

S.S. Genomica Funzionale

Analisi dei profili di espressione per la classificazione molecolare dei tumori, la predizione della risposta al trattamento e l'identificazione dei meccanismi molecolari della chemioprevenzione

Linea di ricerca: 1 - Oncologia Predittiva

Programma: d - Nuove tecniche di diagnostica biologica e molecolare (test genetici e genetic counselling, DNA microarrays e profili di espressione genica, proteomica)

Responsabile: Ulrich Pfeffer

Partecipanti: Giovanna Angelini

Durata: 2006-2008

Parole chiave: microarray; expression profiling; single nucleotide polymorphism; carcinoma mammario; carcinoma uroteliale; chemioprevenzione

Altre strutture IST: S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi (N. Ferrari); S.C. Oncologia Medica A (L. Del Mastro); S.C. Oncologia Medica B (F. Boccardo); S.C. Oncologia Medica C (P. Piccioli); S.S. Senologia Chirurgica Avanzata (G. Canavese); S.C. Oncologia Urologica (P. Puppo); S.C. Chirurgia Toracica (C. Mosci); S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica (M. Truini, F. Carli, P. Romano); S.C. Epidemiologia Clinica (A. Gennari); S.C. Clinical Trials e Bioetica (L. Boni); S.C. Nanobioteconologie (D. Bordo)

Altri Enti coinvolti: Centro Biotecnologie Avanzate, Genova (P. Perri); DOBIG, Università di Genova (G. Lunardi, M.P. Sormani); Istituto Oncologico Veneto e Azienda Ospedaliera di Padova (S. Indraccolo); CILEA, Milano (L. Milanese); ILET Sezione di Genova, CNR (M. Muselli); Lab. Patogenesi Virale, Università di Torino (S. Landolfo); Ludwig Maximilian Universität Monaco, Germania (B. Bachmeier); Zentrum für Molekularbiologie der Universität Heidelberg, Germania (T. Efferth)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Fondazione CARIGE; MIUR; Ministero della Salute; Compagnia San Paolo

Background

La prima fase di applicazione delle analisi di microarray ed in particolare la generazione di profili di espressione ha dimostrato la potenzialità dell'approccio nell'individuare nuove classi molecolari dei tumori e nella predizione del decorso clinico e della risposta alle terapie. Allo stesso tempo, la tecnologia dei microarray si presta per la caratterizzazione dei meccanismi molecolari dei farmaci.

Le "signatures" generate, ossia gruppi di geni con potere discriminante, devono adesso essere convalidate indipendentemente e riportate a piattaforme "classiche" come la immunocistochemica o la "real time" PCR. Allo stesso tempo occorre indagare circa la natura biologica delle sottoclassi di tumori identificate attraverso l'analisi del profilo di espressione. Particolare interesse riveste la correlazione tra genotipo e fenotipo di espressione sia per incrementare il potere diagnostico, prognostico o predittivo sia per meglio comprendere il contributo del contesto genetico all'insorgenza e alla progressione della malattia neoplastica.

Le stesse tecnologie si prestano inoltre per l'identificazione di endpoint biologici in sperimentazioni cliniche.

L'analisi del profilo di espressione generato in modelli cellulari da sostanze chemiopreventive permette inoltre una profonda comprensione dei meccanismi molecolari d'azione nonché il monitoraggio di effetti collaterali di trattamenti progettati per la prevenzione in soggetti sani.

La natura delle analisi genomiche determina la necessità dello sviluppo di mezzi bio-informatici ad hoc, generati per la risoluzione di problemi specifici.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivi

- correlazione tra genotipo dell'aromatasi, CYP19, e profilo di espressione del carcinoma mammario ER positivo nella donna in menopausa
- convalida di un cluster genico per la predizione della progressione del carcinoma uroteliale
- identificazione dei meccanismi molecolari dell'attività anti-angiogenica degli interferoni
- analisi dei meccanismi molecolari d'azione di chemiopreventivi anti-ossidanti
- sviluppo di "signatures" prognostiche e predittive sulla base di analisi funzionali dei geni coinvolti nel processo di metastatizzazione
- applicazione di algoritmi di "machine learning" alla classificazione degli esoni del genoma umano propedeutica all'introduzione degli array "all exon".

