

**Università degli Studi del Piemonte Orientale**  
**“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca**  
**in Medicina Molecolare**  
**(XX Ciclo)**

**Relazione 4° anno:**

**IL RUOLO DI H4/ICOS IN UN MODELLO**  
**MURINO DI CARCINOMA MAMMARIO**

Responsabile scientifico:

Prof. Umberto Dianzani

Dottoranda:

Ilaria Seren-Bernardone

# **Introduzione**

## **1 - IMMUNOBIOLOGIA DI BALB-neuT**

La morfogenesi delle ghiandole mammarie è controllata dagli ormoni sessuali, ovvero estrogeni e progestinici, e da fattori di crescita autocrini. Alterazioni nei segnali di crescita influenzano sia il differenziamento che la proliferazione dei componenti strutturali di tali ghiandole e possono essere associate allo sviluppo di neoplasia e iperplasia.

Tali alterazioni possono per esempio essere dovute a cambiamenti nel numero e nella funzione dei recettori dei suddetti fattori di crescita. Tra i recettori di fattori di crescita espressi sulla membrana delle cellule mammarie si trova p185neu, una proteina con importante funzione morfogenetica e la cui alterazione è spesso di importanza critica nella trasformazione neoplastica.

p185neu è un recettore di membrana ad attività tirosinchinasica, codificato dall'oncogene ErbB-2. E' costituito da una regione extracellulare contenente 4 domini associati a 2 a 2 per formare unità a 2 domini, da un singolo dominio transmembrana e da un dominio ad attività tirosinchinasica intracitoplasmatico.

L'analogo di tale oncogene nei roditori è chiamato Her-2/neu, poichè fu per la prima volta identificato in cellule di neuroblastoma.

### **1.1 - p185neu**

p185neu appartiene alla famiglia degli *Epidermal Growth Factors* (EGF). I recettori di questa famiglia sono in grado di legarsi ad un ampio gruppo di molecole, delle quali EGF è il prototipo. A questa famiglia appartengono anche la proteina EGFR/ErbB-1 e i prodotti degli oncogeni ErbB-3 ed ErbB-4. Non è stato finora scoperto un ligando specifico per p185 ed è probabile che non esista: infatti p185neu ha una struttura aperta in grado di funzionare come corecettore di tutti gli altri ErbB, anche in assenza di interazione diretta con un ligando. Molti membri della famiglia ErbB, una volta associati al loro ligando, formano eterodimeri con altri recettori di EGF e preferibilmente con p185neu, e attivano così una cascata intracellulare di trasduzione del segnale dipendente da MAPK e PI3K/AKT, con effetti potentemente mitogenici e anti-apoptotici.

E' stato ipotizzato che la sovraespressione di p185neu promuova la formazione di nuovi eterodimeri, aumentando così l'effetto mitogenico.

I recettori della famiglia di EGFR (Fig.1) e in particolar modo p185 sono determinanti per morfogenesi e trofismo di molti tessuti: sono infatti coinvolti nel differenziamento delle cellule mesenchimali ed epiteliali, nello sviluppo di neuroni e cellule gliali, del cuore e delle ghiandole mammarie. Un loro malfunzionamento e' spesso associato a patogenesi e progressione di tumori, soprattutto mammari. Infatti tumori mammari con amplificazione di ErbB-2 e sovraespressione di p185neu dimostrano maggior aggressività e invasività oltre ad una maggior resistenza sia alla chemioterapia che alla terapia ormonale.

Non solo queste caratteristiche rendono p185neu un target ideale in trattamenti sperimentali, ma anche il fatto che la percentuale di cellule p185neu+ è generalmente maggiore nelle lesioni preneoplastiche, nei tumori primari e nelle metastasi.

Fig 1 I recettori della famiglia di EGFR [Pannellini et al., 2004]

## 1.2 – Vaccinazione verso p185<sup>neu</sup>

p185neu non e' una molecola particolarmente immunogenica perchè è un antigene *self*, espresso in molti tessuti sani e semplicemente sovraespresso in cellule tumorali. In certi casi però questa sovraespressione è in grado di sovvertire la tolleranza immunologica: si è infatti riscontrato che alcuni pazienti producono Th, CTL e anticorpi specifici per p185neu. Molti vaccini sovvertono la tolleranza a p185neu e inducono una risposta umorale e cellulare in pazienti affetti da tumori con alterata funzione di ErbB-2.

p185neu può essere considerato il prototipo di una classe di *Tumor-Associated Antigens* (TAA) con la caratteristica, molto utile a fini terapeutici e diagnostici, di essere espressi già in lesioni preneoplastiche e di incrementare la loro espressione con la progressione del tumore.

## 1.3 – Topi BALB/c transgenici per l'oncogene Her2/neu

Un modo per testare il potenziale del sistema immunitario nella prevenzione e cura dei tumori è quello di utilizzare topi geneticamente modificati, cioè in grado di sviluppare tumore come conseguenza della mutazione o sovraespressione di un particolare oncogene oppure della perdita di funzione di un oncosoppressore.

In tali modelli murini i tumori diventano evidenti dopo un periodo di tempo caratterizzato dai progressivi stadi della tumorigenesi, mentre la relazione tra tumore e tessuti circostanti è conservata. Altre importanti caratteristiche di questi modelli, che concorrono a confermare una stretta analogia con tumori umani, sono il carattere autologo dei tumori, lo sviluppo di metastasi e la presenza di un sistema immunitario intatto.

Ci sono però anche differenze rispetto al corrispettivo umano, di cui tenere in conto: per esempio il *pattern* di espressione potrebbe non corrispondere a causa della specificità del promotore genico e i meccanismi patogenici possono non sovrapporsi completamente.

Anche il momento in cui avviene la prima espressione dell'oncogene è di cruciale importanza immunologica perchè può direttamente influenzare l'intensità della tolleranza.

Alcuni modelli inoltre sono difficilmente gestibili perchè il tumore ha un lungo periodo di latenza o si sviluppa solo in una piccola percentuale di topi o solo in particolari condizioni come la gravidanza o in seguito alla mutazione di geni che non hanno un corrispettivo umano. L'utilizzo di modelli tumorali murini richiede quindi un compromesso.

