

S.C. Immunologia

Analisi dei meccanismi di modulazione positiva e negativa sull'attività effettrice e regolatoria delle cellule NK umane, messi in atto in condizioni fisiologiche e di malattia neoplastica

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

Programma: a - Infiammazione, immunità innata e tumore

Responsabile: Massimo Vitale

Partecipanti: Raffaella Augugliaro

Durata: 2006-2008

Parole chiave: cellule NK; DC; recettori; regolazione; IDO; LDGL

Altri Enti coinvolti: Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Genova (A. Moretta); Istituto G. Gaslini, Genova (L. Moretta); Dipartimento di Ematologia e Immunologia Clinica, Università di Padova (G.P. Semenzato, R. Zambello)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: AIRC; Compagnia San Paolo; Ministero della Salute

Background

Le cellule Natural Killer (NK) sono linfociti capaci di uccidere cellule tumorali e cellule infettate da virus. La loro funzione è regolata in maniera complessa da un nutrito gruppo di recettori di superficie. Fra questi, NKG2A e alcuni Killer Ig-like Receptors (KIR), specifici per alleli HLA di classe I, controllano negativamente l'attività NK, mentre NKp46, NKp30, NKp44, DNAM-1 e NKG2D svolgono un ruolo di attivazione e sono coinvolti nel riconoscimento di cellule tumorali e/o ligandi di origine virale. Le cellule NK svolgono anche un ruolo nella regolazione della risposta immune specifica. Attraverso i propri recettori (in particolare NKp30) le cellule NK interagiscono con le DC, contribuiscono alla loro maturazione e, in ultima analisi favoriscono una risposta specifica polarizzata di tipo Th1. La loro azione si svolge sia attraverso la secrezione di citochine pro-infiammatorie (IFN-gamma e TNF-alpha), che attraverso il killing di quelle DC che non vanno incontro ad adeguata maturazione. Le DC, a loro volta, inducono le cellule NK a proliferare e a produrre citochine. Alterazioni del fenotipo e/o della funzionalità delle cellule NK, potrebbero quindi rappresentare nuovi meccanismi di "tumor escape" o giocare un ruolo nella patogenesi di malattie caratterizzate da squilibri immunologici. I nostri obiettivi erano quindi quelli di identificare possibili meccanismi di modulazione dell'attività NK e di condurre un'analisi fenotipico-funzionale in malattie caratterizzate da squilibri immunologici quali le allergie o patologie, come nella Malattia Linfoproliferativa dei Linfociti Granulati di tipo NK (NK-LDGL), in cui le stesse cellule NK erano oggetto di attiva ed abnorme proliferazione (spesso oligo- o poli-clonale). I meccanismi eziopatogenetici alla base questa malattia sono tuttora oggetto di intensi studi che si basano fra l'altro sull'analisi fenotipica e funzionale delle popolazioni cellulari oggetto dell'espansione.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

- Identificazione dei fenomeni di modulazione dell'attività effettrice e regolatoria delle cellule NK come meccanismi di "tumor escape" o coinvolti nella patogenesi di malattie caratterizzate da squilibri immunologici.
- Caratterizzazione delle interazioni molecolari coinvolte nelle interazioni regolatorie delle cellule NK con altre cellule del sistema dell'immunità innata (in particolare cellule dendritiche) e con cellule tumorali.

Beneficiari

Servizio Sanitario Nazionale e comunità scientifica.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

A) Identificazione di fattori capaci di modulare l'attività NK.

- IDO. I nostri studi si sono focalizzati prevalentemente sull'analisi di possibili fenomeni di modulazione dell'attività NK mediati dall'enzima IDO. Abbiamo dimostrato che L-kinurenina, un catabolita del triptofano prodotto in seguito all'attività enzimatica di IDO, influenza il processo di attivazione delle cellule NK indotto da diverse citochine. In particolare L-kinurenina interferisce specificamente con l'incremento di espressione e di funzione di NKp46 e NKG2D indotta da IL-2. L'up-regolazione di recettori attivatori quali NKp46, NKp44, NKp30 e NKG2D rappresenta uno dei meccanismi attraverso i quali le cellule NK, in risposta a IL-2, acquisiscono un alto potenziale citotossico ed ampliano il proprio spettro d'azione nei confronti di target tumorali. IDO quindi può essere sfruttato da cellule neoplastiche (che spesso lo esprimono costitutivamente) per sopprimere l'attività NK anti-tumorale, ma può anche essere indotto su cellule del sistema immune (macrofagi, eosinofili, DC) come meccanismo di regolazione. A tal proposito sono in corso studi per caratterizzare il ruolo di IDO nelle interazioni regolatorie che possono favorire l'instaurarsi della tolleranza materno/fetale in cellule immunitarie che popolano la decidua quali le DC e cellule NK.

- Ruolo del microambiente tumorale nella modulazione dell'attività NK. Gli studi sono in corso. Risultati preliminari indicano che i fibroblasti derivati da melanomi possono inibire la funzione NK.

B) Analisi molecolare e funzionale del cross-talk NK/DC in patologie caratterizzate da squilibri immunologici.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

- Allergie respiratorie. Questo studio ci ha permesso di valutare il "cross talk" NK/DC in patologie con forte componente TH2. I dati ottenuti possono essere così riassunti: 1) in pazienti allergici vi è una significativa riduzione in circolo di quella popolazione di cellule NK (a fenotipo CD56++CD16+/-) capaci di produrre grosse quantità di IFN-gamma in risposta ad interazione con DC; 2) le cellule NK da pazienti allergici mostrano una ridotta capacità di promuovere maturazione delle DC e di eliminare (attraverso il killing) le DC immature. Queste osservazioni, indicano nei pazienti allergici, un deficit nella capacità della popolazione NK di promuovere, attraverso una corretta interazione con le DC, un'adeguata polarizzazione della risposta di tipo TH1.

- Analisi fenotipica e funzionale dei GL proliferanti in corso di NK-LDGL. I nostri studi hanno permesso di identificare nei pazienti LDGL da noi analizzati un deficit nella capacità delle NK GL nel regolare il processo di maturazione delle DC. Ciò sembra determinato dal fatto che le cellule NK dei pazienti mostrano una ridotta espressione di NKp30 (il recettore maggiormente coinvolto nell'interazione NK/DC) ed una diminuita capacità di uccidere DC immature. Questo fenomeno potrebbe giocare un ruolo nella patogenesi in quanto le DC promuovono la proliferazione delle cellule NK, ed il loro accumularsi potrebbe sostenere l'espansione cronica di NK GL. Questo studio ci ha anche permesso d'identificare DNAM-1 come recettore capace di cooperare con NKp30 nelle interazioni NK/DC che favoriscono la maturazione delle DC (manoscritto sottomesso).

C) Analisi ed identificazione delle molecole coinvolte nelle interazioni delle cellule NK con altre cellule del sistema dell'immunità innata e con cellule tumorali.

- Identificazione di DNAM-1 come recettore che coopera con NKp30 nell'indurre rilascio da parte delle cellule NK di TNF-alfa, citochina che favorisce la maturazione delle DC (vedi sopra).

- Identificazione e caratterizzazione funzionale di KIR2DS5, un membro della famiglia dei KIR. Grazie alla generazione di un nuovo mAb è stato possibile dimostrare che il recettore codificato dal gene KIR2DS5 è espresso da una sottopopolazione di cellule NK ed è funzionale in quanto, se ingaggiato dal mAb, attiva la funzione effettrice delle cellule NK.

