

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE
UNIVERSITA' DEL PIEMONTE ORIENTALE "A. AVOGADRO"
XVIII CICLO-DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

Relazione del quarto anno

**MECCANISMI MOLECOLARI
RESPONSABILI DELLA REGOLAZIONE NEGATIVA
DEL RECETTORE TIROSINA CHINASI RON**

Dottoranda: **Serena Germano**

Tutore: **Prof. G. Gaudino**

INTRODUZIONE

L'interazione dei fattori di crescita con i recettori di membrana dotati di attività tirosina chinasi (RTKs) determina la trasduzione di segnali intracellulari coinvolti nella regolazione della proliferazione, del differenziamento e della sopravvivenza cellulare.

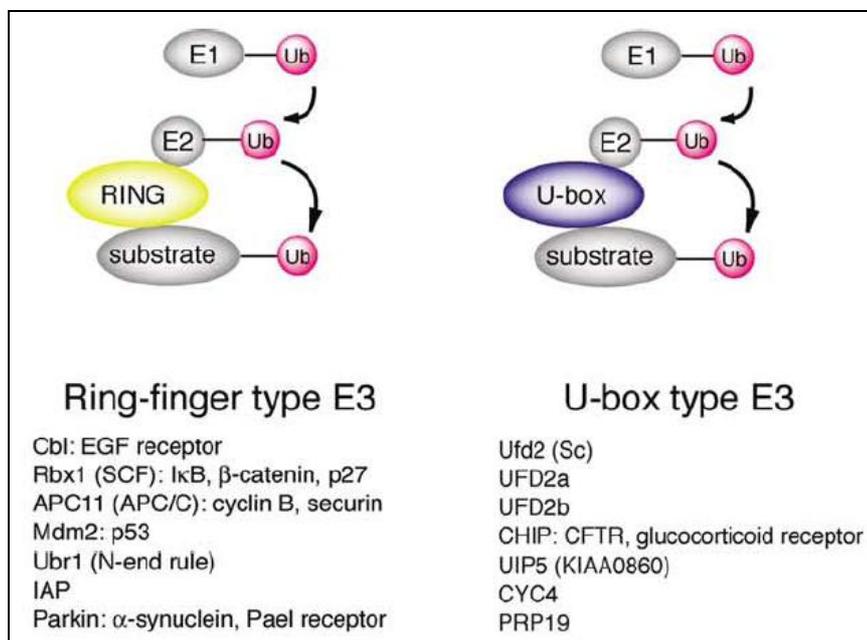
L'intensità, la durata e la specificità delle risposte mediate dai RTKs sono finemente modulate da differenti meccanismi di regolazione negativa. L'esito della segnalazione negativa è l'attenuazione transitoria o definitiva della trasmissione del segnale. Molteplici evidenze sperimentali indicano che la capacità dei RTKs di evadere i meccanismi di regolazione negativa determina uno stato di prolungata stimolazione cellulare, frequentemente associato allo sviluppo di patologie neoplastiche (Bache *et al.*, 2004; Dikic & Giordano, 2003). L'attivazione deregolata dei RTKs è stata documentata in diversi tipi di tumori umani (Blume-Jensen & Hunter, 2001) ed è frequentemente correlata ad una scarsa risposta alle terapie convenzionali (Bennasroune *et al.*, 2004; Lamorte & Park, 2001), sottolineando l'importanza dei RTKs come bersagli molecolari nella terapia anticancro.

Il principale meccanismo di regolazione negativa è rappresentato dalla *down-regulation* indotta da ligando, che prevede la rimozione dei recettori attivati dalla membrana e il loro indirizzamento ai compartimenti degradativi. L'endocitosi dei complessi ligando-recettore e la loro successiva degradazione sono processi regolati dall'ubiquitinazione dei recettori attivati, mediata da specifiche proteine con attività di ubiquitina ligasi. Il prodotto del proto-oncogene c-Cbl è un regolatore negativo di molti RTKs, rappresentando un componente critico del complesso responsabile dell'ubiquitinazione (Thien & Langdon, 2001). c-Cbl è un adattatore molecolare che agisce come ubiquitina ligasi, in grado di riconoscere residui di tirosina fosforilati presenti su RTKs attivati e di reclutare, attraverso un motivo *RING finger*, specifici enzimi coniuganti l'ubiquitina (Joazeiro *et al.*, 1999). Osservazioni sperimentali hanno dimostrato che alterazioni molecolari in grado di interferire con l'ubiquitinazione e la *down-regulation* dei RTKs sono implicate nella patogenesi del cancro. Alcuni esempi riguardano il recettore dell'HGF (Hepatocyte Growth Factor), dell'EGF (Epidermal Growth Factor), del PDGF (Platelet Growth Factor) e il recettore c-Kit (Peschard & Park, 2003).

La *down-regulation* degli RTKs può essere indotta anche da meccanismi indipendenti dalla stimolazione recettoriale. È stata dimostrata l'esistenza di processi degradativi regolati dall'ubiquitinazione anche in assenza di ligando, che intervengono ad esempio nel

controllo dell'omeostasi recettoriale o nella degradazione di recettori recanti mutazioni associate a modificazioni strutturali.

Evidenze sperimentali indicano che tali processi possono essere, almeno parzialmente, indipendenti da c-Cbl e coinvolgono enzimi ad attività ubiquitina ligasica caratterizzati da motivi strutturali differenti, come l'ubiquitina ligasi CHIP (C-terminal Hsc70 interacting protein). CHIP presenta all' N-terminale un dominio TPR attraverso il quale interagisce con la proteina *chaperone* Hsp90 (Heat Shock Protein 90) e al C-terminale un dominio U-box, essenziale per svolgere la sua attività di ubiquitina ligasi (Ballinger *et al.*, 1999).

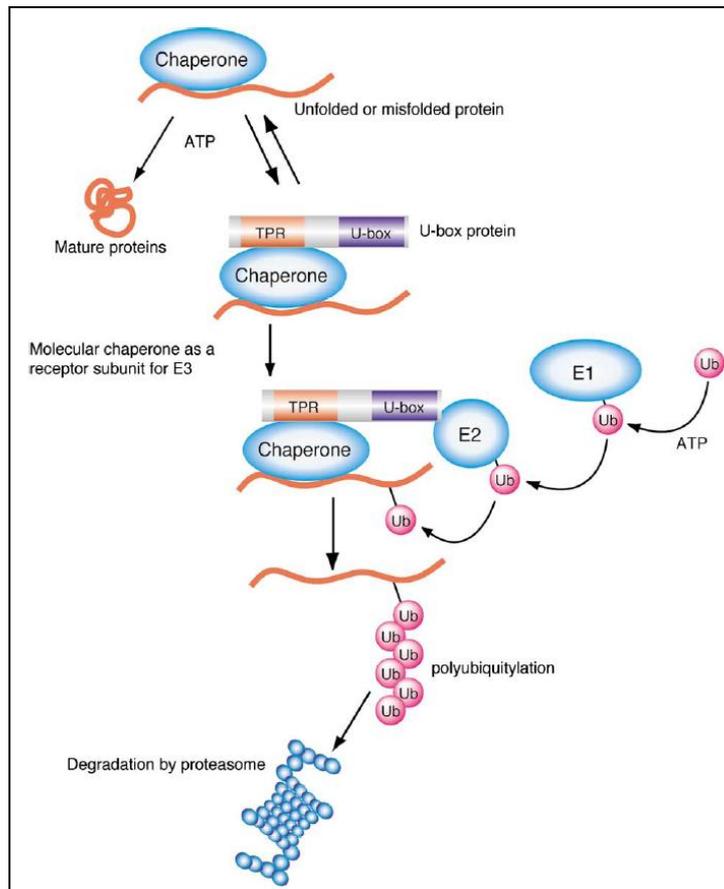


È stato dimostrato che CHIP è in grado di modulare negativamente l'attività di *chaperone* di Hsp90, una proteina coinvolta nella regolazione della maturazione e dell'integrità strutturale di importanti mediatori della trasduzione del segnale (Wegele *et al.*, 2004). Tra le proteine clienti di Hsp90 vi sono recettori tirosina ad attività tirosina chinasi (HER-2/neu, EGFR, Met, IGF-1R), regolatori del ciclo cellulare (cdk4, cdk6), recettori intracellulare per gli ormoni steroidei e proteine mutate coinvolte nella trasduzione del segnale (p53, v-src, Bcr-Abl, Kit). L'interazione dell'ubiquitina ligasi CHIP con i complessi tra Hsp90 e le proteine clienti promuove l'ubiquitinazione di queste ultime e la loro degradazione proteasomale (Connell *et al.*, 2001; Scheufler *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2002).

E' stato caratterizzato il ruolo di CHIP nella *down-regulation* del recettore dei glucocorticoidi (Connell *et al.*, 2001), della proteina CFTR implicata nella fibrosi cistica (Meacham *et al.*, 2001) e del recettore tirosina chinasi ErbB2 (Zhou *et al.*, 2003).

E' stato dimostrato inoltre che inibitori specifici dell' attività ATPasica di Hsp90 come geldanamycin (GA) o i suoi derivati di sintesi, sono in grado di indurre la degradazione delle proteine clienti associate promuovendo il reclutamento a livello dei complessi di proteine ubiquitina ligasi tra cui CHIP (Goetz *et al.*, 2003; Stebbins *et al.*, 1997).

Evidenze sperimentali suggeriscono che l'ubiquitinazione mediata da CHIP possa essere coinvolta nella *down-regulation* di forme recettoriali recanti alterazioni conformazionali o mutazioni in grado di evadere i meccanismi di regolazione negativa innescati dall'interazione con il ligando (Shimamura *et al.*, 2005).



Il prodotto del proto-oncogene RON è un RTK, identificato come il recettore di Macrophage Stimulating Protein (MSP) appartenente alla famiglia del recettore dell'Hepatocyte Growth Factor (HGF). In seguito ad attivazione indotta da ligando Ron promuove proliferazione cellulare, motilità, invasività e morfogenesi su bersagli cellulari di diversa origine.

Il potenziale oncogenico di Ron è evocato da mutazioni puntiformi nel dominio chinasi (Santoro *et al.*, 1998), mentre la sua espressione deregolata può giocare un ruolo critico nello sviluppo e nella progressione tumorale. E' stata documentata l'iperespressione di Ron, con conseguente attivazione costitutiva della chinasi, in

carcinomi mammari (Maggiara *et al.*, 1998), in tumori polmonari non a piccole cellule (Willett *et al.*, 1998) e in adenocarcinomi colon-rettali (Zhou *et al.*, 2003). Osservazioni sperimentali hanno dimostrato che il silenziamento genico di Ron è in grado di contrastare le proprietà tumorigeniche *in vivo* di cellule di adenocarcinoma colon-rettale (Xu *et al.*, 2004). Recentemente è stata dimostrata una correlazione tra l'espressione di Ron e il grado istologico, la dimensione e lo stadio di tumori della vescica (Cheng *et al.*, 2005). L'espressione aberrante di Ron è inoltre frequentemente associata alla presenza di varianti di *splicing* con proprietà oncogeniche (Wang *et al.*, 2003).

