

RECETTORI PER CHEMOCHINE COME MARCATORI BIOLOGICI E MOLECOLARI DI RISPOSTA CLINICA E TARGET DIAGNOSTICO TERAPEUTICO

Stefania Scala

Dipartimento di Immunologia Clinica, Istituto Tumori Napoli, Fondazione G. Pascale, Napoli

Base di partenza e razionale

Le chemochine sono una famiglia di piccole proteine di 8-10 kDa con attività chemotattica. Esse sono caratterizzate da una vasta gamma di attività biologiche, incluso la regolazione del trafficking leucocitario, la modulazione della proliferazione di cellule ematopoietiche e l'adesione alle molecole di matrice extracellulari. Recentemente è stato identificato un ruolo dell'asse chemochine-recettori per chemochine nelle neoplasie umane. Principalmente il recettore CXCR4 e la relativa chemochina, CXCL12 sono stati descritti in numerose neoplasie. CXCL12 è una chemochina di tipo C-X-C che interagisce con un recettore specifico, CXCR4, un recettore a sette-domini transmembrane, associato ad una proteina G-.

Cellule di neoplasia mammaria esprimono elevati livelli di CXCR4 e la specifica chemochina, CXCL12, è massimamente espresso ai luoghi di metastasi di neoplasia mammaria. Trattamento con anticorpi neutralizzanti per CXCR4 riducono drammaticamente la metastasi. Anche nel modello di melanoma, carcinoma del colon, carcinoma renale, del colon retto, del polmone, glioblastoma, carcinoma della prostata l'asse CXCR4/CXCL12 ha dimostrato un ruolo centrale nella metastatizzazione. Pertanto il ruolo dei recettori per chemochine e relativi ligandi ha un ruolo cruciale nel processo di metastatizzazione. Recentemente inoltre abbiamo dimostrato un ruolo prognostico per l'espressione del recettore CXCR4 in associazione all'espressione del VEGF nelle neoplasie del colon retto e un valore prognostico per l'espressione del CXCR4 nel melanoma primitivo. Per definire i meccanismi alla base e evincere strategie inibenti saranno condotti studi sia nel carcinoma prostatico umano (*in vitro*) sia nel modello murino di sviluppo spontaneo del carcinoma prostatico TRAMP (*Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*). Inoltre, numerose evidenze sperimentali suggeriscono che i tumori solidi sono generati e mantenuti da una piccola popolazione di cellule tumorali capaci di proliferare indefinitamente e di dare origine ad una progenie di cellule differenziate. L'espressione di recettori per chemochina, e in particolare del CXCR4 è stata descritta diffusamente su cellule staminali neoplastiche. Verrà pertanto valutato l'analisi del sistema CXCR4-SDF1 a livello delle cellule staminali tumorali, con l'intento di dimostrarne la rilevanza nei tumori primitivi e nelle metastasi. Valutare l'espressione di chemochine e recettori per le cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cell*, CSC), o sfere, ottenute da vari tumori solidi, in particolare tumori del polmone, del colon, melanoma e glioblastoma. I livelli di espressione, in particolare del recettore CXCR4 saranno valutati anche su cellule più differenziate ottenute mediante coltura delle sfere in condizioni differenzianti oppure direttamente sulle cellule tumorali ottenute dalla dissociazione di campioni tumorali freschi. In parallelo verranno effettuati studi simili nelle leucemie acute mieloidi nelle quali è stato possibile dimostrare che i livelli di espressione del CXCR4 rappresentano un fattore prognostico negativo. Da tali evidenze consegue che l'antagonismo del segnale mediato da CXCR4 attraverso peptidi e/o piccole molecole potrebbero rappresentare un interessante approccio terapeutico. Valutazione di

potenziali strategie terapeutiche innovative in grado di ridurre i livelli di espressione di CXCR4 sulle CSC, quindi potenzialmente di ridurre la capacità invasiva, e il processo di *homing* delle CSC nella “nicchia” metastatica attraverso identificazione e sintesi di specifici antagonisti peptidici e/o piccole molecole.

