



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato di ricerca in Medicina Molecolare

XXVIII Ciclo

Studio e caratterizzazione di nuovi
farmaci molecolari nel trattamento dei
tumori dipendenti dalla via oncogenica di
Hedgehog

Relatore:
Prof.ssa Lucia Di Marcotullio

Dottoranda:
Romina Alfonsi

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

“Io sono tra quelli che pensano che la scienza abbia una grande bellezza.

Uno scienziato nel suo laboratorio non è solo un tecnico:

è anche un bambino posto di fronte a fenomeni naturali

che lo impressionano come un racconto di fiabe.”

Marie Curie

Indice:

1	Lista delle pubblicazioni	5
2	Abstract	7
3	Introduzione	9
3.1	<i>La via di trasduzione del segnale di Hedgehog</i>	9
3.2	<i>Ruolo di Hedgehog nello sviluppo</i>	11
3.3	<i>Ruolo di Hedgehog nella tumorigenesi</i>	13
3.4	<i>Inibitori di Smoothened</i>	16
3.5	<i>Inibitori di Gli1</i>	20
4	Risultati progetto I	23
4.1	<i>Virtual screening ed identificazione di nuovi potenziali inibitori di Smo</i>	23
4.2	<i>I compound 11 e 12 inibiscono la via di Hh mediante legame diretto al recettore Smo</i>	24
4.3	<i>Il compound 12 blocca la proliferazione in vari modelli cellulari Hh-dipendenti</i>	29
5	Risultati progetto II	34
5.1	<i>Approccio chimico per l'identificazione di un nuovo e promettente inibitore di Gli1: il Glabrescione B</i>	34
5.2	<i>Requisiti strutturali e funzionali alla base dell'interazione</i>	

	<i>Gli1/DNA</i>	35
5.3	<i>Il GlaB inibisce la via del segnale di Hh interferendo con l'attività trascrizionale di Gli1</i>	39
5.4	<i>Il GlaB inibisce la proliferazione Gli1-dipendente nei GCPs in vitro e in vivo</i>	43
5.5	<i>Il GlaB inibisce la proliferazione Gli1-dipendente del medulloblastoma e delle Mb-SCs in vitro</i>	46
5.6	<i>Il GlaB inibisce la proliferazione Gli1-dipendente del medulloblastoma in vivo</i>	48
5.7	<i>Il GlaB inibisce la proliferazione Gli1-dipendente in cellule di carcinoma a cellule basali in vitro ed in vivo</i>	50
6	Discussione	53
6.1	<i>Progetto I</i>	53
6.2	<i>Progetto II</i>	56
7	Materiali e Metodi	60
8	Bibliografia	68

1. Lista delle pubblicazioni

1) Mazzà D, Infante P, Colicchia V, Greco A, **Alfonsi R**, Siler M, Antonucci L, Po A, De Smaele E, Ferretti E, Capalbo C, Bellavia D, Canettieri G, Giannini G, Screpanti I, Gulino A, Di Marcotullio L.

PCAF ubiquitin ligase activity inhibits Hedgehog/Gli1 signaling in p53-dependent response to genotoxic stress.

Cell and Death Differentiation 2013; 20(12):1688-97.

DOI: 10.1038/cdd.2013.120.

Impact factor 2014: 8.184

2) La Regina G, Bai R, Coluccia A, Famiglini V, Pelliccia S, Passacantilli S, Mazzoccoli C, Ruggieri V, Sisinni L, Bolognesi A, Rensen WM, Miele A, Nalli M, **Alfonsi R**, Di Marcotullio L, Gulino A, Brancale A, Novellino E, Dondio G, Vultaggio S, Varasi M, Mercurio C, Hamel E, Lavia P, Silvestri R.

New pyrrole derivatives with potent tubulin polymerization inhibiting activity as anticancer agents including hedgehog-dependent cancer.

Journal of Medicinal Chemistry 2014; 57(15):6531-52.

DOI: 10.1021/jm500561a.

Impact factor 2014: 5.447

3) Infante P*, Mori M*, **Alfonsi R***, Ghirga F, Aiello F, Toscano S, Ingallina C, Siler M, Cucchi D, Po A, Miele E, D'Amico D, Canettieri G, De Smaele E, Ferretti E, Screpanti I, Uccello Barretta G, Botta M, Botta B, Gulino A, and Di Marcotullio L.

Gli1/DNA interaction is a druggable target for Hedgehog-dependent tumor.

EMBO Journal 2015; 34(2):200-17. DOI: 10.15252/emj.201489213.

Impact factor 2014: 10.434

*** Gli autori hanno contribuito equamente al lavoro.**

4) Infante P, **Alfonsi R** and Di Marcotullio L.

Insights into Gli factors ubiquitylation methods.

Methods in Molecular Biology 2015; 1322:131-46.

DOI: 10.1007/978-1-4939-2772-2_12.

Impact factor 2014: 1.29

5) Infante P, **Alfonsi R**, Botta B, Mori M and Di Marcotullio L.

Targeting GLI factors to inhibit the Hedgehog pathway.

Trends in Pharmacological Sciences 2015; 36(8):547-58.

DOI: 10.1016/j.tips.2015.05.006.

Impact factor 2014: 11.539

6) Christodoulou MS, Mori M, Pantano R, **Alfonsi R**, Infante P, Botta M, Damia G, Ricci F, Sotiropoulou PA, Liekens S, Botta B, Passarella D.

Click reaction as a useful tool to creatively combine pharmacophores: The case of Vismodegib.

Bioorganic & Medicinal Chemistry 2015; 80(6):938-943. DOI: 10.1002/cplu.201402435.

Impact factor 2014: 2.447

7) La Regina G, Bai R, Coluccia A, Famiglini V, Pelliccia S, Passacantilli S, Mazzocchi C, Ruggieri V, Verrico A, Miele A, Monti L, Nalli M, **Alfonsi R**, Di Marcotullio L, Gulino A, Ricci B, Soriani A, Santoni A, Caraglia M, Porto S, Da Pozzo E, Martini C, Brancale A, Marinelli L, Novellino E, Vultaggio S, Varasi M, Mercurio C, Bigogno C, Dondio G, Hamel E, Lavia P, Silvestri R.

New Indole Tubulin Assembly Inhibitors Cause Stable Arrest of Mitotic Progression, Enhanced Stimulation of Natural Killer Cell Cytotoxic Activity, and Repression of Hedgehog-Dependent Cancer.

Journal of Medicinal Chemistry 2015; 58(15):5789-807.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00310.

Impact factor 2014: 5.447

2. Abstract

La via di trasduzione del segnale di Hedgehog (Hh) gioca un ruolo cruciale nello sviluppo e nella tumorigenesi, nonché nella proliferazione e mantenimento delle cellule staminali tumorali (CSCs). L'attivazione di questa via del segnale avviene in seguito al legame del ligando Hh con il recettore inibitorio Patched1 (Ptch1). Tale interazione rimuove l'effetto inibitorio che Ptch1 esercita su un altro recettore, Smoothened (Smo), che rappresenta il regolatore positivo chiave nella trasduzione del segnale. Questo evento consente il rilascio dei fattori trascrizionali zinc-finger della famiglia Gli (Gli1, Gli2 e Gli3), permettendone la traslocazione nucleare e la conseguente attività trascrizionale.

Un'aberrante attivazione del signaling è responsabile dell'insorgenza di diversi tipi di tumore tra i quali il medulloblastoma, il rhabdomyosarcoma, il carcinoma a cellule basali e molti altri. La carcinogenesi Hh dipendente è legata ad alterazioni genetiche e/o molecolari a carico dei componenti più importanti della via, quali ad esempio mutazioni attivanti del recettore Smo, inattivanti il recettore Ptch1 o il regolatore SuFu, traslocazioni di *Gli1* o amplificazioni di *Gli1* o *Gli2*, iperattivazione di Gli1 attraverso meccanismi non canonici.

Dato il ruolo fondamentale nella tumorigenesi e nel mantenimento delle nicchie di cellule staminali tumorali, la via del segnale di Hh rappresenta oggi un attraente bersaglio terapeutico nel cancro. Negli ultimi anni la maggior parte delle ricerche sono state focalizzate sullo sviluppo di farmaci in grado di bloccare l'effetto attivatorio di Smo. Tra questi, il vismodegib (GDC-0449/Eridevige[®]) è stato il primo inibitore di Hh approvato dalla FDA nel 2012 per il trattamento del carcinoma a cellule basali. Tuttavia, diversi studi hanno portato alla luce alcuni limiti degli inibitori sin qui individuati, legati in particolare alla scarsa selettività, allo sviluppo di farmaco resistenza e all'attivazione dell'effettore finale della pathway, Gli1, mediata da altre vie oncogeniche. Queste

evidenze sollevano la necessità di identificare nuovi e più efficaci inibitori di Hh in grado di vincere la farmaco resistenza e contrastare la crescita del tumore.

Al fine di raggiungere questo obiettivo, abbiamo condotto uno studio innovativo di tipo computazionale finalizzato all'individuazione, caratterizzazione e ottimizzazione di nuove molecole in grado di bloccare il potenziale oncogenico di Hh. Attraverso uno screening in silico di una libreria di piccole molecole di origine naturale, sintetica o semi-sintetica e sfruttando la struttura cristallografica dei componenti chiave di nostro interesse, il recettore Smo e il fattore di trascrizione Gli1, abbiamo identificato nuovi efficaci inibitori della via di Hh. In particolare, abbiamo individuato la prima molecola in grado di impedire l'attività trascrizionale di Gli1, grazie alla sua capacità di legare direttamente questo fattore di trascrizione ed inibirne il legame con il DNA. L'efficacia di tali molecole nel bloccare la proliferazione cellulare e quindi la crescita del tumore, è stata comprovata da test effettuati, *in vitro* ed *in vivo*, su modelli tumorali caratterizzati da un'aberrante attivazione del signaling di Hh. I nostri risultati svelano il potenziale di queste molecole come nuovi e promettenti approcci terapeutici per la cura dei tumori associati alla via di Hh.

3. Introduzione

3.1 La via di trasduzione del segnale di Hedgehog

La via di trasduzione del segnale di Hedgehog (Hh) è una pathway altamente conservata durante l'evoluzione. Identificato per la prima volta in *Drosophila*, Hh è un potente morfogeno coinvolto nella regolazione dei processi di sviluppo, embriogenesi e nel patterning tissutale (Hui and Angers, 2011).

Sebbene altamente conservata, la via di trasduzione di Hh nei vertebrati è più complessa che in *Drosophila*, infatti la famiglia dei ligandi Hh è composta da tre membri: Desert (Dhh), Indian (Ihh) e Sonic hedgehog (Shh), ciascuno dei quali è coinvolto in diversi aspetti dello sviluppo tissutale. Ihh partecipa al differenziamento dell'endoderma e del tessuto osseo, Dhh nella spermatogenesi e Shh in molti aspetti dello sviluppo neurale (Wechsler-Reya e al., 2001; Ruiz i Altaba et al., 2002).

Come in *Drosophila*, in assenza del ligando Hh, il recettore inibitorio Ptch1 mantiene in uno stato inattivo il co-recettore Smo [Fig 1A]. L'attivazione della via del segnale di Hh avviene in seguito all'interazione tra il ligando e il recettore Ptch1. Questo legame interrompe l'azione inibitoria dello stesso Ptch sul co-recettore Smo, che migra a livello del *non motile primary cilium*, un organello di membrana presente nei vertebrati e indispensabile per la trasduzione del segnale. Il complesso citoplasmatico formato dalla serin-treonin chinasi Fused (Fu), Costal-2 (Cos2) e Suppressor of Fused (SuFu) lega Smo nella porzione C-terminale della coda intracitoplasmatica consentendo il rilascio dei fattori di trascrizione zinc-finger della famiglia Gli (glioma-associated oncogene Gli1, Gli2 e Gli3) (Humke et al., 2010) [Fig 1B]. Tra i tre, Gli1, l'effettore finale della

pathway, funziona sempre da attivatore. Gli2 ha un ruolo prettamente attivatorio, ma può agire anche da repressore, mentre Gli3 è per lo più repressorio (Traiffort et al., 2010).

In seguito all'attivazione del signaling, Gli viene trasformato nella forma attivatoria con meccanismi non ancora chiari, migra nel nucleo e promuove la trascrizione di una serie di geni coinvolti in diverse funzioni: proliferazione e differenziamento cellulare (*ciclina D1 e D2, N-Myc, WNT, PdgfRa, Igf2, FoxM1, FoxA2, Myf5*), sopravvivenza (*Bcl2*), self-renewal e determinazione del destino cellulare (*Bmi1, Nanog*), angiogenesi (*Vegf*), transizione epitelio-mesenchima e invasività (*Snail1, Elk1, osteopontina*). Tra i geni trascritti annoveriamo anche i regolatori positivi (lo stesso *Gli1*) e negativi (*Ptch, Hip, BMP*) della pathway (Gulino et al., 2012; Pandolfi and Stecca, 2015).

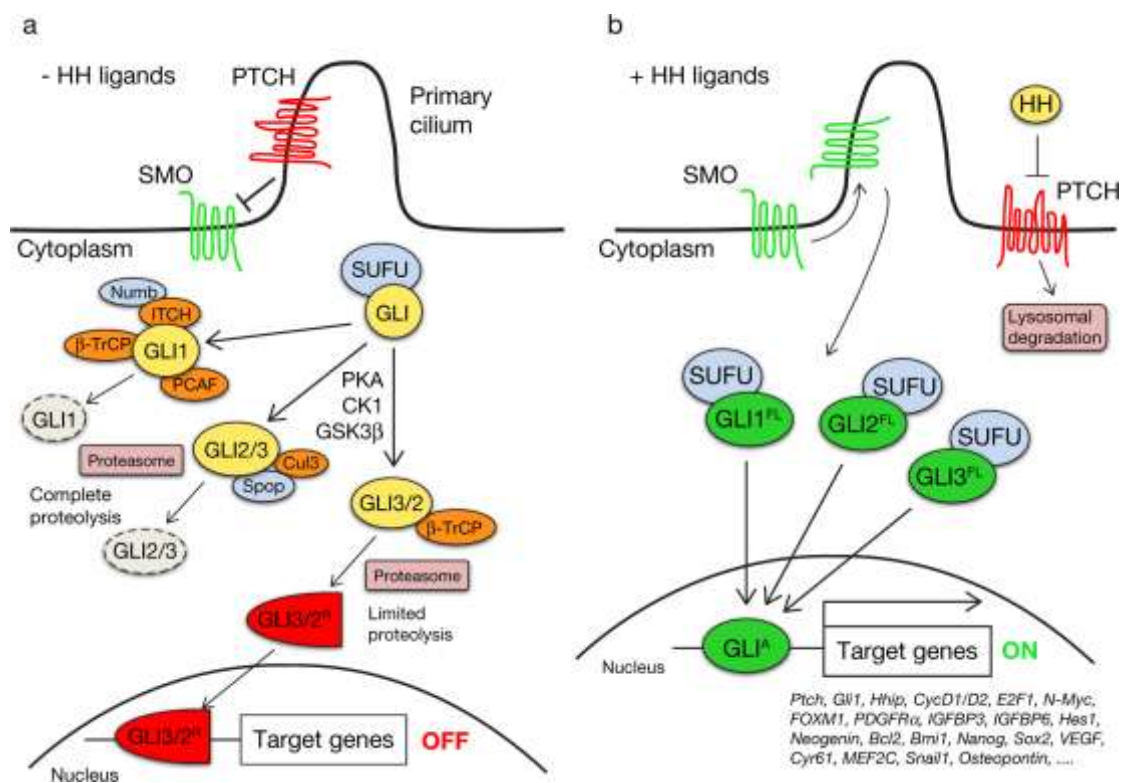


Fig 1: Modello del signaling di Hedgehog nei vertebrati (A e B).

3.2 Ruolo di Hedgehog nello sviluppo

La via di segnalazione di Hh è essenziale per numerosi eventi durante lo sviluppo di molti organi. Uno dei ruoli principali del signaling di Hh consiste nel mantenimento e self-renewal di cellule staminali/progenitrici neurali della zona subgranulare dell'ippocampo e della zona subventricolare del ventricolo laterale del proencefalo (Ruiz i Altaba et al., 2007; Gulino et al., 2007).

Tale signaling controlla infatti, in maniera dose-dipendente, la proliferazione dei precursori neurali e contribuisce al mantenimento delle cellule staminali neurali nella zona subventricolare (SVZ) localizzata nella parte dorsale dell'encefalo. E' stato dimostrato che la via di Hh regola nello specifico il numero di cellule staminali neurali all'interno delle neurosfere nel corso della vita embrionale, post-natale e adulta. Diversi dati di letteratura riportano infatti come le nicchie di cellule staminali nella vita perinatale e adulta esprimano il fattore di trascrizione Gli1 (Stecca and Ruiz i Altaba, 2005). L'esistenza di modelli sperimentali in cui è stata operata l'ablazione genetica di Shh o di Smo nei precursori neurali, hanno mostrato una drastica riduzione del numero di cellule che formano neurosfere accompagnata da una massiccia morte cellulare (Machold et al., 2003). L'inibizione farmacologica di Hh con Ciclopamina compromette la capacità di tali cellule di formare neurosfere, confermando che la via di trasduzione di Hh è assolutamente necessaria per la normale proliferazione e auto-rinnovamento delle cellule staminali (Palma et al., 2005).

Nel cervelletto Hh regola la proliferazione e il differenziamento delle cellule progenitrici dei granuli (GCPs), la componente cellulare maggiormente rappresentata in tale organo durante lo sviluppo. Shh viene prodotto e secreto dalle cellule del Purkinje ed agisce in questo contesto da fattore mitogeno promuovendo l'espansione delle cellule

GCPs. I meccanismi che prevengono l'attivazione della pathway di Hh o che ne determinano lo spegnimento, rappresentano un'area di studio di ampio interesse. Infatti, è proprio su questi meccanismi che agiscono i segnali che, dopo l'iniziale fase proliferativa, permettono alle GCPs di sottrarsi al potente effetto mitogeno di Shh e quindi di uscire dal ciclo cellulare e differenziare (Ho and Scott, 2002).

La pathway di Hh è fondamentale nell'embrione per il corretto sviluppo del sistema nervoso e alterazioni a carico dei componenti chiave del signaling possono predisporre allo sviluppo di patologie genetiche tra cui annoveriamo l'oloprosencefalia, cioè la separazione incompleta del prosencefalo accompagnato da malformazioni facciali di entità variabile; la sindrome di VACTERL, dove VACTERL è l'acronimo di associazione non randomica di difetti vertebrali, atresia anale, malformazioni cardiache, fistola tracheo-esogafea con atresia esofagea, anomalie renali e degli arti; la sindrome di Gorlin, un disordine autosomico dominante che predispone allo sviluppo di diversi tumori.

Le mutazioni che più frequentemente si riscontrano sono a carico di alcuni dei componenti principali della pathway: Ptch1, Smo, SuFu, Gli e REN^{KCTD11}.

La delezione del gene codificante Ptch1 è responsabile di gravi alterazioni dell'embriogenesi. E' stato dimostrato, in modelli murini, che se espressa in omozigosi, la delezione provoca la morte intorno al decimo giorno di vita embrionale. Se espressa in eterozigosi è compatibile con la vita, ma provoca sviluppo di medulloblastoma intorno al quarto-sesto mese di vita post-natale con un'incidenza del 15-20% (Goodrich, Milenkovic et al., 1997).

Le mutazioni a carico del co-recettore Smo sono meno frequenti e rendono il co-recettore insensibile all'inibizione mediata dal recettore Ptch1. Si ha quindi attivazione costitutiva della pathway ligando indipendente.

La perdita di REN^{KCTD11}, per delezione del braccio corto del cromosoma 17, causa un'iperattivazione della pathway. REN^{KCTD11} è una E3-ubiquitina ligasi, scoperta nel nostro laboratorio, in grado di inibire il signaling di Hh, promuovendo la degradazione di HDAC1, un potente attivatore della pathway.

La proteina citoplasmatica SuFu (Suppressor of Fused) è un potente inibitore di Gli1. SuFu si lega alla proteina Gli1, la sequestra nel citoplasma e ne impedisce la traslocazione all'interno del nucleo, inibendone, di conseguenza, l'attività di induttore trascrizionale. Mutazioni a carico di SuFu danno origine ad una proteina non funzionale portando così alla perdita di uno dei meccanismi più importanti che limitano il signaling di Hh.

Mutazioni attivanti a carico dei fattori di trascrizione Gli sono possibili benchè non molto diffuse. L'overespressione o l'iperattivazione di uno o più membri della famiglia dei fattori Gli porta ad una forte attivazione della pathway.

3.3 Ruolo di Hedgehog nella tumorigenesi

La via di Hh controlla la trascrizione di una serie di geni coinvolti in molteplici processi biologici: proliferazione cellulare, migrazione cellulare, metabolismo e staminalità. In particolare, la pathway di Hh è uno dei regolatori chiave dell'autorinnovamento e del mantenimento delle cellule staminali tumorali (CSCs) (Ruiz i Altaba and Stecca, 2007).

Come ulteriore prova dell'importanza del ruolo che la via di trasduzione di Hh svolge a livello fisiologico e patologico, è noto che aberrazioni a carico dei regolatori della pathway possono predisporre anche allo sviluppo o mantenimento di numerosi tumori (rabdomiosarcoma, melanoma, carcinoma a cellule basali, cancro del seno, ovaie,

prostata, fegato, colon e stomaco) (Amakye et al., 2013; Infante et al., 2015; Mas and Ruiz i Altaba, 2010), alcuni dei quali a carico del sistema nervoso centrale come il medulloblastoma e il glioblastoma (Gulino et al., 2012).

Attualmente si distinguono quattro meccanismi principali che portano ad un'alterata attivazione del signaling di Hedgehog: insorgenza di mutazioni genetiche, attivazione per via autocrina, per via paracrina o per via paracrina inversa [Fig 2]. Nel primo caso, l'instaurarsi di mutazioni genetiche a carico di alcuni componenti fondamentali della via (Ptch1, SuFu, Smo) determina l'iperattivazione di Hh in maniera ligando-indipendente [Fig 2A]. In alternativa, l'induzione di tipo ligando-dipendente della pathway può essere mediata dalla secrezione del ligando da parte del tumore stesso, che può così stimolare le cellule tumorali adiacenti (via autocrina) [Fig 2B], oppure lo stroma circostante, il quale è in grado di attivare a sua volta le cellule tumorali adiacenti (via paracrina) [Fig 2C]. La via paracrina inversa prevede invece la secrezione del ligando da parte dello stroma, con conseguente induzione della via di Hh nelle cellule tumorali contigue [Fig 2D] (Di Magno et al., 2015; Amakye et al., 2013).

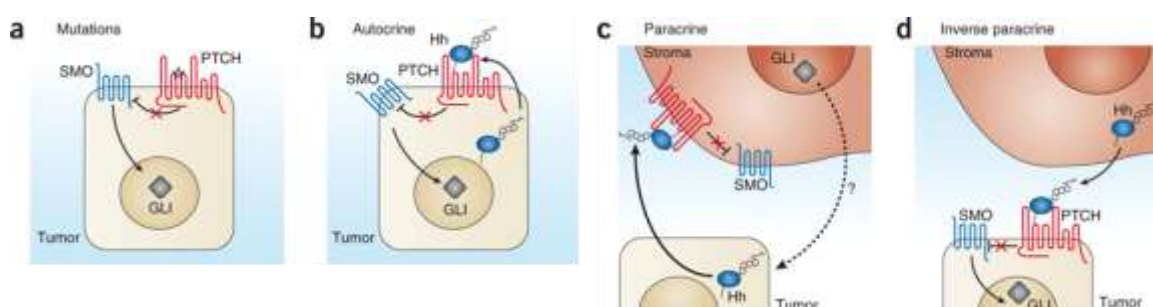


Fig 2: Meccanismi di attivazione aberrante della via di Hh: insorgenza di mutazioni genetiche (A), attivazione autocrina (B), paracrina (C) e paracrina inversa (D).