Sono stati sviluppati e descritti circa un centinaio di modelli murini di tumore mammario spontaneo: ci sono diverse linee di topi transgenici che cominciano a sovraesprimere Her2/neu di ratto in differenti momenti della vita [Muller et al., 1988]. La trascrizione di questo oncogene è controllata da una sequenza ripetuta di *mammary tumor virus*, che conferisce rapidità di sviluppo e accentuata aggressività, oltre a localizzare il tumore stesso a livello delle ghiandole mammarie. La mutazione puntiforme in posizione 664 nel dominio transmembrana porta alla sostituzione di una Valina con un Acido Glutammico, la cui carica negativa risulta nella formazione di legami a idrogeno con un'Alanina in posizione 661 di una seconda molecola di p185neu o di altri recettori EGF. Questi omo- ed eterodimeri trasducono spontaneamente segnali proliferativi, anche in assenza di ligando.

Uno dei più aggressivi modelli di carcinogenesi mammaria dovuta a rat Her-2/neu è quello su background di femmine BALB/c: lo *strain* derivante si chiama BALB-neuT ed è stato ottenuto da un topo transgenico Her2/neu *non-inbred* dopo circa 3 anni di incroci con BALB/c.

#### **1.4 – Morfologia dello sviluppo del tumore mammario in topi BALB-neuT**

Alla nascita, le 10 ghiandole mammarie murine dei topi BALB-neuT consistono in un singolo dotto galattoforo che si suddivide in 3-5 dotti secondari. Dalla quarta settimana questi iniziano a suddividersi per formare nuovi dotti. Essi terminano in piccoli sacchi rivestiti da parecchi strati di cellule epiteliali (*terminal end buds*): proprio questi sono la zona più sensibile a stimoli proliferativi e proseguono il loro sviluppo estrogeno-dipendente fino alla ottava-dodicesima settimana. Allo stesso tempo cominciano a formarsi ulteriori ramificazioni duttali, duttuli e alveoli e i cosiddetti *lateral buds*, che sono la zona di maggior espressione di rat p185neu e il *focus* iperplastico durante la carcinogenesi. All'ottava settimana nelle sacche laterali cominciano ad apparire carcinomi *in situ* e a moltiplicarsi i *foci* di iperplasia (Fig.2).

Fig.2 – Cinetica di sviluppo del tumore mammario in BALB-neuT [da Pannellini et al., 2004]

Questo processo avviene in parallelo in tutte le 10 ghiandole mammarie. Il carcinoma *in situ* diventa invasivo tra la decima e la ventesima settimana e metastatizza dopo la 35-sima. Già durante le prime fasi di sviluppo del tumore, nel modello BALB-neuT, si attiva l'angiogenesi.

Il modello BALB-neuT è particolarmente utile per lo studio e il perfezionamento di strategie immunoterapiche volte a inibire lo sviluppo di tumori. Il recettore p185 neu è un ottimo bersaglio immunologico, essendo una proteina di membrana facilmente accessibile anche senza presentazione in associazione ad MHC, la cui espressione è spesso alterata in tumori umani e murini.

## 1.5 – Vaccinazione antitumorale in topi BALB-neuT

Basandosi sulle caratteristiche morfologiche e funzionali di tale modello, sono stati disegnati vaccini, sia cellulari che a DNA, coadiuvati da molecole ad effetto anti-angiogenetico ed immunostimolante.

### a – Vaccinazione cellulare

Consiste nella somministrazione/trasferimento di cellule tumorali mammarie allogene esprimenti rat p185neu e molecole H-2<sup>q</sup> di classe I (cellule neu/H2<sup>q</sup>) a partire dalla sesta settimana (quando sono presenti solo *foci* iperplastici), seguita dalla somministrazione sistemica di IL-12, ad effetto prevalentemente antiangiogenetico. Questo trattamento è in grado di prevenire lo sviluppo di carcinomi invasivi in tutti i topi di 22 settimane e l'88% rimane libero da tumori palpabili fino alla 52-sima settimana. L'effetto dei due componenti è additivo/sinergico. I linfociti CD8<sup>+</sup> prelevati dalla milza di topi trattati producono elevate quantità di IFN- $\gamma$ .

### b – Vaccinazione a DNA

La vaccinazione cellulare comporta vari rischi e problemi tecnici. Per questo motivo si è pensato di vaccinare con segmenti di DNA (plasmidi) codificanti per rat p185neu o una sua porzione. La somministrazione di tali plasmidi, da soli o in combinazione a segmenti codificanti per la molecola immunomodulatoria IL-1 $\beta$  è in grado di ritardare sensibilmente la comparsa dei tumori e di diminuirne la molteplicità. Questo effetto protettivo però declina col tempo e alla settimana 52 quasi nessun topo è libero da tumore.

Quindi l'obiettivo più importante non è tanto quello di aumentare semplicemente la risposta immunitaria ma quello di ottenere un prolungamento della memoria immunologica.

Le vaccinazioni cellulare e a DNA sono in grado di prevenire la progressione solo di lesioni tumorali precoci ma diventano molto meno efficienti negli stadi successivi. Inoltre sono totalmente inefficaci se iniziate dopo la settimana 15 di vita, quando sono già presenti lesioni avanzate. Sia nell'uomo che nel topo i tumori possono evadere la sorveglianza immunologica attraverso vari meccanismi come la produzione di molecole ad attività immunosoppressiva o la creazione di un microambiente fisicamente inaccessibile al sistema immunitario stesso. Inoltre esistono cloni tumorali che non esprimono l'antigene-target del vaccino e la distruzione, in seguito alla vaccinazione, dei cloni positivi può favorire l'espansione di tali cloni resistenti. Migliori risultati sono stati ottenuti con l'immunoterapia preventiva e cioè vaccinando prima della comparsa dei tumori [Pannellini et al., 2004]

## 2 - ICOS E TUMORI

### 2.1 – La risposta immunitaria ai tumori

I linfociti T maturano nel timo e in seguito migrano verso gli organi linfoidi periferici (milza e linfonodi); qui, tramite il TCR (*T Cell Receptor*), i linfociti naïve CD4+ e CD8+ sono in grado di riconoscere complessi peptide-MHC II/I, rispettivamente, espressi sulla superficie delle APC (*Antigen Presenting Cells*). La stimolazione del TCR non è però di per se sufficiente: l'attivazione richiede un secondo segnale, definito costimolazione.

