

S.S. Immunoterapia Cellulare Personalizzata

Studio delle interazioni recettore/ligando che regolano l'attività anti-tumorale dei linfociti NK

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

Programma: c - Alterazioni dell'immunità innata associata ai tumori e meccanismi di sovversione delle risposte antitumorali

Responsabile: Daniela Pende

Partecipanti: Stefania Martini

Durata: 2006-2008

Parole chiave: linfociti NK; KIR; recettori attivatori; ligandi; tumori; leucemie

Altre strutture IST: S.C. Immunologia

Altri Enti coinvolti: IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, (F. Locatelli, R. Maccario); Ospedale dei Bambini "G. Di Cristina", Palermo/Azienda Ospedaliero-Universitaria Meyer, Firenze (M. Aricò); Università degli Studi di Perugia (A. Velardi); Istituto G. Gaslini, Genova (L. Moretta, M. Falco); Università degli Studi di Genova (S. Marcenaro)

Tipologia progetto: clinico-epidemiologica osservazionale

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: AIRC, MIUR FIRB, Ministero della Salute, Compagnia San Paolo, Fondazione Berlucci

Background

Le cellule NK sono regolate nella loro funzione effettrice da recettori inibitori, quali i KIR, specifici per gruppi di alleli HLA di classe I, e da CD94/NKG2A che riconosce HLA-E. La funzione delle cellule NK è poi regolata positivamente da diversi recettori attivatori (NCR, NKG2D, 2B4, DNAM-1), che, qualora stimolati da opportuni ligandi, possono promuovere la citolisi delle cellule che li esprimono. Grazie a una serie di anticorpi monoclonali, prodotti anche dal nostro gruppo di ricerca, abbiamo potuto studiare la regolazione della suscettibilità alla lisi NK di diverse cellule tumorali, sia linee tumorali di diverso istotipo sia cellule tumorali fresche, quali leucemie mieloidi e linfoblastiche, neuroblastomi e mieloma multiplo. Numerose evidenze cliniche e sperimentali hanno dimostrato che il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-TCSE) deve larga parte della sua efficacia ad un'azione immunologica svolta dai linfociti NK del donatore verso la leucemia, detta attività GvL. Questo si spiega con il fatto che, se i linfociti NK interagiscono con cellule allogeniche, è possibile che uno o più KIR non riconoscano il loro ligando (KIR/HLA mismatch) e quindi risultino alloreattivi. La sottopopolazione "alloreattiva" di cellule NK del donatore, capace di uccidere la leucemia, può essere predetta analizzando gli aplotipi HLA-classe I sia nel donatore che nel ricevente, ed è possibile identificarla sulle NK tramite analisi citofluorimetrica combinando opportunamente diversi anticorpi monoclonali. Abbiamo recentemente dimostrato che la grandezza della sottopopolazione alloreattiva NK è proporzionale al grado di citotossicità delle NK contro le cellule leucemiche. Dall'analisi di numerose leucemie si è dimostrata la rilevanza dell'espressione di PVR e Nectina-2 (ligandi di DNAM-1) per la suscettibilità alla lisi NK.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale del progetto consiste nell'applicare le nostre acquisizioni sulle interazioni recettore-ligando che regolano la citotossicità NK nei confronti di cellule tumorali per compiere una ricerca traslazionale di immunoterapia basata su cellule NK. Tre sono i principali campi di ricerca.

- Caratterizzazione fenotipica di cellule tumorali valutando l'espressione di molecole che vengono up-regolate in seguito a stress, quale trasformazione neoplastica e infezione virale, e rappresentano ligandi dei recettori attivatori NK. In particolare abbiamo prodotto mAb anti-MICA (un ligando di NKG2D) e mAb anti-PVR e -Nectina-2 (i ligandi di DNAM-1) che possono rappresentare rilevanti marcatori della cellula tumorale. Inoltre, cercheremo di identificare nuovi marcatori di cellule tumorali, in particolare molecole funzionalmente rilevanti, quali nuovi ligandi di recettori attivatori dei linfociti NK. Al momento sono ad esempio ancora non noti i ligandi degli NCR, che rappresentano recettori NK specifici cruciali nell'induzione della lisi della maggioranza delle cellule tumorali.

