



Trasforma la tua dichiarazione dei Redditi
in una dichiarazione... d'AMORE!!!
Devolvi il tuo 5 x 1000 all' AISOS!

A.I.S.OS Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
(Prevenzione – Diagnosi – Terapia)

Viale Regina Margherita, 244 – 00198 - Roma
Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657
Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it

NUMERO UNICO PER TUTTI I GESTORI ASSEGNATO E':

45508

dal 5 al 25 luglio 2010

CAMPAGNA RACCOLTA FONDI SMS SOLIDALE



PROGETTO PER RACCOLTA FONDI TELEFONICA TRAMITE SMS SOLIDALE
Titolo del progetto

Approccio preclinico sperimentale alla terapia a bersaglio molecolare negli osteosarcomi.

L'osteosarcoma è un tumore maligno dell'osso e rappresenta in età pediatrica una delle patologie neoplastiche più frequenti. Le possibilità terapeutiche che attualmente si hanno a disposizione per questi tumori, oltre alla chirurgia demolitiva, sono spesso legate a chemioterapici convenzionali, altamente tossici per i piccoli pazienti.

A.I.S.OS Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
Viale Regina Margherita, 244 - 00198 - Roma - Tel +39 0642014870 - Mobile Phone +39 337 565657 - Fax +39 064402937
C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it - www.osteosarcoma.it - info@aisos.it



**Trasforma la tua dichiarazione dei Redditi
in una dichiarazione... d'AMORE!!!
Devolvi il tuo 5 x 1000 all' AISOS!**

**A.I.S.O.S Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
(Prevenzione – Diagnosi – Terapia)**

Viale Regina Margherita, 244 – 00198 - Roma
Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657
Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it

La Associazione Italiana per lo Studio dell'Osteosarcoma (A.I.S.O.S.) in stretta collaborazione con il Dipartimento di Medicina Sperimentale della Sapienza Università di Roma con questo progetto ha l'obbiettivo di reperire fondi al fine di promuovere la ricerca di nuove prospettive terapeutiche per la cura dell'osteosarcoma.

L'osteosarcoma è il più frequente tumore primitivo dell'osso ad alto grado di malignità, costituito da cellule mesenchimali maligne che producono matrice osteoide ed ossea. La sopravvivenza dei pazienti è legata alla comparsa di metastasi ed alla risposta alla chemioterapia (Kent W 2004).

La ricerca scientifica di base ha fornito nell'ultimo decennio dettagliate informazioni sui meccanismi patogenetici, molecolari e biochimici responsabili della proliferazione, del differenziamento e dei processi di riparazione del DNA. Alterazioni di tali meccanismi a vari livelli sono responsabili dell'insorgenza e della progressione metastatica dei tumori maligni (Yu Y 2004). Nonostante queste conoscenze, la cura delle neoplasie maligne è ancora basata sull'impiego di farmaci chemioterapici citotossici, la cui funzione mira direttamente a danneggiare il DNA o a inibire la duplicazione cellulare provocando la morte in maniera aspecifica sia delle cellule tumorali sia delle cellule normali in fase di replicazione. La mancanza di specificità d'azione dei chemioterapici è alla base della considerevole tossicità che fa seguito alla loro somministrazione.

Numerosi sono oramai gli esempi in campo oncologico di quella che viene definita la "terapia a bersaglio molecolare", dove si cerca di selezionare una popolazione con un marcatore molecolare per un trattamento terapeutico mirato, personalizzato ed efficace, e soprattutto meno tossico, utilizzando o un singolo farmaco a bersaglio molecolare o più spesso la combinazione di più chemioterapici.



**Trasforma la tua dichiarazione dei Redditi
in una dichiarazione... d'AMORE!!!
Devolvi il tuo 5 x 1000 all'AISOS!**

**A.I.S.OS Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
(Prevenzione – Diagnosi – Terapia)**

Viale Regina Margherita, 244 – 00198 - Roma
Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657
Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it

La conoscenza degli eventi molecolari legati al processo di metastatizzazione degli osteosarcomi potrebbe contribuire ad individuare possibili bersagli molecolari per una terapia personalizzata e meno tossica. L'ezrina, membro della famiglia delle proteine Ezrina-Radixina-Moesina (ERM), ancora la membrana citoplasmatica con il citoscheletro attraverso la connessione di proteine transmembrana all'actina (Sato N 1992), ha un ruolo nel mantenimento della conformazione e della polarità delle cellule, partecipa ai meccanismi di regolazione della crescita e della differenziazione cellulare e regola le interazioni intercellulari e la migrazione (Tsukita S 1997).