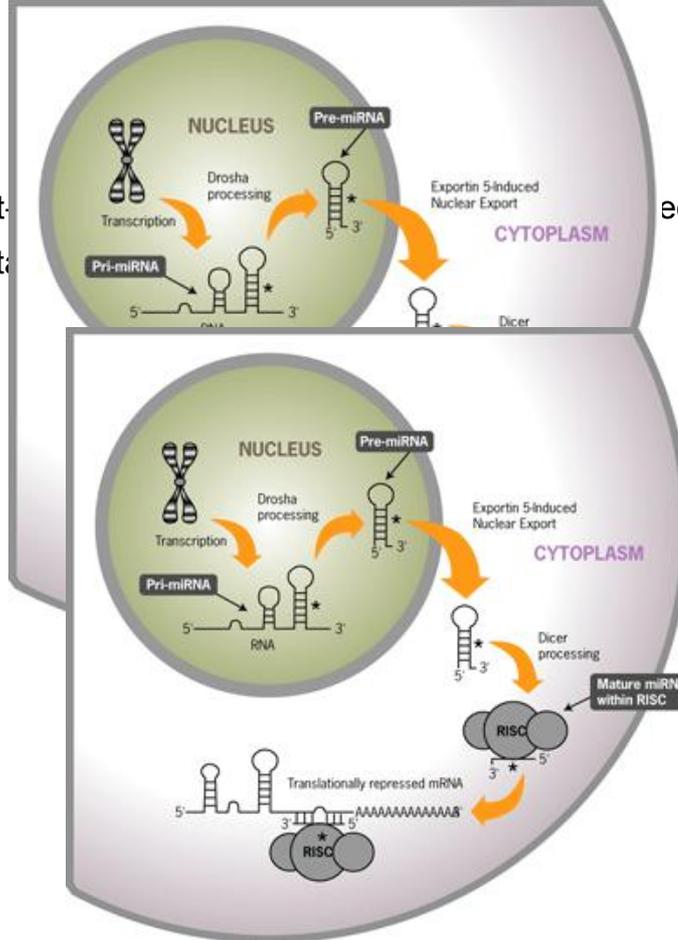
Studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che il recettore attivato è in grado di reclutare l'ubiquitina ligasi c-Cbl, che interagisce in maniera diretta con le tirosine recettoriali Y¹⁰¹⁷ e Y¹³⁵³ tramite il suo dominio PTB o in maniera indiretta, mediata dall'adattatore Grb2, promuovendo l'ubiquitinazione del recettore attivato e la sua degradazione (Penengo *et al.*, 2003).

Recentemente abbiamo dimostrato l'esistenza di un meccanismo di *down-regulation* indipendente da ligando coinvolto nella regolazione del *turnover* recettoriale e mediato dall'ubiquitina ligasi CHIP, che interagisce in maniera indiretta con il recettore attraverso le proteine *chaperone* Hsc70 (Heat Shock Cognate 70) e Hsp90 (Germano *et al.*, 2006). CHIP è coinvolta anche nella regolazione negativa della variante oncogenica costitutivamente attiva recante la sostituzione M1254T nel dominio chinasi che, a differenza della forma normale, è in grado di evadere la *down-regulation* indotta da ligando. Il meccanismo degradativo mediato dall'ubiquitina ligasi CHIP è fortemente indotto da inibitori specifici di Hsp90 come geldanamycin e può rappresentare una strategia terapeutica importante per contrastare l'attività deregolata di Ron.

Parallelamente ai sistemi di controllo post-traduzionale della stabilità proteica sono stati recentemente scoperti meccanismi di regolazione negativa post-trascrizionale mediati dai microRNA (miRNA), una classe di piccoli RNA non codificanti.

I miRNA, originariamente identificanti nel nematode *C. elegans* (Lee *et al.*, 1993), sono altamente conservati negli organismi eucarioti e sono coinvolti nel controllo post-trascrizionale dell'espressione genica. Sono generati come trascritti primari di 100-1000 nucleotidi dall'enzima RNA polimerasi II, caratterizzati da un dominio funzionale con una struttura a forcina. Il successivo processamento di questa regione funzionale da parte delle ribonucleasi III Drosha e Dicer genera il miRNA maturo, una molecola di RNA a doppia elica lunga 22 nucleotidi. Il miRNA maturo, successivamente incorporato all'interno del complesso ribonucleoproteico RISC (RNA-Induced Silencing Complex), dirige il

silenziamento post-
regione non tradotta

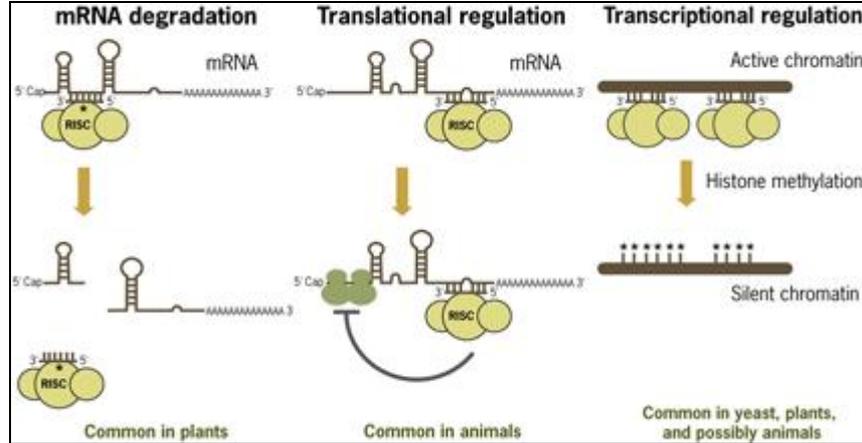


ediante appaiamento alla

Sebbene non siano ancora completamente noti i meccanismi che regolano il silenziamento genico mediato dai miRNA, è stato ipotizzato che possano essere influenzate la stabilità, la compartimentalizzazione e/o la traduzione in proteina degli mRNA complementari (Lim *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Olsen & Ambros, 1999).

I 326 miRNA noti nell'uomo (miRNA database: <http://www.sanger.ac.uk>), si stima possano intervenire nella regolazione dell'espressione del 30% dei geni (Lewis *et al.*, 2005). La natura regolatoria dei miRNA ed il numero sempre crescente di nuovi miRNA identificati suggeriscono il loro coinvolgimento nel controllo di processi biologici fondamentali, quali la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, il differenziamento e la morfogenesi (Harfe, 2005; Miska, 2005).

Algoritmi previsionali indicano che un determinato miRNA ha la capacità di regolare contemporaneamente centinaia di trascritti diversi, poiché il silenziamento dell'mRNA bersaglio non richiede una complementarità esatta con la sequenza del miRNA maturo. Analogamente, un singolo mRNA può essere regolato in modo cooperativo da molteplici miRNA (Krek *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005).



Il profilo d'espressione dei miRNA è strettamente correlato al profilo trascrizionale di un tessuto ed è stato suggerito che un'espressione aberrante dei miRNA possa avere un ruolo nella patogenesi di alcune malattie umane (Alvarez-Garcia & Miska, 2005). Osservazioni sperimentali recenti hanno dimostrato in diversi tumori umani un'espressione deregolata dei miRNA, con frequente riduzione del livello di espressione nel tessuto tumorale rispetto alla controparte normale (Lu *et al.*, 2005). Una ridotta espressione dei miR-143 e -145 è stata documentata in casi di neoplasia colon-rettale (Michael *et al.*, 2003) e in tumori polmonari bassi livelli di *let-7* correlano con una prognosi scarsa (Takamizawa *et al.*, 2004). Per alcuni miRNA è stata inoltre documentata la localizzazione in regioni genomiche frequentemente delete nei tumori umani. In particolare, è stato dimostrato per il *cluster mir-15a-16* la localizzazione a livello del cromosoma 13q14, una regione cromosomica deleta in alcune patologie neoplastiche quali leucemia cronica linfocitica (CLL), mieloma multiplo e tumori della prostata (Calin *et al.*, 2004). Alcuni *loci* per miRNA sono stati al contrario mappati a livello regioni cromosomiche soggette ad amplificazioni, suggerendo una correlazione tra le proprietà oncogeniche dei miRNA e lo sviluppo di patologie neoplastiche. L'esempio meglio caratterizzato è rappresentato dal *cluster mir-17-92* localizzato nell'amplicone 13q31, per cui è stato dimostrato il ruolo causale nello sviluppo tumorale in un modello murino di linfoma (He *et al.*, 2005).

I miRNA "oncogenici" o "onco-soppressori" giocano quindi un ruolo cruciale nella patogenesi del cancro e rappresentano nuovi bersagli molecolari con importanti potenzialità terapeutiche.

SCOPO DEL LAVORO

Il lavoro sperimentale in questo anno di dottorato è stato orientato allo studio dei meccanismi che controllano l'espressione del recettore tirosina chinasi Ron, a livello post-traduzionale e post-trascrizionale.

Sono stati inizialmente caratterizzati i processi degradativi coinvolti nella *down-regulation* indotta da ligando e nella regolazione dell'omeostasi recettoriale, mediati dall'interazione del recettore con differenti enzimi ad attività ubiquitina ligasica.

Sulla base dei risultati ottenuti nel corso degli anni precedenti è stato approfondito lo studio dei meccanismi coinvolti nell'endocitosi del recettore attivato e nel suo smistamento ai compartimenti degradativi in risposta al ligando.

E' stato inoltre caratterizzato il ruolo dell'ubiquitina ligasi CHIP nella regolazione del *turnover* del recettore normale e della forma oncogenica Ron^{M1254T} e nella degradazione recettoriale indotta da inibitori specifici di Hsp90 (geldanamycin, 17-AAG).

La seconda parte del lavoro sperimentale è stata indirizzata allo studio della regolazione post-trascrizionale dell'espressione di Ron da parte di microRNA e alla valutazione di eventuali variazioni del profilo di espressione dei microRNA indotte dall'attivazione ligando-dipendente o costitutiva del recettore.

RISULTATI

1. Meccanismi di down-regulation indotti da ligando

La poliubiquitinazione e l'endocitosi dinamina-dipendente sono necessarie per la degradazione di Ron

Nel lavoro sperimentale svolto negli anni precedenti abbiamo dimostrato che il recettore Ron in risposta al ligando interagisce con l'ubiquitina ligasi c-Cbl che ne media la poliubiquitinazione, ossia la coniugazione con catene composte da quattro o più monomeri di ubiquitina. Dati di letteratura hanno dimostrato che l'ubiquitinazione interviene nella regolazione dell'internalizzazione dei recettori attivati e nello smistamento ai compartimenti degradativi. Per verificare se la poliubiquitinazione fosse coinvolta nella degradazione del recettore attivato abbiamo utilizzato un mutante dell'ubiquitina in cui tutti i residui di lisina sono stati sostituiti ad arginina (Ub-KO) che quindi non è in grado di formare catene di

poliubiquitina. In seguito all'iperespressione di questo mutante abbiamo osservato un blocco della *down-regulation* indotta da MSP, riscontrabile invece nelle cellule esprimenti la forma nativa dell'ubiquitina (fig. 1A). Questo dato dimostra che la poliubiquitinazione recettoriale è necessaria per la degradazione indotta da ligando.

Abbiamo successivamente verificato se il processo di degradazione regolato dalla poliubiquitinazione implicasse meccanismi di endocitosi. Dati di letteratura hanno dimostrato il coinvolgimento della dinamina nella regolazione dell'endocitosi mediata da vescicole di clatrina o dalle *caveolae*. Sulla base di queste osservazioni abbiamo analizzato la degradazione di Ron indotta da ligando in cellule esprimenti una forma mutata della dinamina (dinamina K44A) sotto il controllo di un promotore *tet-off*. In condizioni di assenza dell'antibiotico tetraciclina questo mutante viene espresso ad alti livelli e agisce come dominante negativo. In queste condizioni la degradazione indotta da MSP viene abrogata, mentre come atteso è stata osservata in cellule trattate con tetraciclina (fig. 1B). I risultati ottenuti dimostrano che è necessaria la corretta funzione dei meccanismi di endocitosi dinamina-dipendenti per indirizzare il recettore ai compartimenti degradativi.

La degradazione di Ron coinvolge meccanismi di endocitosi regolati dalla caveolina-1

Al fine di identificare i meccanismi di endocitosi coinvolti nella degradazione di Ron abbiamo utilizzato dei vettori plasmidici per ottenere il silenziamento genico della clatrina o della caveolina-1. Come si può osservare in figura 2A, la stimolazione con MSP ha indotto una diminuzione dei livelli proteici di Ron anche in cellule in cui l'espressione della clatrina è stata marcatamente ridotta. Al contrario, il silenziamento genico della caveolina-1 ha considerevolmente ridotto la degradazione del recettore indotta da ligando (fig. 2B).

Questi dati suggeriscono che la *down-regulation* di Ron indotta da ligando prevede l'internalizzazione *caveolae*-dipendente del recettore, mentre non coinvolge la formazione di vescicole di clatrina. Inoltre, in cellule non stimolate con MSP, abbiamo osservato una riduzione dei livelli recettoriali in seguito al silenziamento della caveolina-1 (fig. 2B). Anche se tale osservazione richiede ulteriori conferme attraverso studi di stabilità del recettore, suggerisce il coinvolgimento delle *caveolae* anche nella regolazione del *turnover* del recettore.

