

S.C. Biologia Cellulare

Ruolo dei "danger factors" nella progressione neoplastica

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

Programma: a - Infiammazione, immunità innata e tumore

Responsabile: Patrizia Castellani

Partecipanti: Anna Rubartelli, Massimo Ardy, Laura Delfino, Caterina Pellecchia

Durata: 2006-2008

Parole chiave: HMGB1; MIF; galectin; TRX; proteine leaderless; tumori

Altre strutture IST: S.S. Genomica Funzionale (G. Angelini); S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini); S.C. Oncologica Chirurgica (F. Cafiero)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: AIRC, Ministero della Salute

Background

E' ormai largamente dimostrato che il microambiente infiammatorio non solo favorisce lo sviluppo delle lesioni neoplastiche ma promuove anche la progressione tumorale. In questo progetto abbiamo analizzato diversi fattori del microambiente infiammatorio-tumorale responsabili di questi effetti pro-tumorali. Possiamo infatti distinguere una componente cellulare (cellule infiammatorie infiltranti, cellule stromali reattive) e una componente umorale che comprende proteine e altre molecole normalmente assenti dall'ambiente extracellulare, e fattori fisico-chimici come redox, pH, tensione di O₂. Tra le proteine, oltre a citochine e chemochine pro-infiammatorie prodotte da cellule tumorali e infiammatorie, abbiamo investigato il ruolo, che sembra essere prominente, giocato dai DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns), proteine intracellulari rilasciate da cellule danneggiate o dalla matrice degradata con funzione infiammatoria. Sono stati anche valutati fattori fisico chimici poiché è noto che il microambiente tumorale è altamente ipossico, e l'ipossia modula fortemente l'espressione genica. E' stato anche investigato il ruolo del redox, che, normalmente ossidante nell'ambiente extracellulare, può essere modificato in senso riducente dall'infiammazione cronica. Il redox è stato studiato mediante colorazioni con reagenti specifici per i gruppi tiolici. Inoltre è stata analizzata la presenza di ossidoreduttasi come tioredoxina e MIF spesso sovraesprese dai tumori. Gli studi sono stati effettuati sia in vivo (campioni chirurgici) che in vitro su linee cellulari tumorali derivate da carcinomi del polmone. I dati ottenuti suggeriscono che c'è una relazione tra fenotipo ridotto e aggressività del tumore. Alla luce di questi risultati abbiamo cercato di valutare se il fenotipo redox influenza l'effetto dei farmaci anti-neoplastici pro-ossidanti (in particolare, il triossido di arsenio) e anti-ossidanti (in particolare, Trolox e N-acetil-cisteina).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Il progetto si propone di chiarire il ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica e di determinarne il controllo mediante farmaci.

Beneficiari

Comunità scientifica e Servizio Sanitario Nazionale.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Il tumore del polmone è un chiaro esempio della connessione tra infiammazione e cancro e il NSCLC è in molti casi l'ultimo stadio di un'infiammazione cronica. Mediante analisi immunoistochimica e colorazioni con reagenti specifici per i gruppi tiolici (Mercury Orange) abbiamo analizzato campioni di carcinoma del polmone. Abbiamo dimostrato che tioredoxina e MIF, due ossidoreduttasi con funzione citochinica, sono sovraesprese nei NSCLC. Inoltre il tessuto neoplastico contiene abbondanti tioli non proteici rispetto alla controparte normale mostrando un fenotipo altamente ridotto. Studi in vitro su linee cellulari di carcinoma del polmone correlano con gli studi in vivo: cloni derivanti dalla stessa linea di carcinoma polmonare che esprimono differenti livelli di TRX e MIF rilasciano varie quantità di tioli non proteici. Questo rilascio è impedito dagli inibitori di TRX indicando il ruolo attivo di questa ossido-reduttasi nella produzione e nel rilascio di tioli. La percentuale di crescita e il potenziale di migrazione in "vitro" e "in vivo" correlano con il livello di TRX e di tioli liberi ma non di MIF. Ogni clone mostra risposte diverse ai composti che modulano il sistema redox. In particolare abbiamo visto che cloni che mostrano un fenotipo più ridotto e più aggressivo sono altamente suscettibili agli effetti citotossici di farmaci pro-ossidanti mentre cloni che esprimono livelli più bassi di TRX contrastano lo stress ossidativo aumentando l'espressione di TRX stessa e passando ad un fenotipo altamente proliferativo. I nostri risultati indicano che le linee cellulari di carcinoma del polmone con vari gradi di aggressività hanno distinte proprietà redox e che un fenotipo più ridotto correla con maggiore aggressività. Sono state inoltre analizzate varie linee cellulari per testare sintesi e secrezione di TRX e rilascio di tioli extracellulari. Anche in questi esperimenti è stata trovata una positiva correlazione tra contenuto intracellulare di TRX e spontaneo rilascio di tioli. Le linee cellulari che hanno un alto livello di TRX (HCT-116, SK-MEL, SK-MES e NCI) rilasciano alti livelli di tioli. Al contrario, le linee cellulari che hanno bassi livelli di TRX (OVCAR, GDM, DOHH2, MCF7 e Jurkat) rilasciano basse quantità di tioli. Inoltre agenti anti e pro-ossidanti hanno differenti effetti su queste linee cellulari che dipendono dallo

Consuntivo progetti RC 2006-2008

stato di stress riducente al quale le cellule sono sottoposte. Questi dati indicano che il contributo di TRX alla progressione tumorale è mediato, almeno in parte, dalla produzione di un microambiente extracellulare ridotto sostenuto dai tioli non proteici. Questo alterato microambiente concorre all'aumento della proliferazione e dell'invasività del tumore.

