

## S.S. Oncologia molecolare e angiogenesi

### Marcatori tumorali d'infiammazione 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:* Francesca Tosetti, Monica Ciarlo, 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. Immunologia (R. Benelli); S.C. Biologia cellulare (R. Vené)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* prevenzione primaria/secondaria

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Salute, Compagnia di San Paolo, Regione Liguria

#### *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.

#### *Risultati e prodotti 2010*

Studi preliminari hanno mostrato che fenretinide inibisce la proliferazione di cellule di carcinoma prostatico ormono-resistente mediante induzione di apoptosi. Fenretinide inibisce la migrazione/invasione, e quindi il processo di metastatizzazione, di cellule di carcinoma prostatico attraverso un'inibizione della via di segnale FAK e AKT con conseguente degradazione di beta-catenina nucleare e ridotta espressione di geni legati alla proliferazione cellulare (ciclina D1 e survivin) e all'angiogenesi (VEGF). L'inibizione dell'attività di AKT è fondamentale per la risposta a fenretinide, infatti cellule che esprimono una forma costitutivamente attiva di AKT (MyrAkt) non sono in grado di rispondere alla molecola. L'evento finale di degradazione di beta-catenina è altrettanto responsabile dell'inibizione del fenotipo migratorio/invasivo in quanto il silenziamento cellulare di beta-catenina produce un effetto paragonabile. La produzione di BMP2 da parte di cellule endoteliali esposte a fenretinide è in grado di inibire la proliferazione, migrazione, invasione di cellule di carcinoma prostatico attraverso un meccanismo d'azione simile a quello di fenretinide, producendo pertanto un effetto sinergico a quello prodotto dalla sola fenretinide.

Abbiamo proseguito gli studi che in passato hanno dimostrato l'attività citostatica e differenziativa di Xantumolo su leucemie AML e CML. Il modello attualmente studiato è di leucemia ALL murina che ci ha consentito di condurre esperimenti in vivo. Esperimenti preliminari indicano che Xantumolo aumenta la sopravvivenza di animali inoculati i.p.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

con cellule leucemiche L1210 e ciò mediante inibizione della migrazione cellulare e conseguente formazione di metastasi cerebrali.

Numerosissime pubblicazioni hanno indicato l'inibitore specifico di COX-2, Celecoxib, come un "multitarget inhibitor" di beta-catenina, NFkB, AKT ecc. Usando linee di carcinoma coloretale con diverse caratteristiche (CaCo2, esprimenti COX-2 attiva; HT29, esprimenti COX-2 enzimaticamente inattiva; HCT15 ed SW480 COX-2 negative) abbiamo notato che l'espressione o meno di COX-2 accompagnava sempre quella di anfiregulina (AREG, citochina EGF-like coinvolta nella progressione di questo tumore). Tuttavia questa regolazione in tandem non era dovuta al controllo di AREG da parte di COX-2 e PGE2 come pubblicato in precedenza da alcuni autori. Anzi, nella linea CaCo2, si è osservato un parziale effetto paradossale per cui Celecoxib incrementava i livelli di AREG prodotta. L'analisi dei pathways intracellulari potenzialmente coinvolti in questa regolazione in tandem ha evidenziato disparità tra le diverse linee cellulari, influenzate dai diversi oncogeni attivi (delezione di APC, mutazione di k-RAS ecc...), per cui abbiamo cercato un modello di cellula normale che potesse essere studiata in modo più riproducibile e approfondito. A questo scopo sono state approntate delle colture primarie di miofibroblasti sub-epiteliali di colon (non essendo al momento possibile espandere colonociti umani in vitro). Queste cellule mesenchimali mostrano al fax un fenotipo estremamente stabile sia che derivino da tumore, che dalla mucosa sana limitrofa. Inoltre i livelli basali di COX-2 e di AREG sono risultati completamente spegnibili (assenza di siero) e sono stati trovati inducibili -ancora una volta in tandem - tramite coltura in siero o con aggiunta di EGF ricombinante. Anche in queste colture primarie il trattamento con Celecoxib induce un paradossale aumento e rilascio di AREG, aprendo inquietanti interrogativi sui possibili pay-back indotti da questo anti-infiammatorio.