Studi recenti testimoniano inoltre l'esistenza di meccanismi non canonici capaci di determinare l'induzione della via di Hh. Tra questi annoveriamo: l'attivazione della chinasi Src (Yam et al., 2009), oscillazioni sincrone dei picchi di calcio e di inositolo

trifosfato a livello del *non motile primary cilium* (Belgacem et al., 2011; Ruat et al., 2014), stimolazione delle GTPasi Rac1 e RhoA mediata dall'interazione tra Smo e le proteine eterotrimeriche G_i (Polizio et al., 2011), o modificazioni nell'assorbimento del glucosio in seguito all'attivazione Ca^{2+} /AMP-mediata della chinasi AMPK (Teperino et al., 2012).

Per tutti i motivi fin qui descritti, la via di trasduzione del segnale di Hh si pone tra gli obiettivi molecolari più interessanti nell'ambito dell'individuazione e ottimizzazione di nuove molecole in grado di inibire le capacità proliferative e oncogeniche intrinseche della pathway stessa. Diverse aziende farmaceutiche hanno investito su progetti finalizzati alla sintesi di nuovi farmaci anti-Hh, alcuni dei quali sono attualmente in fase I o II di sperimentazione [tabella 1] (Pandolfi and Stecca, 2015).

SMO inhibitor	Phase	Indication	Status ^a	Adverse events	Dose/efficacy
Vismodegib (GDC-0449)	1	Locally advanced or metastatic solid tumours (<i>n</i> = 68)	Completed	Frequent grade 1/2 AEs: muscle spasms, dysgeusia, fatigue, alopecia, nausea, decreased appetite, diarrhoea; grade 3/4 AEs occurred in 37% of patients	Recommended phase 2 dose: 150 mg/day; ORR: 29% (58% in BCC, 1 unconfirmed response in MB) (Ref. 246)
	1	Recurrent or refractory childhood MB	Completed		Recommended dose: 150–300 mg (Ref. 251)
	1	High-risk first remission or relapsed multiple myeloma	Ongoing		
	2	Recurrent or refractory adult MB	Ongoing		
	2	Locally advanced or metastatic BCC (<i>n</i> = 96)	Ongoing	Frequent grade 1/2 AEs (>30% of patients): muscle spasms, alopecia, dysgeusia, weight loss, fatigue; grade 3/4 AEs were reported in 25% patients	Response rate: 43% for locally advanced BCC; 30% for metastatic BCC (Ref. 247)
	2	Ovarian cancer in second or third remission (<i>n</i> = 104)	Completed	Common grade 1/2 AEs: dysgeusia, ageusia, muscle spasms, alopecia; grade 3/4 AEs occurred in 23% (vismodegib) and 11.5% (placebo) of patients	Median PFS: vismodegib 7.5 months compared with placebo 5.8 months (Ref. 249)
	2	BCNS (<i>n</i> = 41)	Ongoing	Frequent AEs: dysgeusia, muscle cramps, alopecia, weight loss	Per patient rate of newly formed BCCs: 2 in vismodegib, 29 in placebo (Ref. 244)
	2	Advanced chondrosarcoma	Ongoing	Common grade 1/2 AEs: myalgia, dysgeusia and alopecia; 2 patients had reversible grade 3/4 ALT or AST increase	Clinical benefit rate: 26%; median PFS: 3.5 months; median OS: 12.4 months (Ref. 250)

SMO inhibitor	Phase	Indication	Status ^a	Adverse events	Dose/efficacy
Sonidegib (LDE-225)	1	Advanced solid tumours, including MB and BCC (n = 103)	Completed	Common grade 1/2 AEs: muscle spasms, myalgia, gastrointestinal toxicities, increased liver enzymes, dysgeusia, fatigue, alopecia	MTD: 800 mg/day; DLT: reversible grade 3–4 elevated serum creatine kinase (Ref. 248)
	1/2	Advanced solid tumours in children, including MB	Ongoing		
	2	Relapsed/refractory acute leukaemia	Ongoing		
	2	ER/HER2-breast cancer	Recruiting		
BMS-833923	1	Solid tumours	Completed		
	1	Advanced or metastatic solid tumours, including BCC and BCNS	Completed		
PF-04449913	1	Advanced solid tumours (n = 23)	Completed	Frequent grade 1/2 AEs: dysgeusia, fatigue, decrease appetite, nausea, dizziness, dehydration, diarrhoea	Recommended dose: 80–320 mg/day (Ref. 300)
	1	Haematologic malignancies	Completed		
LY2940680	1	Advanced solid tumours	Ongoing		

Tabella 1: Elenco degli inibitori di Smo attualmente in fase di sperimentazione.

Recentemente molti sforzi sono stati profusi nella ricerca di nuovi inibitori di Smo, uno dei componenti principali del signaling, inserito tra i bersagli più facilmente raggiungibili. Tuttavia diversi dubbi circa il meccanismo di azione e la specificità di tali molecole richiedono ulteriori chiarimenti ed approfonditi studi. Inoltre alcuni tumori sono insensibili al trattamento con antagonisti di Smo, a causa di una attivazione non-canonica di Gli1 (Sanchez et al., 2004; Clement et al., 2007; Mas and Ruiz i Altaba, 2010), il quale sta diventando sempre più una attraente e valida alternativa agli inibitori di Smo.

3.4 Inibitori di Smoothened

Il primo inibitore di Hh ad essere scoperto fu la ciclopamina, un alcaloide di origine naturale estratto dalla pianta *Veratrum californicum* (Chen et al., 2002), in grado di inattivare Smo mediante legame diretto a livello del “heptahelical bundle”, un sito di legame posto tra le sette eliche transmembrana del recettore stesso (Infante et al., 2015). Sebbene i risultati ottenuti dal trattamento con ciclopamina fossero incoraggianti, tale

farmaco ha mostrato fin dall'inizio alcune importanti limitazioni, legate alla teratogenicità, alla tossicità e alla scarsa biodisponibilità (Lipinsky et al., 2008); per questi motivi tale farmaco non è attualmente utilizzato per la terapia dei tumori Hh-dipendenti. Tuttavia recentemente molti sforzi sono stati profusi alla ricerca di altri inibitori derivati dalla ciclopamina, e di nuove molecole di origine naturale, sintetica o semi-sintetica in grado di agire “a monte” della via di Hh, inibendo cioè il recettore Smo.

Il Vismodegib (GDC-0449/Erivedge[®]) è stato il primo farmaco anti-Hh approvato nel gennaio 2012 dalla Food and Drug Administration (FDA), per il trattamento del carcinoma a cellule basali (BCC) avanzato e metastatico (Rudin et al., 2009; Dlugosz et al., 2012). Il vismodegib è attualmente in fase di sperimentazione in diversi trial clinici mirati alla cura di vari tumori tra cui il medulloblastoma, cancro del pancreas, dello stomaco, del colon e dell'ovaio (De Smaele et al., 2010).

Tuttavia, diversi dati di letteratura riportano che, dopo un iniziale risposta al trattamento con vismodegib e conseguente riduzione della massa tumorale, alcuni pazienti hanno presentato eventi di recidiva legati all'insorgenza di mutazioni puntiformi che rendono Smo insensibile all'azione del farmaco. Il primo caso di resistenza farmacologica riportato in letteratura riguarda un paziente affetto da medulloblastoma metastatico, che ha presentato una recidiva di malattia dopo tre mesi di trattamento con vismodegib in seguito all'instaurarsi della mutazione D473H a carico del recettore Smo. L'omologo murino di tale mutazione (D477G) è stato riscontrato anche in un gruppo di topi con medulloblastoma, sottoposti al trattamento con vismodegib e risultati resistenti alla terapia (Yauch et al., 2009).

Uno studio sull'analisi genetica di biopsie di un gruppo di pazienti affetti da BCC, ha rivelato la presenza di molte altre mutazioni puntiformi insorte in seguito a trattamento con vismodegib; alcune di queste sono in grado di rendere Smo costitutivamente attivo

mediante un meccanismo di attivazione ligando-indipendente (W535L; F460L; L412F; V321M), altre invece inducono un cambiamento conformazionale del recettore tale da rendere impossibile il legame con il farmaco (D473H; W281C; V404M; V386A; Q477E) [Fig 3] (Atwood et al., 2015a; Atwood et al., 2015b; Sharpe et al., 2015).

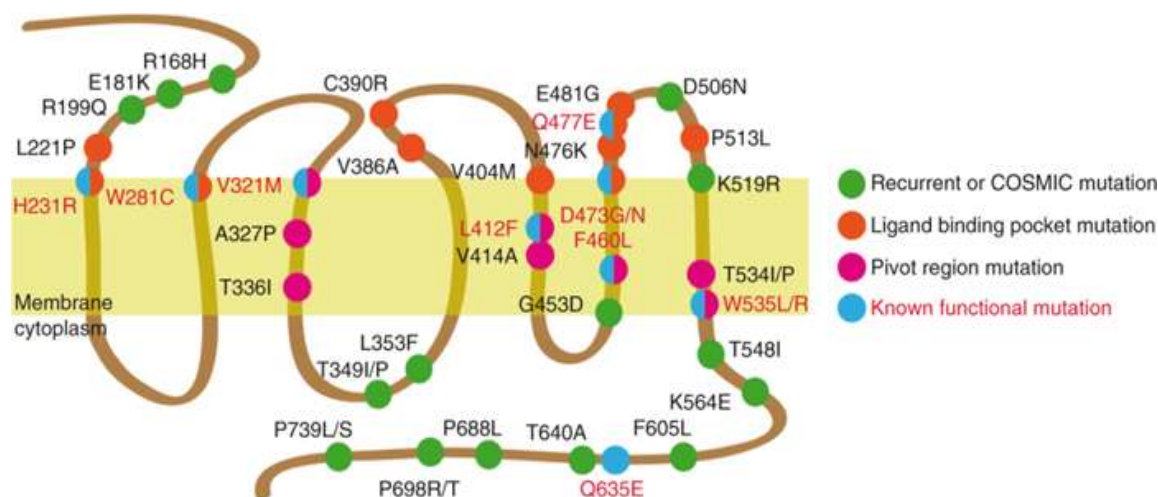


Fig. 3: Struttura del recettore Smo. In evidenza le mutazioni puntiformi più frequentemente riscontrate nei test genetici su pazienti con BCC e coinvolte nei fenomeni di iperattivazione della via di Hh o di resistenza alla terapia farmacologica.

Tali evidenze hanno condotto allo sviluppo di nuovi farmaci, tra i quali alcuni derivati della ciclopamina, in grado di contrastare la resistenza farmacologica [tabella 2]. Il Saridegib (IPI-926), ad esempio, rappresenta l'unico caso di farmaco semi-sintetico derivato dalla ciclopamina. Il Sonidegib (LDE225) è invece un derivato sintetico della ciclopamina (Mas and Ruiz i Altaba, 2010).

	Target	Origin	Original assay	Cells	IC50 (μM) ^a
(a) HH-Gli antagonists					
Natural and derivatives					
Jervine	Smo	<i>Veratrum californicum</i>	HNF3β mRNA level	Chick neural plate	0.5
Cyclopamine	Smo	<i>Veratrum californicum</i>	Gli Luc reporter	NIH3T3	0.3
KAAD-Cyclopamine	Smo	Cyclopamine	Gli Luc reporter	NIH3T3	0.02
Cyclopamine tartrate	Smo	Cyclopamine	?	?	?
Carbohydrate-Cyclopamine (5f)	Smo	Cyclopamine	MTS assay	A549	33
Antigen peptide-Cyclopamine	Smo	Cyclopamine	MTS assay	DUI45	?
IP1-269609	Smo	Cyclopamine	Gli Luc reporter	NIH3T3	?
IP1-926	Smo	Cyclopamine	Alkaline phosphatase induction	C3H10T1/2	0.007
Vitamine D3	?	Activated 7-Dehydrocholesterol	?	?	?
Curcumin	?	<i>Curcuma longa</i>	<i>Gli1</i> and <i>PTCH1</i> mRNA levels	DAOY	?
Zerumbone	Gli	<i>Zingiber zerumbet</i>	Gli Luc reporter	HaCaT	7.1
Staurosporinone	Gli	<i>Nocardopsis</i> sp.	Gli Luc reporter	HaCaT	1.8
Arcyriaflavin C	Gli	<i>Arcyria ferruginea</i>	Gli Luc reporter	HaCaT	11.3
Physalin B	Gli	<i>Physalis minima</i>	Gli Luc reporter	HaCaT	0.66
Physalin F	Gli	<i>Physalis minima</i>	Gli Luc reporter	HaCaT	0.62
Triazole itraconazole	?	(FDA approved)	?	?	?
Synthetic					
Robotnikinin	Shh	Macrocycle	Gli Luc reporter	NIH3T3	4
Estrone Cyclopamine	Smo	Steroidal precursors	Gli Luc reporter	HaCaT	?
SANT1	Smo	?	Gli Luc reporter	HaCaT	0.02
SANT2	Smo	Benzimidazole	Gli Luc reporter	HaCaT	0.03
SANT3	Smo	?	Gli Luc reporter	HaCaT	0.1
SANT4	Smo	?	Gli Luc reporter	HaCaT	0.2
TC132	Smo	SANT2 derivative	Gli Luc reporter	HaCaT	0.08
SANT74	Smo	Chlorobenzothiophene deriv.	Gli Luc reporter	HaCaT	0.07
SANT75	Smo	Chlorobenzothiophene deriv.	Gli Luc reporter	HaCaT	0.02
Cur-61414	Smo	Aminoproline	<i>Gli1</i> mRNA levels	HaCaT	0.2
HhAntag691	Smo	Benzimidazole deriv.	<i>Gli1</i> mRNA levels	HaCaT	0.04
GDC-0449	Smo	Benzimidazole deriv.	<i>Gli1</i> mRNA levels	C3H10T1/2	0.013
BMS-833923/XL139	Smo	?	?	?	0.006–0.035
LAB687	Smo	Ortho-biphenyl carboxamide	Gli Luc reporter	TM3	0.01
1-Amino-4-benzylphthalazine	Smo	Benzylphthalazine	Gli Luc reporter	TM3	0.003
LDE225	Smo	?	?	?	?
Heterocyclic antag.	Smo	Heterocycles	Alkaline phosphatase induction	C3H10T1/2	0.000026–42
PF-04449913	?	?	?	?	?
JK184	Gli	Imidazopyridine deriv.	Gli Luc reporter	C3H10T1/2	0.03
GANT58	Gli	Thiophene with pyridine rings	Gli Luc reporter	NIH3T3	5
GANT61	Gli	Hexahydropyrimidine	Gli Luc reporter	NIH3T3	5
HIP1	Gli	?	Gli Luc reporter	NIH3T3	15
HIP2	Gli	?	Gli Luc reporter	NIH3T3	20
HIP3	Gli	?	Gli Luc reporter	NIH3T3	30
HIP4	Gli	?	Gli Luc reporter	NIH3T3	30

Tabella 2: Elenco dei nuovi farmaci, naturali o sintetici, inibitori della via di Hh.

Tuttavia, nonostante l'impegno di importanti aziende farmaceutiche e università, molti di questi farmaci hanno mostrato eventi di resistenza dovuti non solo all'insorgenza delle mutazioni puntiformi sopra elencate, ma anche a meccanismi di attivazione non canonici quali l'amplificazione dei geni *Gli1* e *Gli2*, alterazioni inattivanti a carico di *SuFu*, o attivanti a carico di *N-Myc* e *Ccnd1*, l'induzione di *Gli1* mediante la via del fosfoinositolo 3-fosfato (PI3K), e l'aumento dell'espressione dei trasportatori ABCs, tra i quali la glicoproteina G, responsabili di velocizzare il metabolismo del farmaco diminuendone gli effetti anti-tumorali (Lee et al., 2007; Infante et al., 2015; Di Magno et al., 2015; Ruat et al., 2014).

3.5 Inibitori di Gli1

I fattori di trascrizione della famiglia Gli (Gli1, Gli2, Gli3) sono gli effettori finali della via di trasduzione di Hh che condividono alcune caratteristiche strutturali: presentano cinque domini zinc finger altamente conservati, il dominio N-terminale, diversi siti di legame per la protein chinasi A (PKA) e altre regioni conservate al C-terminale. Tuttavia, *in vivo*, i fattori Gli sono implicati in diverse funzioni: Gli1 agisce solo come fattore trascrizionale attivante, mentre Gli2 e Gli3 possono agire da attivatori o da repressori trascrizionali in base al contesto cellulare e allo stato di attivazione del signaling. Quando la pathway risulta inattiva, alcune chinasi (PKA, GSK3 β e CK1) fosforilano i fattori Gli, determinando l'ubiquitinazione e la conseguente degradazione proteosoma dipendente di Gli1, o il taglio proteolitico di Gli2 e Gli3 nelle rispettive forme repressive Gli2R e Gli3R (Infante et al., 2015). Tali eventi sono possibili grazie al coinvolgimento del complesso E3 ubiquitina-ligasi formato da Cullin1 e β -TrCP (Varjosalo and Taipale, 2008; Huntzicker et al., 2006). Al contrario, l'accensione della via inibisce tale processo, così che i fattori Gli2 e Gli3 esistano nella loro forma attivatoria (Gli2A e Gli3A) (Teperino et al., 2012). Oltre a β -TrCP, dati di letteratura riportano la presenza di altre E3 ubiquitina ligasi, appartenenti alla famiglia RING (Cullin3/HIB-SPOP) o HECT (Itch), in grado di mediare la proteolisi di Gli1 attraverso meccanismi indipendenti dalla fosforilazione (Di Marcotullio et al., 2006a; Di Marcotullio et al., 2011a).

Nonostante i dati fin qui riportati, molti aspetti dei meccanismi che regolano l'attività di Gli1 sono ancora sconosciuti. Tuttavia, il ruolo fondamentale di Gli sia nell'embriogenesi che nell'adulto, è messo in evidenza dalla capacità di tale fattore di

mediare la trascrizione di geni chiave coinvolti nello sviluppo, nella proliferazione e nel differenziamento (Po et al., 2010; Stecca and Ruiz i Altaba, 2005).

Alla luce di quanto detto, è chiaro che eventuali deregolazioni a carico del gene di *Gli1* possano determinare problemi nello sviluppo o condizioni patologiche gravi, tra cui l'oncogenesi. *Gli1* è stato il primo gene della via di Hh trovato amplificato in vari tumori: glioblastoma, cancro della prostata e in alcuni tumori cerebrali tra cui il medulloblastoma (Kinzler et al., 1987; Clement et al., 2007). Inoltre, attualmente i livelli trascrizionali di *Gli1* vengono utilizzati per discriminare il carcinoma a cellule basali (BCC) da altri tumori della pelle (Hatta et al., 2005). Ciò è dovuto al fatto che, sebbene l'aberrante regolazione della via di Hh può essere dovuta a mutazioni genetiche a carico dei componenti chiave del signaling o a meccanismi Smo-dipendenti e -indipendenti, come precedentemente descritto, tutte le alterazioni determinano l'attivazione dell'effettore finale Gli1. Per questo motivo i fattori Gli stanno diventando attraenti bersagli molecolari per lo sviluppo di nuovi farmaci antitumorali. Tuttavia, ad oggi sono noti pochissimi antagonisti di Gli1, soprattutto a causa della mancanza di nozioni strutturali circa i meccanismi di azione di tale fattore di trascrizione. Tra le molecole individuate, possiamo distinguere inibitori diretti di Gli1 (GANT61, ATO, HPI) (Lauth et al., 2007; Kim et al., 2010; Hyman et al., 2009) e inibitori indiretti (CMAPs, JQ1, BET151, HDAC1, Pyrvinium, Eggenone, Imiquimod) mostrati in figura 4 e riassunti nella tabella 3 (Bassilana et al., 2014; Long et al., 2014; Mottamal et al., 2015; Li et al., 2014; Williams et al., 2015; Wolff et al., 2013; Infante et al., 2015).

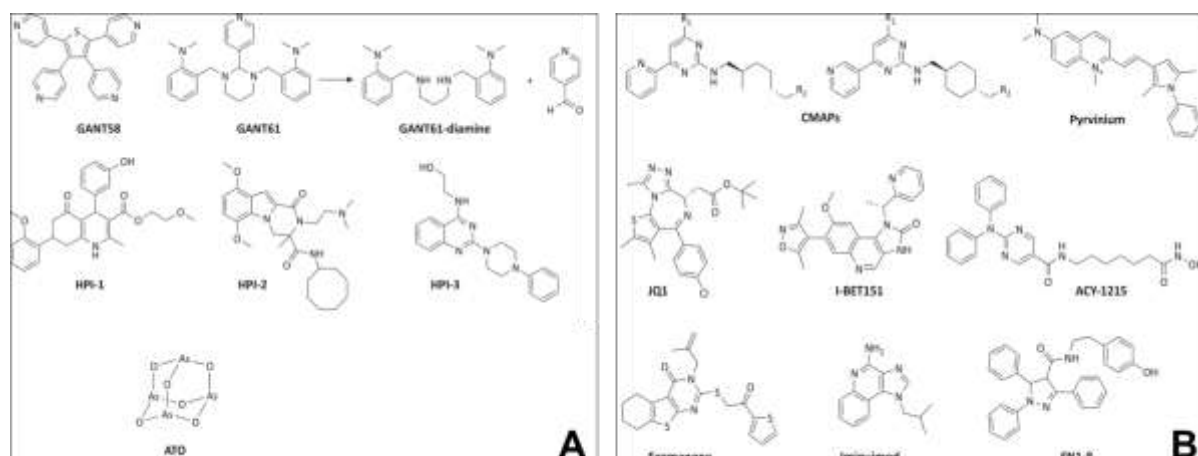


Fig.4: Struttura chimica degli inibitori di Gli1 diretti (A) e indiretti (B).

Compound	Assay	Efficacy ^a	<i>In vivo</i> mouse study	Dosage
CMAP-1	TM3 (1 nM Ag1.5) GliLuc-assay	1.1 μ M (EC ₅₀)	n.d.	n.d.
CMAP-2	TM3 (1 nM Ag1.5) GliLuc-assay	11.3 μ M (EC ₅₀)	n.d.	n.d.
CMAP-3	TM3 (1 nM Ag1.5) GliLuc-assay	0.004 μ M (EC ₅₀)	n.d.	n.d.
CMAP-4	TM3 (1 nM Ag1.5) GliLuc-assay	0.12 μ M (EC ₅₀)	n.d.	n.d.
CMAP-5	TM3 (1 nM Ag1.5) GliLuc-assay	0.02 μ M (EC ₅₀)	n.d.	n.d.
CMAP-6	TM3 (1 nM Ag1.5) GliLuc-assay	n.d.	n.d.	n.d.
CMAP-7	TM3 (1 nM Ag1.5) GliLuc-assay	0.01 μ M (EC ₅₀)	n.d.	n.d.
CMAP-8	TM3 (1 nM Ag1.5) GliLuc-assay	0.05 μ M (EC ₅₀)	n.d.	n.d.
CMAP-9	TM3 (1 nM Ag1.5) GliLuc-assay	0.2 μ M (EC ₅₀)	n.d.	n.d.
I-BET151	Shh-Light2 cells (SAG)/firefly luciferase	31 nM (IC ₅₀)	Allograft of spontaneous MBs from <i>Ptch</i> ^{+/+} mice	30 mg/kg
JQ-1	Cell viability in Smo WT-MB and Med1-MB cells	~50–150 nM (IC ₅₀)	Allograft of Med1-MB cells; SmoWT-MB or SmoD477G-MB cells. Allograft model of <i>Ptch</i> ^{+/+} ; <i>K14-creER2</i> ; <i>p53</i> ^{lox/lox} derived mouse BCC cells	50 mg/kg
HDiA and HDiB	Shh-Light2 cells (SAG)/firefly luciferase	n.d.	n.d.	n.d.
ACY-1215	Shh-Light2 cells (SAG)/firefly luciferase	n.d.	Allograft of primary SmoA1 MB cells (MB99-1 cells)	50 mg/kg
Pyrrvinium	Shh-Light2 cells (SAG or SHH)/firefly luciferase	~10 nM (IC ₅₀)	(a) Allograft of spontaneous MBs from <i>Ptch</i> ^{+/+} mice (b) APC ^{min} mice	(a) 0.8 mg/kg 5 mg/kg (b) 25 mg/kg
GANT58	Shh-Light2 cells (SAG)/firefly luciferase	~5 μ M (IC ₅₀)	Xenograft of 22Rv1 prostate cancer cells	50 mg/kg
GANT61	Shh-Light2 cells (SAG)/firefly luciferase	~5 μ M (IC ₅₀)	Xenograft of 22Rv1 prostate cancer cells Xenograft of Huh7 hepatocellular carcinoma cells Orthotopic xenograft of CFPAC-1 pancreatic cancer cells	50 mg/kg
HPI-1	GLI1 overexpressing NIH 3T3 cells/firefly luciferase	6 μ M (IC ₅₀)	Subcutaneous and orthotopic xenografts of Huh7 hepatocellular carcinoma cells	30 mg/kg
HPI-2	GLI1 overexpressing NIH 3T3 cells/firefly luciferase	>30 μ M (IC ₅₀)	–	–
HPI-3	GLI1 overexpressing NIH 3T3 cells/firefly luciferase	>30 μ M (IC ₅₀)	–	–
HPI-4	GLI1 overexpressing NIH 3T3 cells/firefly luciferase	>30 μ M (IC ₅₀)	–	–
ATO	NIH 3T3 (ShhN) GliLuc-assay	0.7 μ M (IC ₅₀)	(a) Allograft of primary MBs from <i>Ptch</i> ^{+/+} <i>p53</i> ^{+/+} mice (b) Allograft of BCC tumor derived from <i>Ptch</i> ^{+/+} ; <i>K14-creER2</i> ; <i>p53</i> ^{lox/lox}	(a) 2.5–10 mg/kg (b) 7.5 mg/kg

Tabella 3: Elenco degli antagonisti di Gli1 diretti ed indiretti.

