

## S.S. Embriogenesi e Tumorigenesi su Modelli Animali

### Cellule Staminali Tumorali Mammarie: identificazione, isolamento e loro caratterizzazione

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Simonetta Astigiano

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Ottavia Barbieri, Patrizia Damonte

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* neoplasie mammarie; cellule staminali; terapie targets

*Altre strutture IST partecipanti:*

*Altri Enti coinvolti:* ITB-CNR, Segrate, Milano (I. Zucchi); UC-Davis, CA, USA (R.D. Cardiff, A.D. Borowsky)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* DIMES, Università di Genova

#### *Background*

Il tumore mammario rappresenta la causa di morte più comune tra le donne affette da neoplasia. Il lungo lasso di tempo che intercorre nel carcinoma della mammella prima che la sopravvivenza raggiunga il plateau suggerisce il coinvolgimento di una popolazione cellulare capace di resistere ai trattamenti e di sfuggire ai controlli per lungo tempo. Queste cellule, denominate cellule staminali tumorali (CSC), rappresentano una rara sottopopolazione della massa tumorale ed hanno diverse caratteristiche in comune con le cellule staminali somatiche (SC) responsabili del mantenimento della omeostasi tissutale virtualmente di tutti gli organi. Le proprietà che caratterizzano le SC sono la capacità di autorinnovarsi e la pluripotenzialità. Infatti, le SC identificate nella ghiandola mammaria murina mostrano la capacità di generare le tre linee che concorrono a formare le strutture lobulo-alveolari della ghiandola adulta (mioepitelio, epitelio duttale ed epitelio alveolare), e possono essere mantenute attraverso trapianti seriali in vivo. Le SC sono anche caratterizzate da un basso tasso di replicazione e occupano nicchie ambientali particolarmente ipossiche, per cui hanno una lunga sopravvivenza. Questo aumenta la probabilità che, nel corso della vita, accumulino lesioni geniche che possono portare alla loro trasformazione neoplastica. Recentemente, su alcuni modelli murini, è stato identificato un nuovo tipo di SC, le cellule staminali pre-neoplastiche (pCSC). Queste rappresentano uno stadio intermedio ed hanno, infatti, caratteristiche sia delle SC che delle CSC. La scoperta delle pCSC permette quindi di ricostruire l'intero processo di sviluppo neoplastico: SC somatiche accumulano mutazioni che ne inducono la trasformazione conducendo alla formazione di lesioni preneoplastiche, che poi possono progredire a tumori invasivi e metastatici, sede delle CSC. Molti tumori umani, tra cui il mammario, mostrano questo tipo di evoluzione, per cui l'isolamento e la caratterizzazione di pCSC, e la valutazione di differenze e similitudini con le SC e CSC potrebbe essere fondamentale per comprendere la formazione e lo sviluppo dei tumori ed identificare nuovi bersagli molecolari. Inoltre, le CSC sono resistenti alle chemio e radioterapie convenzionali, e poiché è stato sperimentalmente dimostrato che una sola CSC è sufficiente a rigenerare il tumore, ponendo le basi per la recidiva, il targeting delle CSC sarebbe una strategia verosimilmente efficace per il trattamento dei tumori, sia primitivi che metastatici. Nel carcinoma della mammella però una precisa conoscenza delle caratteristiche di queste cellule non è ancora stata raggiunta, e il potenziale terapeutico di trattamenti anti CSC rimane ancora da valutare.

Il nostro gruppo ha una lunga esperienza nella messa a punto, nello studio e nella manipolazione di modelli murini di patologie umane, inoltre abbiamo in corso da alcuni anni una fruttuosa collaborazione con il gruppo della Dr.ssa Zucchi (ITB-CNR di Milano), partecipando alla caratterizzazione delle cellule LA7, un clone derivato dalla linea di tumore mammario del ratto Rama-25, come linea costituita da CSC. Oltre a ciò abbiamo iniziato una collaborazione con il gruppo del Dr. Cardiff (UC-Davis, California) sull'isolamento e caratterizzazione di SC da lesioni pre-neoplastiche.

#### *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo principale del progetto è quello di identificare, isolare e caratterizzare cellule staminali da tessuto mammario normale, pre-neoplastico e neoplastico, con lo scopo di identificare nuovi targets terapeutici e di ottenere modelli per la sperimentazione di terapie mirate.

Obiettivo secondario è l'implementazione delle conoscenze nel campo delle staminali tumorali e la stabilizzazione di modelli murini utilizzabili in studi preclinici.