Elenco pubblicazioni:

Balza E.-Mortara L.-Sassi F.-Monteghirfo S.-Carnemolla B.-Castellani P.-Neri D.-Accolla R.-Zardi L.-Borsi L.
Targeted delivery of tumor necrosis factor alpha to tumor vessels induces a therapeutic T cell mediated immune response that protects the host against syngeneic tumors of different histologic origin.
Clin. Cancer Res. 12:2575/2581, 2006

Mortara L.-Castellani P.-Meazza R.-Tosi G.-De Lerma A.-Procopio F.-Comes A.-Zardi L.-Ferrini S.-Accolla R.
CIITA induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory.
Clin. Cancer Res. 12:3435/3443, 2006

Mortara L.-Balza E.-Sassi F.-Castellani P.-Carnemolla B.-De Lerma A.-Fossati S.-Tosi G.-Accolla R.-Borsi L.
Therapy induced antitumor vaccination by targeting tumor necrosis factor/alpha to tumor vessels in combination with melphalan.
Eur. J. Immunol. 37:3381/3392, 2007

Castellani P.-Angelini G.-Delfino L.-Matucci A.-Rubartelli A.
The thiol redox state of lymphoid organs is modified by immunization: role of different immune cell populations.
Eur. J. Immunol. 38:2419/2425, 2008

Ceccarelli J.-Delfino L.-Zappia E.-Castellani P.-Borghi M.-Ferrini S.-Tosetti F.-Rubartelli A.
The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants.
Int. J. Cancer 123:1770/1778, 2008

Studio dei meccanismi di secrezione di citochine proinfiammatorie prive di sequenza segnale secretoria

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

Programma: a - Infiammazione, immunità innata e tumore

Responsabile: Anna Rubartelli

Partecipanti: Patrizia Castellani, Massimo Ardy, Laura Delfino, Caterina Pellicchia

Durata: 2006-2008

Parole chiave: citochine infiammatorie; secrezione; lisosomi secretori; proteine leaderless

Altre strutture IST: S.S. Genomica Funzionale (G. Angelini); S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini); S.S. Biopolimeri e Proteomica (A. Profumo)

Altri Enti coinvolti: Centro di Immunologia, Luminy, Francia (G. Chimini); Istituto San Raffaele, Milano (M. Bianchi)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: AIRC

Background

La risposta immune contro la cellula neoplastica è fortemente deficitaria in vivo. Tra i fattori responsabili di tale deficit hanno rilevanza citochine e chemochine ad attività inibitoria prodotte dalle stesse cellule neoplastiche, che possono portare a deregolazione nella produzione, da parte di cellule dendritiche e di altre cellule del sistema immune, di fattori solubili necessari per una risposta efficace. Molte di queste cito/chemochine (come IL-1beta, IL-18, HMGB1, MIF, Galectina, tioredoxina) appartengono alla famiglia delle proteine secretorie "leaderless" che vengono secrete tramite una via di secrezione non classica. Abbiamo precedentemente dimostrato che la secrezione di IL-1beta ed HMGB1 avviene per traslocazione delle proteine in organelli specializzati, appartenenti al compartimento endolisosomiale, denominati lisosomi secretori (Chimini and Rubartelli 2005, Rubartelli 2005). L'esocitosi degli organelli contenenti IL-1beta e HMGB1 è indotta da segnali diversi: mentre la secrezione di IL-1beta è stimolata da ATP esogeno, prodotto precocemente dopo l'attivazione dei monociti, quella di HMGB1 è indotta da lisofosfatidilcolina, un fosfolipide attivo generato più tardivamente nel microambiente infiammatorio (Gardella et al 2002, Bonaldi et al 2003, Andrei et al 2004). L'interazione fra le cellule del sistema immune, in particolare cellule dendritiche immature e cellule NK, è cruciale per un corretto inizio di una risposta immune anti-tumorale efficace. Abbiamo precedentemente dimostrato nel nostro laboratorio che il cross-talk fra questi due tipi cellulari porta alla attivazione reciproca, tramite la secrezione di

Consuntivo progetti RC 2006-2008

proteine leaderless quali IL-18 e HMGB1. L'identificazione delle molecole di superficie coinvolte nella secrezione di queste citochine potrà essere estremamente utile per favorire l'instaurarsi di una corretta risposta immune anti-neoplastica. Recentemente sono stati sintetizzati composti facenti parte della famiglia degli inibitori delle deacetilasi istoniche, che mostrano attività sia anti-tumorale che anti-infiammatoria, suggerendo che possano essere utilizzati per bloccare l'infiammazione tumore-associata. Questi composti possono quindi essere utilizzati come modulatori della secrezione di citochine importanti per la risposta anti-tumorale.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Goal del presente progetto era la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della secrezione delle citochine leaderless da parte di cellule infiammatorie e cellule immuni. La comprensione di tali meccanismi è infatti di grande interesse per il disegno di strategie terapeutiche atte a modulare il rilascio di tali citochine per rafforzare le difese dell'ospite.

A tal fine, sono stati perseguiti i seguenti obiettivi:

- caratterizzazione del meccanismo di secrezione non classica responsabile del rilascio di citochine leaderless ad attività pro-infiammatoria e immunomodulatrice e studio di farmaci modulatori di tale secrezione alternativa
- studio dei meccanismi di attivazione reciproca tra DCs e NK, delle citochine e molecole di superficie coinvolte con attività sia attivatoria che inibitoria, e del ruolo di tale cross-talk nell'induzione della risposta immune antineoplastica.