- Valutazione di casi di pazienti leucemici dell'età pediatrica che ricevono allo-TCSE in particolare da donatore aploidentico. Nei casi con KIR/HLA mismatch verrà identificata la sottopopolazione NK alloreattiva presente nel donatore e valutando se questa viene mantenuta anche nel paziente dopo ricostituzione immunologica dal trapianto. Parallelamente sarà possibile analizzare la capacità litica delle cellule NK nei confronti sia dei blasti leucemici che di linee cellulari B-EBV esprimenti lo stesso aplotipo HLA del paziente. I blasti leucemici saranno anche studiati fenotipicamente sia per l'espressione di HLA-classe I che dei ligandi noti dei recettori attivatori. Infatti, abbiamo precedentemente dimostrato che la down-regolazione di HLA-classe I e l'up-regolazione dei ligandi di DNAM-1 (PVR e Nectina-2) e/o di NKG2D (ULBP), come osservato in diversi casi, correlano con la suscettibilità alla lisi NK-mediata. Queste analisi saranno correlate con il decorso clinico dei pazienti per valutare l'impatto della presenza di cellule NK alloreattive originate dalle cellule staminali del donatore nel prevenire la ricaduta leucemica. Se favorevole, si valuterà l'opportunità d'indirizzare, quando praticabile, la scelta del donatore verso un individuo NK "incompatibile" con il ricevente. Inoltre, qualora i linfociti NK del donatore di midollo risultino favorevoli come alloreattività e attività anti-

Consuntivo progetti RC 2006-2008

leucemica, sarà possibile utilizzare queste cellule attivate in vitro con IL-2 per approcci immunoterapici finalizzati a contrastare eventuali recidive leucemiche.

- Un altro obiettivo di questo progetto è lo studio di pazienti affetti da linfocitopenia emofagocitica familiare (FHL) in cui è costantemente riportato un difetto dell'attività citotossica. Per una parte dei casi questo difetto è stato dimostrato dipendere da deficit di perforina (mutazioni del gene PRF1), definendo il sottogruppo FHL2, oppure da anomala esocitosi dei granuli (mutazioni del gene Munc13-4), definendo il sottogruppo FHL3. Il contributo del nostro gruppo consisterà nella messa a punto di test diagnostici che possano prontamente indirizzare verso l'identificazione del tipo di anomalia e quindi del gene da studiare per le mutazioni. Inoltre studieremo linfociti NK derivati dai casi con difetti ancora non noti, nel tentativo di rivelare anomalie nelle loro funzioni e quindi suggerire l'analisi di particolari geni alla scoperta di nuove mutazioni. In questi pazienti la risposta immune è disregolata, perché mentre c'è un deficit di attività citotossica c'è una produzione eccessiva di citochine che portano a reazione infiammatoria e iperattivazione macrofagica. In alcuni casi di FHL si riscontra anche l'insorgenza di linfomi o leucemie, che analizzeremo sia fenotipicamente, come espressione di ligandi dei recettori NK, sia funzionalmente, come suscettibilità alla lisi NK-mediata. La terapia dei pazienti con FHL è rappresentata da allo-TCSE per poter ripristinare una corretta risposta citotossica. In attesa del trapianto è possibile prospettare una immunoterapia basata su cellule NK di supporto a questa immunodeficienza.

Beneficiari

La ricaduta di queste ricerche in campo clinico-assistenziale è sicuramente di grande impatto. Sulla base delle analisi del repertorio NK di potenziali donatori di cellule staminali emopoietiche è possibile selezionare quello che ha caratteristiche più favorevoli per un'attività NK anti-leucemica e quindi attuare una GvL in seguito al trapianto. Questo approccio è già in atto nell'Oncoematologia Pediatrica dell'IRCCS S. Matteo di Pavia, per cui forniamo una consulenza per la scelta del donatore in specifici casi. Seguiamo tutti i casi di aplo-TCSE da donatore alloreattivo nei vari tempi post-trapianto, per valutare nel paziente la cinetica di espressione dei vari recettori NK e della grandezza del subset alloreattivo al fine di capire per quanto tempo viene mantenuto.