### *Pubblicazioni*

Benelli R.-Monteghirfo S.-Vene' R.-Tosetti F.-Ferrari N.

The chemopreventive retinoid 4HPR impairs prostate cancer cell migration and invasion by interfering with FAK/AKT/GSK3beta pathway and beta catenin stability.

Mol. Cancer 9:142;1/142;13, 2010

Palmieri D.-Valli M.-Viglio S.-Ferrari N.-Ledda B.-Volta C.- Manduca P.

Osteoblasts extracellular matrix induces vessel like structures through glycosylated collagen I.

Exp. Cell Res. 316:789/799, 2010

Sogno I.-Vene' R.-Ferrari N.-De Censi A.-Imperatori A.-Noonan D.- Tosetti F.-Albini A.

Angioprevention with fenretinide: targeting angiogenesis in prevention and therapeutic strategies.

Crit. Rev. Oncol. Hematol. 75:2/14, 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

L'emergenza di una ormono-resistenza del carcinoma prostatico è stata imputata a selezione di cloni cellulari la cui crescita è indipendente dal controllo ormonale ma sottoposta ad altre stimolazioni e regolazioni. Cellule di tipo NE (neuroendocrine) sono presenti nel tessuto prostatico ormono-resistente. Mediante sistemi di differenziamento in vitro e utilizzando il modello murino TRAMP che sviluppa spontaneamente tumori prostatici di tipo NE studieremo in dettaglio il fenotipo NE (NSE e sinaptofisina positivo) che sembra essere associato ad attivazione della via di segnale AKT in grado di fosforilare molecole a valle nella via di segnale che controlla il transdifferenziamento NE. Molecole in grado di controllare l'attivazione di AKT (fenretinide e xantumolo) verranno testate nel modello NE.

Per quanto riguarda il modello leucemico, xantumolo ha mostrato attività antiangiogenica e antileucemica (mieloide acuta, cronica e Bcr/Abl+) attraverso inibizione delle vie di segnale AKT, NF-kB e Bcr/Abl (ove presente). Un'alta percentuale di pazienti con leucemia linfoblastica acuta o cronica presenta una serie di mutazioni (es. a carico di Notch, PTEN, PI3K) che causano un'attivazione costitutiva della via di segnale PI3K/Akt/mTOR, fortemente implicata nei processi di sopravvivenza cellulare. Intendiamo verificare l'efficacia di xantumolo in vitro e in modelli preclinici di leucemia linfoblastica acuta o cronica generando linee cellulari resistenti all'azione dei chemioterapici e allo stesso xantumolo. Xantumolo verrà inoltre testato per la sua capacità di modulare le interazioni tra cellula leucemica e cellule stromali del midollo osseo o del linfonodo.

Le colture primarie di miofibroblasti (MF) sub epiteliali di colon sono risultate un utilissimo strumento per l'analisi della regolazione di COX-2 e AREG e per la loro modulazione ad opera di Celecoxib. In particolare in questa annualità approfondiremo le modalità con cui Celecoxib induce AREG. Quest'ultima è infatti il principale ligando attivatore di EGFR nel colon neoplastico ed un suo aumento ad opera di un farmaco è tutt'altro che desiderabile. Investigheremo pertanto le modalità con cui Celecoxib possa indurre AREG nei MF (indagando i principali pathways che mediano la produzione di AREG: beta catenina/TCF-LEF, PKA/CREB, EGFR, ecc). Inoltre valuteremo se altri farmaci attivi contro la COX possano suscitare effetti simili (confronto tra Celecoxib, Nimesulide e Indometacina). Ed infine valuteremo inibitori specifici di questi pathways per capire quali possibili strategie farmacologiche siano perseguibili per rendere l'uso di Celecoxib più sicuro, specialmente nelle applicazioni di chemioprevenzione che ne prevedono l'uso in regime cronico.