Beneficiari

Pazienti affetti da carcinoma uroteliale. Pazienti affetti da carcinoma mammario.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Per la correlazione tra genotipo dell'aromatasi CYP19 e profilo di espressione del carcinoma mammario abbiamo prodotto i profili di espressione di ca. 60 campioni. Le analisi sono tutto'ora in atto (dati non ancora pubblicati).

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Per la convalida di un cluster genico per la predizione della progressione del carcinoma uroteliale abbiamo ottenuto RNA da circa 100 campioni. L'analisi di tumori Ta e T1a con un follow-up di oltre un anno ha permesso la definizione di un classificatore multigenico predittivo della recidiva che, se confermato in un ulteriore studio di validazione attualmente in atto, potrà essere usato per la decisione sul tipo di intervento chirurgico (dati non ancora pubblicati).

Per l'identificazione dei meccanismi molecolari dell'attività anti-angiogenica degli interferoni abbiamo eseguito studi molecolari in cellule endoteliali ed in fibroblasti umani generando profili di espressione. Analisi approfondite sul gene GBP1 dimostrano che agisce come mediatore e attenuatore dell'effetto interferonico agendo sul sistema NFkB (Indraccolo S. et al., 2007).

I meccanismi molecolari d'azione di anti-ossidanti sono stati studiati in vitro e in vivo per una serie di putativi chemiopreventivi (curcumina, artesunate, acido lipoico, n-acetilcisteina, epigallocatechin gallato) identificando il sistema NFkB ed in particolare le chemokine CXCL1 e 2 come mediatori dell'effetto anti-angiogenico e chemiopreventivo. La curcumina amministrata nella dieta dimostra una significativa attività anti-metastatica nel modello murino della metastasi ematogena (Bachmeier B.E.-Mohrenz I.V. et al., 2008 - Vannini N. et al., 2008 - Larghero P. et al., 2007 - Bachmeier B. et al., 2007 - Albini A. et al., 2006 - Anfosso L. et al., 2006).

Abbiamo sviluppato "signatures" prognostiche funzionalmente definite basate sui geni codificanti per proteine dello spazio extracellulare, sui geni dell'ipossia e sulla base del sistema insulina/IGF, insulin sensitivity signature (ISS). La ISS ha un potere prognostico simile al "recurrence score Oncotype DX" con cui l'abbiamo paragonata. Prevediamo l'utilità della signature, dopo appropriata validazione, per la predizione della responsività a farmaci anti-IGFR nonché per la definizione di interventi sul stile di vita e dieta della paziente di carcinoma mammario. Nell'ambito di questi studi abbiamo inoltre rivelato la presenza di "lineage infidelity" nel carcinoma mammario, un processo finora descritto solo per le malattie oncoematologiche e per il carcinoma ovarico (Bachmeier B.E., Nerlich A.G. et al., 2008 - Albini A. et al., 2008 - Gennari A. et al., 2008 - Bosco M. et al., 2006).

L'applicazione di algoritmi di "machine learning" alle sequenze di confine tra esone ed introne ha permesso di generare una classificazione degli esoni del genoma umano rivelando nuovi elementi di sequenza necessari alla definizione del sito di splicing. La classificazione degli esoni permetterà una migliore interpretazione di dati provenienti dai microarray di ultima generazione (dati non ancora pubblicati).

Abbiamo inoltre partecipato ad uno studio di caratterizzazione funzionale di geni codificanti per putativi canali ionici che mostrano un'espressione altamente variabile nel carcinoma mammario. Questi studi sono propedeutici per l'analisi del ruolo di questi geni nella progressione tumorale nonché come potenziali target terapeutici (Caputo A. et al., 2008 - Indraccolo S. et al., 2007).

