

# SAPIENZA Università di Roma

Domanda di finanziamento per Progetti di Ricerca di Università  
Anno 2007 - prot. C26A07XF8X

## 1. Dati Generali

### 1.1 Durata della ricerca

36 mesi

### 1.2 Responsabile della ricerca

*LEVRERO*  
(cognome)

*Massimo*  
(nome)

*Prof. Associato*  
(qualifica)

*28/08/1957*  
(data di nascita)

*NESSUNA AFFERENZA*  
(facoltà)

(dip/istit)

(indirizzo)

*06/49970892*  
(telefono)

(fax)

*massimo.levrero@uniroma1.it*  
(e-mail)

### 1.4 Titolo della ricerca

*Approcci di genomica funzionale ed identificazione di biomarcatori di prognosi e di risposta terapeutica nel carcinoma epatocellulare*

## 2. Informazione sull'attività di ricerca

### 2.1 Parole chiave

1. CARCINOMA EPATOCELLULARE
2. PROFILI DI ESPRESSIONE
3. DINAMICA DELLA CROMATINA
4. CHIP

### 2.2 Ambito della ricerca

*Interdipartimento*

### 2.3 Tipologia

*Nuova ricerca*

## 2.4 Componenti il gruppo di ricerca (escluso il responsabile) Personale docente dell'Università

n°	Cognome	Nome	Qualifica	Facoltà	Dipartimento
1.	FELLI	Maria Pia	PA	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. MEDICINA SPERIMENTALE
2.	NAPOLITANO	Maddalena	RU	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. MEDICINA SPERIMENTALE
3.	VACCA	Alessandra	PO	MEDICINA e CHIRURGIA	DIP. MEDICINA SPERIMENTALE

## Altro personale dell'Università "Sapienza" di Roma

In questo spazio non inserire personale docente e tecnici laureati dell'Ateneo

n°	Cognome	Nome	Qualifica	Facoltà	Dipartimento	Note
1.	GUERRIERI	FRANCESCA	Dottorando			
2.	SCHINZARI	VALERIA	Altro			
3.	TORGOVNIK	ALESSANDRO	Altro			

## Personale di altre Università/Istituzioni

n°	Cognome	Nome	Qualifica	Università/Istituzione	Dipartimento	Note
1.	BELLONI	LAURA	Contrattista di ric.	Fondazione A Cesalpino		CoCoPro
2.	DE IACO	ROSSANA	Contrattista di ric.	Fondazione A Cesalpino		CoCoPro
3.	PEDICONI	NATALIA	Contrattista di ric.	Fondazione A Cesalpino		CoCoPro
4.	TESTONI	BARBARA	Contrattista di ric.	Fondazione A Cesalpino		CoCoPro

## 2.5 Inquadramento della ricerca proposta (in ambito nazionale ed internazionale)

Il carcinoma epatocellulare (Hepatocellular carcinoma, HCC) rappresenta la quinta neoplasia e la terza causa di morte per cancro (Bosch, 2001). La maggior parte dei carcinomi epatocellulari si sviluppa come complicanza tardiva di una cirrosi correlata alle infezioni croniche da virus epatitici (Colombo, 2003), attraverso un processo a più tappe, in cui epatociti maturi acquisiscono alterazioni genetiche successive nel microambiente epatico in cui coesistono di necrosi, infiammazione e rigenerazione porta alla selezione di popolazioni monoclonali ed alla formazione di noduli displastici (Theise., 2002). I macronoduli epatocellulari (ME) che si sviluppano nel corso della cirrosi epatica, sono lesioni focali di diametro compreso tra 0,8 e 2,5 cm e vengono classificati come larghi noduli di rigenerazione (LNR), noduli displastici a basso grado (NDBG) e noduli displastici ad alto grado (NDAG). ME sono presenti nel 10-42 % di fegati esaminati all'autopsia o nei fegati espuntati durante trapianto di fegato, e nel 6-18% dei pazienti cirrotici sottoposti a screening e sorveglianza ecografica. NDBG e NDAG sono meno frequenti dei LNR, ma sono considerati lesioni preneoplastiche, in grado di evolvere in CE con una frequenza del 30% in 1-5 anni (Borzio, 2003). L'acquisizione del fenotipo maligno si accompagna a neovascolarizzazione del nodulo con vasi neofornati di derivazione dai rami dell'arteria epatica. A questo stadio, i noduli di EC sono ben differenziati, presentano un alto indice di proliferazione, che prevale ormai nettamente nei confronti sull'apoptosi compensatoria (Park, 2001) e tendono a divenire meno differenziati e a presentare segni di invasione vascolare quando raggiungono le dimensioni di 1-1,5 cm (Nakashima, 2003; Kojiro & Roskams, 2005). In circa il 40% dei EC la presenza di cellule poco differenziate che esprimono marcatori propri delle cellule progenitriche epatiche (CK-7, CK 19, CD34) si associa ad una prognosi peggiore e ad una maggiore frequenza di recidive (Roskams, 2003). L'esistenza di fattori etiologici multipli e di una evoluzione biologica e clinica complessa e di lunga durata si riflette in una notevole eterogeneità nei comportamenti clinici e nelle caratteristiche biologiche della neoplasia.