**Regolazione metabolica di farmaci antineoplastici redox-attivi: effetti sistemici e su morte e sopravvivenza cellulare nel microambiente tumorale**

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

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

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

*Responsabile scientifico:* Francesca Tosetti

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Nicoletta Ferrari, Alessandro Poggi

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

*Parole chiave:* trasduzione del segnale; morte cellulare programmata; metabolismo; redox; glucosio; ipossia

*Altre strutture IST partecipanti:* S.S. Biopolimeri e proteomica (M. Rocco, A. Profumo); S.C. Immunologia (R. Benelli)

*Altri Enti coinvolti:* S.C. Oncologia Medica, Ospedali Galliera, Genova (A. Decensi); S.S.D. Microcitemia, Ospedali Galliera, Genova (G. Forni)

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* descrittiva a fini conoscitivi

*Soggetti cofinanziatori:* Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

## *Background*

I farmaci antineoplastici modulatori del redox sono attualmente oggetto di intense ricerche precliniche e cliniche in quanto capaci di colpire selettivamente le cellule tumorali che producono elevati livelli di specie reattive di ossigeno (ROS). Lo stress ossidativo costitutivo dovuto all'attivazione di oncogeni e un'inefficiente respirazione mitocondriale richiede adattamenti metabolici e bioenergetici per mantenere un precario equilibrio redox intracellulare. Il passaggio ad un fenotipo glicolitico per la produzione di energia, tipico delle cellule trasformate, conferisce un vantaggio selettivo in condizioni ambientali critiche caratterizzate da scarsità di nutrienti ed ipossia. Mentre l'ipossia intermittente permette adattamenti che favoriscono la crescita del tumore attraverso la maggior produzione di enzimi glicolitici e fattori proangiogenici, uno stato ipossico severo porta a morte cellulare e correla con la comparsa di aree necrotiche ed infiammazione. Numerose evidenze suggeriscono che lo switch glicolitico contribuisca a mantenere l'equilibrio redox intracellulare fornendo riducenti equivalenti necessari ad alimentare i principali sistemi antiossidanti. Le vie di segnale mediate dall'oncogene ras e le MAP cinasi ERK-1/2, PI3K/AKT/mTOR/GSK3, i fattori di trascrizione hypoxia-inducibile transcription factor-1 (HIF-1) propagano informazioni mediate da fattori di crescita, insulina, citochine infiammatorie, con effetto omeostatico rispetto a variazioni delle condizioni ambientali anche nei tessuti normalmente ossigenati. La riprogrammazione trascrizionale controllata dall'attivazione costitutiva di queste vie omeostatiche modifica il microambiente a vantaggio del tumore promuovendo infiammazione ed angiogenesi e la progressione tumorale. Per esempio, GSK3 inibisce l'attività di Nrf2, un fattore di trascrizione che induce l'espressione di enzimi del metabolismo del glutatione (GSH) ed enzimi antiossidanti di fase 2; la sovraespressione di AKT sostiene lo switch glicolitico; l'attivazione di mTOR inibisce l'autofagia, un processo che protegge dalla scarsità di nutrienti, dalla tumorigenesi indotta da stress e dall'invecchiamento. Numerose evidenze sperimentali suggeriscono la possibilità di sfruttare gli adattamenti tumore-specifici come bersagli selettivi di terapia. In particolare, è stata dedicata speciale attenzione a farmaci che, utilizzando un codice redox (modulazione di ROS e GSH), sono in grado di interferire a più livelli con le vie di segnale che regolano in modo pleiotropico eventi chiave quali sopravvivenza cellulare, infiammazione ed angiogenesi. In tale contesto si stanno rivelando particolarmente promettenti farmaci di origine naturale o loro derivati sintetici come la curcumina (34 studi clinici registrati presso l'NIH), triterpenoidi e retinoidi sintetici tra i quali CDDO, o RTA402, e la fenretinide (4HPR), il PEITC (phenethyl isothiocyanate), il resveratrolo. Un dato recentemente emerso è che alcuni farmaci redox-attivi sono in grado di modulare il metabolismo glucidico, trovando quindi potenziale impiego nel trattamento della sindrome metabolica, dell'obesità e del diabete. È noto che queste condizioni patologiche costituiscono fattori di rischio per lo sviluppo di tumori (colon, mammella, prostata). L'interesse in ambito oncologico risiede nel fatto che tali farmaci esercitano un effetto citoprotettivo e chemiopreventivo sulle cellule normali e preneoplastiche, mentre uccidono le cellule tumorali con un'elevata selettività, a differenza dei tradizionali chemioterapici citotossici, modulando l'attività di bersagli molecolari fra i quali Sirt, Foxo ed AMPK, implicati nella regolazione del bilancio energetico a livello sistemico.