Elenco pubblicazioni:

Albini A.-Pfeffer U.

A new tumor suppressor gene: invasion, metastasis, and angiogenesis as potential key targets.
J. Natl. Cancer Inst. 98:800/801, 2006

Anfosso L.-Efferth T.-Albini A.-Pfeffer U.

Microarray expression profiles of angiogenesis related genes predict tumor cell response to artemisinin.
Pharmacogenomics J. 6:269/278, 2006

Bosco M.-Puppo M.-Santangelo C.-Anfosso L.-Pfeffer U.-Fardin P.-Battaglia F.-Varesio L.

Hypoxia modifies the transcriptome of primary human monocytes: modulation of novel immune related genes and identification of CC/chemokine ligand 20 as a new hypoxia inducible gene.
J. Immunol. 177:1941/1955, 2006

Bachmeier B.-Nerlich A.-Iancu C.-Cilli M.-Schleicher E.-Vene' R.-Dell'eva R.-Jochum M.-Albini A.-Pfeffer U.

The chemopreventive polyphenol curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice.
Cell. Physiol. Biochem. 19:137/152, 2007

Indraccolo S.-Pfeffer U.-Minuzzo S.-Esposito G.-Roni V.-Mandrizzato S.-Ferrari N.-Anfosso L.-Dell'eva R.-Noonan D.-Chieco Bianchi L.-Albini A.-Amadori A.

Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells.
J. Immunol. 178:1122/1135, 2007

Larghero P.-Vene' R.-Minghelli S.-Travaini G.-Morini M.-Ferrari N.-Pfeffer U.-Noonan D.-Albini A.-Benelli R.

Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression.
Carcinogenesis 28:1008/1020, 2007

Pedemonte N.-Caci E.-Sondo E.-Caputo A.-Rhoden K.-Pfeffer U.-Di Candia M.-Bandettini R.-Ravazzolo R.-Zegarra O.-Galletta L.

Thiocyanate transport in resting and IL/4 stimulated human bronchial epithelial cells: role of pendrin and anion channels.
J. Immunol. 178:5144/5153, 2007

Albini A.-Mirisola V.-Pfeffer U.

Metastasis signatures: genes regulating tumor microenvironment interactions predict metastatic behavior.
Cancer Metastasis Rev. 27:75/83, 2008

Bachmeier B.-Mohrenz I.-Mirisola V.-Schleicher E.-Romeo F.-Hohneke C.-Jochum M.-Nerlich A.-Pfeffer U.

Curcumin down regulates the inflammatory cytokines CXCL1 and /2 in breast cancer cells via NF(kappa)B.
Carcinogenesis 29:779/789, 2008

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Bachmeier B.E.-Nerlich A.G.-Mirisola V.-Jochum M.-Pfeffer U.
Lineage infidelity and expression of melanocytic markers in human breast cancer.
Int. J. Oncol. 33:1011/1015, 2008

Caputo A.-Caci E.-Ferrera L.-Pedemonte N.-Barsanti C.-Sondo E.-Pfeffer U.-Ravazzolo R.-Zegarra O.-Galiotta L.
TMEM16A, a membrane protein associated with calcium dependent chloride channel activity.
Science 322:590/594, 2008

Gennari A.-Sormani M.-Pronzato P.-Puntoni M.-Colozza M.-Pfeffer U.-Bruzzi P.
HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials.
J. Natl. Cancer Inst. 100:14/20, 2008

Vannini N.-Pfeffer U.-Lorusso G.-Noonan D.-Albini A.
Endothelial cell aging and apoptosis in prevention and disease: E-selectin expression and modulation as a model.
Curr. Pharm. Des. 14:221/225, 2008