La più conosciuta famiglia di molecole costimolatorie è quella di CD28, cui appartengono ICOS e CTLA4. I rispettivi controrecettori appartengono alla famiglia B7 e sono B7.1 e B7.2 per CD28 e CTLA4 e B7h per ICOS.

Il bilancio di espressione di molecole costimolatorie e coinibitorie sulla superficie delle cellule tumorali è fondamentale perchè queste possano essere eliminate da un'efficace risposta immunitaria (*tumor surveillance*). La mancata espressione di molecole costimolatorie rende il tumore invisibile al sistema immunitario e l'aumentata espressione di coinibitorie rende inefficace l'attività citotossica di linfociti T ed NK. Questo è il principio su cui si fonda l'immunoterapia antitumorale.

Un tumore è in grado di attivare una risposta immunitaria se esprime in superficie molecole MHC. Perchè questa sia efficiente deve però anche fornire un segnale costimolatorio. Le molecole costimolatorie sono generalmente espresse solo su cellule linfoidi, tranne B7h, che è naturalmente presente anche in tessuti non linfoidi. Questa ipotesi è stata confermata in modelli murini, in cui è stata studiata l'espressione ectopica di B7.1 e B7.2 [Townsend S.E., 1993; Chen L., 1992; Baskar S., 1993]. L'induzione dell'espressione di B7.1 su cellule tumorali mediante trasfezione è sufficiente a indurre rigetto CD8+ e CD4+-mediato. Il rigetto inoltre genera memoria immunologica e una conseguente immunità a successiva induzione dello stesso tipo di tumore.

Lo stesso approccio è stato usato per dimostrare che l'espressione ectopica di B7h è in grado di fornire il necessario segnale costimolatorio e di promuovere il rigetto CD8-mediato di fibrosarcoma e plasmacitoma [Wallin JJ, 2001; Liu X, 2001]. L'ottimale espansione clonale dei linfociti T CD8+ indotta da B7h richiede però la presenza di B7.1 e B7.2 sulle APC dell'ospite (Fig.3).

Sono già in corso trials clinici per testare l'efficacia di vaccini basati su cellule tumorali trasfettate con B7.1:

- carcinoma renale metastatico: cellule tumorali autologhe trasfettate con B7.1 in associazione a somministrazione sistemica di IL-2 [Antonia SJ, 2002]
- carcinoma polmonare a cellule “non-piccole”: linea di adenocarcinoma trasfettata con B7.1 e HLA-A1 o A2 [Raez LE, 2004].
- leucemia mieloide acuta: cellule tumorali autologhe trasfettate con B7.1 in associazione a IL-2 e trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogene [Chan L, 2006].

Nell'analizzare i precedenti studi bisogna tenere conto del fatto che B7.1 lega non solo CD28, che è notoriamente costimolatrice, ma anche CTLA4, il prototipo dei coinibitori. E' quindi possibile, in certe circostanze, che questi vaccini possano attenuare la risposta immunitaria. Infatti l'espressione a bassi livelli di B7.1 è uno dei meccanismi di “immune-escape” riscontrati in modelli murini di carcinoma del colon [Tirapu I, 2006].

Anche il blocco di CTLA4 con anticorpi neutralizzanti ha dimostrato benefici clinici in pazienti con cancro.

Tutti gli studi finora realizzati hanno usato come modello tumori trapiantabili o chimicamente indotti. Da qui l'idea di studiare il ruolo di ICOS/B7h in un modello di tumore spontaneo come quello dei BALB.neuT, con stadi di sviluppo molto più simili al corrispettivo umano.

# **Materiali e metodi**

## **1 – STRAINS MURINI UTILIZZATI**

### **1.1 – C57BL/6**

I topi C57BL/6 (Fig 4) furono ottenuti per la prima volta da Little nel 1921. Sono classificati come *inbred*, ovvero sono stati ottenuti incrociando per non meno di 20 generazioni successive fratelli e sorelle. Ciò permette allo *strain* di avere uniformità genetica e fenotipica. Come per molti *inbred*, l'efficienza riproduttiva è diminuita, così come le dimensioni e la longevità.

Le caratteristiche fondamentali di questo *strain* sono:

- bassa incidenza di tumori mammari (ciò spiega la comparsa tardiva nella F1 BALB-neuT x B6)
- alta suscettibilità ad arteriosclerosi indotta dalla dieta
- suscettibilità alla dermatite ulcerativa cronica
- resistenza alle radiazioni
- resistenza allo shock anafilattico

Le femmine sono comunemente usate come donatrici di embrioni. Le blastocisti vengono utilizzate come ricevente di cellule staminali embrionali durante la creazione di *knock out*.

Frequentemente si osserva alta mortalità della prole e fenomeni di cannibalismo.



Fig 4 – C57BL/6

Ho condotto i miei esperimenti utilizzando i knockout di ICOS su background C57BL/6 descritti da Chen et al., 2001.

### **1.2 – BALB/c**

Lo *strain* BALB/c (Fig 5) fu creato da McDowell nel 1923. E' tipicamente usato in molti protocolli sperimentali e soprattutto nella produzione di anticorpi monoclonali. E' *inbred*, albino e di piccola taglia.

Le principali caratteristiche sono:

- Bassa incidenza di tumori mammari
- Resistenza ad arterosclerosi indotta dalla dieta.
- Alta incidenza di difetti cardiaci
- Sensibile alle radiazioni



Fig 5 – BALB/c

Nei miei esperimenti ho utilizzato la variante BALB-neuT descritta da Pannellini et al, 2004.