La precoce identificazione delle lesioni preneoplastiche e una migliore caratterizzazione delle lesioni neoplastiche a fini prognostico-terapeutici sono obiettivi importanti per migliorare la prevenzione, la diagnosi precoce e la cura del CE. L'esame istologico del nodulo rappresenta un approccio diagnostico consolidato ma la diagnosi differenziale è difficile per i possibili difetti di campionamento con l'agobiosia e di interpretazione del preparato. Per ottimizzare la diagnosi di ME sono stati proposti criteri aggiuntivi morfologici, la valutazione della neoangiogenesi (Roncalli, 1999) e della proliferazione epatocellulare (Sangiovanni, 2001; Donato, 2001), e lo studio dei profili genetici e molecolari. Una volta accertata la presenza di CE, per orientare le scelte terapeutiche in relazione non solo allo stadio della neoplasia, macroscopicamente rilevato a tecniche di immagine, come attualmente avviene nella pratica clinica, assume sempre maggiore rilevanza la definizione delle caratteristiche biologiche della neoplasia (alterazioni delle pathway apoptotiche, capacità proliferativa, rischio di infiltrazione vascolare e diffusione metastatica, presenza di cellule tumorali circolanti).

La prognosi dell'HCC resta sfavorevole per la larga proporzione di pazienti con malattia avanzata soprattutto a causa della notevole chemioresistenza del tumore. La limitazione nelle scelte terapeutiche disponibili enfatizza la necessità di sviluppare nuove strategie per la prevenzione e di identificare approcci terapeutici innovativi. Un limite importante in questo senso è legato all'incompleta comprensione delle caratteristiche biomolecolari dell'HCC (marcatori e bersagli molecolari) ed alla scarsa caratterizzazione della risposta immunitaria al tumore (antigeni tumorali e risposta immune).

Patogenesi molecolare e profili di espressione nell'HCC

L'analisi globale delle alterazioni genetiche descritte nell'HCC ha dimostrato che almeno quattro diverse vie (i.e. p53/p73 e arresto di crescita/apoptosi in risposta al danno del DNA; pRb e controllo del ciclo cellulare; Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e di inibizione della crescita/apoptosi cellulare;  $\beta$ -catenina e controllo della crescita e delle interazioni cellula-cellula) sono preferenzialmente coinvolte nella patogenesi molecolare dell'HCC (review in Levrero, 2006). Numerosi studi hanno dimostrato la sostanziale eterogeneità genetica degli HCC, verosimilmente dovuta alla eterogeneità di fattori etiologici implicati, e suggeriscono che le vie coinvolte nello sviluppo dell'HCC possano essere diverse a seconda dei fattori di rischio. I casi HBV correlati, che si presentano più spesso con un fenotipo poco differenziato e con un pattern di crescita cellulare accelerato, si associano ad una maggiore instabilità cromosomica. I casi correlati all'infezione HCV sembrano presentare più spesso alterazioni genetiche della via  $\beta$ -catenina associate a lesioni genetiche ed epigenetiche pleiomorfe (Laurent-Puig, 2001; Bruix, 2003).

