

GLIOMA IDENTIFICAZIONE DI NUOVI MARCATORI DI CELLULE STAMINALI TUMORALI A SCOPO DIAGNOSTICO E TERAPEUTICO

Neža Podergajs¹, Helena Motaln¹, Miloš Vittori¹ e Tamara Lah Turnšek^{1,2}

¹ Department of Genetic Toxicology and Cancer Biology, National Institute of Biology, Večna Pot 111, 1000 Lubiana

² Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Ljubljana, Aškerčeva 5, 1000 Lubiana

L'incidenza di cancro, compresi i tumori cerebrali, è in aumento a causa dell'inquinamento ambientale e dell'invecchiamento della popolazione. Benché il glioblastoma (GBM) appartenga ai tumori rari, rappresenta la forma di glioma più maligna ed è associato al tasso di sopravvivenza più basso nonostante gli avanzati protocolli di trattamento. Il progetto GLIOMA è finalizzato a individuare nuovi target molecolari e biomarcatori per il miglioramento della diagnosi e della prognosi del glioblastoma allo scopo di far fronte alla resilienza dei GBM e di suggerire nuovi metodi di trattamento. L'introduzione di nuove strategie all'avanguardia focalizzate sul singolo paziente, mediante conoscenze aggiornate e lo sviluppo di moderne tecnologie, non solo permetterà di aumentare l'efficacia del trattamento e la qualità della vita dei pazienti, ma potrà anche contribuire alla salute della popolazione generale su entrambi i versanti del confine italo-sloveno.

Il coordinatore del progetto GLIOMA è la Prof.ssa Tamara Lah Turnšek del National Institute of Biology (NIB). L'obiettivo principale del progetto è l'istituzione del network internazionale per l'identificazione, diagnosi e terapia dei tumori cerebrali, che comprende ospedali e centri di ricerca di eccellenza impegnati nell'introduzione di tecnologie all'avanguardia nel campo dell'oncologia. Il nucleo di tale network è costituito dal Department of Genetic Toxicology and Cancer Biology del NIB, dallo University Medical Centre Ljubljana, dall'Ospedale Universitario di Udine, dal Sincrotrone di Basovizza e dall'Unità Sanitaria Locale di Chioggia. Il network si amplierà ulteriormente per includere l'Università di Trieste, l'ICGEB di Padriciano e l'Ospedale Universitario di Maribor, oltre ad altri centri da entrambi i lati del confine. L'obiettivo del nostro network è il miglioramento dello stato di salute e della qualità della vita dei pazienti affetti da tumori cerebrali nelle regioni vicine.

IL PROGETTO GLIOMA SI ARTICOLA SU DUE FILONI DI RICERCA, LE CELLULE (STAMINALI) TUMORALI E IL LORO MICROAMBIENTE:

(A) BIOMARCATORI E LORO TARGETING

In particolare, il progetto GLIOMA è incentrato sulle cellule staminali di GBM (GSC), che svolgono presumibilmente un ruolo fondamentale nello sviluppo del tumore. Uno degli obiettivi importanti del progetto è quello di creare una banca interregionale di GSC e di tessuto di GBM, che costituisca la base per la ricerca di nuovi biomarcatori (GSC) con potenziale teranostico, ovvero che possano essere utilizzati come bersagli terapeutici (Figura 1). Il gruppo della Prof.ssa Lah ha recentemente suggerito un miglioramento delle condizioni di crescita per la coltura *in vitro* delle GSC [1]. Impegnato nella ricerca di nuovi biomarcatori delle GSC, il gruppo ha utilizzato un approccio privo di bias basato sulla biologia dei sistemi, che prevedeva l'uso di analisi di proteomica per identificare e validare i nuovi marcatori biologici. I dati di proteomica hanno permesso di individuare una proteina della superficie cellulare, la tetraspanina CD9, che sembra regolare la staminalità delle GSC e mediare i processi di crescita e progressione del tumore [2].

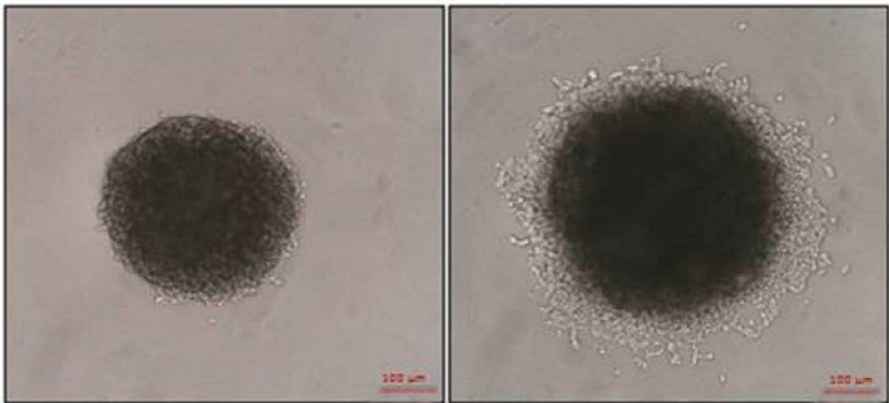


Figura 1: L'invasione delle cellule tumorali è uno dei principali fattori che contribuiscono alla resistenza dei GBM alla terapia. Per studiare l'invasione delle cellule staminali di glioblastoma, gli sferoidi preparati sono stati incorporati nella matrice di collagene. La distanza di invasione di singole cellule invasive provenienti dallo sferoide è stata misurata ogni giorno dal giorno 1 (sinistra) al giorno 5 (destra). Nota: in questo intervallo di tempo la proliferazione delle cellule ha aumentato significativamente il volume dello sferoide.