- Sono attualmente in corso studi atti ad individuare nuovi marcatori di cellule tumorali possibilmente coinvolti in interazioni con cellule NK.

Prodotti biotecnologici. Nel corso del 2008 è stato stipulato un contratto con la ditta "Miltenyi Biotec" per la vendita dell'ibridoma FM95 che produce il mAb anti-CD86, da noi generato.

Elenco pubblicazioni:

Della Chiesa M.-Carlomagno S.-Frumento G.-Balsamo M.-Cantoni C.-Conte R.-Moretta L.-Moretta A.-Vitale M.
The tryptophan catabolite L/kynurenine inhibits the surface expression of NKp46 and NKG2D activating receptors and regulates NK cell function.
Blood 108:4118/4125, 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

Della Chiesa M.-Romeo E.-Falco M.-Balsamo M.-Augugliaro R.-Moretta L.-Bottino C.-Moretta A.-Vitale M.
Evidence that the KIR2DS5 gene codes for a surface receptor triggering natural killer cell function.
Eur. J. Immunol. 38:2284/2289, 2008

Scordamaglia F.-Balsamo M.-Scordamaglia A.-Moretta A.-Mingari M.C.-Canonica G.-Moretta L.-Vitale M.
Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases.
J. Allergy Clin. Immunol. 121:479/485, 2008

Caratterizzazione degli effetti inibitori dei farmaci steroidei sulle cellule Natural Killer

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

Programma: a - Infiammazione, immunità innata e tumore

Responsabile: Maria Cristina Mingari

Partecipanti: Raffaella Augugliaro

Durata: 2006-2008

Parole chiave: linfociti NK; citotossicità; recettori attivatori; trasduzione del segnale

Altri Enti coinvolti: Istituto G. Gaslini, Genova; Dimes, Università di Genova

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Compagnia San Paolo

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Background

Le cellule NK possono esercitare un potente effetto anti-tumorale nelle fasi precoci della risposta immune contro i tumori. Le cellule NK infiltranti il tumore infatti, possono mediare un effetto citotossico diretto contro le cellule tumorali ed inoltre sono in grado di produrre citochine come IL8, IFN-gamma, TNF-alfa che giocano un ruolo importante per la chemiotassi e l'attivazione dei linfociti T e più in generale sono molecole primarie nei processi infiammatori anche legati alla trasformazione tumorale. Recentemente è stato dimostrato che le cellule NK possono giocare un ruolo chiave nel controllo delle recidive leucemiche che si hanno dopo il trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche. In base a queste premesse sono in corso studi preclinici atti a valutare la possibilità di utilizzo di cellule NK attivate in vitro in protocolli sperimentali di immunoterapia, specie nel caso di patologie emato-oncologiche. E' importante valutare situazioni in vivo in cui i trattamenti farmacologici possano alterare l'attività funzionale delle cellule NK. Recentemente infatti abbiamo analizzato la ricostituzione immunologica in pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo per malattie emato-oncologiche; i risultati hanno evidenziato che i pazienti trattati con metilprednisolone, in seguito ad insorgenza di GvHD, avevano un repertorio NK alterato sia dal punto di vista fenotipico che funzionale. Questi dati sono confortati anche da analisi in vitro su cellule NK isolate da donatori sani e coltivate in presenza di metilprednisolone. I farmaci steroidei sono utilizzati in moltissimi campi della clinica e sono caratterizzati da un generale effetto immunosoppressivo: diventa importante verificare se questo alteri le caratteristiche anti-tumorali delle cellule NK.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Poiché in letteratura ci sono pochi e contrastanti dati che riguardano gli effetti del trattamento con steroidi sulle cellule NK ci proponiamo di:

1. Valutare la suscettibilità delle cellule NK al trattamento con farmaci steroidei attraverso il confronto tra dati acquisiti ex-vivo da pazienti sottoposti a questi trattamenti farmacologici e dati ottenuti trattando in vitro con farmaci steroidei cellule NK isolate da donatori sani.
2. Caratterizzare dal punto di vista fenotipico, funzionale (attività citotossica, produzione di citochine) e molecolare (trasduzione del segnale) gli effetti, sulle cellule NK, di steroidi diversi (metilprednisolone e idrocortisone).
3. Dato che l'effetto inibitorio sulle cellule NK da parte dei farmaci steroidei potrebbe alterare anche la loro capacità di migrazione dal sangue periferico ai tessuti, intendiamo verificare anche quest'aspetto poiché l'incapacità di migrare potrebbe impedire a queste cellule di infiltrare i tessuti infiammati e il tumore.

Beneficiari

Pazienti oncologici ed emato-oncologici sottoposti a trattamenti immunosoppressivi tali da poter creare complicazioni al decorso clinico in termini di repertorio linfocitario e riduzione della immunosorveglianza.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Abbiamo verificato che esiste una diversa suscettibilità all'effetto del Metilprednisolone (MePDN) da parte di cellule NK coltivate in presenza di IL-2 o IL-15. Infatti, il blocco proliferativo e l'induzione di apoptosi mediante trattamento con MePDN, è superiore in presenza di IL-2. Questo correla con una maggior efficacia dello steroide di inibire la fosforilazione di molecole cruciali per la trasduzione intracitoplasmatica dei segnali d'attivazione cellulare come STAT-1, STAT-3 e STAT-5. Dal punto di vista funzionale l'effetto dello steroide era simile sia in presenza di IL-15 che IL-2. Il MePDN inibisce l'attività citotossica modulando l'espressione dei recettori attivatori NKp44 ed NKp30. Altri importanti recettori attivatori (NKG2D, DNAM, 2B4), pur rimanendo ben espressi in membrana, in presenza dello steroide non attivano la citolisi NK-mediata. La quantità di granuli contenenti Perforina, Granzyme A e B non varia tra le cellule trattate e non, ma lo steroide inibisce la fosforilazione delle molecole ERK 1 e 2, responsabile dell'esocitosi dei granuli liti stessi. Quindi l'inibizione dell'attività citotossica potrebbe essere dovuta alla modulazione di recettori di membrana ed al blocco dell'esocitosi dei granuli.

Confrontando i dati precedentemente acquisiti sui pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche e i risultati ottenuti *in vitro* abbiamo ritenuto importante verificare se MePDN potesse alterare il normale differenziamento *in vitro* di cellule NK a partire da precursori ematopoietici CD34+.

La presenza di MePDN a dosi farmacologiche è capace di accelerare il differenziamento dei precursori ematopoietici in cellule Natural Killer. Infatti, in presenza dello steroide, i precursori linfocitari acquisiscono più velocemente l'espressione dei recettori attivatori NKp46, 2B4, DNAM-1 ed NKG2D rispetto ai precursori coltivati in terreno di controllo. Inoltre, alte percentuali dei precursori differenziatisi in presenza di MePDN esprimono la molecola LFA-1 e ciò correla con un incremento dell'attività citotossica. Il MePDN esercita invece un effetto inibitorio sulla produzione di qualsiasi citochina da parte delle cellule NK immature. In particolare il trattamento steroideo inibisce la produzione di IL-13 ed IL-8. L'analisi delle sottopopolazioni di precursori purificati ha confermato che le NK immature producono alte quantità di IL-8 in assenza di steroide. IL-8 è un'importante citochina con attività chemotattiche, pro-angiogeniche e modulatorie del differenziamento mieloidi: il fatto che MePDN ne inibisca la produzione potrebbe essere legato alla sua attività farmacologica anti-infiammatoria o potrebbe essere correlabile al processo di differenziamento NK. Un altro importante effetto svolto dal MePDN sui precursori ematopoietici è l'inibizione del differenziamento dei precursori mieloidi. Infatti, l'aggiunta del MePDN comporta la conversione di precursori mieloidi in precursori linfocitari di tipo NK. Questo fenomeno potrebbe avere risvolti importanti in vivo: ci riferiamo ai pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche che spesso vengono trattati con farmaci immunosoppressori come MePDN per curare la "Graft versus Host Disease". Un simile blocco del differenziamento dei precursori mieloidi potrebbe avere conseguenze importanti sul ripopolamento leucocitario del paziente e sul suo decorso clinico.

