

S.C. Immunologia

Caratterizzazione in vitro ed in vivo della funzione di recettori inibitori in grado di indurre arresto proliferativo in cellule mieloidi normali e leucemiche

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: b - Risposta immunitaria antitumorale: interazioni cellulari, fattori solubili e recettori

Responsabile scientifico: Maria Cristina Mingari

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Raffaella Augugliaro, Romana Conte

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: recettori inibitori; leucemie; differenziamento mieloido; ciclo cellulare; apoptosi

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Animal Facility (M. Sanguineti)

Altri Enti coinvolti: Istituto G. Gaslini, Genova; Dipartimento Medicina Sperimentale, Università di Genova (C. Vitale); Banca Cordone Ombelicale, A.O.U. San Martino, Genova

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute

Background

Siglec-7(p75/AIRM-1) e CD33 sono due recettori inibitori appartenenti alla famiglia delle sialoadesine, entrambi espressi da cellule mielomonocitarie. Hanno un buon grado di omologia e le loro code intracitoplasmatiche hanno sequenze ITIM in grado di reclutare le fosfatasi SHP-1 o -2 (Mingari et al. Immunol Rev. 2001). Il loro "crosslinking" con anticorpi monoclonali inibisce la proliferazione e differenziamento in vitro di precursori mieloidi CD34+ coltivati in presenza di GM-CSF (Granulocyte-Macrophage- Colony Stimulating Factor), fattore di crescita specifico per il differenziamento di cellule mielomonocitarie. Un effetto analogo è stato osservato su cellule isolate da leucemie mieloidi umane. Il legame di CD33 induce apoptosi della cellula bersaglio e l'uso simultaneo di etoposide ha un effetto sinergico. Il "crosslinking" di Siglec-7 si limita ad un blocco proliferativo/differenziativo.

L'uso di ligandi specifici per CD33 o Siglec-7 potrebbe quindi rappresentare una risorsa nella messa a punto di nuovi protocolli terapeutici contro le leucemie mieloidi. Questa prospettiva ha spinto vari gruppi a cercare di caratterizzare sia meccanismi che sottendono agli effetti inibitori sia meccanismi che possano eluderli: è stato dimostrato ad esempio che l'azione di Siglec-7 e CD33 è modulata dall'interazione dei loro motivi ITIM con SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signalling 3) (Crocker et al., Nat Rev Immunol, 2007). Nostri precedenti esperimenti suggerivano che il crosslinking di Siglec-7 inibisce l'espressione di ciclina D1 e dati molecolari preliminari indicherebbero la modulazione di importanti fattori di trascrizione come EGR-1, proteina coinvolta nel differenziamento mielomonocitario. Tali risultati supporterebbero l'ipotesi che queste molecole possano giocare un ruolo nel corso del differenziamento emopoietico: la loro attivazione potrebbe contribuire a decidere le sorti dei precursori mieloidi. Questi studi sono stati condotti in vitro tramite "crosslinking" con anticorpi monoclonali dei recettori espressi sulla membrana cellulare di linee leucemiche di origine mieloido (MM6 e U937): sarebbe perciò importante confermarli anche su leucemie mieloidi fresche coltivate in vitro e nei modelli in vivo di leucemia mieloido.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale del nostro progetto è verificare il ruolo regolatorio di queste molecole nei processi proliferativi e differenziativi nel corso della mielopoiesi e la loro potenziale attività anti-leucemica. Intendiamo operare attraverso due diversi approcci sperimentali.

Il primo valuterà la suscettibilità in vitro al "crosslinking" di CD33 e/o Siglec7 di precursori emopoietici isolati da sangue cordonale e da leucemie mieloidi CD33+Siglec-7+ isolate da pazienti emato-oncologici.

Il secondo approccio sperimentale valuterà in vivo gli effetti del "crosslinking", con anticorpi monoclonali, di Siglec-7 o CD33 espressi da un modello di leucemia mieloido (linea U937) indotta in topi NOD/SCID IL2rg-/- (in collaborazione con il laboratorio di Oncologia dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova, Dr. Vito Pistoia).

Impatto assistenziale certo o potenziale

La verifica di un'efficace attività anti-leucemica in vivo in modelli murini potrebbe essere determinante per valutare la messa a punto di anticorpi monoclonali specifici per Siglec 7 umanizzati con potenziale ruolo terapeutico e destinati all'uso nel paziente.

Risultati e prodotti 2009

In questo primo anno abbiamo inizialmente curato la purificazione dell'anticorpo monoclonale specifico per p75/AIRM-1 (Siglec7) e del relativo controllo isotipo-specifico da utilizzare per esperimenti sia in vitro che in vivo nel modello murino. Una prima serie di esperimenti è stata eseguita sulla linea leucemica umana U937; le cellule tumorali sono state trattate in vitro in presenza di solo mezzo di coltura o con anticorpo anti-Siglec7 o con anticorpo di controllo. La