Il laboratorio del Prof. Alessandro Vindigni e di Paola Storici ha proposto come biomarcatori alternativi proteine che svolgono la loro funzione nel nucleo cellulare. Sono state valutate come nuovi biomarcatori le proteine della famiglia delle elicasi RECQ, responsabili della divisione e crescita cellulare e della morte cellulare programmata. Mutazioni nei geni della famiglia dell'enzima RECQ1 sono apparse fortemente correlate a instabilità genomica, la quale costituisce uno degli eventi precoci dello sviluppo tumorale. Nei tumori cerebrali l'elevata espressione dell'enzima RECQ1 è apparsa cruciale per la rapida proliferazione delle cellule tumorali cerebrali. Abbiamo pertanto dedicato ulteriori ricerche alla validazione funzionale dell'enzima RECQ1 [3] e della tetraspanina CD9 con strumenti sviluppati di recente allo scopo di rendere più efficiente il targeting di queste molecole e a fini di trattamento. Come intervenire sulle cellule (staminali) di glioblastoma? L'approccio standard è rappresentato dalla

neutralizzazione dell'attività dei biomarcatori sulla superficie cellulare; tuttavia, nel progetto GLIOMA il gruppo del Prof. Radovan Komel ha lavorato al miglioramento di questa tecnica mediante la produzione di nano-anticorpi. In virtù delle loro piccole dimensioni, questi rappresentano un mezzo più efficace per superare la barriera ematoencefalica che impedisce alle molecole più grandi di giungere alle cellule cerebrali [4]. I nano-anticorpi vengono prodotti naturalmente dai lama dopo esposizione a specifici antigeni presenti sulla superficie delle GSC. Per identificare nuovi anticorpi specifici per le GSC, abbiamo creato la cosiddetta libreria di nano-anticorpi a partire dall'RNA di linfociti isolati da lama immunizzati con GSC.

Prima della traslazione in studi clinici delle conoscenze acquisite *in vitro* sui nuovi biomarcatori, occorre ottenere una conferma finale testando tali marcatori in un modello *in vivo*. Nel progetto GLIOMA abbiamo realizzato il modello tumorale del pesce zebra [5] impiantando cellule tumorali con geni silenziati che codificano per i biomarcatori (ovvero proteina CD9 ed elicasi RECQ1) nell'embrione di pesce zebra per osservare il ruolo di queste proteine nella formazione del tumore (Figura 2). Questo nuovo animale modello potrebbe sostituire i modelli di topo impiegati in precedenza e facilitare l'uso di vertebrati inferiori nella ricerca sul cancro. Inoltre, questo modello offre il vantaggio di essere semplice ed economico rispetto ai modelli costituiti da roditori e pertanto rappresenta un nuovo approccio promettente nella ricerca sulle cellule (staminali) di glioma.

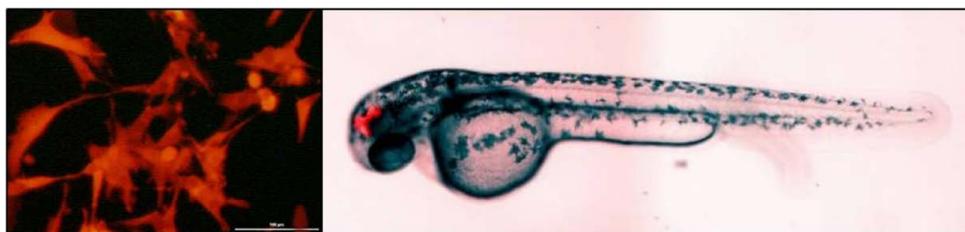


Figura 2: Per studiare nel modello tumorale in vivo il ruolo dei nuovi marcatori di GBM scoperti, cellule tumorali con geni silenziati che codificano per questi biomarcatori sono stati prima trasfettati per esprimere la proteina fluorescente rossa dsRed (sinistra). Le cellule sono state quindi impiantate nel cervello di embrioni trasparenti di pesce zebra (destra), permettendoci di studiare la distribuzione e l'invasione delle cellule tumorali.

B) IL MICROAMBIENTE CELLULARE

La massa tumorale di GBM è eterogenea, non soltanto in relazione ai diversi sottotipi di cellule di GBM, ma anche per quanto riguarda la molteplicità di cellule normali che infiltrano il tumore, le cosiddette cellule stromali. Tra queste, stiamo studiando le cellule staminali mesenchimali (MSC) infiltranti, che presentano tropismo per le cellule tumorali. Sono interessanti modulatori cellulari del GBM e potrebbero modulare specificamente il comportamento delle GSC, che non è ancora stato chiarito in dettaglio. Il gruppo della Prof.ssa Lah sta studiando in che modo l'interazione tra MSC derivate dal midollo osseo [6] e cellule di GBM influisce sulla crescita tumorale [7] e sul processo di invasione [8],[9]. Allo stesso tempo, il gruppo del Prof. Carlo Alberto Beltrami e di Antonio Paolo Beltrami sta studiando con Daniela Cesselli le GASC, cellule staminali associate al glioma, che sembrano avere un valore prognostico [10]. Questi esperimenti sono finalizzati al possibile uso delle MSC e di altre cellule stromali in sistemi cellulari per la veicolazione di farmaci e il trattamento del GBM, che potrebbero rappresentare una nuova generazione di agenti terapeutici antitumorali.

Infine, il progetto GLIOMA offre anche opportunità economiche per l'industria, dal momento che uno dei suoi obiettivi principali è favorire la competitività di imprese di recente formazione. Ad esempio, Biosistemika, un'azienda spin-off del NIB si è unita al progetto allo scopo di identificare marcatori sierici

nei pazienti con glioblastoma, che potrebbero portare alla creazione di prodotti interessanti a livello commerciale e allo sviluppo di metodi di screening non invasivi da entrambi i lati del confine.