4. Risultati progetto I

4.1 Virtual screening ed identificazione di nuovi potenziali inibitori di Smo

Le terapie antitumorali convenzionali prevedono un approccio combinato di resezione chirurgica, radioterapia e trattamenti con farmaci in grado di bloccare la crescita tumorale senza però eradicare le cellule staminali tumorali (CSCs), le quali possono quindi provocare casi di recidiva. Per questi motivi, negli ultimi anni, la ricerca di nuovi farmaci antitumorali si è fortemente concentrata sullo sviluppo di molecole in grado di agire sulla progressione del ciclo cellulare e sulle vie di trasduzione del segnale. In particolare, l'obiettivo è di colpire le pathway coinvolte nel mantenimento delle CSCs, con lo scopo di identificare terapie efficaci ed innovative in grado di debellare il tumore e diminuire al minimo il rischio di recidive.

La via di trasduzione di Hedgehog (Hh) gioca un ruolo chiave nello sviluppo e nella staminalità, ed è spesso deregolata in diversi tumori. Recentemente, molti sforzi sono stati profusi per la ricerca di compound capaci di legare ed inibire il recettore attivatorio Smo (Ruat et al., 2014). Tra questi annoveriamo il vismodegib (GDC-0449/Erivedge[®]), farmaco ampiamente testato e approvato dalla FDA per la terapia del BCC (Rudin et al., 2009; Dlugosz et al., 2012). Tuttavia alcuni studi hanno portato alla luce diversi meccanismi di resistenza farmacologica in seguito a trattamento con vismodegib (Atwood et al., 2015b; Sharpe et al., 2015), sottolineando l'importanza di individuare nuove molecole capaci di antagonizzare l'effetto tumorigenico di Smo.

A tal fine, in collaborazione con il gruppo di chimici del Professor Bruno Botta (Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Sapienza Università di Roma), abbiamo sottoposto un'ampia libreria di molecole naturali, sintetiche e semi-sintetiche

(n=1200) ad uno screening virtuale *in silico*. In particolare, abbiamo utilizzando un approccio “ligand-based” sfruttando la struttura cristallografica di Smo in complesso con la ciclopamina [Fig. 5] per condurre degli esperimenti di docking molecolare (Weierstall et al., 2014). Questa strategia ha permesso di restringere notevolmente il numero di molecole da testare come potenziali inibitori del signaling di Hh.

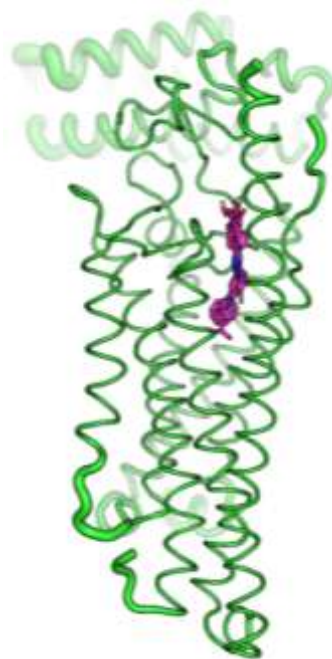


Fig. 5: Struttura cristallografica del recettore Smo (verde) in complesso con l'inibitore ciclopamina (magenta).

*4.2 I compound **11** e **12** inibiscono la via di Hh mediante legame diretto al recettore Smo*

Attraverso gli studi di screening virtuale e docking molecolare di cui sopra, siamo riusciti ad identificare diciassette potenziali antagonisti di Smo [Fig 6].

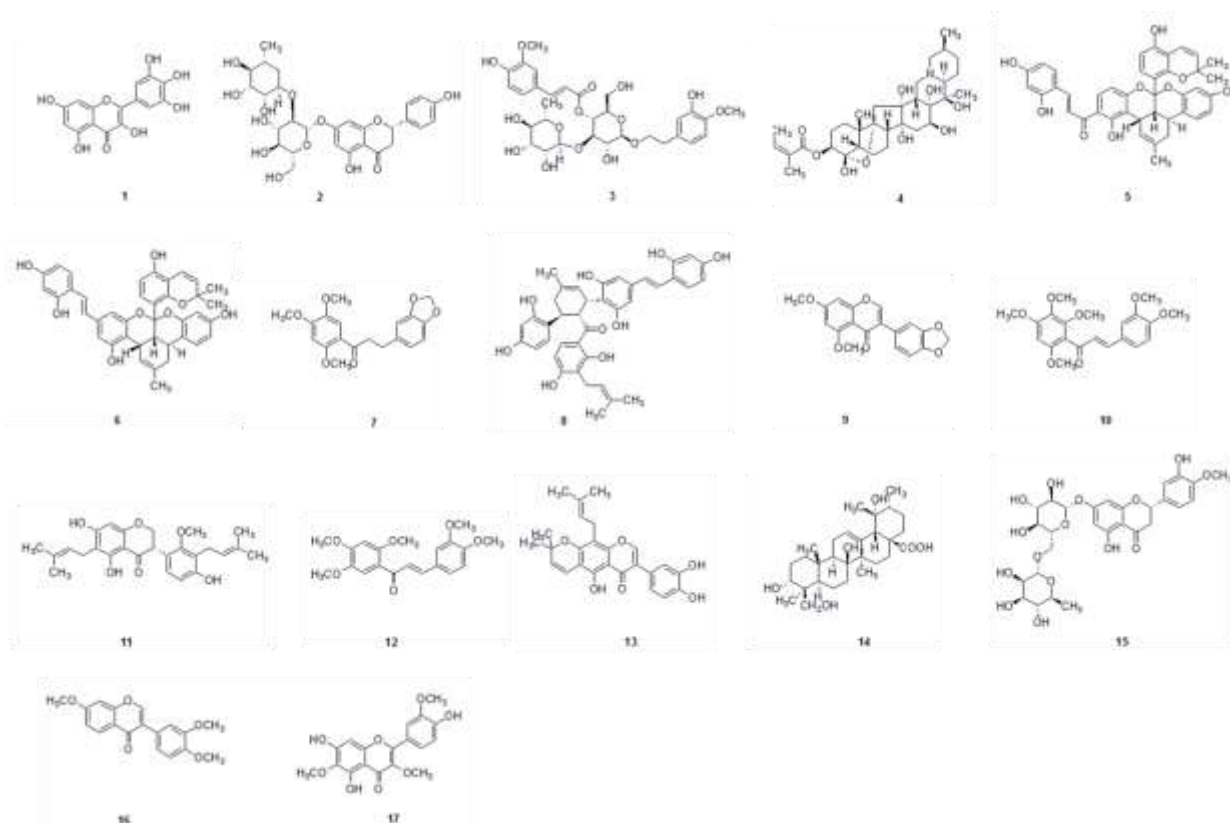


Fig. 6: Struttura chimica delle diciassette molecole individuate tramite approccio chimico per l'identificazione di nuovi potenziali inibitori di Smo.

La capacità di tali compound di inibire la via di Hh è stata testata attraverso il saggio funzionale luciferasico sulla linea cellulare NIH3T3 Shh-Light II, nelle quali è stabilmente incorporata la sequenza di legame di Gli1 al DNA posta a monte di un reporter luciferasico (GliBS-Luc) (Taipale et al., 2000). In particolare abbiamo co-trattato le cellule con il noto agonista di Smo, SAG (Chen et al., 2002), e la molecola in esame a varie concentrazioni. Alla concentrazione massima testata di 30 μ M, le molecole **1-5** si sono dimostrate inattive, mentre le molecole **6-10** e **11-12** hanno mostrato una media o alta capacità nel promuovere l'inibizione della via, con un valore di IC_{50} compreso tra 4 e 38 μ M [Fig 7]. I compound **13-17** sono invece citotossici, come dimostrato dal forte abbattimento dei valori del normalizzatore *Renilla* utilizzato nel suddetto saggio funzionale.

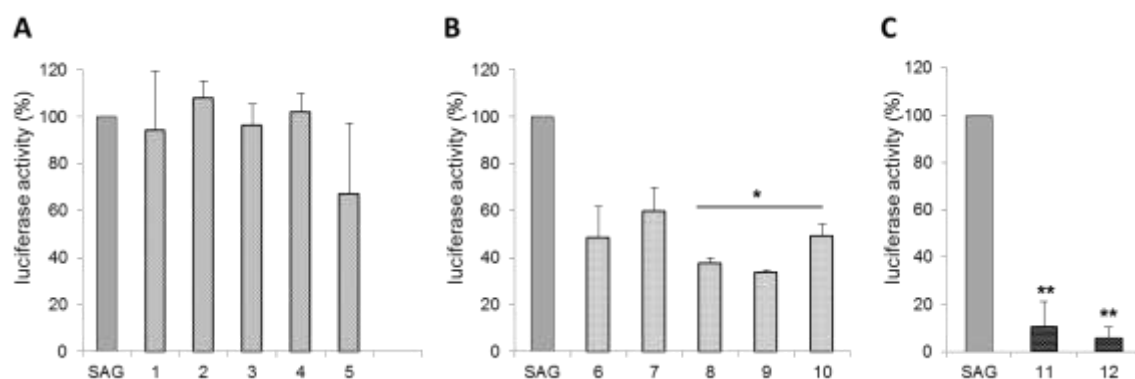


Fig 7: Saggio luciferasico in NIH3T3 Shh-Light II cotratte per 48h con SAG e con i compound in esame (30 μ M) i quali si sono dimostrati non attivi (A), mediamente attivi (B) o molto attivi (C). I risultati sono stati normalizzati vs i valori di *Renilla* e rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs SAG.

La curva dose-risposta mostrata in figura 8 ed effettuata sulla linea NIH3T3 Shh-Light II, mette in risalto il compound **12** evidenziandone il forte potere inibitorio ($IC_{50} = 4.4 \mu$ M) rispetto al compound **11**, che risulta invece meno efficace ($IC_{50} = 9.79 \mu$ M).

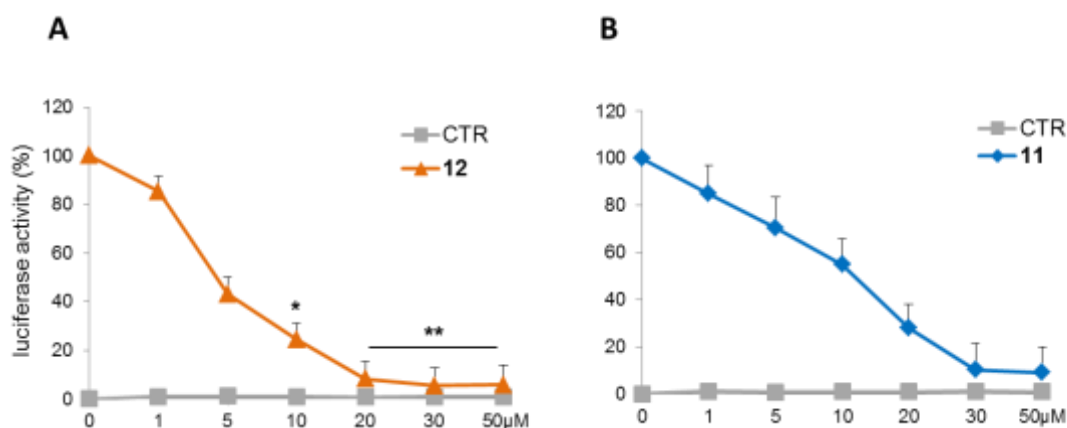


Fig. 8: Curva dose-risposta in NIH3T3 Shh-Light II trattate per 48h con SAG da solo (CTR) o in combinazione con i compound **12** (A) o compound **11** (B). I risultati sono stati normalizzati vs i valori di *Renilla* e rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs CTR.

Inoltre il compound **12** mostra un'elevata specificità per la via di trasduzione di Hh, non agendo su altre vie di segnalazione dipendenti (Jun/AP1) [Fig 9A] o indipendenti (Wnt/ β -catenina) [Fig 9B] da Hh.

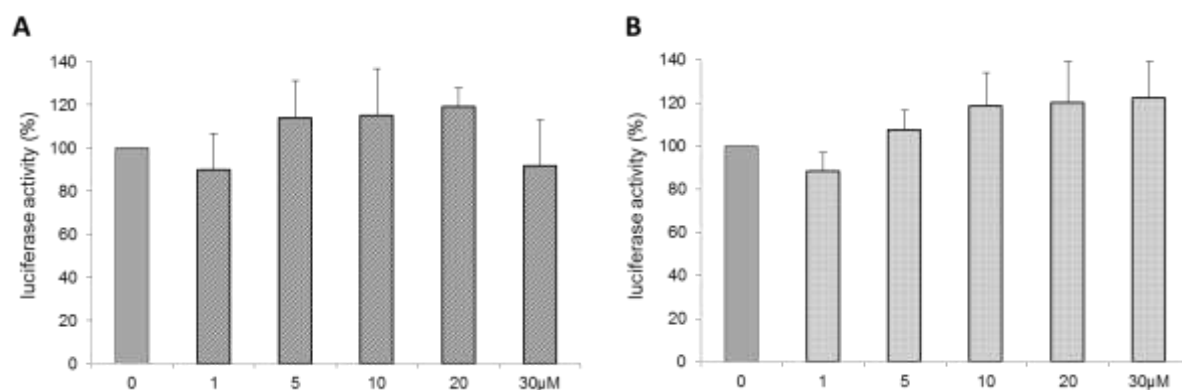


Fig 9: L'effetto del compound **12** sulle vie di trasduzione di AP1/Jun e WNT/ β -Catenina è stato valutato tramite saggi luciferasici in MEFs WT trasfettate rispettivamente con il reporter luciferasico MMP1 e c-Jun (A), o il reporter luciferasico Top Flash e β -Catenin (B), e trattate per 24 h con concentrazioni crescenti di compound **12** o DMSO come controllo (CTR). I risultati sono stati normalizzati vs i valori di *Renilla* e rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. I risultati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. * $P < 0.05$ vs CTR.

Per validare i risultati ottenuti dagli esperimenti di modeling molecolare e dimostrare che i compound **11** e **12** sono in grado di legare il recettore Smo, abbiamo condotto un saggio di competizione basato sull'utilizzo della Bodipy-cyclopamine (BC), un derivato fluorescente della ciclopamina, capace di legare Smo a livello del sito di legame posto tra le sette eliche transmembrana del recettore stesso (heptahelical boundle) (Weierstall et al., 2014). In particolare, abbiamo voluto verificare la capacità dei compound **11** e **12** di legare sia la proteina WT di Smo, sia il mutante D477G, l'ortologo murino della prima mutazione puntiforme descritta che determina farmaco-resistenza in seguito a trattamento con Vismodegib (Yauch et al., 2009; Dijkgraaf et al., 2011). A tal fine, abbiamo trasfettato la linea cellulare HEK293T con il plasmide d'espressione di Smo-WT oppure Smo-D477G e poi incubato con BC da sola o in presenza di varie concentrazioni dei compound **11** e **12**. Come mostrato in figura 10A e 10B, entrambi i compound hanno un effetto inibitorio su Smo-WT o Smo-D477H comparabile, con una curva dose-risposta, affinità di legame e valori di IC_{50} simili tra loro (compound **11** su

Smo-WT IC_{50} = 6.17 μ M, su Smo-D477G IC_{50} = 6.6 μ M; compound **12** su Smo-WT IC_{50} = 45.62 μ M, su Smo-D477G IC_{50} = 56.71 μ M).

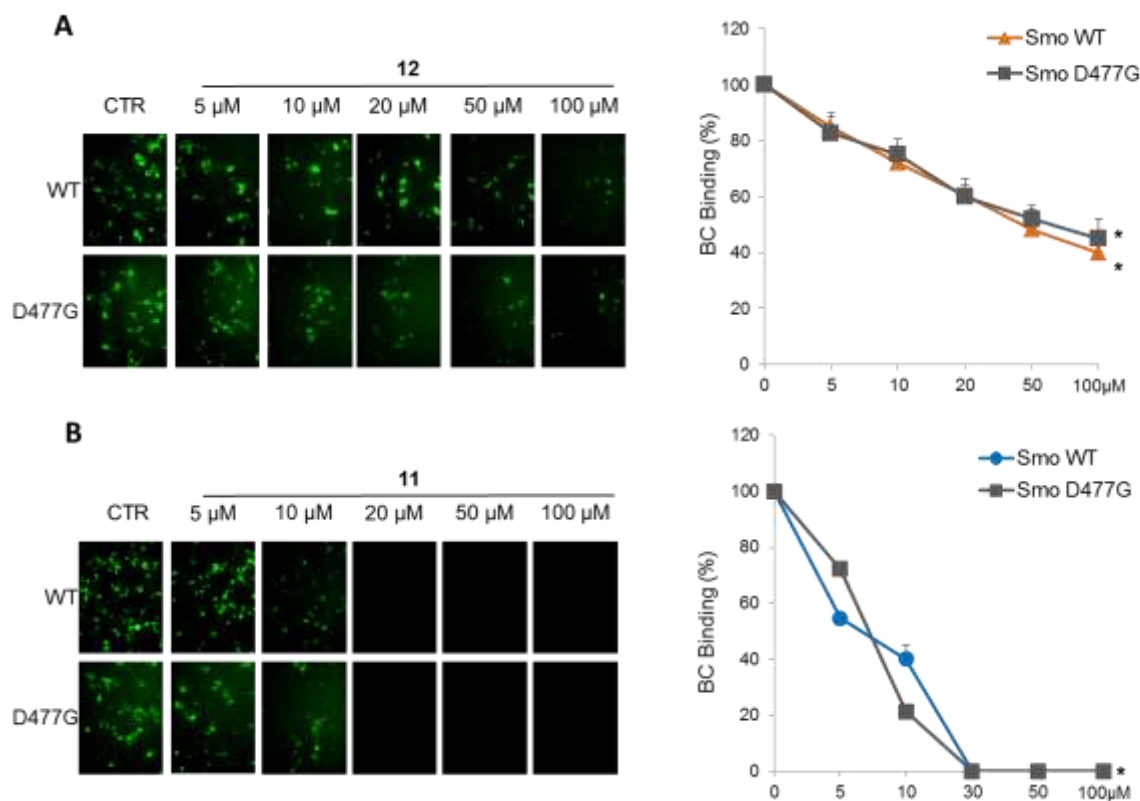


Fig 10: Saggio di competizione per il legame al recettore Smo con Bodipy-cyclopamine (BC). Le cellule HEK293T sono state trasfettate con i plasmidi d'espressione per Smo WT o con il mutante di resistenza D477G e trattate con BC da sola o in presenza di concentrazioni crescenti dei compound **12** (A) o **11** (B). Nel pannello di sinistra sono mostrate delle immagini rappresentative della competizione (BC in verde), con relativa curva della percentuale di incorporazione di BC dei rispettivi compound nel pannello di destra.

Tali risultati dimostrano la capacità dei compound **11** e **12** di legare Smo nello stesso sito di legame della ciclopamina, ponendosi come potenziali farmaci per il trattamento dei tumori Hh-dipendenti, compresi i tumori resistenti al vismodegib.

I risultati ottenuti nei saggi luciferasici su NIH3T3 Shh-Light II, uno dei test biologici funzionali maggiormente validati per lo studio dell'attivazione/inibizione della via di trasduzione di Hh, trattate con il compound **12** o il compound **11**, mostravano una

maggior capacità del compound **12** (Chalcone) di inibire il signaling di Hh. Per tale ragione abbiamo deciso di approfondire le potenzialità di questa promettente molecola.

4.3 Il compound **12** blocca la proliferazione in vari modelli cellulari Hh-dipendenti

Al fine di valutare l'efficacia biologica del Chalcone *in vitro*, abbiamo analizzato i livelli di mRNA dei più importanti target di Hh in fibroblasti embrionali murini *Ptch1*^{-/-} (*Ptch1*^{-/-} MEFs) trattati con la suddetta molecola. In questa linea cellulare l'attivazione costitutiva della via di Hh è causata dalla mancanza del gene repressorio *Ptch1* (Goodrich et al., 1997). Come mostrato in figura 11, il Chalcone è in grado di ridurre significativamente i livelli di mRNA dei target di Hh, determinando così un forte inibizione della pathway di Hh.

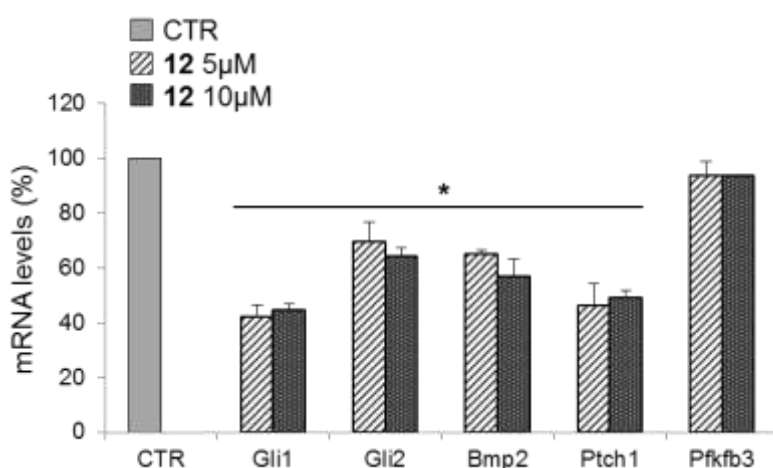


Fig 11: Livelli di espressione di mRNA dei principali target di Hh in MEFs *Ptch1*^{-/-} trattate per 48h con il compound **12** e DMSO come controllo (CTR). I livelli di trascritto sono stati valutati mediante PCR real time quantitativa normalizzata su controlli endogeni (*β2-microglobulina* e *HPRT*). Il gene *Pfkfb3* è stato utilizzato come controllo negativo. I risultati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. *P<0.05 vs CTR.

Come precedentemente riportato, la via del segnale di Hh è coinvolta nello sviluppo del cervelletto regolando la proliferazione dei progenitori dei granuli cerebellari

(GCPs). Tale linea cellulare neuronale deriva dall'epitelio germinale del "rhombic lip", la regione del romboencefalo posta all'interfaccia tra tubo neurale e tetto del quarto ventricolo. Da qui, intorno all'undicesima settimana gestazionale, le GCPs migrano tangenzialmente e vanno a ricoprire la superficie esterna del cervelletto costituendo il cosiddetto Strato Esterno dei Granuli (EGL - External Germinal Layer). Le cellule contenute nell'EGL sono caratterizzate da una intensa attività proliferativa ma, progressivamente, esse intraprendono un programma differenziativo che porterà alla formazione di granuli maturi. Il processo di differenziamento di queste cellule inizia con l'uscita dal ciclo cellulare e prosegue con la loro migrazione in profondità, attraverso lo strato delle cellule del Purkinje, fino a raggiungere la definitiva localizzazione nello strato interno, chiamato IGL (Internal Granule Layer) (Di Marcotullio et al., 2006b). Di conseguenza l'EGL va incontro, inizialmente, ad una rapida espansione che ha il suo culmine nei primi mesi di vita post-natale e, successivamente, a causa del prevalere dei fenomeni differenziativi, inizia ad assottigliarsi fino a scomparire intorno al primo anno di vita.