2. Meccanismi di *down-regulation* regolati dall'ubiquitina ligasi CHIP

CHIP media l'ubiquitinazione c-Cbl indipendente del mutante oncogenico Ron^{M1254T}

Abbiamo dimostrato precedentemente che il mutante oncogenico costitutivamente attivo Ron^{M1254T} non associa l'ubiquitina ligasi c-Cbl ed è in grado di evadere la degradazione indotta da ligando. Questo mutante presenta tuttavia un'ubiquitinazione basale (fig. 3A) ed un'associazione marcata con la proteina chaperone Hsp90 e con l'ubiquitina ligasi CHIP. Sulla base di queste osservazioni abbiamo inteso verificare se l'attività ubiquitina ligasica di CHIP potesse essere responsabile dell'ubiquitinazione ligando indipendente di Ron^{M1254T}. A tale scopo è stato analizzato il livello di ubiquitinazione del recettore Ron^{M1254T} in condizioni di over-espressione di un mutante di delezione di CHIP privo del dominio Ubox necessario per l'attività enzimatica della proteina (CHIP- Δ Ubox). In presenza di questo mutante che, mantenendo la capacità di interagire con il recettore agisce come dominante negativo, abbiamo osservato una riduzione marcata del livello di ubiquitinazione di Ron^{M1254T} rispetto al livello basale (fig. 3B). I dati ottenuti dimostrano che CHIP è un'ubiquitina ligasi attiva sulla forma oncogenica di Ron che non è soggetta ai meccanismi di regolazione negativa mediati dall'ubiquitina ligasi c-Cbl.

CHIP regola il turnover di Ron e del mutante oncogenico Ron^{M1254T}

Dati di letteratura hanno dimostrato il coinvolgimento dell'ubiquitina ligasi CHIP nella regolazione del *turnover* di alcune proteine "clienti" di Hsp90 (Connell *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003). Nel lavoro sperimentale svolto durante il precedente anno di dottorato abbiamo dimostrato la presenza di Ron in un complesso multi-proteico contenente le proteine chaperone Hsp90 e Hsc70 e l'ubiquitina ligasi CHIP. Sulla base di questi risultati abbiamo inteso verificare se CHIP fosse coinvolta nella regolazione del *turnover* di Ron. A tal fine è stato effettuato un esperimento di silenziamento genico, trasfettando cellule COS-7 con un vettore plasmidico codificante un siRNA (short interfering RNA) diretto contro il trascritto di CHIP o un siRNA di controllo. In presenza del siRNA di controllo, il trattamento prolungato con l'inibitore della sintesi proteica cicloesimide ha determinato una diminuzione del livello di espressione di Ron e, in modo più marcato, del mutante Ron^{M1254T} (Fig. 4). Al contrario, in seguito al silenziamento genico di CHIP non abbiamo rilevato alcuna diminuzione apprezzabile della quantità di recettore dopo trattamento con cicloesimide, dimostrando che l'attività ubiquitina ligasica di CHIP è essenziale nella

regolazione del *turnover* di Ron. La debole riduzione del livello di espressione di Ron^{M1254T} riscontrabile in presenza del siRNA di CHIP è verosimilmente imputabile al *turnover* accelerato che caratterizza questo mutante oncogenico e al non completo silenziamento genico dell'ubiquitina ligasi.

Inibitori di Hsp90 inducono la degradazione di Ron

In precedenza abbiamo dimostrato il coinvolgimento dell'ubiquitina ligasi CHIP nella degradazione di Ron indotta dall'inibitore di Hsp90 geldanamycin in fibroblasti murini esprimenti Ron ricombinante (3T3-Ron). Per confermare la sensibilità di Ron all'inibitore in un sistema cellulare esprimente il recettore in modo endogeno, è stata allestita una cinetica di degradazione in cellule di carcinoma del pancreas FG2. Il trattamento prolungato con geldanamycin ha indotto in cellule FG2 una diminuzione del livello di espressione di Ron paragonabile a quella osservata in cellule 3T3-Ron (fig. 5A).

Studi *in vitro* e in xenotrapianti murini hanno attribuito all'inibitore geldanamycin una potente attività antitumorale, legata alla capacità di indurre la degradazione diverse proteine chinasi la cui attività risulta deregolata in molti tumori umani (Gorre *et al.*, 2002; Solit *et al.*, 2002). L'elevata citotossicità di geldanamycin, che ne limita l'utilizzo *in vivo*, ha portato allo sviluppo di derivati di sintesi meno tossici quali il 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) e il 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) (Goetz *et al.*, 2003; Hollingshead *et al.*, 2005). Risultati pre-clinici promettenti hanno favorito l'utilizzo del 17-AAG in *trials* clinici, da solo o in associazione ad altri chemoterapici (Goetz *et al.*, 2005; Workman, 2004).

Sulla base di queste osservazioni abbiamo voluto verificare se anche l'inibitore 17-AAG, rilevante dal punto di vista clinico, fosse in grado di indurre la degradazione di Ron. Come si può osservare in figura 5B anche questo composto ha determinato una significativa destabilizzazione del recettore.

Per verificare il coinvolgimento di CHIP in questo meccanismo di *down-regulation* abbiamo analizzato la degradazione di Ron indotta da 17-AAG in presenza del siRNA di CHIP. Il silenziamento di CHIP ha determinato il blocco della degradazione di Ron (fig. 5C).

I risultati ottenuti dimostrano che l'ubiquitina ligasi CHIP riveste un ruolo cruciale nella regolazione della degradazione recettoriale indotta dall'inibizione dell'attività di Hsp90.

Il mutante Ron^{M1254T} è più sensibile all'effetto destabilizzante degli inibitori di Hsp90

Evidenze sperimentali precedenti hanno dimostrato che il trattamento con geldanamycin determina una marcata degradazione del recettore oncogenico, con una cinetica accelerata rispetto a quella del recettore normale. Sulla base di queste osservazioni abbiamo verificato la maggiore sensibilità del mutante oncogenico anche al derivato di geldanamycin 17-AAG. In risposta al 17-AAG abbiamo osservato una cinetica di degradazione più rapida per il mutante Ron^{M1254T}, accompagnata da una scomparsa rapida delle forme fosforilate di Erk-1/2 e Akt, importanti mediatori della traduzione del segnale Ron-dipendente (fig. 6A). Abbiamo osservato inoltre che concentrazioni di farmaco di 0.1 μ M sono sufficienti per indurre la degradazione di Ron^{M1254T}, mentre sono necessarie concentrazioni di 1 μ M per ottenere effetti apprezzabili sulla degradazione del recettore normale (fig. 6B).

L'effetto destabilizzante di questi inibitori sulle proteine bersaglio è stato imputato alla sua capacità di alterarne l'associazione con la proteina chaperone Hsp90 (Xu *et al.*, 2001). Abbiamo pertanto valutato l'associazione tra Hsp90 e Ron o il mutante oncogenico Ron^{M1254T} dopo il trattamento con geldanamycin o 17-AAG. In un esperimento di cinetica a breve termine con i due inibitori, la dissociazione da Hsp90 è risultata più rapida per Ron^{M1254T} rispetto al recettore normale (fig. 7A). Inoltre alla concentrazione 0.1 μ M di entrambi gli inibitori è stata osservata esclusivamente la dissociazione del recettore oncogenico da Hsp90 (fig. 7B).

Questi dati indicano che la sostituzione oncogenica M1254T è associata ad una aumentata sensibilità agli inibitori di Hsp90 e ad una più dinamica interazione con la proteina chaperone.

17-AAG contrasta la crescita, la migrazione e l'attività trasformante di cellule 3T3-Ron^{M1254T}

La mutazione puntiforme M1254T conferisce al recettore un potenziale trasformante *in vitro* e la capacità di crescita e migrazione in maniera ligando indipendente (Santoro *et al.*, 1998). Sulla base di queste osservazioni abbiamo verificato se il trattamento con l'inibitore clinicamente rilevante 17-AAG fosse in grado di alterare le potenzialità invasive del recettore oncogenico.

E' stato allestito un saggio di proliferazione su cellule NIH-3T3 non trasfettate e su cellule 3T3-Ron e 3T3-Ron^{M1254T}. Come atteso, cellule 3T3-Ron^{M1254T} hanno mostrato un tasso di proliferazione marcatamente più elevato rispetto ai fibroblasti normali o esperimenti

Ron *wild-type*. Il trattamento con basse concentrazioni di 17-AAG (0,1 μ M) ha determinato una riduzione consistente nella crescita delle cellule 3T3-Ron^{M1254T} (fig. 8A). Il tasso di proliferazione di cellule NIH-3T3 non trasfettate e di cellule 3T3-Ron è risultato simile e, come atteso, la riduzione della crescita in presenza di 17-AAG è risultata comparabile.

Abbiamo quindi valutato l'effetto del trattamento con 17-AAG sulla migrazione di cellule 3T3-Ron e 3T3-Ron^{M1254T}, con un saggio di migrazione *in vitro* in presenza di siero. Come atteso, è stata osservata una maggiore attività di migrazione delle cellule 3T3-Ron^{M1254T}. In seguito al trattamento con 17-AAG, la migrazione di entrambe le linee cellulari è risultata considerevolmente ridotta, con un effetto più marcato nel caso di cellule esprimenti il mutante oncogenico Ron^{M1254T} (fig. 8B).

È noto che Ron^{M1254T} presenta attività trasformante *in vitro* (Santoro *et al.*, 1998). In un saggio di formazione di foci abbiamo osservato che l'elevata capacità trasformante di Ron^{M1254T} è risultata pressoché completamente abolita dal trattamento con 17-AAG ad entrambe le concentrazioni testate (fig. 8C).

I dati ottenuti indicano che l'inibitore 17-AAG è un potente inibitore della proliferazione cellulare, della migrazione e della capacità trasformante indotte da Ron^{M1254T}, suggerendo un suo possibile utilizzo nei casi di tumori umani caratterizzati dall'espressione e attivazione alterata del recettore Ron.

3. Ruolo dei microRNA nella regolazione negativa di Ron

I microRNA 198 e 214 sono coinvolti nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione di Ron

Sulla base di evidenze sperimentali che attribuiscono ai microRNA (miRNA) una funzione regolatoria dell'espressione genica, abbiamo valutato il possibile coinvolgimento di alcune di queste sequenze oligoribonucleotidiche nella regolazione post-trascrizionale di Ron.

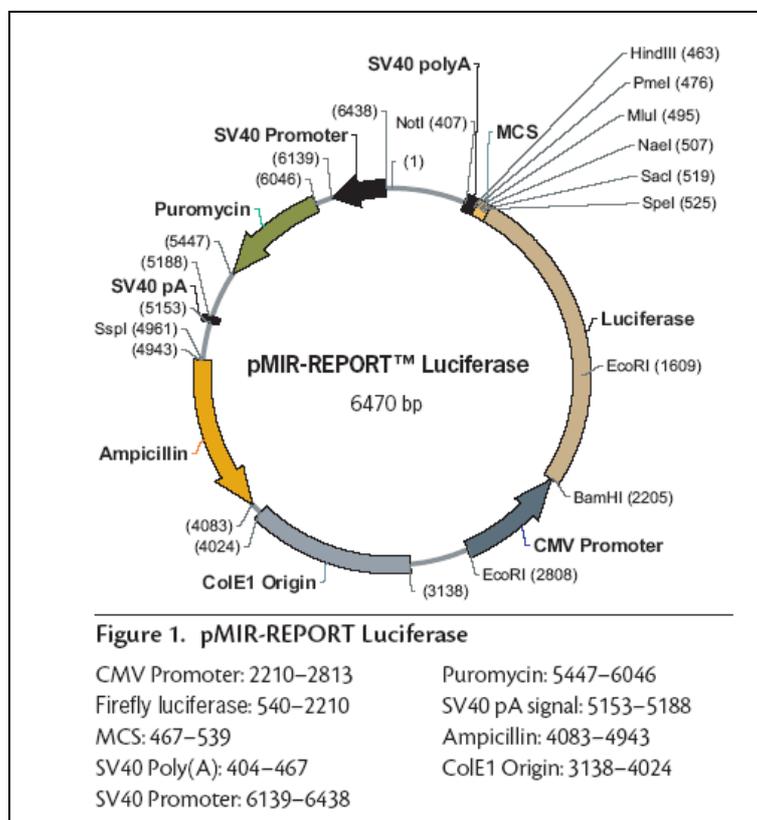
A tal fine abbiamo utilizzato *softwares* previsionali disponibili in rete (e.s. miRBASE, miRanda) che effettuano una ricerca di possibili target interrogando un *database* contenente le sequenze di tutti i miRNA finora identificati (miRNA *database* del Sanger Institute: <http://www.sanger.ac.uk>). I diversi programmi attribuiscono un punteggio (*score*) ad ogni specifico miRNA sulla base delle caratteristiche delle rispettive sequenze bersaglio presenti nella regione non tradotta in posizione 3' (3' UTR) dell'mRNA di interesse, come la conservazione tra le specie e la presenza di *seeds*, sequenze di 7

nucleotidi perfettamente complementari. I 15 miRNA con punteggio più alto identificati con i differenti algoritmi sono stati ulteriormente analizzati utilizzando il *software* RNAHybrid, che analizza la stabilità termodinamica dei complessi miRNA-mRNA.