Lo steroide ha evidenziato un'attività dicotomica nei confronti delle NK mature ed immature. Unico punto in comune tra le due popolazioni è l'inibizione indotta dal MePDN della produzione di citochine e la modulazione di alcune importanti recettori di superficie come CD161 e CD31 mentre quella di LFA-1 non veniva alterata. Queste molecole sono coinvolte nei processi di adesione e migrazione attraverso l'endotelio da parte delle cellule NK. Infatti l'endotelio può esprimere entrambi i ligandi (CD31 legame omofilo con CD31, LIT-1 ligando CD161) per queste molecole, oltre che per LFA-1 (ICAM-1 o CD54). Tuttavia nei nostri esperimenti le cellule NK attivate, sia mature che immature, hanno evidenziato una limitata capacità di migrare. I risultati comunque suggerirebbero che CD161 possa giocare un ruolo nell'adesione e migrazione transendoteliale, soprattutto delle cellule di cellule NK immature. Inoltre la presenza di farmaci steroidei sembra inibire pesantemente il processo di migrazione.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Elenco pubblicazioni:

Chiossone L.-Vitale C.-Cottalasso F.-Moretti S.-Azzarone B.-Moretta L.-Mingari M.C.
Molecular analysis of the methylprednisolone mediated inhibition of NK cell function: evidence for different susceptibility of IL/2 versus IL/15 activated NK cells.
Blood 109:3767/3775, 2007

Vitale C.-Cottalasso F.-Montaldo E.-Moretta L.-Mingari M.C.
Methylprednisolone induces preferential and rapid differentiation of CD34+ cord blood precursors toward NK cells.
Int. Immunol. 20:565/575, 2008

Analisi molecolare della apoptosi degli effettori citotossici indotta dal tumore: ruolo dello stroma neoplastico

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

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

Responsabile: Alessandro Poggi

Durata: 2006-2008

Parole chiave: apoptosi; effettori citotossici; natural killer cells; HLA solubile; Fas/FasL; cellule stromali

Altri Enti coinvolti: Lab. di Immunologia Clinica, Dip. di Medicina Interna, Università di Genova (P. Contini); Medicina Interna ad Indirizzo Immunologico, Dip. di Medicina Interna, Università di Genova (F. Indiveri); Clinica Ematologia, Università di Genova (M. Gobbi); Istituto Scientifico San Raffaele, Milano (M. R. Zocchi)

Tipologia progetto: clinico epidemiologica osservazionale

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: AIRC; Compagnia San Paolo; Ministero della Salute

Background

E' stato dimostrato che il sistema immunitario contribuisce a limitare l'insorgenza di neoplasie sia attraverso gli effettori della immunità naturale, tra cui i linfociti natural killer (NK), sia attraverso gli effettori della immunità acquisita (linfociti T specifici). Tuttavia, numerose evidenze cliniche e sperimentali indicano che le neoplasie sfuggono al controllo del sistema immunitario e che questo è dipendente, almeno in parte, dalla liberazione da parte del tumore di fattori solubili quali citochine immunoregatorie o dalla assenza sul tumore del corretto repertorio dei ligandi per i recettori espressi dai linfociti implicati nel riconoscimento della neoplasia stessa. Le cellule neoplastiche possono produrre fattori solubili come il TGF-beta inibenti l'attività citolitica degli effettori anti-tumorali o il Fas ligando che interagendo con Fas alla superficie del linfocita ne induce la morte cellulare programmata (PCD). E' stato dimostrato che i linfociti effettori T alfabeta CD8+, T gammadelta CD8+ e le cellule NK vengono indotti alla PCD dagli antigeni di istocompatibilità (HLA-I) solubili tramite l'ingaggio dei suoi specifici recettori rappresentati dal CD8 o dalle isoforme di tipo attivatorio di membri della famiglia degli IRS. Inoltre, l'ingaggio, da parte della cellula tumorale, di recettori di tipo stimolatorio denominati Natural Cytotoxicity Receptors (NCR) espressi alla superficie dell'effettore citotossico NK ne inducono la PCD sempre tramite la liberazione di FasL. Questi dati suggeriscono che anche l'HLA-I solubile e/o la attivazione della cellula effettrice potrebbe essere rilevante per la cellula tumorale al fine di eludere il controllo del sistema immunitario. E' noto che lo stroma del tessuto in cui il tumore si sta sviluppando può svolgere un ruolo immunoregatorio. Infatti, esso è ricco di cellule mesenchimali staminali (MSC) che in vitro esercitano un potente effetto immunosoppressivo, il cui meccanismo molecolare non è ancora completamente chiarito. Un ruolo è stato attribuito sia a fattori solubili (TGF-beta, HGF, IDO, e PGE2) che al contatto diretto tra linfocita e MSC. Non è ancora stato definito con certezza se la attività immunosoppressiva sia una peculiarità di cellule indifferenziate quali le MSC o una caratteristica comune con le cellule stromali mature presenti nei differenti tessuti connettivi originati dalle MSC.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Definizione delle strutture molecolari e dei meccanismi biochimici coinvolti nell'induzione di apoptosi degli effettori citotossici da parte delle cellule tumorali e analisi del ruolo immunosoppressivo delle cellule mesenchimali stromali. Scopo finale del progetto è quello di identificare meccanismi sui quali sia possibile intervenire farmacologicamente per inibire la immunosoppressione che accompagna la maggior parte delle neoplasie.

Il progetto si articola in diversi obiettivi secondari:

i) misurazione di sHLA-I, sFasL e in seguito di sMIC-A nei sieri di pazienti affetti da AML, CLL e NHL e verifica della funzione in vitro di tali fattori solubili; ii) definizione della capacità di HLA-I e di molecole MHC-correlate quali MIC-A espresse alla superficie delle cellule neoplastiche di indurre apoptosi delle cellule effettrici in vitro ed ex-vivo, tramite l'analisi dei linfociti isolati dal sangue periferico, midollo osseo e linfonodi dei pazienti sopra menzionati; iii) analisi dei possibili meccanismi di inibizione degli effettori e della loro apoptosi indotta dalle cellule stromali (normali o derivate dal tessuto neoplastico); iv) definizione delle vie biochimiche di induzione di apoptosi; v) regolazione farmacologica.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Beneficiari

Pazienti affetti da diverse malattie mielo e linfoproliferative che possono avvalersi della stimolazione del sistema immunitario per limitare la espansione della neoplasia.