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

Il nostro obiettivo principale è di fornire dati sperimentali e clinici atti a promuovere l'impiego di farmaci modulatori dell'equilibrio redox di origine naturale, o loro derivati sintetici, per la prevenzione e la cura dei tumori. Per quanto alcuni dei farmaci menzionati siano attualmente utilizzati in numerosi studi clinici, evidenze preliminari del nostro gruppo di ricerca e di altri mostrano che alcuni tipi tumorali non rispondono o sono in grado di sviluppare resistenza a farmaci modulatori del redox. Gli studi preclinici proposti si prefiggono di comprendere i meccanismi molecolari responsabili della resistenza e testare alcune strategie farmacologiche in grado di potenziare l'attività di farmaci redox-attivi. A tale scopo utilizzeremo farmaci modulatori del metabolismo glucidico in combinazione con farmaci capaci di interferire con i meccanismi di difesa antiossidanti. Parallelamente, valuteremo fattori sierici correlati a stress ossidativo quali biomarcatori surrogati di rischio per cancro in soggetti sani o affetti da sindrome metabolica, ed indicatori di risposta e tossicità in pazienti oncologici.

## *Impatto assistenziale certo o potenziale*

L'applicazione di strategie per la prevenzione del cancro comporterebbe un notevole guadagno in termini di sopravvivenza e qualità della vita per i soggetti ad aumentato rischio e, quindi, di tutela della salute pubblica da parte del SSN, oltre ad una riduzione della spesa sanitaria destinata ad interventi diagnostico-terapeutici ed assistenziali onerosi. Attualmente gli investimenti destinati alla ricerca sperimentale e clinica per la prevenzione del cancro in

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

soggetti a rischio sono molto limitati. Tuttavia, la dimostrazione dell'efficacia e della sicurezza di trattamenti capaci di ridurre il rischio necessita di approfonditi studi a livello preclinico e clinico. L'utilizzo di farmaci di origine naturale con tossicità bassa o nulla, dotati di proprietà biologiche funzionali alla prevenzione e alla cura dei tumori, e contemporaneamente in grado di normalizzare condizioni patologiche predisponenti, potrebbe rappresentare una strategia preventiva efficace e a basso costo di grande impatto sanitario e sociale.