I miRNA hsa-miR-198 e hsa-miR-21, caratterizzati dal miglior compromesso tra *score* e caratteristiche termodinamiche, sono stati pertanto selezionati come candidati più probabili per la regolazione del trascritto di Ron (fig. 9A).

Per verificare sperimentalmente la funzione regolatoria sul trascritto di Ron dei due miRNA identificati, cellule esprimenti in modo endogeno il recettore (GTL16) sono state trasfettate con oligonucleotidi sintetici commerciali chimicamente identici alle sequenze di miRNA maturi endogeni, in grado di essere efficacemente processati dal RISC (pre-miR precursor hsa-miR-198 e hsa-miR-214, Ambion). Come controllo è stato trasfettato un oligonucleotide costituito da una sequenza non presente nel trascrittoma umano (pre-miR precursor negative control 1, Ambion). A tempi diversi dalla trasfezione è stato analizzato il livello di espressione di Ron mediante immunoblotting (fig. 9B). A basse dosi di reagente di trasfezione non abbiamo osservato alcuna modulazione del livello recettoriale. Al contrario, aumentando la concentrazione del reagente di trasfezione abbiamo riscontrato con entrambi i miRNA testati una riduzione debole del livello di espressione di Ron. L'effetto è risultato dose-dipendente e maggiormente apprezzabile in risposta al miRNA 198. Non abbiamo osservato in nessuna delle condizioni testate variazioni nei livelli di espressione di Met, recettore per l'HGF appartenente alla stessa famiglia di Ron.

Anche se necessitano di una conferma in altre linee cellulari, i risultati ottenuti suggeriscono il possibile coinvolgimento dei miRNA 198e 214 nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione di Ron. A ulteriore verifica dei dati ottenuti l'intera sequenza corrispondente alla regione 3' UTR dell'mRNA di Ron è stata clonata nel vettore plasmidico pMIR-REPORT (Ambion), a valle della sequenza codificante l'enzima luciferasi. L'utilizzo di questo vettore permette di valutare mediante analisi di luminescenza l'interazione tra un miRNA e la regione 3' UTR di uno specifico mRNA.



Sono attualmente in corso esperimenti di co-trasfezione del costrutto pMIR-REPORT-3'UTR- Ron e del pre-miR-214/-198 o del pre-miR-negative control, che consentiranno di verificare se l'effetto dell'iperespressione del miR-198 sulla *down-regulation* del recettore è dovuto all'interazione diretta del miRNA con la regione 3' UTR di Ron.

Modulazione dell'espressione di microRNA indotta da MSP

Crescenti evidenze sperimentali suggeriscono il coinvolgimento dei miRNA nel controllo di processi biologici fondamentali, quali la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, il differenziamento e la morfogenesi (Harfe, 2005; Miska, 2005). Abbiamo pertanto inteso verificare se l'attivazione di Ron indotta da ligando possa determinare una modulazione nei livelli di miRNA specifici.

A tale scopo è stato analizzato il profilo di espressione dei miRNA in cellule epiteliali primarie (cheratinociti neonatali umani) esprimenti Ron, stimulate o meno con MSP in assenza di siero. L'RNA totale estratto da queste cellule è stato sottoposto a marcatura con i fluorofori Hy3/Hy5 mediante l'utilizzo del "miRCURY LNA Array labeling kit" (Exiqon). Il livello di espressione dei miRNA in cellule stimulate con il ligando è stato comparato al livello di espressione basale mediante analisi su *microarrays* (miRCURY LNA microarray kit V8.0, Exiqon). I *microarrays* utilizzati contengono sonde per i 326 mi-RNA umani attualmente identificati, presenti nell'ultimo aggiornamento del miRNA *database* del

Sanger Institute. Le sonde sono costituite da sequenze di LNA (Locked Nucleic Acid), un analogo del DNA con caratteristiche termodinamiche differenti, particolarmente adatto all'utilizzo per l'analisi dei miRNA, poichè garantisce una buona specificità di ibridazione in un ampio intervallo di temperature anche con sequenze corte. I *microarrays* sono stati processati (fig. 11) ed è attualmente in corso l'analisi dei dati che consentirà l'identificazione dei miRNA i cui livelli cellulari risultano modulati dall'attivazione di Ron.

PROSPETTIVE FUTURE

Il lavoro sperimentale nei prossimi mesi sarà volto ad approfondire e confermare il ruolo dei miRNA nella regolazione negativa di Ron.

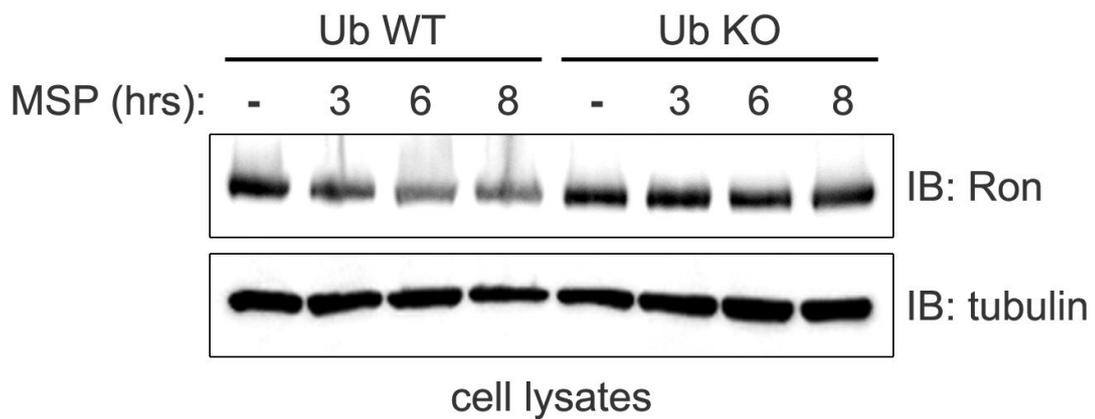
Verrà valutato l'effetto di inibitori specifici dell'attività dei miRNA 198 e 214 (miRcury LNA miRNA inhibitors, Exiqon), costituiti da sequenze di acidi nucleici complementari ai miRNA maturi e quindi in grado di bloccarne la funzione.

Sarà inoltre verificato se un'alterata espressione di questi miRNA possa contribuire all'accumulo di forme costitutivamente attive di Ron documentato in alcuni tipi tumorali. A tale scopo, sarà confrontata l'espressione dei due miRNA in linee cellulari derivate da tumori epiteliali in cui è stata descritta un'espressione aberrante di Ron (es. ZR75.1, HCT116, SW837, SW620 TCCSUP, UB40) e in cellule epiteliali primarie, mediante *RealTime PCR*.

La modulazione del profilo d'espressione dei miRNA indotta da stimolazione di Ron, valutata mediante *microarrays*, sarà validata attraverso analisi in *RealTime PCR*.

L'identificazione di miRNA in grado di modulare l'espressione di proteine coinvolte nella regolazione della crescita cellulare, della migrazione e dell'invasività, consentirà di chiarire il coinvolgimento di Ron nei processi di promozione e progressione tumorale.

A



B

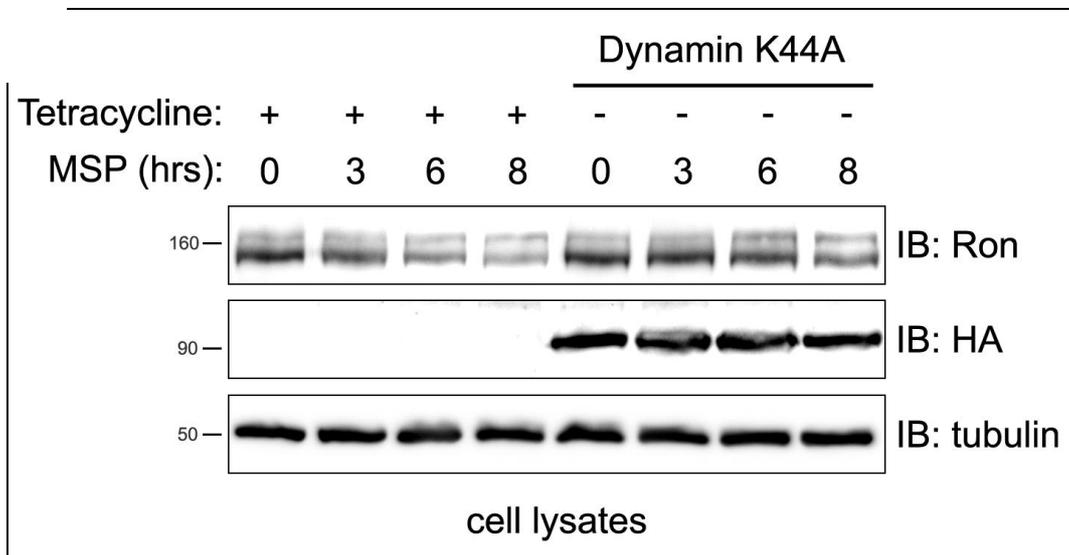


Fig. 1. A) Cellule COS-7 sono state co-trasfettate con i cDNA di Ron e con un plasmide codificante l'ubiquitina *wild-type* (Ub-WT) o un mutante recante la sostituzione di nove residui di lisina ad arginina (Ub-KO). 72 ore dopo la trasfezione le cellule sono state trattate con MSP 100 ng/ml per i tempi indicati e successivamente lisate. Un'eguale quantità di estratti proteici totali è stata analizzata in immunoblotting con gli anticorpi indicati. **B)** Cellule HeLa esprimenti dinamina K44A recante il tag HA sotto il controllo di un promotore *tet-off* sono state trasfettate con il cDNA di Ron. 48 ore dopo la trasfezione le cellule sono state poste in terreno contenente o meno tetraciclina e dopo ulteriori 24 ore trattate con MSP 100 ng/ml per i tempi indicati. Le cellule successivamente sono state lisate. Un'eguale quantità di estratti proteici totali è stata analizzata in immunoblotting con gli anticorpi indicati.