Beneficiari

Comunità scientifica, Servizio Sanitario Nazionale.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Abbiamo osservato che molte citochine infiammatorie senza sequenza segnale (leaderless) sono sovraesprese da tumori di varia istologia e possono agire come danger factors inducendo una risposta infiammatoria non controllata quando rilasciate da cellule tumorali o infiammatorie infiltranti. Per identificare nuovi farmaci che controllino l'attività di tali citochine abbiamo approfondito gli studi sulla secrezione di IL-1 in soggetti sani e in pazienti affetti da malattie autoinfiammatorie (Broccardo et al., 2006; Gattorno et al., 2007; Gattorno et al., 2008; Ferwerda et al., 2008) e abbiamo dimostrato che inibitori delle deacetilasi istoniche, farmaci già utilizzati nella terapia antineoplastica, inibiscono selettivamente la secrezione di IL-1 (Carta et al., 2006). In particolare, abbiamo identificato un passaggio importante nella secrezione di IL-1 β indotta da PAMPs (Pathogen associated molecular patterns): precisamente, tali molecole attivando i PRR (Pathogen Recognition Receptors) inducono oltre a sintesi di pro-IL-1, rilascio extracellulare di ATP che agendo sui recettori P2X7 espressi dai monociti, induce maturazione e secrezione della citochina matura (Piccini et al., 2008; Netea et al., in press).

Riguardo allo studio del cross-talk tra DCs e NK e del ruolo di tale cross-talk nell'induzione della risposta immune antineoplastica, abbiamo dimostrato che nei cloni NK derivati in vitro delle cellule NK circolanti di donatori sani, la capacità di indurre maturazione delle cellule dendritiche correla con la capacità dei cloni di secernere HMGB1 dopo interazione fisica con le cellule dendritiche (Semino et al., 2007). Abbiamo anche studiato la modulazione del redox dei linfonodi a seguito di risposta immune ad antigeni, a abbiamo caratterizzato le diverse popolazioni cellulari (DC, linfociti B) coinvolte in tale regolazione (Castellani et al., 2008)

Stimoli infiammatori ripetuti sono anche responsabili della generazione del microambiente infiammatorio che favorisce l'insorgenza e la progressione del tumore. Tra questi, grande importanza hanno i fattori di pericolo rilasciati da cellule morenti. Abbiamo proposto che l'equilibrio tra morte per necrosi e morte per apoptosi e un corretto redox extracellulare siano requisiti per contenere la risposta infiammatoria. Nel microambiente neoplastico, tale equilibrio è perduto, con aumentata necrosi e presenza di un redox altamente riducente, dovuto all'eccesso di riducenti proteici e non proteici prodotti dalla cellule in risposta allo stress ossidativo (Ceccarelli et al., 2008; Sitia & Rubartelli, in press). Tale microambiente favorisce l'attività dei fattori di pericolo quali HMGB1 che potenziano l'infiammazione e risulta in ultimo vantaggioso per il tumore (Rubartelli & Lotze, 2007, Lotze et al., 2007a; Lotze et al., 2007b; Ellerman et al., 2007).

Elenco pubblicazioni:

Broccardo C.-Nieoullon V.-Amin R.-Masmejean F.-Carta S.-Tassi S.-Pophillat M.-Rubartelli A.-Pierres M.-Rougon G.-Nieoullon A.- Chazal G.-Chimini G.

ABCA2 is a marker of neural progenitors and neuronal subsets in the adult rodent brain.
J. Neurochem. 97:345/355, 2006

Carta S.-Tassi S.-Semino C.-Fossati G.-Mascagni P.-Dinarello C.-Rubartelli A.

Histone deacetylase inhibitors prevent exocytosis of interleukin 1 β containing secretory lysosomes: role of microtubules.

Blood 108:1618/1626, 2006

Ellerman J.-Brown C.-De Vera M.-Zeh H.-Billiar T.-Rubartelli A.-Lotze M.

Masquerader: high mobility group box 1 and cancer.

Clin. Cancer Res. 13:2836/2848, 2007

Gattorno M.-Tassi S.-Carta S.-Delfino L.-Ferlito F.-Pelagatti M.-D'osualdo A.-Buoncompagni A.-Alpigiani M.-Alessio M.-Martini A.-Rubartelli A.

Pattern of interleukin/1 β secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin/1 blockade

in patients with CIAS1 mutations.

Arthritis Rheum. 56:3138/3148, 2007

Lotze M.-Deisseroth A.-Rubartelli A.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Damage associated molecular pattern molecules.
Clin. Immunol. 124:1/4, 2007

Lotze M.-Zeh H.-Rubartelli A.-Sparvero L.-Amoscato A.-Washburn N.-Devera M.-Liang X.-Tor M.-Billiar T.
The grateful dead: damage associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity.
Immunol. Rev. 220:60/81, 2007

Rubartelli A.-Lotze M.
Inside, outside, upside down: damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) and redox.
Trends Immunol. 28:429/436, 2007

Semino C.-Ceccarelli J.-Lotti L.-Torrise M.-Angelini G.-Rubartelli A.
The maturation potential of NK cell clones toward autologous dendritic cells correlates with HMGB1 secretion.
J. Leukoc. Biol. 81:92/99, 2007

Castellani P.-Angelini G.-Delfino L.-Matucci A.-Rubartelli A.
The thiol redox state of lymphoid organs is modified by immunization: role of different immune cell populations.
Eur. J. Immunol. 38:2419/2425, 2008