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

presenza dell'anticorpo specifico anti-Siglec7 inibiva parzialmente la proliferazione della linea tumorale. La stessa linea leucemica U937 è stata poi utilizzata per esperimenti in vivo. Risultati interessanti sono stati ottenuti in ceppi di topi NOD/SCID IL2rg-/- nei quali l'inoculo di cellule U937 era in grado di generare tumori solidi. Gli animali inoculati con la linea tumorale, venivano successivamente trattati con anticorpi anti-Siglec7 o di controllo. Sono stati trattati tre gruppi di topi con tre diverse dosi di anticorpo e negli animali trattati con la dose intermedia di anticorpo (100 microgrammi/topo) si evidenziava, dopo circa 10 giorni di trattamento, una riduzione significativa della massa tumorale rispetto ai controlli. Sono stati allestiti campioni istologici dai tumori isolati dagli animali per effettuare indagini di immunohistochimica tuttora in corso. Sono stati inoltre preparati lisati delle cellule tumorali ottenute dai topi trattati sui quali sono in corso analisi di tipo biochimico e di biologia molecolare.

Pubblicazioni

Balsamo M.-Zambello R.-Teramo A.-Pedrazzi M.-Sparatore B.-Scordamaglia F.-Pende D.-Mingari MC.-Moretta L.-Moretta A.-Semenzato G.-Vitale M.

Analysis of NK cell/DC interaction in NK-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes (LDGL): role of DNAM-1 and NK p30

Exp Hematol. 37:1167/75, 2009

Locatelli F.-Pende D.-Maccario R.-Mingari MC.-Moretta A.-Moretta L.

Haploidentical hemopoietic stem cell transplantation for the treatment of high-risk leukemias: how NK cells make the difference

Clin Immunol. 133:171/8, 2009

Pende D.-Marcenaro S.-Falco M.-Martini S.-Bernardo ME.-Montagna D.-Romeo E.-Cognet C.- Martinetti M.-Maccario R.-Mingari MC.-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 113:3119/29, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nel corso di quest'anno procederemo nella ricerca e analisi di campioni di leucemia mieloide isolati ex-vivo da pazienti emato-oncologici in cura presso i reparti di onco-ematologia dell'Ospedale San Martino di Genova (Prof. Andrea Bacigalupo e Prof. Marco Gobbi) per verificare l'espressione di Siglec-7 e scegliere così quelli più idonei all'utilizzo per esperimenti in vitro ed in vivo. Selezioneremo leucemie potenzialmente tumorigeniche nel modello murino NOD/SCID IL2rg-/- . La possibilità di indurre una vera e propria leucemia in questo ceppo murino dovrebbe essere facilitata trattandosi di ceppi immunodeficienti, mentre la presenza ed il numero di potenziali cellule staminali leucemiche potrebbero condizionarne la riuscita. A questo scopo saranno effettuate analisi citofluorimetriche delle varie leucemie per verificare la presenza di marcatori per cellule staminali emopoietiche quali CD33, CD34, CD44, CD45, CD117, CD123, e CD133. Verificheremo inoltre se l'espressione di recettori inibitori IRp60 e Siglec-7 correla con la presenza di alcuni di questi marcatori (CD117 e/o CD123 per esempio). Lo scopo è quello di ripetere gli stessi esperimenti effettuati con la linea U937 inoculando nel topo leucemie mieloidi fresche, verificandone la tumorigenicità e trattando poi l'animale con l'idoneo anticorpo monoclonale per osservare l'eventuale effetto inibitorio. Si proseguiranno infine, sulle cellule isolate dai tumori eventualmente cresciuti nel topo, le indagini di immunohistochimica, biochimica e biologia molecolare per meglio caratterizzare gli effetti del trattamento.

Isolamento e caratterizzazione di cellule staminali tumorali da melanoma metastatico e carcinoma ovarico: identificazione di nuovi marcatori molecolari da utilizzarsi come possibili bersagli dell'attività delle cellule Natural Killer

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: b - Risposta immunitaria antitumorale: interazioni cellulari, fattori solubili e recettori

Responsabile scientifico: Maria Cristina Mingari

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Barbara Carnemolla, Massimo Vitale, Raffaella Augugliaro

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

Altre strutture IST partecipanti: S.S. Animal Facility (E. Ognio); S.C. Oncologia Medica A (P. Queirolo); S.C. Oncologia Medica C (M. Bruzzone); S.C. Oncologia Chirurgica (F. Cafiero)

Altri Enti coinvolti: Istituto G. Gaslini, Genova (V. Pistoia); Dip. di Ginecologia, Università di Genova (N. Ragni); Dip. di Medicina Sperimentale, Università di Genova (G. Pietra)