## 2 - GENOTIPIZZAZIONE

I topi BALB-neuT vengono ottenuti per incrocio di femmine BALB/c con maschi BALB-neuT, che sono eterozigoti per Her2/neu. Quindi la prole deve essere genotipizzata perchè alcuni topi saranno neu -/- e altri neu +/-.

La genotipizzazione si effettua per amplificazione mediante PCR su DNA estratto da frammenti di coda.

### 2.1 – Estrazione del DNA da coda

Si tagliano 1-2 mm di coda all'animale: per solubilizzare la cheratina e liberare il DNA si incuba ogni campione con 200 µl di NaOH 50mM per 10 minuti a 95°C, in agitazione.

Quindi si neutralizza con Tris/HCl 1M pH 8 (50 µl) e si agita con vortex per circa 1 minuto e si centrifuga a 13000 rpm per 6 minuti. A questo punto si recupera il surnatante e lo si conserva a 4°C. Si quantizza il DNA estratto con nanodrop e si utilizza direttamente per amplificare con PCR o si conserva a 4°C.

### 2.2 – Amplificazione del DNA

Le condizioni di PCR, il ciclo e i primer utilizzati sono indicati nelle tabelle che seguono.

(Tab 1, 2, 3, 4)

bp	Sqz 5'-3'	OLIGO	T <sub>m</sub> (°c)	T <sub>annealing</sub> (°c)
265	GACTGCAACTGCTCCTGGC	<b>ICOS fw</b>	60	56
	CATTGGATTCTTGATGGACAC	<b>ICOS3 rev</b>	66	62
478	ATTGAACAAGATGGATTGCAC	<b>neo fw</b>	58	54
	TCTTCGTCCAGATCATCCT	<b>neo rev</b>	56	52
230	GTAACACAGGCAGATGTAGGA	<b>neuT fw</b>	62	58
	ATCGGTGATGTCGGCGATAT	<b>neuT rev</b>	60	56
~300	TTCTTGGGTATGGAATCCTG	<b>b-actina fw</b>	58	54
	CTAGAAGCACTTGCGGTGCA	<b>b-actina rev</b>	62	58

Tab. 1 – Primers utilizzati

**1) BALB-neuT**

REAGENTS	FINAL CONC	μl(final 25)
H2O		0,4
buffer (10X)	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,5 mM	<b>1,5</b>
dNTP (2mM)	0,2 mM	2,5
neuT fw	0,5 μM	2,5
neuT rev	0,5 μM	2,5
b-actina fw	0,5 μM	2,5
b-actina rev	0,5 μM	2,5
Taq (5U/μl)	* 0,5 U/reaction	0,1
DNA sample	2,5 μl	8
		<b>25</b>

Tab 2 – Concentrazione dei reagenti utilizzati per amplificare il gene Her2/neu e il controllo positivo β-actina

**2) ICOS (ICOS3Rev)**

REAGENTS	FINAL CONC	μl(final 25)
H2O		0,1
buffer (10X)	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	<b>1,5 mM</b>	<b>1,5</b>
dNTP (2mM)	0,2 mM	2,5
ICOS fw	0,5 μM	2,5
ICOS2 rev	0,5 μM	2,5
neomycine Fw	0,5 μM	2,5
neomycine Rev	0,5 μM	2,5
Taq (5U/μl)	* 2 U/reaction	0,4
DNA sample	2,5 μl	<b>8</b>
		<b>25</b>

Tab 3 - Concentrazione dei reagenti utilizzati per amplificare il gene ICOS e il controllo del *gene-transfer*, neomicina

95°C	5min	32 cycles
94°C	1min	
<b>65°C</b>	1min	
72°C	1min	
72°C	5min	
4°C	∞	

Tab 4 – Ciclo di PCR utilizzato

Il tipico profilo che si vede correndo su gel di agarosio al 3% i prodotti della PCR è il seguente (fig 6):

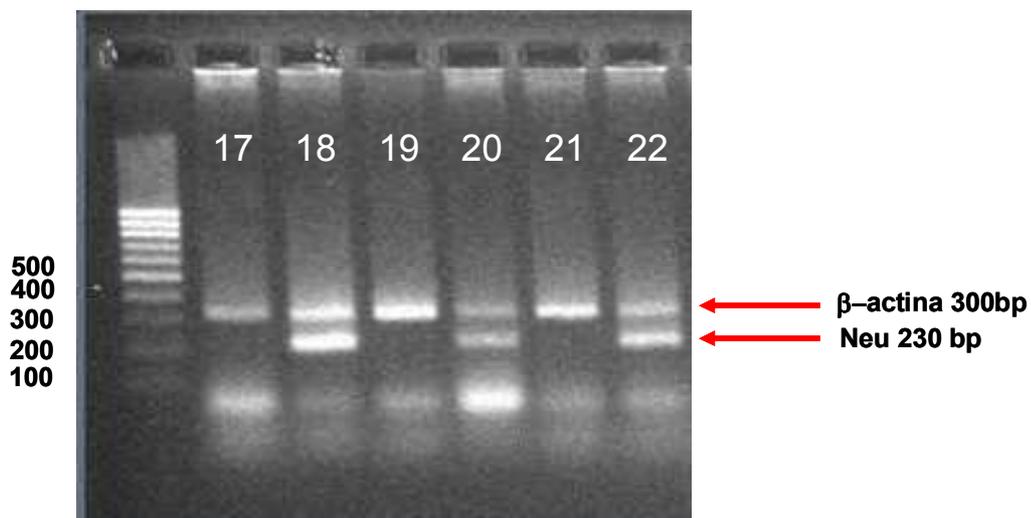


Fig 6 – gel di agarosio al 3%, prodotti di PCR con primer neu e beta-actina

### 3 – ESTRAZIONE DI CELLULE DELLA MILZA

La milza dell'animale viene estatta in condizioni di sterilità e le cellule vengono portate in sospensione in terreno RPMI 10%FBS (Gibco).

