

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: 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.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

- Analisi in vitro del trattamento con anti-Siglec-7 o anti-CD33 di cellule leucemiche mieloidi.

Effettueremo esperimenti di proliferazione sia con la linea U937, sia con un pannello di leucemie mieloidi acute e croniche selezionate, CD33+, Siglec-7+ isolate ex-vivo da pazienti emato-oncologici. Sappiamo che le leucemie "fresche" possono presentare una suscettibilità diversa al trattamento con anticorpi monoclonali anti-CD33 o anti-

Programmazione 2009-2001

Siglec-7 rispetto alle linee cellulari. Utilizzeremo sia campioni congelati già in nostro possesso sia campioni freschi ottenuti grazie alle collaborazioni con i reparti di onco-ematologia dell'Ospedale San Martino (Prof. Andrea Bacigalupo e Prof. Marco Gobbi) o dell'Istituto Gaslini di Genova (Dr. Giorgio Dini) e prelevati dai pazienti previo consenso informato. Gli esperimenti consisteranno in colture di cellule leucemiche in vitro in assenza (linea U937) o presenza di citochine appropriate quali IL-3, SCF ed GM-CSF (leucemie mieloidi fresche): le cellule saranno sottoposte a "crosslinking" con anticorpi anti-Siglec-7, anti-CD33 e anticorpi di controllo, utilizzando piastre ricoperte con anticorpi anti-porzione Fc delle IgG murine. La proliferazione sarà valutata a diversi intervalli di tempo (18-24-48 ore) come in precedenti esperimenti. Una volta confermato l'effetto inibitorio valuteremo la produzione di citochine e/o chemochine e verificheremo se il "crosslinking" di CD33 o Siglec-7 possa modulare questa produzione. In passato solo la produzione di IL-6 era stata studiata.

Recentemente è stato dimostrato un ruolo cruciale nel differenziamento mieloide delle proteine JAK3/STAT3. Valuteremo se il "crosslinking" di CD33 o Siglec-7 possa modulare l'espressione e la fosforilazione delle vie di trasduzione del segnale (JAK/STAT) in particolare di JAK3 e STAT3, paragonandole a risultati precedentemente ottenuti analizzando lo stato di attivazione di STAT5. Inoltre ci concentreremo sulle proteine che regolano il ciclo cellulare (Cicline e cdk) e in particolare ci focalizzeremo sull'espressione di D1 (già precedentemente analizzata) paragonandola a D2 e poi cdk4 e cdk6. Queste analisi saranno effettuate sia con tecniche di citometria a flusso sia tramite Western Blot, queste ultime in collaborazione con la Prof. C. Domenicotti (DIMES, Università di Genova).

- Analisi degli effetti in vivo mediati da anticorpi diretti contro Siglec-7 o CD33 inoculati in topi NOD/SCID IL2rg^{-/-}. Questi esperimenti saranno effettuati in collaborazione con la Dott.ssa Irma Airoidi (Servizio di Oncologia diretto dal Dr. Vito Pistoia, Istituto G. Gaslini di Genova), che già da tempo si appoggia al servizio di Animal Facility dell'IST. Pianificheremo un protocollo per l'inoculo di anticorpi monoclonali specifici per Siglec-7 e CD33 in topi NOD/SCID IL2rg^{-/-}. nei quali venga fatta espandere la linea mieloide leucemica umana U937, positiva per l'espressione di entrambe le molecole CD33 e Siglec-7. A questo scopo verranno purificate grandi quantità di anticorpi monoclonali derivati dai surnatanti dei seguenti ibridomi: QA79 (anti-Siglec-7, gentilmente fornito dal Prof. A. Moretta, Università di Genova), CD33 e un ibridoma produttore un anticorpo di controllo dello stesso isotipo IgG1 dei precedenti ma funzionalmente non correlato. La purificazione avverrà tramite cromatografia a scambio ionico (su DEAE). In una prima serie di esperimenti ci concentreremo sull'inoculo nel topo di QA79 (anti-Siglec-7), effettuando almeno due iniezioni a settimana per circa due settimane, con la prima iniezione effettuata 24-48 ore dopo inoculo i.p. di U937. I topi NOD/SCID IL2rg^{-/-} saranno suddivisi in tre gruppi, ciascuno comprendente 4-6 topi e trattati con dosi di anticorpo diverse. Dopo una serie di esperimenti preliminari per valutare una curva dose-risposta, valuteremo gli effetti dei trattamenti sulla crescita del tumore e sulla sopravvivenza dei topi. Tutti gli esperimenti e le analisi statistiche saranno effettuati e valutati in collaborazione con l'unità del Dr. Pistoia.