Ruolo del potenziale redox extracellulare nella risposta immune e nella progressione neoplastica

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

Programma: a - Infiammazione, immunità innata e tumore

Responsabile: Giovanna Angelini

Durata: 2006-2008

Parole chiave: risposta immune; redox; tioredoxina; HMGB1; tumori

Altre strutture IST: S.C. Biologia Cellulare (Patrizia Castellani, Anna Rubartelli, Massimo Ardy, Laura Delfino); S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini)

Altri Enti coinvolti: Griffith University, Brisbane, Australia (P. Clarke)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; AIRC

Background

Il potenziale redox extracellulare gioca un ruolo fondamentale nel controllo della proliferazione e del differenziamento cellulare ed è noto che un microambiente riducente è essenziale per una corretta risposta immune. Abbiamo precedentemente dimostrato che le cellule dendritiche (DC) sono in grado, in vitro, di modulare le prime fasi della risposta immune, agendo sul potenziale redox intra ed extracellulare. Con la maturazione, le DC acquistano la capacità di captare cistina dal mezzo e rilasciare cisteina, che viene utilizzata dai linfociti T per attivarsi e proliferare. Inoltre, a seguito del contatto con i linfociti T antigene specifici, le DC secernono nell'ambiente extracellulare anche tioredoxina (TRX), una potente ossidoreduttasi citosolica (Angelini G. et al., 2002). La tioredoxina gioca un ruolo fondamentale nella regolazione della proliferazione cellulare, protegge le cellule dallo stress ossidativo ma protegge anche le cellule dall'apoptosi e la sua sovraespressione potrebbe quindi favorire la progressione neoplastica. La tioredoxina è spesso sovraespressa ed a volte secreta anche dalle cellule tumorali anche se il ruolo della tioredoxina secretoria non è stato fino ad ora del tutto chiarito. Infine, è noto che molte citochine, tra cui IL-1 beta, IL-18, FGF-1, HMGB1, MIF, Galectina richiedono condizioni ambientali riducenti per mantenersi funzionali, per la presenza nella loro struttura di cisteine libere che in ambiente ossidante formano ponti disolfuro, con conseguente inattivazione. E' quindi ipotizzabile che la secrezione parallela di tioredoxina, tioli liberi e citochine sensibili all'ossidazione possa contribuire, nel microambiente dove avviene la risposta immune, a prolungare nel tempo l'attività di tali citochine.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo Generale:

Capire il ruolo del redox extracellulare e della TRX secretoria nella risposta immune e nei tumori.

Obiettivi secondari:

1. Identificare quali cellule, oltre alle DC rilascino tioli e TRX nell'ambiente extracellulare, durante la risposta immune
2. Caratterizzare lo stato redox di tessuti linfoidi in animali germ free, dopo iniezione antigenica e in confronto con tessuti non linfoidi.
3. Caratterizzare come diversi microambienti (riducenti o ossidanti, contenenti citochine infiammatorie o danger factors sensibili all'ossidazione quali HMGB1, MIF, Galectina) influenzano il differenziamento dei vari tipi di cellule immuni (DC, NK, T, B) verso fenotipi funzionalmente diversi e quindi il tipo e l'ampiezza della risposta immune.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

4. Chiarire il ruolo svolto dai tioli esogeni sulla proliferazione tumorale "in vivo" e definire il ruolo della TRX nella risposta proliferativa indotta da tioli.