RINGRAZIAMENTI

Il progetto GLIOMA è cofinanziato dal Programma per la Cooperazione Transfrontaliera Italia-Slovenia 2007-2013. Questo lavoro è stato anche supportato dal progetto ARSS J1-4247 (assegnato a TLT) e dal finanziamento per giovani ricercatori (ARRS).

LETTERATURA

[1] Podergajs N, Brekka N, Radlwimmer B, Herold-Mende C, Talasila Km, Tiemann K, Rajčević U, Lah Turnšek T, Bjerkvig R, Miletic H. Expansive growth of two glioblastoma stem-like cell lines is mediated by bFGF and not by EGF. *Radiol Oncol*, 2013, 47(4):330-7.

[2] Podergajs N, Rajčević U, Verbovšek U, Motaln H, Niclou SP, Jimenez CR, Herold-Mende C, Lah Turnšek T. CD9 is a potential stem cell marker of glioblastoma stem-like cells. In: Petan, Toni (Ed.), Špes, Aleš (Ed.). 10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Ljubljana, Slovenia, September 15-18, 2013. Book of abstracts. Ljubljana: Slovenian Biochemical Society, 2013, p. 150.

[3] Berti M, Chaudhuri Ar, Thangavel S, Gomathinayagam S, Lopes M, Vindigni A. Mechanistic insights into replication fork reversal and restart under genotoxic stress. In: Abstracts of papers presented at the 2013 meeting on Eukaryotic DNA replication & genome maintenance, 2013, p. 185.

[4] Kočevár N, Hudler P, Komel R. The progress of proteomic approaches in searching for cancer biomarkers. *N Biotechnol*, 2013, 30(3):319-26.

[5] Vittori M, Podergajs N, Motaln H, Breznik B, Lah Turnšek T. The zebrasifh embryonic brain as the area of tumour cell xenotransplantation for glioblastoma progression studies. *Tissue Models & Drug Screening Conference*, May 6-7, 2014, Berlin, Germany. Book of Abstracts, Berlin, 2014, in press.

[6] Obrez M, Motaln H, Verbovšek U, Lah Turnšek T. Vloga matičnih celic pri napredovanju in zdravljenju glioma. *Zdrav Vestn.*, 2013, letn. 82, št. 2, pp. 113-122.

[7] Motaln H, Lah Turnšek T. Harnessing systems biology approaches to study direct MSC and glioma (stem) cell interactions. In: Serša G (Ed.), Kos J (Ed.), Lah Turnšek T (Ed.), Čemažar M (Ed.), Filipič M (Ed.), Kranjc S (Ed.), Markelc B (Ed.). 7th Conference on Experimental and Translational Oncology, Portorož, Slovenia, April, 20-24, 2013. Book of abstracts. Ljubljana: Association of Radiology and Oncology, 2013, p. 92.

[8] Schichor C, Albrecht V, Korte B, Buchner A, Riesenberger R, Mysliwicz J, Paron I, Motaln H, Lah Turnšek T, Jürchott K, Selbig J, Tonn JC. Mesenchymal stem cells and glioma cells form a structural as well as a functional syncytium in vitro. *Exp Neurol*, 2012, 234(1):208-19.

[9] Motaln H, Gruden K, Hren M, Schichor C, Primon M, Rotter A, Lah TT. Human mesenchymal stem cells exploit the immune response mediating chemokines to impact the phenotype of glioblastoma. *Cell Transplant*, 2012, 21(7):1529-45.

[10] Bourkoula E, Mangoni D, Ius T, Pucer A, Isola M, Musiello D, Marzinotto S, Toffoletto B, Sorrentino M, Palma A, Caponnetto F, Gregoraci G, Vindigni M, Pizzolitto S, Falconieri G, De Maglio G, Pecile V, Ruaro ME, Gri G, Parisse P, Casalis L, Scoles G, Skrap M, Beltrami C, Beltrami AP, Cesselli D. Glioma-associated stem cells: a novel class of tumor-supporting cells able to predict prognosis of human low-grade gliomas. *Stem Cells*, 2014, 32(5):1239-53.

[11] Zupančič K, Blejec A, Herman A, Veber M, Verbovšek U, Koršič M, Knežević M, Rožman P, Lah Turnšek T, Gruden K, Motaln H. Identification of plasma biomarker candidates in glioblastoma using an antibody-array-based proteomic approach. *Radiology and oncology*, 2014, [in press], doi: 10.2478/raon-2014-0014.

Consorzio	Ente	Struttura	Città	Team Manager
Lead Partner	<i>Istituto nazionale di biologia</i>	I) Stazione di biologia marina di Pirano II) Dipartimento di tossicologia genetica e di biologia dei tumori	Pirano, Lubiana	Prof. Tamara Lah Turnšek
PP1	<i>Elettra - Sincrotrone Trieste S.C.p.A</i>		Basovizza	Dr. Alessandro Vindigni
PP2	<i>Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Maria della Misericordia</i>		Udine	Prof. Carlo Alberto Beltrami
PP3	<i>Facoltà di Medicina, Università di Lubiana</i>	Centro medico di biologia molecolare, Istituto di biochimica	Lubiana	Prof. Radovan Komel
PP4	<i>Azienda soci-sanitaria Chioggia</i>		Chioggia	Federico Sartori

GLIOMA

DOLOČANJE NOVIH BIOMARKERJEV MOŽGANSKIH TUMORJEV – GLIOMOV ZA DIAGNOZO IN KOT NOVE TARČE ZDRAVLJENJA

Neža Podergajs¹, Helena Motaln¹, Miloš Vittori¹ in Tamara Lah Turnšek^{1,2}

¹ Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka, Nacionalni inštitut za biologijo, Večna Pot 111, 1000 Ljubljana