### *Risultati e prodotti 2010*

Il progetto si proponeva di studiare le vie di segnale in risposta allo stress mediate dall'oncogene ras e dalle MAP cinasi ERK-1/2, JNK, p38, la via regolativa della sopravvivenza PI3K/AKT/mTOR/GSK3, i fattori di trascrizione hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1), in quanto componenti importanti di adattamenti biochimici tumore-specifici attivati da fattori di crescita e citochine infiammatorie del microambiente tumorale. Poiché sono stati recentemente sviluppati inibitori farmacologici per alcuni elementi delle vie regolative descritte, queste assumono valenza di promettenti bersagli selettivi di terapia. Gli studi preclinici in vitro, effettuati in cellule wild-type di retinoblastoma Y79 e Weri-Rb1, di adenocarcinoma prostatico PC3 e DU145, di glioblastoma U87 e nelle corrispondenti linee resistenti al retinoide sintetico 4HPR (fenretinide), mostrano un ruolo del glicogeno sintasi cinasi GSK3 negli adattamenti metabolici che favoriscono la progressione a fenotipo resistente. La caratterizzazione dei meccanismi di difesa riguardano alterazioni dell'equilibrio ossido-riduttivo fra cui la correlazione dello stato di attività di GSK3 con i livelli di glutazione ridotto (GSH) e l'espressione di eme ossigenasi, e con l'assetto bioenergetico (produzione di energia tramite aumentato consumo di glucosio a spese della fosforilazione ossidativa). I risultati sperimentali fin qui ottenuti evidenziano un ruolo per GSK3 di mediatore della decisione fra sopravvivenza e morte cellulare, in dipendenza dell'intensità del danno causato dall'esposizione al farmaco antineoplastico, e sottolineano l'importanza della combinazione fra dose ottimale di farmaco ed associazione con inibitori della risposta allo stress.

La collaborazione con la S.S. Biopolimeri e proteomica dell'IST ha permesso di mettere a punto metodiche per la valutazione di malonaldeide (MDA), derivato dalla perossidazione dei lipidi, quale parte di un pannello di marcatori circolanti di stress ossidativo. Altri marcatori fra i quali gli isoprostani (IsoPS, derivati dalla perossidazione di acido arachidonico catalizzata da radicali liberi) ed il GSH circolante sono in corso di valutazione con analoghe tecniche di cromatografia liquida e spettrometria di massa e, parallelamente, con metodi biochimici.

### *Pubblicazioni*

Benelli R.-Monteghirfo S.-Vene' R.-Tosetti F.-Ferrari N.

The chemopreventive retinoid 4HPR impairs prostate cancer cell migration and invasion by interfering with FAK/AKT/GSK3beta pathway and beta catenin stability.

Mol. Cancer 9:142;1/142;13, 2010

Ferrari N.-Tosetti F.-De Flora S.-Donatelli F.-Noonan D.M.-Albini A.

Diet-Derived phytochemicals: from cancer chemoprevention to cardio-oncological prevention.

Curr. Drug Targets, Epub Dec 15, 2010

Sogno I.-Vene' R.-Ferrari N.-De Censi A.-Imperatori A.-Noonan D.- Tosetti F.-Albini A.

Angioprevention with fenretinide: targeting angiogenesis in prevention and therapeutic strategies.

Crit. Rev. Oncol. Hematol. 75:2/14, 2010

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Al fine di comprendere gli adattamenti metabolici che favoriscono la resistenza di cellule tumorali a stress, in particolare lo stress ossido-riduttivo, utilizzeremo modulatori metabolici tra i quali il triterpenoide CDDO-Me (CDDO-metil estere, o RTA402) ed il BSO (buthionine sulfoximine), due agenti che depletano il GSH già in sperimentazione clinica, sia come singoli agenti od in combinazione con farmaci regolatori del metabolismo glucidico tra cui DCA (dicloroacetato), 2-deossiglucosio (2DG) e sodio ossammato, un inibitore di lattico deidrogenasi. Proseguiremo i nostri studi sull'inibizione farmacologica di GSK3 e la ricaduta sugli elementi della via regolativa ROS/GSH/Nrf2/HIF in quanto promettente approccio nella chemioprevenzione e nella terapia dei tumori, ipotesi confermata dalla scelta di GSK3 come bersaglio selettivo di terapia o biomarcatore di risposta in numerosi trials clinici in corso. L'indagine comprenderà la caratterizzazione molecolare dei meccanismi di morte cellulare, con particolare riguardo allo studio dell'autofagia in quanto fenomeno ambivalente con funzione anti- o proapoptotica a seconda del contesto biologico. Estenderemo i nostri studi a sistemi cellulari (linee stabilizzate e colture primarie) rappresentativi di patologie tumorali ove sia definita una progressione della malattia da lesioni preneoplastiche (es. poliposi adenomatosa e adenocarcinoma del colon), articolandoli secondo il disegno sperimentale sopra delineato.

