

S.S. Oncologia Molecolare e Angiogenesi

Marcatori tumorali d'inflammatione quali target per terapie mirate di chemioprevenzione

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: e - Prevenzione primaria e chemioprevenzione

Responsabile scientifico: Nicoletta Ferrari

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Roberto Benelli, Stefano Monteghirfo, Sebastiano Carlone, Claudio Malfatto, Simona Minghelli

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: fenretinide; xantumolo; AKT; beta-catenina; CXCL1; COX-2

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Biologia Cellulare; S.S. Tumori Urologici; S.S. Embriogenesi e Tumorigenesi su Modelli Animali; S.C. Anatomia e Citoistologia Patologica

Altri Enti coinvolti:

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Ministero della Salute, Compagnia di San Paolo

Background

Un'ampia letteratura indica che i tumori solidi umani si avvantaggiano di condizioni croniche sub-letali di ipossia, a loro volta causa ed effetto di stimoli pro-infiammatori di varia natura.

Mentre la stessa cellula tumorale è in grado di indurre e favorire questo status micro ambientale, essa condiziona la propria nicchia asservendo le cellule normali (endotelio, fibroblasti, leucociti) a proprio vantaggio. L'idea di trattare un tumore considerando la sola cellula neoplastica è quindi riduttiva e l'applicazione di protocolli chemiopreventivi capaci di colpire l'intero microambiente tumorale risulta senz'altro preferibile. Numerosi approcci sperimentali e clinici hanno dimostrato che la modifica del microambiente tumorale in senso anti-infiammatorio e/o anti-angiogenico (es. con strategie contro HIF-1alfa, COX-2, mTOR, o VEGF) è in grado di ridurre sensibilmente l'incidenza tumorale e la progressione di tumori preesistenti.

Questo tipo di strategie si compone necessariamente di due fasi imprescindibili:

- l'identificazione di markers caratterizzanti il tumore nella sua componente multicellulare e la selezione di quelli utilizzabili come bersaglio;
- l'identificazione e sviluppo preclinico di molecole terapeutiche con azione mirata sui bersagli prescelti.

Il nostro progetto si inserisce in questa tematica testando farmaci di origine sintetica o naturale ad attività chemiopreventiva e valutandone gli specifici bersagli cellulari, sia a livello di cellula tumorale che di microambiente.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Identificazione di marcatori che accompagnano la progressione tumorale sia nella cellula neoplastica che nel microambiente e loro caratterizzazione.

Valutazione biochimica e preclinica di molecole chemiopreventive capaci di influenzare pathways attivatori propri dell'intera cellularità tumorale.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Validazione dei nuovi marcatori quali potenziali strumenti utili per la diagnosi/prognosi/follow-up del paziente neoplastico.

Produzione di dati utili alla traslazione delle molecole chemiopreventive analizzate all'applicazione clinica.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

La chemioresistenza rappresenta uno dei maggiori ostacoli al controllo della malattia neoplastica negli stadi avanzati. L'adattamento delle cellule tumorali alle terapie convenzionali rivela la presenza innata od acquisita di alterazioni molecolari nelle vie che regolano la proliferazione e l'attivazione di morte cellulare. Parte di queste alterazioni sono associate allo stato infiammatorio cronico che accompagna la malattia neoplastica. Non a caso vie di segnale quale PI3K/Akt, NF-kB, Wnt/beta-catenina sono fortemente alterate durante la progressione tumorale.

Utilizzando molecole quali fenretinide e xantumolo caratterizzate da limitati effetti indesiderati e quindi utilizzabili per una prevenzione "cronica" di alcune forme tumorali, e che abbiamo dimostrato modulare vie di segnale che controllano angiogenesi/metastasi e infiammazione, intendiamo condurre in vitro studi mirati alla messa a punto di protocolli di chemioprevenzione da applicare successivamente in sperimentazioni precliniche. Indagheremo inoltre su potenziali nuovi bersagli terapeutici per valutare possibili associazioni sinergiche con molecole aventi uno spettro d'azione complementare.

In questa parte del progetto i nostri modelli sperimentali saranno costituiti dal carcinoma prostatico e dalle leucemie, neoplasie per le quali le vie di segnale sopra citate hanno un ruolo essenziale.

Programmazione 2009-2011

Il carcinoma prostatico presentandosi come una neoplasia indolente per decenni è un modello ideale per approcci di chemioprevenzione. A dispetto di questa lentezza negli esordi, il tumore nella sua fase maligna presenta caratteristiche di estrema aggressività e difficile trattamento. Mentre le forme precoci benigne del tumore prostatico possono venir rallentate con terapie ormonali anti androgeno, l'insorgenza di chemioresistenza impone l'eradicazione chirurgica come endpoint obbligatorio di pazienti con diagnosi positiva. L'applicazione di protocolli chemiopreventivi in pazienti a rischio potrebbe inibire/rallentare l'insorgenza della patologia o inibire/rallentare la chemioresistenza e la progressione della malattia.

Utilizzando linee di carcinoma della prostata, ormono dipendenti e non, intendiamo definire nel dettaglio i meccanismi molecolari operati da fenretinide e xantumolo e che controllano la modulazione di Akt e NF-kB ed estenderemo la nostra indagine ad altre vie di segnale responsabili del processo invasivo e di chemioresistenza. Valuteremo inoltre se nel carcinoma prostatico la via di segnale Wnt/catenina è attivata e gli eventuali effetti di una sua modulazione. Particolare attenzione verrà inoltre rivolta allo stato redox prodotto dalle molecole in esame a livello cellulare quale probabile mediatore dei fenomeni osservati.