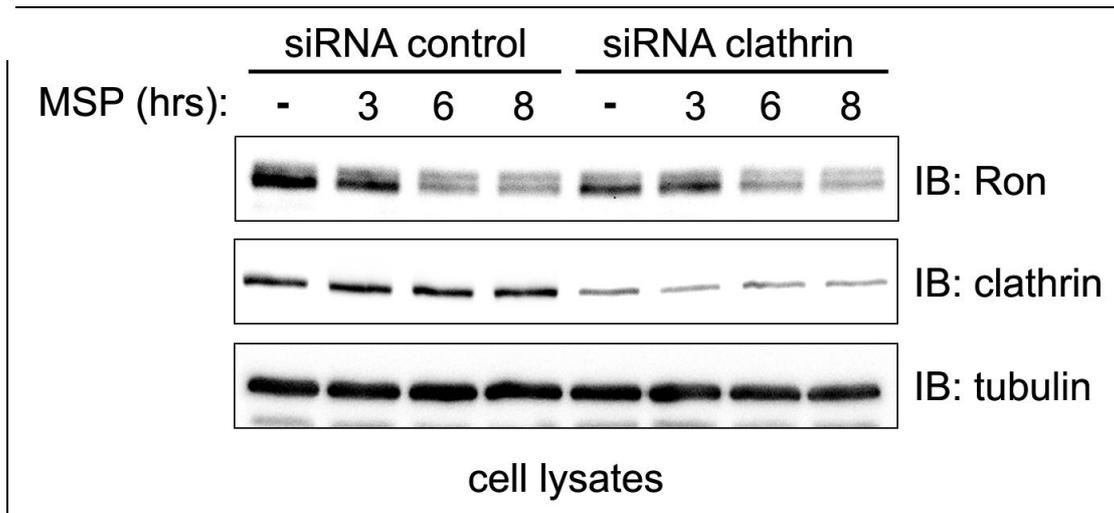
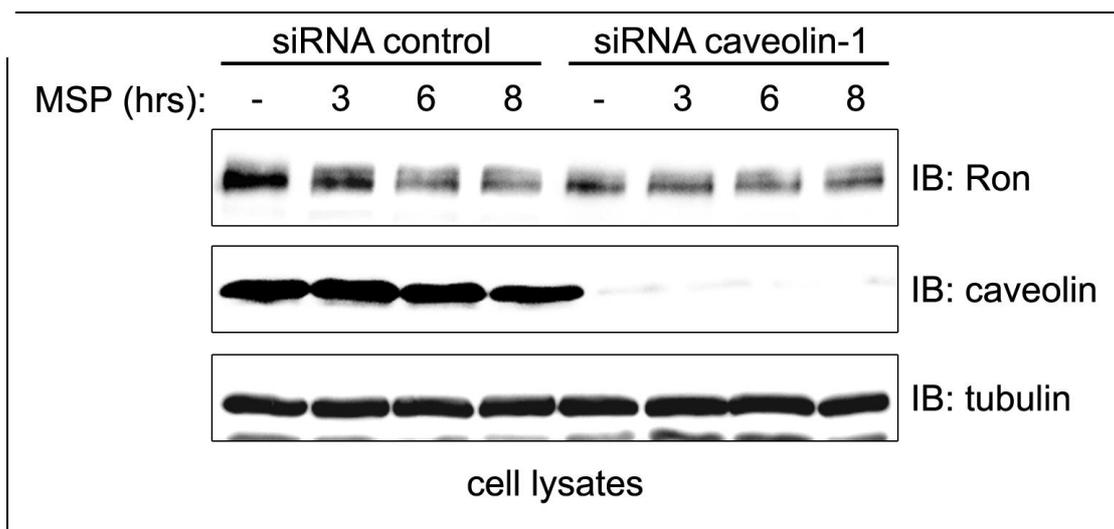
A**B**

Fig 2. A) Cellule FG2 sono state trasfettate con un plasmide codificante un plasmide codificante il siRNA per clatrina o un siRNA controllo. 72 ore dopo la trasfezione le cellule sono state trattate con MSP 100 ng/ml per i tempi indicati e successivamente lisate. Un'eguale quantità di estratti proteici totali è stata analizzata in immunoblotting con gli anticorpi indicati. **B)** Cellule FG2 sono state trasfettate con un plasmide codificante un plasmide codificante il siRNA per caveolina-1 o un siRNA controllo. 72 ore dopo la trasfezione le cellule sono state trattate con MSP 100 ng/ml per i tempi indicati e successivamente lisate. Un'eguale quantità di estratti proteici totali è stata analizzata in immunoblotting con gli anticorpi indicati.

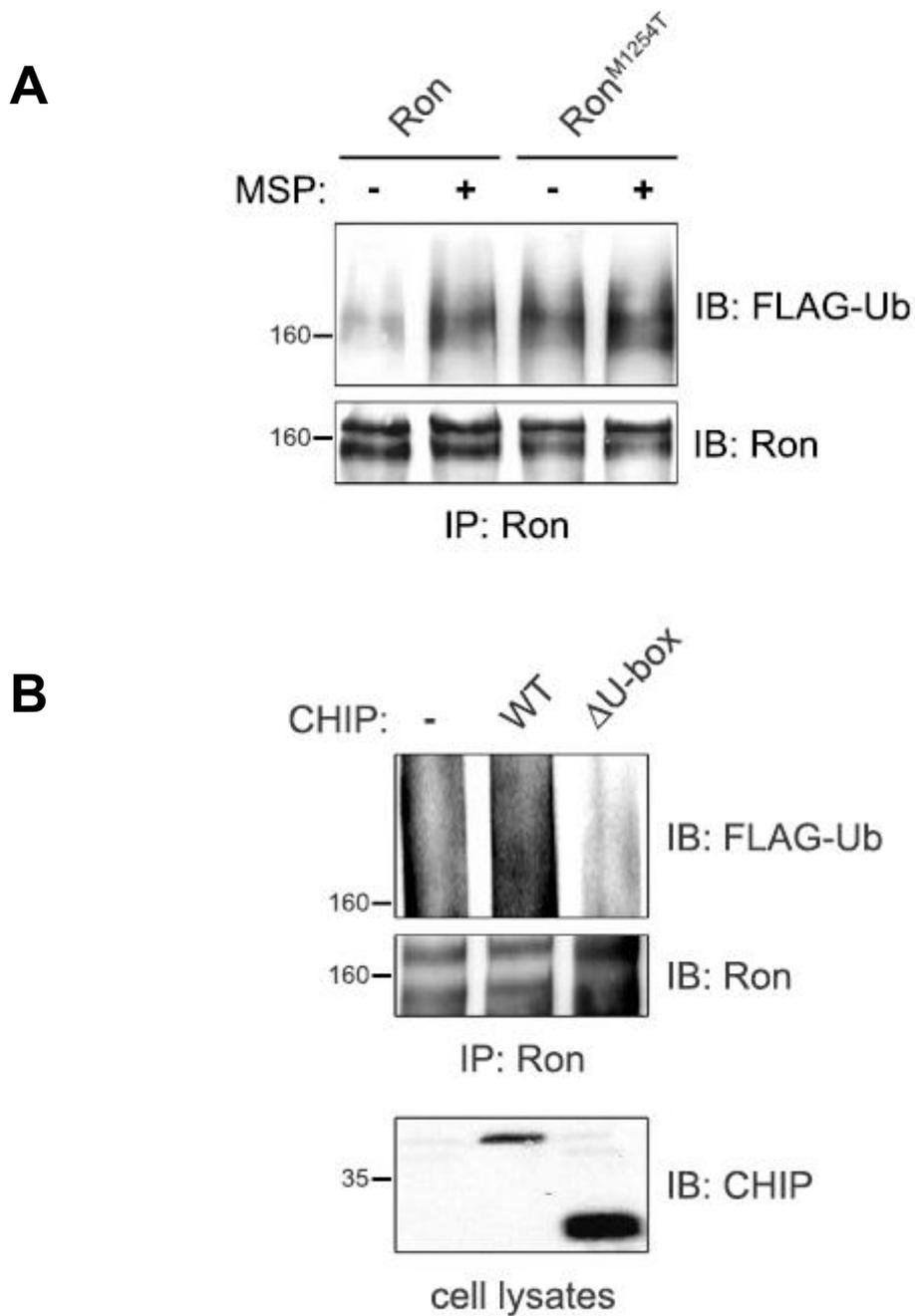


Fig. 3. A) Il cDNA di Ron o di Ron^{M1254T} è stato trasfettato in cellule COS-7 insieme a una forma dell'ubiquitina recante il tag FLAG (FLAG-Ub). A 72h dalla trasfezione le cellule sono state stimolate con solvente (-) o con 300ng/ml di MSP per 20min. Gli estratti proteici sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti-recettore e sottoposti a SDS-PAGE e immunoblotting con gli anticorpi indicati. **B)** I cDNA Ron^{M1254T} e FLAG-Ub sono stati trasfettati in cellule COS-7 insieme ai cDNA di CHIP o del mutante CHIPΔUbox. Gli estratti proteici sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti-recettore e sottoposti a SDS-PAGE e immunoblotting con gli anticorpi indicati. Gli estratti totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE ed immunoblotting con anticorpi anti-CHIP.

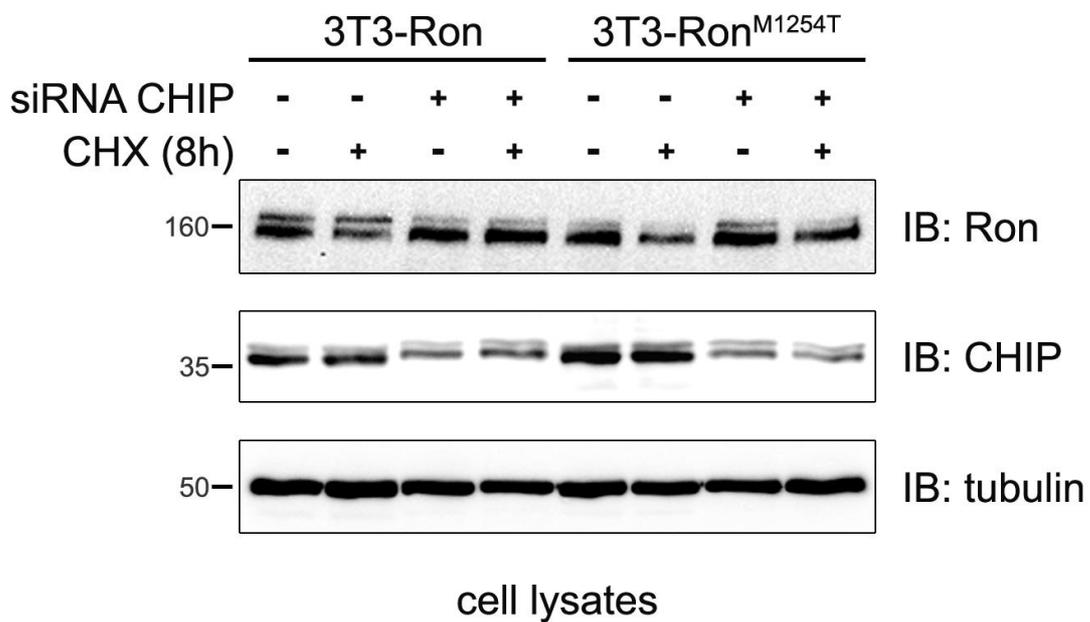


Fig. 4. Cellule COS-7 sono state co-trasfettate con i cDNA di Ron o Ron^{M1254T} e un plasmide codificante il siRNA per CHIP o un siRNA controllo. 72 ore dopo la trasfezione le cellule sono state trattate con cicloesimide (CHX) 10 μ M per 8 ore e successivamente lisate. Un'eguale quantità di estratti proteici totali è stata analizzata in immunoblotting con gli anticorpi indicati. Il silenziamento genico è stato verificato mediante immunoblotting con l'anticorpo policlonale anti-CHIP, mentre l'anticorpo anti- α -tubulina è stato utilizzato come controllo di caricamento.