Ceccarelli J.-Delfino L.-Zappia E.-Castellani P.-Borghi M.-Ferrini S.-Tosetti F.-Rubartelli A.
The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affects tumor progression and response to prooxidants.
Int. J. Cancer 123:1770/1778, 2008

Ferwerda G.-Kramer M.-De Jong D.-Piccini A.-Joosten L.-Devesaginer I.-Girardin S.-Adema G.-Van Der Meer J.-Kullberg B.-Rubartelli A.-Netea M.
Engagement of NOD2 has a dual effect on proIL1beta mRNA transcription and secretion of bioactive IL1beta.
Eur. J. Immunol. 38:184/191, 2008

Gattorno M.-Piccini A.-Lasiglie' D.-Tassi S.-Brisca G.-Carta S.-Delfino L.-Ferlito F.-Pelagatti M.-Caroli F.-Buoncompagni A.-Viola S.-Loy A.-Sironi M.-Vecchi A.-Ravelli A.-Martini A.-Rubartelli A.
The pattern of response to anti/interleukin/1 treatment distinguishes two subsets of patients with systemic onset juvenile idiopathic arthritis.
Arthritis Rheum. 58:1505/1515, 2008

Piccini A.-Carta S.-Tassi S.-Lasiglie' D.-Fossati G.-Rubartelli A.
ATP is released by monocytes stimulated with pathogen sensing receptor ligands and induces IL1beta and IL18 secretion in an autocrine way.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:8067/8072, 2008

Netea M.G.-Nold Petry C.A.-Nold M.F.-Joosten L.A.B.-Opitz B.-Van der Meer J.H.M.-Van de Veerdonk F.L.-Ferwerda G.-Heinhuis B.-Devesa I.-Funk J.-Mason R.J.-Kullberg B.J.-Rubartelli A.-Van der Meer J.W.M.-Dinarello C.A.
Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages.
Blood, in press

Rubartelli A.-Sitia R.
Stress as an intercellular signal: the emergence of stress associated molecular patterns (SAMP).
Antioxidant and Redox Signaling, in press

Modulazione metabolica di vie di trasduzione del segnale proangiogeniche

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

Programma: e - Angiogenesi

Responsabile: Francesca Tosetti

Partecipanti: Roberta Venè, Giuseppe Arena

Durata: 2006-2008

Parole chiave: redox; glucosio; trasduzione del segnale; metabolismo; morte cellulare programmata; HIF; GSK3

Altre strutture IST: S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi (N. Ferrari, R. Benelli); S.C. Immunologia (A. Poggi)

Altri Enti coinvolti: ISMAC (CNR), Genova

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute, Istituto Superiore di Sanità

Background

Le condizioni dell'ambiente extracellulare, quali lo stato di ossigenazione, la disponibilità di substrati energetici (glucosio, aminoacidi), il pH, sono continuamente monitorate da sistemi intracellulari che veicolano informazioni a vie di trasduzione del segnale deputate al mantenimento dell'omeostasi. La riprogrammazione dell'attività trascrizionale alla base della risposta adattativa che nel tempo favorisce la stabilizzazione e lo sviluppo del tumore dipende in larga parte dall'attività di due fattori di trascrizione, hypoxia-inducible transcription factor (HIF) e NFkB. È stato recentemente dimostrato che la cinasi glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3beta) coordina a monte (master regulator) sia l'attività di HIF-1alfa che di NFkB. HIF è un elemento di integrazione delle principali vie di trasduzione del segnale che regolano l'equilibrio metabolico tissutale inducendo l'espressione di numerose proteine fra cui enzimi del metabolismo glucidico (Glut-1, PGK) e molecole proangiogeniche (VEGF, eritropoietina). HIF è un complesso trascrizionale dimerico attivato dall'ipossigenazione, ma anche da fattori di crescita proangiogenici (IGF-1), ormoni (insulina), citochine infiammatorie e chemochine e dalla carenza di ferro nei tessuti normalmente ossigenati. HIF ed NFkB mediano inoltre l'adattamento dei tessuti alle alterazioni dello stato di ossido-riduzione (redox), agli squilibri energetici che si riscontrano nei tessuti tumorali, ed inducono angiogenesi. Diverse vie di trasduzione del segnale modulano a loro volta la stabilità e l'attività di HIF e NFkB: fra queste la via di ERK1/2, la via di PTEN/AKT/mTOR, e la via di AMPK (AMP-activated protein kinase) attivate da stress. Sulla base dei dati esposti il progetto proponeva di verificare l'ipotesi che alcuni farmaci antitumorali proossidanti di provata efficacia, in particolare il retinoide 4HPR, attualmente utilizzato nella prevenzione del tumore della mammella, e farmaci sperimentali (il triterpenoide CDDO-Me, il flavonoide xantumolo) esercitassero la loro azione interferendo con alcune reti regolative chiave deputate alla trasduzione dei segnali di sopravvivenza cellulare, angiogenesi ed infiammazione sopra descritte.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo principale del progetto era identificare potenziali marcatori molecolari di risposta a farmaci redox attivi verificandone le proprietà antiangiogeniche ed antiinfiammatorie. In particolare:

- Verificare l'ipotesi che i farmaci in studio utilizzati a basse dosi, quindi in un setting clinico preferenzialmente chemiopreventivo, potessero esercitare un effetto omeostatico sull'equilibrio tissutale, stabilendo nei tessuti sensibili condizioni metaboliche sfavorevoli al mantenimento di processi energeticamente dispendiosi, quali angiogenesi ed infiammazione, favorenti la stabilizzazione del tumore.