Definiti i meccanismi molecolari di risposta ai composti in esame passeremo alla sperimentazione in vivo utilizzando topi TRAMP trattati con i composti a partire dalla quarta settimana di vita e per 24 settimane consecutive. Alla conclusione degli esperimenti, una dettagliata analisi istologica e immunohistochemica dei tumori insorti ci permetterà di definire se tali molecole potranno avere un utilizzo nella clinica come chemiopreventivi in forme neoplastiche a lenta evoluzione.

L'insorgenza di ormono-resistenza e metastatizzazione nel carcinoma prostatico umano sembrano essere legati al trans-differenziamento neuroendocrino della cellula di adenocarcinoma in parte operato da Akt. Considerando che i topi TRAMP sviluppano tumori di origine neuroendocrina nel 50% dei casi, valuteremo se il nostro approccio di chemioprevenzione è in grado di modificare tale incidenza e inoltre tale modello sarà di particolare utilità per identificare potenziali marcatori di trans-differenziamento (e quindi di progressione della malattia) da applicare alla diagnostica.

Nell'ambito di studi indirizzati a comprendere il ruolo svolto dal microambiente nell'evoluzione del carcinoma prostatico, utilizzando il modello di carcinoma prostatico murino TRAMP-C2, abbiamo dimostrato che l'espressione costitutiva della chemochina CXCL1 nel topo singenico c57/bl svolge una vistosa azione inibitoria sullo sviluppo del tumore. Questo dato è decisamente controcorrente con altri studi su CXCL1 che lo dimostrano correlare con la progressione di alcuni tumori e, particolarmente, del melanoma. Studi effettuati su cellule TRAMP-C2 esprimenti CXCL1 selezionate da una lunga permanenza in vivo per resistere a questo trattamento (cellule TRAMP-G2) dimostrano che la permanenza in vivo elimina le cellule esprimenti CXCL1 e ne determina una transizione epitelio-mesenchimale con perdita delle citocheratine. Quando tuttavia l'espressione di CXCL1 è ripristinata con una nuova trasduzione, i tumori, pur mostrando una crescita comparabile ai controlli, sono tuttavia confinati nel sottocute, mentre i controlli invadono rapidamente i tessuti del topo arrivando ad infiltrare le vertebre. L'analisi proteomica di numerosi marcatori, tra cui MMP2, 3, 9 e TIMP1, 2 non ha dimostrato variazioni significative nelle due popolazioni tumorali in vivo. L'analisi delle due popolazioni cellulari in vitro mostra un'incrementata adesione ed una ridotta capacità migratoria nelle cellule esprimenti CXCL1. Partendo da questi dati caratterizzeremo i possibili effetti autocrini di CXCL1 sulle cellule TRAMP (che esprimono il recettore) e procederemo alla validazione patologica -su tissue-microarrays di tumori prostatici umani- dell'espressione di CXCL1 al fine di evidenziarne il possibile ruolo pro/anti tumorale nella storia naturale di questo tumore.

Per quanto riguarda il modello leucemico, abbiamo precedentemente dimostrato che l'inibizione dell'attività di Akt e NF-kB da parte di xantumolo è in grado di controllare la proliferazione ed il potenziale angiogenico di leucemie AML e CML. In leucemie CML Bcr/Abl(+), Imatinib è la terapia d'elezione; tuttavia i pazienti sviluppano resistenza al farmaco per overespressione o mutazioni del gene Bcr/Abl. Abbiamo dimostrato che lo xantumolo, con un meccanismo NF-kB e ROS dipendente, inibisce drasticamente la proliferazione cellulare e la trascrizione del gene Bcr/Abl (non la sua fosforilazione) e si è dimostrato attivo anche in cellule resistenti ad Imatinib. Sulla base di queste osservazioni, è nostra intenzione indagare se xantumolo e fenretinide sono in grado di bypassare i fenomeni di chemioresistenza, e con quali meccanismi, che si osservano in modelli sperimentali diversi. A tale scopo utilizzeremo cellule di leucemia linfocitica murina L1210, ampiamente utilizzate per la loro capacità di sviluppare chemioresistenza a numerosi farmaci antineoplastici grazie ad una overespressione dei geni MDR (multidrug resistance). Dati preliminari indicano che le cellule sono responsive ad entrambi i composti in esame e qualora fossimo in grado di superare fenomeni di chemioresistenza valuteremo in vivo, in un modello singenico, la reale efficacia di tali composti. Solo successivamente, e in caso di risultati promettenti, passeremo alla sperimentazione in vivo impiegando cellule di leucemia umana.

