERV-K provoca una reale riduzione della crescita dei tumori inoculati in topi nudi atimici che potrebbe essere deve essere dovuta ad una ridotta espressione di *env*. E' noto infatti che l'espressione di *env*, codificata sia da retrovirus infettivi (Mangeny and Heidmann 1998; Blaise et al., 2001) che da sequenze retrovirali endogene (Mangeny et al., 2001, 2005), può eludere le risposte di immunosorveglianza nei topi. Un abbassamento dell'espressione di *env* (Fig. 7D e 9A, 9C), potrebbe pertanto favorire l'attivazione di una risposta immunitaria anche in topi nudi immunodepressi, i quali mantengono una basale attività immunologica (Hasui et al., 1989, Farag and Caligiuri 2006) che potrebbe controllare la crescita del tumore.

Le due famiglie di retroelementi si distinguono anche per una diversa localizzazione delle proteine da loro codificate: mentre le proteine codificate dal LINE-1 localizzano nel nucleo (Fig. 7A), quelle espresse da HERV-K, *gag pol* ed *env*, sono essenzialmente di natura citoplasmatica (Fig 9A). Questa caratteristica potrebbe suggerire la possibilità di interazione con altre proteine ed una regolazione di meccanismi cellulari completamente diversi tra i due retrotransposoni. In conclusione, le differenze tra le due famiglie di retroelementi accentuano il ruolo predominante, rispetto ad HERV-K e forse anche rispetto altri retrovirus endogeni, che LINE-1 potrebbe avere nella crescita tumorale già nelle prime fasi della formazione del tumore grazie alla sua capacità di modulare l'espressione genica cellulare. Inoltre, il suo diretto controllo sull'espressione di

HERV-K comporterebbe una cooperazione dei due retroelementi alla progressione tumorale sovvertendo le risposte immunitarie dell'ospite.

Gli inibitori farmacologici dell'RT, nevirapina ed efavirenz, esercitano una potente azione antitumorale ma è verosimile che non discriminino tra le diverse RT codificate dalle varie famiglie di retroelementi limitandosi a bloccare genericamente con diversi livelli di efficienza qualsiasi attività di retrotrascrizione presente nella cellula.

I risultati ottenuti con l'RNAi, inibendo separatamente l'espressione di LINE-1 e HERV-K, hanno dimostrato che l'RT codificata dal primo è la principale, se non unica, sorgente di RT nelle cellule tumorali in quanto gli effetti osservati *in vitro* ed *in vivo* in seguito al trattamento sono simili nei due approcci.

Su queste basi, è realistico ipotizzare che un sistema di vettori retrovirali, in grado di inibire in maniera specifica l'espressione del LINE-1 nelle cellule tumorali, potrebbe essere utilizzato in alternativa alla terapia farmacologica.

In terapia genica, i vettori retrovirali sono generalmente utilizzati per consentire l'inserimento stabile di nuove sequenze nel genoma dell'ospite sfruttando la capacità intrinseca dei retrovirus di integrarsi. L'inconveniente maggiore di questo sistema è che l'inserzione è un evento del tutto casuale e potenzialmente mutageno capace di alterare la funzionalità dei geni oncosoppressori o attivare gli oncogeni.

Per evitare questo problema, nel corso degli ultimi anni, si è preferito utilizzare dei vettori adenovirali, le cui sequenze non si integrano nel genoma, ma rimangono in forma episomale consentendo infezioni multiple e ripetute. In base a queste considerazioni abbiamo intrapreso lo sviluppo di un sistema di vettori adenovirali, alternativo a quello retrovirale, ma di uguale efficacia quale inibitore della RT.

I risultati ottenuti trattando i topi con Ad-Scr e con Ad-L1i sono allo stato attuale preliminari, in quanto se da un lato il vettore adenovirale ha dimostrato una capacità antitumorale *in vivo*, dall'altro questo effetto, nelle condizioni sperimentali testate, non è superiore ai sistemi precedentemente adoperati. E' necessario altro lavoro per mettere a punto le condizioni ottimali di infezione, la concentrazione del vettore virale ed anche per valutare i possibili effetti citotossici che possono insorgere in situ o a livello sistemico.