- Verificare l'ipotesi che i farmaci proossidanti usati a dosi più elevate, alcuni dei quali (4HPR, CDDO-Me) attualmente in sperimentazione clinica per il trattamento di tumori avanzati, potessero indurre morte cellulare programmata di tipo non apoptotico colpendo selettivamente le cellule tumorali adattate ad avverse condizioni del microambiente. La caratterizzazione molecolare degli adattamenti metabolici acquisiti nel corso della tumorigenesi per tollerare elevate condizioni di stress offrono la possibilità di utilizzare inibitori farmacologici del signaling atti ad aumentare l'efficacia delle terapie in regime di combinazione e superare la resistenza a farmaci citotossici tradizionali.

Beneficiari

Comunità scientifica internazionale.

Ricerca clinica nell'ambito di trials sperimentali o protocolli clinici per la prevenzione e cura dei tumori con i farmaci studiati come singoli agenti od in regime di combinazione.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Abbiamo identificato alcuni meccanismi molecolari coinvolti nell'attività di farmaci chemiopreventivi e verificata l'efficacia antitumorale ed antiangiogenica (angiopreventivi) in protocolli sperimentali preclinici di prevenzione e trattamento in vivo in diversi modelli tumorali. Abbiamo rilevato che caratteristica comune dei farmaci studiati è la modulazione delle vie di sopravvivenza di AKT/mTOR/GSK3beta e l'equilibrio energetico mediato da AMPK. I principali risultati ottenuti sono i seguenti: i farmaci chemiopreventivi redox-attivi (NAC, xantumolo, 4HPR, CDDO-Me) mostrano effetti antiangiogenici ed antiinfiammatori se usati a basse dosi non tossiche, e pro-apoptotici non classici se usati a dosi più elevate, ma clinicamente rilevanti; il retinoide proossidante 4HPR ed il triterpenoide CDDO-Me esercitano effetti metabolici insulinomimetici inducendo la fosforilazione di GSK3 ed avviando tramite questo mediatore del signaling un programma di adattamento metabolico allo stress ossidativo.

Alcuni degli studi proposti sono stati effettuati in cellule derivate da tumori a forte componente infiammatoria (cellule tumorali di prostata PC3, DU145, LnCAP) o su linee del tumore raro retinoblastoma (Y79, Weri-Rb1). Interessandoci a farmaci antitumorali modulatori del redox, abbiamo misurato in vitro parametri indicativi di stress ossidativo quali la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), i livelli di glutazione, sistemi enzimatici ad attività redox quali superossido dismutasi (SOD), glutazione perossidasi (GPx), eme ossigenasi (HO-1), glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD). Dal momento che l'attività redox di alcuni composti angiopreventivi a dosi clinicamente rilevanti ma elevate rispetto alle dosi chemiopreventive, può stimolare una massiccia produzione di ROS a livello mitocondriale, abbassando così la soglia di tolleranza allo stress ossidativo, abbiamo studiato l'induzione di morte cellulare dipendente e indipendente dall'attivazione di caspasi a dosi crescenti dei farmaci. Abbiamo quindi verificato a livello biochimico la correlazione fra modulazione di parametri metabolici (incorporazione di glucosio, valutazione del pool del nucleotide piridinico NADPH) e stato redox (ROS, glutazione intracellulari) con l'attività proapoptotica dei farmaci. Riguardo a 4HPR, abbiamo analizzato la modulazione delle vie di trasduzione di AKT, mTOR e GSK3beta, in relazione alla sopravvivenza e l'induzione di morte cellulare programmata in linee cellulari di carcinoma prostatico e retinoblastoma. Lo studio è stato effettuato in presenza o meno di stimolazione con fattore di sopravvivenza insulin-like growth factor (IGF-1). 4HPR a dosi micromolari induce una forma complessa di morte cellulare caratterizzata da induzione di stress ossidativo e deplezione di glutazione, compromissione della funzionalità mitocondriale e attivazione di caspasi. Un dato interessante è che il farmaco provoca dilatazione del compartimento lisosomiale ed intensa vacuolizzazione citoplasmatica, evidenziata con analisi al microscopio confocale ed elettronico (TEM), e rilascio di proteasi lisosomiali, un meccanismo responsabile di morte cellulare caspasi-indipendente. Tali eventi culminano in una caduta energetica con dissipazione del potenziale transmembrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) e del contenuto di ATP intracellulare. L'attivazione da parte di IGF-1 di AKT/mTOR, che regolano aspetti del metabolismo energetico stimolando la produzione di ATP,