La definizione dei bersagli molecolari coinvolti nella induzione della apoptosi dei linfociti anti-tumorali come anche la identificazione dei fattori responsabili della immunosoppressione esercitata dalle cellule mesenchimali stromali dovrebbe fornire le basi per la formulazione di protocolli di immunoterapia atti ad evitare o a limitare i meccanismi di sfuggita dal controllo del sistema immunitario messi in atto dal tumore nel corso di leucemia mieloide acuta, leucemia linfoide cronica e linfomi non-Hodgkin.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Abbiamo valutato la presenza di antigeni di classe I solubili (sHLA-I) nel siero di pazienti affetti da AML (n=20) o da CLL (n=40) e in donatori sani (n=20). Nelle AML abbiamo riscontrato un forte aumento del sHLA-I rispetto ai donatori sani (ambito di variazione 0.7-1.7mcg/ml nelle AML rispetto a 0.1-0.6 mcg/ml nei sani). Al contrario i pazienti BCLL non presentavano un aumento significativo del sHLA-I nel siero. Il sHLA-I isolato dai pazienti AML era in grado di indurre apoptosi in effettori citotossici CD8+ tramite la liberazione di Fas ligando (FasL). Inoltre, le caspasi 3 e 9 risultavano attivate ed il DNA frammentato negli effettori citotossici CD8+ in vivo indicando che queste cellule stavano morendo mediante morte cellulare programmata (PCD). Lo studio delle cellule stromali isolate da diversi tessuti normali (midollo osseo, linfonodi, timo, tonsille, cute) o da biopsie chirurgiche di linfonodi di pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin o da neoplasia polmonari (n=4) o neoplasie mammarie (n=3) ha dimostrato che queste esprimono una serie di marcatori (SH2, SH3, SH4, ICAM1, LFA3, MICA, ULBP1, ULPB2, ULBP3, CD44, CD29, HLA-I) comuni indicando che se delle differenze tra le diverse popolazioni stromali esistono, queste non riguardano i marcatori analizzati. Esperimenti preliminari inoltre dimostrano che sia le popolazioni isolate da biopsie tumorali che da tessuto sano, a rapporti equivalenti con i linfociti, sono in grado di inibire la proliferazione linfocitaria in MLR come quella indotta da anticorpi monoclonali anti-CD3 o da superantigeni quali TSST1 SEB e SEC. Ciò suggerisce che ogni popolazione stromale è in grado di esercitare un effetto immunosoppressivo. L'immunosoppressione viene esercitata anche sulla generazione di linfociti LAK (Lymphokine activated killer) grazie ad un blocco della traduzione del segnale indotto da IL2 o IL15 su linfociti natural killer (NK) che previene la espressione ad alti livelli di molecole coinvolte nella uccisione di cellule neoplastiche (blocco dell'aumento di espressione di NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, e CD69). Infine abbiamo dimostrato che la co-coltura di cellule stromali derivate da midollo osseo con linfociti isolati dal sangue periferico determina la generazione di cellule regolatorie CD4+ o CD8+ che possono esprimere o no il fattore di trascrizione Foxp3. Ciò potrebbe amplificare l'effetto immunosoppressivo che si evidenzia in vivo dopo somministrazione di cellule stromali da midollo osseo impiegato nel trattamento della reazione del trapianto contro l'ospite. Il trattamento con inibitori della sintesi del colesterolo quali le statine, che sono applicati già in clinica nella terapia del mieloma multiplo, determina una riduzione dell'effetto inibitorio sulla proliferazione e attivazione linfocitaria esercitata dallo stroma. L'uso in clinica di tali inibitori potrebbe quindi avere un ruolo nella riduzione dell'effetto immunosoppressivo mediato dallo stroma. Dato che lo stroma è in grado di produrre collagene ci siamo focalizzati sulla molecola LAIR-1 (Leukocyte Associated Ig-Like Receptor 1) che è un potenziale ligando del collagene ed abbiamo dimostrato che l'ingaggio di LAIR-1 evoca un segnale inibitorio. Questo determina una forte inibizione della attivazione linfocitaria che esita nel blocco della proliferazione o nella inibizione della attività secretoria. La espressione di tale marcatore risulta fortemente ridotta o assente nelle CLL ad alto rischio mentre è espressa a livelli simili al soggetto sano nei pazienti a basso rischio. Nelle CLL che non esprimono LAIR-1 non si ha, dopo il suo ingaggio, un blocco della proliferazione allo stimolo mediato dal recettore per l'antigene. La riduzione od assenza di LAIR-1 sulle cellule neoplastiche potrebbe ridurre l'effetto immunosoppressivo esercitato dallo stroma nei confronti della cellula neoplastica. La analisi citofluorimetrica di una serie di linfomi non Hodgkin ha confermato che LAIR-1 non è espresso sulla cellula B neoplastica rinforzando l'ipotesi che le cellule neoplastiche possano sfuggire al controllo della proliferazione esercitato dallo stroma.

Elenco pubblicazioni:

Poggi A.-Zocchi M.

Antigen presenting cells and stromal cells trigger human natural killer lymphocytes to autoreactivity: evidence for the involvement of natural cytotoxicity receptors (NCR) and NKG2D.
Clin. Dev. Immunol. 13:325/336, 2006

Poggi A.-Zocchi M.

HIV/1 Tat triggers TGF/beta production and NK cell apoptosis that is prevented by pertussis toxin B.
Clin. Dev. Immunol. 13:369/372, 2006

Scielzo C.-Camporeale A.-Geuna M.-Alessio M.-Poggi A.-Zocchi M.-Chilosi M.-Caligaris F.-Ghia P.

ZAP/70 is expressed by normal and malignant human B cell subsets of different maturational stage.
Leukemia 20:689/695, 2006

Catellani S.-Poggi A.-Bruzzone A.-Dadati P.-Ravetti J.-Gobbi M.- Zocchi M.

Expansion of V(delta)1 T lymphocytes producing IL/4 in low grade non Hodgkin lymphomas expressing UL/16 binding proteins.
Blood 109:2078/2085, 2007

Contini P.-Zocchi M.-Pierri I.-Albarelo A.-Poggi A.

In vivo apoptosis of CD8+ lymphocytes in acute myeloid leukemia patients: involvement of soluble HLA/I and Fas ligand.
Leukemia 21:253/260, 2007

Poggi A.-Catellani S.-Fenoglio D.-Borsellino G.-Battistini L.- Zocchi M.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