Nonostante i primi risultati ottenuti in studi pre-clinici con la terapia genica, la sua applicazione clinica rimane ancora limitata e numerosi sono gli ostacoli da superare prima che si possa pensare di utilizzare in modo sistematico i vettori virali per terapie umane. Allo scopo di evitare effetti negativi, per ogni vettore virale è infatti necessario conoscere la capacità di infezione dei diversi tessuti, la concentrazione a cui utilizzare il virus e gli effetti indesiderati a livello locale o sistemico che possono svilupparsi anche a distanza di diversi anni da trattamento.

Il lavoro svolto in precedenza, ed anche parte del mio presente lavoro, ha dimostrato che sia nevirapina sia efavirenz sono in grado di bloccare in maniera specifica l'attività della RT endogena solo in cellule tumorali preservando quelle normali. Requisito fondamentale per un farmaco chemioterapico è la selettività di bersaglio, per ora una proprietà ideale in quanto non esistono terapie in grado di agire solo sul tumore. I farmaci anti-tumorali solitamente utilizzati (cisplatino, paclitaxel, vinblastina, etoposide) sono degli agenti citotossici in grado di bloccare la replicazione di tutte le cellule proliferanti dell'organismo, ma in maniera indiscriminata, come le cellule del tessuto ematopoietico, le mucose delle vie gastrointestinali, i follicoli piliferi provocando nei pazienti devastanti effetti collaterali.

A differenza dei chemioterapici correntemente utilizzati, gli inibitori della RT sono invece dei farmaci che non hanno alcun effetto citotossico né citostatico sulle cellule normali né effetti nocivi sui pazienti sulla base di dati epidemiologici che riportano una buona tolleranza alla continua somministrazione di entrambi questi farmaci nei pazienti AIDS. L'insieme di queste osservazioni incoraggia, come primo passo, l'inizio di trials clinici, per valutare la potenzialità di queste due molecole come farmaci anti-tumorali.

In una prospettiva a più lungo termine, sarebbe invece necessario sviluppare nuove molecole specificamente mirate contro l'RT endogena codificata da LINE-1, in quanto nevirapina ed efavirenz sono state originariamente sviluppate contro l'RT di HIV.

La terapia genica e la terapia farmacologica sono due metodi differenti, ma paralleli, per bloccare a diversi livelli l'attività dell'RT nelle cellule trasformate: mentre la prima blocca la trascrizione del gene, la seconda inibisce l'attività della proteina.

La speranza è che uno studio approfondito e sistematico di entrambi questi approcci si potrà consentire lo sviluppo di una efficace terapia anti-tumorale applicabile a diversi tipi di tumore.

BIBLIOGRAFIA

Baltimore, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* (1970) 226: 1209-1211

Bannert N. and Kurth R. "Retroelements and human genome: new prospective on an old relation." *PNAS* 2004; 14572-14579.

Beraldi R, Pittoggi C, Sciamanna I, Mattei E, Spadafora C. Expression of LINE-1 retrotransposons is essential for murine preimplantation development. *Mol Reprod Dev.* 2006 Mar;73(3):279-87

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1097-101.

Bratthauer GL, Fanning TG Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer. *Oncogene.* 1992 Mar;7(3):507-10.

Büscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4172-80.

Chen JM, Stenson PD, Cooper DN, Férec C. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Hum Genet.* 2005 Sep;117(5):411-27

Dewannieux M, Harper F, Richaud A, Letzelter C, Ribet D, Pierron G, Heidmann T. "Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements." *Genome Res.* 2006 Dec;16(12):1548-56.

Di Lorenzo G, Konstantinopoulos PA, Pantanowitz L, Di Trollo R, De Placido S, Dezube BJ. "Management of AIDS-related Kaposi's sarcoma." *Lancet Oncol.* 2007 Feb;8(2):167-76.