L'enzima COX-2 costituisce allo stesso tempo un marcatore ed un target per la chemioprevenzione del carcinoma coloretale. Grossi trials clinici multicentrici hanno confermato il coinvolgimento di COX-2 nell'insorgenza di questo tumore, dimostrando come inibitori di questo enzima (aspirina, celecoxib, ecc.) possano ridurre fino al 30% la sua incidenza nelle forme sporadiche. A dispetto della abbondantissima letteratura a questo riguardo, la valutazione dell'enzima attraverso immunohistochemica di campioni umani risulta molto controversa, specialmente nell'adenoma dove non è tuttora chiaro quale componente cellulare la esprima e con quanta frequenza. Secondo i nostri dati preliminari questa discrepanza è legata all'uso dei diversi anticorpi contro COX-2 oggi disponibili: la maggior parte di essi è prodotta sfruttando un dominio specifico di questo enzima (residui aminoacidici 567-599). Purtroppo questo peptide, pur distinguendo bene COX-2 da COX-1, quando analizzato con BLAST mostra una struttura sufficientemente conservativa anche in altre proteine cellulari. Questa promiscuità è facilmente evidenziabile quando il tessuto del colon è analizzato tramite western blot, infatti è tipica la comparsa di numerose bande aspecifiche a vari pesi molecolari e spesso più rappresentate di quella putativa a 72 kDa.

I nostri dati preliminari mostrano inoltre che 4 su 4 anticorpi prodotti contro COX-2 utilizzando suddetto peptide, o un suo frammento, riconoscono una proteina di peso molecolare simile che potrebbe non coincidere con l'enzima d'interesse. Questo antigene riconosciuto da anticorpi contro COX-2, ma non dotato di attività enzimatica, era già stato notato da Wennogle e colleghi nel '95 (FEBS letters 371: 315-20), ma mai identificato. Resta pertanto aperto il legittimo dubbio che possa semplicemente trattarsi di una forma denaturata della proteina, ovvero di una sua forma variante, ovvero di un'altra molecola. Poiché è probabile che fino ad oggi questo marcatore sia stato valutato in vece di

Programmazione 2009-2011

COX-2 in molti studi (gli anticorpi testati sono infatti tra i più usati), intendiamo identificare questa molecola; inoltre desideriamo tentare di selezionare in maniera definitiva almeno un anticorpo capace di riconoscere COX-2, possibilmente non promiscuo per l'antigene "COX-2 mimetico". In questo primo anno di studio intendiamo pertanto:

- Verificare la specificità e la sensibilità di anticorpi commerciali contro COX-2 su cellule di controllo trasdotte con un costrutto d'espressione per COX-2 (linea cellulare di carcinoma del colon HCT15 e SW480 normalmente incapaci d'esprimere l'enzima, anche sotto stimolazione con TNFa). Queste due linee hanno anche il vantaggio di esprimere livelli ai limiti della detection dell'antigene COX-2 mimetico.

- Tentare la separazione tramite gel bidimensionale ed identificare in spettrometria di massa l'antigene COX-2 mimetico.

Anche nel caso si trattasse di una particolare forma denaturata dell'enzima è comunque di notevole interesse identificarne la presenza, perché alcuni degli anticorpi testati riconoscono solo questa forma molecolare e non COX-2, generando pericolosi falsi positivi sia in immunocistochemica che in western blot.

Per caratterizzare gli effetti dell'espressione di COX-2 nel carcinoma del colon abbiamo valutato -tramite cytokine arrays- il pannello di fattori di crescita e citochine prodotti da linee cellulari di carcinoma del colon esprimenti (HT29, CaCo2) e non esprimenti COX-2 (HCT15, SW480). Tramite una ricerca in letteratura abbiamo selezionato queste linee anche in base al comparabile status di APC/beta-catenina poiché il pathway di wnt è tra i responsabili dell'espressione di COX-2.

L'analisi dei fattori solubili rilasciati nel medium di coltura ha dimostrato -sorprensamente- che, a scapito di più di 30 markers espressi in maniera comparabile tra le 4 linee cellulari, la presenza /assenza di COX-2 determinava variazioni solo su due markers: Anfiregulina e CCL20/MIP3a. Valuteremo pertanto se l'espressione di COX-2 sia condizione necessaria e sufficiente per determinare il rilascio di anfiregulina, un fattore di crescita tipicamente sovraespresso nelle fasi avanzate del carcinoma coloretale.

Per valutare il ruolo dei miofibroblasti del colon nella tumorigenesi abbiamo inoltre prodotto, in collaborazione con la S.C. di Anatomia e Citoistologia Patologica, 8 linee primarie di queste cellule, derivate da 4 pazienti, utilizzando sia la parte tumorale che la controparte di tessuto normale del medesimo soggetto. Le 8 linee saranno confrontate su cytokine arrays per evidenziare le differenze nelle due componenti cellulari che, già macroscopicamente, mostrano differenze sostanziali nella dimensione ed organizzazione su monolayer di coltura.