Tipologia progetto: preclinica

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; MIUR

Background

I tumori non sono costituiti da raggruppamenti cellulari omogenei, bensì originano da un assortimento eterogeneo di cellule differenziate in modo anomalo e derivate da un pool "clonale" di cellule staminali. L'esistenza di cellule staminali del tumore (CST) è stata inizialmente dimostrata nelle leucemie (Bonnet D., Dick, J.E. Nat. Med., 1997,) e successivamente in vari tumori solidi (Al-Hajj M. et al, PNAS, 2003; Singh S.K. et al, Cancer Res., 2003; Singh S.K. et al, Nature, 2004; Ricci-Vitiani L. et al, Nature, 2007; O'Brien C.A. et al, Nature, 2007; Li C. et al, Cancer Res., 2007; Schatton T. et al, Nature, 2008). 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 responsabili della rigenerazione locale del tumore (recidiva tumorale) e/o della comparsa di metastasi. Le CST infatti, sono naturalmente resistenti alla chemioterapia in quanto quiescenti (slow cycling), sono in grado di riparare efficientemente il DNA danneggiato ed esprimono proteine anti-apoptotiche o geni MDR (multidrug resistance genes) (Dean M. et al, Nat. Rev. Cancer, 2005; Gottesman M.M. et al, Nat. Rev. Cancer, 2002; Bao S. et al, Nature, 2006). Isolare e caratterizzare le cellule staminali del cancro presenti nei tumori solidi può essere molto utile per l'identificazione e lo sviluppo di nuove e più efficaci terapie sia farmacologiche che biologiche. In particolare con l'allestimento di protocolli d'immunoterapia mirati contro le CST si può pensare di generare risposte anti-tumorali più durature e selettive soprattutto nei confronti dei tumori metastatici. I principali effettori della risposta immunitaria antitumorale sono le cellule Natural Killer (NK) e i linfociti T citotossici (CTL). Antigeni tumore associati riconosciuti da linfociti T CD8+ sono stati identificati e usati in forma di vaccini in diversi trials clinici (Parmiani G. et al, J. Natl. Cancer. Instit., 2002). Per quanto riguarda le cellule NK, effettrici della risposta innata, in questi ultimi anni nel nostro laboratorio ne è stata caratterizzata l'attività effettrice grazie all'identificazione di numerosi recettori di tipo inibitorio e attivatorio. Il fine bilanciamento tra recettori inibitori e attivatori è responsabile dell'attività di questa popolazione (Moretta A. et al, Annual. Rev. Immunol., 1996; Moretta A. et al, Annual. Rev. Immunol., 2001; Moretta L. et al, Embo J., 2004). Alcuni recettori attivatori (NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D e DNAM1) sono coinvolti nella lisi delle cellule tumorali grazie a interazioni con i rispettivi ligandi espressi dal tumore (Pende D. et al, Cancer Res., 2002; Pende D. et al, Blood, 2005). Recentemente abbiamo dimostrato che le cellule NK attivate sono in grado di lisare con estrema efficienza linee di melanoma maligno arricchite in CST, isolate sulla base dell'espressione di marcatori come il CD133 e della capacità di crescere formando sfere in appositi terreni di coltura (Pietra G. et al, Int. Immunol., 2009). E' stato possibile isolare cellule con caratteristiche di CST oltre che dal melanoma anche dal carcinoma ovarico (Zhang S. et al, Cancer Res., 2008; Alvero AB. et al, Cell Cycle, 2009). Entrambi i tumori condividono un'elevata aggressività e limitate opzioni di trattamento specialmente quando la malattia passa alla fase metastatica. Inoltre per il carcinoma ovarico ancor oggi non disponiamo di strumenti di screening che ne consentano l'identificazione precoce diagnosticando la malattia ad uno stadio in cui essa è curabile.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Questo progetto, ampliamento e continuazione di un progetto precedente si propone nel suo insieme di identificare nuovi bersagli tumorali da utilizzarsi per approcci terapeutici innovativi.

In particolare saranno perseguiti i seguenti obiettivi:

- 1) Isolare e caratterizzare CST da melanoma e carcinoma ovarico e identificare nuovi marcatori da utilizzare come bersagli terapeutici
- 2) Valutare la suscettibilità alla lisi da parte delle cellule NK di putative CST isolate dai due tipi di tumore
- 3) Valutare la capacità delle cellule NK di prevenire o inibire la crescita del tumore in vivo (ottenuto trapiantando cellule con caratteristiche di CST nel modello murino NOD/SCID il2rg -/-)
- 4) In particolare nel caso del melanoma, indagare se ipotetiche CST isolate dal tumore possano contribuire alla sua formazione promuovendo un'angiogenesi di tipo classico o attraverso fenomeni di "mimetismo vascolare".

Impatto assistenziale certo o potenziale

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

Risultati e prodotti 2009

La nostra ricerca nel 2009 si è articolata nei seguenti punti:

- 1) Abbiamo studiato l'effetto delle interazioni tra cellule Natural Killer (NK) e cellule tumorali (melanoma). E' noto che i tumori possono sfuggire al riconoscimento da parte delle cellule del sistema immunitario rilasciando fattori immunosoppressori. Cellule NK del sangue periferico attivate in vitro con IL-2 sono state coltivate in presenza e in assenza di cellule di melanoma. La successiva analisi fenotipica ha rivelato che nelle NK coltivate in presenza del melanoma l'espressione IL-2-indotta dei recettori attivatori NKp30 e NKG2D è inibita e così pure quella "ex novo" di NKp44 (l'espressione dei recettori inibitori rimane invariata). L'inibizione interessa anche le funzioni effettrici quali la citotossicità che risulta compromessa nelle cellule NK coltivate in presenza di melanoma
- 2) Abbiamo proseguito i test di screening su anticorpi monoclonali (mAbs) ottenuti inoculando nel topo popolazioni arricchite in cellule staminali tumorali (CST) da melanoma. Sono stati selezionati alcuni mAbs sulla base della loro distribuzione e/o della loro capacità di discriminare tra tessuto sano e tessuto tumorale. Ci siamo focalizzati sull'anticorpo MS131 espresso differenzialmente dalle linee di melanoma analizzate. Analisi biochimiche e di spettrometria di massa hanno evidenziato una specificità dell'anticorpo per la Desmogleina 2 (DSG-2) proteina della famiglia delle caderine desmosomali. La porzione intracellulare di DSG-2 sembra coinvolta in alcuni processi di regolazione dell'apoptosi, mentre la porzione extracellulare (contenente l'epitopo riconosciuto da MS131) sembra essere soggetta a clivaggio da parte di metalloproteasi della famiglia ADAM. Sono in corso ulteriori analisi per verificare se l'espressione differenziale di DSG-2 su melanomi diversi sia da correlare ad eventuali differenze biologiche.