Ergün S, Buschmann C, Heukeshoven J, Dammann K, Schnieders F, Lauke H, Chalajour F, Kilic N, Strätling WH, Schumann GG. Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *J Biol Chem.* 2004 Jun 25;279(26):27753-63

Fanning TG, Singer MF. "LINE-1: a mammalian transposable element." *Biochim Biophys Acta.* 1987 Dec 8;910(3):203-12

Feuchter-Murthy AE, Freeman JD, Mager DL. Splicing of a human endogenous retrovirus to a novel phospholipase A2 related gene. *Nucleic Acids Res.* 1993 Jan 11;21(1):135-43

Galli UM, Sauter M, Lecher B, Maurer S, Herbst H, Roemer K, Mueller-Lantzsch N. Human endogenous retrovirus rec interferes with germ cell development in mice and may cause carcinoma in situ, the predecessor lesion of germ cell tumors. *Oncogene.* 2005 Apr 28;24(19):3223-8

Hagan CR, Sheffield RF, Rudin CM. Human Alu element retrotransposition induced by genotoxic stress. *Nat Genet.* 2003 Nov;35(3):219-20.

Häsler J, Samuelsson T, Strub K. "Useful 'junk': Alu RNAs in the human transcriptome." *Cell Mol Life Sci.* 2007 Jul;64(14):1793-800

Herbst H, Sauter M, Kühler-Obbarius C, Löning T, Mueller-Lantzsch N. "Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in germ cell and trophoblastic tumours." *APMIS.* 1998 Jan;106(1):216-20.

Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE and Herlyn M. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth

control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am. J. Pathol.*, (2000) 156, 1515–1525.

International Human Genome Consortium. “Initial sequencing and analysis of human genome”. *Nature* 2001. 409:860-921.

Jurka J. “Evolutionary impact of human Alu repetitive elements.” *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Dec;14(6):603-8

Kazazian HH Jr. “Mobile elements and disease.” *Curr Opin Genet Dev.* 1998 Jun;8(3):343-50

Kim TH., Jeon JY., Yi JM., Kim DS., Huh JW., Hur CG. and Kim HS. “The distribution and Expression of HERV families in the Human Genome.” *Mol Cells.* 2004; 18:1: 87-93.

Kondo Y, Issa JP. Enrichment for histone H3 lysine 9 methylation at Alu repeats in human cells. *J Biol Chem.* 2003 Jul 25;278(30):27658-62

Landriscina M, Fabiano A, Altamura S, Bagalà C, Piscazzi A, Cassano A, Spadafora C, Giorgino F, Barone C, Cignarelli M. Reverse transcriptase inhibitors down-regulate cell proliferation in vitro and in vivo and restore thyrotropin signaling and iodine uptake in human thyroid anaplastic carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Oct;90(10):5663-71

Landriscina M, Spadafora C, Cignarelli M, Barone C. Anti-tumor activity of non-nucleosidic reverse transcriptase inhibitors. *Curr Pharm Des.* 2007;13(7):737-47

Levine AM. “AIDS-related lymphoma.” *Semin Oncol Nurs.* 2006 May;22(2):80-9

Löwer R, Löwer J, Frank H, Harzmann R, Kurth R. “Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses.” *J Gen Virol.* 1984 May;65 (Pt 5):887-98.

Löwer R. "The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies." *Trends Microbiol.* 1999 Sep;7(9):350-6.

Luan DD, Korman MH, Jakubczak JL, Eickbush TH. "Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition." *Cell.* 1993 Feb 26;72(4):595-605.

Mangiacasale R, Pittoggi C, Sciamanna I, Careddu A, Mattei E, Lorenzini R, Travaglini L, Landriscina M, Barone C, Nervi C, Lavia P, Spadafora C. "Exposure of normal and transformed cells to nevirapine, a reverse transcriptase inhibitor, reduces cell growth and promotes differentiation." *Oncogene.* 2003 May 8;22(18):2750-61

Martin SL, Branciforte D Synchronous expression of LINE-1 RNA and protein in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 1993 Sep;13(9):5383-92

Martin SL. "The ORF1 Protein Encoded by LINE-1: Structure and Function during L1 retrotransposition." *J Biomed Biotechnol.* 2006 (1): 45621.

Maj A, Pareek CS, Klauzińska M, Zwierzchowski L. Polymorphism of 5'-region of the bovine growth hormone receptor gene. *J Anim Breed Genet.* 2005 Dec;122(6):414-7.