In modelli murini, l'espressione dell'ezrina determina un vantaggio di sopravvivenza alle cellule metastatiche di osteosarcoma che raggiungono il polmone (Khanna C 2004). Inoltre, l'iperespressione è stata associata allo sviluppo di metastasi polmonari negli osteosarcomi dei cani (Khanna C 2001). Negli studi in vivo in una piccola coorte di pazienti pediatrici affetti da osteosarcoma, l'espressione dell'ezrina è associata alla progressione della malattia (Ferrari S 2008).

In un recente studio, svolto presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale della Sapienza Università di Roma, abbiamo confermato la presenza nella maggior parte degli osteosarcomi di una iperespressione dell'ezrina, nella sua forma non fosforilata e fosforilata attiva, con una maggior presenza dell'espressione nei tumori di alto grado e nelle metastasi. Questo rafforza l'ipotesi del possibile ruolo di questa proteina nella progressione neoplastica e metastatica degli osteosarcomi (Di Cristofano C 2010).



**Trasforma la tua dichiarazione dei Redditi
in una dichiarazione... d'AMORE!!!
Devolvi il tuo 5 x 1000 all'AISOS!**

**A.I.S.OS Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
(Prevenzione – Diagnosi – Terapia)**

Viale Regina Margherita, 244 – 00198 - Roma
Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657
Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it

La forma attiva fosforilata presenta inoltre una localizzazione anomala nucleare nei tumori maligni, già descritta nelle colture cellulari, ma mai rilevata in vivo negli osteosarcomi. Questa anomala localizzazione nucleare dell'ezrina è più verosimilmente associata alla sua funzione di fattore di trascrizione nucleare che alla sua funzione di ancoraggio (Di Cristofano C 2010).

Originariamente si pensava che l'ezrina svolgesse esclusivamente un ruolo di collegamento tra le proteine di membrana e l'actina citoscheletrica. Successivamente sono stati individuati una serie di complessi e processi cellulari in cui tale proteina è implicata (Batchelor C 2004).

Si pensa infatti che l'ezrina sia coinvolta anche nei segnali mediati dai recettori tirosin-chinasici, nella trasduzione del segnale al nucleo mediante l'attivazione della via delle MAPK (proteine chinasiche attivate da fattori mitogeni) che porta all'aumento della sintesi proteica indotta dalla proteina mTOR (Wan Z 2005).

Il meccanismo specifico con cui l'ezrina partecipa al processo metastatico rimane ancora poco conosciuto. Tuttavia l'inibizione dell'espressione del gene dell'ezrina porta in modelli murini alla diminuzione delle metastasi ed è associata alla diminuzione dell'espressione dell'attività delle MAPK (Wan Z 2005). Questa evidenza potrebbe offrire una nuova possibilità terapeutica mirata all'inibizione di mTOR nella cura dei pazienti con osteosarcoma metastatico che presentano la via della MAPK chinasi attivate dall'espressione della forma attiva dell'ezrina.



**Trasforma la tua dichiarazione dei Redditi
in una dichiarazione... d'AMORE!!!
Devolvi il tuo 5 x 1000 all'AISOS!**

**A.I.S.OS Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
(Prevenzione – Diagnosi – Terapia)**

Viale Regina Margherita, 244 – 00198 - Roma
Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657
Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it

Finalità

In base a quanto detto, lo scopo dello studio è quello di valutare e confrontare l'efficacia della rapamicina su colture cellulari primarie di osteosarcoma ottenute da tumori resecati e stratificati in base all'espressione della ezrina.

Il programma prevede che tale obiettivo sia raggiunto mediante una iniziale caratterizzazione dell'espressione e della localizzazione proteica dell'ezrina nelle colture cellulari primarie, un successivo silenziamento dell'espressione del gene della ezrina, tramite l'utilizzo di uno small interfering RNA (siRNA) specifico, nelle sole linee cellulari che la iperesprimono, seguito dalla somministrazione di rapamicina.

La valutazione dell'efficacia del farmaco potrebbe far emergere differenze di risposta al trattamento con rapamicina tra le linee cellulari trattate con siRNA e non, proponendo l'ezrina come un marcatore predittivo di risposta alla terapia mirata negli osteosarcomi.