D'altro canto una serie di lavori recenti mettono in relazione l'espressione delle proteine virali HBV e HCV con l'attivazione della pathway Wnt/ $\beta$ -catenina anche in assenza di mutazioni del gene della  $\beta$ -catenina. La proteina HBx di HBV attiva le chinasi Erk1/2 le quali legano ed inattivano la chinasi GSK3 con conseguente accumulo di  $\beta$ -catenina (Ding, 2005). La proteina NS5A, attraverso l'attivazione di PI3K, induce la stabilizzazione di  $\beta$ -catenina (Street, 2005) mentre HCV core, attraverso l'induzione dell'espressione di Wnt1 (Fukutomi, 2005), contribuisce all'attivazione persistente della pathway Wnt/ $\beta$ -catenina ed alla proliferazione epatocitaria incontrollata. Nonostante gli sforzi effettuati, non è stato tuttavia ancora possibile identificare con certezza alterazioni genetiche specifiche dei diversi stadi evolutivi del processo di trasformazione epatocitaria e, in particolare, le lesioni associate agli stadi preneoplastici e precoci. LOH in 1p (1p36-p34) e a carico del locus M6F/IGF2R e l'accorciamento dei telomeri sembrano essere eventi precoci che si accompagnano all'espressione di alcuni geni (SP70, Glypican 3) o set di geni (Smith, 2003; Paradis, 2003). Lo studio dei profili globali di espressione mediante microarrays ha portato alla identificazione di numerosi nuovi geni modulati nel EC ed in particolare geni la cui espressione correla con la progressione tumorale (p16, SOCS1, PEG10), la disseminazione tumorale e la formazione di metastasi (nm23 H1, osteopontina, RhoC, KAI1, MMP14), la recidiva dopo trattamento radicale (REL, A20, vimentina, PDGFRA), senza però consentire l'identificazione univoca di "marcatori" utilizzabili per il momento nella pratica clinica (Kim, 2003; Thorgeirsson, 2006).

Il progetto di ricerca proposto è finalizzato allo sviluppo e produzione di nuovi strumenti diagnostici basati sulle nanotecnologie per l'identificazione precoce delle lesioni pre-neoplastiche e per la caratterizzazione a fini prognostico-terapeutici delle lesioni HCC.

## 2.6 Sintesi del programma di ricerca e descrizione dei compiti dei singoli partecipanti

L'obiettivo principale del progetto di ricerca proposto è finalizzato allo sviluppo di approcci diagnostici innovativi per l'identificazione precoce delle lesioni pre-neoplastiche dell'HCC e per la caratterizzazione a fini prognostico-terapeutici delle lesioni HCC.

In particolare verranno:

1. validati reagenti basati su nanotecnologie (microarray a bassa densità per analisi trascrizionale e analisi dei profili di espressione tumorali).

Microarrays cDNA a bassa densità per la valutazione dei profili d'espressione utili per l'identificazione delle lesioni preneoplastiche e la caratterizzazione prognostico-terapeutica dell'HCC erranno sviluppati sulla base delle conoscenze disponibili (banche dati di microarray in possesso di gruppi di ricerca pubblici e privati/commerciali) e dei risultati generati dal Progetto. I nuovi chip cDNA di seconda generazione a bassa densità e a basso costo orientati allo studio di profili di espressione clinicamente rilevanti. La scelta dei cDNA da inserire nei diversi arrays verrà effettuata con la finalità di produrre arrays orientati alla patologia neoplastica epatica (geni modulati nel CE e nelle lesioni preneoplastiche identificati empiricamente negli studi di valutazione dei profili di espressione mediante microarrays globali; dei geni verosimilmente modulati sulla base delle conoscenze acquisite con l'analisi delle vie di segnalazione e dei fattori trascrizionali la cui funzione è alterata nel CE).

Verranno anche sviluppate tecnologie innovative (ChIP-on-Chips) per l'analisi dei profili trascrizionali nei pazienti con HCC. L'approccio si basa sulla combinazione di tecniche di immunoprecipitazione della cromatina in fase liquida (ChIP) con l'uso di microarrays di DNA genomico (Chips) per l'identificazione sistematica di geni bersaglio per i fattori trascrizionali (TF) e i modulatori della cromatina di interesse. Verranno in particolare sviluppati e validati microarrays di oligonucleotidi a bassa densità da utilizzare per tecniche di ChIP-on Chips orientati allo studio di singoli TF/regolatori della cromatina e/o di specifiche vie di segnalazione/trascrizione potenzialmente alterati nell'HCC e nelle lesioni preneoplastiche. Verranno prodotti e validati microarrays contenenti oligonucleotidi (50-60 mer) rappresentativi delle regioni regolatrici di 200-300 geni bersaglio legati in vivo da uno specifico fattore trascrizionale o modificatore della cromatina. La scelta dei geni bersaglio verrà effettuata sulla base delle conoscenze generate nell'ambito di specifiche ricerche "in silico" e dei dati disponibili nella letteratura o in banche dati su "web". Saranno studiati i seguenti TF e rimodellatori della cromatina: p53 ed i membri della famiglia p63 e p73, coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nella chemioresistenza; la famiglia di fattori trascrizionali E2F coinvolti nel ciclo cellulare nello sviluppo e nell'apoptosi; il fattore trascrizionale NFkB che controlla i geni dell'immunità innata, anti apoptotici, anti proliferativi, pro proliferativi e l'identità di cellule staminali; la via di segnalazione di Wnt/b-catenina; i modulatori della cromatina p300/CBP e PCAF/GCN5.