Abbiamo a disposizione anticorpi monoclonali, da noi prodotti, che possono avere una valenza diagnostica nelle classificazioni di leucemie.

Tramite opportuni test immunologici, siamo coinvolti nella diagnostica della FHL orientando verso specifici test genetici.

Tutte queste attività rientrano in una diagnostica avanzata e la nostra collaborazione con i clinici, specialmente nell'ambito della onco-ematologia, è intensa e costante.

Inoltre, si sta cercando di mettere a punto le procedure per una immunoterapia basata sulle cellule NK di supporto al trapianto per i pazienti leucemici e per i pazienti FHL.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

- Grazie all'utilizzo di mAb ottenuti dal mio gruppo di ricerca, è stato possibile analizzare il ruolo di recettori caratteristici delle cellule NK nell'interazione con specifici ligandi espressi da cellule tumorali (melanoma, carcinoma renale e altri carcinomi), cellule infettate da virus (HIV) e altre cellule del sistema immunitario (cellule dendritiche, macrofagi). Nel 2008, è stato pubblicato uno studio in collaborazione che ha dimostrato che gli inibitori dell'istone diacetilasi (HDI), che stanno emergendo come potenti agenti anti-tumorali, sensibilizzano cellule tumorali per gli effetti citotossici delle cellule NK. Questo dipende dal fatto che HDI determinano, sulla superficie delle cellule tumorali, un aumento dell'espressione di ligandi per i recettori NK attivatori NKG2D e DNAM-1 quindi facilitando il riconoscimento delle cellule tumorali (linee di carcinoma della prostata e medulloblastoma) da parte delle cellule NK. Questi risultati suggeriscono che la combinazione di HDI e immunoterapia può essere un'efficace strategia per terapia anti-cancro (Schmudde et al., Cancer Letters, 2008). Inoltre, la collaborazione con il gruppo di A.S. Fauci all'NIH di Bethesda ha portato alla dimostrazione che la replicazione virale cronica di HIV-1 in individui infetti risulta in varie aberrazioni fenotipiche e funzionali che interferiscono con l'uccisione NK-mediata di blasti autologhi p24^{POS} derivati da cellule T primarie. Infatti, l'uccisione di questi blasti è principalmente NKG2D-dipendente, ma la collaborazione degli NCR è difettiva ed esiste un'alta frequenza di NK anergiche in questi pazienti (Fogli M. et al., PLoS Pathog., 2008).

- L'analisi di trapianti aploidentici di cellule staminali emopoietiche (aplo-TCSE) in pazienti affetti da leucemia acuta ha rivelato che esiste un evidente vantaggio se il donatore è NK-alloreattivo. Questo vantaggio si osserva sia in termini di minor incidenza di relapse leucemico sia di sopravvivenza con cura della malattia. Il mio gruppo si occupa di valutare l'alloreattività NK nel donatore e nel ricevente post-trapianto, sia dal punto di vista fenotipico che funzionale valutando la capacità delle cellule NK di uccidere la leucemia o cellule quali le B-EBV con aplotipo HLA-I correlato. In questo progetto forniamo una consulenza al gruppo di A. Velardi (Perugia) per lo studio di trapianti in pazienti leucemici adulti, mentre collaboriamo con il gruppo di F. Locatelli (Pavia) per i trapianti in pazienti pediatrici. I dati della prima casistica sono stati pubblicati nel 2007, mentre il nostro studio sui pazienti pediatrici è stato pubblicato quest'anno (Pende D. et al., Blood, 2008). In quest'ultimo studio abbiamo rivelato nuove acquisizioni sulle interazioni molecolari che regolano la capacità dei linfociti NK di uccidere blasti leucemici e sui criteri per poter selezionare ottimali donatori di cellule staminali emopoietiche. Inoltre, abbiamo dimostrato che linfociti NK alloreattivi persistono per tempi lunghi post-trapianto. Inoltre, si sta cercando di mettere a punto le procedure per una immunoterapia basata sulle cellule NK di supporto al trapianto. Per i pazienti leucemici, questa immunoterapia effettuata in fase pre-trapianto permetterebbe di ridurre il condizionamento del paziente, in fase post-trapianto avrebbe la finalità di ridurre la ricaduta leucemica.