Le emazie vengono lisate mediante shock osmotico con acqua (900 µl) e successiva neutralizzazione con PBS 10X (100 µl).

Quindi si eliminano i detriti cellulari mediante filtrazione e si contano le cellule. Mediamente da una milza si ottengono circa 90 milioni di cellule totali.

### 4 - CITOFUORIMETRO

Le analisi citofluorimetriche sono state effettuate su cellule totali estratte da milza.

Dopo un prima incubazione di 30 minuti con siero di ratto al 10% per bloccare i recettori Fc, le cellule sono state lavate e risospese in staining buffer al 10% in siero di ratto e colorate con i seguenti anticorpi:

- anti-ICOS - FITC

- anti-CD4-APC (BD Pharmingen)
- NK 1.1 – PE (e-Bioscience)
- anti- CD8-biotina (TIB105) + streptavidina-AlexaFluor647 (Molecular Probes)
- anti-CD3 – DyLi649
- anti-CD3 $\gamma\delta$  - FITC (BD Pharmingen)
- anti-CD25-biotina (BD Pharmingen)+ streptavidina- AlexaFluor647 (Molecular Probes)
- anti-CD4 – FITC (GK 1.5)
- anti-FoxP3 – PE

La tintione intracellulare di FoxP3 è stata effettuata mediante kit e-Bioscience (PE anti-mouse/rat FoxP3 staining set).

## **5 - TRATTAMENTI**

Le femmine BALB-neuT sono state trattate con anticorpo anti-ICOS C398.4A (Buonfiglio et al., 2000), prodotto in hamster e attivo su cellule murine e umane.

L'anticorpo è stato iniettato per via intraperitoneale una volta a settimana ad una dose di 100 $\mu$ g/topo per 4 settimane seguite da settimane di pausa. Il ciclo viene ripetuto per tutta la vita dell'animale.

Come controllo sono stati utilizzati immunoglobuline di hamster (NHlg) e PBS.

## ***Scopo del lavoro***

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare l'influenza di ICOS (la sua assenza e la sua stimolazione) in un modello murino di carcinoma mammario.

## ***Risultati***

Lo studio può essere suddiviso in 2 parti:

1. studio della cinetica di sviluppo dei tumori mammari in BALB-neuT trattati con anticorpo legante ICOS (C398.4A)
2. studio della cinetica di sviluppo dei tumori mammari in F1 ed F2 di BALB-neuT x ICOS KO C57BL/6: in questo modello è possibile vedere l'effetto dell'assenza parziale (F1: ICOS +/-) o totale (F2: ICOS -/-) di ICOS su molteplicità di tumori, dimensioni e settimana di comparsa.

### **1 – C398.4A**

Sono stati considerati 9 gruppi sperimentali di femmine BALB-neuT. Il trattamento è stato iniziato alla settima/ottava settimana (w7-8) di vita in 7 esperimenti e alla dodicesima (w12) in 2, per vedere il momento di inizio del trattamento potesse avere un'influenza sull'efficacia dello stesso. Istologicamente la differenza risiede nel fatto che alla w7-8 i tumori non si sono ancora sviluppati, mentre alla w12 sono quasi palpabili.

Ogni gruppo sperimentale è stato suddiviso in 3 sottogruppi, sottoposti a 3 trattamenti differenti:

- A) iniezione i.p. di C398.4A (4mg/Kg ovvero 100µg/topo) una volta alla settimana per 4 settimane, seguita da una pausa di 3 settimane.
- B) iniezione i.p. di NHlg (Immunoglobuline di hamster, controllo) (4mg/Kg ovvero 100µg/topo) una volta alla settimana per 4 settimane, seguita da una pausa di 3 settimane.
- C) iniezione di PBS (200µl/topo, controllo) una volta alla settimana per 4 settimane, seguita da una pausa di 3 settimane.

Una volta alla settimana sono stati misurati numero e dimensione dei tumori. I primi tumori palpabili hanno cominciato a comparire alla settimana 14 (w14) di vita dell'animale. I topi sono stati sacrificati per ragioni etiche quando le dimensioni dei tumori superavano i 10 mm o quando tutte le ghiandole mammarie risultavano interessate, tra la w20 e la w27.

### 1.1 Settimana di comparsa del primo tumore

La somministrazione i.p. di C398.4A si è dimostrata efficace nel ritardare, seppure di poco (1 settimana), la comparsa del primo tumore palpabile, rispetto al trattamento con PBS e con NH-Ig, che hanno dato risultati paragonabili. Da notare che il ritardo nell'inizio del trattamento (w12) si rispecchia in una comparsa precoce dei tumori: i topi trattati con C398.4A tendono a comportarsi come i controlli e il trattamento perde quindi la sua efficacia (Tab 5).

	Mean	SD	w7-8 Mean	w12 Mean
C98.4A	<b>18,12</b>	2,1	18,00	17,33
NH Ig	<b>16,87</b>	1,1	16,92	16,40
PBS	<b>16,47</b>	1,6	16,17	16,83
	Median		Median	Median
C98.4A	<b>19,00</b>		18,00	17,50
NH Ig	<b>17,00</b>		17,00	16,00
PBS	<b>16,00</b>		16,00	16,00

Tab 5

### 1.2 Settimana di sacrificio

Contrariamente a quanto osservato per la comparsa del primo tumore palpabile, i 3 gruppi sperimentali non sembrano variare molto in riferimento alla settimana di vita media in cui è ritenuto opportuno sacrificarli (Tab 6).

	Mean	SD	Mean	Mean
C98.4A	<b>22,70</b>	2,9	23,71	20,333
NH Ig	<b>23,71</b>	1,4	23,78	23,6
PBS	<b>22,79</b>	2,2	21,78	24,6
	Median		Median	Median
C98.4A	<b>23,50</b>		24,00	20,00
NH Ig	<b>24,00</b>		24,00	24,00
PBS	<b>23,00</b>		22,00	25,00

Tab 6

### 1.3 Dimensioni dei tumori

La dimensione dei tumori è stata valutata in 2 modi. Nel primo caso è stata messa in relazione con il numero di tumori per topo, mentre nel secondo con il numero totale di mammelle (10) (Figura 7, Tab 7).