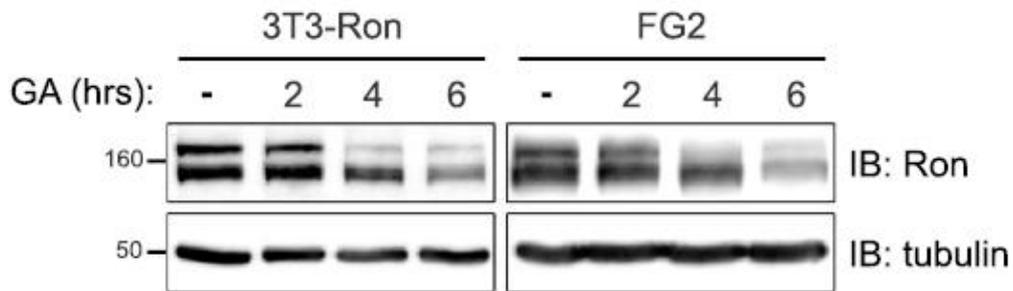
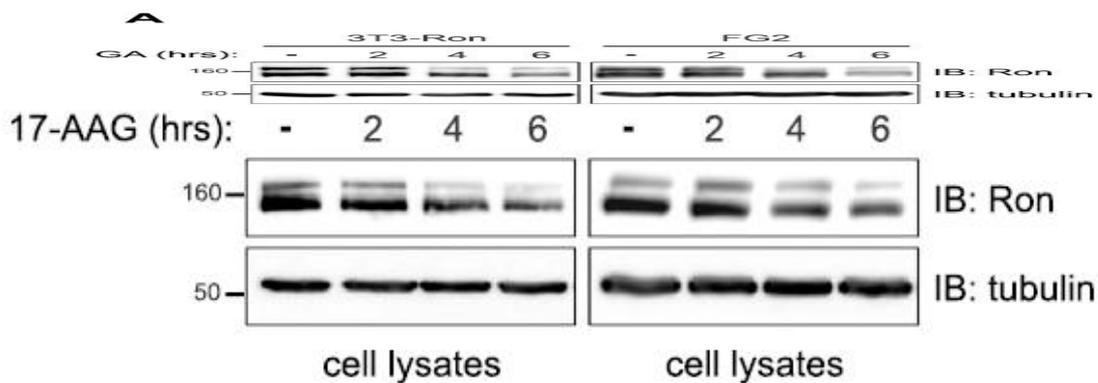
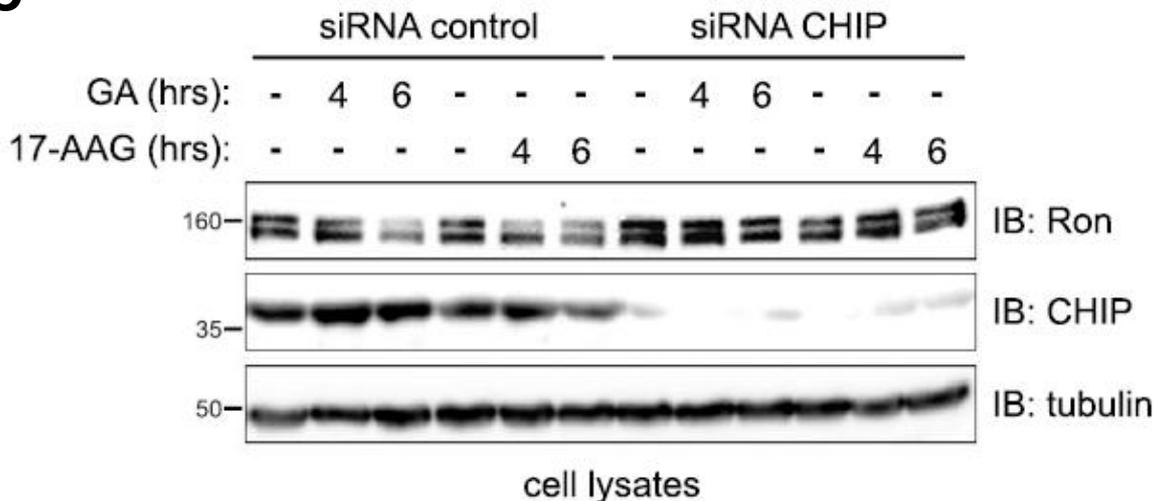
A**B****C**

Fig. 5. Cellule 3T3-Ron o FG2 sono state lisate dopo trattamento con geldanamicina (GA) 1 μ M (pannello **A**) o con 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) 1 μ M (pannello **B**) o per i tempi indicati. Gli estratti totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE ed immunoblotting con anticorpi diretti contro la porzione C-terminale di Ron. L'anticorpo anti- α -tubulina è stato utilizzato come controllo di caricamento. **C**) Cellule FG2 sono state trasfettate con un vettore plasmidico codificante il siRNA di CHIP o un siRNA di controllo. 48 ore dopo la trasfezione le cellule sono state trattate con GA o 17-AAG 1 μ M per tempi diversi, quindi lisate. Gli estratti totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE ed immunoblotting con anticorpi anti-Ron, anti-CHIP e anti- α -tubulina

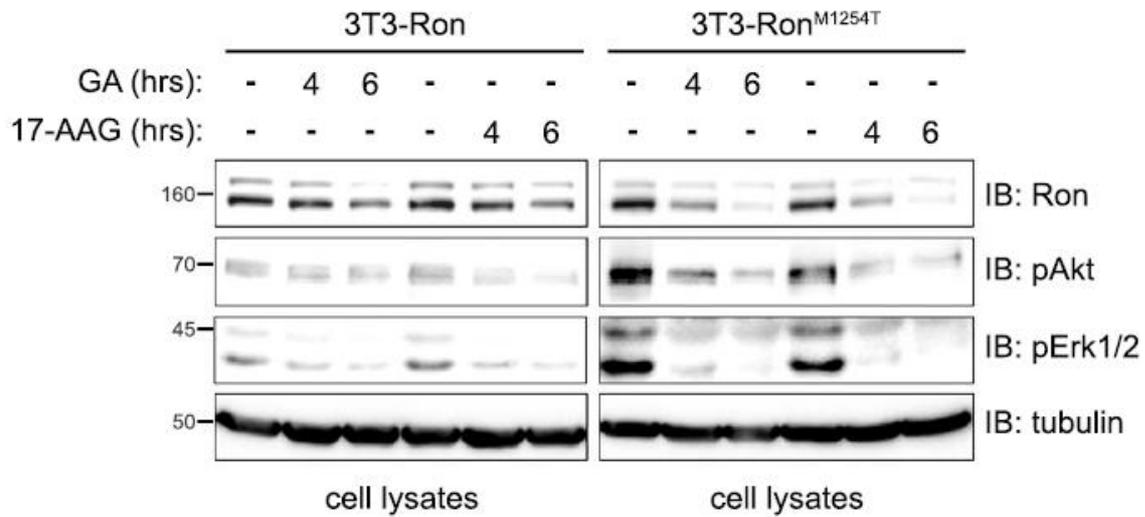
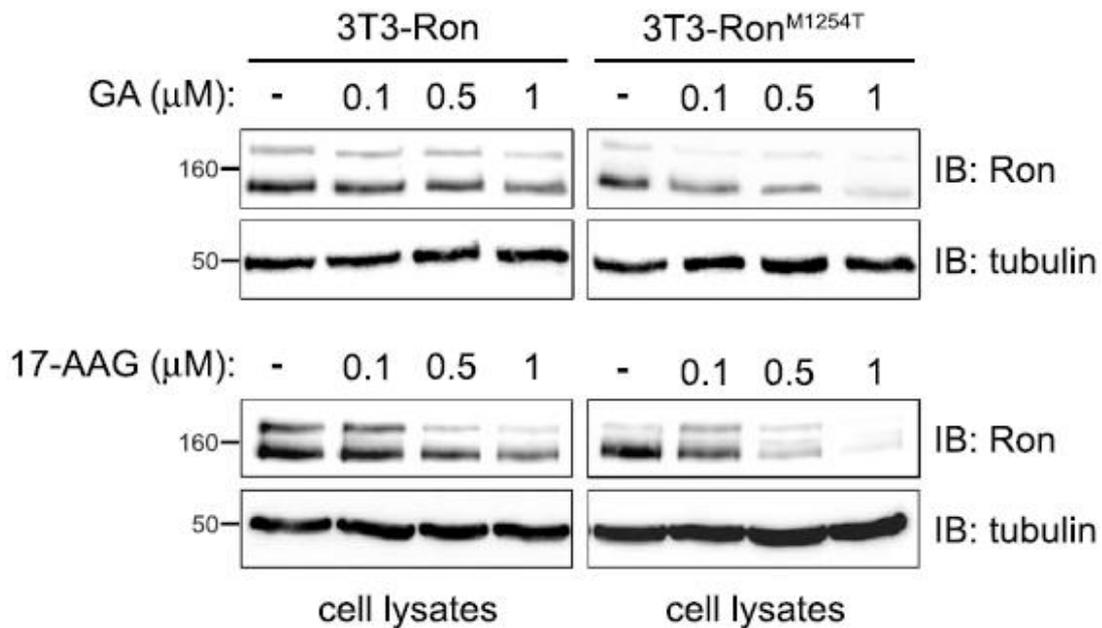
A**B**

Fig. 6. A) Cellule 3T3-Ron o FG2 sono state trattate con GA o 17-AAG 1 μM per i tempi indicati e successivamente lisate; gli estratti totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE ed immunoblotting con gli anticorpi indicati. **B)** Cellule 3T3-Ron o FG2 sono state lisate dopo trattamento con GA o 17-AAG per 6 ore a diverse concentrazioni. Gli estratti totali sono stati sottoposti a SDS-PAGE ed immunoblotting con gli anticorpi indicati.

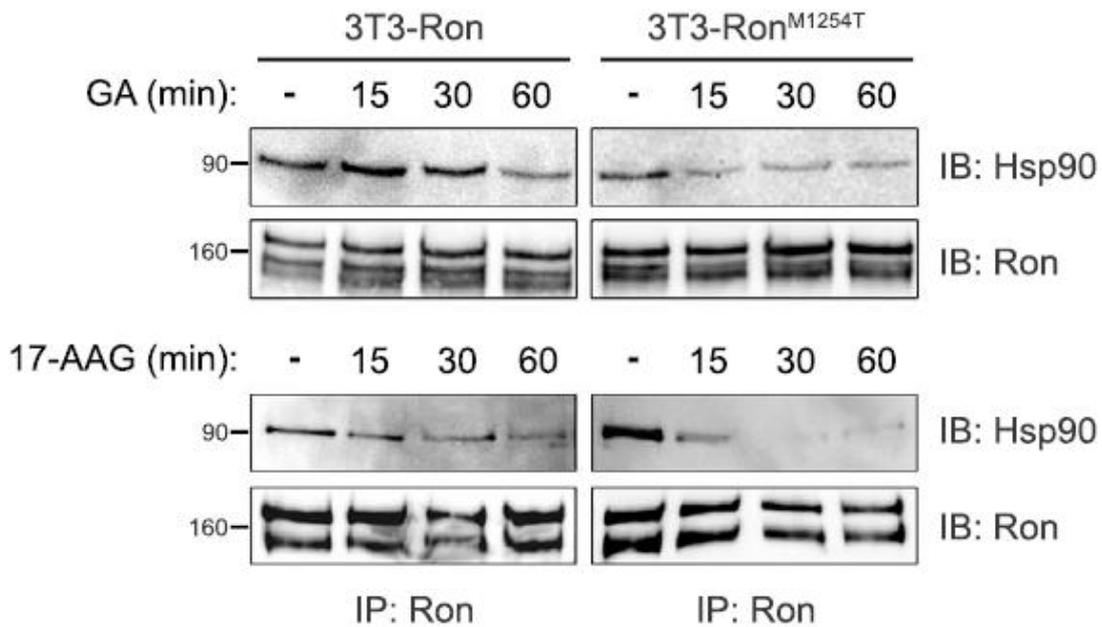
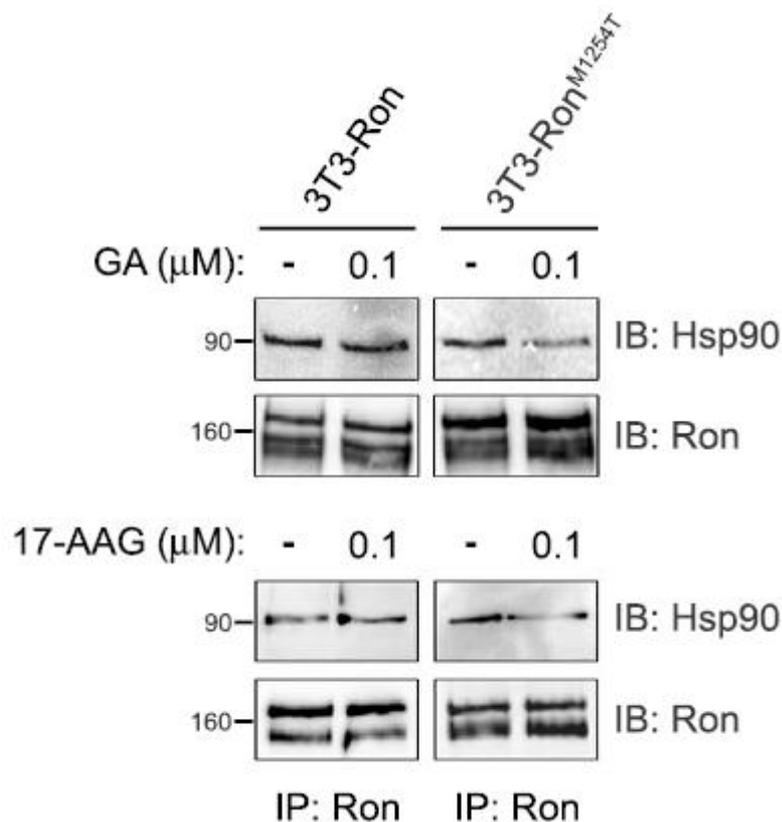
A**B**