Lo studio dello stato redox sistemico intrapreso in collaborazione con la S.S. Biopolimeri e proteomica IST sarà effettuato su sieri di soggetti afferenti a studi clinici attivi all'interno dell'istituto e nell'ambito delle collaborazioni citate. La nostra aspettativa è di ottenere indicazioni specifiche a seconda della patologia in esame, per una possibile associazione di farmaci citoprotettivi in corso di terapia od in ambito chemiopreventivo.

## **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

*Altro personale della struttura partecipante al progetto:* Alessandra Musso, Silvia Boero

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

*Anno di inizio:* 2009

*Durata:* 36 mesi

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

*Altre strutture IST partecipanti:* S.C. Immunologia (P. Canevali)

*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.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

- 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).

### *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-tumorali 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.

### *Risultati e prodotti 2010*

Nell'ambito dei segnali mediati durante l'interazione di cellule leucemiche e cellule stromali (MSC) e/o nutrici (NLC), abbiamo dimostrato (Poggi A et al. Br.J. Haematol) che l'ingaggio del CD31 (PECAM1) induce un segnale di sopravvivenza nelle cellule di leucemia linfatica cronica (CLL). Infatti, in una serie di 40 pazienti analizzati abbiamo identificato due gruppi di CLL che mostravano una differente cinetica di apoptosi spontanea in vitro e distinti rapporti tra le proteine pro e anti-apoptotiche. Il primo gruppo CLL-I aveva bassi rapporti tra Bcl-XL/Bax e Bcl-2/Bax ed andava rapidamente in apoptosi in vitro; il secondo gruppo denominato CLL-II mostrava alti rapporti tra Bcl-XL/Bax e Bcl-2/Bax ed era resistente all'apoptosi per diversi giorni. Cellule simili alle NLC che esprimevano vimentina, CD68 e CD31 erano presenti nelle colture delle CLL-II. La oligomerizzazione del CD31 ottenuta con anticorpi specifici induceva la fosforilazione di Akt dipendente dalla PI-3K e la traslocazione delle sub unità di NF-kBp65 e p52 in entrambi i gruppi di CLL che portava ad un aumento della trascrizione di BCL2 e BCL2L1 ed a un aumento della sopravvivenza delle cellule. Il legame con transfettanti stabili CD31<sup>+</sup> induceva anch'esso un segnale anti-apoptotico nelle cellule B dei due gruppi con un incremento del contenuto di proteine Bcl-2 e Bcl-XL, indipendentemente dalla espressione di CD38. Questi effetti erano bloccati dall'uso di frammenti F(ab')<sub>2</sub> (che non inducono per definizione la oligomerizzazione del recettore ma ne impediscono la interazione con i suoi ligandi naturali). Questi dati suggeriscono che il CD31 possa mediare un segnale anti-apoptotico durante la interazione delle CLL con le NLC. Per quel che riguarda le MSC come bersaglio della terapia in corso di malattie ematologiche abbiamo dimostrato che le statine, inibitori della sintesi del mevalonato e di conseguenza della isoprenilazione delle piccole proteine leganti il GTP e della sintesi del colesterolo, sono in grado di modificare il fenotipo e la funzione delle MSC isolate da midollo osseo. Infatti, abbiamo dimostrato (Musso A. et al, Haematologica) che la fluvastatina porta alla alterazione dei microfilamenti di actina ed alla inattivazione della proteina legante il GTP RhoA. Inoltre, la fluvastatina inibisce la fase S del ciclo cellulare nelle MSC impedendo la proliferazione ma inducendo l'apoptosi delle MSC in una piccola frazione. La produzione di citochine quali IL6 e IL8 da parte