Molti studi dimostrano che una deregolazione dei meccanismi molecolari sottesi all'attivazione della pathway di Hedgehog, può portare ad una proliferazione incontrollata delle GCPs, con conseguente trasformazione tumorigenica di tali progenitori, considerati come le cellule di origine del medulloblastoma (MB) (Shuller et al., 2008; Yang et al., 2008).

Abbiamo testato l'effetto biologico del compound **12** e la sua capacità di inibire la proliferazione cellulare Hh-dipendente, in GCPs estratti da modelli murini di 4 giorni di vita post natale, caratterizzati da iperattivazione della pathway di Hh. In particolare, abbiamo espantato il cervelletto di topi CD1 di 4 giorni di vita post natale, al fine di poter estrarre e mettere in coltura i progenitori dei granuli cerebellari. In seguito abbiamo

trattato i GCPs in coltura con il SAG da solo, per attivare la via di trasduzione di Hh, o con SAG e compound **12**. Il trattamento con il compound **12** ostacola, in maniera dose dipendente, la proliferazione promossa dall'agonista SAG, come indicato dalla riduzione d'incorporazione della bromo deossiuridina (BrdU) (Fig. 12A e 12B). Inoltre, tale effetto è stato confermato in analisi di espressione che mostrano una significativa riduzione dei livelli di mRNA dei principali target di Hh in GCPs trattati con il compound **12** [Fig 12C].

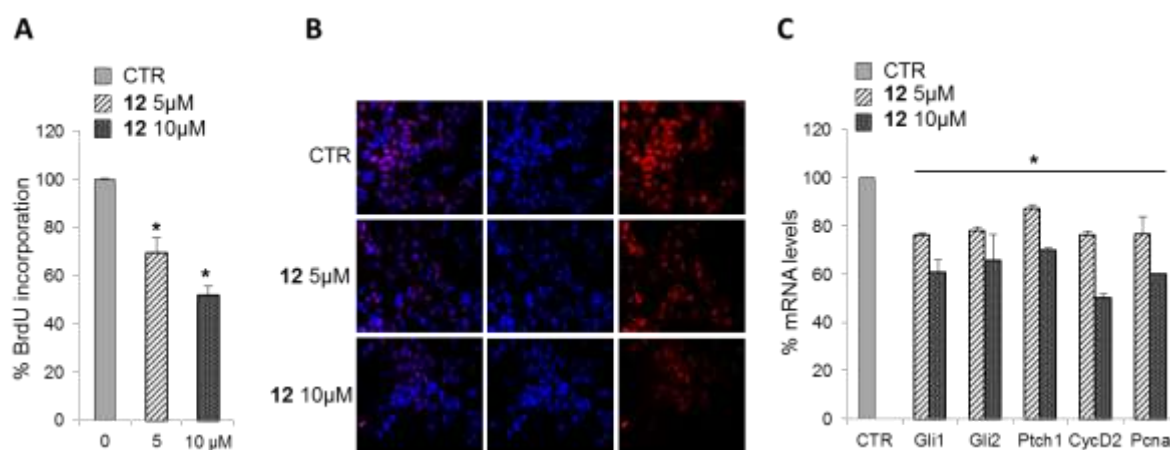


Fig 12: I progenitori dei granuli cerebellari (GCPs) sono stati trattati per 48h con SAG da solo o in combinazione con il compound **12**. L'inibizione della proliferazione cellulare è stata validata mediante saggio di incorporazione di BrdU rispetto al CTR. (A). Le immagini di fluorescenza della BrdU (rosso) e del colorante nucleare Hoechst (blu) dimostrano l'abbattimento della proliferazione in seguito al trattamento con il compound **12** (B). Livelli di espressione di mRNA dei principali target di Hh GCPs trattati per 48h con SAG da solo (CTR) o in combinazione con il compound **12** (C). I livelli di trascritto sono stati valutati mediante PCR real time quantitativa normalizzata su controlli endogeni (β -microglobulina e *HPRT*). I risultati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. * $P < 0.05$ SAG + compound **12** vs SAG (CTR).

L'aberrante attivazione della via di Hh, ed in particolare la presenza di mutazioni genetiche che determinano l'iperattivazione di Gli1, sono responsabili dello sviluppo di diversi tumori umani. Il medulloblastoma (MB) ed il carcinoma a cellule basali (BCC) sono ad oggi considerati i due principali tumori Hh-dipendenti. Per questa ragione, l'effetto inibitorio del compound **12** è stato convalidato mediante test biologici *in vitro* in

una coltura cellulare tumorale di medulloblastoma (MB) o in una linea cellulare di carcinoma a cellule basali (ASZ001).

Le cellule di MB sono state isolate da un tumore primario spontaneo derivato dal modello murino *Ptch1*^{+/-}, messe in coltura e trattate con il compound **12** [Fig 13]. Le immagini mostrano la capacità di tale molecola di inibire la proliferazione cellulare [Fig 13 A] come diretta conseguenza della capacità di ridurre i livelli di mRNA di *Gli1* [Fig 13B] in maniera dose-dipendente.

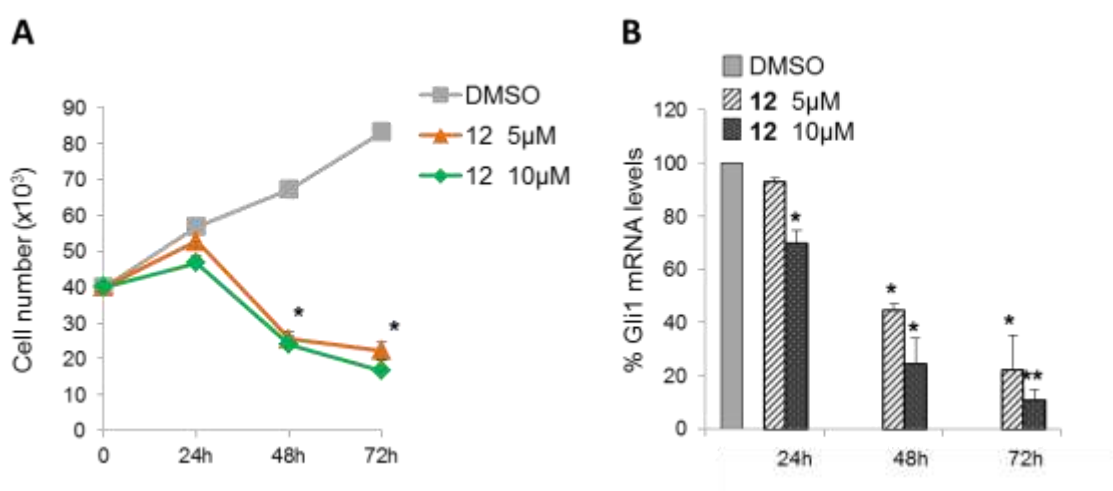


Fig 13: Curva di proliferazione di cellule di MB primario spontaneo derivato da topi *Ptch1*^{+/-} messe in coltura e trattate *in vitro* con differenti concentrazioni di compound **12** o DMSO come controllo. Dopo i tempi indicati è stata effettuata una conta con trypan blue per determinare la crescita cellulare (A). Nel pannello (B) sono mostrati i livelli di espressione di mRNA di *Gli1* in seguito al trattamento con il compound **12**. I livelli di trascritto sono stati valutati mediante PCR real time quantitativa normalizzata su controlli endogeni (*β2-microglobulina* e *HPRT*). I risultati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. *P<0.05 vs DMSO.

Risultati simili sono stati ottenuti in seguito a trattamento con il compound **12** su cellule di carcinoma a cellule basali (BCC) ASZ001, precedentemente caratterizzate come una linea cellulare Hh-dipendente in seguito a delezione del gene *Ptch1* (Aszterbaum et al., 1999). Anche in tale linea infatti il compound **12** è in grado di inibire la crescita cellulare in maniera dose-dipendente [Fig 14A], dato in accordo con la

riduzione significativa dei livelli di mRNA di *Gli1* osservata in seguito al trattamento [Fig 14B].

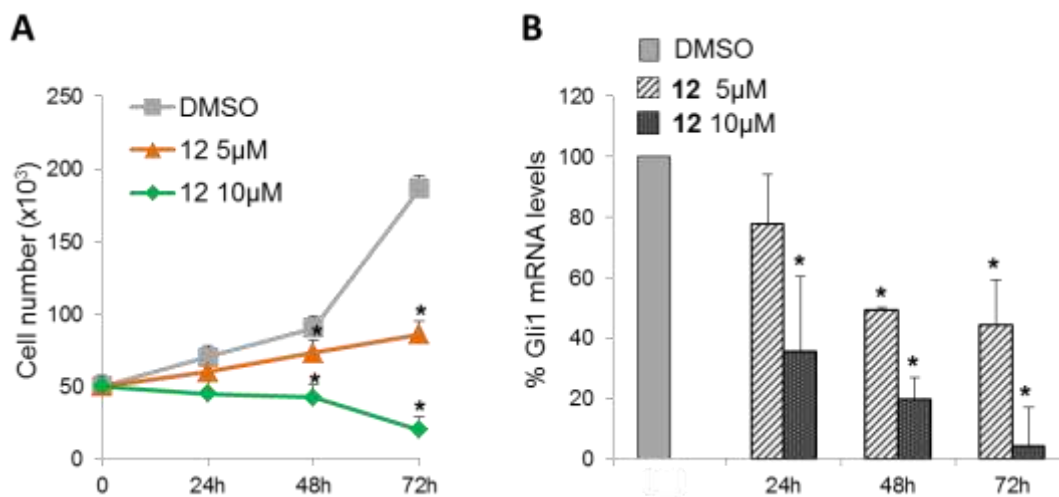


Fig 14: Curva di proliferazione di cellule di carcinoma a cellule basali (BCC), ASZ001, derivato da topi *Ptch1*^{+/-} trattate *in vitro* con differenti concentrazioni di compound **12** o DMSO come controllo. Dopo i tempi indicati è stata effettuata una conta con trypan blue per determinare la crescita cellulare (A). Nel pannello (B) sono mostrati i livelli di espressione di mRNA di *Gli1* in seguito al trattamento con il compound **12**. I livelli di trascritto sono stati valutati mediante PCR real time quantitativa normalizzata su controlli endogeni (*β2-microglobulina* e *HPRT*). I risultati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. *P<0.05 vs DMSO.

La capacità del compound **12** di inibire la proliferazione Hh-dipendente *in vivo* attraverso dei modelli murini di allograft e/o xenograft, è attualmente in corso di studio.

5. Risultati progetto II

5.1 Approccio chimico per l'identificazione di un nuovo e promettente inibitore di Gli1: il Glabrescione B

Diverse evidenze hanno recentemente dimostrato che le cellule tumorali possono acquisire resistenza al trattamento con gli inibitori di Smo attraverso meccanismi in grado di indurre la via del segnale “a valle”, cioè attivando l’effettore finale della pathway Gli1 (Amakye et al., 2013; Aberger and Ruiz i Altaba, 2014; Infante et al., 2015). Per questo motivo lo sviluppo di molecole capaci di agire indipendentemente da Smo o a valle di Smo, cioè bloccando l’attività di Gli1 e superando i fenomeni di resistenza, rappresenta una attraente e promettente alternativa alle terapie antitumorali attuali. Infatti, gli antagonisti di Gli1 costituiscono una valida soluzione sia per pazienti affetti da tumori con mutazioni a carico dei componenti principali della via, sia per quei tumori che mostrano alti livelli di espressione e/o di attività di Gli1 indotti attraverso una via non canonica.

Allo stato dell’arte sono note pochissime molecole capaci di bloccare direttamente Gli1, principalmente a causa della mancanza di informazioni sui meccanismi che regolano Gli1 stesso e la sua capacità trascrizionale. Dunque la delucidazione dei processi alla base dell’attività trascrizionale di Gli1 e il chiarimento delle caratteristiche strutturali che ne mediano il legame al DNA rappresentano un tassello fondamentale per il disegno e lo sviluppo di nuovi farmaci anti-Hh.

5.2 Requisiti strutturali e funzionali alla base dell'interazione Gli1/DNA

Al fine di identificare le basi molecolari che sottendono al legame tra il fattore di trascrizione Gli1 e il DNA, abbiamo disegnato un protocollo di screening computazionale sfruttando la struttura cristallografica di Gli1 in complesso con il DNA (Pavletich and Pabo, 1993). Grazie alla collaborazione con un team di chimici guidati dal Professor Bruno Botta (Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Sapienza Università di Roma), sono stati condotti degli studi di dinamica molecolare (MD). Basandoci sui risultati ottenuti dalla MD, abbiamo condotto degli esperimenti di Alanine-scanning computazionale. Ciò ci ha permesso di individuare i potenziali residui amminoacidici in grado di alterare la stabilità termodinamica del complesso Gli1/DNA. L'energia di legame (ΔG) dei mutanti di Gli1 è stata poi confrontata con quella di Gli1 WT, per ottenere così i valori di $\Delta\Delta G$. In seguito, tale dato è stato validato ripetendo gli esperimenti di MD mutando *in silico* Gli1 nei residui K340, K350, R354 dello zinc finger 4 e nei residui K360, K371, R380 e K381 dello zinc finger 5 [Fig 15].

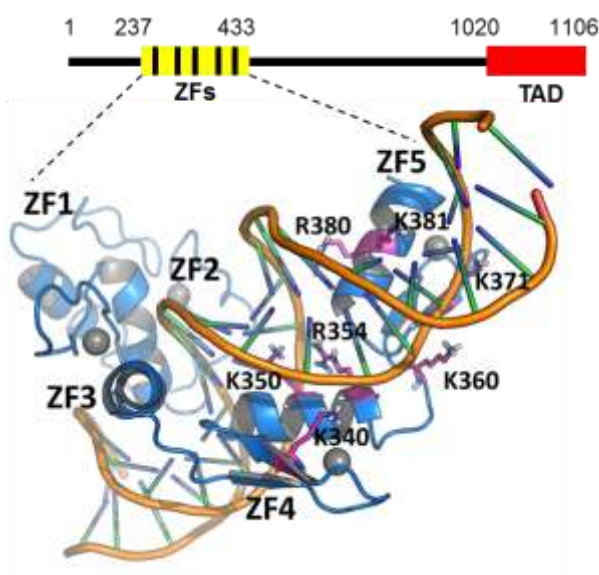


Fig 15: Struttura rappresentativa degli zinc finger di Gli1 estrapolata da esperimenti di dinamica molecolare. Gli zinc finger sono rappresentati in blu, i residui coinvolti nel legame al DNA sono rappresentati in magenta, gli ioni zinco sono rappresentati dalle sfere grigie.

Per correlare le precedenti osservazioni con l'attività trascrizionale di Gli1, abbiamo condotto un saggio funzionale luciferasico. A tale scopo, cellule HEK293T sono state trasfettate con il plasmide d'espressione per Gli1 WT o con i vari mutanti puntiformi sopra elencati, insieme al vettore 12XGliBS–Luc (in cui la sequenza di legame di Gli1 al DNA è posta a monte della luciferasi), e al normalizzatore pRL-TK *Renilla* [Fig 16]. Le mutazioni K350, R354, R380 e K381 abrogano completamente l'attività trascrizionale di Gli1, mentre i mutanti K340, K371 e K360 sono meno efficaci. Tali evidenze suggeriscono che queste mutazioni potrebbero essere coinvolte nel legame con il DNA.

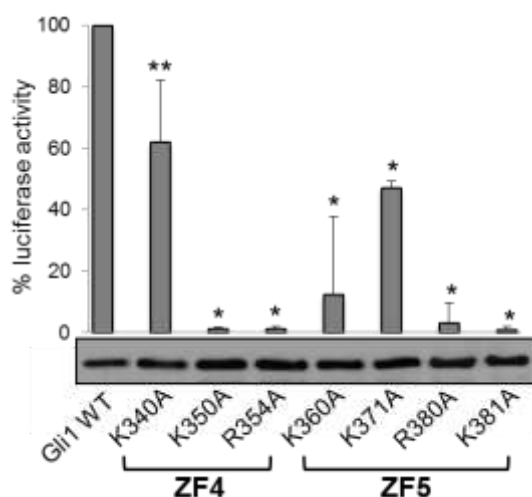


Fig 16: Saggio luciferasico in HEK293T in presenza di Gli1 WT o dei mutanti indicati. I risultati sono stati normalizzati vs i valori di *Renilla* e rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. *P<0.05; **P<0.01 vs Gli1 WT. Nel pannello sottostante sono riportati i livelli di espressione dei plasmidi utilizzati nel saggio di luciferasi.

I nostri studi si sono focalizzati sui mutanti K350A e K340A, che presentano rispettivamente l'energia di legame ($\Delta\Delta G$) più elevata o intermedia.

In particolare abbiamo testato la capacità di tali mutanti di legare il DNA attraverso un saggio di mobilità elettroforetica (EMSA), utilizzando uguali quantità di GST-Gli1-WT, GST-Gli1-K350A e GST-Gli1-K340A, e una probe di DNA contenente una sequenza consenso responsiva a Gli1 o una seconda probe mutata e incapace di legare il fattore di

trascrizione [Fig 17A]. Come mostrato in figura 17B, la proteina ricombinante GST-Gli1-WT è in grado di legare la probe di DNA con alta affinità, al contrario della proteina GST-Gli1-K350A che è totalmente incapace di legare il DNA, e della proteina GST-Gli1-K340A che invece presenta una ridotta affinità di legame. Ciò suggerisce che entrambi i mutanti sono coinvolti con il legame di Gli1 al DNA sebbene con un contributo diverso.

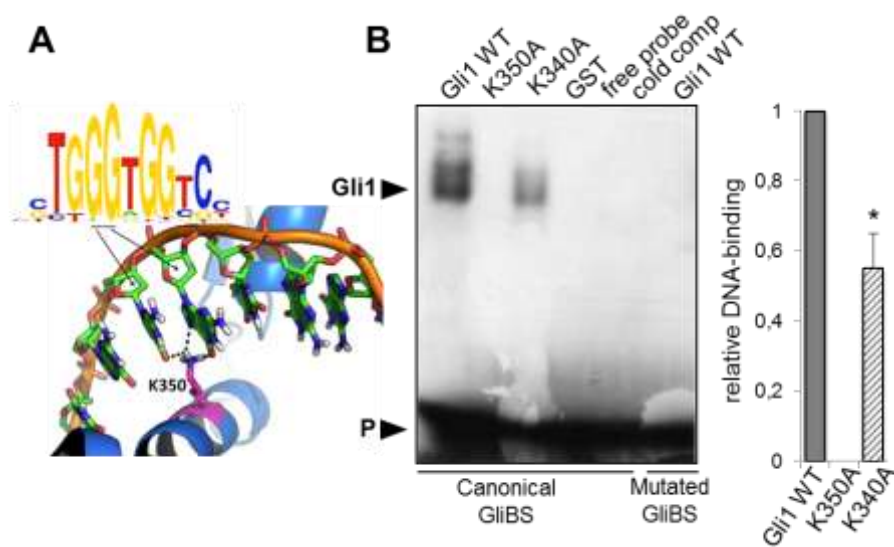


Fig 17: Rappresentazione schematica dell'interazione Gli1/DNA (A). Una sequenza oligonucleotidica contenente il sito di legame per Gli1 (5'-TTGCCTACCTGGGTGGTCTCTCCACTT-3') o una sequenza mutata di controllo (5'-TTGCCTACCTCCCACTTCTCTCCACTT-3') è stata utilizzata come probe (P) negli esperimenti di EMSA. Il saggio è stato condotto utilizzando le proteine ricombinanti GST-Gli1-WT (porzione amminoacidica 242-424), GST-Gli1-K350A oppure GST-Gli1-K340A (B). Il grafico a destra mostra i valori di ratio (derivati da tre esperimenti indipendenti) del legame della proteina GST-Gli1-WT o delle proteine mutanti alla probe marcata/probe non marcata, normalizzati sulle quantità di GST-Gli1-WT legata al DNA. *P<0.05 vs Gli1 WT.

Alla luce di questi risultati, abbiamo testato una libreria di piccole molecole naturali (>800) sulla struttura di Gli1 estrapolata dagli esperimenti di MD. All'interno della libreria, solo sei molecole (Narceine, Acethylvismione B, Chalcone V94, Vismione B, Vismione E e Glabrescione B) sono state selezionate poiché coinvolte nel legame con almeno uno dei residui evidenziati dai test di mutagenesi [Fig 18A]. In seguito, la capacità di questi prodotti naturali di inibire la via di Hh è stata valutata tramite saggio funzionale luciferasico condotto nella linea cellulare di MEFs WT trasfettata con il

vettore di espressione per Gli1 WT, il costrutto 12XGliBS–Luc ed il normalizzatore pRL–TK *Renilla*. Come mostrato in figura 18, tre molecole (Narceine, Acethylvismione B e Chalcone V94) sono inattive [Fig 18B], mentre i compound Vismione B, Vismione E e Glabrescione B presentano una media o alta capacità nel promuovere l’inibizione della via di Hh [Fig 18C]. Tra queste il Glabrescione B (GlaB), un isoflavone estratto dai semi della pianta *Derris Glabrescens*, è il compound più promettente, anche quando confrontato con il noto inibitore di Gli1, GANT61 [Fig 18D].

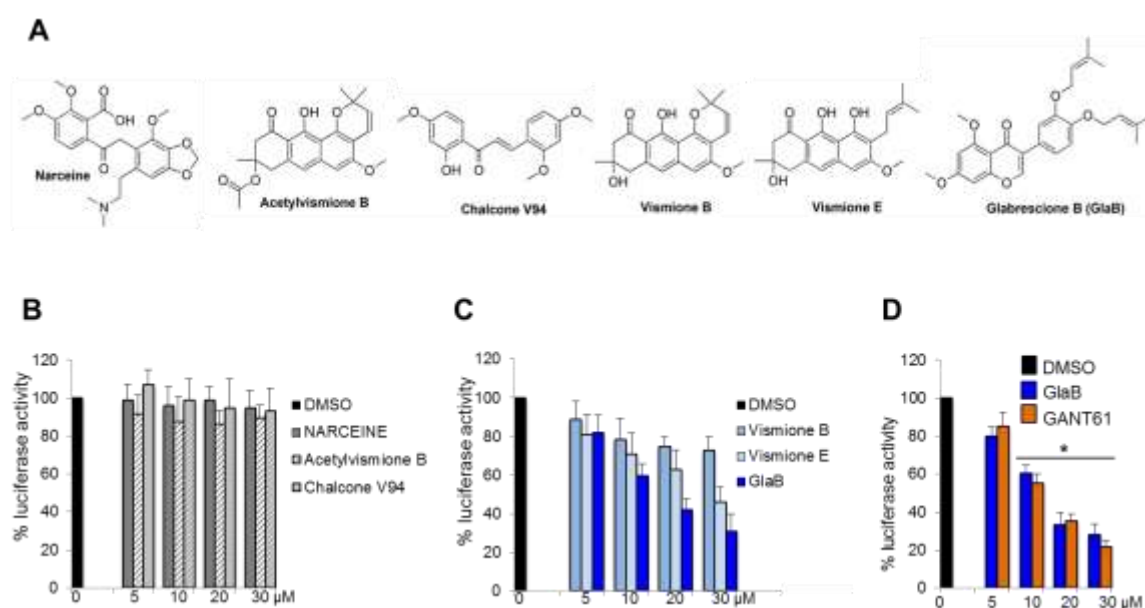


Fig 18: Struttura chimica dei 6 potenziali inibitori di Gli1 individuati dallo screening *in silico* (A). Saggio luciferasico in MEFs WT trasfettate con Flag–Gli1 WT, 12XGliBS–Luc e pRL–TK *Renilla* e trattate per 24h con le molecole indicate (B–C–D). I risultati sono stati normalizzati vs i valori di *Renilla* e rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. *P<0.05 vs DMSO.

Inoltre, tramite saggi di risonanza magnetica nucleare (NMR) abbiamo dimostrato la capacità del GlaB di legare direttamente Gli1 attraverso i residui amminoacidici K340 e K350 implicati nel legame al DNA, sebbene con affinità diverse come evidenziato dai valori di energia di legame (Δ G) mostrati in figura 19. In particolare il GlaB mostra un’alta affinità di legame per la proteina WT, ed un’affinità ridotta o nulla per i mutanti K340A e K350A, rispettivamente.

