

## VALUTAZIONE DEL POTENZIALE RUOLO DEL NUOVO ANTIGENE CANCER-TESTIS BORIS NELLO SVILUPPO DI NUOVE STRATEGIE DI IMMUNOTERAPIA PER IL CANCRO

Lucia Gabriele (a), Maria Ferrantini (a), Herbert C Morse III (b), Victor Lobanenkov (b)

(a) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

(b) National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

BORIS/CTCF (Brother of the Regulator of Imprinted Sites), un paralogo del fattore di trascrizione CTCF, è un nuovo membro della famiglia dei *cancer testis* (CT) (Loukinov D, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:6806). L'espressione di BORIS è limitata ad alcuni stadi dello sviluppo delle cellule germinali maschili e ad una grande varietà di cellule neoplastiche sia esse linee cellulari o tumori primari (Klenova EM, *et al. Semin Cancer Biol* 2002;12:399). L'espressione condizionata di BORIS in cellule normali determina la demetilazione e la derepressione di MAGE-A1 e la riattivazione di altri geni CT come NY-ESO-1 and Oct-4 (Vatolin S, *et al. Cancer Res* 2005;65:7751; Hong JA, *et al. Cancer Res* 2005;65:7763; Hoffmann MJ, *et al. Biochem Pharmacol* 2006;72(11):1577). Di notevole interesse, il gene Oct-4 è considerato un fattore caratterizzante cellule staminali tumorali (Ponti D, *et al. Cancer Res* 2005;65:5506; Hochedlinger K, *et al. Cell* 2005;121:465). Di conseguenza, è stato suggerito che BORIS può agire come oncogene e la sua espressione a stadi precoci del processo di carcinogenesi determina la deregolazione e l'attivazione di molti geni CT. Evidenze iniziali suggeriscono che BORIS stesso è regolato dalla metilazione del DNA poiché la sua espressione è indotta in cellule tumorali da trattamento con l'inibitore della metil-trasferasi (DNMT) 5-aza-2'-deossicitidina (DAC) (Hong JA, *et al. Cancer Res* 2005;65:7763). In aggiunta, una recente pubblicazione sostiene il ruolo dell'ipometilazione di DNA del promotore nel controllo dell'espressione di BORIS (Woloszynska-Read A, *et al. Cancer Immunity* 2007;7:21). Per di più, un lavoro pubblicato di recente evidenzia che linfociti CD8+ citotossici con una potente attività antitumorale, capaci di lisare linee cellulari tumorali di origine istologica distinta in modo MHC classe I ristretto, vengono generati dopo immunizzazione con un vaccino a DNA del gene BORIS (Ghochikyan *et al.*, 2007). Nel loro insieme, tutti questi dati indicano che BORIS è espresso molto precocemente nei tumori, media l'induzione di altri geni CT e può aumentare l'immunogenicità di alcuni tumori. Alla luce di ciò, BORIS rappresenta un nuovo bersaglio potenzialmente utilizzabile nell'immunoterapia dei tumori.

Dal punto di vista clinico, gli agenti modulatori epigenetici, recentemente al centro di grande interesse come farmaci antitumorali, promuovono fortemente l'espressione di antigeni CT così come di molecole del complesso di istocompatibilità di Classe I (MHC I) e di altre molecole costimolatorie. Conseguentemente, nonostante l'iniziale preoccupazione sulla capacità dei farmaci epigenetici di attivare antigeni CT, terapie combinate basate sull'utilizzo di DNMT e/o inibitori dell'istone deacetilasi (HDAC) e di vaccini diretti verso antigeni CT sono sempre più considerate per l'utilizzo clinico. In relazione a ciò, un grande sforzo scientifico è diretto a sviluppare una seconda generazione di inibitori DNMT e HDAC più efficaci e più selettivi. Tra essi l'apicidina è considerato un promettente candidato (Jones P, *et al. J Med Chem* 2008;51:2350). Nonostante ciò, ad oggi l'esatto meccanismo di azione dell'apicidina come inibitore HDAC rimane sconosciuto (Im JY, *et al. Chemico-Biol Inter* 2008;172:235).

Su questa base è data l'importanza del ruolo di BORIS nella trasformazione di cellule neoplastiche e nella regolazione di altri geni CT, i principali obiettivi del presente studio possono essere riassunti come segue: i) indagare le caratteristiche immunologiche di BORIS come potenziale bersaglio di nuove strategie di immunoterapia del cancro; ii) stabilire potenziali correlazioni tra l'induzione di BORIS da parte di agenti epigenetici con l'aumento della risposta immunologica e clinica a vaccini diretti contro BORIS nel tentativo di disegnare nuove terapie combinate.