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Pubblicazioni

Balsamo M.- Scordamaglia F.-Pietra G.-Manzini C.-Cantoni C.-Boitano M.-Queirolo P.-Vermi W.-Facchetti F.-Moretta A.-Moretta L.- Mingari M.C.-Vitale M.

Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity
PNAS 49: 20847/20852, 2009

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 characteristics of cancer stem cells.

Int. Immunol. 21: 793/801, 2009.

Pietra G.- Romagnani C.-Moretta L.- Mingari MC.

HLA-E and bound peptides recognition by subsets of T and NK cells.

Current Pharmaceutical Design. 15: 3336/3344, 2009

Sensi ML.- Pietra G.- Molla A.- Nicolini G.- Vegetti C.- Bersani I.- Millo E.- Weiss EH.- Moretta L.-Mingari MC.- Anichini A.

Peptides with dual binding specificity for HLA-A2 and HLA-E are encoded by alternatively spliced isoforms of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 5.

International Immunology 21: 257/268, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Gli obiettivi della nostra ricerca nel 2010 si articoleranno nei seguenti punti:

1) Approfondire la conoscenza dei meccanismi attraverso cui le cellule di melanoma esplicano la loro attività regolatoria sulle cellule NK. Valuteremo il ruolo di fattori solubili, noti per essere prodotti dalle cellule tumorali e coinvolti nell'inibizione delle cellule del sistema immunitario, quali la prostaglandina E2 (PGE2), l'enzima indoleammina-2,3-diossigenasi (IDO), il TGF-beta e il fattore inibente la migrazione dei macrofagi (MIF). Utilizzando inibitori specifici di tali fattori in co-culture NK-melanoma verificheremo se la presenza dell'inibitore possa esitare in un ripristino della funzione NK

2) Analizzare il ruolo funzionale della proteina DSG-2 nei melanomi. In particolare, ci concentreremo sull'apoptosi dal momento che, nelle cellule epiteliali intestinali, DSG-2 è stata descritta favorire l'apoptosi indotta da farmaci chemioterapici. Ci proponiamo di inibire l'espressione di DSG-2 (mediante RNA interference) in linee di melanoma DSG-2+ e di valutare la suscettibilità all'apoptosi (indotta da farmaci e/o radiazioni ionizzanti) delle linee DSG-2 siRNA rispetto alle linee parentali

3) Valutare fenotipo e funzione delle cellule NK isolate da liquidi ascitici di pazienti affette da tumore ovarico allo scopo di studiarne la modulazione funzionale in risposta al continuo contatto con le cellule tumorali presenti nelle asciti. Ci proponiamo inoltre di isolare e caratterizzare eventuali CST di carcinoma ovarico coltivando le cellule tumorali presenti nei liquidi ascitici in idonei terreni di coltura privi di siero.

Studio degli effetti del microambiente tumorale sull'attività delle cellule NK: identificazione e caratterizzazione di nuove vie di immuno-modulazione attivate dal tumore

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: b - Risposta Immunitaria antitumorale: interazioni cellulari, fattori solubili e recettori

Responsabile scientifico: Massimo Vitale

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Raffaella Augugliaro

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: cellule NK; microambiente tumorale; fibroblasti; ipossia

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Oncologia Medica A (P. Queirolo); S.C. Oncologia Chirurgica (F. Cafiero)

Altri Enti coinvolti: Istituto G. Gaslini, Genova (L. Varesio, L. Moretta, C. Cantoni); DIMES, Università di Genova (B. Sparatore, A. Moretta); Università di Padova (G. Semenzato, R. Zambello)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro; Ministero della Salute

Background

Nonostante il progredire delle conoscenze sull'immunologia dei tumori, l'efficacia degli approcci immunoterapeutici per il trattamento dei tumori solidi rimane limitata. Ciò può essere determinato dal fatto che le cellule effettrici che raggiungono il tumore possono essere fortemente influenzate dal microambiente generato in situ. Nel tumore, infatti,