Medstrand P, Blomberg J. Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. *J Virol.* 1993 Nov;67(11):6778-87

Modoni S, Landriscina M, Fabiano A, Fersini A, Urbano N, Ambrosi A, Cignarelli M. Reinduction of cell differentiation and ¹³¹I uptake in a poorly differentiated thyroid tumor in response to the reverse transcriptase (RT) inhibitor nevirapine. *Cancer Biother Radiopharm.* 2007 Apr;22(2):289-95

Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, Romirer I, Födinger D, Seppel H, Schanab O, Magin-Lachmann C, Löwer R, Jansen B, Pehamberger H, Wolff K. “An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells.” *Cancer Res.* 2003 Dec 15;63(24):8735-41

Nekrutenko A, Li WH. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends Genet.* 2001 Nov;17(11):619-21

Okahara G, Matsubara S, Oda T, Sugimoto J, Jinno Y, Kanaya F. “Expression analyses of human endogenous retroviruses (HERVs): tissue-specific and developmental stage-dependent expression of HERVs.” *Genomics.* 2004 Dec;84(6):982-90

Ono M, Kawakami M, Ushikubo H. “Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D.” *J Virol.* 1987 Jun;61(6):2059-62

Ostertag E.M. and Kazazian H.H.J. “Biology of Mammalian L1 Retrotransposons”. *Annual review Genetic* 2001; 35: 501-38.

Pittoggi C, Sciamanna I, Mattei E, Beraldi R, Lobascio AM, Mai A, Quaglia MG, Lorenzini R, Spadafora C. Role of endogenous reverse transcriptase in murine early embryo development. *Mol Reprod Dev.* 2003 Nov;66(3):225-36

Quia F, Zhang ZC, Wu XF, Li YP, Xu Q. Interaction between integrin alpha(5) and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) 333: 1269–1275.

Ross DA, Laing JH, Sanders R, Wilson GD. Long term follow-up of c-myc, p53 and proliferation measurements in malignant melanoma. *Eur J Surg Oncol* (2006) 32: 80–84.

Sarkar D, Su ZZ, Vozhilla N, Park ES, Gupta P, Fisher PB. Dual cancer-specific targeting strategy cures primary and distant breast carcinomas in nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 27;102(39):14034-9.

Sauter ER, Yeo UC, Von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res* (2002)62: 3200–3206.

Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;310:211-50

Sciamanna I, Landriscina M, Pittoggi C, Quirino M, Mearelli C, Beraldi R, Mattei E, Serafino A, Cassano A, Sinibaldi-Vallebona P, Garaci E, Barone C, Spadafora C. “Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth.” *Oncogene.* 2005 Jun 2;24(24):3923-31

Seifarth W, Spiess B, Zeilfelder U, Speth C, Hehlmann R, Leib-Mösch C. “Assessment of retroviral activity using a universal retrovirus chip.” *J Virol Methods.* 2003 Sep;112(1-2):79-91.

Sinibaldi-Vallebona P, Lavia P, Garaci E, Spadafora C. “A role for endogenous reverse transcriptase in tumorigenesis and as a target in differentiating cancer therapy”. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006 Jan;45(1):1-10.

Temin HM, Mizutani S. “RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.” *Nature.* 1970 Jun 27;226(5252):1211-3

Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, Epp L, Lu DW, Johanning GL. “Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer.” *Oncogene.* 2003 Mar 13;22(10):1528-35.

Whitcomb JM, Hughes SH. "Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems." *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:275-306

Whitelaw E, Martin DI. "Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals." *Nat Genet.* 2001 Apr;27(4):361-5

Yi JM, Kim HS. "Expression analysis of endogenous retroviral elements belonging to the HERV-F family from human tissues and cancer cells." *Cancer Lett.* 2004 Jul 28;211(1):89-96

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare per il Dott. Spadafora che mi ha seguito durante il corso del dottorato e in questo periodo di formazione mi ha aiutato a crescere scientificamente.

Grazie ad Ilaria, Carmine, Cristina ed Alessandro senza la loro collaborazione ed il loro aiuto non sarebbe stato possibile sviluppare questo lavoro; insieme abbiamo affrontato la routine quotidiana del laboratorio e condiviso momenti di festa e di difficoltà.

Grazie al Prof. P.B. Fisher della Columbia University, che mi ha ospitato nel suo laboratorio e mi ha permesso di vivere un bellissima esperienza non solo lavorativa, ma anche di vita.