- Adhesion molecules and kinases involved in gamma/delta T cells migratory pathways: implications for viral and autoimmune diseases.
Curr. Med. Chem. 14:3166/3170, 2007
- Poggi A.-Prevosto C.-Zancolli M.-Canevali P.-Musso A.-Zocchi M.
NKG2D and natural cytotoxicity receptors are involved in natural killer cell interaction with self antigen presenting cells and stromal cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1109:47/57, 2007
- Poggi A.-Zancolli M.-Catellani S.-Borsellino G.-Battistini L.-Zocchi M.
Migratory pathways of gammadelta T cells and response to CXCR3 and CXCR4 ligands. Adhesion molecules involved and implications for multiple sclerosis pathogenesis.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1107:68/78, 2007
- Poggi A.-Zocchi M.
Human natural killer lymphocytes through the engagement of natural cytotoxicity receptors and NKG2D can trigger self aggression.
Autoimmun. Rev. 6:295/299, 2007
- Prevosto C.-Zancolli M.-Canevali P.-Zocchi M.-Poggi A.
Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell lymphocyte interaction.
Haematologica 92:881/888, 2007
- Ropolo M.-Degan P.-Foresta M.-D'errico M.-Lasiglie' D.-Dogliotti E.-Casartelli G.-Zupo S.-Poggi A.-Frosina G.
Complementation of the oxidatively damaged DNA repair defect in Cockayne syndrome A and B cells by Escherichia coli formamidopyrimidine DNA glycosylase.
Free Radic. Biol. Med. 42:1807/1817, 2007
- 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
- Lombardi M.-Terrazzano G.-Cosentini E.-Gargiulo L.-Risitano A.-Camerlingo R.-Sica M.-Aufiero D.-Poggi A.-Pirozzi G.-Luzzatto L.-Rotoli B.-Notaro R.-Alfinito F.-Ruggiero G.
Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: significant association with specific HLA/A, /B, /C, and /DR alleles in an Italian population.
Hum. Immunol. 69:202/206, 2008
- Patterson S.-Chaidos A.-Neville D.-Poggi A.-Butters T.-Roberts I.- Karadimitris A.
Human invariant NKT cells display alloreactivity instructed by invariant TCR/CD1d interaction and killer Ig receptors.
J. Immunol. 181:3268/3276, 2008
- Poggi A.-Zocchi M.
Role of bone marrow stromal cells in the generation of human CD8(+) regulatory T cells.
Hum. Immunol. Epub Sep 22, 2008
- Ponassi R.-Biasotti B.-Tomati V.-Bruno S.-Poggi A.-Malacarne D.- Cimoli G.-Salis A.-Pozzi S.-Migliano M.-Damonte G.-Cozzini P.- Spyraiki F.-Campanini B.-Bagnasco L.-Castagnino N.-Tortolina L.- Mumot A.-Frassoni F.-Daga A.-Cilli M.-Piccardi F.-Monfardini I.- Perugini M.-Zoppoli G.-D'arrigo C.-Pesenti R.-Parodi S.
A novel Bim/BH3 derived Bcl/X(L) inhibitor. Biochemical characterization, in vitro, in vivo and ex vivo anti leukemic activity.
Cell Cycle 7:3211/3224, 2008
- Poggi A.-Catellani S.-Bruzzone A.-Caligaris F.-Gobbi M.-Zocchi M.
Lack of the leukocyte associated Ig/like receptor/1 expression in high risk chronic lymphocytic leukaemia results in the absence of a negative signal regulating kinase activation and cell division.
Leukemia 22:980/988, 2008
- Viale M.-Petrillo G.-Maccagno M.-Castagnola P.-Aiello C.-Cordazzo C.-Mariggio' M.-Jadhav S.-Bianchi L.-Leto G.-Rizzato E.-Poggi A.- Spinelli D.
Sensitivity of different resistant tumour cell lines to the two novel compounds (2Z,4E)/2/methylsulfanyl/5/(1/naphthyl)/4/nitro/2,4 /pentadienoate and (1E,3E)/1,4/bis(2/naphthyl)/2,3/dinitro/1,3/buta diene.
Eur. J. Pharmacol. 588:47/51, 2008
- Poggi A.-Catellani S.-Garuti A.-Pierri I.-Gobbi M. and Zocchi M.R.
Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukemias by all-transretinoic acid and sodium valproate.
Leukemia, in press
- Ropolo M.-Daga A.-Griffero F.-Foresta M.-Casartelli G.L.-Cappelli E.-Zumino A.-Poggi A.-Zona GL. and Frosina G.
A comparative analysis of DNA repair in stem and non-stem glioma cell cultures.
Molecular Cancer Research, in press

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Studio della suscettibilità di cellule staminali tumorali alla lisi mediata da cellule Natural Killer

Linea di ricerca: 2 - Interazioni ospite-tumore

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

Responsabile: Maria Cristina Mingari

Partecipanti: Barbara Carnemolla, Raffaella Augugliaro, Romana Conte

Durata: 2006-2008

Parole chiave: cellula staminale tumorale; cellule NK; recettori attivatori

Altri Enti coinvolti: Istituto G. Gaslini, Genova; DIMES, Università di Genova

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: MIUR

Background

I tumori non sono costituiti da masse omogenee di cellule, bensì sono formati da un assortimento eterogeneo di cellule differenziate in modo anomalo che derivano da un pool "clonale" di cellule staminali. L'esistenza delle cellule staminali tumorali è stata dimostrata nelle leucemie ed in alcuni tumori solidi (tumori del cervello, carcinomi della mammella e del colon). Le attuali terapie anti-neoplastiche convenzionali sono rivolte contro la frazione di cellule tumorali più "differenziata" e "highly cycling" e non contro le cellule staminali tumorali capaci, dopo il trattamento, di riprodurre il tumore localmente (recidiva tumorale) e/o di dare luogo a metastasi. Le CST infatti, sono naturalmente resistenti alla chemioterapia perché sono quiescenti (slow cycling), possono riparare efficientemente il DNA danneggiato ed over-esprimono proteine anti-apoptotiche o geni MDR (multidrug resistance genes). Quindi, l'isolamento e lo studio delle cellule staminali del cancro presenti nei tumori solidi può portare all'identificazione e allo sviluppo di nuove terapie farmacologiche ed immunoterapiche rivolte specificamente contro questa sottopopolazione cellulare altamente tumorigenica. In particolare, immunoterapie rivolte specificamente contro CST potrebbero indurre risposte anti-tumorali più durature o addirittura essere efficaci contro i tumori metastatici. Le principali cellule effettrici che possono svolgere un'attività anti-tumorale sono le cellule NK e i linfociti T citotossici (CTL). Negli ultimi anni nel nostro laboratorio sono stati identificati i recettori attivatori espressi dalle cellule NK coinvolti nella lisi delle cellule tumorali. Le molecole NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D e DNAM1 sono alcuni dei recettori attivatori espressi dalle cellule NK che hanno un ruolo importante nell'indurre la lisi delle cellule neoplastiche in seguito alla loro interazione con i ligandi tumorali (alcuni dei quali non ancora noti).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Dal momento che recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di cellule con caratteristiche staminali nei melanomi, gli obiettivi principali del nostro progetto sono stati quelli di: 1) isolare e caratterizzare le cellule staminali tumorali nel melanoma; 2) analizzare la loro suscettibilità alla lisi NK-mediata.

Beneficiari

L'applicazione delle nuove conoscenze potrà essere utile per l'identificazione di nuovi target molecolari del tumore e per lo sviluppo di nuove terapie anti-tumorali selettive.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

In dettaglio la nostra ricerca si è articolata nei seguenti punti:

1) Al fine di studiare le cellule staminali di melanoma abbiamo fatto crescere le cellule tumorali, derivate sia da linee cellulari stabilizzate che da biopsie fresche, in un particolare terreno di coltura (SCM) già utilizzato per favorire la crescita *in vitro* delle cellule staminali derivate da tumori cerebrali. Abbiamo analizzato 10 linee di melanoma e di queste 3 erano in grado di crescere in sospensione sotto forma di sfere (melanosfere) se coltivate in SCM. Abbiamo inoltre caratterizzato dal punto di vista fenotipico le melanosfere espanse *in vitro*. In particolare abbiamo valutato l'espressione su tali cellule delle molecole MICA, ULBPs (ligandi del recettore attivatorio NKG2D), PVR e Nectina-2 (ligandi del recettore attivatorio DNAM-1) e dei ligandi dei recettori attivatori NKp46, NKp30 e NKp44 mediante l'utilizzo di anticorpi specifici o delle rispettive molecole chimeriche solubili. Infine, abbiamo valutato se tali cellule fossero suscettibili alla lisi NK-mediata. I nostri risultati suggeriscono che le cellule NK sono in grado di lisare le melanosfere e che il riconoscimento è mediato da differenti recettori attivatori (e.g. NCRs, NKG2D e DNAM-1).