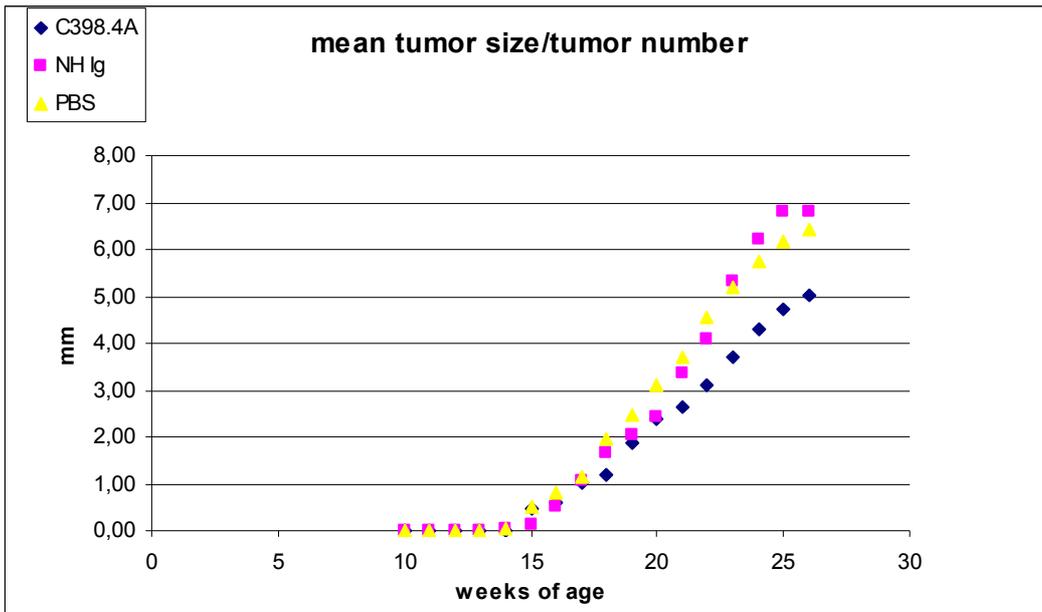


Fig 7

	p value
t-test C398/PBS	0,000685
t-test C398/Nhig	0,011073
t-test PBS/Nhig	0,375159

Tab 7

Il trattamento con C398.4A ha significativamente diminuito ( $p < 0,01$ ) la dimensione media dei tumori a parità di settimana di vita rispetto ai topi non trattati (trattati con PBS o NHlg). Di seguito sono riportate le medie delle dimensioni dei tumori in relazione al numero totale di mammelle per topo (Fig 8, Tab 8):

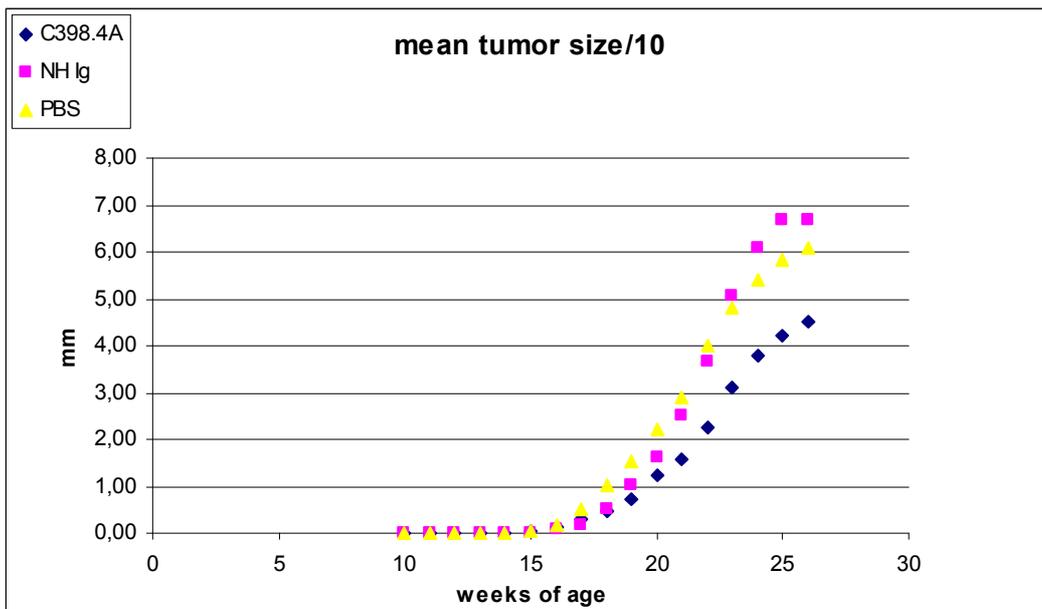


Fig 8

	p value
t-test C398/PBS	0,000967
t-test C398/Nhig	0,009203
t-test PBS/Nhig	0,823965

Tab 8

Anche correlando la dimensione dei tumori al numero totale di mammelle, il trattamento con C398.4A ha significativamente ritardato la crescita dei tumori.

#### 1.4 Tumor multiplicity

Il trattamento con C398.4A è in grado di rallentare la crescita dei tumori: ciò si riflette anche sul numero di tumori palpabili presenti, a parità di settimane di vita, su topi trattati e non trattati. Tra la settimana 17 e la settimana 22 di vita i topi trattati con C398.4A hanno un numero di tumori inferiore rispetto ai controlli. La differenza più consistente si registra alla settimana 22 (5,16 vs 7,71~7,60) (Fig 9, Tab 9).