2. identificate le caratteristiche cliniche e biologiche dell'HCC capaci di predire la capacità proliferativa, il rischio di infiltrazione vascolare e diffusione metastatica, la risposta terapeutica ai trattamenti convenzionali ed innovativi.

I risultati ottenuti nell'ambito dei WP1 e 2 verranno correlati con i dati demografici, clinici, radiologici, istologici, molecolari al fine di identificare le variabili associate alla diagnosi istologica (ME vs CE) e costruire uno score prognostico. Verranno in particolare valutati: a) le caratteristiche demografiche del paziente; b) l'aspetto radiologico ed in particolare la vascolarizzazione della lesione (ecografia con mdc, RM con mdc, TC multislice con mdc); c) la presenza di infezione HBV occulta (nei pazienti con CE HBsAg negativi) d) la proliferazione epatocitaria (citofluorimetria a flusso e immunocitochimica con colorazione e analisi morfometrica di PCNA - proliferative cell nuclear antigen e analisi dell'espressione di ciclone e inibitori delle chinasi ciclino-dipendenti) e) la ploidia e la citodieresi (alterazioni cromosomiche, espressione delle proteine della famiglia AURORA, Polo-like chinasi, TD60, Rho); f) l'angiogenesi (immunocitochimica per CD34; RT-PCR per VEGF e le sue varianti di splicing e per il recettore KDR) g) la presenza di mutazioni a carico di p53, b-catenina, axina e gancirina; h) l'espressione delle isoforme di TAp73 e DNp73; i) la presenza di cellule tumorali circolanti mediante il metodo.

Le popolazioni di pazienti incluse nello studio saranno:

a) pazienti cirrotici con funzione epatica conservata (classe di Child-Pugh A e B) e lesione focale epatica solida di diametro compreso tra 0,8 e 2,5 cm evidenziata ad ecografia addominale (US) in corso di un programma di sorveglianza per la diagnosi precoce di CE, consecutivamente valutati.

b) pazienti con HCC (> 2,5 cm) di cui sia disponibile tessuto epatico tumorale e perilesionale consecutivamente valutati.

3. definito uno score prognostico che identifichi nel paziente cirrotico quali tra le variabili epidemiologiche, cliniche, radiologiche, istologiche e molecolari, abbia un valore predittivo indipendente nell'identificare il rischio di evoluzione delle lesioni preneoplastiche in carcinoma epatocellulare.

Un altro obiettivo di questo progetto è quello di elucidare a livello molecolare il ruolo delle proteine DNp73 nello sviluppo e nella chemioresistenza dell'HCC e di caratterizzare le pathway che regolano l'espressione e l'attività di DNp73.

A tal fine verranno studiate:

1. l'attivazione di NFkB, beta-catenina e DNp73 in pazienti con cirrosi ed HCC mediante tecniche di immunocitochimica;

Verrà in primo luogo utilizzato un approccio di tipo immunocitochimico per studiare l'espressione di DNp73, l'accumulo di beta-catenina e l'attivazione di NFkB ex vivo in campioni epatici di HCC e relativo tessuto peritumorale nonché da pazienti con epatite cronica e cirrosi HCV ed HBV correlata. L'espressione di DNp73 e l'accumulo nucleare di beta-catenina verranno valutati mediante l'uso di anticorpi specifici, mentre l'attivazione di NF-kB verrà valutata attraverso l'analisi della traslocazione nucleare della subunità p65, attraverso l'utilizzo di anticorpi che riconoscono specificamente l'NLS (nuclear localization signal) di p65, normalmente mascherato dall'interazione con Ikb quando p65 viene trattenuto nel citoplasma nella sua forma inattiva. Gli epatociti, i biliociti, le cellule endoteliali e stromali, saranno identificati attraverso ulteriori e specifiche colorazioni. Le HPC attivate saranno identificate per la loro capacità di esprimere combinazioni di marcatori epatocitari e colangiocitari (citocheratine CK7, CK8, CK18, CK14, CK19; gli antigeni OV-6 e cromogranina A; alfa-fetoproteina) così come marcatori di cellule progenitrici non epatospecifici come c-kit, CD34 e Scd1. Verranno utilizzati altresì anticorpi contro le altre subunità NFkB (p100, p105, p50, p52...) e contro le versioni modificate di p53 (fosforilazione in serina e acetilazione) e p65 (forma acetilata, tirosina-fosforilata). L'espressione di DNp73, l'accumulo di beta-catenina e l'attivazione di NFkB e la loro localizzazione topografica verranno correlate con numerosi parametri istologici: infiammazione, attivazione delle HPCs, fibrosi, proliferazione cellulare, necrosi ed apoptosi.