2) Al fine di ottenere una caratterizzazione molecolare delle proteine di superficie selettivamente espresse dalle cellule staminali tumorali di melanoma, abbiamo seguito l'approccio sperimentale "classico" che prevede l'immunizzazione di ceppi murini balb/c con "melanosfere" e la produzione di mAbs. Gli anticorpi monoclonali ottenuti sono tuttora oggetto di screening. In particolare stiamo approfondendo lo studio di un anticorpo monoclonale (MS131, IgG1) che riconosce alcune linee di melanoma, mentre non reagisce con melanociti normali, fibroblasti, linfociti, monociti e cellule dendritiche.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

3) Poiché recentemente alcuni autori hanno identificato nel melanoma una sottopopolazione di cellule tumorigeniche caratterizzata dalla co-espressione dei marcatori ABCB5 e CD133, nel corso del presente progetto abbiamo analizzato l'espressione dell'antigene CD133 in linee di melanoma stabilizzate in vitro. Le linee analizzate esprimevano il marcatore CD133 in maniera molto eterogenea. In particolare mediante analisi citofluorimetrica abbiamo potuto rilevare la presenza di tale antigene in 3 su 10 linee analizzate. Infine abbiamo valutato se le linee di melanoma, caratterizzate da una differente espressione del marcatore CD133, fossero ugualmente suscettibili alla lisi NK-mediata. I nostri dati funzionali suggeriscono che le cellule NK sono in grado di lisare in maniera efficiente sia linee di melanoma CD133-positive che linee CD133-negative.

4) Dal momento che uno studio recente (Bao S., et al. 2006) ha dimostrato che nei glioblastomi le cellule staminali tumorali CD133⁺ sono più radio-resistenti rispetto al subset CD133 negativo, abbiamo valutato se anche in linee stabilizzate di melanoma le cellule CD133⁺ rappresentano la sottopopolazione cellulare che conferisce al tumore una maggiore resistenza alle radiazioni ionizzanti. A questo scopo abbiamo analizzato la suscettibilità all'irradiamento di una linea cellulare stabilizzata di melanoma che esprimeva in maniera bimodale il marcatore CD133. I nostri risultati indicano che dopo trattamento con basse dosi di radiazioni ionizzanti (2-5 Gy) una maggiore percentuale di cellule esprime l'antigene CD133. Inoltre, dopo irradiamento, la frazione CD133⁺ esprime bassi livelli di caspasi-3 attivata rispetto alla frazione CD133⁻. Questi risultati suggeriscono che la frazione CD133⁺ è più resistente all'apoptosi indotta dalle radiazioni.

I risultati ottenuti ai punti 1, 3 e 4 sono attualmente in fase di pubblicazione.

Elenco pubblicazioni:

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

Vacca P.-Pietra G.-Falco M.-Romeo E.-Bottino C.-Bellora F.-Prefumo F.-Fulcheri E.-Venturini P.-Costa M.-Moretta A.-Moretta L.-Mingari M.C.
Analysis of natural killer cells isolated from human decidua: evidence that 2B4 (CD244) functions as an inhibitory receptor and blocks NK cell function.
Blood 108:4078/4085, 2006

Millo E.-Pietra G.-Armirotti A.-Vacca P.-Mingari M.C.-Moretta L.-Damonte G.
Purification and HPLC/MS analysis of a naturally processed HCMV derived peptide isolated from the HEK/293T/HLA/E+/UL40+ cell transfectants and presented at the cell surface in the context of HLA/E.
J. Immunol. Methods 322:128/136, 2007

Avignolo C.-Bagnasco L.-Biasotti B.-Melchiori A.-Tomati V.-Bauer I.-Salis A.-Chiossone L.-Mingari M.C.-Orecchia P.-Carnemolla B.-Neri D.-Zardi L.-Parodi S.
Internalization via Antennapedia protein transduction domain of an scFv antibody toward c/Myc protein.
FASEB J. 22:1237/1245, 2008

Carrega P.-Morandi B.-Costa R.-Frumento G.-Forte G.-Altavilla G.-Ratto G.B.-Mingari M.C.-Moretta L.-Ferlazzo G.
Natural killer cells infiltrating human nonsmall cell lung cancer are enriched in CD56bright CD16- cells and display an impaired capability to kill tumor cells.
Cancer 112:863/875, 2008

Catassi A.-Paleari L.-Servent D.-Sessa F.-Dominioni L.-Ognio E.- Cilli M.-Vacca P.-Mingari M.C.-Gaudino G.-Bertino P.-Paolucci M.- Calcaterra A.-Cesario A.-Granone P.-Costa R.-Ciarlo M.-Alama A.- Russo P.
Targeting alpha7 nicotinic receptor for the treatment of pleural mesothelioma.
Eur. J. Cancer 44:2296/2311, 2008

Giuliani M.-Giron Michel J.-Negrini S.-Vacca P.-Durali D.-Caignard A.-Le Bousse C.-Chouaib S.-Devocelle A.-Bahri R.-Durrbach A.- Taoufik Y.-Ferrini S.-Croce M.-Mingari M.C.-Moretta L.-Azzarone B.
Generation of a novel regulatory NK cell subset from peripheral blood CD34+ progenitors promoted by membrane bound IL/15.
PLoS ONE 3:e2241;1/e2241;16, 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

Scordamaglia F.-Balsamo M.-Scordamaglia A.-Moretta A.-Mingari M.C.-Canonica G.-Moretta L.-Vitale M.
Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases.
J. Allergy Clin. Immunol. 121:479/485, 2008

Spaggiari G.-Capobianco A.-Abdelrazik H.-Becchetti F.-Mingari M.C.-Moretta L.
Mesenchymal stem cells inhibit natural killer cell proliferation, cytotoxicity and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2.
Blood 111:1327/1333, 2008

Stifanese R.-Averna M.-De Tullio R.-Salamino F.-Cantoni C.-Mingari M.C.-Prato C.-Pontemoli S.-Melloni E.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Role of the calpain calpastatin system in the density dependent growth arrest.
Arch. Biochem. Biophys. 479:145/152, 2008

Vacca P.-Cantoni C.-Prato C.-Fulcheri E.-Moretta A.-Moretta L.-Mingari M.C.
Regulatory role of Nkp44, Nkp46, DNAM/1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells.
Int. Immunol. 20:1395/1405, 2008

Sensi M.L.-Pietra G.-Molla A.-Nicolini G.-Vegetti C.-Bersani I.-Millo E.-Weiss E.-Moretta L.-Mingari M.C.-Anichini A.
Peptides with dual binding specificity for HLA-A2 and HLA-E are encoded by alternatively spliced isoforms of the anti-oxidant enzyme peroxiredoxin 5".
Int. Immunol., in press

Pietra G.-Manzini C.-Vitale M.-Balsamo M.-Ognio E.-Boitano M.-Queirolo P.-Moretta L.-Mingari M.C.
Natural Killer cells kill human melanoma cells with phenotypic characteristics of cancer stem cells.
Int. Immunol., submitted