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

fattori cellulari (fibroblasti, cellule endoteliali, DC, fagociti e le cellule neoplastiche stesse) ed extra-cellulari (proteine della matrice, enzimi, citochine, chemochine e altri mediatori di segnale), interagendo reciprocamente, contribuiscono a formare un complesso microambiente in grado di influenzare sia la progressione del tumore stesso che la qualità della risposta immunitaria montata dall'ospite. L'induzione di linfociti T regolatori (Treg) o di cellule mieloidi soppressorie, così come la produzione di diversi fattori con attività immuno-modulatrice (quali arginase-1, NOS-2, IDO, TGF-beta) rappresentano spesso tratti funzionali distintivi del microambiente generato nell'ambito del tumore. In molti casi, i fibroblasti associati al tumore (Tumor Associated Fibroblasts - TAF) giocano un ruolo determinante nella formazione e nel mantenimento di tale microambiente. Queste cellule, infatti, in risposta a diversi fattori rilasciati dal tumore, quali FGF, PDGF o TGF-beta, vanno incontro a cambiamenti fenotipici e funzionali che consentono loro di contribuire alla progressione tumorale, mediante secrezione di fattori di crescita e/o trasformanti (TGF-beta, IGF, HGF), fattori angiogenici (VEGF) ed enzimi proteolitici (MMPs) che, catalizzando la degradazione della matrice extra-cellulare, facilitando l'invasione e la metastatizzazione. Esistono tuttavia ancora pochi dati in letteratura riguardo alle capacità dei TAF di influenzare in maniera determinante la risposta immunitaria contro tumore.

Un altro elemento di cui tener conto per valutare l'efficacia di una risposta immunitaria nel sito tumorale è rappresentato dal fatto che, a causa dell'inappropriata vascolarizzazione dello stroma tumorale, il tumore può presentare zone in cui persiste una bassa tensione di ossigeno. Diversi studi hanno suggerito come le "nicchie ipossiche" possano contenere, fra le altre, quelle cellule (chiamate Cancer Stem Cells - CSC) con caratteristiche funzionali determinanti per la rigenerazione ed il mantenimento del tumore stesso. Anche in questo caso è poco noto se e come un ambiente ipossico possa influenzare la risposta immunitaria.

Tra gli effettori coinvolti nella risposta dell'ospite contro i tumori, le cellule Natural Killer (NK) giocano un ruolo importante, sia perché capaci di uccidere direttamente cellule trasformate, sia perché, grazie alla loro capacità di produrre citochine pro-infiammatorie (IFN-gamma e TNF-alpha) e di interagire in cross-talk funzionali con le cellule dendritiche (DC), sono coinvolte nella regolazione e polarizzazione della risposta immunitaria specifica. L'attività citolitica, la produzione di citochine, nonché la capacità di sostenere cross-talk funzionali con le DC, sono regolate da un'ampia gamma di recettori di superficie quali i KIR (Killer Ig-like Receptors - recettori specifici per molecole HLA di classe I) ed i recettori attivatori NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D e DNAM-1 (attraverso i quali le cellule NK possono riconoscere ed uccidere cellule tumorali). In seguito ad attivazione (per esempio attraverso l'esposizione a citochine come IL-2, IL-15, IL-12, IL-23), le cellule NK possono migliorare notevolmente la propria capacità di riconoscere bersagli tumorali e la propria efficienza citolitica, sia perché up-regolano l'espressione dei propri granuli citolitici (granzymes e perforine) e di svariati recettori attivatori fra cui NKp30, NKG2D e NKp46, e sia perché esprimono ex novo altri recettori quali NKp44 e CD69, capaci di attivare ulteriormente la loro risposta funzionale.

Le cellule NK rappresentano dunque una potenziale risorsa per l'allestimento di nuove strategie terapeutiche. Per poter sfruttare al meglio tale potenzialità, tuttavia, è necessario indagare a fondo i possibili meccanismi messi in atto dal tumore per sovvertire l'efficacia dell'attività NK e verificare quali sono le condizioni di attivazione più efficaci per superare questi effetti immunosoppressivi. Studi recenti, eseguiti anche nel nostro laboratorio, hanno indicato che diversi fattori che possono essere presenti nel microambiente tumorale quali IDO, TGF-beta o ligandi solubili del recettore NKG2D possono effettivamente influenzare l'efficacia funzionale delle cellule NK o la loro capacità di attivarsi in risposta ad IL-2. Un altro elemento che potrebbe giocare un ruolo nelle interazioni fra cellule NK e microambiente tumorale è rappresentato da HMGB-1 (High Mobility Group Box-1), una fattore nucleare, espresso sia da cellule NK che da cellule tumorali, che può essere rilasciato nell'ambiente extracellulare e svolgere funzioni pro-infiammatorie. I meccanismi che regolano il rilascio attivo di HMGB-1 da parte delle cellule NK sono solo in parte caratterizzati, mentre non è noto il possibile effetto di questa citochina sulla funzione NK.