2. la regolazione dell'espressione di DNp73 ed il ruolo delle pathway NFkB/DNp73 e beta-catenina/DNp73 nell'attivazione delle cellule progenitrici epatiche (HPC) e nello sviluppo dell'HCC.

Lo studio della regolazione dell'espressione di DNp73 mediata dalle pathway NF-kB e beta-catenina in relazione all'attivazione delle cellule progenitrici epatiche (HPCs) ed allo sviluppo dell'HCC sarà dettagliatamente condotto anche in vitro. La regolazione trascrizionale dell'espressione di DNp73 sarà analizzata mediante l'identificazione dei fattori trascrizionali e dei co-attivatore e co-repressori trascrizionali che regolano l'attività del promotore P2p73. Ricercatori del nostro gruppo hanno recentemente clonato una regione più ampia del promotore P2p73 (promotore DNp73) e hanno iniziato a caratterizzarlo dal punto di vista strutturale e funzionale.

Nel promotore intragenico P2p73 abbiamo identificato siti attivatori p53-RE, NF-kB, AP-1, MyoD/Zeb e TCF/beta-catenina, oltre che siti repressori ISRE e RARE. Verranno effettuati esperimenti di cotrasfezione con plasmidi reporter, EMSA, EMSA supershift ed immunoprecipitazione della cromatina per studiare l'espressione basale e per valutare la modulazione trascrizionale dell'espressione di DNp73 da parte dei fattori trascrizionali E2F, NF-kB, p53/p63/p73, AP-1, MyoD/Zeb e TCF/beta-catenina in differenti fasi del ciclo cellulare e in risposta a fattori di crescita, stimoli differenziativi, citochine e danno del DNA. Verranno utilizzate cellule Hep3B (p53 null), HepG2 e HuH-6 (p53 wild type), epatociti murini immortalizzati MMH-D3 dotati di potenziale differenziale epatocitario e biliare, fibroblasti embrionali derivati da topi p53<sup>-/-</sup>, E2F1<sup>-/-</sup>, Jun<sup>-/-</sup> e p65<sup>-/-</sup> e linee di fibroblasti 3T3 derivate da topi p73<sup>-/-</sup>, nonché i loro derivati trasdotti con vettori di espressione Tap73-alfa, Tap73-beta e DNp73.

La subunità p65 di NFkB e beta-catenina sono entrambe acetilate in condizioni fisiologiche e la loro acetilazione è direttamente regolata dalla interazione con le acetiltransferasi p300 e PCAF e con le deacetilasi di classe I HDAC1/2 e di classe III hSirt1. Evidenze preliminari personali indicano come l'attivazione di hSirt1 riduca l'attività del promotore P2p73 e come, di converso, l'inibizione dell'attività enzimatica di hSirt1 da parte della nicotinamide si associ ad una rapida attivazione di P2p73.

Per studiare l'attività del promotore P2p73 in condizioni basali, nel ciclo cellulare e nell'apoptosi in risposta al danno del DNA, verranno effettuati esperimenti di cotrasfezione con plasmidi reporter, di coimmunoprecipitazione, test funzionali utilizzando inibitori specifici di sir2 (nicotinamide, sirtinolo) ed attivatori (resveratrolo) e test di immunoprecipitazione della cromatina con anticorpi anti-pCAF, anti-CBP, anti-Sirt1 e anti-deacetilasi.

Infine, il contributo relativo di NF-kB e beta-catenina nell'attivazione cronica dell'espressione di DNp73 nelle linee di HCC verrà definito in maniera non equivoca mediante esperimenti nei quali l'espressione di p63, beta-catenina, TCF/LEF verrà silenziata mediante RNA interferenti specifici e l'uso di mutanti dominanti negativi.

3. il contributo delle proteine DNp73 alla chemioresistenza dell'HCC.

Il rapporto tra isoforme TAp73 e DNp73 si è dimostrato infatti un importante fattore nel determinismo della sensibilità cellulare ai chemioterapici che danneggiano il DNA ed un fattore prognostico potenzialmente più accurato della valutazione del solo stato di p53.