Consuntivo progetti RC 2006-2008

risulta compromessa in presenza del farmaco e non è in grado di prevenire questa forma di morte programmata. I dati ottenuti rivelano alcuni importanti meccanismi molecolari alla base delle proprietà antitumorali di 4HPR, utilizzato in studi clinici di prevenzione e cura dei tumori solidi, e potrebbero contribuire allo sviluppo di regimi terapeutici potenziati in combinazione con farmaci che esercitano attività proapoptotica attraverso la regolazione del metabolismo energetico cellulare. Abbiamo definito l'attività di terpenoidi sintetici chemiopreventivi, in particolare CDDO, CDDO-Me e CDDO-Im, su linee di carcinoma prostatico androgeno-dipendenti ed indipendenti (PC3, DU145, LNCap). I risultati dello studio mostrano che tali composti somministrati a basse dosi micromolari inducono morte cellulare caratterizzata da attivazione di caspasi 8 e 3, processing di PARP e fosforilazione della cinasi GSK3beta coinvolta nella progressione del tumore prostatico. Il silenziamento di GSK3beta, al pari della sua inibizione farmacologica, potenzia notevolmente la citotossicità di CDDO-Me in cellule PC3 e DU145. I nostri studi suggeriscono che la combinazione con inibitori specifici di GSK3beta, già in uso in ambito psichiatrico ed in sperimentazione clinica quali promettenti agenti antitumorali, potrebbe aumentare l'efficacia di farmaci chemiopreventivi potenziando l'apoptosi via caspasi 8. Recenti risultati ottenuti in cellule tumorali di retinoblastoma mostrano che 4HPR, pur inducendo morte cellulare, attiva contemporaneamente una risposta difensiva di sopravvivenza allo stress ossidativo che coinvolge l'enzima GSK3beta ed è caratterizzata da un'aumentata espressione di eme ossigenasi, superossido dismutasi, e dalla modulazione dei livelli intracellulari di glutazione. Abbiamo dimostrato che la fosforilazione di GSK3beta è soggetta più in generale a regolazione redox utilizzando diversi stimoli farmacologici pro-ossidanti e composti antiossidanti con diverso meccanismo d'azione (triossido di arsenico, fenetilisotiocianato) ed appare legata allo stato metabolico cellulare in quanto viene bloccata da inibitori del catabolismo glucidico quali 2-deossiglucosio e della via dei pentoso fosfati.

Elenco pubblicazioni:

Cardinali B.-Damonte G.-Melone L.-Salis A.-Tosetti F.-Rocco M.-Profumo A.

Identification of a new truncated form and deamidation products of fibrinopeptide B released by thrombin from human fibrinogen.

Thromb. Haemost. 96:302/308, 2006

Tosetti F.-Noonan D.-Albini A.

Choking hypoxia inducible factor 1alpha: a novel mechanism for connective tissue growth factor inhibition of angiogenesis.

J. Natl. Cancer Inst. 98:946/948, 2006

Vene' R.-Arena G.-Poggi A.-D'arrigo C.-Mormino M.-Noonan D.-Albini A.-Tosetti F.

Novel cell death pathways induced by N/(4/hydroxyphenyl)retinamide: therapeutic implications.

Mol. Cancer Ther. 6:286/298, 2007

Monteghirfo S.-Tosetti F.-Ambrosini C.-Stigliani S.-Pozzi S.- Frassoni F.-Fassina G.-Soverini S.-Albini A.-Ferrari N.

Antileukemia effects of xanthohumol in Bcr/Abl transformed cells involve nuclear factor/(kappa)B and p53 modulation.

Mol. Cancer Ther. 7:2692/2702, 2008

Vene' R.-Larghero P.-Arena G.-Sporn M.-Albini A.-Tosetti F.

Glycogen synthase kinase 3beta regulates cell death induced by synthetic triterpenoids.

Cancer Res. 68:6987/6996, 2008

Venè R.-Arena G.-Cardinali B.-Paleari L.-Albini A.-Tosetti F.

Glycogen synthase kinase 3beta regulates glutathione metabolism in response to oxidative stress.

Manuscript in preparation.

Utilizzo terapeutico di L19TNFalpha da solo o in combinazione con altre proteine di fusione (L19-IL2) o chemioterapici (es. melphalan, oxaliplatino) nel trattamento preclinico di tumori solidi

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

Programma: f - Sviluppo preclinico e di fase I di terapie biologiche antitumorali: immunoterapia, immunoterapia adottiva, terapie "antisense", terapia antiangiogenica, terapia genica e terapia cellulare

Responsabile: Laura Borsi

Partecipanti: Enrica Balza, Patrizia Castellani

Durata: 2006-2008

Parole chiave: citochine; matrice extracellulare (ECM); tumor targeting; immunoterapia

Altre strutture IST: S.C. Immunologia (B. Carnemolla)

Altri Enti coinvolti: Università dell'Insubria, Varese (L. Mortara, R. Accolla); Istituto G. Gaslini, Genova (L. Moretta)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Soggetti cofinanziatori: Istituto Superiore di Sanità; Ministero della Salute; Alleanza contro il Cancro

Background

L19TNFalpha è una immunocitochina formata dall'anticorpo ricombinante L19, specifico per il dominio oncofetale ED-B della fibronectina [un marker di angiogenesi (Castellani et al., *Int J Cancer*. 1994;59:612-8)], e da TNFalpha. Sebbene il TNFalpha sia una delle più potenti citochine antitumorali, i suoi inaccettabili effetti collaterali ne hanno precluso la somministrazione sistemica a dosi terapeuticamente efficaci e, ad oggi, l'utilizzo clinico di TNFalpha è limitato a somministrazioni loco-regionali, in combinazione al melphalan. Dopo 48h dall'iniezione endovena in topi con tumore, la dose di L19mTNFalpha accumulata selettivamente intorno ai vasi tumorali è circa 35 volte superiore a quella ottenuta con TNFalpha o con una proteina di fusione di controllo. Inoltre, rispetto alle molecole di controllo, la proteina di fusione L19mTNFalpha presenta un'efficacia terapeutica di circa 4 volte superiore. Nonostante questo, nessun caso di guarigione completa da tumore è stato da noi ottenuto con l'utilizzo della sola proteina di fusione L19mTNFalpha in diversi modelli di tumore murino (Borsi et al, *Blood*. 2003;102:4384-92). Al contrario, il trattamento combinato con L19mTNFalpha e melphalan, in singola somministrazione sistemica, ha indotto completa guarigione da tumore (follow-up >10 mesi) nell'83% dei casi di fibrosarcoma WEHI-164 e nel 33% dei casi di colon carcinoma C51. Tutti gli animali curati hanno successivamente rigettato fino a 5 volte la dose tumorigenica di cellule dello stesso tumore da cui sono guariti e, in una percentuale molto alta di casi (80-100%), anche tumori singenici di origine istologica diversa. In esperimenti di Winn assay gli splenociti degli animali guariti da WEHI-164 (E:T=1:1) hanno protetto da fibrosarcoma WEHI-164 il 100% dei topi BALB/c naive e l'80% dei topi fortemente immunodepressi, SCID beige, e da colon carcinoma C51 (E:T=5:1) l'80% dei topi BALB/c. Inoltre, esperimenti di Winn assay utilizzando immunosplenociti depletati "in vitro" hanno indicato che, nel processo di rigetto adottivo, sono fondamentali le cellule T, CD8+ e specialmente le CD4+. Nel topo guarito da tumore le CD4+ T helper presentano un tipo di risposta sia TH1 che TH2 (Balza et al., *Clin.Cancer Res.*, 2006,12(8):2575-82). Nel loro complesso questi risultati dimostrano che il trattamento con L19mTNFalpha/melphalan induce una potente risposta immunitaria T cellulo-mediata diretta verso tumori istologicamente diversi che verosimilmente esprimono gli stessi antigeni tumore-associati (TAAs).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