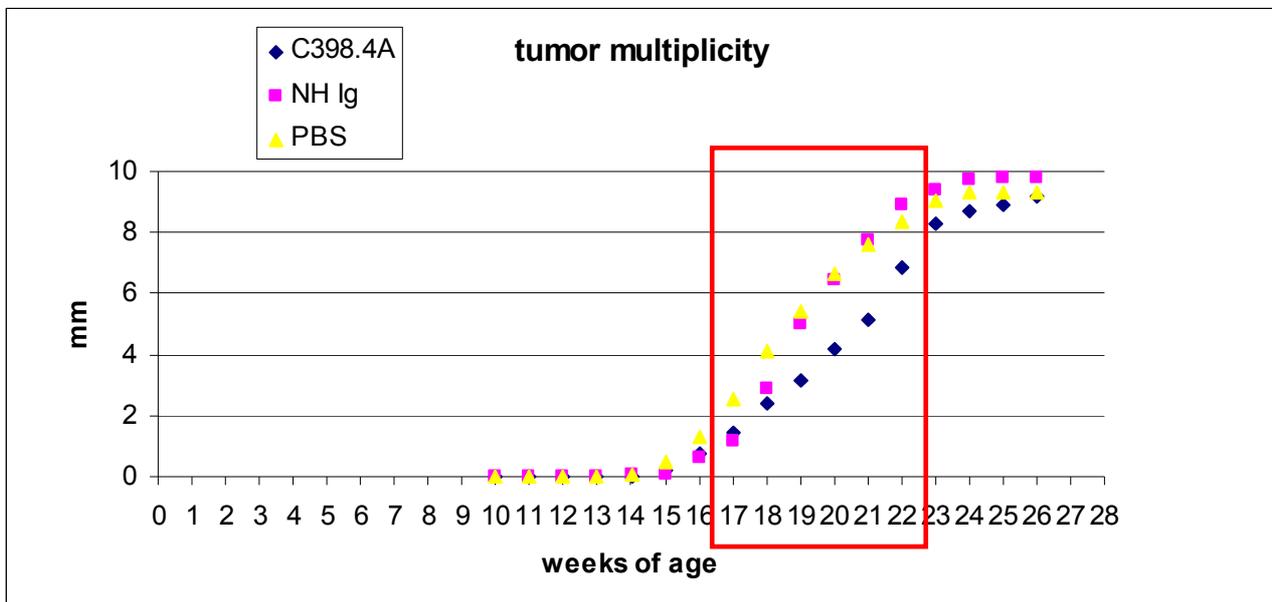


Fig 9

	p value
t-test C398/PBS	0,00130
t-test C398/NHlg	0,00546
t-test PBS/NHlg	0,37215

Tab 9

### 1.5 Percentuale di topi liberi da tumore

Il ritardo nella comparsa di tumori riportato precedentemente nei topi trattati con C398.4A si rispecchia nella notevole differenza, tra la settimana 17 e 20 di vita, nella percentuale di topi liberi da tumore, particolarmente spiccata alla settimana 18 (Fig 10).

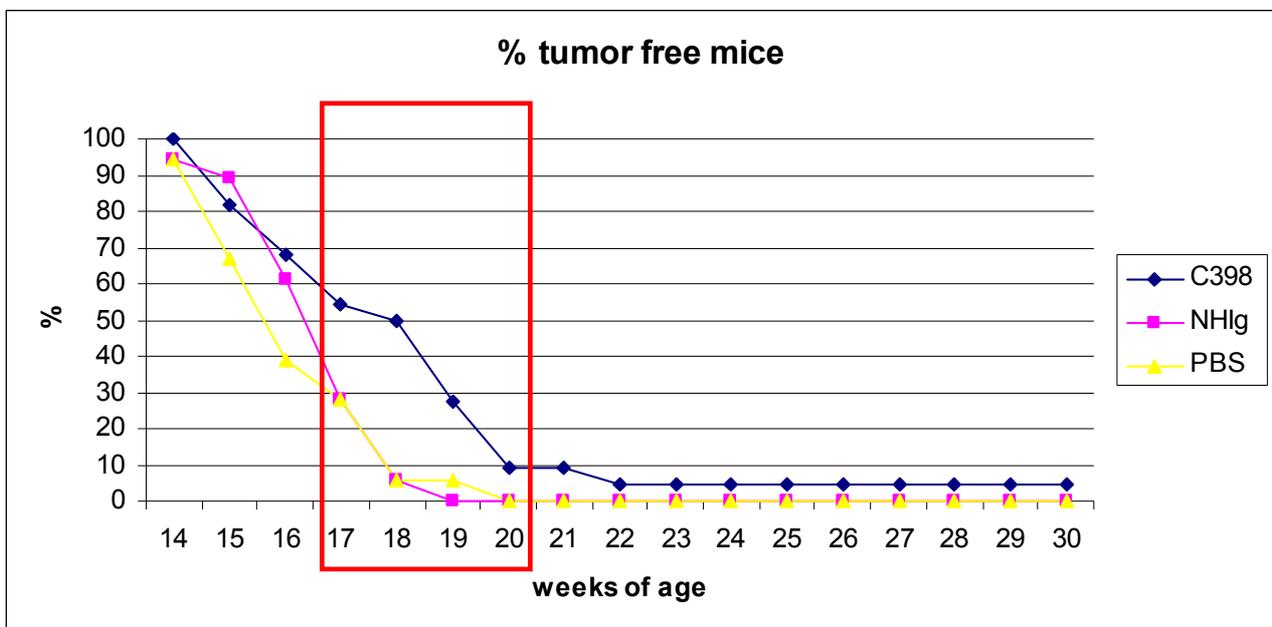


Fig 10

### 1.6 Analisi citofluorimetriche

Sono state condotte analisi citofluorimetriche su cellule totali estratte da milza per valutare eventuali differenze tra topi trattati con C398.4A e controlli nell'espressione dei marcatori delle Treg (CD25 e FoxP3) ma non è stata notata nessuna differenza. Nemmeno la percentuale di NK sembra variare nei 2 gruppi sperimentali.

### 1.7 Test di competizione con il ligando naturale

Ci siamo chiesti se l'effetto del trattamento con C398.4A fosse dovuto ad un effetto agonista di C398.4A su ICOS o piuttosto ad uno spiazzamento del ligando naturale (B7h), più attivo, e quindi ad un effetto simil-antagonista o parzialmente neutrelizzante.