Fig. 7. A) Cellule 3T3-Ron o 3T3-Ron^{M1254T} sono state lisate dopo trattamento con geldanamicina 1μM o con 17-AAG 1μM per diversi tempi. Gli estratti sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti-recettore, quindi sottoposti a SDS-PAGE e immunoblotting con gli anticorpi indicati. **B)** Gli estratti di cellule 3T3-Ron o 3T3-Ron^{M1254T} sono state immunoprecipitati dopo trattamento con GA o con 17-AAG 0.1 μM per 6 ore e quindi sottoposti a SDS-PAGE ed immunoblotting con gli anticorpi indicati.

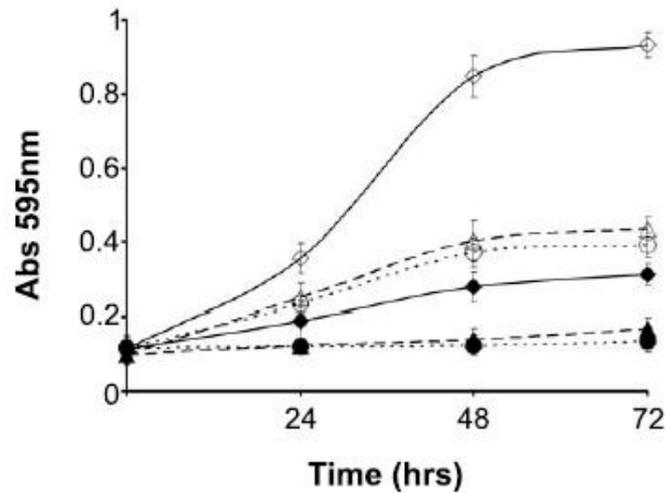
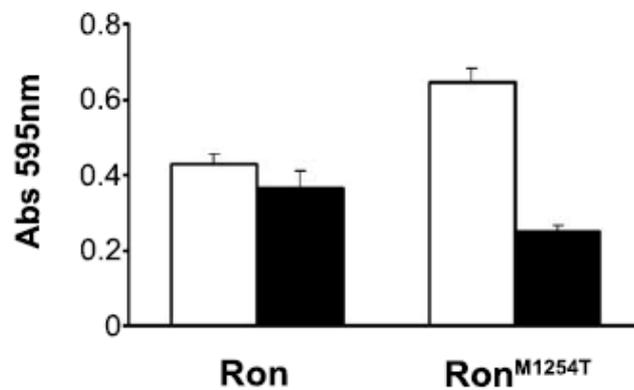
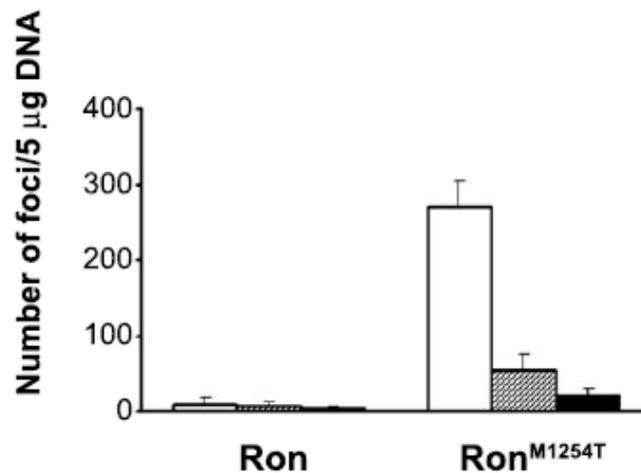
A**B****C**

Fig. 8. A) Cellule NIH-3T3 (curva puntinata), NIH-Ron (curva tratteggiata) o NIH-Ron^{M1254T} (curva continua) sono state coltivate in presenza di 0,1 μM 17-AAG (simboli neri) o di solvente (simboli bianchi). Il numero di cellule è stato verificato mediante il metodo della colorazione con cristal-violetto. **B)** 1 x 10⁵ cellule NIH-3T3 o NIH-Ron sono state fatte migrare attraverso camere Transwell® in presenza o in assenza di GA 1 μM per 6h. Al termine le cellule migrate nella camera inferiore sono state fissate e colorate con crystal violetto. Dopo solubilizzazione del colorante con acido acetico al 10% è stata determinata l'assorbanza a 595nm. **C)** Cellule NIH-3T3 sono state trasfettate con il cDNA di Ron o Ron^{M1254T}. Due giorni dopo la trasfezione sono state trattate con solvente (colonna bianca), con 17-AAG 10 nM (colonna segmentata) o 17-AAG 50nM (colonna nera). Il trattamento è stato rinnovato ogni 48h e le cellule mantenute a confluenza. 10 giorni dopo la trasfezione sono stati contati i foci formati.

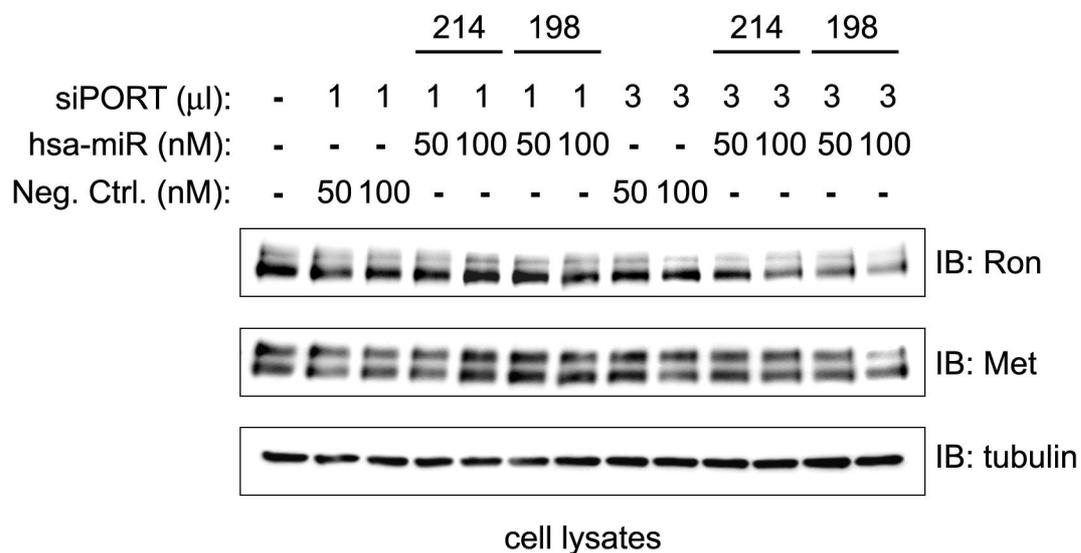


Fig. 10. Cellule GTL16 sono state trasfettate con i pre-miRNA precursor (Ambion) hsa-miRNA-198, hsa-miRNA-214 o hsa pre-miRNA negative control alla concentrazione 50 nM o 100 nM con 1 o 3 μ l di siPORT-NeoFX Transfection Reagent (Ambion). A 72h dalla trasfezione le cellule sono state lisate e un'eguale quantità di estratti proteici totali è stata analizzata mediante SDS-PAGE e immunoblotting con gli anticorpi indicati.

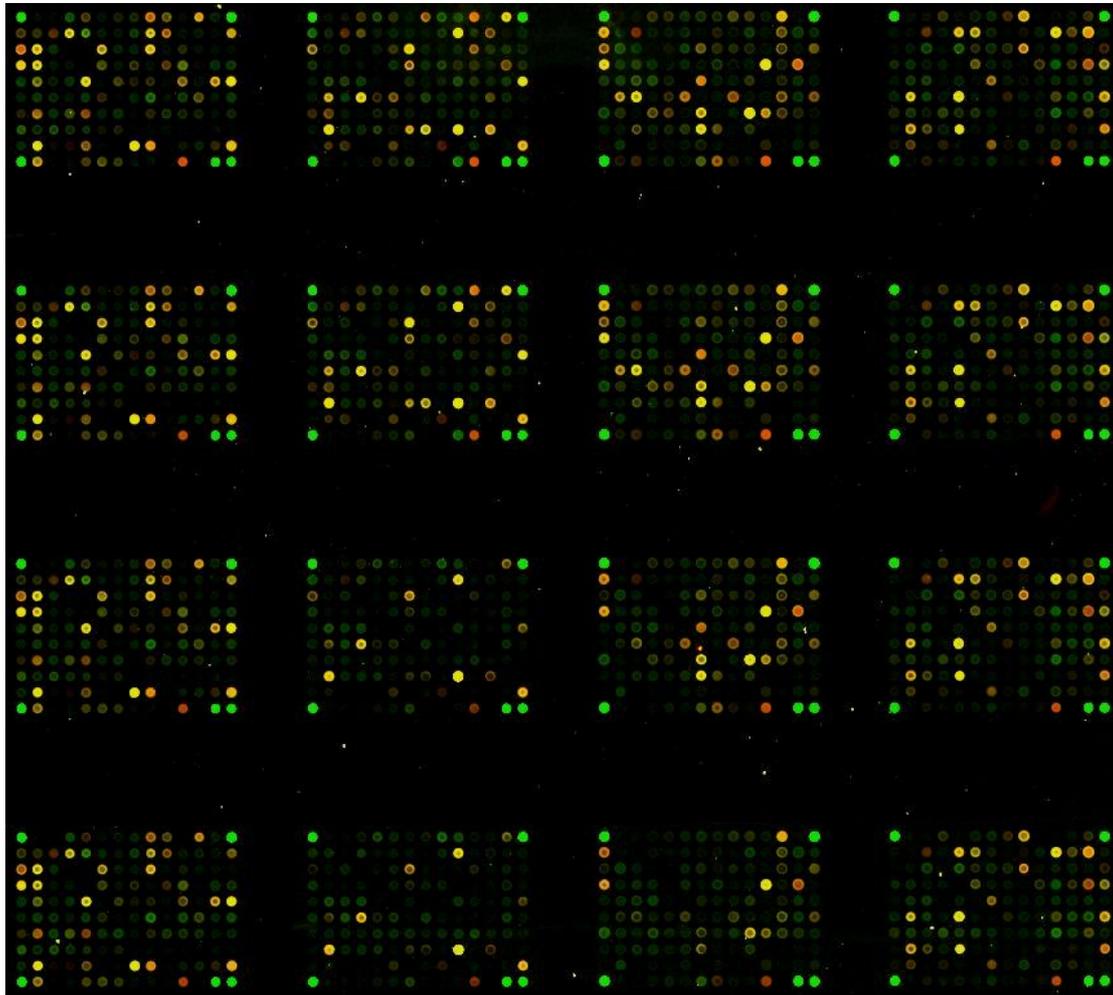


Fig. 11. Cheratinociti umani primari sono stati coltivati in terreno senza siero e stimolati o meno con 100 ng/ml di MSP per 8h. L'RNA totale è stato estratto utilizzando il miRNAasy Kit (Qiagen), in grado di preservare la frazione contenente RNA di piccole dimensioni. L'RNA è stato quindi marcato con il miRCURY RNA labelling kit (Exiqon) e ibridato per 16h a 60°C su vetrini miRCURY LNA microarray 8.0 (Exiqon). La fluorescenza è stata rilevata mediante scansione laser (Agilent).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Alvarez-Garcia, I. & Miska, E. A. (2005). MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* **132**, 4653-4662.