La immunocitochina L19TNFalpha è entrata nel 2008 in trials clinici di fase I-II, per cui è importante conoscere al meglio le attività biologiche di questa molecola da sola o in combinazione a diversi chemioterapici per un ottimale utilizzo clinico nella terapia dei tumori. Il progetto aveva lo scopo:

- di chiarire i meccanismi immunologici innescati dal trattamento con L19mTNFalpha/melphalan e responsabili del rigetto di due tumori istologicamente diversi (fibrosarcoma WEHI-164 e colon carcinoma C51) indotti nei topi singenici BALB/c;
- di utilizzare L19mTNFalpha in combinazione a L19-IL2 (proteina di fusione già entrata in trials clinici di fase I/II) e chemioterapici diversi dal melphalan, quali ad es. oxaliplatino, per valutarne l'efficacia terapeutica nel trattamento dei tumori solidi indotti nell'animale singenico;
- di valutare approcci di vaccinazione contro tumori solidi utilizzando L19mTNFalpha sia come adiuvante che come agente terapeutico.

Beneficiari

- Immediato beneficiario il sistema sanitario, poiché L19TNFalpha è entrata nel 2008 in trials clinici di fase I-II;
- comunità scientifica.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Il primo obiettivo che ci eravamo proposti di raggiungere era quello di chiarire i meccanismi immunologici innescati dal trattamento con L19mTNFalpha/melphalan. Questo è stato raggiunto nel 2006 con lo studio relativo al ruolo dei diversi subsets di cellule immunitarie essenziali nell'innescare e mantenere la risposta immunitaria responsabile della guarigione da tumore indotta da terapia con L19mTNFalpha e melphalan. Da questo studio è emerso che le cellule T, sia CD4+ (con risposta mista Th1/Th2) che CD8+ (effettori antitumorali finali), sono essenziali per l'efficacia antitumorale del trattamento con L19mTNFalpha/melphalan sia nella fase di priming che effettrice e di memoria immunologica che, in vivo, persiste almeno fino a 10 mesi dalla cura. L'analisi immunocitochimica del tumore dopo la terapia (fase di priming) e durante la fase di rigetto mostra un precoce infiltrato tumorale da parte dei T linfociti CD4+ e CD8+ in numero significativamente elevato rispetto ai controlli. Inoltre, nei linfonodi drenanti il tumore di topi trattati con L19mTNFalpha/melphalan si assiste a rapida e persistente diminuzione del numero, ma non della funzione, delle cellule CD4+CD25+ T regolatorie.

Abbiamo anche esteso (2008) a modelli di tumore muscolo scheletrico diversi dal fibrosarcoma WEHI-164 e dal colon carcinoma C51 lo studio dell'efficacia terapeutica di L19TNFalpha/melphalan. Nel caso del fibrosarcoma GI-17, il trattamento non ha determinato guarigioni da tumore ma ha ridotto la velocità di crescita del tumore rispetto ai controlli non trattati aumentando di circa dieci giorni l'aspettativa di vita (+50%). Al contrario, dopo trattamento degli animali con osteosarcoma K7M2, si è ottenuto sia rallentamento della curva di crescita del tumore in tutti gli animali, rispetto ai controlli, che guarigione da tumore nel 20% degli animali trattati. I topi guariti hanno rigettato successivamente un challenge di tumore omologo.

Il secondo obiettivo che ci eravamo posti riguardava la valutazione di combinazioni terapeutiche di L19TNFalpha con chemioterapici diversi dal melphalan. Nel 2007 nel modello di colon carcinoma C51 sono stati comparati i risultati terapeutici ottenuti utilizzando L19mTNFalpha/oxaliplatino (5 microgrammi/g, la più alta dose testata con i più bassi effetti tossici) con quelli derivanti dalla combinazione L19mTNFalpha/melphalan. In entrambi i casi si è avuta guarigione nel 30% degli animali trattati. Nel corso del 2008 si è studiata l'efficacia terapeutica della combinazione L19TNFalpha/gemcitabina (analogo di nucleoside ampiamente usato in clinica) che, riducendo il numero delle mieloidi soppressorie Gr1+CD11b+ in animali con tumore, può aumentare l'attività delle T-CD8+ e potenziare l'effetto di L19TNFalpha. I risultati indicano che l'efficacia di gemcitabina da sola o in combinazione a L19TNFalpha dipende molto dal modello di tumore murino utilizzato. Nel caso del colon carcinoma C51 ad esempio, la gemcitabina cura da sola circa il 20% degli animali ed il 40% in combinazione con L19TNFalpha, raddoppiando l'aspettativa di vita media rispetto al trattamento con L19TNFalpha/melphalan negli animali non curati. In altri modelli come il melanoma è

Consuntivo progetti RC 2006-2008

risultata del tutto inefficace e nel caso del fibrosarcoma WEHI-164 la combinazione L19TNFalpha/gemcitabina induce guarigione in circa l'80% dei topi con tumore come la combinazione L19TNFalpha/melphalan aumentando anche in questo caso l'aspettativa di vita nei topi non curati.