La nostra intenzione è dunque quella di proseguire gli studi per caratterizzare i circuiti regolatori che si possono stabilire fra cellule NK e microambiente tumorale ed individuare nuovi elementi (cellulari o molecolari) del microambiente tumorale capaci di interferire con l'attività delle cellule NK. Inoltre abbiamo intenzione di analizzare le pathways di attivazione delle cellule NK e caratterizzare le basi molecolari dell'aumentata efficienza della risposta mediata dai recettori attivatori NK in diverse condizioni di attivazione (per esempio in seguito a stimolazione con differenti citochine).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Saranno identificate e/o approfondite le diverse interazioni molecolari coinvolte nella regolazione dell'attività delle cellule NK da parte del microambiente tumorale. In particolare, i nostri studi si focalizzeranno sull'analisi di materiale biologico derivato da campioni di melanoma metastatico. I nostri obiettivi specifici saranno:

- Analisi del ruolo dei fibroblasti derivati dallo stroma tumorale nel condizionare l'attività delle cellule NK e caratterizzazione degli eventuali meccanismi di azione.
- Analisi delle interazioni fra cellule neoplastiche e cellule NK (resting o attivate con diverse citochine o altri fattori) ed identificazione di possibili meccanismi di modulazione reciproca del fenotipo di superficie e della funzione.
- Caratterizzazione del ruolo di HMGB1 nelle interazioni NK/tumore.
- Analisi dell'effetto dell'ambiente ipossico sulla funzionalità delle cellule NK.
- Studio dei meccanismi che permettono di massimizzare l'efficienza funzionale della cellula NK: caratterizzazione delle possibili sinergie nella trasduzione di segnali positivi mediati da recettori indotti in seguito ad attivazione cellulare.

Impatto assistenziale certo o potenziale

I risultati ottenuti forniranno elementi utili per identificare nuove molecole e/o fattori da utilizzare come vettori o come bersaglio in terapie innovative.

La generazione di nuovi reagenti (mAbs) specifici per markers tumorali o per molecole coinvolte nelle interazioni NK/tumore potranno fornire la base per la generazione di strumenti diagnostici o terapeutici.

Risultati e prodotti 2009

- Sono proseguiti gli studi di caratterizzazione dei circuiti regolatori che si stabiliscono fra cellule NK e microambiente tumorale con particolare attenzione al ruolo dei fibroblasti. Abbiamo derivato linee primarie di fibroblasti da diverse lesioni metastatiche di melanoma ed allestito esperimenti di co-cultura con cellule NK. Abbiamo dimostrato che i

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

fibroblasti derivati da tumore (TF) sono in grado di interferire con alcuni processi di attivazione, indotti da IL-2, che permettono alla cellula NK di incrementare il proprio potenziale citolitico e la capacità di riconoscere cellule neoplastiche. In presenza di TF infatti, le cellule NK hanno una ridotta capacità di acquisire o incrementare, in risposta ad IL-2, l'espressione di diversi recettori coinvolti nel riconoscimento di ligandi tumorali, nonché del proprio macchinario citolitico (Granzimi e Perforine). In particolare, l'espressione dei recettori attivatori NKp44, NKp30 e DNAM-1 appare alterata in presenza di TF. Tali alterazioni comportano una ridotta capacità funzionale della cellula NK che perde efficacia nell'uccidere cellule di melanoma e diminuisce la capacità di produrre citochine. Utilizzando inibitori specifici e allestendo colture in "trans-well" abbiamo dimostrato che la modulazione di DNAM-1 dipende dal contatto cellula-cellula, mentre l'inibizione degli altri recettori attivatori dipende, almeno in parte, dal rilascio di PGE2 da parte dei fibroblasti. Abbiamo analizzato 11 linee di fibroblasti derivate da metastasi di melanoma (6 nodali e 5 cutanee) e abbiamo osservato che tutte sono in grado di inibire l'espressione di NKp44 sulle cellule NK e, parallelamente, sono in grado di produrre costitutivamente PGE2. Nella maggior parte dei casi, inoltre, la produzione di PGE2 aumenta quando i fibroblasti sono co-coltivati con le cellule NK. L'analisi istologica rivela che, in metastasi nodali di melanoma, le cellule NK e i fibroblasti sono a stretto contatto suggerendo come la modulazione della funzione NK da parte dei fibroblasti possa effettivamente avvenire in vivo. I nostri dati indicano un nuovo potenziale meccanismo di escape tumorale.

- L'attività regolatoria svolta dalle cellule NK attraverso la produzione di citochine e l'interazione con le DC, potrebbe svolgere un ruolo importante nell'omeostasi del microambiente tumorale. Un nostro studio in collaborazione con Renato Zambello (Università di Padova) e mirato a chiarire i meccanismi eziopatogenetici della Malattia Linfoproliferativa dei Linfociti Granulati di tipo NK (NK-LDGL), ci ha permesso di analizzare l'interazione NK/DC sia in condizioni patologiche che fisiologiche. Tale studio ha portato all'identificazione del ruolo di cooperazione di DNAM-1 con NKp30 nelle interazioni NK/DC che favoriscono la maturazione delle DC.

Pubblicazioni

Balsamo M.-Scordamaglia F.-Pietra G.-Manzini C.-Cantoni C.-Boitano M.-Queirolo P.-Vermi W.-Facchetti F.-Moretta A.-Moretta L.-Mingari M.C.-Vitale M.

Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(49):20847-20852

Balsamo M.-Zambello R.-Teramo A.-Pedrazzi M.-Sparatore B.-Scordamaglia F.-Pende D.-Mingari M.C.-Moretta L.-Moretta A.-Semenzato G.-Vitale M.

Analysis of NK cell/DC interaction in NK-type Lymphoproliferative Disease of Granular Lymphocytes (LDGL): role of DNAM-1 and NKp30.
Exp. Hematol. 2009;37:1167-1175

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. 2009; 21:793-801

Prodotti biotecnologici

Nel corso del 2009 è stato stipulato un contratto con la ditta "Miltenyi Biotec" per la vendita dell'ibridoma FM276 che produce il mAb anti-CD276, da noi generato.