Obiettivo non secondario è quello di ricercare differenze dell'espressione genica, tramite l'utilizzo della metodica di microarray, tra le diverse linee cellulari in modo da poter individuare eventuali pathway di espressione genica associati alla attivazione e localizzazione subnucleare dell'ezrina.

Modalità e i tempi di realizzazione (durata complessiva progetto 12 mesi)

Il programma ha come obiettivo principale di valutare e confrontare l'efficacia della rapamicina su colture cellulari primarie di osteosarcoma stratificate in base all'espressione della ezrina.

Brevemente si tratta di capire se la presenza dell'ezrina, la sua localizzazione subcellulare e la sua fosforilazione modificano la risposta terapeutica alla rapamicina negli osteosarcomi e quali pathway molecolari modula.



**Trasforma la tua dichiarazione dei Redditi
in una dichiarazione... d'AMORE!!!
Devolvi il tuo 5 x 1000 all'AISOS!**

**A.I.S.OS Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
(Prevenzione – Diagnosi – Terapia)**

Viale Regina Margherita, 244 – 00198 - Roma
Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657
Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it

Sulla base di ricerche già effettuate, in cui si è evidenziato negli osteosarcomi una variabilità di espressione e di localizzazione subcellulare dell'ezrina, si prevede di prelevare durante l'intervento chirurgico di resezione frammenti di tessuto neoplastico da cui saranno allestite colture cellulari primarie di osteosarcoma (*primo trimestre*).

Tale materiale, e le colture da esso derivate, saranno caratterizzate con metodiche di immunoistochimica e di immunofluorescenza utilizzando anticorpi anti-ezrina non fosforilata (clone 3C12 - Santa Cruz Biotechnology) e fosforilata attiva (Tyr354 - Santa Cruz Biotechnology). Verrà inoltre indagata anche la localizzazione subcellulare nucleare o citoplasmatica della proteina (*secondo trimestre*).

Successivamente, nelle linee cellulari che esprimono l'ezrina sia a livello nucleare che citoplasmatico, si eseguirà un silenziamento del gene ezrina, tramite la trasfezione di uno small interfering RNA (siRNA) specifico anti-l'ezrina (5V-AAGGAAUCCUUAGCGAUGAGA-3V; Dharmacon Research Inc.-Lafayette, CO).

Dalle linee cellulari ezrina-silenziate, verranno allestiti dei Western Blot (WB) ed saggiato quantitativamente mRNA dell'ezrina per il controllo del blocco dell'espressione (*terzo trimestre*).

Dalle linee cellulari ezrina-silenziate e quelle che esprimono l'ezrina, sia a livello nucleare che citoplasmatico, verrà estratto l'RNA totale per lo studio di microarray di espressione. Le stesse linee cellulari saranno trattate con rapamicina per 24 e 48 ore.



**Trasforma la tua dichiarazione dei Redditi
in una dichiarazione... d'AMORE!!!
Devolvi il tuo 5 x 1000 all'AISOS!**

**A.I.S.OS Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
(Prevenzione – Diagnosi – Terapia)**

Viale Regina Margherita, 244 – 00198 - Roma
Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657
Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it

Successivamente verrà valutato la risposta al trattamento del farmaco nelle diverse linee cellulari, analizzando la quantità di mTOR fosforilato, utilizzando un saggio in WB, e la espressione della ciclina D1, l'indice di proliferazione cellulare, la fase G1 e S del ciclo cellulare in citofluorimetria (*quarto trimestre*).

La valutazione dell'efficacia del farmaco potrebbe far emergere differenze di risposta al trattamento con rapamicina tra le diverse linee cellulari trattate proponendo l'ezrina come un marcatore predittivo di risposta alla terapia mirata negli osteosarcomi.

I risultati attesi comprendono la determinazione della risposta terapeutica della rapamicina in linee cellulari primarie di osteosarcoma. La determinazione dell'espressione della localizzazione e dello stato di attivazione dell'ezrina in tali linee, al fine di stratificare le linee cellulari e determinare quanto l'ezrina influenzi la risposta terapeutica con rapamicina. Inoltre lo studio potrebbe far emergere quali pathway molecolari sono modulati dall'espressione, dalla localizzazione e lo stato di attivazione dell'ezrina.