Nel corso del primo anno (2009-2010) saranno preparate le quantità di anticorpo purificato da inoculare in vivo e saranno effettuati i primi esperimenti nei modelli murini per valutare una curva dose-risposta. In parallelo, saranno svolti esperimenti con la linea U937 che ci consentiranno una più precisa analisi in vitro degli effetti del trattamento con anti-Siglec-7 o anti-CD33 su cellule leucemiche mieloidi. Saranno anche raccolti campioni di leucemie mieloidi "fresche" dai pazienti.

Track record

Spaggiari G.M.-Capobianco A.-Becchetti S.-Mingari M.C.-Moretta L.
Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation.
Blood 107:1484/1490, 2006

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 109:3767/3675, 2007

Spaggiari G.M.-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

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

Locatelli F.-Pende D.-Maccario R.-Mingari M.C.-Moretta A.-Moretta L.
Haploidentical hemopoietic stem cell transplantation for the treatment of high-risk leukemias: How NK cells make the difference.
Clin. Immunol. Epub May 28, 2009

Pende D.-Marcenaro S.-Falco M.-Martini S.-Bernardo M.E.-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 redefinition of inhibitory KIR specificity.
Blood 113:3119/3129, 2009

Programmazione 2009-2001

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: 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

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

Programmazione 2009-2001

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.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Campioni derivati da melanoma metastatico e da liquidi ascitici di pazienti affette da tumore ovarico verranno ottenuti grazie alle collaborazioni con i seguenti reparti clinici: Oncologica Medica A e C, Oncologia Chirurgica IST e Dipartimento di Ginecologia dell'Università di Genova. I campioni saranno raccolti previo ottenimento del consenso informato come da procedura approvata dal comitato etico dell'IST.

Isolamento e caratterizzazione fenotipica e delle CST.

Per poter meglio caratterizzare dal punto di vista molecolare le CST, saranno adottate procedure di coltura standardizzate e già in uso presso il laboratorio. Utilizzeremo terreni di coltura selettivi che permettono la crescita delle cellule tumorali sottoforma di sfere e contemporaneamente l'arricchimento in CST. Dopo aver verificato eventuali caratteristiche di staminalità (capacità di autorinnovamento, test di formazione di sfere) queste cellule saranno clonate. Le ipotetiche CST saranno isolate sulla base della loro proprietà di maggiore resistenza ai farmaci e della radioresistenza. Sarà poi verificata la tumorigenicità in vivo di linee arricchite in CST (modelli murini NOD/SCID e NOD/SCID il2rg -/-).

Generazione di anticorpi monoclonali.

Topi balb/c verranno immunizzati con CST. Valuteremo se gli anticorpi monoclonali prodotti siano in grado di riconoscere molecole differenzialmente espresse nelle diverse sottopopolazioni che compongono il tumore. Le molecole riconosciute dagli anticorpi selezionati saranno identificate attraverso cromatografia e spettrometria di massa.

Analisi funzionale delle CST.

E' nostra intenzione analizzare se le cellule staminali di melanoma contribuiscono in vivo alla formazione del tumore attraverso la promozione dell'angiogenesi tumorale "classica" e/o attraverso il loro stesso differenziamento in cellule endoteliali (mimetismo vascolare). A tal fine verrà valutata la capacità delle CST di produrre mediatori solubili promuoventi l'angiogenesi. La presenza di bFGF, VEGF, CXCL1/Gro-alpha, CXCL8/IL-8 nei sovrantanti tumorali sarà valutata attraverso tests ELISA. La capacità dei sovrantanti tumorali di supportare la crescita, la migrazione e la differenziazione delle cellule endoteliali in vitro verrà valutata attraverso test MTT, test di chemiotassi e test di crescita su substrato (Matrigel). Infine, si valuterà la capacità delle CSC di melanoma di produrre e rilasciare mediatori pro-angiogenici se stimolate con PMA e ionomicina o LPS (in collaborazione col Dr. Roberto Benelli, S.S: Oncologia Molecolare e Angiogenesi IST).