Anticorpi ricombinanti umani: uso nella diagnosi e terapia dei neuroblastomi

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: Barbara Carnemolla

Partecipanti: Romana Conte, Paola Orecchia

Durata: 2006-2008

Parole chiave: neuroblastoma; tumor targeting; extra cellular matrix; human recombinant antibodies; immunotherapy

Altre strutture IST: S.C. Biologia Cellulare (E. Balza, L. Borsi)

Altri Enti coinvolti: Istituto Scientifico G. Gaslini, Genova; Università degli Studi di Genova; Centro di Biotecnologie Avanzate, Genova (L. Zardi)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute

Background

Il neuroblastoma è il più comune tumore solido extracranico dell'infanzia e con il più alto rischio di morte, la probabilità di sopravvivenza al quarto stadio della malattia ad oltre il terzo anno di vita, è inferiore al 15%. Studi preliminari di immunoistochimica su neuroblastomi umani di vario grado hanno dimostrato che alcuni componenti della matrice extracellulare dei tumori solidi, come ad esempio l'isoforma oncofetale della Fibronectina (B-FN) e l'isoforma della Tenascina C contenente la repeat di tipo III, c (cTN-C), sono espressi in questi tumori (Carnemolla et al. Am. J. Pathol. 1999). Recentemente abbiamo dimostrato che anticorpi ricombinanti umani (come ad esempio L19) con alta affinità per l'isoforma B-FN si localizzano selettivamente a livello della matrice extracellulare dei tumori, *in vivo*. Questo è stato dimostrato sia con studi preclinici che clinici (Neri et al. 1997; Tarli et al. 1999; Borsi et al. 2002; Santimaria et al. 2003). Inoltre questi ligandi possono selettivamente veicolare sostanze terapeutiche nei tumori, es. citochine (Carnemolla et al. 2002; Borsi et al. 2003; Halin et al, 2003). Infine le sostanze terapeutiche, incluse le citochine, veicolate selettivamente dai ligandi vengono concentrate a livello della matrice extracellulare del tumore dove esplicano la propria attività con il risultato di aumentare drammaticamente l'efficacia terapeutica dei farmaci (Carnemolla et al., 2002; Borsi et al., 2003; Halin et al., 2003). Nell'ambito di questo progetto abbiamo dimostrato che l'isoforma B-FN è molto espressa anche nello stroma del neuroblastoma ed abbiamo eseguito studi preclinici di "tumor targeting" e terapia in topi singenici iniettati con neuroblastoma murino. I risultati ottenuti indicano che L19-IL2 e L19-TNF-alpha, iniettati per via sistemica nel topo con varie combinazioni terapeutiche, esplicano la loro efficacia terapeutica in modelli sperimentali di neuroblastoma. Abbiamo inoltre studiato la memoria immunitaria indotta dal trattamento con L19mTNalpha e L19-IL2.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Studi sull'attività terapeutica e sui meccanismi d'azione di immunoproteine quali L19mTNalpha e L19-IL2, in modelli sperimentali murini di neuroblastoma.

Beneficiari

Servizio Sanitario Nazionale e comunità scientifica.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

Nell'ambito di questo progetto, dopo aver dimostrato, con esperimenti di immunoistochimica, che l'isoforma oncofetale della Fibronectina (B-FN) è espressa nello stroma del neuroblastoma, abbiamo effettuato studi preclinici di "tumor targeting" e terapia in modelli murini di neuroblastoma. Più in dettaglio abbiamo per prima cosa stabilito le curve di crescita di varie linee di neuroblastoma umano (IMR-32, SKNBE, LAN-5, SKNF1 e SKNAS) e murino (Neuro2A e NIE-115) rispettivamente in topi SCID o singenici (A/J) e valutato la reattività di questi tumori sperimentali con l'anticorpo ricombinante L19.

Per gli esperimenti di immunoterapia abbiamo utilizzato i modelli sperimentali Neuro 2A e NIE-115, positivi per l'espressione della B-FN in topi singenici A/J.

Gruppi di 10 topi A/J con tumore Neuro2A indotto sotto cute sono stati trattati con diversi protocolli di combinazioni terapeutiche di immunocitochine (L19IL2, L19TNF alpha) e chemioterapici (melphalan). La miglior combinazione terapeutica è risultata quella con L19mTNFalpha ed L19-IL2 con guarigione dell'80% (8/10) degli animali trattati. Lo stesso tipo di trattamento in gruppi di topi A/J con tumore NIE-115 ha dato un esito terapeutico inferiore con il 30% (3/10) di guarigioni complete. La terapia con L19mTNF alpha e L19-IL2 è inoltre risultata meno tossica (perdita di peso medio degli animali $\leq 5\%$) della terapia con le citochine mTNFalpha e IL2 non veicolate dall' anticorpo ricombinante L19 e somministrate in dosi equimolari (perdita di peso medio dei topi di $>10\%$).

Nell' ultimo anno di questo progetto (2008) abbiamo eseguito esperimenti per studiare la memoria immunitaria indotta dal trattamento con L19mTNFalpha e L19-IL2: gli animali guariti da entrambi i tipi di tumore hanno rigettato il tumore omologo almeno fino a 3 mesi dopo la guarigione. Studi in vitro (CRA, Chromium Release Assay, ed ELISPOT), effettuati su splenociti di animali a 3 mesi dalla guarigione, hanno evidenziato una cospicua componente effettrice CD8+ insieme ad una componente CD4+ con risposta di tipo prevalentemente Th1 (ELISPOT x IFN gamma). Dopo aver verificato in esperimenti di transfer adottivo di immunità (Winn assay) che gli immunosplenociti totali di topi guariti da Neuro2A, in un rapporto E/T (Effector/Target) uguale a 5/1, proteggono dal tumore il 100% dei topi A/J "naive", abbiamo valutato l'effetto protettivo dopo deplezione *in vitro* di vari subsets cellulari. E' risultato che la protezione in Winn assay diminuisce di circa il 50% depletando gli splenociti dei CD4+ o dei CD8+. Questo indica una doppia responsabilità nel processo di guarigione e di memoria immunitaria antitumorale. La deplezione di cellule B ed NK non modifica sostanzialmente la sopravvivenza rispetto agli immunosplenociti totali. Le cellule T regolatorie CD4+CD25+ diminuiscono nei linfonodi drenanti il tumore in termini sia relativi (%) che assoluti dopo la terapia combinata.

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

Balza E.-Mortara L.-Sassi F.-Monteghirfo S.-Carnemolla B.-Castellani P.-Neri D.-Accolla R.-Zardi L.-Borsi L.
The immunological basis of tumor therapy by targeted delivery of TNF α to tumor vessels.
Retrovirology Dec 21;3 Suppl 1:1, 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

Brevetto:

Brevetto dal titolo:

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

Inventori: Balza Enrica, Borsi Laura, Castellani Patrizia e Barbara Carnemolla, 2008

Ricerca di nuovi antigeni tumore associati e valutazione del loro potenziale diagnostico e terapeutico

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: Barbara Carnemolla

Partecipanti: Romana Conte, Paola Orecchia, Valentina Rea

Durata: 2006-2008

Parole chiave: tumor associated antigens; tumor targeting; extra cellular matrix; human recombinant antibodies; immunotherapy

Altre strutture IST: S.C. Biologia Cellulare (E. Balza, P. Castellani)

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Altri Enti coinvolti: Centro di Biotecnologie Avanzate, Genova (L. Zardi)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Istituto Superiore di Sanità

Background

E' sempre più evidente che lo stroma tumorale, ed in particolare i componenti della sua matrice extracellulare (ECM), hanno un ruolo determinante per la crescita e la progressione di un tumore solido. I tumori non possono crescere senza un rimodellamento della ECM del tessuto normale circostante nel quale il tumore cresce con la formazione di componenti dello stroma tumorale che sono qualitativamente e quantitativamente differenti rispetto a quelli dei tessuti normali.