Abbiamo infine valutato (2007-2008) la possibilità di utilizzare L19mTNFalpha come adiuvante in protocolli di vaccinazione che utilizzino come immunogeno omogenato di tumore in un modello di colon carcinoma murino (C51) e in due melanomi murini (B16BL6B17 e B16F1) indotti nei topi singenici. Nel modello di colon carcinoma, ha rigettato il tumore omologo il 12.5% (2/16) degli animali vaccinati con una singola iniezione di omogenato e il 25% (4/16) degli animali vaccinati con omogenato addizionato con L19mTNFalpha. Inoltre, la vaccinazione con omogenato C51 addizionato con L19mTNFalpha, pur non proteggendo dal tumore eterologo WEHI-164 i topi vaccinati, influisce positivamente sull'efficacia della terapia con L19mTNFalpha/melphalan aumentando da 80 a 100 la % dei topi guariti. Nei modelli di melanoma utilizzati, B16B17 e B16F1, il protocollo di vaccinazione con quattro iniezioni di immunogeno ha dato i primi risultati di rilievo. Infatti, tumori palpabili dopo il challenge tumorale sono comparsi con un ritardo di tre giorni rispetto ai controlli nei topi vaccinati con solo omogenato e di una settimana nei topi vaccinati con omogenato addizionato di L19TNFalpha. Inoltre, la terapia con L19TNFalpha/melphalan induce un ulteriore rallentamento nella curva di crescita dei tumori che quasi duplica l'aspettativa di vita rispetto ai controlli.

Elenco pubblicazioni:

Balza E.-Mortara L.-Sassi F.-Monteghirfo S.-Carnemolla B.-Castellani P.-Neri D.-Accolla R.-Zardi L.-Borsi L.
Targeted delivery of tumor necrosis factor alpha to tumor vessels induces a therapeutic T cell mediated immune response that protects the host against syngeneic tumors of different histologic origin.
Clin. Cancer Res. 12:2575/2581, 2006

Berndt A.-Anger K.-Richter P.-Borsi L.-Brack S.-Silacci M.-Franz M.-Wunderlich H.-Gajda M.-Zardi L.-Neri D.-Kosmehl H.
Differential expression of tenascin C splicing domains in urothelial carcinomas of the urinary bladder.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 132:537/546, 2006

Franz M.-Hansen T.-Richter P.-Borsi L.-Bohmer F.-Hyckel P.-Schleier P.-Katenkamp D.-Zardi L.-Kosmehl H.-Berndt A.
Complex formation of the laminin/5 gamma2 chain and large unspliced tenascin C in oral squamous cell carcinoma in vitro and in situ: implications for sequential modulation of extracellular matrix in the invasive tumor front.
Histochem. Cell Biol. 126:125/131, 2006

Franz M.-Hansen T.-Borsi L.-Geier C.-Hyckel P.-Schleier P.-Richter P.-Altendorf A.-Kosmehl H.-Berndt A.
A quantitative co localization analysis of large unspliced tenascin C(L) and laminin 5/gamma2 chain in basement membranes of oral squamous cell carcinoma by confocal laser scanning microscopy.
J. Oral Pathol. Med. 36:6/11, 2007

Mortara L.-Balza E.-Sassi F.-Castellani P.-Carnemolla B.-De Lerma A.-Fossati S.-Tosi G.-Accolla R.-Borsi L.
Therapy induced antitumor vaccination by targeting tumor necrosis factor/alpha to tumor vessels in combination with melphalan.
Eur. J. Immunol. 37:3381/3392, 2007

Berndt An.-Muller J.-Borsi L.-Kosmehl H.-Methner U.-Berndt A.
Reorganisation of the caecal extracellular matrix upon Salmonella infection. Relation between bacterial invasiveness and expression of virulence genes.
Vet. Microbiol. Epub Jul 4, 2008

Leipner C.-Grun K.-Muller A.-Buchdunger E.-Borsi L.-Kosmehl H.-Berndt A.-Janik T.-Uecker A.-Kiehntopf M.-Bohmer F.
Imatinib mesylate attenuates fibrosis in coxsackievirus B3 induced chronic myocarditis.
Cardiovasc. Res. 79:118/126, 2008

Villa A.-Trachsel E.-Kaspar M.-Schliemann C.-Sommavilla R.-Rybak J.-Rosli C.-Borsi L.-Neri D.
A high affinity human monoclonal antibody specific to the alternatively spliced EDA domain of fibronectin efficiently targets tumor neo vasculature in vivo.
Int. J. Cancer 122:2405/2413, 2008

Brevetti:

12.12.2008 Deposito brevetto dal titolo:

Anticorpo monoclonale e suo uso per la identificazione della isoforma oncofetale della fibronectina (b-fn) a scopo diagnostico o terapeutico.

Inventori: Enrica Balza; Laura Borsi; Barbara Carnemolla; Patrizia Castellani; Francesca Sassi