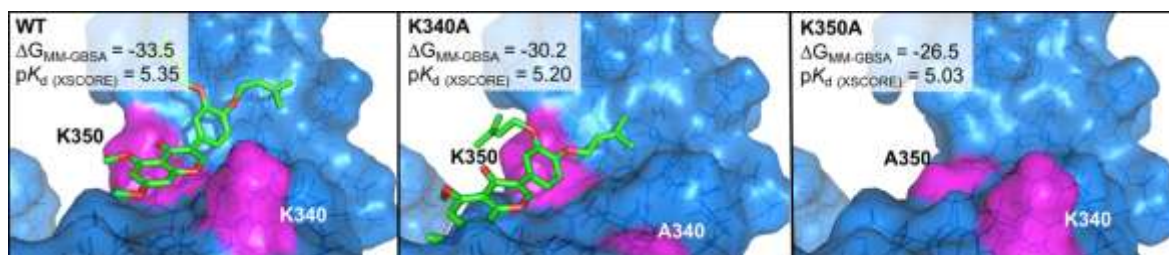


Fig 19: Dettaglio dell'interazione del GliB con Gli1-WT o con i mutanti K340A e K350A. Nei riquadri in alto a sinistra sono riportati i valori di energia di legame (ΔG) e le costanti di dissociazione (pK_d). Gli1 è rappresentato in blu, i mutanti K340A e K350A in magenta e il GliB in verde.

5.3 Il GliB inibisce la via del segnale di Hh interferendo con l'attività trascrizionale di Gli1

Per confermare la capacità del GliB di legare Gli1 ed inibirne l'attività trascrizionale, abbiamo testato il suddetto compound su diverse linee cellulari correlate alla via di Hh.

In prima analisi, per assicurarci che l'effetto inibitorio del GliB sulla via di Hh fosse specificatamente dovuto ad un'alterata funzionalità di Gli1 e che il farmaco non agisse abrogando il pathway mediante il recettore Smo, abbiamo condotto dei saggi luciferasici sulla linea cellulare di MEFs Smo^{-/-}. Tale linea è stata precedentemente trasfettata con un plasmide di espressione per Gli1, un reporter luciferasico responsivo a Gli (12XGliBS-Luc) e il normalizzatore *Renilla*, ed in seguito trattata per 24h con concentrazioni crescenti di GliB. Come mostrato in figura 20A il GliB è in grado di inibire l'attività luciferasica indotta da Gli1 nella suddetta linea cellulare.

Successivamente, abbiamo testato le potenzialità del GliB sulla linea di MEFs Ptch1^{-/-}, che presenta un'aberrante attivazione del signaling a causa della mancanza in omozigosi del gene per recettore inibitorio Ptch1. Abbiamo quindi trattato le cellule per 48h e poi analizzato i livelli di mRNA dei principali geni target di Hh, inserendo come controllo il gene *Pfkfb3* non relato alla pathway di Hh.

Lo stesso esperimento è stato condotto anche sulla linea MEFs SuFu^{-/-} nella quale l'iperattivazione ligando-indipendente della via è dovuta all'assenza del noto oncosoppressore SuFu, e non è inibita dal trattamento con l'antagonista di Smo, ciclopamina (Svard et al., 2006). In entrambi i modelli cellulari, i livelli di mRNA dei target di Hh diminuiscono notevolmente rispetto al controllo non trattato, mentre i valori del gene *Pfkfb3* risultano inalterati [Fig 20B-C].

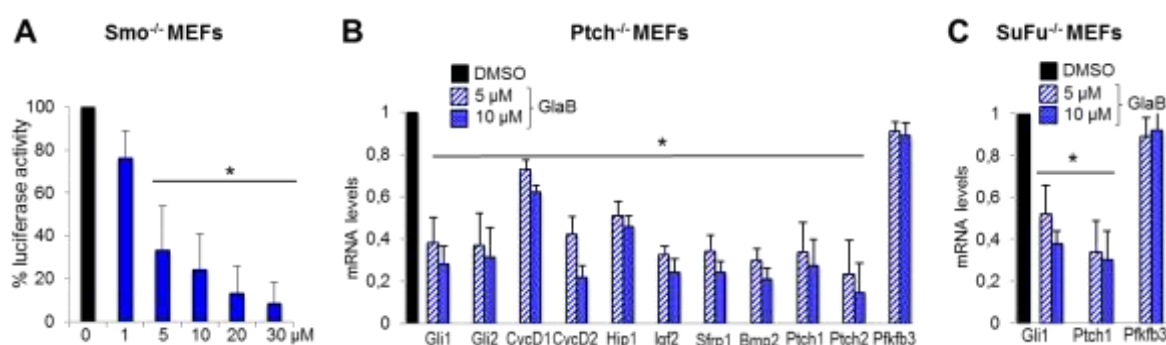


Fig 20: Saggio luciferasico in MEFs Smo^{-/-} trasfettate con Gli1 WT, 12XGliBS-Luc e pRL-TK *Renilla* e trattate per 24h con concentrazioni crescenti di GlaB (A). I risultati sono stati normalizzati vs i valori di *Renilla*. Livelli di espressione di mRNA dei principali target di Hh in MEFs Ptch1^{-/-} (B) e SuFu^{-/-} (C) trattate per 48h con il GlaB o DMSO come controllo. I livelli di trascritto sono stati valutati mediante PCR real time quantitativa normalizzata su controlli endogeni (*β2-microglobulina* e *HPRT*). Il gene *Pfkfb3* è stato utilizzato come controllo negativo. *P<0.05 vs DMSO. I risultati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Ulteriori dati a conferma della forte e specifica azione del GlaB su Gli1 sono mostrati nelle figura 21 e 22.

In particolare, abbiamo condotto un esperimento di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) sulla linea cellulare di MEFs WT trasfettata con il plasmide di espressione di Gli1. In questo esperimento il trattamento con il GlaB alle dosi indicate, riduce significativamente il reclutamento di Gli1 sul promotore del gene *Ptch1*[Fig 21].

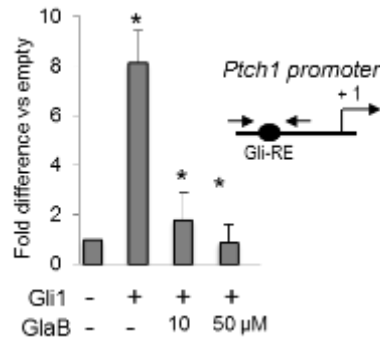


Fig 21: Saggio di immunoprecipitazione della cromatina in MEFs WT trasfettate con il plasmide di espressione per Gli1 WT e trattate con GliB alle concentrazioni indicate. La valutazione del risultato è stata effettuata mediante PCR real time quantitativa utilizzando dei primer per il sito di legame di Gli1 sul promotore del gene murino di *Ptch1*. I risultati sono espressi in fold-change rispetto al controllo (pcDNA3).

Inoltre, data la forte omologia tra i domini zinc finger di Gli1 e Gli2 [Fig 22A], abbiamo voluto testare la capacità del GliB di inibire l'attività trascrizionale indotta da Gli2. A tal fine abbiamo trasfettato la linea MEFs WT con i costrutti necessari per un saggio luciferasico: la sequenza di legame di Gli1 al DNA posta a monte di un reporter luciferasico (GliBS-Luc), il normalizzatore *Renilla*, e i plasmidi d'espressione per Gli1 e Gli2. Come mostrato in figura 22B, tale test mette in evidenza l'efficacia del GliB nell'inibire la capacità trascrizionale dei fattori Gli.

Allo scopo di chiarire al meglio l'effetto diretto del GliB su Gli1, abbiamo trasfettato nella linea cellulare di medulloblastoma umano DAOY, appartenente al sottogruppo Shh (Northcott et al., 2012; Triscott et al., 2013), degli RNA silenzianti (siRNA) specifici per Gli1 o Gli2 (siGli1/2), o siRNA di controllo (siCtr). I risultati di tale esperimento mostrano l'incapacità del GliB di reprimere i livelli di mRNA del gene *Ptch1* in assenza dei fattori Gli ma non nel controllo, indicando che la presenza di tali fattori di trascrizione è fondamentale per l'attività del GliB [Fig 22C].

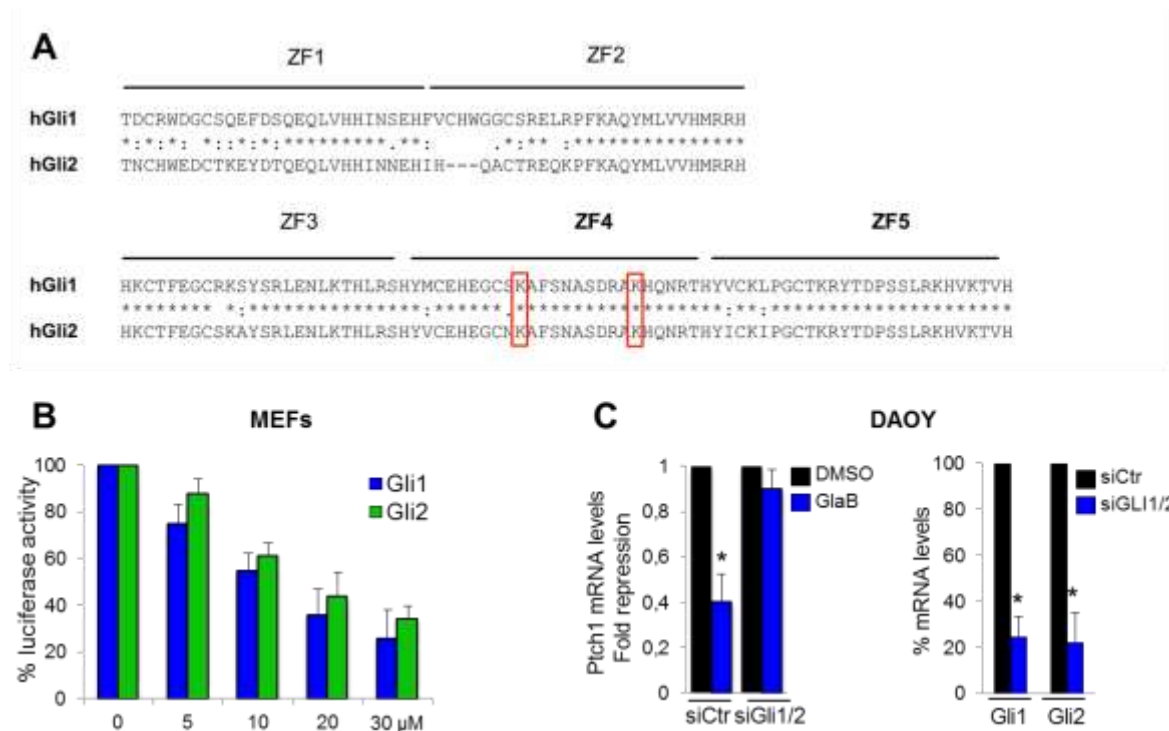


Fig 22: (A) Allineamento degli zinc finger di Gli1 e Gli2. I residui K340 e K350 sono evidenziati in rosso. (B) Saggio luciferasico in MEFs WT trasfettate con Gli1 WT o Gli2 WT, 12XGliBS-Luc e pRL-TK *Renilla* e trattate per 24h con concentrazioni crescenti di GlaB. I risultati sono stati normalizzati vs i valori di *Renilla* e rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. (C) Livelli di espressione del gene *Ptch1* (a sinistra) e livelli di espressione dei geni *Gli1* e *Gli2* (a destra) nella linea cellulare DAOY trasfettata con dei siRNA specifici per Gli1 o Gli2 (siGli1/2) o con siRNA di controllo (siCtrl), e trattate con GlaB (5μM) o DMSO come controllo. I livelli di trascritto sono stati valutati mediante PCR real time quantitativa normalizzata su controlli endogeni (*GAPDH* e *HPRT*). *P<0.05 vs CTR.

Come precedentemente riportato, abbiamo dimostrato mediante saggi di NMR la capacità del GlaB di legare Gli1 WT con alta affinità, mentre i mutanti K340A e K350A mostrano, rispettivamente, un'affinità di legame bassa o nulla rispetto alla proteina WT. Per validare tale risultato e confermare la capacità del GlaB di impedire l'interazione Gli1/DNA, abbiamo condotto un saggio di mobilità elettroforetica (EMSA), utilizzando uguali quantità di GST-Gli1-WT o GST-Gli1-K340, e aggiungendo alla reazione concentrazioni crescenti di GlaB. Come si nota in figura 23A, il GlaB è in grado di inibire fortemente l'interazione tra GST-Gli1-WT e il DNA, mentre il legame tra GST-Gli1-K340 e il DNA in presenza di GlaB è solo parzialmente indebolito. Ciò implica dunque che, sebbene il residuo K340 non svolga una funzione chiave nella regolazione

dell'interazione Gli1/DNA come accade invece per il residuo K350, capace di inibire completamente il suddetto legame, esso rappresenta uno dei residui più importanti in tale processo. Tale dato è stato validato anche mediante un saggio luciferasico in HEK293T, trasfettate con il plasmide di espressione per Gli1 WT o il mutante Gli1 K340A e trattate con il GlaB: in presenza di Gli1 wt il GlaB è in grado di inibirne l'attività trascrizionale, mentre in presenza del mutante K340A il GlaB risulta meno efficace [Fig 23B].

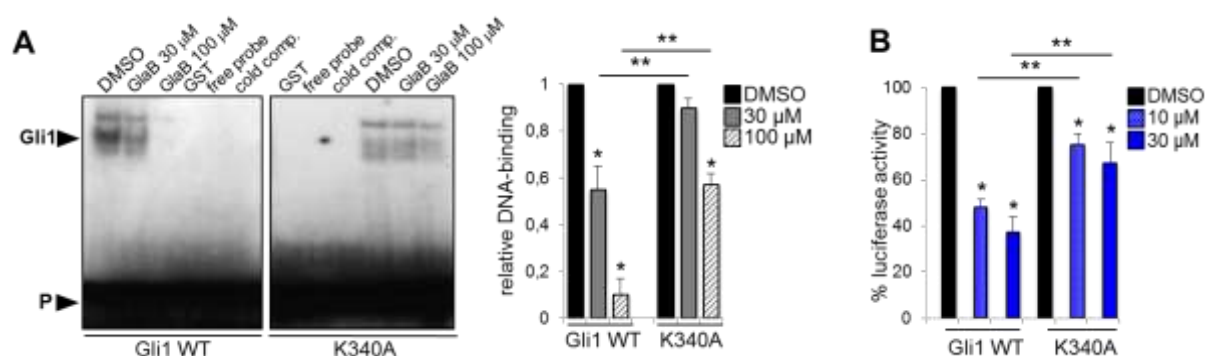


Fig 23: Inibizione dell'interazione Gli1/DNA mediata dal GlaB. (A) Il saggio EMSA è stato condotto utilizzando le proteine ricombinanti GST-Gli1-WT (porzione amminoacidica 242-424) oppure GST-Gli1-K340A in presenza di varie concentrazioni di GlaB o DMSO come controllo. Il grafico a destra mostra i valori di ratio (derivati da tre esperimenti indipendenti) del legame della proteina GST-Gli1-WT o della proteina mutante alla probe marcata/probe non marcata, normalizzati sulle quantità di GST-Gli1-WT legata al DNA in assenza di GlaB. (B) Saggio luciferasico in HEK293T in presenza di Gli1 WT o del mutante K340A, trattate con concentrazioni crescenti di GlaB o con DMSO come controllo. I risultati sono stati normalizzati vs i valori di *Renilla* e rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. *P<0.05 vs DMSO; **P<0.05 K340A vs Gli1 WT.

5.4 Il GlaB inibisce la proliferazione Gli1-dipendente nei GCPs in vitro e in vivo

Per testare *in vivo* la capacità del GlaB di interferire con i processi di crescita guidati dalla via di Hh, abbiamo iniettato sottocute, a livello della zona cervicale, il solvente da solo (2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin:ethanol, 3:1) o con GlaB (100 μmol/Kg), in topi CD1 di 6 giorni di vita post natale. Le cavie sono state sottoposte a 2 giorni di trattamento e poi sacrificate per il prelievo del cervelletto. L'organo espiantato è

stato poi utilizzato per l'estrazione di RNA e per analisi immunoistochimiche. Come è possibile osservare il figura 24A la somministrazione di GlaB è in grado di abbattere i livelli di mRNA dei principali target di Hh. Tali evidenze si traducono, come mostrato nell'analisi immunoistologica, in una significativa riduzione dello spessore dello strato granulare esterno (EGL) [Fig 24B-C], in una diminuzione della quantità di proteina Gli1 e, di conseguenza, in una forte riduzione della proliferazione cellulare, indicato dalla bassa percentuale di cellule positive al noto marcatore della proliferazione Ki67 [Fig 24B].

Risultati simili sono stati ottenuti tramite saggi di proliferazione condotti sui progenitori dei granuli (GCPs) trattati con GlaB a diverse concentrazioni *in vitro* ed *in vivo*.

In particolare, la crescita cellulare dei GCPs è stata valutata mediante test *in vitro* di incorporazione della BrdU. Anche in questo caso il GlaB si è dimostrato altamente efficace nel bloccare la proliferazione cellulare Hh-dipendente [Fig 24D]. In accordo con i dati *in vitro*, GCPs trattati *in vivo* con il GlaB mostrano una significativa riduzione sia dei livelli di trascritto [Fig 24E] che dei livelli proteici [Fig 24F] dei più importanti target di Hh.

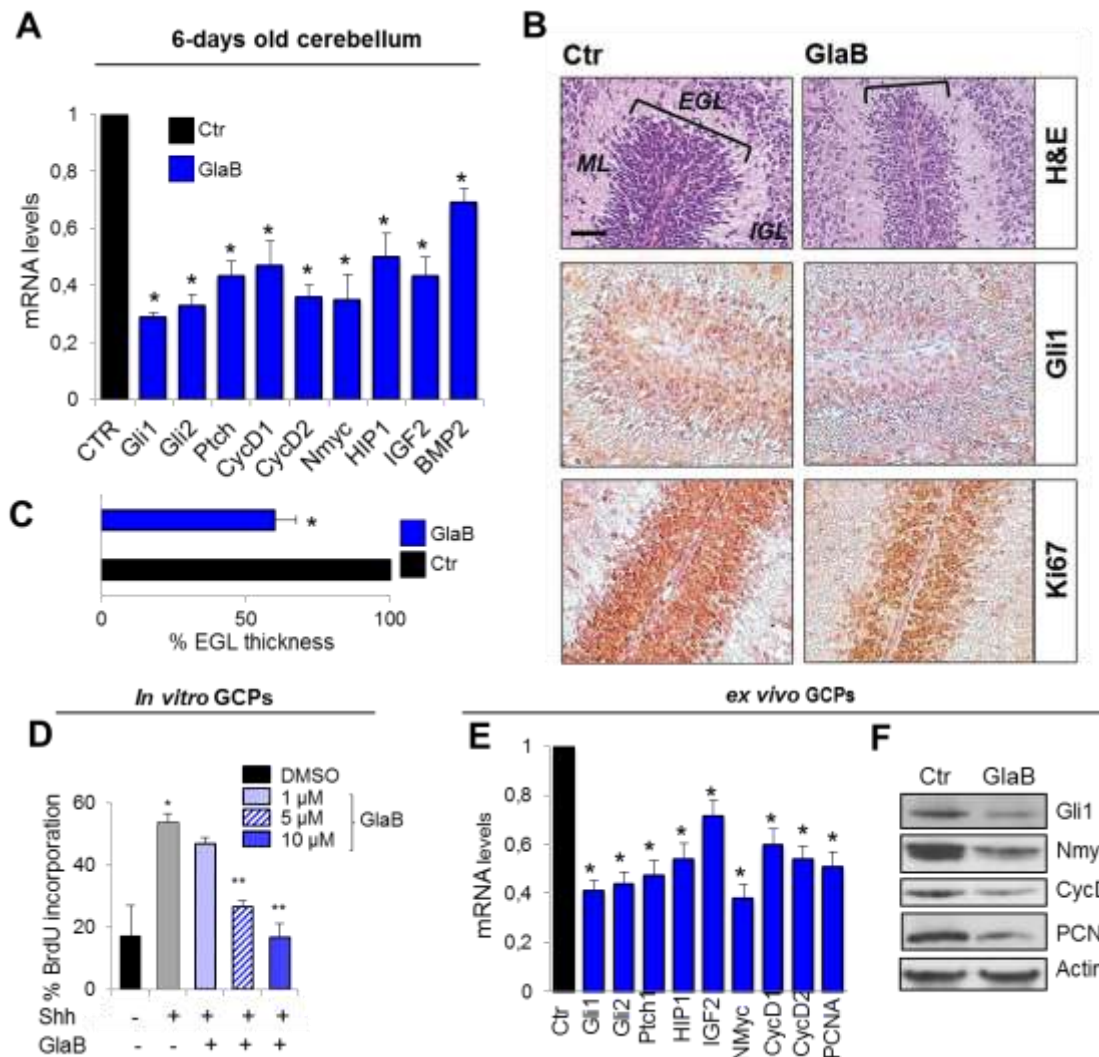


Fig 24: (A) Livelli di espressione di mRNA dei principali target di Hh in cervelletti di topi di 6 giorni di vita post natale trattati *in vivo* con GlaB. (B) In figura sono mostrate delle immagini rappresentative dei saggi di immunoistochimica in topi di 6 giorni di vita post natale. Nel pannello in alto è mostrata la colorazione ematossilina/eosina, nel pannello centrale i livelli di Gli1 e nel pannello in basso i livelli di Ki67 (scale bar = 50µm). (C) Il grafico mostra la riduzione dello spessore dell'EGL (espresso in percentuale) nei topi trattati con GlaB rispetto ai topi non trattati (Ctr) (n= 10/trattamento). (D) Saggio di incorporazione di BrdU in GCPs isolati da topi di 4 giorni di vita post natale trattati *in vitro* con Shh e differenti concentrazioni di GlaB per 48h. L'inibizione della proliferazione cellulare è stata misurata come la percentuale di incorporazione rispetto ai campioni di controllo trattati con DMSO. *P<0.05 Shh vs DMSO; *P<0.05 Shh+GlaB vs Shh. (E-F) Livelli di espressione di mRNA e proteina dei principali target di Hh determinati in GCPs isolati da topi di 6 giorni di vita post natale trattati *in vivo* con GlaB. I livelli di trascritto sono stati valutati mediante PCR real time quantitativa normalizzata su controlli endogeni (β 2-microglobulina e HPRT). *P<0.05 vs CTR. I risultati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

5.5 Il *GlaB* inibisce la proliferazione *Gli1*-dipendente del medulloblastoma e delle Mb-SCs in vitro

L'effetto inibitorio del *GlaB* è stato convalidato mediante test biologici *in vitro* effettuati in due linee cellulari tumorali Hh-dipendenti: MB e cellule staminali derivate da MB.

Le cellule tumorali di MB sono state isolate da un tumore primario spontaneo derivato dal modello murino *Ptch1*^{+/-}, messe in coltura e trattate con *GlaB*, GANT61 o DMSO come controllo. Le immagini mostrano la capacità del *GlaB* di inibire la proliferazione cellulare [Fig 25A] e i livelli di mRNA di *Gli1* [Fig 25B] in maniera dose-dipendente, con risultati simili rispetto a quelli ottenuti con il GANT61.

Diversi tumori, incluso il medulloblastoma, contiene un piccolo sottogruppo di cellule con proprietà molto simili alle cellule staminali e per questo chiamate Mb-SCs like. Questa popolazione cellulare, caratterizzata da una capacità di auto-rinnovamento illimitata, è responsabile della forte espansione cellulare ed è causa della tumorigenesi, della resistenza sviluppata verso le terapie convenzionali e della conseguente recidiva di malattia (Manoranjan et al., 2013). La via di trasduzione di Hh gioca un ruolo chiave nel mantenimento delle Mb-SCs attraverso l'attivazione del gene della staminalità *Nanog* indotta da *Gli1* (Clement et al., 2007; Po et al., 2010; Garg et al., 2013).

Per tali motivi abbiamo trattato con *GlaB* delle Mb-SCs derivate topi *Ptch1*^{+/-}, e ne abbiamo valutato l'effetto attraverso vari saggi biologici *in vitro*.