- I pazienti con mutazioni del gene della perforina (FHL2) e i pazienti con mutazioni del gene Munc13-4 (FHL3) sono caratterizzati da una grave immunodeficienza dovuta a una diminuita capacità delle cellule T CD8 ed NK di uccidere cellule infettate da virus e tumorali (in particolare leucemie e linfomi). Il mio gruppo ha partecipato ad uno studio multi-centrico in cui si è potuto studiare un ampio pannello di pazienti valutando la correlazione genotipo-fenotipo. Il nostro contributo è consistito nell'analisi dell'attività NK per valutare il grado di deficit citotossico in relazione al tipo di mutazione (Trizzino et al., J Med Genet., 2008; Santoro et al., Haematologica, 2008). Partecipiamo anche ad un progetto europeo (FP7, CureHLH) e siamo in particolare coinvolti nel mettere a punto test immunologici di diagnostica avanzata che indirizzino verso specifiche analisi genetiche, seguendo quanto dimostrato nella nostra pubblicazione

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Marcenaro et al., *Blood*, 2006. L'attività di ricerca è poi focalizzata su quei casi che rivelino un deficit della citotossicità in mancanza di mutazioni dei geni noti, alla scoperta di nuovi geni-malattia. Inoltre, si sta valutando la possibilità di inoculare, nei pazienti FHL in attesa del trapianto di midollo, linfociti NK da donatore allogenico per poter vicariare all'immunodeficienza, fornendo cellule con normale attività citotossica che possano affrontare infezioni virali.

Elenco pubblicazioni:

- Marcenaro S.-Gallo F.-Martini S.-Santoro A.-Griffiths G.-Arico' M.-Moretta L.-Pende D.
Analysis of natural killer cell function in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): defective CD107a surface expression heralds Munc13/4 defect and discriminates between genetic subtypes of the disease.
Blood 108:2316/2323, 2006
- Mavilio D.-Lombardo G.-Kinter A.-Fogli M.-La Sala A.-Ortolano S.-Farschi A.-Follmann D.-Gregg R.-Kovacs C.-Marcenaro E.-Pende D.-Moretta A.-Fauci A.
Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV/1 infection.
J. Exp. Med. 203:2339/2350, 2006
- Moretta L.-Bottino C.-Pende D.-Castriconi R.-Mingari M.C.-Moretta A.
Surface NK receptors and their ligands on tumor cells.
Semin. Immunol. 18:151/158, 2006
- Moretta L.-Ferlazzo G.-Bottino C.-Vitale M.-Pende D.-Mingari M.C.-Moretta A.
Effector and regulatory events during natural killer dendritic cell interactions.
Immunol. Rev. 214:219/228, 2006
- Pende D.-Castriconi R.-Romagnani P.-Spaggiari G.-Marcenaro S.-Dondero A.-Lazzeri E.-Lasagni L.-Martini S.-Rivera P.-Capobianco A.-Moretta L.-Moretta A.-Bottino C.
Expression of the DNAM/1 ligands, nectin/2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer dendritic cell interaction.
Blood 107:2030/2036, 2006
- Saez Borderias A.-Guma M.-Angulo A.-Bellosillo B.-Pende D.-Lopez Botet M.
Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus.
Eur. J. Immunol. 36:3198/3206, 2006
- Santoro A.-Cannella S.-Bossi G.-Gallo F.-Trizzino A.-Pende D.-Dieli F.-Bruno G.-Stinchcombe J.-Micalizzi C.-De Fusco C.-Danesino C.-Moretta L.-Notarangelo L.-Griffiths G.-Arico' M.
Novel Munc13/4 mutations in children and young adult patients with haemophagocytic lymphohistiocytosis.
J. Med. Genet. 43:953/960, 2006
- Endt J.-McCann F.-Almeida C.-Urlaub D.-Leung R.-Pende D.-Davis D.-Watzl C.
Inhibitory receptor signals suppress ligation induced recruitment of NKG2D to GM1/Rich membrane domains at the human NK cell immune synapse.
J. Immunol. 178:5606/5611, 2007
- Lionello I.-Mangia P.-Gattinoni L.-Pende D.-Cippone A.-Sensi M.-Rigatti P.-Traversari C.
CD8+ T lymphocytes isolated from renal cancer patients recognize tumour cells through an HLA and TCR/CD3 independent pathway.
Cancer Immunol. Immunother. 56:1065/1076, 2007
- Maccalli C.-Nonaka D.-Piris A.-Pende D.-Rivoltini L.-Castelli C.-Parmiani G.
NKG2D mediated antitumor activity by tumor infiltrating lymphocytes and antigen specific T cell clones isolated from melanoma patients.
Clin. Cancer Res. 13:7459/7468, 2007
- Nedvetzki S.-Sowinski S.-Eagle R.-Harris J.-Vely F.-Pende D.-Trowsdale J.-Vivier E.-Gordon S.-Davis D.
Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses.
Blood 109:3776/3785, 2007
- Ruggeri L.-Mancusi A.-Capanni M.-Urbani E.-Carotti A.-Aloisi T.-Stern M.-Pende D.-Perruccio K.-Burchielli E.-Topini F.-Bianchi E.-Aversa F.-Martelli M.-Velardi A.
Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value.
Blood 110:433/440, 2007
- Boysen P.-Gunnes G.-Pende D.-Valheim M.-Storset A.
Natural killer cells in lymph nodes of healthy calves express CD16 and show both cytotoxic and cytokine producing properties.
Dev. Comp. Immunol. 32:773/783, 2008
- Fogli M.-Mavilio D.-Brunetta E.-Varchetta S.-Ata K.-Roby G.-Kovacs C.-Follmann D.-Pende D.-Ward J.-Barker E.-Marcenaro E.-Moretta A.-Fauci A.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Lysis of endogenously infected CD4+ T cell blasts by rIL/2 activated autologous natural killer cells from HIV infected viremic individuals.
PLoS Pathog. 4: 7;1/7;13, 2008

Pende D.-Marcenaro S.-Falco M.-Martini S.-Bernardo ME.-Montagna D.-Romeo E.-Cognet C.-Martinetti M.-Maccario R.-Mingari M.C.-Vivier E.-Moretta L.-Locatelli F.-Moretta A.
Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and re-definition of inhibitory KIR specificity.
Blood Epub Oct 22, 2008

Santoro A.-Cannella S.-Trizzino A.-Bruno G.-De Fusco C.- Notarangelo L.-Pende D.-Griffiths G.-Arico' M.
Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defect in patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3.
Haematologica 93: 1086/1090, 2008

Schmudde M.-Braun A.-Pende D.-Sonnemann J.-Klier U.-Beck JF.-Moretta L.-Bröker BM.
Histone deacetylase inhibitors sensitize tumour cells for cytotoxic effects of natural killer cells.
Cancer Lett. Epub Aug 19, 2008

Trizzino A.-Zur Stadt U.-Ueda I.-Risma K.-Janka G.-Ishii E.-Beutel K.-Sumegi J.-Cannella S.-Pende D.-Mian A.-Henter J.-Griffiths G.-Santoro A.-Filipovich A.-Arico' M.
Genotype phenotype study of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis due to perforin mutations.
J. Med. Genet. 45:15/21, 2008