La capacità vasculogenica (mimetismo vascolare) delle CST verrà valutata mediante utilizzo di modelli murini di xenotrapianto. Linee cellulari di tumore saranno inoculate s.c. in topi NOD/SCID. Quando i tumori trapiantati raggiungeranno un diametro di circa 10-15 mm saranno prelevati e sottoposti ad analisi istologica e IHC. Per determinare se la capacità vasculogenica si associ alle cellule staminali, esamineremo l'espressione di marcatori di staminalità e citogenetici (anomalie cromosomiche) sulle cellule endoteliali di probabile derivazione tumorale. Tale obiettivo sarà raggiunto attraverso la preparazione di sonde FISH "ad hoc" marcate combinate con immunisto chimica per marcatori endoteliali. Per quest'ultimo aspetto è in atto la collaborazione con il laboratorio di Oncologia dell'Istituto Giannina Gaslini di Genova (Prof. Vito Pistoia).

Suscettibilità alla lisi da parte delle cellule NK e analisi delle interazioni tra cellule NK e cellule di melanoma.

Valuteremo con test citotossici la capacità di cellule NK (allogeneiche e autologhe) di lisare in vitro popolazioni tumorali arricchite in CST. Saranno identificati i recettori attivatori responsabili del riconoscimento e della lisi e gli eventuali ligandi espressi dalle cellule tumorali. Verranno anche analizzati gli effetti della co-coltura tra cellule NK e cellule tumorali. A tal fine, le cellule NK isolate dal sangue periferico saranno attivate in vitro in presenza di IL-2 e coltivate sia in presenza che in assenza di cellule di melanoma. Dopo 7 giorni verrà valutata: a) la proliferazione delle cellule NK (CFSE); b) l'attività citotossica (test di rilascio di ⁵¹Cr) e la produzione di citochine (tests Elisa).

Analisi della capacità delle cellule NK di prevenire o inibire la crescita in vivo delle CST.

Ai ceppi di topi trattati con le cellule tumorali verranno somministrate, dopo un intervallo di circa 10 giorni, cellule NK umane attivate e monitorata la sopravvivenza dei topi trattati con le cellule NK rispetto ai controlli.

Durante il primo anno (2009-2010) verranno ulteriormente perfezionate le metodiche di isolamento ed identificazione di CST a partire dai campioni di tumore (metastasi cutanee e/o linfonodali per il melanoma e liquidi ascitici per il carcinoma ovarico) allo scopo di ottenere nuove linee tumorali arricchite in CST. Proseguiranno i test di screening su anticorpi monoclonali ottenuti dall'inoculo di popolazioni arricchite in CST da melanoma e in parte già in nostro possesso. Procederemo con gli esperimenti di tumorigenicità in vivo, inizialmente con il modello del melanoma del quale disponiamo al momento di maggiori informazioni, e proseguiranno gli studi per caratterizzare l'attività delle cellule NK (citotossicità e produzione di citochine) in risposta al contatto con le diverse linee tumorali. Saranno inoltre approfonditi gli studi relativi alla produzione di fattori pro-angiogenici da parte delle linee di tumore da noi ottenute in vitro.

Track record

Moretta L.-Bottino C.-Pende D.-Castriconi R.-Mingari M.C.-Moretta A.
Surface NK receptors and their ligands on tumor cells.
Semin. Immunol. 18: 151/158, 2006

Programmazione 2009-2001

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

Spaggiari G.M.-Capobianco A.-Becchetti S.-Mingari M.C.-Moretta L.
Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation.
Blood 107:1484/1490, 2006

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 CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells.
Cancer 112:863/875, 2008

Spaggiari G.M.-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

Locatelli F.-Pende D.-Maccario R.-Mingari M.C.-Moretta A.-Moretta L.
Haploidentical hemopoietic stem cell transplantation for the treatment of high-risk leukemias: How NK cells make the difference.
Clin. Immunol. Epub May 28, 2009

Pende D.-Marcenaro S.-Falco M.-Martini S.-Bernardo M.E.-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 redefinition of inhibitory KIR specificity.
Blood 113:3119/3129, 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