² Oddelek za biokemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 5, 1000 Ljubljana

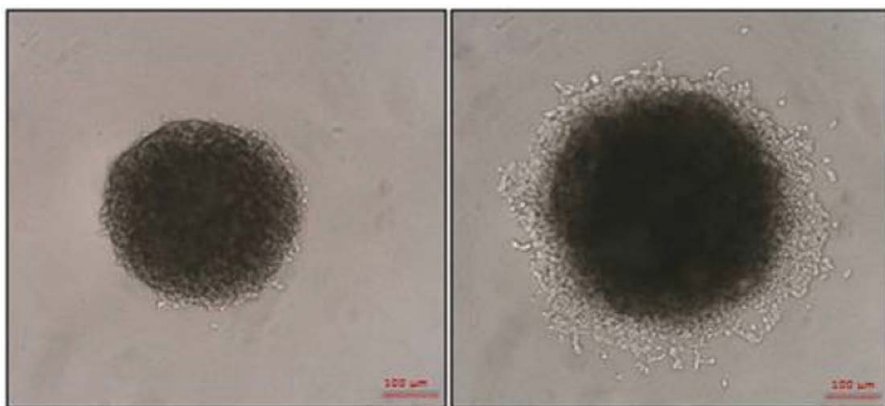
Pojavnost rakavih obolenj se zaradi onesnaženosti in slabih življenjskih navad povečuje. Narašča tudi število možganskih tumorjev, še posebej tistih najbolj malignih oblik – glioblastomov (GBM), pri katerih tudi novi načini zdravljenja ne omogočajo ozdravitve oziroma podaljšanja preživetja. Ravno zaradi odpornosti glioblastomov na ustaljene in moderne načine zdravljenja, je projekt GLIOMA usmerjen v raziskovanje in iskanje novih molekularnih tarč in biomarkerjev. Cilj projekta je izboljšanje diagnoze, prognoze in napovedi odziva bolnikov z glioblastomom na zdravljenje ter poteka bolezni. Z razvojem in preverjanjem najsodobnejših strategij, ki omogočajo načrtovanje novih terapij, prilagojenih posameznemu bolniku, projekt GLIOMA teži k vzpostavitvi koncepta individualiziranega zdravljenja na področju onkologije in glioblastomskih obolenj. Novi načini zdravljenja tumorskih obolenj, podprti s sodobnim znanjem in razvojem modernih tehnologij, tako ne bodo le povečali učinkovitosti zdravljenja in kvalitete življenja bolnikov z glioblastomom, ampak bodo tudi prispevali k izboljšanju splošnega zdravja populacije v obeh slovensko-italijanskih obmejnih regijah.

Vodja projekta GLIOMA je prof. Tamara Lah Turnšek z Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB). Glavni cilj projekta je vzpostavitev mednarodne mreže za zaznavanje, diagnozo in zdravljenje možganskih tumorjev. Konzorcij sestavljajo tako bolnišnice kot odlična raziskovalna središča, ki se ukvarjajo z uvajanjem biotehnologij na področju onkologije. Omrežje poleg jedra, ki je Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka na NIB, sestavljajo še Univerzitetni klinični center Ljubljana, Univerzitetna bolnišnica v Vidmu, Sincostrone v Bazovici in Zdravstvena ustanova v Chioggi. Predvideno je širjenje te mreže tudi na Univerzo v Trstu, ICGEB v Padričah in Univerzo v Mariboru ter na druge centre obeh obmejnih regij. Cilj tega mrežnega povezovanja je povečati zdravje in kakovost življenja bolnikov z možganskimi tumorji tudi v sosednjih regijah.

RAZISKAVE V OKVIRU PROJEKTA GLIOMA SE NANAŠAJO NA RAZISKOVANJE TUMORSKIH (MATIČNIH) CELIC IN NJIHOVEGA TUMORSKEGA MIKROOKOLJA:

(A) BIOLOŠKI OZNAČEVALCI TUMORSKIH MATIČNIH CELIC KOT TERAPEVTSKE TARČE

Projekt GLIOMA se osredotoča na glioblastomske matične celice (GMC), ki jim pripisujejo ključno vlogo pri razvoju tumorja. Eden od pomembnih ciljev projekta je ustvariti medregionalno banko tkiv GBM in GMC, ki predstavlja osnovo za iskanje novih označevalcev GMC s potencialno uporabnostjo v teranostiki, torej spremljanju odziva GBM na zdravljenje (Slika 1). Skupina prof. Lahove je pred kratkim izboljšala rastne pogoje gojenja GMC *in vitro* [1]. V okviru iskanja novih označevalcev GMC so za identifikacijo in validacijo novih bioloških označevalcev uporabili neodvisen pristop sistemske biologije, ki vključuje analize proteomov celic. S to metodo je bil identificiran površinski celični protein - tetraspanin CD9, ki najverjetneje skrbi za uravnavanje matičnosti GMC in sodeluje v procesih rasti in napredovanja GBM [2].



Slika 1: Invazija tumorskih celic je eden glavnih dejavnikov odpornosti GBM na zdravljenje. Z namenom preučiti invazijo glioblastomskih matičnih celic so bili sferoidi teh celic vklopljeni v kolagenski matriks. Razdalja posameznih celic, ki invadirajo iz sferoida, je bila merjena od dneva 1 (levo) do dneva 5 (desno). S proliferacijo celic se je v tem času tudi znatno povečal premer sferoida.