Beneficiari

La comunità scientifica.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Per quanto concerne il primo obiettivo abbiamo dimostrato che durante la risposta immune i linfociti B attivati, in vivo, ma anche dopo attivazione in vitro, sono in grado di rilasciare cisteina nell'ambiente extracellulare. Questa capacità di rilasciare tioli, già nota per le DC è in accordo con la capacità delle cellule B attivate di comportarsi come cellule presentanti l'antigene. I nostri risultati dimostrano quindi che i linfociti B cooperano con le DC nelle prime fasi della risposta immune e cioè quando i linfociti T resting non sono in grado di internalizzare la cistina, perché prive del trasportatore specifico. Abbiamo infatti valutato, mediante PCR, l'espressione del trasportatore della cistina nelle DC, in cellule B resting ed attivate, cellule T resting ed attivate. Prima della loro attivazione, i linfociti T sfruttano la cisteina presente nel microambiente, prodotta appunto dalle cellule presentanti l'antigene DC e linfociti B attivati. Dopo l'attivazione, i linfociti T iniziano rapidamente ad esprimere il trasportatore per la cistina e quindi si svincolano dalla dipendenza dalla cisteina esogena (Castellani P. et al., 2008).

In relazione all'obiettivo 2, abbiamo dimostrato mediante colorazione con Mercury Orange (che permette di evidenziare e di quantificare la presenza di tioli su fettine di tessuto criocongelate) che negli spazi intercellulari dei linfonodi e di altri tessuti linfoidi quali milza e timo è presente una grande quantità di tioli liberi (cisteina e glutatione), al contrario dei tessuti di origine non linfoide, quali fegato e rene che ne sono quasi totalmente privi. Inoltre, la quantità di tioli aumenta sensibilmente nell'animale immunizzato. Tutto ciò suggerisce che la regolazione del redox extracellulare sia un meccanismo ristretto al sistema immune. Abbiamo anche dimostrato che la presenza di tioli liberi nei linfonodi si concentra nella zona T, in vicinanza delle DC ma che dopo attivazione, si localizza nella zona B ed in particolare nei centri germinativi. Infine abbiamo dimostrato che gli organi linfoidi mostrano una colorazione positiva per la tioredoxina, confermando il ruolo di questa ossido reduttasi nella produzione e nel mantenimento della cisteina (Castellani P. et al., 2008).

Per quanto riguarda l'obiettivo 3, tra i danger factors sensibili all'ossidazione, siamo partiti dalla citochina proinfiammatoria HMGB1 che è in grado di indurre la maturazione delle DC. In particolare abbiamo dimostrato che l'interazione tra DC ed NK autologhe provoca attivazione reciproca dei due tipi di cellule. Le cellule NK, attivate dalle DC, secernono HMGB1 che a sua volta induce maturazione delle DC, prevenendone la lisi. Tuttavia cellule NK attivate possono, in alcuni casi, uccidere le DC. Abbiamo quindi dimostrato che esistono cloni differenti di NK con capacità distinte di indurre la maturazione o la lisi delle DC. In particolare, abbiamo visto che la capacità delle NK di indurre maturazione delle DC dipende, nei cloni maturativi, dalla ri-localizzazione di HMGB1 dal nucleo al citoplasma e dalla sua conseguente secrezione. Le cellule NK sono costituite da subset funzionalmente distinti, con diversa capacità di secernere HMGB1 e di indurre maturazione o lisi delle DC autologhe. L'acquisizione di queste caratteristiche dipende fortemente dagli stimoli provenienti dal microambiente tumorale (Semino C. et al., 2007).

Lo studio rivolto a chiarire l'obiettivo 4 è tuttora in corso e prosegue nella SC Biologia Cellulare. Questo studio ha dimostrato che alcuni tumori, tra cui il carcinoma umano a piccole cellule del polmone, over-esprimono MIF e tioredoxina e che i tessuti tumorali posseggono un contenuto di tioli molto maggiore rispetto ai corrispondenti tessuti sani, avvalorando l'ipotesi che il sistema redox abbia un ruolo nello sviluppo dei tumori. Infine, varie linee tumorali di polmone possiedono caratteristiche redox diverse definite dai differenti livelli di tioredoxina espressa e tioli liberi secreti, caratteristiche che correlano positivamente con l'aggressività (Ceccarelli J. et al., 2008)

Elenco pubblicazioni:

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.-Borghesi 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