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, 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,

Programmazione 2009-2001

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 extracellulare, 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.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Sono attualmente in corso studi atti ad analizzare gli effetti funzionali dell'interazione fra cellule NK e cellule tumorali e stromali (fibroblasti) derivate da campioni di tessuto tumorale fresco. Il materiale biologico è prelevato da pazienti con melanoma metastatico, di cui è disponibile una biopsia del tumore effettuata a fini terapeutici. Il materiale biotico è ottenuto grazie alla collaborazione con il Prof. Ferdinando Cafiero (Oncologia Chirurgica IST) e con la Dott.ssa Paola Queirolo (Oncologia Medica A IST). Le cellule NK fresche co-coltivate con fibroblasti o con cellule tumorali sia in assenza che in presenza di diversi stimoli citochinici (IL-2, IL-15, IL-12, IL-23), sono valutate funzionalmente e fenotipicamente attraverso diversi approcci: a) valutazione del potenziale citotossico nei confronti di appropriate cellule bersaglio; b) valutazione della produzione di citochine mediante test ELISA o analisi intracitoplasmatica; c) valutazione della capacità

Programmazione 2009-2001

delle cellule NK di indurre la maturazione delle DC e di eliminare DC immature. L'analisi fenotipica/funzionale dopo co-coltura viene effettuata anche su fibroblasti e cellule tumorali. I primi dati di questi esperimenti indicano che, effettivamente, le cellule NK possono essere modulate negativamente dai fibroblasti derivati da tessuto tumorale. Nel corso del 2009, questi dati saranno validati dall'analisi funzionale dei fibroblasti, ed integrati dallo studio degli effetti mediati dalle cellule tumorali.

Nel biennio 2010-2011:

- proseguiranno gli esperimenti di co-coltura attualmente in corso. Mediante l'utilizzo di mAb bloccanti ed inibitori specifici saranno caratterizzati gli eventuali fattori solubili coinvolti nei meccanismi di modulazione individuati. Saranno anche immunizzati topi con cellule tumorali, TAF e cellule NK con lo scopo di ottenere nuovi mAbs specifici per molecole di superficie eventualmente coinvolte nelle interazioni cellula-cellula
- in collaborazione con la Prof.ssa Bianca Sparatore (Istituto di Biochimica, DIMES Università di Genova), che sintetizzerà la molecola HMGB1 ed eseguirà valutazioni quantitative della presenza intra- ed extra-cellulare della molecola in diverse condizioni sperimentali, saranno analizzati gli eventuali effetti di HMGB1 sulla funzione e/o il fenotipo delle diverse sottopopolazioni di cellule NK. Inoltre, mediante l'uso di mAbs specifici, saranno analizzati in dettaglio i sistemi recettoriali di superficie coinvolti nella regolazione del rilascio di HMGB1 da parte delle cellule NK
- in collaborazione con il Prof. Luigi Varesio (Laboratorio di Biologia Molecolare, Istituto G. Gaslini Genova), che si avvale di una solida esperienza nello studio dell'influenza dell'ipossia sulla funzione cellulare, mediante l'utilizzo di un incubatore a tensione di Ossigeno controllata, studieremo gli effetti dell'ipossia sulla funzione e sul fenotipo delle cellule NK
- saranno caratterizzate eventuali sinergie esistenti tra recettori di superficie, espressi dai linfociti NK in seguito ad attivazione (per es. CD69 e Nkp44), nel riconoscere cellule bersaglio e nel trasdurre segnali positivi all'interno della cellula. Mediante esperimenti di immunoprecipitazione crociata ed analisi in Western Blot si valuterà se l'interazione della cellula NK con cellule bersaglio o il diretto ingaggio di singoli recettori mediato da mAbs specifici, possa causare associazioni, in cis, tra recettori di superficie. Mediante lo stesso approccio saranno anche analizzate le molecole trasduttrici possibilmente associate ai complessi recettoriali e, attraverso l'analisi del loro pattern di fosforilazione, se ne valuterà il ruolo nel trasporto del segnale all'interno della cellula. Attraverso l'analisi al microscopio confocale le possibili associazioni recettoriali saranno visualizzate e ne sarà indagata la loro possibile partecipazione a sinapsi immunologiche.