delle MSC non era alterata dal trattamento delle MSC con fluvastatina. L'effetto immunosoppressivo indotto dalle MSC sulla proliferazione dei linfociti T era bloccato dal trattamento delle MSC con fluvastatina, in parte in relazione ad una considerevole riduzione della espressione di molecole di adesione sulla superficie delle MSC. L'acido mevalonico era in grado di prevenire gli effetti della fluvastatina. Infine, la fluvastatina riduceva l'effetto anti-apoptotico mediato dalle MSC sulle cellule B solo in presenza di corticosteroidi. Questi dati suggeriscono che farmaci che agiscono sulla via biosintetica del mevalonato possano regolare l'immunosoppressione mediata dalle MSC sui linfociti T e l'effetto anti-apoptotico sui linfociti B. Esperimenti sono in corso per determinare se anche le cellule B di CLL o di linfomi sono rese più sensibili all'apoptosi in presenza di MSC da midollo osseo o linfonodo trattate con farmaci che impediscono la sintesi o l'utilizzazione del colesterolo. Nell'ambito dell'analisi della sensibilità all'apoptosi di effettori citotossici anti-tumorali abbiamo dimostrato che i linfociti  $\gamma\delta T$ , CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta T$  e le cellule NK mostrano una diversa sensibilità ai segnali di sopravvivenza mediati dal recettore NKG2D (Poggi A. et al. Int. J. Cancer). Tutte e tre le popolazioni linfocitarie sono in grado di attivare Akt1/PKBalpha attraverso l'ingaggio di questa molecola. Però a seguito del legame con cellule leucemiche trattate con acido trans-retinoico la maggior parte delle linfociti  $\gamma\delta T$  e la metà dei linfociti CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta$  riceveva un segnale di sopravvivenza mentre la maggior parte delle cellule NK moriva entro il quinto giorno di co-cultura. Questo effetto era correlato al significativo aumento della traslocazione nucleare di NF-kBp52 e RelB, le due sub unità di NF-kB coinvolte principalmente nella trascrizione delle proteine anti-apoptotiche Bcl-2 o Bcl-xL e della proteina pro-apoptotica Bax che aumentavano nei linfociti  $\gamma\delta T$  o CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta T$  a seguito dell'ingaggio di NKG2D con anticorpi monoclonali o con i ligandi di NKG2D espressi da cellule leucemiche. Al contrario, la traslocazione nucleare NF-kBp52 o di RelB non aumentava, né tantomeno i rapporti tra le proteine Bcl-2/Bax o Bcl-xL/Bax nelle cellule NK dopo oligomerizzazione di NKG2D. Tali eventi biochimici possono essere il motivo della minore sensibilità dei linfociti  $\gamma\delta T$  e CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta T$  all'apoptosi rispetto alle cellule NK. Infine sono in corso esperimenti di interazione tra MSC da linfonodo di linfomi Hodgkin e cellule  $\gamma\delta T$  per determinare se tali MSC possano modulare la attività anti-neoplastica di questi linfociti mediata dalla interazione di NKG2D con i suoi ligandi espressi nel microambiente tumorale.

### *Pubblicazioni*

Foresta M.-Ropolo M.-Degan P.-Pettinati I.-Kow Y.-Damonte G.-Poggi A.-Frosina G.

Defective repair of 5/hydroxy/2'/deoxycytidine in Cockayne syndrome cells and its complementation by Escherichia coli formamidopyrimidine DNA glycosylase and endonuclease III.

Free Radic. Biol. Med. 48:681/690, 2010

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Poggi A.-Prevosto C.-Catellani S.-Rocco I.-Garuti A.-Zocchi M.R.

Engagement of CD31 delivers an activating signal that contributes to the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells.

Br. J. Haematol. 151:252/264, 2010

Ghio M.-Contini P.-Negrini S.-Mazzei C.-Zocchi M.R.-Poggi A.