In prima analisi, abbiamo testato la capacità clonogenica di tali cellule di formare neurosfere a partire da una sospensione a singola cellula. Come mostrato in figura 25C il *GlaB* inibisce fortemente il potenziale clonogenico di tali cellule, diminuendo sia il numero che le dimensioni delle neurosfere. In accordo con i precedenti risultati, l'analisi dei livelli di mRNA e dei livelli proteici dei target di Hh coinvolti nella proliferazione e

nella staminalità nelle Mb-SCs si abbattano significativamente in presenza di GlaB [Fig 25D-E]. L'attività clonogenica di tali cellule è dunque fortemente alterata dal GlaB, il quale agisce interferendo sulla capacità di replicazione cellulare come dimostrato dal saggio di incorporazione di BrdU in figura 25F. Inoltre i risultati del saggio di morte cellulare TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) e la presenza della forma clivata della proteina caspasi-3, verificata tramite western blot [Fig 25G], rivelano il ruolo pro-apoptotico svolto dal GlaB in queste cellule.

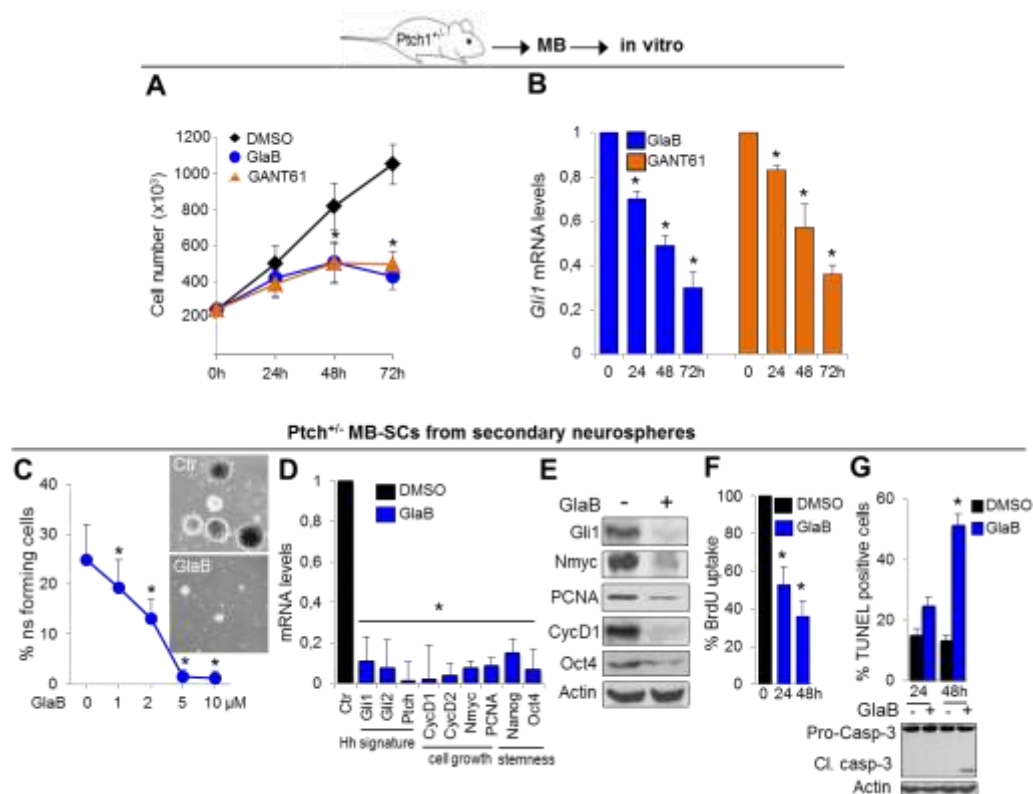


Fig 25: Curva di proliferazione di cellule di MB derivato da topi $Ptch^{+/-}$ messe in coltura e trattate *in vitro* con GlaB (5μM), GANT61 (10μM) o DMSO come controllo (A). Dopo i tempi indicati è stata effettuata una conta con trypan blue per determinare la crescita cellulare. (B) Livelli di espressione di mRNA di Gli1. (C) Saggio clonogenico su cellule staminali derivate da MB di topi $Ptch^{+/-}$ trattate con GlaB (5μM) o DMSO per valutarne le capacità di formare neurosfere. (D-E) Livelli di espressione di mRNA e proteina dei principali target di Hh. I livelli di trascritto sono stati valutati mediante PCR real time quantitativa normalizzata su controlli endogeni ($\beta 2$ -microglobulina e *HPRT*). (F) Saggio di incorporazione di BrdU in MB-SCs trattate *in vitro* con GlaB 5μM per 24 o 48h. L'inibizione della proliferazione cellulare è stata misurata come la percentuale di incorporazione rispetto ai campioni di controllo trattati con DMSO. (G) Saggio TUNEL in MB-SCs trattate *in vitro* con GlaB 5μM per 24 o 48h. La morte cellulare è stata misurata rispetto ai campioni di controllo trattati con DMSO. Nel pannello in basso sono mostrati i livelli proteici di Caspasi 3 nei campioni trattati con GlaB rispetto ai controlli (DMSO). I risultati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti. * $P < 0.05$ vs DMSO.

5.6 Il GlaB inibisce la proliferazione Gli1-dipendente del medulloblastoma in vivo

L'effetto biologico del GlaB *in vivo* è stato testato in un modello allograft di MB. A tal proposito cellule di medulloblastoma primario spontaneo, derivato da topi Ptch1^{+/-}, sono state inoculate nel fianco di topi nudi. Gli animali sono stati trattati a giorni alterni per 18 giorni con delle iniezioni sottocute di GlaB (75 µmol/Kg) o con il solvente di controllo. Durante l'intero periodo di terapia le dimensioni delle masse nei topi trattati e nei topi di controllo sono state monitorate ogni 2 giorni, ed è stata osservata una forte riduzione del volume tumorale nei topi trattati rispetto ai controlli anche in seguito all'espanto [Fig 26A-B].

Le masse estratte sono state quindi sottoposte ad una serie di indagini biologiche.

In particolare, abbiamo valutato le caratteristiche morfologiche dei tumori mediante colorazione immunoistochimica con ematossilina-eosina e colorante blu di Masson, specifico per il tessuto connettivo, che ha rivelato una ridotta cellularità nel campione trattato rispetto al controllo. Ciò è dovuto ad un forte abbattimento della proliferazione e della sopravvivenza cellulare come dimostrato dai bassi livelli di proteina Gli1, dalla bassa incorporazione del marcatore di proliferazione Ki67, e dall'aumentata morte cellulare rivelata dal saggio TUNEL [Fig 26C-D].

Tali risultati sono stati ulteriormente confermati dal significativo abbattimento sia dei livelli di mRNA, sia dei livelli proteici dei principali target di Hh [Fig 26E-F].

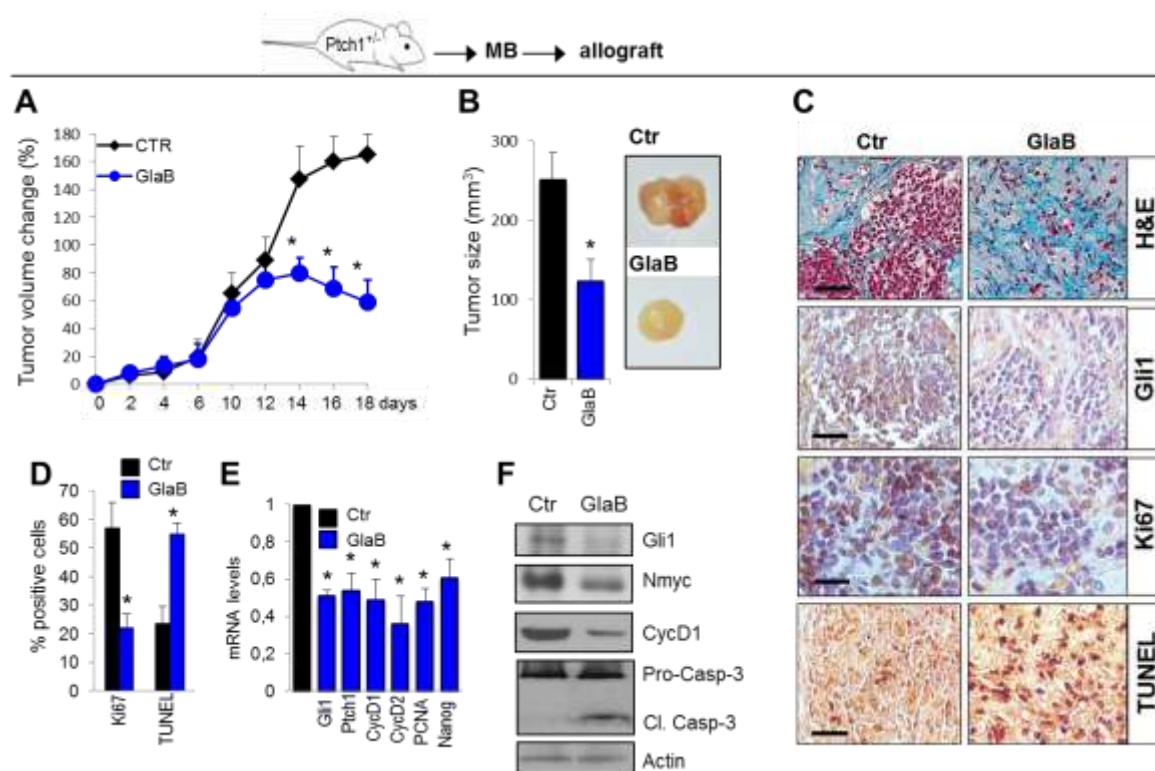


Fig 26: (A) Variazione del volume della massa tumorale durante in trattamento di 18 giorni con GlaB o con il solvente (n= 6/trattamento). (B) Il grafico mostra la media del volume dei tumori (sinistra) rappresentati nelle immagini a destra. (C) Analisi immunohistochimica delle masse tumorali: nel pannello in alto è mostrata la colorazione di Masson (scale bar = 35µM), a seguire i livelli di Gli1 e Ki67 (scale bar = 25µM e 10µM rispettivamente), e nel pannello in basso i livelli di Ki67 (scale bar = 25µM). (D) Quantizzazione della colorazione immunohistochimica per Ki67 o del saggio TUNEL mostrati in (C). (E-F) Livelli di espressione di mRNA e proteina dei principali target di Hh. I livelli di trascritto sono stati valutati mediante PCR real time quantitativa normalizzata su controlli endogeni (*β2-microglobulina* e *HPRT*). *P<0.05 vs Ctr.

Risultati altrettanto sorprendenti sono stati ottenuti in seguito ad esperimenti di xenotraspianti ortotopici su modelli murini NOD/SCID. Nello specifico le cellule di medulloblastoma umano DAOY sono state impiantate a livello del cervelletto delle suddette cavie. In seguito gli animali sono stati trattati con delle iniezioni intraperitoneali di GlaB (75 µmol/Kg) o con il solvente di controllo. Dopo 25 giorni di trattamento gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione *in vivo*, ed i cervelletti sono stati espunti. Il calcolo del volume tumorale ha rivelato una forte riduzione della massa nei topi trattati rispetto ai topi di controllo [Fig 27A-B]. Tale effetto è stato provocato

dall'inibizione della proliferazione cellulare mediata dal GlaB, come dimostrato dalla bassa percentuale di incorporazione del marcatore Ki67 nelle cavie trattate rispetto a quelle di controllo [Fig 27A-C].

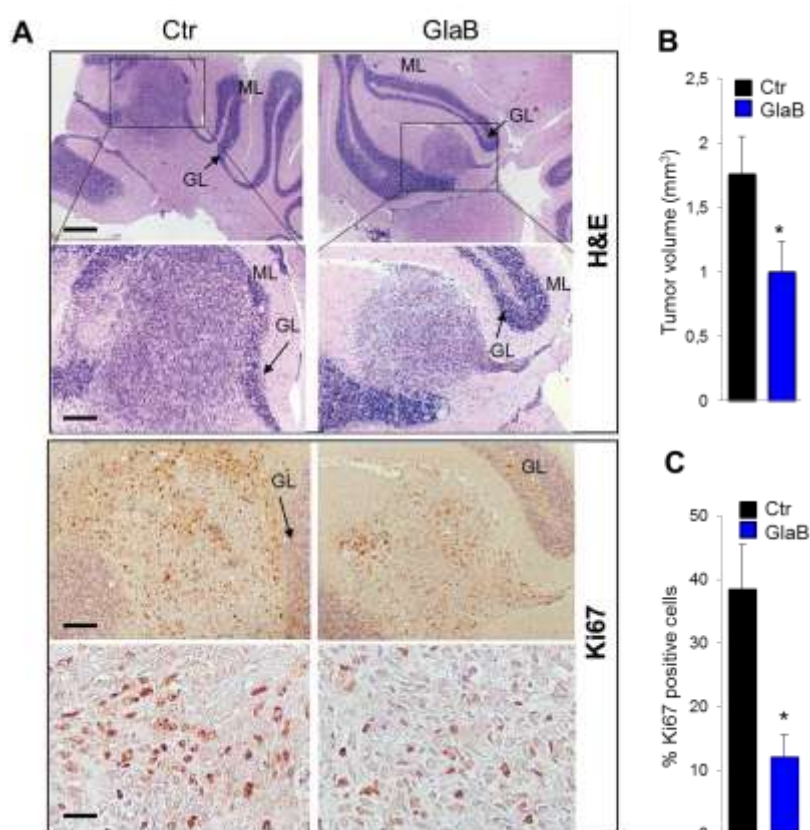


Fig 27: (A) Immagini rappresentative (ingrandimento maggiore e minore) delle colorazioni immunoistochimiche Ematossilina/eosina (scale bar = 500 o 200µm) e Ki67 (scale bar = 100 o 50µm) sulla linea cellulare di MB umano Daoy trapiantate nel cervelletto di topi NOD/SCID e trattate *in vivo* con GlaB o solvente (Ctr). (B) Nel grafico è rappresentata la media del volume delle masse tumorali a fine trattamento. (C) Quantizzazione della colorazione immunoistochimica per Ki67 mostrata in (A). *P<0.05.

5.7 Il GlaB inibisce la proliferazione Gli1-dipendente in cellule di carcinoma a cellule basali *in vitro* ed *in vivo*

Oltre al medulloblastoma, anche il carcinoma a cellule basali (BCC) fa parte dei tumori Hh-dipendenti, nel quale alcune alterazioni genetiche di tale pathway causano un'aberrante attivazione di Gli1.

Per questi motivi abbiamo testato l'effetto biologico del GlaB, *in vitro* ed *in vivo*, sulla linea di BCC, ASZ001, considerate come una linea Hh/Gli1-dipendente perchè caratterizzate dalla delezione del gene di *Ptch1* (Aszterbaum et al., 1999).

Test di mortalità e di proliferazione cellulare *in vitro* dimostrano la capacità del GlaB di bloccare la proliferazione della suddetta linea, e di indurre morte cellulare in maniera dose-dipendente [Fig 28A-B]. Tali evidenze sono confermate dall'abbattimento dei livelli di mRNA di *Gli1* mostrati in figura 28C.

Risultati molto promettenti sono stati ottenuti anche nei test *in vivo*.

L'effetto biologico del GlaB *in vivo* è stato testato trapiantando le cellule di carcinoma a cellule basali, ASZ001, sul fianco di topi nudi. Gli animali sono stati trattati a giorni alterni per 18 giorni con delle iniezioni sottocute di GlaB (75 µmol/Kg) o con il solvente di controllo. Durante l'intero periodo di terapia le dimensioni delle masse nei topi trattati e nei topi di controllo sono state monitorate ogni 2 giorni, ed è stata osservata una forte riduzione del volume tumorale nei topi trattati rispetto ai controlli anche in seguito all'espanto [Fig 28D-E].

Le masse espantate sono state incluse in paraffina per l'indagine istologica. In particolare abbiamo valutato le caratteristiche morfologiche dei tumori mediante colorazione immunoistochimica con ematossilina-eosina e colorante blu di Masson, che ha rivelato una ridotta cellularità nel campione trattato rispetto al controllo. Anche questa linea tumorale, infatti, presenta un forte abbattimento della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, confermata dai bassi livelli di proteina Gli1, dalla bassa incorporazione del marcatore di proliferazione Ki67, dall'aumentata morte cellulare rivelata dal saggio TUNEL e dall'abbattimento dei livelli di mRNA dei principali target di Hh [Fig 28F-G-H].

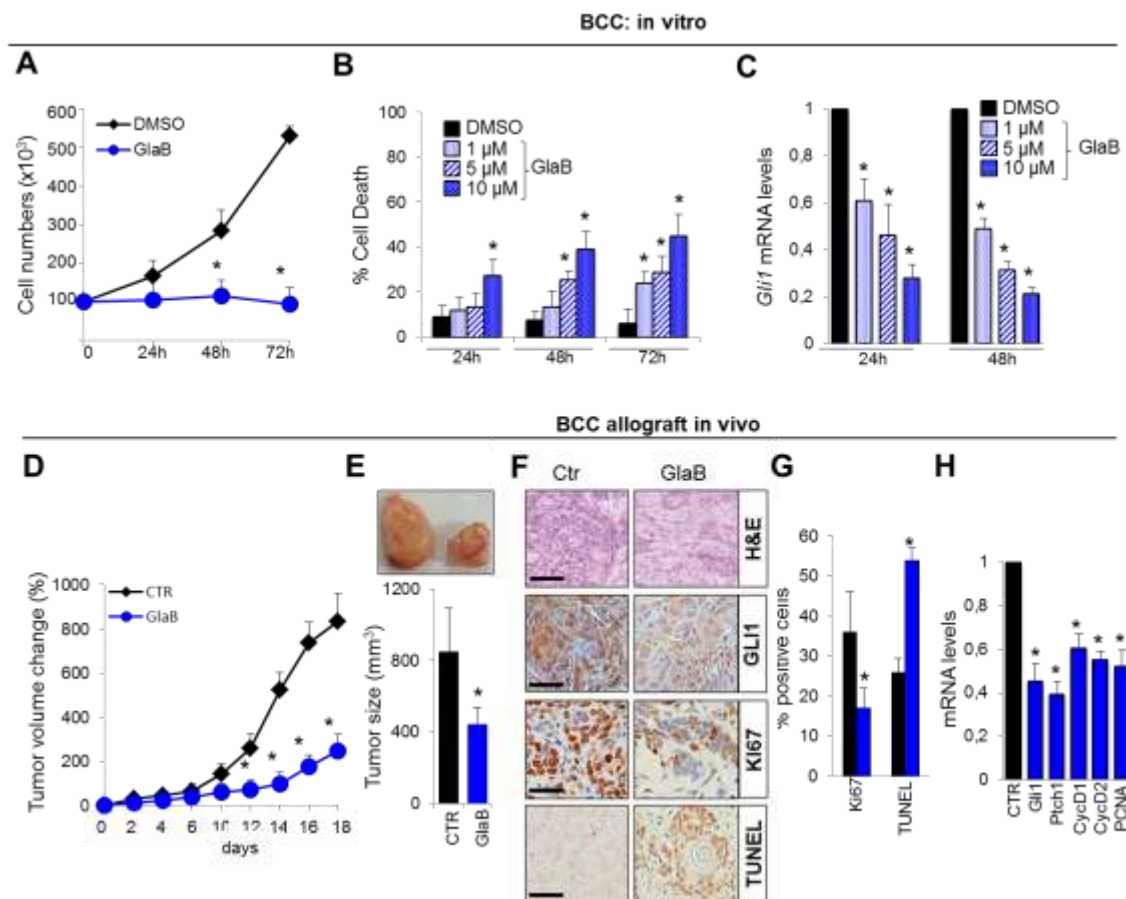


Fig 28: (A-B) Curva di proliferazione e mortalità in cellule di carcinoma a cellule basali (BCC) ASZ001 trattate *in vitro* con GlaB (5 μ M) o DMSO come controllo. (C) Livelli di espressione di mRNA di Gli1 nelle cellule ASZ001 trattate *in vitro* per 24 o 48h con differenti dosi di GlaB. *P<0.05 vs DMSO. (D) Variazione del volume della massa tumorale durante in trattamento *in vivo* di 18 giorni con GlaB o con il solvente (n= 6/trattamento). (E) Il grafico mostra la media del volume dei tumori (sinistra) rappresentati nelle immagini a destra. (F) Analisi immunohistochimica delle masse tumorali: nel pannello in alto è mostrata la colorazione di Masson (scale bar = 50 μ m), a seguire i livelli di Gli1 e Ki67 (scale bar = 25 μ m per entrambe), e nel pannello in basso i livelli di Ki67 (scale bar = 30 μ m). (G) Quantizzazione della colorazione immunohistochimica per Ki67 o del saggio TUNEL mostrati in (F). (H) Livelli di espressione di mRNA dei principali target di Hh. I livelli di trascritto sono stati valutati mediante PCR real time quantitativa normalizzata su controlli endogeni (β 2-microglobulina e HPRT). *P<0.05 vs Ctr.

6. Discussione

6.1 Progetto I

In questo lavoro di tesi, mediante un approccio multidisciplinare tra la chimica farmaceutica e la biologia cellulare e molecolare, abbiamo identificato una nuova molecola naturale, che agendo come inibitore di Smo, blocca la via di trasduzione di Hh: il compound **12** (Chalcone). Inoltre tale progetto sottolinea la rilevanza delle molecole di origine naturale come importante risorsa per l'identificazione di nuovi farmaci anti-tumorali. Infatti, un terzo dei farmaci approvati dalla FDA è di origine naturale, e un quarto tra questi è estratto dalle piante (Patridge et al., 2015). Tuttavia, a partire dall'anno 2000, l'utilizzo delle molecole naturali in farmaceutica ha subito un grave declino poiché le aziende farmaceutiche hanno iniziato a concentrare i propri sforzi sull'individuazione di nuove tecnologie per lo sviluppo di potenziali farmaci anti-tumorali. Nonostante ciò, tali strategie non hanno dato i risultati sperati, contribuendo al ritorno di interesse nell'uso dei prodotti naturali (Harvey et al., 2015). Inoltre, negli ultimi anni, la chimica ha fornito un grande contributo in tal senso, modificando le molecole naturali al fine di migliorarne le caratteristiche chimiche, quali la biodisponibilità, la stabilità chimica e metabolica e la tossicità, per renderli dei potenziali candidati per studi preclinici. Un esempio di ciò è fornito dal derivato della ciclopamina IPI-926 che ha recentemente terminato il trial clinico di fase II (Tremblay et al., 2009).

Il cancro è una delle patologie umane in cui le molecole naturali possono trovare un'applicazione terapeutica. In particolare, la via di trasduzione di Hh rappresenta un importante bersaglio molecolare da parte di nuovi prodotti naturali. Negli ultimi anni, infatti, sono stati condotti moltissimi studi finalizzati all'identificazione di nuovi

potenziali farmaci in grado di inibire questa pathway oncogenica. Il primo inibitore della via di Hh a essere stato scoperto è la ciclopamina, un alcaloide estratto dalla pianta *Veratrum californicum*, in grado di antagonizzare l'effetto tumorigenico di Smo nei tumori Hh-dipendenti (Taipale et al., 2000). In seguito, a partire dalla ciclopamina, sono stati individuati una serie di prodotti naturali in grado di interferire con la trasduzione del segnale di Hh agendo sui principali regolatori della via, il recettore Smo ed il fattore di trascrizione Gli1 (Ruat et al., 2014; Infante et al., 2014; Infante et al., 2015).

Lo sviluppo di potenziali inibitori di Smo si è rivelato deludente a causa della scarsa farmacocinetica, di gravi effetti collaterali e di fenomeni di resistenza farmacologica dovuta all'insorgenza di mutazioni che rendono Smo insensibile all'azione del farmaco.