Uno dei componenti della ECM dello stroma tumorale è l' isoforma della fibronectina contenente l'extradominio ED-B (B-FN, marker di angiogenesi). Negli ultimi anni la nostra ricerca ha dimostrato che reagenti (anticorpi ricombinanti umani) con alta affinità per questo antigene si localizzano selettivamente a livello della matrice extracellulare dei tumori, in vivo. Questo è stato dimostrato sia con studi preclinici che clinici (Neri et al. Nature Biotechnology 15, 1271-1275, 1997; Tarli et al. Blood, 94:192-198, 1999; Borsi et al. Int. J. Cancer., 102:75-85, 2002; Santimaria et al., Clin.Cancer Res., 9:571-9, 2003). I ligandi di questi antigeni possono selettivamente veicolare sostanze terapeutiche nei tumori, es. citochine (Carnemolla et al. Blood, 99: 1659-65, 2002; Borsi et al., Blood, 102: 4384-92 , 2003; Halin et al, Cancer Res. 63: 3202-3210, 2003). Le sostanze terapeutiche veicolate selettivamente dai ligandi vengono concentrate a livello della matrice extracellulare del tumore dove esplicano la propria attività con il risultato di aumentare drammaticamente l'efficacia terapeutica dei farmaci (Carnemolla et al. Blood, 99: 1659-65, 2002; Borsi et al., Blood, 102, 4384-92, 2003; Halin et al, Cancer Res. 63: 3202-3210, 2003).

Sono attualmente in corso trials clinici di fasi I/II che utilizzano uno di questi immunoterapici (L19 IL2, Carnemolla et al. Blood 2002). L'obiettivo della nostra ricerca è stato quello di identificare nuovi antigeni associati alla ECM tumorale con lo scopo di aumentare i "targets" dove veicolare selettivamente differenti sostanze terapeutiche.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L'obiettivo della nostra ricerca è quello di identificare nuovi antigeni associati sia alla ECM tumorale che alla membrana plasmatica di cellule tumorali, con lo scopo di aumentare i "targets" dove veicolare selettivamente differenti sostanze terapeutiche.

Beneficiari

Servizio Sanitario Nazionale e comunità scientifica.

Consuntivo attività e risultati del progetto a fine 2008

L'approccio proteomico per l'analisi differenziale delle proteine espresse in un tessuto tumorale e nella controparte normale, permette l'identificazione di antigeni tumore-associati. A questo scopo abbiamo separato la ECM di carcinomi squamosi del polmone e dei corrispondenti tessuti normali, dalla componente cellulare. Nei carcinomi squamosi del polmone abbiamo identificato un certo numero di antigeni espressi in diversa quantità rispetto al corrispondente tessuto normale, come ad esempio la periostina e proteine appartenenti alla famiglia dei collagene e delle Heat Shock Proteins. Abbiamo focalizzato i nostri studi sulla periostina, una proteina della ECM coinvolta nella adesione cellulare e nella formazione del tumore.

La periostina è overespressa nel carcinoma mammario umano e sembra indurre un significativo aumento dell'angiogenesi. Nel cancro alla vescica sono state descritte alcune isoforme di periostina umana che derivano da splicing alternativo del pre-mRNA, mentre nulla è stato pubblicato sull'espressione di specifiche isoforme di periostina nel melanoma.

Per studiare le isoforme di periostina come nuovi potenziali markers del melanoma, nell'ultimo anno di questo progetto (2008) abbiamo analizzato lo "alternative splicing" del trascritto primario della periostina umana in cellule tumorali e fibroblasti isolati da melanoma cutaneo metastatico e da tessuto di melanoma uveale. Risultati preliminari indicano che entrambi i tipi cellulari derivanti dal tumore esprimono mRNA della periostina, ma solo nelle cellule del melanoma è possibile evidenziare una isoforma contenente un particolare esone. L'espressione di questa isoforma è evidenziabile nel 50% dei casi nelle cellule tumorali purificate da melanoma cutaneo metastatico e nel 100% dei casi di melanoma uveale. Abbiamo espresso in E. Coli la periostina umana sia come proteina completa che come frammenti utilizzando sequenze sottoposte a splicing alternativo del pre-mRNA. Abbiamo prodotto anticorpi monoclonali murini e anticorpi ricombinanti umani specifici per la periostina e con reattività positiva in ELISA, Western Blot e Immunoistochimica.

Nel 2008 abbiamo anche intrapreso uno studio sulla caratterizzazione delle proteine espresse sulla superficie di cellule di melanoma umano cresciute nel normale terreno di coltura o in un particolare terreno di coltura per ottenere le cosiddette "melanosfere" che potrebbero mimare, in vitro, le Cancer Stem Cells. La comparazione differenziale delle proteine di superficie espresse nei due tipi cellulari può condurre all'identificazione di nuovi marcatori tumorali. Per il raggiungimento di questo scopo abbiamo seguito un approccio di tipo proteomico in collaborazione con il CNR di Milano. L'analisi dei digeriti triptici delle proteine di membrana è stata effettuata in triplicato attraverso cromatografia bidimensionale accoppiata a "Tandem Mass Spectrometry" denominata Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT). Le proteine identificate sia nei campioni di cellule di melanoma che nelle melanosfere sono in numero elevato (tra 550 e 600). Inoltre, confrontando l'espressione delle proteine di membrana tra i due campioni di cellule, si evidenzia che alcune proteine sono "up-regolate" nelle cellule di melanoma (circa il 9% delle proteine identificate) altre sono "up-regolate" nelle melanosfere (circa il 10% delle proteine identificate).

Elenco pubblicazioni:

Avignolo C.-Bagnasco L.-Biasotti B.-Melchiori A.-Tomati V.-Bauer I.-Salis A.-Chiossone L.-Mingari M.C.-Orecchia P.-Carnemolla B.-Neri D.-Zardi L.-Parodi S.

Consuntivo progetti RC 2006-2008

Internalization via Antennapedia protein transduction domain of an scFv antibody toward c/Myc protein.
FASEB J. 22:1237/1245, 2008

Barboro P.-D'Arrigo C.-Repaci E.-Bagnasco L.-Orecchia P.-Carnemolla B.-Patrone E.-Balbi C.
Proteomic analysis of the nuclear matrix in the early stages of rat liver carcinogenesis: Identification of differentially expressed and MAR-binding proteins.
Exp. Cell Res. Epub Oct 28, 2008

Barboro P.-Rubagotti A.-Orecchia P.-Spina B.-Truini M.-Repaci E.-Carmignani G.-Romagnoli A.-Introini C.-Boccardo F.-Carnemolla B.-Balbi C.
Differential proteomic analysis of nuclear matrix in muscle invasive bladder cancer: potential to improve diagnosis and prognosis.
Cell. Oncol. 30:13/26, 2008

Brevetti:

Brevetto dal titolo:

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

Inventori: Balza Enrica, Borsi Laura, Castellani Patrizia e Barbara Carnemolla, 2008