Track record

Albini A.-Dell'Eva R.-Vené R.-Ferrari N.-Noonan DM.-Fassina G.
Mechanisms of the anti-angiogenic activity by the hop flavonoid Xanthohumol.
FASEB J. 20:527/529, 2006

Benelli R.-Lorusso G.-Albini A.-Noonan DM.
Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease.
Curr. Pharm. Des. 12:3101/3115, 2006

Paleari L.-Trombino S.-Falugi C.-Gallus L.-Carlone S.-Angelini C.-Sepcic K.-Turk T.-Faimali M.-Noonan DM.-Albini A.
Marine sponge-derived polymeric alkylpyridinium salts as a novel tumor chemotherapeutic targeting the cholinergic system in lung tumors.
Int. J. Oncol. 29:1381/1388, 2006

Tettamanti G.-Malagoli D.-Benelli R.-Albini A.-Grimaldi A.-Perletti G.-Noonan DM.-de Eguileor M.-Ottaviani E.
Growth factors and chemokines: a comparative functional approach between invertebrates and vertebrates.
Curr. Med. Chem.13:2737/2750, 2006

Albini A, Benelli R.
The chemoinvasion assay: a method to assess tumor and endothelial cell invasion and its modulation.
Nat. Protoc. 2:504/511, 2007

Albini A.-Noonan D.-Ferrari N.
Molecular pathways for cancer angioprevention.
Clin. Cancer Res.13:4320/4325, 2007

Benelli R.
Aspirin, COX-2, and the risk of colorectal cancer.
N. Engl. J. Med. 357:824/825, 2007

Dell'Aica I.-Niero R.-Piazza F.-Cabrelle A.-Sartor L.-Colalto C.-Brunetta E.-Lorusso G.-Benelli R.-Albini A.-Calabrese F.-Agostini C.-Garbisa S.
Hyperforin blocks neutrophil activation of matrix metalloproteinase-9, motility and recruitment, and restrains inflammation-triggered angiogenesis and lung fibrosis.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 321:492/500, 2007

Dell'Eva R.-Ambrosini C.-Minghelli S.-Douglas M. Noonan DM.- Albini A.-Ferrari N.
The Akt inhibitor deguelin, is an angiopreventive agent also acting on the NF- κ B pathway. Carcinogenesis 28: 404/413, 2007

Dell'Eva R.-Ambrosini C.-Vannini N.-Piaggio G.-Albini A.-Ferrari N.
The Akt/ NF- κ B inhibitor Xanthohumol targets cell growth and angiogenesis in hematologic malignancies.
Cancer 110:2007/2011, 2007

Programmazione 2009-2011

Indraccolo S.-Pfeffer U.-Minuzzo S.-Esposito G.-Roni V.-Mandrizzato S.-Ferrari N.-Anfosso L.-Dell'eva R.-Noonan DM.-Chieco-Bianchi L.-Albini A.-Amadori A.
Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells.
J. Immunol. 178:1122/1135, 2007

Larghero P.-Vene R.-Minghelli S.-Travaini G.-Morini M.-Ferrari N.-Pfeffer U.-Noonan D.-Albini A.-Benelli R.
Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression.
Carcinogenesis 28:1008/1020, 2007

Noonan DM.-Benelli R.-Albini A.
Angiogenesis and cancer prevention: a vision.
Recent Results Cancer Res.174:219/224, 2007

Bianco R.-Rosa R.-Damiano V.-Daniele G.-Gelardi T.-Garofalo S.-Tarallo V.-De Falco S.-Melisi D.-Benelli R.-Albini A.-Ryan A.-Ciardiello F.-Tortora G.
Vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells.
Clin. Cancer Res. 4:5069/5080, 2008

Monteghirfo S.-Tosetti F.-Ambrosini C.-Stigliani S.-Pozzi S.-Frasconi F.-Fassina GF.-Soverini S.-Albini A.-Ferrari N.
Anti-leukemia effects of xanthohumol in Bcr/Abl transformed cells involve NF- κ B and p53 modulation.
Mol. Cancer Ther. 7:2692/2702, 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 cells.
Exp Cell Res. 314:2289/2298, 2008

Barboro P.-Repaci E.-Rubagotti A.-Salvi S.-Boccardo S.-Spina B,Truini M.-Introini C.-Puppo P.-Ferrari N.-Carmignani G.-Boccardo F.-Balbi C.
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. .
Br. J. Cancer 100:1608/1616, 2009

Benelli R.-Monteghirfo S.-Balbi C.-Barboro P.-Ferrari N.
Novel antivascular efficacy of metronomic Taxotere therapy in prostate cancer: hnRNP K as a player.
Int. J. Cancer 124:2989/2996, 2009

Ferrari N.-Palmieri D.
Role of MT1-MMP in the osteogenic differentiation.
Bone 44:251/265, 2009

Manduca P.-Castagnino A.-Lombardini D.-Marchisio S.-Soldano S.-Ulivi V.-Zanotti S.-Garbi C.-Sogno I.-Venè R.-Sapienza C.-Ferrari N.-Tosetti F.-Albini A.
Anti-angiogenic Properties of Chemopreventive Drugs: Fenretinide as a Prototype.
Recent Results Cancer Res.181:71/76, 2009

Vinciguerra M.-Carrozzino F.-Peyrou M.-Carlone S.-Montesano R.-Benelli R.-Foti M.
Unsaturated fatty acids promote hepatoma proliferation and progression through downregulation of the tumor suppressor PTEN.
J. Hepatol. 50:1132/1141, 2009

Benelli R.-Ferrari N.
Angiogenesis inhibition: state of the art, forgotten strategies and new perspectives.
Curr. Cancer Ther. Rev., in press

Ruolo dello stroma tumorale e di fattori solubili nell'immunosoppressione nei linfomi

Linea di ricerca: 2 - Interazioni Tumore-Ospite

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

Responsabile scientifico: Alessandro Poggi

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: linfomi; cellule mesenchimali stromali; HLA solubile; linfociti anti-tumoral; citotossicità