Kot alternativne označevalce v laboratoriju prof. Alessandra Vindignija in Paole Storici preučujejo proteine, ki sodelujejo v procesih, ki potekajo v celičnem jedru. Osredotočajo se na ovrednotenje novega biološkega označevalca iz družine helikaz RECQ, ki je odgovoren za celično delitev, rast in programirano celično smrt. Pokazali so, da so mutacije genov družine encimov RECQ1 močno povezane z genomsko nestabilnostjo, enim od zgodnjih dogodkov, ključnih za razvoj raka. Kot kaže je pri možganskih tumorjih povišano izražanje encima RECQ1 ključno za hitro podvojevanje tumorskih celic. Zato smo posvetili naše nadaljnje raziskave funkcionalni validaciji encima RECQ1 [3] in tetraspanina CD9 z novo razvitimi orodji, ki nam bodo razkrile njihov potencial za uporabo v ciljnih terapijah in učinkovitejše zdravljenje.

Kako uporabiti glioblastomske (matične) celice kot tarče? Standardni pristop je onemogočiti aktivnost označevalcev na celični površini. Zato namerava v projektu GLIOMA skupina prof. Radovana Komela izboljšati ta pristop s tehnologijo izdelave nano-proteites. Zaradi svoje majhne velikosti nano-

protitelesa namreč bolje prehajajo krvno-možgansko bariero, ki večjim molekulam preprečuje dostop do možganskih celic [4]. Nano-protitelesa povsem naravno tvorijo lame po izpostavitvi specifičnim antigenom, v tem primeru proteinom, ki so prisotni na površini GMC. Za identifikacijo novih nano-protiteles, specifičnih za GMC, smo pripravili tako imenovano knjižnico nano-protiteles iz RNA limfocitov lam, ki so bile imunizirane z GMC.

Končna potrditev znanja o novih bioloških označevalcih, pridobljenega *in vitro*, pred translacijo v klinične preiskave, zahteva preverjanje njihove vloge v modelih *in vivo*. V projektu GLIOMA smo razvili model raka v ribah cebricah [5], pri čemer smo vsadili tumorske celice z utišanimi geni za biološke označevalce (npr. protein CD9 in helikazo RECQ1) v zarodke rib cebric, z namenom opazovanja njihove vloge pri tvorbi neoplazij (Slika 2). Ta ribji model bi lahko nadomestil mišje modele in pripomogel k uporabi preprostejših vretenčarjev v raziskavah raka. Dodatni prednosti tega živalskega modela sta tudi njegova preprostost in nizka cena v primerjavi z modeli glodavcev, zaradi česar obeta ribji model nove pristope v raziskovanju glioblastomskih (matičnih) celic.



Slika 2: Za preučevanje vloge novih označevalcev GBM z modelom raka *in vivo* smo tumorske celice z utišanimi geni za označevalce najprej modificirali za izražanje rdečega fluorescentnega proteina dsRed (levo). Celice so bile nato injicirane v možgane prozornega zarodka ribe cebrice (desno) za spremljanje njihove porazdelitve in invazije.

(B) CELIČNO MIKROOKOLJE

Tumorska masa GBM je heterogena, ne le z vidika vsebnosti različnih podtipov celic GBM, temveč tudi z vidika prisotnosti različnih vrst normalnih celic, t. i. stromalnih celic, ki se nahajajo v tumorju. Pri slednjih se osredotočamo na raziskave infiltrirajočih mezenhimskih matičnih celic (MMC), ki so sposobne usmerjenega gibanja proti rakavim celicam. Sposobne so spremeniti tudi lastnosti in obnašanje celic GBM in najverjetneje tudi specifične lastnosti GMC, kar doslej še ni bilo podrobneje raziskano. Skupina prof. Lahove preučuje vpliv interakcij med MMC iz kostnega mozga [6] in celicami GBM na rast [7] in invazijo GBM [8], [9]. Po drugi strani pa skupina prof. Carla Alberta Beltramija in Antonia Paola Beltramija z Daniello Cesselli preučuje delovanje z gliomi povezanih matičnih celic –GASC-ov, s potencialno prognostično vrednostjo v kliniki [10]. Ti poskusi so usmerjeni v raziskave uporabnosti MMC in drugih celic strome GBM pri zdravljenju GBM z vnosom zdravil na celični osnovi, ki bi lahko predstavljali novo generacijo terapevtikov za ciljno zdravljenje raka.

Projekt GLIOMA ponuja tudi gospodarske priložnosti za industrijo, saj je eden od njegovih pglavitnih ciljev povečati kompetitivnost novonastalih podjetij. Tak primer je odcepljeno podjetje NIBa Biosistemika, ki se je vključilo v projekt z namenom identifikacije serumskih označevalcev bolnikov [11], kar bi lahko vodilo v tržno zanimive izdelke in razvoj neinvazivnih metod presejalnih testov na obeh straneh meje.

ZAHVALA

Projekt GLIOMA sofinancira Evropski program čezmejnega sodelovanja med Slovenijo in Italijo 2007-2013. To delo je podprto tudi s projektom ARRS J1-4247 (podeljen TLT) ter s financiranjem mladih raziskovalcev ARRS.

VIRI

[1] Podergajs N, Brekka N, Radlwimmer B, Herold-Mende C, Talasila Km, Tiemann K, Rajčević U, Lah Turnšek T, Bjerkgvig R, Miletic H. Expansive growth of two glioblastoma stem-like cell lines is mediated by bFGF and not by EGF. *Radiol Oncol*, 2013, 47(4):330-7.

[2] Podergajs N, Rajčević U, Verbovšek U, Motaln H, Niclou SP, Jimenez CR, Herold-Mende C, Lah Turnšek T. CD9 is a potential stem cell marker of glioblastoma stem-like cells. In: Petan, Toni (Ed.), Špes, Aleš (Ed.). 10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Ljubljana, Slovenia, September 15-18, 2013. Book of abstracts. Ljubljana: Slovenian Biochemical Society, 2013, p. 150.