Con lo scopo di identificare nuovi potenziali inibitori di Smo in grado di superare i limiti appena descritti, abbiamo utilizzato la struttura cristallografica di Smo in complesso con la ciclopamina (Rudin et al., 2009) per condurre uno studio di screening virtuale su una libreria di 1200 prodotti naturali, sintetici e semi-sintetici. Lo screening *in silico* ha consentito di selezionare diciassette molecole sottoposte successivamente a saggi luciferasici per valutarne la capacità di inibire la via di Hh. Tra i composti testati, cinque molecole (**1-5**) si sono dimostrate inattive, le molecole **6-10** si sono rivelate mediamente attive ($IC_{50} \sim 24-38 \mu M$), mentre le molecole **11-12** hanno mostrato un'alta capacità nel promuovere l'inibizione della via di Hh ($IC_{50} \sim 4-9 \mu M$). I compound **13-17** sono invece risultati citotossici. In particolare, il compound **12** (Chalcone) si è rivelato il miglior antagonista di Smo. Questa molecola, appartenente alla famiglia dei calconi e sintetizzata mediante la reazione di Claisen-Schmidt modificata dal Professor Bargellini (Tognazzi, 1924; Bargellini, 1919; Bargellini and Avrutin, 1910), è in grado di legare direttamente Smo, come dimostrato dal saggio di competizione con Bodipy-ciclopamina. Di

particolare interesse è la capacità di tale molecola di legare anche il mutante di Smo D477G, l'ortologo della prima mutazione puntiforme umana identificata che causa farmaco-resistenza al trattamento con Vismodegib, farmaco approvato nel 2012 dalla FDA per la terapia del BCC. Tale evidenza suggerisce la possibilità di impiegare il compound **12** per il trattamento dei tumori resistenti al Vismodegib. L'efficacia biologica di tale compound è stata testata *in vitro* in diversi modelli cellulari Hh-dipendenti, come ad esempio i fibroblasti embrionali murini $Ptch1^{-/-}$ ($Ptch1^{-/-}$ MEFs), nei quali l'iperattivazione della via di Hh è dovuta alla mancanza del recettore Ptch1. In questa linea cellulare, il compound **12** è in grado di inibire l'espressione endogena dei principali target di Hh.

Il potenziale del Chalcone è stato testato anche in un contesto cellulare più fisiologico, rappresentato dai progenitori dei granuli cerebellari (GCPs), la cui proliferazione cellulare durante lo sviluppo del cervelletto è sotto il controllo della via di Hh. In particolare, il compound **12** è in grado di inibire l'espressione dei principali target di Hh in GCPs trattati con SAG, con conseguente diminuzione della crescita cellulare. Inoltre il Chalcone ha mostrato un'alta specificità di azione per la via di Hh, essendo inattivo sia su vie di trasduzione relate (Wnt/ β -catenina), sia su pathway non relate a Hh (Jun/AP1).

Dal momento che l'aberrante attivazione del signaling di Hh è responsabile dello sviluppo di diversi tumori umani, abbiamo voluto dimostrare l'efficacia del compound **12** di inibire la proliferazione cellulare in due tumori Hh-dipendenti, derivati da modelli murini $Ptch1^{+/-}$: il MB e il BCC. In entrambi i casi, il Chalcone, promuovendo inibizione dei livelli di espressione di Gli1 in maniera dose-dipendente, determina il blocco della proliferazione nelle suddette cellule tumorali.

La capacità del compound **12** di inibire la proliferazione Hh-dipendente *in vivo* attraverso l'utilizzo di modelli di allograft e/o xenograft, è attualmente in corso di studio.

Il Chalcone si pone quindi come nuovo e interessante inibitore di Smo, capace di inibire la proliferazione cellulare di tumori primari Hh-dipendenti e di superare il fenomeno della farmaco-resistenza, agendo anche sul mutante murino di Smo D477G.

6.2 Progetto II

In questo progetto abbiamo in prima analisi identificato i requisiti strutturali alla base dell'interazione Gli1/DNA e successivamente utilizzato tali conoscenze per individuare una nuova piccola molecola, il Glabrescione B (GlaB) in grado di inibire la via di Hh, *in vitro* ed *in vivo*, mediante legame diretto con Gli1, effettore finale del signaling di Hh.

In particolare, abbiamo identificato i residui amminoacidici fondamentali per il legame di Gli1 al DNA (come per esempio la K340 e K350) e quindi per la sua attività trascrizionale. Tra i due, il residuo K350 lega specificamente la sequenza consenso di Gli mediante interazioni idrogeno con due basi guanina, senza contattare il gruppo fosfato, come dimostrato dagli esperimenti di docking molecolare (MD). Ciò fornisce così una spiegazione strutturale del ruolo chiave svolto dal residuo K350. Tale modello è supportato da saggi di mobilità elettroforetica (EMSA) e saggi luciferasici condotti in presenza del mutante di Gli1 K350A. Il residuo K340, invece, creerebbe una tasca in corrispondenza dello zinc finger 4 di Gli1, caratterizzato da una superficie piuttosto piatta, consentendo al GlaB di contattare direttamente l'aminoacido K350 e realizzare le interazioni più vantaggiose.

Diversi studi sulla funzione di Gli1 e Gli2 hanno portato alla luce l'esistenza di specifici residui affetti da modificazioni post-traduzionali che occorrono al di fuori del dominio di legame al DNA. La fosforilazione della Serina 84 da parte di mTOR/S6K1 permette il rilascio di Gli1 dal suo inibitore SuFu (Wang et al., 2012), un meccanismo probabilmente

coinvolto nella fosforilazione mediata dalla via di RAS/MAPK (Aberger and Ruiz i Altaba, 2014). Inoltre, i residui Y859, Y872 e S1060 di Gli1 sono legati cooperativamente dalla E3 ligasi Itch (Di Marcotullio et al., 2006a e 2011a), mentre le degrons D_C (residui 462-467) legano β TrCP, determinando l'ubiquitinazione e la degradazione della proteina attraverso la via proteosomale (Huntzicker et al., 2006). Infine, l'acetilazione dei residui K518 (Gli1) e K757 (Gli2) previene l'attività trascrizionale di tali fattori (Canettieri et al., 2010; Coni et al., 2013), mentre il residuo T374 Gli1 è un importante sito di legame per la PKA, la quale è in grado di contrastare la localizzazione nucleare di Gli1 (Sheng et al., 2006). Una volta fosforilati da aPKC ι/λ , i residui S243 e T304, situati rispettivamente nello zinc finger 1 e 3 di Gli1, conferiscono alla proteina una maggiore capacità di formare un complesso con il DNA (Atwood et al., 2013), probabilmente attraverso un cambiamento conformazionale, mediante stabilizzazione del legame o ancora reclutando altri co-fattori.

Tuttavia, non sono stati riportati eventi di acetilazione o ubiquitinazione a carico dei residui K350 e K340, suggerendo che questi residui sono coinvolti nell'interazione con il DNA, e ponendoli come nuovi potenziali bersagli molecolari per l'inibizione di Gli1.

A questo proposito, combinando studi di mutagenesi con la spettroscopia NMR e la dinamica molecolare, abbiamo dimostrato che i residui K340 e K350 sono fortemente coinvolti nel legame tra Gli1 e il GlaB, la prima piccola molecola naturale descritta, in grado di inibire l'attività oncogenica di Hh bloccando l'interazione Gli1/DNA, *in vitro* e *in vivo*, ed interferendo con le funzioni trascrizionali di Gli1 stesso [Fig 29].

La rilevanza biologica dei nostri dati è fornita dalla dimostrazione che l'interazione Gli1/DNA è un ottimo target molecolare per inibire l'iperattivazione di Gli1 indotta non solo da segnali di attivazione a monte della via, mediati cioè da Smo, ma anche da nuovi meccanismi di attivazione a valle (quali la fosforilazione Gli1,

l'amplificazione del gene *Gli1*, l'attivazione epigenetica mediata da BRD4, la deubiquitinazione, deacetilazione o attivazione mediata da aPKC γ /λ, p70S6K o RAS/ERK) che sono responsabili della farmaco-resistenza agli inibitori anti-Smo frequentemente osservata nei tumori Hh-dipendenti (Aberger e Ruiz i Altaba, 2014; Amakye et al., 2013; Tang et al., 2014). Inoltre, meccanismi di attivazione non canonici della via di Hh/Gli1 sono responsabili di modificazioni genetiche e/o epigenetiche che contribuiscono all'induzione di diversi oncogeni comunemente riscontrati in molti tumori (Aberger e Ruiz i Altaba, 2014).

La ridondanza di tali meccanismi di attivazione di Gli1 osservati in diversi tipi di tumori può rappresentare una sfida per la progettazione di terapie personalizzate mirate. Gli inibitori della via di PI3K/AKT sono in grado di superare la resistenza ai farmaci anti-Smo fosforilando Gli1, in maniera S6K1-dipendente, e determinandone l'inattivazione (Buonamici et al., 2010). Allo stesso modo, l'iperattivazione di aPKC γ /λ in BCC, spiega la resistenza ai farmaci anti-Smo che potrebbe essere evitata mediante impiego di specifici inibitori delle chinasi (Atwood et al., 2013). Infine, farmaci antagonisti delle istone-deacetilasi (HDAC) sono efficaci nel bloccare la via di Hh e la crescita cellulare in tumori caratterizzati dall'over espressione di HDAC1/2 (Canettieri et al., 2010).

Quindi, l'inibizione farmaco-mediata dei vari segnali capaci di attivare Gli1 mediante modificazioni post-traslazionali, sembrerebbe richiedere una combinazione di approcci terapeutici.

Al contrario, la delucidazione dei requisiti strutturali alla base dell'interazione Gli1/DNA fornisce informazioni preziose per ottimizzare le strategie farmacologiche mirate all'individuazione di nuovi antagonisti di Gli1, in grado di interferire con il legame al DNA. Ciò rappresenta una strategia terapeutica attraente poiché in grado di agire

direttamente sull'effettore finale e più potente del signaling, Gli1, e di superare gli eventi di farmaco-resistenza che si instaurano a monte della via del segnale.

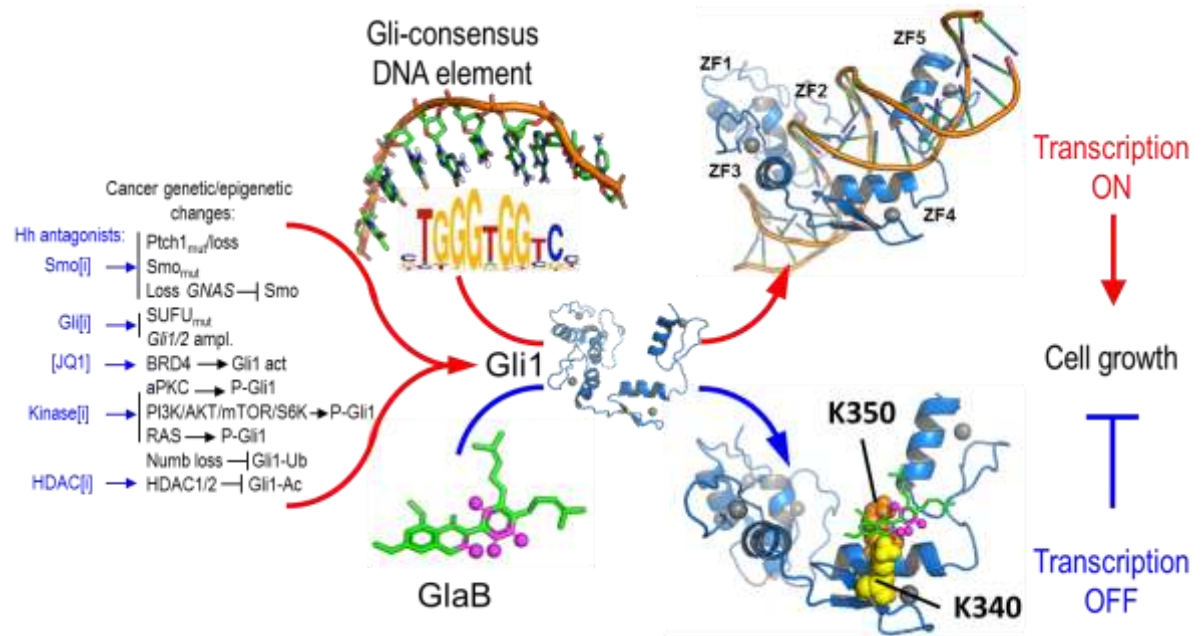


Fig 29: Modello schematico del meccanismo di azione del GlaB sulla via di trasduzione di Hh.

7. Materiali e Metodi

7.1 Colture cellulari

Le linee cellulari HEK293T, NIH3T3 Shh-Light II, MEFs WT, MEFs Ptch1^{-/-}, MEFs Smo^{-/-} e MEFs SuFu^{-/-} sono state coltivate in terreno DMEM con aggiunta di 10% FBS, penicillina e streptomicina, 1% di glutammina. La linea di medulloblastoma umano Daoy è stata coltivata come descritto in Mazzà et al., 2013; le cellule staminali tumorali provenienti da medulloblastoma di topi Ptch1^{+/-} sono state cresciute come descritto in Po et al., 2010. La linea murina di carcinoma a cellule basali ASZ001 è stata coltivata in terreno 154CF (Gibco-BRL) con aggiunta di 2% di FBS chelato con Chelex 100[®] (Sigma Aldrich), 0.05 mM di Cloruro di calcio (Gibco-BRL) e antibiotico. I precursori dei granuli cerebellari GCPs sono stati isolati da topi di 4 giorni di vita post-natale come descritto in Di Marcotullio et al., 2011b. I tumori primari di Medulloblastoma derivano da topi Ptch1^{+/-} (Jackson Laboratory). Da questi è stata preparata una sospensione cellulare coltivata per breve tempo, al fine di analizzare le modulazioni della via di Hh (Sasai et al., 2006; Berman et al., 2002; Kool et al., 2014; Infante et al., 2014).

7.2 Trasfezioni e trattamenti

Le trasfezioni nelle linee cellulari HEK293T e MEFs sono state effettuate utilizzando i reagenti DreamFect[™] Gold (Oz Biosciences SAS), Lipofectamine 2000 o Lipofectamine Plus (Invitrogen). Per gli esperimenti di RNA interference, la linea cellulare di medulloblastoma umano Daoy è stata trasfettata con un non-targeting siRNA come controllo, oppure con un double-stranded siRNAs contro Gli1 e Gli2 (On target-Plus SMARTpool reagents; Dharmacon). Le trasfezioni sono state effettuate con il reagente HiPerFect (Qiagen) secondo le istruzioni della casa produttrice.

Le cellule sono state trattate con Shh (3 µg/ml, R&D Systems Inc), SAG (200 nM, Alexis Biochemicals Farmingdale), GANT61 (Enzo Life Science), Cyclopamine-KAAD (1 µM, Merk Millipore), Bodipy-Cyclopamine (5 nM,, Biovision).

7.3 Mutagenesi

Le mutagenesi a carico del plasmide Flag-Gli1 sono state condotte utilizzando il QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit e il QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) secondo le istruzioni della casa produttrice.

7.4 Livelli di espressione del mRNA

RNA totale è stato estratto con Trizol (Invitrogen) e retrotrascritto con Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). L'analisi dei livelli di mRNA dei geni *Gli1*, *Gli2*, *Ptch1*, *Ptch2*, *Nanog*, *Oct-4*, *Cyclin D1*, *Cyclin D2*, *NMyc*, *HIP1*, *Sfrp1*, *Bmp2*, *IGF2*, *PCNA*, *Pfkfb3*, *β-2 microglobulin*, *HPRT*, *GAPDH*, è stata effettuata tramite PCR real-time quantitativa (qRT-PCR) utilizzando la metodica TaqMan (Assay-on-Demand Reagents acquistati presso Applied Biosystems) e la ABI Prism 7900HT Sequence Detection System. La mix di reazione contenente il template di cDNA, la master mix TaqMan Universal PCR (Applied Biosystems) e una miscela di primers è stata amplificata mediante parametri standard in un termociclatore qRT-PCR. Ogni reazione di amplificazione è stata condotta in triplicato e la media dei tre cicli soglia è stata utilizzata per calcolare la quantità di trascritto presente in ciascun campione mediante il software SDS versione 2.3. La quantizzazione del trascritto è stata espressa come il rapporto della quantità di campione rispetto alla quantità di normalizzatore. Tutti i campioni sono stati normalizzati con tre controlli endogeni, *β-2 microglobulin*, *HPRT*, *GAPDH*, i quali hanno dato risultati simili tra loro.

7.5 Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

La linea cellulare murina MEFs WT è stata trasfettata con il plasmide Gli1-Flag o con pcDNA 3.1. Dopo la reazione di cross-linking, la reazione di immunoprecipitazione è stata effettuata con l'anticorpo mouse anti Flag-M2 (Sigma Aldrich) (1:200). Il DNA è stato eluito ed analizzato mediante qRT-PCR. Gli oligonucleotide utilizzati per la reazione di amplificazione sono: promotore di Ptch1, forward 5'-GAGCATTCCTTAATGGAAG-3', reverse 5'-CTGCAACGCGATTGGCTCT-3'; Controllo GAPDH: forward 5'-GACGGCCGCATCTTCTTGT-3', reverse 5'-CCTGGTGACCAGGCGC-3' (Canettieri et al., 2010; Coni et al., 2013).

7.6 Saggio di mobilità elettroforetica (EMSA)

Abbiamo prodotto degli oligonucleotidi corrispondenti alla sequenza canonica di legame di Gli1 (Gli-BS, 5' -TTGCCTACCTGGGTGGTCTCTCCACTT- 3') o la sua forma mutata, incapace di legare Gli1 (5' -TTGCCTACCTCCCACCTTCTCTCCACTT - 3'). I frammenti sono stati marcati con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP utilizzando la T4 polynucleotide kinase secondo le istruzioni della casa produttrice, purificate attraverso colonne G25 (Amersham Pharmacia), ed utilizzate come probe per il saggio di mobilità elettroforetica (EMSA). Le proteine di fusione Glutathione S-transferase (GST), GST, GST-Gli1ZF-WT (frammento dello zinc-finger di Gli1: aa 242-424), GST-Gli1ZF-K340A o GST-Gli1ZF-K350A, sono stati prodotti come descritto in De Smaele et al., 2008. La reazione di legame tra le diverse proteine GST e gli oligonucleotidi marcati, è avvenuta a temperatura ambiente per 20 minuti utilizzando 4 μg della proteina di fusione GST e 20,000 c.p.m. di probe marcata con ^{32}P , in 20 μl totali. La concentrazione finale dei componenti del buffer di reazione impiegato per l'EMSA sono: 50mM HEPES (pH 7.5), 100mM KCl, 5mM DTT, 1mM

EDTA, 20% glicerolo 0,05% NP40, 0,2µg/µl BSA, 5 mM MgCl₂ e 50 µg/ml poly(dI)-poly(dC). Un punto sperimentale di controllo è stato allestito usando un eccesso di oligonucleotidi non marcati (50X). I complessi sono stati risolti su un gel non denaturante 5%, essiccati, ed esposti per autoradiografia. Le bande ottenute sono state quantizzate attraverso densitometria con PhosphorImager (Molecular Dynamics), sfruttando il software IMAGE QUANT per valutare la ratio di probe legata a GliZF vs la probe non legata.

7.7 Luciferasi, proliferazione cellulare e saggio clonogenico su MB-SCs

Il saggio di luciferasi è stato effettuato sulla linea cellulare murina NIH3T3 Shh-Light II trattate con l'agonista SAG, oppure sulle linee HEK293T o MEFs trasfettate con il reporter luciferasico GliBS-Luc, pRL-TK Renilla (normalizzatore) e altri plasmidi, come indicato. I valori di luciferasi e renilla sono stati ottenuti tramite il kit dual-luciferase assay system (Biotium Inc). I risultati sono stati espressi come il rapporto tra i valori di luciferasi e i valori di renilla, e rappresentano la media di 3 esperimenti, ciascuno condotto in triplicato.

La proliferazione cellulare è stata valutata mediante saggio di incorporazione di BrdU (Roche). In breve, dopo l'incorporazione di BrdU, le cellule sono state fissate con paraformaldeide 4% e permeabilizzate con Triton X-100 0.2%; l'incorporazione di BrdU è stata eseguita secondo le istruzioni della casa produttrice. I nuclei sono stati controcolorati mediante il reagente Hoechst. Infine sono stati contati 500 nuclei per punto sperimentale, e tra questi sono stati contati i nuclei positivi per la BrdU (ogni esperimento è stato condotto in triplicato).

La crescita cellulare è stata inoltre valutata attraverso una conta cellulare con trypan Blue, in seguito al trattamento per 24, 48 e 72 ore con il compound in esame.

Per il saggio clonogenico, le cellule sono state piastrate a densità clonale (1–2 cellule/mm²) in una piastra da 96 pozzetti, e coltivata in un terreno di selezione descritto in Po et al., 2010.

7.8 Bodipy-Cyclopamine

Le cellule HEK293T sono state trasfettate con i plasmidi codificanti per Smo-WT Flag o il mutante Smo-D477G Flag. In seguito le cellule sono state lavate con PBS 1X con aggiunta di FBS 0.5%, fissate in paraformaldeide 4% per 10 minuti, incubate per 2h a 37°C con Bodipy-cyclopamine (5 nM) e la molecola in esame, e infine permeabilizzate con Triton x-100 0.2%. I nuclei sono stati contro-colorati mediante il reagente Hoechst. I risultati sono stati espressi in % di incorporazione di Bodipy+molecola rispetto alla bodipy da sola (Manetti et al., 2010).

7.9 Western Blot

Le cellule sono state lisate in un buffer di radioimmunoprecipitazione standard con aggiunta di inibitori delle proteasi (Roche). Il lisato è stato risolto tramite SDS-PAGE. Gli anticorpi Mouse anti-Gli1 e rabbit anti-Caspase3 sono stati acquistati dalla ditta Cell Signaling; gli anticorpi anti-rabbit PCNA e anti-rabbit Oct-4 sono stati acquistati dalla ditta Abcam; l'anticorpo anti-Flag-HRP è stato acquistato dalla ditta Sigma Aldrich; gli anticorpi mouse anti-NMyc, rabbit anti-Cyclin D1, goat anti-Actin e gli anticorpi secondari coniugati con HRP sono stati acquistati dalla ditta Santa Cruz Biotechnology. Tutti gli anticorpi sono stati utilizzati a concentrazioni diverse e rivelati tramite chemiluminescenza (ECL, Amersham Pharmacia).

7.10 Immunoistochimica e saggio TUNEL

Per I saggi di immunoistochimica, i campioni sono stati fissati con formalina 4% e inclusi in paraffina. Le sezioni sono state incubate con gli anticorpi rabbit polyclonal-Gli1 H300 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology), rabbit monoclonal-Ki67 (1:100) (Thermo Fisher Scientific) o mouse monoclonal-Ki67 (1:200) (Leica Microsystems) diluiti in PBS. La rivelazione è stata effettuata tramite il kit “Mouse-to-Mouse HRP (DAB) staining system” (ScyTek Laboratories) secondo le istruzioni della casa produttrice. La morte cellulare su sezioni incluse in paraffina è stata effettuata tramite il kit “in situ cell death detection kit, POD” (Roche), mentre la morte cellulare su cellule Ptch1^{+/-} MB-SCs è stata valutata tramite il kit “in situ cell death detection kit, TMR red” (Roche). Entrambi i kit sono stati usati secondo le istruzioni della ditta produttrice.

7.11 Iniezioni sottocutanee su modelli murini CD1 (P6)

Topi CD1 di 6 giorni di vita post natale sono stati divisi in maniera casuale in due gruppi (n = 6) e trattati s.c. con il solvente da solo (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin:ethanol, 3:1) o GlaB (100 μ mol/Kg) per 2 giorni (le 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin sono state acquistate dalla ditta Sigma Aldrich). I cervelletti sono stati prelevati, e i livelli di mRNA valutati mediante qRT-PCR. Inoltre sono state prodotte delle sezioni istologiche e le dimensioni del campione sono state calcolate con il software Image Pro Plus 6.2.

7.12 Allotrapianti

Medulloblastoma spontanei derivanti da topi Ptch1^{+/-} sono stati isolati e disgregati al fine di ottenere una sospensione a singola cellula. Uno stesso volume della sospensione cellulare (2×10^6) è stato iniettato s.c. nel fianco posteriore di topi nudi femmine

BALB/c (nu/nu) (Charles River Laboratories). Il tumore è cresciuto fino ad una dimensione media di 100 mm³. Gli animali sono stati divisi casualmente in due gruppi (n = 6) e trattati con solvente (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin:ethanol, 3:1) o GlaB (75 μ mol/Kg) per 18 giorni.