Down-regulation of human Natural Killer cell-mediated cytotoxicity induced by blood transfusion: role of transforming growth factor- $\beta$ , soluble Fas ligand and soluble class I human leukocyte antigen.

Transfusion, in press

Mirabella T.-Poggi A.-Scaranari M.-Mogni M.-Lituania M.-Baldo C.-Cancedda R.-Gentili C.

Phenotypic characterization of Human Amniotic Fluid Stem Cells (hAFSCs): recruitment of host's progenitor cells after in vivo implantation.

Biomaterials, in press

Musso A.-Zocchi M.R.-Poggi A.

Relevance of the mevalonate biosynthetic pathway in the regulation of bone marrow mesenchymal stromal cell-mediated effects on T cell proliferation and B cell survival.

Haematologica, in press

Poggi A.-Zancolli M.-Catellani S.-Boero S.-Musso A.-Zocchi M.R.

Differential survival of  $\alpha\beta$  T cells,  $\gamma\delta$  T cells, and NK cells upon engagement of NKG2D by NKG2DL-expressing leukemic cells.

Intern. J. Cancer, in press

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

Nell'anno 2011 termineremo l'analisi dell'interazione tra MSC isolate da linfonodi di pazienti affetti da linfoma di Hodgkin e le cellule  $\gamma\delta$ T. Valuteremo se le MSC sono in grado di modulare la generazione di effettori citotossici efficaci nell'uccidere le cellule di linfoma e se le MSC inducono un fenotipo ed un assetto funzionale nelle cellule  $\gamma\delta$ T di tipo regolatorio. Analizzeremo inoltre se nel contesto del microambiente linfonodale esiste un assetto favorente la espansione di cellule regolatorie e se questo è determinato dalla presenza di citochine quali TGF- $\beta$  e IL15. Infatti, è stato dimostrato che queste due citochine sono coinvolte nella generazione di cellule regolatorie di tipo  $\gamma\delta$ T esprimenti il recettore per l'antigene V-delta 2. Noi intendiamo focalizzarci sulle cellule  $\gamma\delta$ T di tipo V-delta 1 che appaiono essere presenti nel contesto del parenchima linfonodale dei linfomi Hodgkin in maniera selettiva rispetto alle V-delta 2 che sono presenti in minore quantità.

Continueremo gli esperimenti atti a definire se i farmaci capaci di regolare il contenuto di colesterolo delle MSC siano in grado di bloccare i loro effetti immunosoppressivi. In tale contesto, focalizzeremo la nostra attenzione sul farmaco avasimibe che blocca il trasferimento di acili al colesterolo rendendolo indisponibile per il suo uso ed integrazione nelle membrane cellulari. Intendiamo anche valutare se anticorpi monoclonali umanizzati impiegati nella terapia dei linfomi o delle leucemie quali il rituximab (anti-CD20) siano ancora efficaci nell'attivare la citolisi anticorpo dipendente di cellule NK o cellule  $\gamma\delta$ T o cellule CD8<sup>+</sup> $\alpha\beta$ T che esprimono il recettore FC per le immunoglobuline G in presenza di MSC e quali siano i meccanismi di regolazione mediati da tali cellule in questo contesto. Infine, si determinerà se le MSC possono essere un bersaglio della terapia con l'anticorpo Cetuximab anti- recettore per l'EGF in quanto abbiamo osservato che tale recettore è espresso sulle MSC isolate da linfonodo. Per ciò che riguarda il ruolo di cellule nutrici delle MSC da linfonodo o midollo osseo in corso di linfomi o CLL intendiamo analizzare il ruolo del fattore BAFF nel mantenere e/o stimolare la crescita delle cellule neoplastiche. In tale contesto utilizzeremo l'anticorpo umanizzato anti-BAFF Belimumab che è stato recentemente approvato per l'uso nell'uomo per il trattamento del lupus eritematoso sistemico e che potrebbe avere un ruolo nella crescita delle neoplasie linfoidi dato che diversi linfomi presentano un produzione autocrina di tale fattore.