Bache, K. G., Slagsvold, T. & Stenmark, H. (2004). Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *Embo J* **23**, 2707-2712.

Ballinger, C. A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L. J., Yin, L. Y. & Patterson, C. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* **19**, 4535-4545.

Bennasroune, A., Gardin, A., Aunis, D., Cremel, G. & Hubert, P. (2004). Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**, 23-38.

Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355-365.

Calin, G. A., Liu, C. G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., Dell'Aquila, M. L., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T. J., Bullrich, F., Negrini, M. & Croce, C. M. (2004). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11755-11760.

Cheng, H. L., Liu, H. S., Lin, Y. J., Chen, H. H., Hsu, P. Y., Chang, T. Y., Ho, C. L., Tzai, T. S. & Chow, N. H. (2005). Co-expression of RON and MET is a prognostic indicator for patients with transitional-cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* **92**, 1906-1914.

Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Hohfeld, J. & Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* **3**, 93-96.

Dikic, I. & Giordano, S. (2003). Negative receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 128-135.

Germano, S., Barberis, D., Santoro, M. M., Penengo, L., Citri, A., Yarden, Y. & Gaudino, G. (2006). Geldanamycins trigger a novel Ron degradative pathway hampering oncogenic signaling. *J Biol Chem*.

Goetz, M. P., Toft, D. O., Ames, M. M. & Erlichman, C. (2003). The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol* **14**, 1169-1176.

Goetz, M. P., Toft, D., Reid, J., Ames, M., Stensgard, B., Safgren, S., Adjei, A. A., Sloan, J., Atherton, P., Vasile, V., Salazaar, S., Adjei, A., Croghan, G. & Erlichman, C. (2005). Phase I trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* **23**, 1078-1087.

- Gorre, M. E., Ellwood-Yen, K., Chiosis, G., Rosen, N. & Sawyers, C. L. (2002).** BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. *Blood* **100**, 3041-3044.
- Harfe, B. D. (2005).** MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 410-415.
- He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J. & Hammond, S. M. (2005).** A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828-833.
- Hollingshead, M., Alley, M., Burger, A. M., Borgel, S., Pacula-Cox, C., Fiebig, H. H. & Sausville, E. A. (2005).** In vivo antitumor efficacy of 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin hydrochloride), a water-soluble geldanamycin derivative. *Cancer Chemother Pharmacol* **56**, 115-125.
- Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Levenson, J. D., Hunter, T. & Liu, Y. C. (1999).** The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**, 309-312.
- Kim, V. N. (2005).** Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells* **19**, 1-15.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M. & Rajewsky, N. (2005).** Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* **37**, 495-500.
- Lamorte, L. & Park, M. (2001).** The receptor tyrosine kinases: role in cancer progression. *Surg Oncol Clin N Am* **10**, 271-288, viii.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. (1993).** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. (2005).** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15-20.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S. & Johnson, J. M. (2005).** Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769-773.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. & Parker, R. (2005).** MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* **7**, 719-723.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R. & Golub, T. R. (2005).** MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834-838.

- Maggiora, P., Marchio, S., Stella, M. C., Giai, M., Belfiore, A., De Bortoli, M., Di Renzo, M. F., Costantino, A., Sismondi, P. & Comoglio, P. M. (1998).** Overexpression of the RON gene in human breast carcinoma. *Oncogene* **16**, 2927-2933.
- Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M. & Cyr, D. M. (2001).** The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* **3**, 100-105.
- Michael, M. Z., SM, O. C., van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P. & James, R. J. (2003).** Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* **1**, 882-891.
- Miska, E. A. (2005).** How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 563-568.
- Olsen, P. H. & Ambros, V. (1999).** The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**, 671-680.
- Penengo, L., Rubin, C., Yarden, Y. & Gaudino, G. (2003).** c-Cbl is a critical modulator of the Ron tyrosine kinase receptor. *Oncogene* **22**, 3669-3679.
- Peschard, P. & Park, M. (2003).** Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases. *Cancer Cell* **3**, 519-523.
- Santoro, M. M., Penengo, L., Minetto, M., Orecchia, S., Cilli, M. & Gaudino, G. (1998).** Point mutations in the tyrosine kinase domain release the oncogenic and metastatic potential of the Ron receptor. *Oncogene* **17**, 741-749.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U. & Moarefi, I. (2000).** Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199-210.
- Shimamura, T., Lowell, A. M., Engelman, J. A. & Shapiro, G. I. (2005).** Epidermal growth factor receptors harboring kinase domain mutations associate with the heat shock protein 90 chaperone and are destabilized following exposure to geldanamycins. *Cancer Res* **65**, 6401-6408.
- Solit, D. B., Zheng, F. F., Drobnjak, M., Munster, P. N., Higgins, B., Verbel, D., Heller, G., Tong, W., Cordon-Cardo, C., Agus, D. B., Scher, H. I. & Rosen, N. (2002).** 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces the degradation of androgen receptor and HER-2/neu and inhibits the growth of prostate cancer xenografts. *Clin Cancer Res* **8**, 986-993.
- Stebbins, C. E., Russo, A. A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F. U. & Pavletich, N. P. (1997).** Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**, 239-250.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T. & Takahashi, T. (2004).**

Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* **64**, 3753-3756.

Thien, C. B. & Langdon, W. Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 294-307.

Wang, M. H., Wang, D. & Chen, Y. Q. (2003). Oncogenic and invasive potentials of human macrophage-stimulating protein receptor, the RON receptor tyrosine kinase. *Carcinogenesis* **24**, 1291-1300.

Wegele, H., Muller, L. & Buchner, J. (2004). Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **151**, 1-44.

Willett, C. G., Wang, M. H., Emanuel, R. L., Graham, S. A., Smith, D. I., Shridhar, V., Sugarbaker, D. J. & Sunday, M. E. (1998). Macrophage-stimulating protein and its receptor in non-small-cell lung tumors: induction of receptor tyrosine phosphorylation and cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**, 489-496.

Workman, P. (2004). Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Lett* **206**, 149-157.

Xu, W., Marcu, M., Yuan, X., Mimnaugh, E., Patterson, C. & Neckers, L. (2002). Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12847-12852.

Xu, W., Mimnaugh, E., Rosser, M. F., Nicchitta, C., Marcu, M., Yarden, Y. & Neckers, L. (2001). Sensitivity of mature ErbB2 to geldanamycin is conferred by its kinase domain and is mediated by the chaperone protein Hsp90. *J Biol Chem* **276**, 3702-3708.

Xu, X. M., Wang, D., Shen, Q., Chen, Y. Q. & Wang, M. H. (2004). RNA-mediated gene silencing of the RON receptor tyrosine kinase alters oncogenic phenotypes of human colorectal carcinoma cells. *Oncogene* **23**, 8464-8474.

Zhou, P., Fernandes, N., Dodge, I. L., Reddi, A. L., Rao, N., Safran, H., DiPetrillo, T. A., Wazer, D. E., Band, V. & Band, H. (2003). ErbB2 degradation mediated by the co-chaperone protein CHIP. *J Biol Chem* **278**, 13829-13837.

Zhou, Y. Q., He, C., Chen, Y. Q., Wang, D. & Wang, M. H. (2003). Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal adenocarcinomas: generation of different splicing RON variants and their oncogenic potential. *Oncogene* **22**, 186-197.

ATTIVITA' SCIENTIFICA

- IV Italian RNAi Symposium, Modena, 7 giugno 2006
- VIII Convegno FISV. Riva del Garda, 28 settembre- 1 ottobre 2006.
“Mechanisms involved in trafficking and degradation of the Ron tyrosine kinase receptor”.
(poster e presentazione orale).
- MicroRNAs Europe 2006 Meeting: “MicroRNAs: Biology to Development and Disease”,
Cambridge, UK, 1-2 Novembre 2006

PUBBLICAZIONI

- *“Geldanamycins trigger a novel Ron degradative pathway, hampering oncogenic signaling”*. Serena Germano, Davide Barberis, Massimo M. Santoro, Lorenza Penengo, Ami Citri, Yosef Yarden, Giovanni Gaudino.
J Biol Chem. 2006 Aug 4;281(31):21710-9. Epub 2006 Jun 1.
- *“Transduction of the E6 and E7 genes of alpha- and beta-papillomaviruses differentially modulates pro-inflammatory gene expression”*. Marco De Andrea, Michele Mondini, Barbara Azzimonti, Serena Germano, Giovanni Gaudino, Tiziana Musso, Santo Landolfo and Marisa Gariglio. Sottomesso a Virus Research.
- *“Erionite and Asbestos differently cause transformation of Human Mesothelial Cells”*.
P. Bertino, A. Marconi, L. Palumbo, D. Barbone, B. Bruni, S. Germano, Dogan U., G. F. Tassi, C. Porta, L. Mutti, G. Gaudino. Sottomesso per la pubblicazione.
- *“Combination of Imatinib Mesaylate with Gemcitabine provides a novel therapeutic approach to Malignant Mesothelioma”*. Pietro Bertino, Dario Barbone, Camillo Porta, Serena Germano, Sara Busacca, Sabrina Pinato, Gianfranco Tassi, Roberto Favoni, Giovanni Gaudino, and Luciano Mutti. In corso di revisione.

SEMINARI FREQUENTATI

- 18/11/2005 “Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits”.
Dr. Diego Cotella.
- 23/11/2005 “HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical implications.”
Prof. Luigi Elio Adinolfi.
- 25/11/2005 “Mechanism of transcriptional regulation and disease.”
Prof. Robert Tjian.
- 19/01/2006 “Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation.”
Prof.ssa Maria Grano.
- 13/02/2006 “New perspectives in metabotropic glutamate receptors”
Prof. Ferdinando Nicoletti.
- 15/02/2006 “Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico”
Prof. Daniele Sblattero.
- 13/03/2006 “Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia”
Dr.ssa Antonia Follenzi.
- 20/04/2006 “Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative”.
Dott.ssa Daniela Cilloni.
- 03/05/2006 “Impatto delle biotecnologie sulle strategie di impresa nel settore della tutela della salute”
Dr. Claudio Jommi.
- 04/05/2006 “Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale.”
Dr. Luciano Mutti.

SEMINARI PRESSO IL DISCAFF

- 18/10/2005 “Lipidomica cerebrale”
Dr. A. Minassi
- 08/11/2005 “Segnali di Ca²⁺ e migrazione di neuroni e cellule gliali”
Prof. C. Distasi
- 12/11/2005 “Vascular myogenesis in zebrafish”
Dr. M.M. Santoro

- 15/11/2005 “Glutamate receptors in non-neuronal cells”
Dr. G. Miglio
- 06/12/2005 “La neurogenesi in età adulta”
Prof. M.G. Grilli
- 18/01/2006 “Proteine EGR: Ruolo nelle funzioni cognitive e nella risposta allo stress cronico”
Prof. M. Orsetti-Dr. A. Dellarole
- 01/02/2006 “La calcineurina come switch molecolare durante lo sviluppo neuronale”
Prof. A.A.Genazzani-Dr. R.Zaninetti
- 20/02/2006 “The neuronal cell cycle: a unique target for the treatment of the Alzheimer’s disease”
Relator: Prof. A. Copani
- 23/02/2006 “Novel therapeutic approaches for liver cancer”
Prof. L.Tessitore
- 01/03/2006 “Sumoilazione del fattore di trascrizione Egr-1”
Dr. E. Brunelli
- 06/04/2006 “Il Signore degli anelli”: l’ossidosqualene ciclastasi come enzima e come potenziale bersaglio di farmaci”
Prof. F. Viola
- 15/05/2006 “Strategies to maintain oral food intake in patients with advanced malignant disease: success and failures”
Prof. V.E. Baracos