Attività previste e risultati attesi nel 2010

- Nel corso del 2010, attraverso esperimenti di co-cultura e analisi fenotipiche e funzionali delle cellule coinvolte, studieremo l'effetto dell'interazione tra cellule NK e bersagli tumorali. Verificheremo se la prolungata coabitazione di cellule NK e cellule tumorali (fenomeno che si può verificare all'interno del microambiente tumorale) possa favorire la risposta dell'ospite verso il tumore o possa, invece, facilitare l'escape tumorale. A tal scopo, analizzeremo se l'interazione fra cellule NK e cellule tumorali possa modulare: a) l'espressione e la funzione dei principali recettori che regolano l'attività delle cellule NK; b) l'espressione sulle cellule tumorali di molecole bersaglio che ne permettono il riconoscimento da parte degli effettori della risposta immunitaria; c) la suscettibilità delle cellule tumorali all'attività citolitica linfocitaria. Questo sistema sperimentale sarà utilizzato anche per valutare comparativamente se citochine diverse, capaci di intervenire sulla funzione NK, possano favorire o sfavorire tali fenomeni. Mediante l'utilizzo di mAb bloccanti e inibitori specifici saranno caratterizzati eventuali fattori solubili coinvolti nei meccanismi di modulazione individuati. Saranno anche immunizzati topi con cellule tumorali e cellule NK con lo scopo di ottenere nuovi mAbs specifici per molecole di superficie coinvolte nelle interazioni cellula-cellula.

- In collaborazione con il Prof. Luigi Varesio (Laboratorio di Biologia Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova), che si avvale di una solida esperienza nello studio degli effetti dell'ipossia sulla funzione cellulare, studieremo gli effetti dell'ipossia sulla funzione e sul fenotipo delle cellule NK.

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

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

Programma: c - Studi preclinici per lo sviluppo di test diagnostici e terapie biologiche antitumorali

Responsabile scientifico: Barbara Carnemolla

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Romana Conte, Paola Orecchia

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

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

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

Altri Enti coinvolti: CNR, Milano (P.L. Mauri); Helios Klinikum Erfurt, Univ. Chefarzt des Instituts für Pathologie, Erfurt, Germany (H. Kosmehl); CBA, Genova (L. Zardi)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: terapeutica/quality of life

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute; Istituto Superiore Sanità; Istituto Europeo di Oncologia

Background

Le cellule tumorali sono in grado di modificare il microambiente che le circonda attraverso il rilascio di diversi fattori di crescita e il coinvolgimento di proteasi che insieme determinano un rimodellamento dello stroma tumorale promuovendo la progressione neoplastica. Questi fattori, mediante un'azione paracrina combinata, portano ad una progressiva distruzione della normale omeostasi di un tessuto sano e inducono un processo di infiammazione cronica accompagnata da una marcata neoangiogenesi. Nel processo di modificazione del microambiente tumorale sono coinvolte anche cellule tipiche stromali come i fibroblasti che vanno incontro a uno "shift" fenotipico acquisendo caratteristiche di cellula differenziata, come accade in seguito a danno tissutale o evento di stress. 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. L' ECM si arricchisce di proteine e di particolari isoforme proteiche non espresse nel tessuto sano, che contribuiscono alla progressione tumorale. Uno dei componenti della ECM dello stroma tumorale più studiati è l' isoforma della fibronectina contenente l'extradominio ED-B (B-FN, marker di angiogenesi). In passato abbiamo 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, 1997; Tarli et al, Blood, 1999; Borsi et al, Int. J. Cancer., 2002; Santimaria et al, Clin.Cancer Res., 2003). I ligandi di questi antigeni possono selettivamente veicolare sostanze terapeutiche nei tumori, es. citochine (Carnemolla et al, Blood, 2002; Borsi et al, Blood, 2003; Halin et al, Cancer Res., 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, 2002; Borsi et al, Blood, 2003; Halin et al, Cancer Res., 2003). Sono attualmente in corso trials clinici di fasi I/II che utilizzano uno di questi immunoterapici (L19 IL2, Carnemolla et al, Blood, 2002).

La nostra ricerca nel triennio 2009-2011 si focalizzerà sul melanoma e sul carcinoma ovarico con l'obiettivo di identificare nuovi antigeni associati sia alle membrane di cellule tumorali che alla ECM tumorale con lo scopo di aumentare i "targets" dove veicolare selettivamente differenti sostanze terapeutiche. Un nuovo potenziale marker tumorale che si vuole studiare in questo progetto è la Periostina, una proteina secretoria che si accumula nella ECM dello stroma tumorale, è coinvolta nei processi di adesione cellulare e angiogenesi e contribuisce alla progressione tumorale promuovendo la sopravvivenza e la migrazione delle cellule tumorali. La periostina è overespressa in molti tumori umani tra i quali il carcinoma mammario, polmonare, del colon e nel melanoma. Per quanto riguarda l'ovaio il trascritto della periostina è assente nel tessuto normale, ma altamente espresso nel tessuto fetale e nel carcinoma ovarico. Le cellule del carcinoma ovarico secernono la periostina che si accumula nel liquido ascitico di pazienti con questa neoplasia.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