Il contributo della sovraespressione di DN- e DTAp73 nella chemioresistenza così tipica dell'HCC verrà definitivamente precisato mediante silenziamento dell'espressione di DN- e DTAp73 con siRNA interferenti specifici in cellule di HCC trattate con diversi farmaci chemioterapici e valutando le modificazioni del ciclo cellulare e l'induzione di apoptosi (analisi in citometria a flusso, clivaggio di PARP e attivazione delle caspasi). Inoltre nelle cellule di HCC verranno studiati gli

effetti proapoptotici degli inibitori delle deacetilasi di classe I (tricostatina e valproato) e di classe III (nicotinamide, sirtinolo) ed il relativo coinvolgimento dell'attivazione di DNP73, mediante una combinazione di esperimenti con vettori luciferasi, di valutazione dell'espressione genica e saggi funzionali (crescita cellulare ed apoptosi).

### **3. Elenco delle migliori pubblicazioni negli ultimi 5 anni**

#### **A) Pubblicazioni su riviste scientifiche**

1. POLLICINO T; RAFFA G; COSTANTINO L; LISA A; CAMPELLO C; SQUADRITO G; LEVRERO M.; RAIMONDO G (2007). *Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma.* HEPATOLOGY vol. 45 pp. 277-285 ISSN: 0270-9139
2. WEISZ L; DAMALAS A; LIONTOS M; KARAKAIDOS P; FONTEMAGGI G; MAOR-ALONI R; KALIS M; LEVRERO M.; STRANO S; GORGOLIS VG; ROTTER V; BLANDINO G; OREN M (2007). *Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells.* CANCER RESEARCH vol. 67 pp. 2396-2401 ISSN: 0008-5472
3. AMICI C; ROSSI A; COSTANZO A; CIAFRE S; MARINARI B; BALSAMO M; LEVRERO M.; SANTORO M.G (2006). *Herpes simplex virus disrupts NF-kappa B regulation by blocking its recruitment on the Ikappa Balpha promoter and directing the factor on viral genes* THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 281 pp. 7110-7117 ISSN: 0021-9258 Epub 2006 Jan 3
4. BELLONI L; MORETTI M; MERLO M; DAMALAS A; COSTANZO A; LEVRERO M. (2006). *DNp73a protects myogenic cells from apoptosis.* ONCOGENE vol. 25 pp. 3606-3612 ISSN: 0950-9232 E-pub ahead of print, May 1 (PMID 16652159)
5. LEVRERO M. (2006). *Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C* ONCOGENE ISSN: 0950-9232 accepted march 2, 2006
6. LUNGHY P; A. COSTANZO; LEVRERO M.; AND A. BONATI (2006). *MEK1 inhibitors decrease DNp73 levels and sensitize primary myelogenous leukemia to arsenic trioxide-induced apoptosis* BLOOD vol. 107 pp. 4549-4553 ISSN: 0006-4971 E-pub Febr 7, 2006
7. POLLICINO T; BELLONI L; RAFFA G; PEDICONI N; SQUADRITO G; RAIMONDO G; LEVRERO M. (2006). *Hepatitis B Virus (HBV) replication is regulated by the acetylation status of HBV cccDNA-bound H3 and H4 histones.* GASTROENTEROLOGY vol. 130 pp. 823-837 ISSN: 0892-1601
8. MERLO P; FULCO M; COSTANZO M; MANGIACASALE R; STRANO S; BLANDINO G; TAYA Y; LAVIA P; LEVRERO M. (2005). *A role of p73 in mitotic exit* THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 280 pp. 30354-30360 ISSN: 0021-9258
9. STRANO S.; MONTI O.; PEDICONI N.; BACCARINI A.; FONTEMAGGI G.; LAPI E.; MANTOVANI F.; DAMALAS A.; CITRO G.; SACCHI A.; DEL SAL G.; LEVRERO M.; BLANDINO G. (2005). *The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA Damage* MOLECULAR CELL vol. 18 pp. 447-459 ISSN: 1097-2765
10. LUNGHY P.; COSTANZO A.; LEVRERO M.; BONATI A. (2004). *Treatment with arsenic trioxide (ATO) and MEK1 inhibitor activates the P73.P53AIP1 apoptotic pathway in leukemia cells.* BLOOD vol. 104 pp. 519-525 ISSN: 0006-4971 I003099
11. THOMSON PR; WANG D; WANG L; FULCO M; PEDICONI N; GE Q; LEVRERO M.; SARTORELLI V; COTTER RJ; COLE PA (2004). *Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop.* NATURE STRUCTURAL BIOLOGY vol. 11 pp. 308-315 ISSN: 1072-8368 I000642
12. FULCO M; COSTANZO A; MERLO P; MANGIACASALE R; STRANO S; BLANDINO G; BALSANO C; LAVIA P; LEVRERO M. (2003). *p73 is regulated by phosphorylation at the G2/M transition.* THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 278 pp. 49196-49202 ISSN: 0021-9258 I000562 ( )