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Immunologia (S. Boero)

Programmazione 2009-2011

Altri Enti coinvolti: Unità di Anatomia Patologica, A.O.U. San Martino, Genova (J.L. Ravetti); Laboratorio di Ematologia e Clinica di Ematologia, Università di Genova (M. Gobbi); Laboratorio di Immunologia, Università del Piemonte Orientale (U. Dianzani); Laboratorio di Ematologia Sperimentale, Ospedale le Molinette, Torino (M. Massaia); Divisione di Immunologia Trapianti e Malattie Infettive, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano (M.R. Zocchi)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: descrittiva a fini conoscitivi

Soggetti cofinanziatori: Compagnia di San Paolo; Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

I linfociti citotossici possono eliminare le cellule neoplastiche fornendo una difesa nei confronti dell'espansione del tumore ed un ritardo nella morte dell'ospite. Nelle neoplasie ematologiche come nei tumori solidi, i linfociti devono localizzarsi nel sito tumorale prima di porre in atto i loro effetti protettivi. Nel contesto della neoplasia i linfociti effettori possono incontrare le cellule tumorali, le cellule mesenchimali stromali (MSC), un grande numero di cellule di tipo infiammatorio e cellule stromali reattive, fattori della matrice extracellulare, fattori solubili prodotti dalle popolazioni cellulari sopra menzionate. E' evidente che le cellule neoplastiche possono superare le difese dell'ospite date le loro capacità proliferative in modo che alcuni cloni tumorali selezionati dallo stesso ambiente circostante possano sfuggire ad ogni meccanismo di controllo. Le proteine della matrice extracellulare sintetizzate dalle MSC possono essere differenti in qualità e quantità rispetto a quelle dei tessuti sani e, in parte per questo motivo, le cellule neoplastiche possono espandersi e metastatizzare. Inoltre, le MSC ed altre cellule stromali possono produrre citochine che favoriscono la crescita neoplastica. Un esempio paradigmatico è il mieloma multiplo dove le cellule stromali producono IL6 favorendo la crescita del mieloma.

E' da notare che le MSC isolate dal BM possono promuovere la proliferazione e il differenziamento di varie sottopopolazioni di linfociti B. Inoltre, le MSC da BM possono acquisire caratteristiche dei fibroblasti reticolari presenti nei linfonodi e possono favorire la crescita delle cellule B dei linfomi follicolari. Quindi, si potrebbe considerare la MSC come un bersaglio della terapia in alcuni linfomi non Hodgkin (NHL) per limitare la crescita delle cellule neoplastiche B. Le MSC da BM possono inibire in vitro la proliferazione dei linfociti T e la generazione delle cellule citotossiche attivate da citochine. Inoltre, le MSC possono selezionare cellule di tipo regolatorio sia T che di tipo dendritico (DC) che in conseguenza inibiscono la risposta immunitaria. L'immunoterapia è un possibile mezzo terapeutico per eliminare le cellule neoplastiche. E' difficile generare in vitro ed in vivo cellule citotossiche specifiche perché pochi tumori presentano degli antigeni tumore associati (TAA) e quindi sono capaci di un'efficace risposta immunitaria. Dall'altra parte le cellule killer naturali (NK) che sono considerate i più potenti effettori citotossici di cui dispone l'uomo, possono lisare le cellule neoplastiche se queste mancano, od esprimono a bassi livelli, l'HLA di classe I. In questo scenario può avere anche un ruolo la forma solubile (s) dell'HLA-I. Infatti è stato dimostrato che il sHLA-I inibisce in vitro l'attività citotossica di cloni T alloreattivi e delle NK inducendone la apoptosi.

Intendiamo studiare se le MSC e l'HLA-I solubile potrebbero essere responsabili della regolazione della risposta immunitaria. Proponiamo di studiare il ruolo di questi due fattori nei linfomi non Hodgkin come modello di neoplasia con caratteristiche intermedie tra i tumori solidi propriamente detti e le leucemie. Ciò per poter poi applicare le conoscenze acquisite alle neoplasie di tipo epiteliale e mesodermico. Nel caso dei linfomi sia la via ematogena sia linfatica possono essere coinvolte nella diffusione della neoplasia; durante il passaggio attraverso l'endotelio, le cellule del sistema immunitario ricevono e forniscono una serie di segnali che possono modificare la funzionalità del linfocita anti-tumorale. E' essenziale capire se il comportamento del linfocita anti-tumorale sia lo stesso attraversando un vaso sano rispetto ad un vaso neoformato del tumore. Inoltre, sviluppare o potenziare la attività anti-endoteliale dei linfociti anti-tumorali potrebbe concorrere a ridurre la vascolarizzazione della neoplasia e quindi a ridurre la espansione. Intendiamo quindi analizzare se le cellule endoteliali possano costituire un bersaglio per i linfociti antineoplastici.

Infine, nel corso di NHL sono impiegati anticorpi monoclonali umanizzati (anti-CD20, Rituximab), accanto o in associazione alla chemioterapia. La citotossicità anticorpo dipendente (ADCC) mediata dalla interazione dell'anticorpo con il recettore per il frammento cristallizzabile (FcR) presente su effettori citotossici (quali linfociti T o NK) concorre alla eliminazione delle cellule linfomatose. Intendiamo analizzare quale tra le varie sottopopolazioni linfocitarie potenzialmente capaci di eliminare le cellule linfomatose siano le più efficaci nell'attivare la ADCC, tenendo conto della possibilità che la attivazione tramite FcR possa anche indurre la morte cellulare programmata dell'effettore citotossico (PCD).