[3] Berti M, Chaudhuri Ar, Thangavel S, Gomathinayagam S, Lopes M, Vindigni A. Mechanistic insights into replication fork reversal and restart under genotoxic stress. In: Abstracts of papers presented at the 2013 meeting on Eukaryotic DNA replication & genome maintenance, 2013, p. 185.

[4] Kočevar N, Hudler P, Komel R. The progress of proteomic approaches in searching for cancer biomarkers. *N Biotechnol*, 2013, 30(3):319-26.

[5] Vittori M, Podergajs N, Motaln H, Breznik B, Lah Turnšek T. The zebrasifh embryonic brain as the area of tumour cell xenotransplantation for glioblastoma progression studies. Tissue Models & Drug Screening Conference, May 6-7, 2014, Berlin, Germany. Book of Abstracts, Berlin, 2014, in press.

[6] Obrez M, Motaln H, Verbovšek U, Lah Turnšek T. Vloga matičnih celic pri napredovanju in zdravljenju glioma. *Zdrav Vestn.*, 2013, letn. 82, št. 2, pp. 113-122.

[7] Motaln H, Lah Turnšek T. Harnessing systems biology approaches to study direct MSC and glioma (stem) cell interactions. In: Serša G (Ed.), Kos J (Ed.), Lah Turnšek T (Ed.), Čemažar M (Ed.), Filipič M (Ed.), Kranjc S (Ed.), Markelc B (Ed.). 7th Conference on Experimental and Translational Oncology, Portorož, Slovenia, April, 20-24, 2013. Book of abstracts. Ljubljana: Association of Radiology and Oncology, 2013, p. 92.

[8] Schichor C, Albrecht V, Korte B, Buchner A, Riesenberger R, Mysliwietz J, Paron I, Motaln H, Lah Turnšek T, Jürchott K, Selbig J, Tonn JC. Mesenchymal stem cells and glioma cells form a structural as well as a functional syncytium in vitro. *Exp Neurol*, 2012, 234(1):208-19.

[9] Motaln H, Gruden K, Hren M, Schichor C, Primon M, Rotter A, Lah TT. Human mesenchymal stem cells exploit the immune response mediating chemokines to impact the phenotype of glioblastoma. *Cell Transplant*, 2012, 21(7):1529-45.

[10] Bourkoula E, Mangoni D, Ius T, Pucer A, Isola M, Musiello D, Marzinotto S, Toffoletto B, Sorrentino M, Palma A, Caponnetto F, Gregoraci G, Vindigni M, Pizzolitto S, Falconieri G, De Maglio G, Pecile V, Ruaro ME, Gri G, Parisse P, Casalis L, Scoles G, Skrap M, Beltrami C, Beltrami AP, Cesselli D. Glioma-associated stem cells: a novel class of tumor-supporting cells able to predict prognosis of human low-grade gliomas. *Stem Cells*, 2014, 32(5):1239-53.

[11] Zupančič K, Blejec A, Herman A, Veber M, Verbovšek U, Koršič M, Knežević M, Rožman P, Lah Turnšek T, Gruden K, Motaln H. Identification of plasma biomarker candidates in glioblastoma using an antibody-array-based proteomic approach. *Radiology and oncology*, 2014, [in press], doi: 10.2478/raon-2014-0014.

Konzorcij	Prijavitelj	Enota	Mesto	Vodja projektne skupine
Lead Partner	<i>Nacionalni inštitut za biologijo</i>	I) Morska biološka postaja II) Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka	Piran, Ljubljana	prof. Tamara Lah Turnšek
PP1	<i>Elettra - Sincrotrone Trieste S.C.p.A</i>		Bazovica	dr. Alessandro Vindigni
PP2	<i>Zdravstveno-univerzitetni zavod S. Maria della Misericordia</i>		Videm	prof. Carlo Alberto Beltrami
PP3	<i>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta</i>	Medicinski center za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo	Ljubljana	prof. Radovan Komel
PP4	<i>Zdravstvena ustanova iz Chioggie</i>		Chioggia	Federico Sartori

GLIOMA IDENTIFICATION OF NEW GLIOMA BIOMARKERS AS POTENTIAL DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC TARGETS

Neža Podergajs¹, Helena Motaln¹, Miloš Vittori¹ and Tamara Lah Turnšek^{1,2}

¹ Department of Genetic Toxicology and Cancer Biology, National Institute of Biology, Večna Pot 111, 1000 Ljubljana

² Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, University of Ljubljana, Aškerčeva 5, 1000 Ljubljana

The incidence of cancer, including brain tumours, is increasing due to environmental pollution and population aging. Although glioblastoma (GBM) belongs to rare tumours, it is the most malignant form of glioma where patients display the shortest survival rate despite the advanced treatment protocols. To address the glioblastomas' resilience and suggest novel treatment methods, the GLIOMA project aims to search for novel molecular targets and biomarkers for GBM diagnosis and prognosis improvement. Introducing new "state of the art" strategies focusing on individual patient, by up to date knowledge and the development of modern technologies will not only increase the treatment efficiency and life quality of the patients, but may also contribute to health of general population on both sides of the Slovene-Italian border.

The coordinator of the GLIOMA project is Prof. Tamara Lah Turnšek from National Institute of Biology (NIB). The primary goal of the project is the establishment of the international network for detection, diagnosis and therapy of brain tumours. It comprises hospitals and excellent research centres dedicated to the introduction of "state of the art" technologies in the field of oncology. The core of this network consists of the Department of Genetic Toxicology and Cancer Biology at NIB, the University Medical Centre Ljubljana, the University Hospital in Udine, Sincrotrone in Basovizza and the Local Health Unit in Chioggia. The network shall further expand to the University of Trieste, the ICGEB in Padriciano and the University Hospital of Maribor as well as to other centres at both sites of the border. The goal of our networking is to increase health and life quality of brain tumour patients in the neighbouring regions.