13. PEDICONI N; IANARI A; COSTANZO A; BELLONI L; GALLO R; CIMINO L; PORCELLINI A; SCREPANTI I; BALSANO C; ALESSE E; GULINO A; LEVRERO M. (2003). *Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage* NATURE CELL BIOLOGY vol. 5 pp. 552-8 ISSN: 1465-7392 I000640 (CQ)
14. COSTANZO A.; MERLO P.; PEDICONI N.; FULCO M.; SARTORELLI V.; SHILTZ L.; COLE PA.; FONTEMAGGI G.; FANCIULLI M.; BLANDINO G.; BALSANO C.; LEVRERO M. (2002). *DNA DAMAGE-DEPENDENT ACETYLATION OF p73 DICTATES THE SELECTIVE ACTIVATION OF APOPTOTIC TARGET GENES* MOLECULAR CELL vol. 9 pp. 175-86 ISSN: 1097-2765 I000624 (CQ)
15. VOSSIO S; PALESCANDOLO E; PEDICONI N; MORETTI F; BALSANO C; COSTANZO A (2002). *DN-p73 is activated after DNA damage in a p53 dependent manner to regulate p53-induced cell cycle arrest.* ONCOGENE vol. 21 pp. 3796-3803 ISSN: 0950-9232 I000649 (CQ)
16. VACCA A., FELLI MP, PALERMO R, DI MARIO G, CALCE A, DI GIOVINE M, FRATI L, GULINO A, SCREPANTI I. (2006). *Notch3 and pre-TCR interaction unveils distinct NF-kB pathways in T cell development and leukemogenesis.* EMBO JOURNAL vol. 25, pp. 1000-1008 ISSN: 0261-4189.
17. NAPOLITANO M., GUBELLINI P, SPIEZIA S, CENTONZE D, GULINO A, BERNARDI G, CALABRESI P. (2004). *Inhibition of mitochondrial complex II results in alterations of gene expression involved in glutamatergic and dopaminergic signaling in the striatum: possible implication for Huntington's disease.* NEUROBIOLOGY OF DISEASE vol. 15, pp. 407-414 ISSN: 0969-9961.
18. PIZZA G, DE VINCI C, LO CONTE G, MAZZUCA A, DI MAIO V, RATINI S, SEVERINI G, BUSUTTI L, PALARETI AP, GULINO A., VACCA A., MELCHIORRI L, FERRARI M, GIACOMELLI L, BARICORDI OR, FORZINI S, CAPANNA R. (2004). *Allogeneic gene-modified tumour cells in metastatic kidney cancer.* Report II. FOLIA BIOLOGICA vol. 50, pp. 175-183 ISSN: 0015-5500.
19. BELLAVIA D., CAMPESE A.F., VACCA A., GULINO A., SCREPANTI I. (2003). *Notch3, another Notch in T cell development.* SEMINARS IN IMMUNOLOGY vol. 15, pp. 107-112 ISSN: 1044-5323.
20. FELLI M., A. VACCA, A. CALCE, D. BELLAVIA, A.F. CAMPESE, R. GRILLO, M. DI GIOVINE, S. CHECQUOLO, C. TALORA, R. PALERMO, G. DI MARIO, L. FRATI, A. GULINO, AND I. SCREPANTI. (2005). *"PKCtheta mediates pre-TCR signaling and contributes to Notch3-induced T cell leukemia"*. ONCOGENE vol. 24, pp. 992-1000 ISSN: 0950-9232.
21. NAPOLITANO M., CENTONZE D, CALCE A, PICONI B, SPIEZIA S, GULINO A, BERNARDI G, CALABRESI P. (2002). *Experimental parkinsonism modulates multiple genes involved in signal transduction of dopaminergic signals in the striatum.* NEUROBIOLOGY OF DISEASE vol. 10, pp. 387-395 ISSN: 0969-9961.
22. NAPOLITANO M., PICCONI B., CENTONZE D., BERNARDI G., CALABRESI P., GULINO A. (2006). *L-DOPA treatment of parkinsonian rats changes the expression of Src, Lyn and PKC kinases.* NEUROSCIENCE LETTERS vol. 398, pp. 211-214 ISSN: 0304-3940.
23. ARGENTI B., GALLO R., DI MARCOTULLIO L., FERRETTI E., NAPOLITANO M., CANTERINI S., DE SMAELE E., GRECO A., FIORENZA M.T., MARODER M., SCREPANTI I., ALESSE E., GULINO A. (2005). *Hedgehog Antagonist RENKCTD11 Regulates Proliferation and Apoptosis of Developing Granule Cell Progenitors.* JOURNAL OF NEUROSCIENCE vol. 25, pp. 8338-8346 ISSN: 0270-6474.
24. LUCIA DI MARCOTULLIO, ELISABETTA FERRETTI, ENRICO DE SMAELE, BEATRICE ARGENTI, CLAUDIA MINCIONE, FRANCESCA ZAZZERONI, RITA GALLO, LAURA MASUELLI, NAPOLITANO M., MARELLA MARODER, ANDREA MODESTI, FELICE GIANGASPERO, ISABELLA SCREPANTI, EDOARDO ALESSE, AND ALBERTO GULINO. (2004). *RENKCTD11 is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma.* PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA vol. 101, pp. 10833-10838 ISSN: 1091-6490.