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

Obiettivo generale:

Determinare quali sono i meccanismi d'immuno-evasione messi in atto dal linfoma e la loro rilevanza nella evoluzione della malattia.

Obiettivi secondari:

- a) Determinare se l'HLA solubile nei pazienti affetti da linfoma non Hodgkin (NHL) è responsabile della apoptosi di effettori anti-tumorali.
- b) Ruolo delle cellule mesenchimali stromali isolate dai linfonodi patologici nella regolazione della generazione e funzione di effettori anti-tumorali.
- c) Regolazione farmacologica della produzione di HLA-solubile e dell'azione immunosoppressiva delle cellule mesenchimali stromali.
- d) Ruolo potenziale dei linfociti anti-linfoma nella regolazione della diffusione del linfoma per via sanguinea e/o linfatica.
- e) Ruolo dell'induzione di PCD nell'effettore citotossico da ADCC tramite anticorpi monoclonali umanizzati usati in clinica per la terapia dei linfomi (anti-CD20, Rituximab).

Programmazione 2009-2011

Impatto assistenziale certo o potenziale

La correlazione tra la quantità di HLA solubile presente nel siero dei pazienti NHL, la presenza di linfociti effettori anti-tumoralmente apoptotici in circolo e il decorso della malattia permetterà di definire dei parametri biologici utili per la stadiazione della malattia.

La conoscenza dei meccanismi di immunoevasione messi in atto dalle cellule linfomatose seguita dall'identificazione dei farmaci, già approvati per l'uso in clinica, capaci di contrastare questi meccanismi permetterà la loro applicazione clinica nei linfomi.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

Questo progetto è focalizzato sulla comprensione dei meccanismi molecolari attraverso cui i linfomi non Hodgkin (NHL) sfuggono al controllo del sistema immunitario.

I casi di NHL si otterranno dalla Divisione di Ematologia diretta dal Prof. Gobbi (Università di Genova) e dall'Unità di Anatomia Patologica diretta dal Dr. Ravetti (A.O.U. San Martino, Genova). I campioni biologici (biopsie linfonodali, aspirati di midollo osseo e prelievi di sangue periferico) saranno ottenuti durante i controlli e le procedure diagnostiche convenzionali, in accordo con il consenso informato in uso presso la Divisione di Ematologia. Il progetto ha ottenuto, per il 2009, l'approvazione del Comitato Etico dell'Università di Genova e ne sarà richiesto il prolungamento per tutto il periodo della ricerca. Approssimativamente, in un anno, nella unità di Anatomia Patologica dell'ASL3 si sono eseguite 160 nuove diagnosi per casi di NHL e di malattia di Hodgkin (HL) su biopsie linfonodali di pertinenza della Regione Liguria. Ci proponiamo di studiare un quinto di questi casi in anno di ricerca. Questa previsione si basa sul fatto che nell'anno precedente abbiamo processato ed analizzato 30 casi tra NHL e HL. Ciascun caso sarà valutato per l'ammontare della componente stromale mediante immunistochemical e ciascun paziente sarà seguito nel tempo per valutare l'evoluzione della sua malattia. L'analisi statistica sarà eseguita applicando, se le condizioni lo permettono, i saggi statistici seguenti: ANOVA, Bonferroni-Dunnett, t di student o chi-quadrato.

Attività primo anno

a) Determinare se l'HLA solubile nei pazienti affetti da linfoma non Hodgkin (NHL) è responsabile della apoptosi di effettori anti-tumoralmente. Attraverso: i) valutazione dell'ammontare dell'HLA-I solubile presente nei sieri dei pazienti NHL e secreti dalle cellule linfomatose in coltura; ii) valutazione della sua funzionalità (induzione di apoptosi, produzione di citochine immunoregolatriche quali il fattore trasformante beta -TGFbeta; iii) identificazione dei meccanismi molecolari che inducono la apoptosi e le vie metaboliche utilizzate; iv) regolazione farmacologica della apoptosi indotta dall'HLA-I solubile o dalle cellule linfomatose.

Analizzeremo i sieri di 20-30 pazienti NHL per la presenza di HLA solubile mediante ELISA. In alcuni casi (n=10), popolazioni clonali di linfociti T o NK saranno selezionate sulla base dell'espressione dei recettori per l'HLA-I quali CD8, forme attivatorie o inibitorie della superfamiglia delle immunoglobuline dei recettori inibitori (IRS) e verificando se l'HLA-I solubile isolato dai pazienti è in grado di indurre la apoptosi dei linfociti effettori. Inoltre analizzeremo la interrelazione che c'è tra il segnale apoptotico mediato dal recettore per l'antigene nelle cellule T (di tipo alfa/beta e gamma/delta), in modo da capire se gli IRS attivatori sono in grado di amplificare la risposta mediata dal TCR. Il ruolo della via intrinseca ed estrinseca nell'apoptosi dell'effettore sarà analizzata come l'espressione durante l'interazione con il bersaglio tumorale delle proteine anti-apoptotiche o pro-apoptotiche della famiglia di Bcl2 (Bad, Bax, BclXI).

b) Ruolo delle cellule mesenchimali stromali isolate dai linfonodi patologici (LMSC) nella regolazione della generazione e funzione di effettori anti-tumoralmente. Suddivisibile nei seguenti sottopunti: i) analisi della localizzazione delle cellule mesenchimali stromali e dei linfociti in biopsie di linfonodi da pazienti NHL o da linfonodi risultati normali ed analizzati a scopo diagnostico; ii) isolamento e caratterizzazione fenotipico-funzionale delle LMSC.