A questo fine, la prima parte del progetto è stata focalizzata ad identificare peptide antigenici della proteina BORIS riconosciuti da cellule T CD8+. Abbiamo trovato che un epitopo HLA-A(\*)02.01 ristretto (BORIS8-17) era capace di stimolare cellule T CD8+ *in vivo* in topi transgenici HLA-A(\*)02.01 e *in vitro* in cellule da donatori sani (Romagnoli G, *et al.* In: *Rapporti ISTISAN* 06/50. p. 36-40; Gabriele L, *et al.* Brevetto in preparazione; Romagnoli G, Belardelli F, Gabriele L. lavoro in preparazione). Questa parte degli studi ha fornito la prima evidenza del potenziale uso di BORIS come bersaglio di trattamenti immunoterapeutici innovativi in una varietà di tumori. Sfortunatamente, a causa di una contaminazione generalizzata del nostro stabulario, non siamo stati in grado di finire questa parte del progetto che al momento è in fase di conclusione. In seguito, poiché il gruppo NIH partecipante a questo progetto ha recentemente pubblicato che BORIS è espresso in modo aberrante in tumori di carcinoma mammario (D'Arcy *et al.*, 2008), ci siamo focalizzati nello studio della modulazione di BORIS in linee cellulari di carcinoma mammario (MCF7; MDA-MB-435 e MDA-MB-231) da parte di diversi modulatori epigenetici quali apicidina, depsipeptide e il ben conosciuto SAHA, usando tecniche di immunoistochimica e analisi di *western blot* e real-time PCR. Abbiamo trovato che l'apicidina selettivamente determina l'aumento dell'espressione di BORIS suggerendo un possibile controllo di questo farmaco sul potenziale immunologico di BORIS. Alla luce di tutto ciò, intendiamo proseguire i nostri studi come di seguito descritto: i) verificare l'abilità di cellule T CD8+ BORIS-specifiche di riconoscere tumori BORIS-positivi di varia origine in modo HLA-A(\*)02.01 ristretto; ii) studiare la modulazione di vie del segnale intracellulare correlate all'induzione di BORIS da parte di apicidina e altri potenziali modulatori epigenetici in cellule di carcinoma mammario, e in altre linee tumorali di diversa origine, mediante l'uso di esperimenti di *microarray* e analisi di espressione genica.

Nel contesto di questo progetto di cooperazione ISS-NIH, il gruppo NIH ha condotto studi sulla modulazione da parte della metilazione di residui CpG del promotore di BORIS e sull'espressione di questa proteina in linee cellulari e in pazienti di carcinoma mammario utilizzando tecniche innovative per la rilevazione di RNA, proteine e anticorpi (Renaud *et al.*, 2007; D'Arcy *et al.*, 2008). Su questa base, il gruppo NIH continuerà gli studi, già finanziati, sulla potenziale correlazione tra livelli di BORIS nei tumori con parametri clinico/patologici. Inoltre, studi in collaborazione tra i gruppi ISS-NIH coinvolti in questo progetto proseguiranno per completare la caratterizzazione immunologica dell'antigene BORIS e per disegnare immunoterapie innovative per pazienti con tumori BORIS-positivi.

## **Pubblicazioni conseguite nell'ambito del progetto**

D'Arcy V, Pore N, Docquier F, Abdullaev ZK, Chernukhin I, Kita GX, Rai S, Smart M, Farrar D, Pack S, Lobanekov V, Klenova E. BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. *Br J Cancer* 2008;98(3):571.

Gabriele L, Ozato K. The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18(5-6):503-10.

Ghochikyan A, Mkrtychyan M, Loukinov D, Mamikonyan G, Pack SD, Movsesyan N, Ichim TE, Cribbs DH, Lobanekov VV, Agadjanyan MG. Elicitation of T cell responses to histologically unrelated tumors

- by immunization with the novel cancer-testis antigen, brother of the regulator of imprinted sites. *J Immunol* 2007;178(1):566-73.
- Mkrtichyan M, Ghochikyan A, Loukinov D, Davtyan H, Ichim TE, Cribbs DH, Lobanekov VV, Agadjanyan MG. DNA, but not protein vaccine based on mutated BORIS antigen significantly inhibits tumor growth and prolongs the survival of mice. *Gene Ther* 2008;15(1):61-4.
- Renaud S, Pugacheva EM, Delgado MD, Braunschweig R, Abdullaev Z, Loukinov D, Benhattar J, Lobanekov V. Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. *Nucleic Acids Res* 2007;35(21):7372-88.
- Romagnoli G, Borghi P, Buoncervello M, Spadaro F, Lokinov D, Lobanekov V, Ferrantini M, Morse III HC, Belardelli F, Gabriele L. BORIS-mediated gene activation in breast cells treated with the histone deacetylase inhibitor apicidin. Manoscritto in preparazione.
- Romagnoli G, Borghi P, Lokinov D, Lobanekov V, Agadjanyan M, Morse III HC, Belardelli F, Gabriele L. High-Affinity HLA-A(\*)02.01 epitope from the cancer testis antigen BORIS generate *in vitro* and *in vivo* antitumor CTL response without autoimmune side effects. Manoscritto in preparazione.
- Taylor P, Tamura T, Kong HJ, Kubota T, Kubota M, Borghi P, Gabriele L, Ozato K. The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. *Immunity* 2007;27(2):228-39.