THE GLIOMA PROJECT HAS TWO ARMS OF RESEARCH, THE TUMOUR (STEM) CELLS AND THEIR MICROENVIRONMENT:

(A) BIOMARKERS AND THEIR TARGETING

Specifically, the GLIOMA project focuses on GBM stem cells (GSCs), which presumably play a key role in tumour development. One of the important aims of the project is to create an interregional GBM tissue and GSC bank, representing the basis for search of novel (GSC) biomarkers with potential theranostic, i.e. therapy targeting potential (Figure 1). The group of Prof. Lah recently proposed improved growth conditions for the *in vitro* culturing of the GSCs [1]. In search for novel GSC biomarkers, they used unbiased systems biology approach involving proteomics analyses to identify and validate novel biological markers. Proteomics data revealed cell surface protein, tetraspanin CD9, which appears to regulate the stemness of GSCs and mediate processes of tumour growth and progression [2].

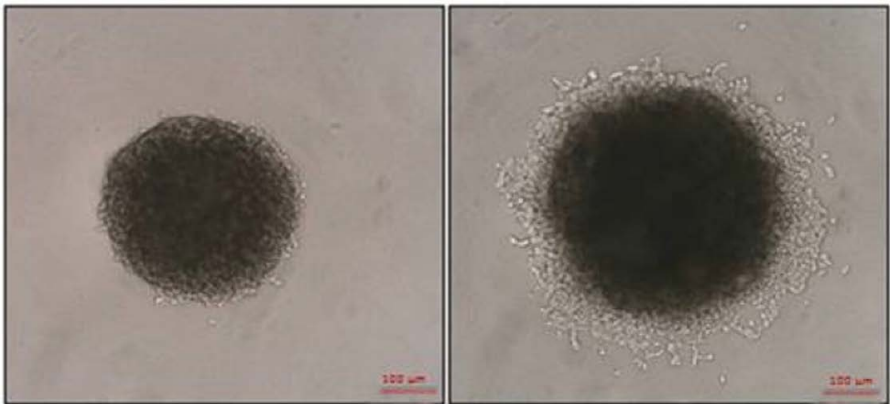


Figure 1: Tumour cell invasion is one of the major contributors to GBM resistance to therapy. To study the invasion of glioblastoma stem cells, the prepared spheroids were embedded into the collagen matrix. The invasion distance of single cells invading from the spheroid was measured each day from day 1 (left) to day 5 (right). Note, that cells' proliferation over this time significantly increases the spheroid volume.

As alternative biomarkers, the proteins functioning in the cell nucleus were proposed by Prof. Alessandro Vindigni's and Paola Storici's lab. RECQ helicase family proteins, responsible for cell division, growth and programmed cell death, were evaluated as novel biomarkers. Mutations of RECQ1 enzyme family genes appeared strongly related to genome instability which is one of the early events in cancer development. In brain tumours, elevated expression of the RECQ1 enzyme appeared to be crucial for fast proliferation of brain tumour cells. We therefore dedicated our further research to functionally validate RECQ1 enzyme [3] and tetraspanin CD9 with newly developed tools for their efficient targeting and for the treatment.

How to target glioblastoma (stem) cells? Neutralising the biomarkers activity at cell surface is the standard approach, however in the GLIOMA project, the group of Prof. Radovan Komel aimed to improve the technology by the production of nano-antibodies. Due to their small size, these represent a better tool to approach the blood-brain barrier that prevents larger molecules from accessing the brain cells [4]. Nano-antibodies are produced naturally by llamas upon their exposure to specific antigens present on the surface of GSCs. To identify novel GSC specific antibodies, we have constructed

the so-called nano-antibody library from lymphocyte RNA, isolated from llamas immunized with GSCs. Final confirmation before translating the knowledge on novel biomarkers obtained *in vitro* into the clinical trials should occur by testing these in the *in vivo* model. In the GLIOMA project we have established the zebrafish cancer model [5] by implanting tumour cells with silenced genes coding for the biomarkers (e.g. protein CD9 and RECQ1 helicase) into the zebrafish embryo to observe the role of these proteins in neoplasm formation (Figure 2). Such new animal model could substitute for previously used mice models and facilitate the use of lower vertebrates in cancer research. Furthermore, this model has a benefit of being simple and cheap compared to rodents' model and thus represents a new promising approach in glioma (stem) cell research.



Figure 2: To study the role of newly discovered GBM markers in the *in vivo* cancer model, tumour cells with silenced genes coding for these biomarkers were first transfected to express the red fluorescent protein dsRed (left). The cells were then implanted into the brain of the transparent zebrafish embryo (right), enabling us to study distribution and invasion of the tumour cells.

B) THE CELLULAR MICROENVIRONMENT

GBM tumour mass is heterogeneous, not only with respect to different GBM cell subtypes but also regarding a plethora of normal cells infiltrating the tumour, the so-called stromal cells. Of these, we are investigating infiltrating mesenchymal stem cells (MSCs) which are exhibiting tropism towards the cancer cells. They are interesting cellular modulators of GBM and possibly specifically of GSCs' behaviour which is still not known to details. The group of Prof. Lah is studying how the interactions between the bone marrow derived MSCs [6] and GBM cells affect the tumour growth [7] and invasion [8],[9]. On the other hand, the group of Prof. Carlo Alberto Beltrami and Antonio Paolo Beltrami with Daniela Cesselli are studying the GASCs, the glioma-associated stem cells, which seem to have a prognostic value [10]. These experiments are directed towards the potential use of MSCs and other stromal cells in cell-based GBM treatment and drug delivery, which may represent a new generation of cancer therapeutics. Finally, the GLIOMA project also offers the economic opportunities for industry, as one of its major goals is to increase the competitiveness of newly formed enterprises. For example, Biosistemika, a spin-off company from NIB joined the project with the aim of identifying glioblastoma patients' serum markers, which may lead to commercially interesting products and to development of non-invasive methods for their screening on both sides of the border.