25. CENTONZE D, ALESSANDRO MARTORANA, GUBELLINI P, NAPOLITANO M., BERNARDI G, GULINO A, CALABRESI P. (2002). *Tissue plasminogen activator regulates dopamine-dependent synaptic plasticity and membrane excitation in distinct striatal cell types*. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE. vol. 16, pp. 712 ISSN: 0953-816X. European Journal of Neuroscience.
26. TALORA C, CIALFI S, OLIVIERO C, PALERMO R, PASCUCCHI M, FRATI L, VACCA A., GULINO A, SCREPANTI I. (2006). *Cross-talk among Notch3, pre-TCR and Tal-1 in T-cell development and leukemogenesis*. BLOOD. vol. 107, pp. 3313-3320 ISSN: 0006-4971.
27. PIZZA G, DE VINCI C, LO CONTE G, MAZZUCA A, CORRADO G, MENNITI D, BENATI A, ROMAGNOLI P, FORNAROLA V, BUSUTTI L, PALARETI A, CAPANNA R, DI MAIO V, RATINI S, GULINO A, VACCA A., MELCHIORRI L, FERRARI M, BORIANI S, BARICORDI RO. (2003). *Allogeneic gene-modified tumor cells in metastatic kidney cancer: preliminary report*. FOLIA BIOLOGICA. vol. 49, pp. 147-159 ISSN: 0015-5500.

## B) Pubblicazioni di volumi o saggi in volume

## C) Pubblicazioni su atti di convegni e congressi

## D) Altro (pubblicazioni non previste nei punti precedenti)

### 4. Richiesta di finanziamento del progetto

Note (specificare in dettaglio le spese)

4.1 A) Totale spese per l'acquisto di apparecchiature scientifiche	€	
4.2 B) Spese generali per la ricerca	€	materiali per colture cellulari; reagenti per biologia molecolare; anticorpi; oligonucleotidi; chimici;
4.2.1 Materiali di consumo e manutenzione strumenti (specificare il tipo di materiale e la strumentazione utilizzata)	45.000	
4.2.2 Missioni - Seminari	€	missioni e partecipazione a congressi
	3.000	
4.2.3 Raccolta, codifica e elaborazioni dati	€	
4.2.4 Altre voci: pubblicazioni	€	spese per pubblicazioni
	2.000	

TOTALE A+B 50.000

4.3 C) Collaborazioni di ricerca (l'importo fisso di 1.550 €, lordo al mese, per un max di 12 mesi) € 18.600 salario per un collaboratore alla ricerca con competenza in bioinformatica

### 4.4 Ultimi tre anni di finanziamenti ottenuti per ex Progetti di Ateneo

2003: Nessun finanziamento

2004: Nessun finanziamento

2005: Nessun finanziamento

### 4.5 Consuntivo scientifico per l'ultimo anno di finanziamento ottenuto (risultati e pubblicazioni relative)

## **5. Parere del Dipartimento/Centro di appartenenza del responsabile**

Contestualmente alla domanda di Ateneo, il proponente sta presentando anche domanda per Ricerca di Ateneo Federato?  SÌ

~~~~~ Data delibera: 22/03/2007 ~~~~~ Parere: POSITIVO

Firma .....

Data 10/05/2007 09:00