In particolare saranno perseguiti i seguenti obiettivi:

- Allestimento di linee cellulari primarie di osteosarcoma;
- Caratterizzazione dell'espressione, della localizzazione subcellulare e dello stato di attivazione dell'ezrina negli osteosarcomi;
- Caratterizzazione delle modificazioni dell'espressione genica indotte dall'ezrina;
- Valutazione della risposta alla terapia con rapamicina nelle linee cellulari primarie di osteosarcoma;

**A.I.S.OS Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma**

Viale Regina Margherita, 244 - 00198 - Roma - Tel +39 0642014870 - Mobile Phone +39 337 565657 - Fax +39 064402937

C.F. e P.I. 08433741009

www.aisos.it - www.osteosarcoma.it - info@aisos.it



Trasforma la tua dichiarazione dei Redditi
in una dichiarazione... d'AMORE!!!
Devolvi il tuo 5 x 1000 all'AISOS!

A.I.S.O.S Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
(Prevenzione – Diagnosi – Terapia)

Viale Regina Margherita, 244 – 00198 - Roma
Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657
Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it

- Valutazione della influenza nella risposta alla terapia con rapamicina indotta dalla dell'espressione, dalla localizzazione subcellulare e dallo stato di attivazione dell'ezrina.

Budget di spesa complessivo previsto ed allocazione dei costi (A+B+C)

66.200 EUR

I fondi ottenuti dalla raccolta fondi telefonica tramite Sms solidale saranno devolute dall'A.I.S.O.S. al Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma, I Facoltà di Medicina e Chirurgia, Polo Pontino, U.O.C. di Anatomia Patologica, (Direttore Prof. Carlo Della Rocca) per la copertura delle spese relative alla realizzazione del progetto:

A) Spese per l'acquisto di apparecchiature scientifiche* **25.000 EUR*

- JASCO V550 Dual wave-length ed accessori per controllo dell'efficienza della marcatura e del DNA ed RNA

B) Spese generali per la ricerca

Materiali di consumo e manutenzione strumenti **33.200 EUR**

Allestimento culture cellulari* **5.000 EUR*

- Materiale a perdere per colture cellulari comprensivo di terreni di coltura ed eventuali additivi;
- Manutenzione per cappe da laboratorio per colture cellulari, microscopi ottici a luce trasmessa e microscopi invertiti;



Trasforma la tua dichiarazione dei Redditi
in una dichiarazione... d'AMORE!!!
Devolvi il tuo 5 x 1000 all'AISOS!

A.I.S.OS Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
(Prevenzione – Diagnosi – Terapia)

Viale Regina Margherita, 244 – 00198 - Roma
Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657
Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it

<i>Tecnica di cDNA microarray</i>	15.000 EUR
• Kit di estrazione RNA; microchip;	
<i>Preparazione del siRNA e trasfezione</i>	3.000 EUR
<i>siRNA e materiale per trasfezione; reagenti</i>	
<i>RT-PCR</i>	2.000 EUR
Kit di estrazione RNA; primers; reagenti	
<i>Analisi immunistochimica ed immunofluorescente</i>	1.200 EUR
Anticorpi, reagenti;	
<i>Analisi in Western Bot</i>	1.000 EUR
sistemi di acquisizione di immagine digitale; materiale per stampa fotografico	
<i>Terapia con rapamicina</i>	3.000 EUR
Rapamicina; manutenzione cappe chimiche;	
<i>Analisi in citofluorimetria</i>	3.000 EUR
Anticorpi; reagenti	



**Trasforma la tua dichiarazione dei Redditi
in una dichiarazione... d'AMORE!!!
Devolvi il tuo 5 x 1000 all'AISOS!**

**A.I.S.OS Onlus n° 52474
Associazione Italiana Studio Osteosarcoma
(Prevenzione – Diagnosi – Terapia)**

Viale Regina Margherita, 244 – 00198 - Roma
Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657
Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009
www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it

C) Raccolta, codifica e elaborazioni dati

8.000 EUR

Destinatari

- A.I.S.OS Onlus n°52474, Associazione Italiana Studio Osteosarcoma (Presidente Dott.ssa Francesca Terracciano). Viale Regina Margherita, 244 – 00198 – Roma. Tel +39 0642014870 – Mobile Phone +39 337 565657. Fax +39 064402937 – C.F. e P.I. 08433741009. www.aisos.it – www.osteosarcoma.it – info@aisos.it
- Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma, I Facoltà di Medicina e Chirurgia, Polo Pontino, U.O.C. di Anatomia Patologica, (Direttore Prof. Carlo Della Rocca). Viale Regina Elena, 324 00161 Roma. tel. 06/49970731. fax 06/4463652.

**Il Presidente
Dr.ssa Francesca M. Terracciano**