ACKNOWLEDGEMENT

The GLIOMA project is co-funded by the European Cross-Border Cooperation Programme of Slovenia-Italy 2007-2013. This work was also supported by the ARRS project J1-4247 (granted to TLT) and young researcher grant to NP (ARRS).

REFERENCES

- [1] Podergajs N, Brekka N, Radlwimmer B, Herold-Mende C, Talasila Km, Tiemann K, Rajčević U, Lah Turnšek T, Bjerkvig R, Miletic H. Expansive growth of two glioblastoma stem-like cell lines is mediated by bFGF and not by EGF. *Radiol Oncol*, 2013, 47(4):330-7.
- [2] Podergajs N, Rajčević U, Verbovšek U, Motaln H, Niclou SP, Jimenez CR, Herold-Mende C, Lah Turnšek T. CD9 is a potential stem cell marker of glioblastoma stem-like cells. In: Petan, Toni (Ed.), Špes, Aleš (Ed.). 10th Meeting of the Slovenian Biochemical Society with International Participation, Ljubljana, Slovenia, September 15-18, 2013. Book of abstracts. Ljubljana: Slovenian Biochemical Society, 2013, p. 150.
- [3] Berti M, Chaudhuri Ar, Thangavel S, Gomathinayagam S, Lopes M, Vindigni A. Mechanistic insights into replication fork reversal and restart under genotoxic stress. In: Abstracts of papers presented at the 2013 meeting on Eukaryotic DNA replication & genome maintenance, 2013, p. 185.
- [4] Kočevar N, Hudler P, Komel R. The progress of proteomic approaches in searching for cancer biomarkers. *N Biotechnol*, 2013, 30(3):319-26.
- [5] Vittori M, Podergajs N, Motaln H, Breznik B, Lah Turnšek T. The zebrasifh embryonic brain as the area of tumour cell xenotransplantation for glioblastoma progression studies. *Tissue Models & Drug Screening Conference*, May 6-7, 2014, Berlin, Germany. Book of Abstracts, Berlin, 2014, in press.
- [6] Obrez M, Motaln H, Verbovšek U, Lah Turnšek T. Vloga matičnih celic pri napredovanju in zdravljenju glioma. *Zdrav Vestn.*, 2013, letn. 82, št. 2, pp. 113-122.
- [7] Motaln H, Lah Turnšek T. Harnessing systems biology approaches to study direct MSC and glioma (stem) cell interactions. In: Serša G (Ed.), Kos J (Ed.), Lah Turnšek T (Ed.), Čemažar M (Ed.), Filipič M (Ed.), Kranjc S (Ed.), Markelc B (Ed.). 7th Conference on Experimental and Translational Oncology, Portorož, Slovenia, April, 20-24, 2013. Book of abstracts. Ljubljana: Association of Radiology and Oncology, 2013, p. 92.
- [8] Schichor C, Albrecht V, Korte B, Buchner A, Riesenberger R, Mysliwicz J, Paron I, Motaln H, Lah Turnšek T, Jürchott K, Selbig J, Tonn JC. Mesenchymal stem cells and glioma cells form a structural as well as a functional syncytium in vitro. *Exp Neurol*, 2012, 234(1):208-19.
- [9] Motaln H, Gruden K, Hren M, Schichor C, Primon M, Rotter A, Lah TT. Human mesenchymal stem cells exploit the immune response mediating chemokines to impact the phenotype of glioblastoma. *Cell Transplant*, 2012, 21(7):1529-45.
- [10] Bourkoula E, Mangoni D, Ius T, Pucer A, Isola M, Musiello D, Marzinotto S, Toffoletto B, Sorrentino M, Palma A, Caponnetto F, Gregoraci G, Vindigni M, Pizzolitto S, Falconieri G, De Maglio G, Pecile V, Ruaro ME, Gri G, Parris P, Casalis L, Scoles G, Skrap M, Beltrami Ca, Beltrami AP, Cesselli D. Glioma-associated stem cells: a novel class of tumor-supporting cells able to predict prognosis of human low-grade gliomas. *Stem Cells*, 2014, 32(5):1239-53.
- [11] Zupančič K, Blejec A, Herman A, Veber M, Verbovšek U, Koršič M, Knežević M, Rožman P, Lah Turnšek T, Gruden K, Motaln H. Identification of plasma biomarker candidates in glioblastoma using an antibody-array-based proteomic approach. *Radiology and oncology*, 2014, [in press], doi: 10.2478/raon-2014-0014.

Consortium	Body	Structure	City	Team Manager
Lead Partner	<i>National Institute of Biology</i>	I) Marine Biology Station II) Department of Genetic Toxicology and Cancer Biology	Piran, Ljubljana	Prof. Tamara Lah Turnšek
PP1	<i>Elettra - Sincrotrone Trieste S.C.p.A</i>		Bazovica	Dr. Alessandro Vindigni
PP2	<i>Santa Maria della Misericordia Health-University Institute</i>		Udine	Prof. Carlo Alberto Beltrami
PP3	<i>University of Ljubljana, Medical Faculty</i>	Medical Centre of Molecular Biology, Institute of Biochemistry	Ljubljana	Prof. Radovan Komel
PP4	<i>Health Social Company Chioggia</i>		Chioggia	Federico Sartori