#### *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Non vi sarà un impatto assistenziale certo, ma potenzialmente potremo individuare nuove terapie mirate all'eradicazione delle CSC.

# Programmazione 2009-2011

## *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

Durante il triennio del progetto tenteremo l'isolamento delle CSC e delle SC dai tessuti umani utilizzando protocolli già sperimentati su altre specie. L'idea è quella di mantenere le cellule sia stabilizzandole in vitro che come trapianti in vivo per poterle espandere ed avere materiale a sufficienza per la loro caratterizzazione biologica e molecolare. Le cellule in vivo saranno inoltre utilizzate per valutare la loro risposta sia a terapie convenzionali (es. Doxorubicin) che sperimentali (es. rapamicina, 4HPR).

Per il 2009 prevediamo di poter ricevere circa una decina di campioni di tumori mammari umani con la controparte normale per tentare l'isolamento delle cellule, mentre è molto difficile fare previsioni sulla disponibilità di lesioni preneoplastiche.

In parallelo porteremo avanti studi su SC, CSC e pCSC murine per definirne le caratteristiche e studiare i meccanismi di progressione neoplastica. Abbiamo già iniziato l'isolamento di CSC dai topi transgenici MMTV-neu mentre otterremo dal Dott. Cardiff il modello dei pre-cancer da topi transgenici MMTV-PyVmT da cui isolare SC.

Infine proseguiremo gli studi in collaborazione con la Dott.ssa Zucchi sulla caratterizzazione delle CSC di ratto LA7, su cui stiamo ora valutando la potenzialità metastatica.

## *Track record*

Damonte P.-Gregg JP.-Borowsky AD.-Keister BA.-Cardiff RD.  
EMT tumorigenesis in the mouse mammary gland.  
Lab. Invest. 87:1218/1226, 2007

Zucchi I.-Sanzone S.-Astigiano S.-Pelucchi P.-Scotti M.-Valsecchi V.-Barbieri O.-Bertoli G.-Albertini A.-Reinbold R.A.-Dulbecco R.  
The properties of a mammary gland cancer stem cell.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104(25):10476/10481, 2007

Cocola C.-Sanzone S.-Astigiano S.-Pelucchi P.-Piscitelli E.-Vilardo L.-Barbieri O.-Beertoli G.-Reinbold R.-Zucchi I.  
A rat mammary gland cancer cell with stem cells properties of self-renewal and multi.lineage differentiation.  
Cytotechnology 58:25/32, 2008

Damonte P.-Hogson J.G.-Chen J.Q.-Young L.J.T.-Cardiff R.D.-Borowsky A.D.  
Mammary carcinoma behavior is programmed in the precancer stem cell.  
Breast Cancer Res. 10:R50, 2008

Palmieri D.-Astigiano S.-Barbieri O.-Ferrari N.-Marchisio S.-Ulivi V.-Volta C.-Manduca P.  
Procollagen I COOH-terminal fragment induces VEGF-A and CXCR4 expression in breast carcinoma.  
Exp. Cell Res. 314:2289/2298, 2008

Zucchi I.-Astigiano S.-Bertalot G.-Sanzone S.-Cocola C.-Pelucchi P.-Bertoli G.-Stehling M.-Barbieri O.-Albertini A.-Schöler H.R.-Neel B.-Reinbold R.A.-Dulbecco R.  
Distinct populations of tumor initiating cells derived from a tumor generated by rat mammary cancer stem cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(44):16940/16945, 2008

Cocola C.-Anastasi P.-Astigiano S.-Piscitelli E.-Pelucchi P.-Vilardo L.-Bertoli G.-Beccaglia M.-Veronesi M.C.-Sanzone S.-Barbieri O.-Reinbold R.A.-Luvoni G.C.-Zucchi I.  
Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumor-initiating potential.  
Reprod. Domest. Anim. 44:214/217, 2009

Visigalli D.-Palmieri D.-Strangio A.-Astigiano S.-Barbieri O.-Casartelli G.-Zicca A.-Manduca P. The carboxyl terminal trimer of procollagen I induces pro-metastatic changes and vascularization in breast cancer cells xenografts.  
BMC Cancer 18:59/69, 2009

## **Ruolo dell'Arginasi 1 nel microambiente tumorale**

*Linea di ricerca:* 2 - Interazioni Tumore-Ospite

*Programma:* a - Ruolo del microambiente tumorale nella progressione neoplastica

*Responsabile scientifico:* Ottavia Barbieri

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Simonetta Astigiano

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* arginasi 1; immunosoppressione; granulociti; linfociti T; animali transgenici; NSCLC