Il progetto proposto indicherà un nuovo approccio terapeutico inibendo l’asse del CXCR4. Inoltre, l’identificazione di un nuovo bersaglio terapeutico potrebbe essere rapidamente trasferita in studi clinici con inibitori del CXCR4.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

Obiettivi del progetto sono:

1. Valutare l’espressione di chemochine e relativi recettori in neoplasie solide e in leucemie acute mieloidi per identificare pattern di espressione. Saranno condotti anche studi nel carcinoma prostatico (*in vitro*) sia nel modello murino di sviluppo spontaneo del carcinoma prostatico TRAMP.
2. Valutare il ruolo dei recettori delle chemochine nelle cellule staminali tumorali. CSC–CXCR4 positive verranno isolate e analizzate per capacità proliferativa, di adesione e di migrazione delle diverse sotto-popolazioni di cellule staminali. In saggi *in vivo* verrà invece prevalentemente valutata la capacità metastatica delle due sottopopolazioni cellulari. Infine analizzare retrospettivamente la correlazione tra espressione di CXCR4 sulle cellule staminali e la prognosi dei pazienti.
3. Sintetizzare specifici inibitori dei recettori per chemochine o di chemochine. Innanzitutto l’obiettivo sarà quello di sintetizzare analoghi di natura peptidica/peptidomimetica del ligando endogeno, rispetto al quale risultino più stabili alla degradazione enzimatica *in vivo* e in grado di essere irrigiditi nella conformazione idonea all’interazione con il recettore prescelto mediante l’introduzione di strutture cicliche nel *backbone* peptidico, nonché con l’introduzione di aminoacidi non naturali dotati di catene laterali la cui topologia è in grado di incrementare l’affinità verso il sistema recettoriale.
4. Valutare l’effetto *in vitro* di inibitori del CXCR4 su blasti leucemici di LAM overesprimenti il CXCR4. In particolare, utilizzando modelli *in vitro* d’interazione fra cellule leucemiche e cellule stromali o molecole della matrice extracellulare, si cercherà di valutare se l’inibizione del CXCR4 sia in grado di modificare la risposta ai chemioterapici anti-leucemici. Questi studi verranno anche estesi a modelli *in vivo*.
5. Effettuare la validazione biologica delle molecole prodotte. In particolare i composti verranno testati per tossicità in un sistema cellulare *in vitro* e successivamente *in vivo*.
6. Eseguire sintesi, purificazione e analisi di complessi metallici coniugati a molecole di natura peptidica.
7. Utilizzare possibilmente in Studi Clinici di Fase I le molecole validate, nonché eventuali terapie basate sull’uso combinato di trattamenti tradizionali (chemioterapia, terapie anti-angiogenesi, ecc) e nuove molecole selezionate.
8. Allestire studi clinici basati sul valore prognostico attribuito ai pattern di espressione dei recettori delle chemochine sulle cellule staminali tumorali.

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel corso del primo anno di attività la percentuale di cellule esprimenti il recettore CXCR4 in melanoma metastatico e nella relativa popolazione staminale tumorale sono stati valutati. Cellule tumorali CXCR4+ mostrano una maggiore capacità migratoria in saggi *in vitro* rispetto alle cellule CXCR4-. Sono in corso esperimenti *in vivo* nei quali, attraverso un sistema di *imaging in vivo*, verranno valutate lesioni a distanza. Evidenze iniziali dimostrano *in vivo* l'equivalenza tra le due popolazioni cellulari in termini di capacità tumorigenica.

Meccanismi molecolari di regolazione dell'espressione del recettore CXCR4 e dell'attività del *signaling* a valle dello stesso sono stati valutati in cellule tumorali. I dati più significativi concernono a) l'identificazione di un meccanismo di regolazione dell'espressione di CXCR4 da parte del miR146a, la cui espressione è a sua volta regolata da un fattore di trascrizione noto come PLZF (Labbaye C, 2008); e b) la scoperta di un meccanismo di regolazione mediato dal miR-219 su una glicoproteina nota come CD164 che si associa al recettore CXCR4 in seguito alla sua stimolazione. Come per il CXCR4, i livelli di espressione di CD164 aumentano con l'avanzamento del tumore, almeno nel melanoma. CD164 è espresso nei melanomi primari ma i suoi livelli incrementano nei melanomi metastatici. L'inibizione dell'espressione di CD164 *in vitro* è associata ad una ridotta capacità di migrazione.