L' obiettivo della nostra ricerca è quello di:

- identificare nuovi markers associati alla membrana plasmatica di cellule tumorali o associati alla matrice extracellulare dello stroma tumorale (come ad esempio isoforme di Periostina), in particolare nel melanoma e carcinoma ovarico;
- produrre anticorpi specifici per tali proteine con lo scopo di veicolare selettivamente differenti sostanze terapeutiche nel microambiente tumorale.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Fino ad oggi non disponiamo di strumenti di screening che consentano l'identificazione precoce delle neoplasie ovariche in modo da diminuire la morbilità e mortalità, diagnosticando la malattia ad uno stadio in cui essa è curabile (Nossov et al., 2008). I tumori ovarici in stadio iniziale determinano sintomi aspecifici che non consentono al medico di base e agli specialisti operanti sul territorio di sospettare precocemente la presenza di un tumore ovarico. Disporre quindi di ligandi per nuovi markers tumorali specifici non solo per il carcinoma ovarico, ma anche per il melanoma, può potenzialmente contribuire a migliorare la diagnosi e la cura di queste neoplasie.

Risultati e prodotti 2009

Al fine di identificare nuovi markers tumorali, sono stati prodotti ed in parte caratterizzati, anticorpi monoclonali murini e ricombinanti umani (scFv) specifici sia per recettori espressi sulle cellule tumorali di melanoma, sia per proteine della matrice extracellulare (ECM) dello stroma tumorale rilasciate dalle cellule tumorali o dalle cellule stromali presenti nel microambiente. In particolare è stato generato e caratterizzato un anticorpo monoclonale (mAb OC-20) specifico per la periostina, una proteina secretoria che si accumula nella ECM dello stroma tumorale, coinvolta nei processi di adesione

Consuntivo 2009 - Programmazione 2010

cellulare e angiogenesi che contribuisce alla progressione tumorale promuovendo la sopravvivenza e la migrazione delle cellule tumorali. E' stato caratterizzato l'epitopo della periostina riconosciuto dal mAb OC-20 ed è stato inoltre dimostrato che questo anticorpo monoclonale è in grado di inibire l'adesione delle cellule di melanoma alla proteina.

Abbiamo selezionato una "Antibody phage Display Library" su una linea di melanoma metastatico isolata da paziente ed ottenuto anticorpi ricombinanti umani. Uno di questi anticorpi, OC46-F2, dimostra un'alta specificità per una proteina espressa preferenzialmente sulla superficie di cellule di melanoma sia primario che metastatico. E' in corso l'identificazione dell'antigene specifico per questo anticorpo ricombinante.

In collaborazione con il CNR di Milano è in corso 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 selettivo, "serum-free" in cui le cellule crescono formando sfere ("melanosfere") all'interno delle quali potrebbero essere contenute le putative Cancer Stem Cells, cellule staminali responsabili della rigenerazione locale del tumore (recidiva tumorale) e/o della comparsa di metastasi. La comparazione differenziale delle proteine di superficie espresse nei due tipi cellulari e delle proteine secrete (secretoma) è in corso di valutazione.

Abbiamo inoltre messo a punto il metodo per la crescita in vitro di sferoidi isolati dal liquido ascitico di pazienti affette da carcinoma ovarico. Con i sistemi di coltura adottati queste cellule riescono a mantenere in coltura la morfologia di origine.

Pubblicazioni

Balza E.- Carnemolla B.- Mortara L.- Castellani P.- Soncini D.- Accolla RS- Borsi L.
Therapy-induced antitumor vaccination in neuroblastomas by the combined targeting of IL-2 and TNFalpha
Int J Cancer. Epub Oct 29, 2009

Balza E.-Sassi F.-Ventura E.-Parodi A.-Fossati S.-Blalock W.-Carnemolla B.-Castellani P.-Zardi L.-Borsi L.
A novel human fibronectin cryptic sequence unmasked by the insertion of the angiogenesis-associated extra type III domain B
Int J Cancer. 125:751/8, 2009. Erratum in: Int J Cancer. 2009

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. 315:226/39, 2009

Ventura E.-Sassi F.-Fossati S.-Parodi A.-Blalock W.-Balza E.- Castellani P.-Borsi L.-Carnemolla B.-Zardi L.
Use of uteroglobin for the engineering of polyvalent, polyspecific fusion proteins
J Biol Chem. 284:26646/54, 2009

Attività previste e risultati attesi nel 2010

Nel 2010 prevediamo di completare gli studi descritti nei risultati 2009. In particolare focalizzeremo la nostra sperimentazione sulla produzione di anticorpi ricombinanti umani specifici per proteine di superficie degli sferoidi isolati dal liquido ascitico di pazienti con carcinoma dell'ovaio.

Prevediamo di impiegare gli anticorpi da noi prodotti (OC-20 e OC46-F2) in studi preclinici di targeting ed immunoterapia ed inoltre di studiare l'espressione della periostina e delle sue isoforme nel sangue di pazienti con melanoma e carcinoma ovarico per valutarne il loro potenziale diagnostico.