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Terapia Immunologica (S. Ferrini)

# Programmazione 2009-2011

*Altri Enti coinvolti:* Istituto Oncologico Veneto, Padova (V. Bronte)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Association for International Cancer Research, UK

## *Background*

I tumori sono in grado di mettere in atto numerose strategie per sottrarsi al controllo del sistema immunitario. Una delle strategie più efficaci sembra essere legata all'espressione, a livello del microambiente tumorale, dell'Arginasi (ARG), un enzima che catabolizza l'Arginina ad Ornitina ed Urea. Una marcata riduzione della concentrazione di L-arginina nel microambiente extracellulare si traduce in una drastica downregolazione dell'espressione della catena  $\alpha$  del CD3 dei linfociti T. Il triggering del complesso CD3/TCR, in presenza di attività arginasi risulta quindi in un blocco proliferativo e nell'instaurarsi di una condizione di energia che in ultimo può condurre a morte cellulare. Un analogo effetto di blocco proliferativo viene esercitato anche sulle cellule NK. L'effetto immunosoppressivo dell'ARG viene amplificato dalla concomitante espressione della sintetasi ossido nitrica (NOS). In presenza dei due enzimi, infatti viene ad essere prodotto perossinitrito, che va a nitrosilare i residui tirosinici. Una Tiroxina nitrosilata non è in grado di essere fosforilata e quindi di trasdurre il segnale. L'effetto finale a carico della risposta immune consiste in una rapida apoptosi di quei linfociti T che abbiano ricevuto un segnale di attivazione. Nell'uomo questo meccanismo sembra essere alla base dell'immunosoppressione locale nel tumore della prostata.

Esistono due diverse isoforme di ARG, espresse da differenti tipi cellulari: ARG1 e ARG2. Nell'uomo il ruolo di ARG1 è ancora poco conosciuto: escludendo gli epatociti l'enzima è espresso solo dai polimorfonucleati neutrofilici (PMN), in cui è localizzato in forma inattiva all'interno dei granuli di gelatinasi. E' evidente che in questa forma non può agire sul catabolismo dell'Arginina, tuttavia è stato osservato che l'enzima rilasciato a seguito di lisi dei PMN è attivo ed è responsabile dell'attività immunosoppressiva associata a raccolte purulente. Non è noto, viceversa se l'enzima possa essere esocitato in forma attiva da PMN viabili, e quali stimoli possano indurre il fenomeno. In studi preliminari sul carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) abbiamo riscontrato che i PMN reclutati all'interno del NSCLC hanno un contenuto in ARG1 ridotto rispetto alle stesse cellule nei vasi o a quei PMN che infiltrano il tessuto polmonare normale; questo suggerisce che i PMN infiltranti il NSCLC possano andare incontro all'esocitosi dei granuli contenenti ARG1. Se tale enzima è in forma attiva questo potrebbe contribuire a spiegare il fatto che i linfociti infiltranti il NSCLC sono anergici. Dato poi che i PMN sono presenti in quantità nel microambiente infiammatorio dei tumori umani, è possibile che essi contribuiscano all'immunosoppressione locale anche in altri tipi di tumore.

Nei topi ARG1 è espressa principalmente dalle cosiddette cellule mieloidi soppressore (MSC) infiltranti il tumore e può essere indotta da vari fattori presenti nel microambiente tumorale come citochine, ipossia, cAMP e prostaglandine; va osservato che in modelli di tumori murini il blocco farmacologico dell'attività di ARG1 può ripristinare la risposta immunitaria anti tumore ed indurre la regressione della neoplasia.

L'isoforma ARG2 nell'uomo è espressa costitutivamente dalle cellule di alcuni tumori solidi, ma ciò non implica che l'enzima abbia un ruolo di rilievo nell'immuno-evasione tumorale. Occorre infatti che l'enzima sia espresso a livelli tali da indurre l'effettiva deplezione di L-arginina nell'ambiente extracellulare. Noi abbiamo dimostrato che nel NSCLC ciò non avviene, sebbene le cellule tumorali possano esprimere costitutivamente ARG2. Il panorama muterebbe però se all'azione dell'ARG2 si sommasse quella dell'ARG1 espressa dai PMN infiltranti il tumore.