CXCR4 è iperespresso in cellule tumorali farmaco-resistenti rispetto alle corrispondenti cellule parentali. Questo risultato si riferisce ad una linea tumorale di melanoma, ma è analogo a quanto riscontrato su blasti leucemici di leucemia mieloide acuta. I risultati inibenti la migrazione *in vitro* ottenuti somministrando a concentrazioni subcitotossiche un peptide sintetico, il *cicloTyrinv*, sembrano incoraggianti.

Peptidi inibenti il recettore CXCR4 sono stati realizzati attraverso un *Rationale Design* basato sulla omologia strutturale identificata tra la struttura del CXCL12 e vMIPII, una chemochina prodotta dall'herpes virus-Kaposi associato. Essendo stato dimostrato che l'N-terminale sia di vMIP-II che di SDF-1 α è sufficiente per il legame al CXCR4 e per esplicare l'attività fisiologica della chemochina (agonista per SDF-1 α e antagonista per vMIP-II), è stata progettata una nuova famiglia di ligandi di CXCR4. Tali peptidi sono stati sintetizzati e studi funzionali sono in corso per valutare la possibile funzione biologica inibitoria nei confronti del recettore CXCR4. I saggi funzionali prevedono saggi di inibizione di migrazione, inibizione del legame di specifici anticorpi fluorescenti contro il recettore CXCR4, inibizione dell'induzione del P-Erk ligando indotta e inibizione del rilascio del calcio. Peptidi selezionati verranno poi testati per il binding specifico al recettore attraverso test di spiazzamento del ligando marcato. Tali saggi realizzati su linee cellulari leucemiche (CEM) e linee epiteliali di melanoma (PES 43) hanno permesso di identificare 4 peptidi candidati inibenti CXCR4.

Preliminari studi *in vivo* hanno valutato il modello delle metastasi polmonari indotte delle cellule di melanoma B16 nel sistema dei topi C57Bl. Metastasi polmonari sono state verificate attraverso valutazione post sacrificio. Sono in corso di definizioni possibili rilevazioni attraverso metodiche di imaging attraverso sonde fluorescenti, TC-PET dedicate ai piccoli animali e metodiche di RMN.

Possibile ruolo diagnostico del recettore CXCR4 nei gliomi è stato descritto; l'espressione del CXCR4 discriminava tra astrocitoma di secondo grado e astrocitomi anaplastici e glioblastoma multiforme. Inoltre, l'analisi quantitativa delle aree peritumorali nelle immagini MR pesate in T2, sembravano correlare con i livelli di espressione di CXCR4.

La valutazione di parametri M in relazione alla crescita di un modello di glioblastoma umano ottenuto dall'impianto intracerebrale di cellule U87 nel topo nudo è in corso. La crescita

tumorale è stata valutata mediante immagini MR pesate in T1 dopo somministrazione di Gadolinio e in T2.

Verranno inoltre valutate, *in vitro* e *in vivo*, le potenziali attività terapeutiche di antagonisti di come AMD3100 e di peptidi inibitori, sintetizzati dall'Istituto Tumori Pascale di Napoli.

Analisi dell'espressione di CXCR4 in biopsie di tumore e su modelli *in vivo* di neoplasia prostatica (TRAMP) è in corso. Sieri e apparato urogenitale da topi TRAMP e wild type (WT) di differenti età sono stati raccolti. Lesioni PIN insorgono già alla V/VI settimana di vita. Intorno alla settimana 11-12, quando gli animali sviluppano tolleranza verso antigeni tumore associati le lesioni PIN hanno invaso quasi tutti gli acini prostatici. Un franco adenocarcinoma e la possibilità di metastasi ai linfonodi paraortici è caratteristica di topi di oltre 20 settimane di vita. In una percentuale variabile di topi TRAMP di questa età (5-20%) si sviluppa una neoplasia prostatica neuroendocrina, particolarmente insensibile agli androgeni e con alte potenzialità metastatiche ad organi viscerali.