Un volume (2×10^6) di cellule di carcinoma a cellule basali (BCC) ASZ001 è stata risospesa in un egual volume di terreno di coltura 154CF e Matrigel (BD Biosciences), ed iniettate s.c. nel fianco posteriore di topi nudi femmine BALB/c (nu/nu) (Charles River Laboratories), come precedentemente descritto (Eberl et al., 2012). Il tumore è cresciuto fino ad una dimensione media di 200 mm³. Gli animali sono stati divisi casualmente in due gruppi (n = 6) e trattati con solvente (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin:ethanol, 3:1) o GlaB (100 μ mol/Kg) per 18 giorni. La crescita tumorale è stata monitorata mediante misurazioni effettuate con il caliper. Variazione nel volume del tumore sono state calcolate secondo la formula: lunghezza x larghezza x 0,5 X (lunghezza + larghezza) (Lauth et al., 2007).

Tutti gli esperimenti condotti su cavie hanno ricevuto l'approvazione del comitato etico preposto.

7.13 Xenotrapianto ortotopico

Topi adulti femmine NOD/SCID (Charles River Laboratories) sono stati anestetizzati mediante iniezione i.p. con un mix ketamina (10 mg/kg) e xylazina (100 mg/kg). La regione posteriore del cranio è stata rasata, e posizionata in uno strumento per stereotassi cerebrale. La linea cellulare di medulloblastoma umano Daoy è stata impiantata nel cervelletto ($0.2 \times 10^6/3 \mu$ l) alla velocità di infusione di 1 μ l/min utilizzando le seguenti coordinate estrapolate dall'atlante di Franklin and Paxinos: 6.6 mm posteriori al bregma; 1 mm laterali rispetto alla linea centrale; and 2 mm ventrali rispetto al cranio. Dopo

l'iniezione, la cannula è stata lasciata *in loco* per 5 min per permettere la stabilizzazione della pressione intracranica. La ferita è stata suturata mediante dei punti metallici. 10 giorni dopo l'impianto del tumore, gli animali sono stati divisi casualmente in due gruppi ($n = 6$) e trattati mediante iniezioni i.p. con il solvente (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin:ethanol, 3:1) o con GlaB (75 $\mu\text{mol/Kg}$) a giorni alterni. Dopo 25 giorni di trattamento gli animali sono stati sacrificati, perfusi in vivo. Cervello e cervelletto sono stati fissati in paraformaldeide 4% in un buffer fosfato 0.1M (pH 7.2) ed inclusi in paraffina. Per il calcolo del volume cerebrale sono state prodotte delle fettine coronali (2 μm) a partire dal mesencefalo fino alla fine del cervelletto. L'analisi è stata condotta su 40 sezioni di 2 μm ottenute ogni 40 μm dal piano orizzontale del cervelletto, in cui il cervelletto è stato visualizzato ad un ingrandimento 2.5X. Su una sezione ogni 40 μm è stata effettuata una colorazione con H&E. L'area tumorale di ogni sezione è stata valutata con il microscopio Axio Imager M1 microscope (Leica Microsystems GmbH) provvisto del software Image Pro Plus 6.2. La seguente formula è stata utilizzata per il calcolo del volume tumorale: Volume = somma dell'area misurata per ogni sezione X spessore della sezione X frequenza di campionamento.

Tutti gli esperimenti condotti su cavie hanno ricevuto l'approvazione del comitato etico preposto.

7.14 Analisi statistica.

I risultati sono espressi come +/- la deviazione standard (DS) a partire da un numero appropriato di esperimenti. Le differenze statistiche sono state analizzate con il test Mann-Whitney U per valori non parametrici con il software StatView 4.1 (Abacus Concepts). Valori con un $P < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

8. Bibliografia

1. Aberger F, Ruiz I, Altaba A (2014). Context-dependent signal integration by the GLI code: the oncogenic load, pathways, modifiers and implications for cancer therapy. *Semin Cell Dev Biol.* **33**:93-104.
2. Amakye D, Jagani Z, Dorsch M (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Med* **19**:1410-1422.

3. Aszterbaum M, Epstein J, Oro A, Douglas V, LeBoit PE, Scott MP, Epstein EH Jr (1999). Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nat Med* **5**:1285-1291.
4. Atwood SX, Li M, Lee A, Tang JY, Oro AE (2013) GLI activation by atypical protein kinase C α regulates the growth of basal cell carcinomas. *Nature* **494**:484-488.
5. Atwood SX, Sarin KY, Li JR, Yao CY, Urman NM, Chang AL, Tang JY, Oro AE (2015). Rolling the Genetic Dice: Neutral and Deleterious Smoothened Mutations in Drug-Resistant Basal Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol* **135**(8):2138-2141.
6. Atwood SX, Sarin KY, Whitson RJ, Li JR, Kim G, Rezaee M, Ally MS, Kim J, Yao C, Chang AL, Oro AE, Tang JY (2015). Smoothened variants explain the majority of drug resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell* **27**(3):342-353.
7. Bargellini G, Avrutin G (1910). Sopra alcuni derivati dell'ossidrochinone. *Gazz. Chim. Ital.* **40**:342-347.
8. Bargellini G (1919). Contributo alla conoscenza della costituzione della Scutellareina. *Gazz. Chim. Ital.* **49**:47-63.
9. Bassilana F, Carlson A, DaSilva JA, Grosshans B, Vidal S, Beck V, Wilmeringwetter B, Llamas LA, Showalter TB, Rigollier P, Bourret A, Ramamurthy A, Wu X, Harbinski F, Plonsky S, Lee L, Ruffner H, Grandi P, Schirle M, Jenkins J, Sailer AW, Bouwmeester T, Porter JA, Myer V, Finan PM, Tallarico JA, Kelleher JF 3rd, Seuwen K, Jain RK, Luchansky SJ (2014). Target identification for a Hedgehog pathway inhibitor reveals the receptor GPR39. *Nat Chem Biol* **10**(5):343-349.
10. Belgacem YH and Borodinsky LN (2011). Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**:4482-4487.
11. Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA (2002). Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* **297**:1559-1561.
12. Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, Hsiao K, Yuan J, Green J, Ospina B, Yu Q, Ostrom L, Fordjour P, Anderson DL, Monahan JE, Kelleher JF, Peukert S, Pan S, Wu X, Maira SM, García-Echeverría C, Briggs KJ, Watkins DN, Yao YM, Lengauer C, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M (2010) Interfering with resistance to smoothened antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med* **2**:51-70.
13. Canettieri G, Di Marcotullio L, Greco A, Coni S, Antonucci L, Infante P, Pietrosanti L, De Smaele E, Ferretti E, Miele E, Pelloni M, De Simone G, Pedone EM, Gallinari P, Giorgi A, Steinkühler C, Vitagliano L, Pedone C, Schinin ME, Screpanti I, Gulino A (2010). Histone deacetylase and Cullin3-REN(KCTD11) ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation. *Nat Cell Biol* **12**(2):132-142.

14. Chen JK, Taipale J, Cooper MK and Beachy PA (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & Development* **16**:2743-2748.
15. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A (2007). HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell selfrenewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* **17**:165-172.
16. Coni S, Antonucci L, D'Amico D, Di Magno L, Infante P, De Smaele E, Giannini G, Di Marcotullio L, Screpanti I, Gulino A, Canettieri G (2013). Gli2 acetylation at lysine 757 regulates hedgehog-dependent transcriptional output by preventing its promoter occupancy. *PLoS One* **8**(6):e65718.
17. De Smaele E, Fragomeli C, Ferretti E, Pelloni M, Po A, Canettieri G, Coni S, Di Marcotullio L, Greco A, Moretti M, Di Rocco C, Pazzaglia S, Maroder M, Screpanti I, Giannini G, Gulino A (2008). An integrated approach identifies Nhlh1 and Insm1 as Sonic Hedgehog-regulated genes in developing cerebellum and medulloblastoma. *Neoplasia* **10**(1):89-98.
18. De Smaele E, Ferretti E, Gulino A (2010). Vismodegib, a small-molecule inhibitor of the hedgehog pathway for the treatment of advanced cancers. *Curr Opin Invesig Drugs* **11**(6):707-718.
19. Dijkgraaf GJ, Alicke B, Weinmann L, Januario T, West K, Modrusan Z, Burdick D, Goldsmith R, Robarge K, Sutherlin D, Scales SJ, Gould SE, Yauch RL, de Sauvage FJ (2011). Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothened mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer Res* **71**(2):435-444.
20. Di Magno L, Coni S, Di Marcotullio L, Canettieri G (2015). Digging a hole under Hedgehog: downstream inhibition as an emerging anticancer strategy. *Biochim Biophys Acta* **1856**(1):62-72.
21. Di Marcotullio L, Ferretti E, Greco A, De Smaele E, Po A, Sico MA, Alimandi M, Giannini G, Maroder M, Screpanti I, Gulino A (2006a). Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nat Cell Biol* **8**(12):1415-1423.
22. Di Marcotullio L, Ferretti E, De Smaele E, Screpanti I, Gulino A (2006b). Suppressors of hedgehog signaling: Linking aberrant development of neural progenitors and tumorigenesis. *Mol Neurobiol* **34**(3):193-204.
23. Di Marcotullio L, Greco A, Mazzà D, Canettieri G, Pietrosanti L, Infante P, Coni S, Moretti M, De Smaele E, Ferretti E, Screpanti I, Gulino A (2011a). Numb activates the E3 ligase Itch to control Gli1 function through a novel degradation signal. *Oncogene* **30**(1):65-76.
24. Di Marcotullio L, Canettieri G, Infante P, Greco A, Gulino A (2011b). Protected from the inside: endogenous histone deacetylase inhibitors and the road to cancer. *Biochim Biophys Acta* **1815**(2):241-252.
25. Dlugosz A, Agrawal S, Kirkpatrick P (2012). Vismodegib. *Nat Rev Drug Discov* **11**(6):437-438.

26. Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Loipetzberger A, Damhofer H, Zoidl K, Schnidar H, Hache H, Bauer HC, Solca F, Hauser-Kronberger C, Ermilov AN, Verhaegen ME, Bichakjian CK, Dlugosz AA, Nietfeld W, Sibilio M, Lehrach H, Wierling C, Aberger F (2012). Hedgehog-EGFR cooperation response genes determine the oncogenic phenotype of basal cell carcinoma and tumour-initiating pancreatic cancer cells. *EMBO Mol Med* **4**(3):218-233.
27. Garg N, Po A, Miele E, Campese A, Begalli F, Silvano M, Infante P, Capalbo C, De Smaele E, Canettieri G, Di Marcotullio L, Screpanti I, Ferretti E, Gulino A (2013). microRNA-17-92 cluster is a direct Nanog target and controls neural stem cell through Trp53inp1. *EMBO J* **32**:2819-2832.
28. Goodrich LV, Milenković L, Higgins KM, Scott MP (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277**(5329):1109-1113.
29. Gulino A, Di Marcotullio L, Ferretti E, De Smaele E, Screpanti I (2007). Hedgehog signaling pathway in neural development and disease. *Psychoneuroendocrinology* **32**:S52S56.
30. Gulino A, Di Marcotullio L, Canettieri G, De Smaele E, and Screpanti I (2012). Hedgehog/Gli Control by Ubiquitination/Acetylation Interplay. *Vitamins and Hormones* **88**:211-227.
31. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**:111-129.
32. Hatta N, Hirano T, Kimura T, Hashimoto K, Mehregan DR, Ansai S, Takehara K, Takata M (2005). Molecular diagnosis of basal cell carcinoma and other basaloid cell neoplasms of the skin by the quantification of Gli1 transcript levels. *J Cutan Patol* **32**(2):131-136.
33. Ho KS and Scott MP (2002). Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* **12**(1):57-63.
34. Hui C and Angers S (2011). Gli Proteins in Development and Disease. *Cell Dev. Biol.* **27**:513-537.
35. Humke EW, Dorn KV, Milenkovic L, Scott MP and Rohatgi R (2010). The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes & Development* **24**:670-682.
36. Huntzicker EG, Estay IS, Zhen H, Lokteva LA, Jackson PK, Oro AE (2006). Dual degradation signals control Gli protein stability and tumor formation. *Genes Dev* **20**(3):276-281.
37. Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, Zhao Y, Ocasio CA, Han K, Sun M, Rack PG, Sinha S, Wu JJ, Solow-Cordero DE, Jiang J, Rowitch DH, Chen JK (2009). Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **106**(33):14132-14137.
38. Infante P, Mori M, Alfonsi R, Ghirga F, Aiello F, Toscano S, Ingallina C, Siler M, Cucchi D, Po A, Miele E, D'Amico D, Canettieri G, De Smaele E, Ferretti E, Screpanti I, Uccello Barretta G, Botta M, Botta B, Gulino A, Di Marcotullio L

- (2014). Gli1/DNA interaction is a druggable target for Hedgehog-dependent tumors. *EMBO J* **34**(2):200-217.
39. Infante P, Alfonsi R, Botta B, Mori M, Di Marcotullio L (2015). Targeting GLI factors to inhibit the Hedgehog pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**:547-558.
 40. Kim J, Lee JJ, Kim J, Gardner D, Beachy PA (2010). Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **107**(30):13432-13437.
 41. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* **236**(4797):70-73.
 42. Kool M, Jones DT, Jäger N, Northcott PA, Pugh TJ, Hovestadt V, Piro RM, Esparza LA, Markant SL, Remke M, Milde T, Bourdeaut F, Ryzhova M, Sturm D, Pfaff E, Stark S, Hutter S, Seker-Cin H, Johann P, Bender S, Schmidt C, Rausch T, Shih D, Reimand J, Sieber L, Wittmann A, Linke L, Witt H, Weber UD, Zapatka M, König R, Beroukhi R, Bergthold G, van Sluis P, Volckmann R, Koster J, Versteeg R, Schmidt S, Wolf S, Lawerenz C, Bartholomae CC, von Kalle C, Unterberg A, Herold-Mende C, Hofer S, Kulozik AE, von Deimling A, Scheurlen W, Felsberg J, Reifemberger G, Hasselblatt M, Crawford JR, Grant GA, Jabado N, Perry A, Cowdrey C, Croul S, Zadeh G, Korbel JO, Doz F, Delattre O, Bader GD, McCabe MG, Collins VP, Kieran MW, Cho YJ, Pomeroy SL, Witt O, Brors B, Taylor MD, Schüller U, Korshunov A, Eils R, Wechsler-Reya RJ, Lichter P, Pfister SM (2014) Genome sequencing of Shh medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothened inhibition. *Cancer Cell* **25**:393-405.
 43. Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R (2007). Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **104**(20):8455-8460.
 44. Lee Y, Kawagoe R, Sasai K, Li Y, Russell HR, Curran T, McKinnon PJ (2007). Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene* **26**(44):6442-6447.
 45. Li B, Fei DL, Flaveny CA, Dahmane N, Baubet V, Wang Z, Bai F, Pei XH, Rodriguez-Blanco J, Hang B, Orton D, Han L, Wang B, Capobianco AJ, Lee E, Robbins DJ (2014). Pyrvinium attenuates Hedgehog signaling downstream of smoothened. *Cancer Res* **74**(17):4811-4821.
 46. Lipinski RJ, Hutson PR, Hannam PW, Nydza RJ, Washington IM, Moore RW, Girdaukas GG, Peterson RE, Bushman W (2008). Dose- and route-dependent teratogenicity, toxicity, and pharmacokinetic profiles of the hedgehog signaling antagonist cyclopamine in the mouse. *Toxicol Sci* **104**(1):189-197.
 47. Long J, Li B, Rodriguez-Blanco J, Pastori C, Volmar CH, Wahlestedt C, Capobianco A, Bai F, Pei XH, Ayad NG, Robbins DJ (2014). The BET bromodomain inhibitor I-BET151 acts downstream of smoothened protein to abrogate the growth of hedgehog protein-driven cancers. *J Biol Chem* **289**(51):35494-35502.

48. Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**:937-950.
49. Manetti F, Faure H, Roudaut H, Gorojankina T, Traiffort E, Schoenfelder A, Mann A, Solinas A, Taddei M, Ruat M (2010). Virtual screening-based discovery and mechanistic characterization of the acylthiourea MRT-10 family as smoothened antagonists. *Mol. Pharmacol* **78**:658-665.
50. Manoranjan B, Venugopal C, McFarlane N, Doble BW, Dunn SE, Scheinemann K, Singh SK (2013). Medulloblastoma stem cells: modeling tumor heterogeneity. *Cancer Lett* **338**:23-31.
51. Mas C, Ruiz I, Altaba A (2010). Small molecule modulation of HH-Gli signaling: current leads, trials and tribulations. *Biochem Pharmacol* **80**:712-723.
52. Mazzà D, Infante P, Colicchia V, Greco A, Alfonsi R, Siler M, Antonucci L, Po A, De Smaele E, Ferretti E, Capalbo C, Bellavia D, Canettieri G, Giannini G, Screpanti I, Gulino A, Di Marcotullio L (2013). PCAF ubiquitin ligase activity inhibits Hedgehog/Gli1 signaling in p53-dependent response to genotoxic stress. *Cell Death Differ* **20**(12):1688-1697.
53. Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G (2015). Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* **20**(3):3898-3941.
54. Northcott PA, Jones DT, Kool M, Robinson GW, Gilbertson RJ, Cho YJ, Pomeroy SL, Korshunov A, Lichter P, Taylor MD, Pfister SM (2012). Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer* **12**:818-834.
55. Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005). Sonic hedgehog signaling regulates the behavior of stem cells and early precursors in the postnatal and adult brain. *Development* **132**:335-344.
56. Pandolfi S and Stecca B (2015). Cooperative integration between HEDGEHOG-Gli signalling and other oncogenic pathways: implications for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med*. **17**:e5.
57. Patridge E, Gareiss P, Kinch MS, Hoyer D (2015). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today*.
58. Pavletich NP, Pabo CO (1993). Crystal structure of a five-finger Gli-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* **261**:1701-1707.
59. Po A, Ferretti E, Miele E, De Smaele E, Paganelli A, Canettieri G, Coni S, Di Marcotullio L, Biffoni M, Massimi L, Di Rocco C, Screpanti I, Gulino A (2010). Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *Embo J* **29**(15):2646-2658.
60. Polizio AH, Chinchilla P, Chen X, Kim S, Manning DR, Riobo NA (2011). Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J. Biol. Chem.* **286**:19589-19596.

61. Ruat M, Hoch L, Faure H, Rognan D (2014). Targeting of Smoothed for therapeutic gain. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**:237-246.
62. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B, LoRusso PM, Von Hoff DD, de Sauvage FJ, Low JA (2009). Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* **361**(12):1173-1178.
63. Ruiz i Altaba A, Palma V, Dahmane N (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci.* **3**(1):24-33.
64. Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B (2007). The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol* **17**(9):438-447.
65. Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, Ruiz i Altaba A (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **101**:12561-12566.
66. Sasai K, Romer JT, Lee Y, Finkelstein D, Fuller C, McKinnon PJ, Curran T (2006) Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies. *Cancer Res* **66**:4215-4222.
67. Schuller U, Heine VM, Mao J, Kho AT, Dillon AK, Han YG, Huillard E, Sun T, Ligon AH, Qian Y, Ma Q, Alvarez-Buylla A, McMahon AP, Rowitch DH, Ligon KL (2008). Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell* **14**:123-134.
68. Sharpe HJ, Pau G, Dijkgraaf GJ, Basset-Seguin N, Modrusan Z, Januario T, Tsui V, Durham AB, Dlugosz AA, Haverty PM, Bourgon R, Tang JY, Sarin KY, Dirix L, Fisher DC, Rudin CM, Sofen H, Migden MR, Yauch RL, de Sauvage FJ (2015). Genomic analysis of smoothed inhibitor resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell* **27**(3):327-341.
69. Sheng T, Chi S, Zhang X, Xie J (2006) Regulation of Gli1 localization by the cAMP/protein kinase A signaling axis through a site near the nuclear localization signal. *J Biol Chem* **281**:9-12.
70. Stecca B and Ruiz i Altaba A (2005). Brain as a Paradigm of Organ Growth: Hedgehog–Gli Signaling in Neural Stem Cells and Brain Tumors. *J Neurobiol.* **64**(4):476-490.
71. Svard J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergström A, Ericson J, Toftgård R, Teglund S (2006). Genetic elimination of suppressor of Fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell* **10**:187-197.
72. Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA (2000). Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**:1005-1009.
73. Tang Y, Gholamin S, Schubert S, Willardson MI, Lee A, Bandopadhyay P, Bergthold G, Masoud S, Nguyen B, Vue N, Balansay B, Yu F, Oh S, Woo P, Chen S, Ponnuswami A, Monje M, Atwood SX, Whitson RJ, Mitra S, Cheshier

- SH, Qi J, Beroukhir R, Tang JY, Wechsler-Reya R, Oro AE, Link BA, Bradner JE, Cho YJ (2014). Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition. *Nat Med.* **20**:732-740.
74. Teperino R, Amann S, Bayer M, McGee SL, Loipetzberger A, Connor T, Jaeger C, Kammerer B, Winter L, Wiche G, Dalgaard K, Selvaraj M, Gaster M, Lee-Young RS, Febbraio MA, Knauf C, Cani PD, Aberger F, Penninger JM, Pospisilik JA, Esterbauer H (2012). Hedgehog partial agonism drives Warburg-like metabolism in muscle and brown fat. *Cell* **151**:414-426.
75. Tognazzi V (1924). Calconi e Idrocalconi. *Gazz. Chim. Ital.* **54**:697-704.
76. Traiffort E, Angot E and Ruat M (2010). Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *Journal of Neurochemistry* **113**:576-590.
77. Tremblay MR, Nesler M, Weatherhead R, Castro AC (2009). Recent patents for Hedgehog pathway inhibitors for the treatment of malignancy. *Expert Opin. Ther. Pat.* **19**:1039-1056.
78. Triscott J, Lee C, Foster C, Manoranjan B, Pambid MR, Berns R, Fotovati A, Venugopal C, O'Halloran K, Narendran A, Hawkins C, Ramaswamy V, Bouffet E, Taylor MD, Singhal A, Hukin J, Rassekh R, Yip S, Northcott P, Singh SK et al (2013). Personalizing the treatment of pediatric medulloblastoma: polo-like kinase 1 as a molecular target in high-risk children. *Cancer Res* **73**:6734-6744.
79. Varjosalo M and Taipale J (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* **22**(18):2454-2472.
80. Wang Y, Ding Q, Yen CJ, Xia W, Izzo JG, Lang JY, Li CW, Hsu JL, Miller SA, Wang X, Lee DF, Hsu JM, Huo L, Labaff AM, Liu D, Huang TH, Lai CC, Tsai FJ, Chang WC, Chen CH, Wu TT, Buttar NS, Wang KK, Wu Y, Wang H, Ajani J, Hung MC (2012) The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways. *Cancer Cell* **21**:374-387.
81. Wechsler-Reya R and Scott MP (2001). The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci.* **24**:385-428.
82. Weierstall U, James D, Wang C, White TA, Wang D, Liu W, Spence JC, Bruce Doak R, Nelson G, Fromme P, Fromme R, Grotjohann I, Kupitz C, Zatsepin NA, Liu H, Basu S, Wacker D, Han GW, Katritch V, Boutet S, Messerschmidt M, Williams GJ, Koglin JE, Marvin Seibert M, Klinker M, Gati C, Shoeman RL, Barty A, Chapman HN, Kirian RA, Beyerlein KR, Stevens RC, Li D, Shah ST, Howe N, Caffrey M, Cherezov V (2014). Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography. *Nat. Commun* **5**, 3309.
83. Williams CH, Hempel JE, Hao J, Frist AY, Williams MM, Fleming JT, Sulikowski GA, Cooper MK, Chiang C, Hong CC (2015). An in vivo chemical genetic screen identifies phosphodiesterase 4 as a pharmacological target for hedgehog signaling inhibition. *Cell Rep* **11**(1):43-50.
84. Wolff F, Loipetzberger A, Gruber W, Esterbauer H, Aberger F, Frischauf AM (2013). Imiquimod directly inhibits Hedgehog signalling by stimulating adenosine receptor/protein kinase A-mediated GLI phosphorylation. *Oncogene* **32**(50):5574-5581.

85. Yam PT, Langlois SD, Morin S, Charron F (2009). Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* **62**:349-362.
86. Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alicke B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, Pujara K, Stinson J, Callahan CA, Tang T, Bazan JF, Kan Z, Seshagiri S, Hann CL, Gould SE, Low JA, Rudin CM, de Sauvage FJ (2009). Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* **326**(5952):572-574.
87. Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourbonoulas M, Schuller U, Machold R, Fishell G, Rowitch DH, Wainwright BJ, Wechsler-Reya RJ (2008). Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* **14**:135-145.