Questa parte del progetto si basa sulla esperienza acquisita negli ultimi due anni coltivando le cellule mesenchimali stromali da linfonodi di pazienti NHL, dal midollo osseo e da biopsie tessutali.

Per determinare la relazione e la localizzazione regionale nei linfonodi di pazienti NHL o nei linfonodi risultati sani delle cellule linfomatose, dei linfociti T reattivi, delle cellule NK, delle cellule follicolari dendritiche, endoteliali e dei fibroblasti reticolari sarà eseguita una estensiva analisi immunistochemical con anticorpi che possono reagire con le indicate popolazioni cellulari. Focalizzeremo la nostra attenzione sui linfomi follicolari (FL) e sui linfomi a grandi cellule B diffusi (DLBCL) perché negli ultimi due anni questi due tipi di linfomi sono tra i più frequenti pervenuti (su 29 casi 17FL e 12 DLBCL). La valutazione della componente stromale (fibroblasti reticolari e rete di fibre collagene-reticolina) sarà eseguita con colorazioni specifiche e con anticorpi che riconoscono collagene-reticolina e cellule stromali (vimentina, transglutaminasi etc). La quantità della componente stromale sarà quantificata e correlata con la diagnosi e l'evoluzione della malattia. La quantità della componente stromale sarà correlata con la proliferazione delle cellule linfomatose e i linfociti normali reattivi in un determinato linfonodo.

La caratterizzazione funzionale sarà focalizzata sulla capacità delle LMSC di modulare l'mRNA basale o inducibile per citochine immunoregolatriche (come TGFbeta, HGF, VEGF e IL6). Per confermare la rilevanza biologica delle nostre osservazioni, alcuni esperimenti saranno eseguiti in parallelo su sezioni criostatate degli stessi linfonodi da cui le LMSC sono state ottenute.

Attività secondo anno

a) Prosecuzione delle attività riportate al punto b dell'anno precedente sul ruolo delle LMSC nella regolazione della generazione e funzione di effettori anti-tumoralmente.

b) Regolazione farmacologica della azione immunosoppressiva delle cellule mesenchimali stromali (LMSC).

La prosecuzione delle attività del punto b del 2009 sarà sviluppata in questi sottopunti: i) ruolo di LAIR-1 (Leukocyte-Associated-Ig-Like-Inhibitory Receptor-1) nella regolazione della proliferazione delle cellule B del NHL tramite la interazione con il collagene prodotto dalle LMSC; ii) ruolo della interazione tra NKG2D espresso dai linfociti effettori anti-tumoralmente ed i suoi ligandi espressi sulle LMSC.

Programmazione 2009-2011

Attività terzo anno

- a) Ruolo potenziale dei linfociti anti-linfoma nella regolazione della diffusione del linfoma per via sanguinea e/o linfatica.
- b) Ruolo dell'induzione di PCD nell'effettore citotossico da ADCC tramite anticorpi monoclonali umanizzati usati in clinica per la terapia dei linfomi (anti-CD20, Rituximab).

I risultati attesi per il 2009 sono i seguenti:

- a) Quantificazione dell'HLA solubile nei sieri di pazienti affetti da linfoma non Hodgkin (NHL).
- b) Quantificazione dell'HLA solubile liberato dalle cellule B NHL
- c) Valutazione della induzione di apoptosi, produzione di citochine immunoregatorie quali il fattore trasformante beta (TGFbeta), da parte dell'HLA solubile dei sieri o liberato dalle cellule B linfomatose
- d) Identificazione dei meccanismi molecolari che inducono la apoptosi e le vie metaboliche utilizzate.
- e) Regolazione farmacologica della apoptosi indotta dall'HLA-I solubile o dalle cellule linfomatose.
- f) Localizzazione delle cellule mesenchimali stromali isolate dai linfonodi patologici (LMSC) nei linfonodi NHL e sani.
- g) Isolamento e caratterizzazione fenotipico-funzionale delle LMSC.
- h) Selezione di anticorpi monoclonali specifici per le LMSC e/o coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria verso la cellula linfomatosa.

Track record

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

Expression of UL-16 binding proteins on neoplastic B cells and expansion of $\square\square$ T lymphocytes in low grade non Hodgkin lymphomas.
Blood 109:2078/2085, 2006

Poggi A.-Zocchi M.R.

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

Poggi A.-Zocchi M.R.

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

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

Human normal mature B lymphocytes express the T-lymphocyte-related tyrosine kinase ZAP-70. Leukemia 20:689/695, 2006

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

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

Poggi A.-Castellani C.-Fenoglio D.-Borsellino G.-Battistini L.-Zocchi M.R.