A breve inizieranno le analisi in immunoistochimica e citofluorimetria per valutare l'espressione di CXCR4/SDF1 sulle cellule neoplastiche e stromali nel modello TRAMP. Contemporaneamente saranno condotte analisi su preparati istologici umani di neoplasie prostatiche.

Le CSC sono state isolate da tessuto prostatico sano e da lesioni neoplastiche TRAMP in differenti stadi (da PIN a tumore neuroendocrino). Sono state quindi isolate una linea di cellule staminali da prostata murina sana e almeno 4 linee di CSC da lesioni PIN, adenocarcinoma e tumore neuroendocrino. Mentre la linea di cellule staminali prostatiche da topo WT non è stata in grado di generare tumore se inoculate in topo immunodeficiente, le linee di CSC fino ad oggi valutate sono state in grado di generare tumori sia ortotopici sia sottocutanei.

L'analisi citofluorimetrica delle CSC ha mostrato una scarsa espressione di CXCR4 (<10%), apparentemente non modificabile dai successivi passaggi *in vitro*. Espressione di chemochine e loro recettori verrà valutata su cellule tumorali differenziate, ottenute mediante coltura delle sfere in condizioni differenzianti oppure direttamente sulle cellule tumorali ottenute dalla dissociazione di campioni tumorali freschi. La valutazione retrospettiva sulle cellule staminali tumorali di CXCR4 e altre chemochine, permetterà di definire il valore predittivo del pattern di espressione di CXCR4, da solo o in associazione, sulla formazione di metastasi.

Le concentrazioni degli intermedi del metabolismo della fosfatidilcolina (PC), in particolare la fosforilcolina (PCho) e glicerofosforilcolina (GPC), possono rappresentare biomarcatori metabolici della risposta al trattamento (proliferazione cellulare, apoptosi e sopravvivenza, angiogenesi).

Nel primo anno abbiamo studiato le variazioni quantitative dei metaboliti colinici in modelli *in vitro* di cellule linfoblastoidi umane (CEM) private di siero e poi ristimate con siero fetale (10%), oppure con chemochina SDF-1 α . Dati preliminari mostrano che i livelli intracellulari di PCho aumentavano significativamente in cellule private di siero rispetto alle cellule di controllo in presenza di siero. La riesposizione al siero (10%) o alla sola chemochina SDF1- α , induceva livelli di PCho a valori basali. Risultati preliminari hanno inoltre indicato che le cellule trattate con AMD3100 presentavano un contenuto intracellulare di PCho intermedio tra cellule di controllo e cellule deprivate di siero.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1. Articolazione del progetto Recettori per chemochine come marcatori biologici e molecolari di risposta clinica e target terapeutico

Proponente (<i>Cordinatore del progetto</i>)	UO (<i>ente di appartenenza: responsabile</i>)	Gruppi di ricerca afferenti	Responsabile scientifico del gruppo
Pascale (Stefania Scala)	UO1 (Pascale: Stefania Scala)	Pascale	Alfredo Siani
		Pascale	Stefania Scala
		Pascale	Vincenzo Rosario Iaffaioli
		Pascale	Paolo del Rio
		Pascale	Claudio Arra
		CNR	Pietro Omodeo
		CNR	Stefania de Luca
		ISS	Alessandra Carè
		ISS	Ugo Testa
	UO2 (ISS: Ruggero Marchiano De Maria)	ISS	Franca Podo
		ISS	Giuseppe Arancia
		HSR	Matteo Bellone
	UO3 (HSR: Matteo Bellone)	HSR	Rossella Galli
		HSR	Claudio Doglioni

Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, Felli N, Mattia G, Petrini M, Colombo MP, Peschle C, Carè A. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* 2008;68(8):2745-54.
2. Felicetti F, Errico MC, Segnalini P, Mattia G, Carè A. MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8(11):1759-65.
3. Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, Pelosi E, Pasquini L, Petrucci E, Biffoni M, Nuzzolo ER, Billi M, Foà R, Brunetti E, Grignani F, Testa U, Peschle C. A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nat Cell Biol* 2008;10(7):788-801.