## *Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari*

L'obiettivo principale del presente progetto è quello di investigare i meccanismi di azione e di regolazione dell'ARG1 nei tumori solidi dell'uomo, nel valutarne il ruolo nell'escape immunitario e nella progressione del tumore, e infine nell'identificare possibili approcci terapeutici mirati alla soppressione dell'attività arginasi.

## *Impatto assistenziale certo o potenziale*

Sviluppo potenziale di terapie tumorali anti immunosoppressore.

## *Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi*

Intendiamo investigare il ruolo di ARG1 sia in vitro su cellule tumorali umane, che in vivo in modelli preclinici murini.

Per quanto riguarda gli studi in vitro, nel primo anno di attività studieremo il meccanismo con il quale ARG1 viene rilasciata dai PMN nel microambiente tumorale. Poiché l'enzima è immagazzinato all'interno dei granuli di gelatinasi in forma inattiva, studieremo il suo meccanismo di attivazione e quale siano i fattori che ne determinano il rilascio nel microambiente. Questo studio verrà condotto esaminando l'effetto di specifici secretagoghi, quali formilpeptidi, PMA, zymosan, immunocomplessi e citocalasina b, e di citochine, segnatamente TNF $\alpha$ , IL-8 e IFN $\gamma$ . Verrà anche valutata l'azione dei surnatanti di linee cellulari tumorali, e si andrà a dosare in questi ultimi quei fattori che risultassero efficaci nell'indurre l'esocitosi e/o l'attivazione dell'ARG1 nei PMN.

Verificheremo poi se l'esocitosi di ARG1 indotta da tali fattori sia sufficiente ad indurre l'inibizione della proliferazione dei linfociti T in sistemi in vitro.

Al fine di verificare il ruolo dell'ARG1 nei tumori umani, verrà approfondito lo studio sui PMN infiltranti i tumori, con particolare riferimento a quelli del polmone. Verranno confrontati i livelli di argininemia e di ARG1 sierica in pazienti con NSCLC e in individui normali. Si valuterà inoltre se i livelli di ARG1 nel siero possano essere correlati con parametri anatomopatologici, quali tipo istologico e grado, e clinici, quali stadio, OS e DFS.

Per quanto riguarda gli esperimenti in modelli preclinici murini intendiamo usare due differenti approcci.

1. Miriamo a valutare gli effetti biologici dell'espressione di ARG1 in un modello transgenico murino recentemente prodotto nel nostro laboratorio, in cui si ha un'espressione costitutiva di ARG1 nei macrofagi.

2. Dato che nel topo i macrofagi rappresentano la popolazione leucocitaria maggiormente presente nel microambiente tumorale, intendiamo investigare nello stesso modello animale il ruolo di ARG1 nella progressione tumorale e nel tumour immune escape.

Lo sviluppo di un modello murino per lo studio dell'espressione di ARG1 è molto importante per studiare la funzione di

## Programmazione 2009-2011

questo enzima anche in patologie non tumorali, come le alterazioni del metabolismo dell'Arginina, l'asma, le infezioni, le ferite e le malattie autoimmuni. Inoltre questo modello è essenziale per poter sperimentare nuovi approcci terapeutici mirati all'inibizione dell'attività arginasi.

Infatti l'ultima tappa del nostro progetto consiste nell'identificare inibitori specifici dell'attività enzimatica o inibitori di quei fattori che inducono il rilascio e/o l'attivazione di ARG1.

Il nostro scopo, per il primo anno, è quello di giungere ad identificare i fattori responsabili dell'esocitosi di ARG1 da parte dei PMN, di chiarire in parte i meccanismi di attivazione dell'enzima, di raccogliere un numero di campioni adeguato da pazienti e controlli, e di avviarne l'indagine.

### *Track record*

Rotondo R.-Mastracci L.-Piazza T.-Barisione G.-Fabbi M.-Cassanello M.-Costa R.-Morandi B.-Astigiano S.-Cesario A.-Sormani MP.-Ferlazzo G.-Grossi F.-Ratto GB.-Ferrini S.-Frumento G.

Arginase 2 is expressed by human lung cancer, but neither it induces immune suppression, nor it affects disease progression.

Int. J. Cancer 123:1108/1116, 2008

Rotondo R.-Barisione G.-Mastracci L.-Grossi F.-Orengo AM.-Costa R.-Truini M.-Fabbi M.-Ferrini S.-Barbieri O.

IL8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophils polymorphonuclears in Non-Small Cells Lung Cancer.

Int. J. Cancer 125:887/893, 2009