Adesion molecules and kinases involved in $\square\square$ T cells migratory pathways: implications for viral and autoimmune diseases.
Curr. Med. Chem. 14:3166/3170, 2007

Poggi A.-Prevosto C.-Zancolli M.-Canevali P.-Musso A.-Zocchi M.R.

NKG2D and natural cytotoxicity receptors are involved in natural killer cell interaction with self-antigen presenting cells and stromal cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1109:47/57, 2007

Poggi A.-Zancolli M.-Castellani S.-Borsellino G.-Battistini L.-Zocchi M.R.

Migratory pathways of gammadelta T cells and response to CXCR3 and CXCR4 ligands: adhesion molecules involved and implications for multiple sclerosis pathogenesis.
Ann. N.Y. Acad. Sci.1107:68/78, 2007

Poggi A.-Zocchi M.R.

Human natural killer lymphocytes through the engagement of natural cytotoxicity receptors and NKG2D can trigger self aggression.
Autoimmun. Rev. 6:295/299, 2007

Prevosto C.-Zancolli M.,Canevali P.-Zocchi M.R.-Poggi A.

Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction.
Haematologica 92:881/888, 2007

Ropolo M.-Degan P.-Foresta M.-D'errico M.-Lasiglie D.-Dogliotti E.-Casartelli G.-Zupo S.-Poggi A.-Frosina G.

Complementation of the oxidative damage DNA repair defect in Cockayne syndrome A and B cells by E. coli formamidopyrimidine DNA glycosilase.
Free Radic. Biol. Med. 42:1807/1817, 2007

Venè R.-Arena G.-Poggi A.-D'Arrigo C.-Mormino M.-Noonan D.M.-Albini A.-Tosetti T.

Programmazione 2009-2011

Novel cell death pathways induced by N/(4/hydroxyphenyl)retinamide: therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* 6:286/298, 2007

Lombardi M.L.-Terrazzano G.-Casentini E.-Gargiulo L.-Risitano A.-Camerlengo R.-Sica M.-Aufiero D.-Poggi A.-Dirozzi G.-Luzzatto L.-Rotoli B.-Notaro R. -Alfinito F.-Ruggiero G.

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Significant association with specific HLA-A, -B, -C, and -DR alleles in an Italian population.

Hum. Immunol. 69:202/206, 2008

Patterson S.-Chaidos A.-Neville D.C.-Poggi A.-Butters T.-Roberts I .A.G.-Karadimitris A.

Human invariant NKT cells display alloreactivity instructed by invariant TCR-CD1d interaction and killer immunoglobulin receptors.

J. Immunol. 181:3268/3276, 2008

Ponassi R.-Biasotti B.-Tomati V.-Bruno S.-Poggi A.-Malacarne D.-Cimoli G.-Salis A.-Pozzi S.-Migolino M.-Damonte G.-Cozzini P.-Spyraki F.-Campanini B.-Bagnasco L.-Castagnino N.- Tortolina L.-Mumot A.-Frassoni F.-Daga A.-Cilli M.-Piccardi F.-Monfardini I.-Perugini M.- Zoppoli G.-D'Arrigo C.-Pesenti R.-Parodi S.

A novel Bim-BH3-derived Bcl-XL inhibitor: biochemical characterization, in vitro, in vivo and ex-vivo anti-leukemic activity.

Cell Cycle 7:3211/3224, 2008

Poggi A.-Catellani S.-Bruzzone A.-Caligaris-Cappio F.-Gobbi M.-Zocchi M.R.

Lack of the Leukocyte-associated Ig-like receptor-1 expression in high risk chronic lymphocytic leukemias results in the absence of a negative signal regulating kinase activation and cell division. *Leukemia* 22:980/988, 2008

Poggi A.-Zocchi M.R.

Role of bone marrow stromal cells in the generation of human CD8(+) regulatory T cells.

Hum. Immunol. 69:755/769, 2008

Viale M.-Petrillo M.-Taccagno M.-Castagnola P.-Aiello C.-Cordazzo C.-Mariggò M.A.-Jadhav S.A.-Bianchi L.-Leto G.-Rizzato E.-Poggi A.-Spinelli D.

Sensitivity of different resistant tumour cell lines to the two novel compounds (2Z,4E)-2-methylsulfanyl-5-(1-naphthyl)-4-nitro-2,4-pentadienoate and (1E,3E)-1,4-bis(2-naphthyl)-2,3-dinitro-1,3-butadiene.

Eur. J. Pharmacol. 588:47/51, 2008

Fenoglio D.-Poggi A.-Ferrera A.-Setti M.-Murdaca G.-Castellani S.-Zocchi M.R.

V α 1 T lymphocytes producing IFN γ and IL-17 are expanded in HIV-1 infected patients and respond to *Candida albicans*.

Blood 113:6611/6618, 2009

Poggi A.-Catellani S.-Garuti A.-Pierri I.-Gobbi M.-Zocchi M.R.

Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukemias by all-transretinoic acid and sodium valproate.

Leucemia 23:644/648, 2009

Ropolo M.-Daga A.-Griffero F.-Foresta M.-Casartelli G.L.-Zumino A.-Poggi A.-Cappelli E.- Zona GL.-Spaziante R.-Corte G.-Frosina G.

A comparative analysis of DNA repair in stem and non-stem glioma cell cultures.

Mol. Cancer Res. 7:383/392, 2009