Track record

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

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

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)

Programmazione 2009-2001

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.

Descrizione delle attività 2009-2011, con dettaglio delle attività e dei risultati attesi nel primo anno

Al fine di identificare nuovi markers tumorali, verranno prodotti e caratterizzati anticorpi monoclonali murini e ricombinanti umani (scFv) specifici sia per recettori espressi sulle cellule tumorali di carcinoma ovarico (isolate dal liquido ascitico e/o dal tessuto tumorale) e di melanoma, sia per proteine della ECM dello stroma tumorale rilasciate dalle cellule tumorali o dalle cellule stromali presenti nel microambiente tumorale (come per esempio Periostina). Gli anticorpi ricombinanti umani verranno prodotti mediante le "Antibody phage Display Libraries", un sistema che permette la presentazione della parte scFv dell'anticorpo sulla superficie di un fago. Usando un processo di "biopanning" si possono selezionare fagi che presentano scFv umani che legano specificamente proteine "targets", ad esempio recettori di membrana e proteine della ECM. Questa tecnologia è un rapido ed efficace strumento che permette di ottenere anticorpi monoclonali umani ricombinanti ad alta specificità ed affinità senza ricorrere all'immunizzazione di animali. Vengono così eliminati gli inconvenienti determinati dall'uso sull'uomo di proteine derivate da una specie diversa. Essendo più piccoli di una immunoglobulina completa possono più facilmente raggiungere e legare l'antigene "target" e sono più facilmente manipolabili con tecniche di ingegneria genetica che permettono di produrre proteine di fusione composte da scFv (veicolo) e farmaco (es IL-2, TNF-alpha o altri). Il farmaco potrà così raggiungere in maniera selettiva e a concentrazioni più alte il tumore, eliminando il problema della tossicità che spesso è limitante quando il farmaco non viene veicolato selettivamente nel tumore.

Un altro approccio che verrà usato per l'identificazione di nuovi markers tumorali è quello proteomico. E' in corso uno studio sulla caratterizzazione delle proteine espresse sulla superficie di cellule di melanoma umano cresciute nel

Programmazione 2009-2001

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 permetterebbe di identificare nuovi marcatori tumorali.

Nel primo anno di questo progetto ci focalizzeremo sulla produzione e caratterizzazione di anticorpi monoclonali murini e ricombinanti umani specifici per la periostina. Selezioneremo inoltre la "Antibody phage Display Library", per ottenere anticorpi ricombinanti umani che abbiano specificità per proteine espresse preferenzialmente sulla superficie di cellule di melanoma sia primario che metastatico. Infine, i reagenti prodotti verranno utilizzati non solo per studi preclinici di targeting e immunoterapia, ma anche per mettere a punto un test di espressione della periostina nel sangue di pazienti con melanoma e carcinoma ovarico per valutarne il loro potenziale diagnostico.

Track record

Balza E.-Mortara L.-Sassi F.-Monteghirfo S.-Carnemolla B.-Castellani P.-Neri D.-Accolla RS.-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.12:2575/2582, 2006

Castriconi R.-Dondero A.-Negri F.-Bellora F.-Nozza P.-Carnemolla B.-Raso A.-Moretta L.-Moretta A.-Bottino C.
Both CD133+ and CD133- medulloblastoma cell lines express ligands for triggering NK receptors and are susceptible to NK-mediated cytotoxicity.
Eur. J. Immunol. 11:3190/3196, 2007

Mortara L.-Balza E.-Sassi F.-Castellani P.-Carnemolla B.-De Lerma Barbaro A.-Fossati S.-Tosi G.-Accolla RS.-Borsi L.
Therapy-induced antitumor vaccination by targeting tumor necrosis factor alpha to tumor vessels in combination with melphalan.
Eur. J. Immunol. 12:3381/3392, 2007

Avignolo C.-Bagnasco L.-Biasotti B.-Melchiori A.-Tomati V.-Bauer I.-Salis A.-Chiossone L.-Mingari MC.-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

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

Brevetto "Anticorpo monoclonale e suo uso per la identificazione della isoforma oncofetale della fibronectina (b-fn) a scopo diagnostico o terapeutico". Inventori: Balza E, Borsi L, Castellani P, Carnemolla B, 2008

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 125:751/758, 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. 315:226739, 2009