Per questo ho allestito un test *in vitro* su cellule totali di milza di topi BALB-neuT di 12 settimane.

500.000 cellule per condizione sono state attivate in RPMI 10%FCS in presenza di anti-CD3 (11 o 1  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ ) per 48 h con i seguenti stimoli:

- 1) ctrl
- 2) C398.4A 1 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$
- 3) msB7h-hulg 1 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$
- 4) C398.4A 1 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  + msB7h-hulg 1 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$

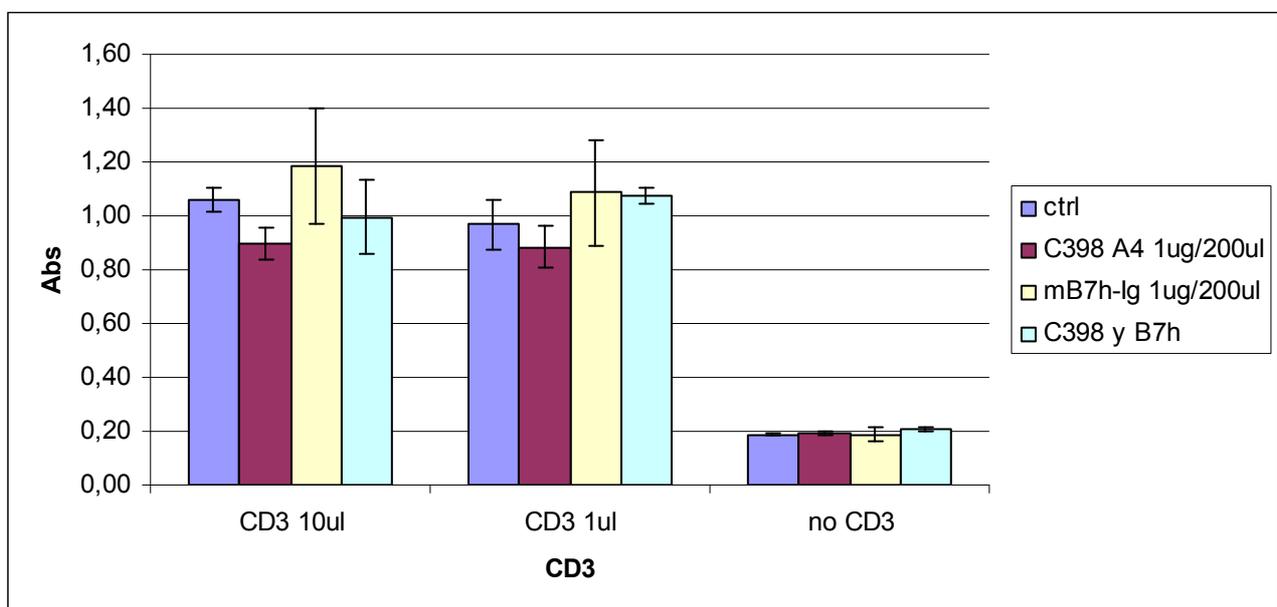


Fig 11

L'effetto è stato quantificato mediante MTT/formazano ovvero come attività mitocondriale. C398.4A sembra inibire l'attivazione indotta da anti-CD3, nonché l'effetto del ligando naturale msB7h-hulg (Fig 11).

## 2 - [BALB-neuT x ICOS KO C57BL/6] F1 (ICOS F1)

Lo scopo ultimo del lavoro e' quello di riuscire ad ottenere topi con genotipo Her2/neu +/- ICOS -/-.

Poichè i BALB-neuT sono ICOS +/+, nella prima generazione (F1), ottenuta incrociando maschi BALB-neuT con femmine ICOS KO, tutta la prole è ICOS +/-.

La proleF1 è stata ripartita per 3 utilizzi:

- alcune femmine Her2/neu +/- (indicate ICOSF1) sono state monitorate per tutto il corso della loro vita per valutare se la parziale assenza di ICOS potesse influenzare lo sviluppo dei tumori. Come controllo sono state utilizzate femmine HER2/neu +/- ICOS WT ottenute dall'incrocio di maschi BALB-neuT con femmine C57BL/6 WT (indicate B6F1)
- maschi HER2/neu +/- sono stati incrociati con femmine ICOS KO per ottenere F2 e spostare progressivamente il background neu su C57BL/6
- maschi Her2/neu +/- sono stati incrociati con femmine HER2/neu -/- della stessa nidiata per ottenere F2 (per differenziarla dalla precedente verrà indicata come F2h). Il progressivo incrocio tra fratelli permette, dopo circa 12 generazioni, di ottenere topi *inbred*, con uniformità fenotipica e genetica.

## 2.2- Settimana di comparsa del primo tumore

La parziale assenza di ICOS sembra ritardare la comparsa dei primi tumori palpabili. Ciò rispecchierebbe il risultato ottenuto su topi trattati con C398.4A, ammettendo un effetto parzialmente neutralizzante di tale anticorpo nei confronti del ligando naturale (Tab 10).

	<b>Mean</b>
<b>ICOS F1</b>	21,04
<b>B6 F1</b>	20,78
	<b>Median</b>
<b>ICOS F1</b>	21,00
<b>B6 F1</b>	20,00

Tab 10

## 2.3- Settimana di sacrificio

Non ci sono differenze rispetto all'età in cui è stato ritenuto necessario il sacrificio, Ciò suggerisce un appianamento delle differenze col progredire della tumorigenesi (Tab 11).

	<b>Mean</b>
<b>ICOS F1</b>	27,07
<b>B6 F1</b>	27,50
	<b>Median</b>
<b>ICOS F1</b>	27,50
<b>B6 F1</b>	27,50

Tab 11

## 2.4- Dimensioni dei tumori

La dimensione dei tumori è stata valutata in 2 modi. Nel primo caso è stata messa in relazione con il numero di tumori per topo(Figura 12, Tab 12)., mentre nel secondo con il numero totale di mammelle (10) (Fig 13, Tab 13)

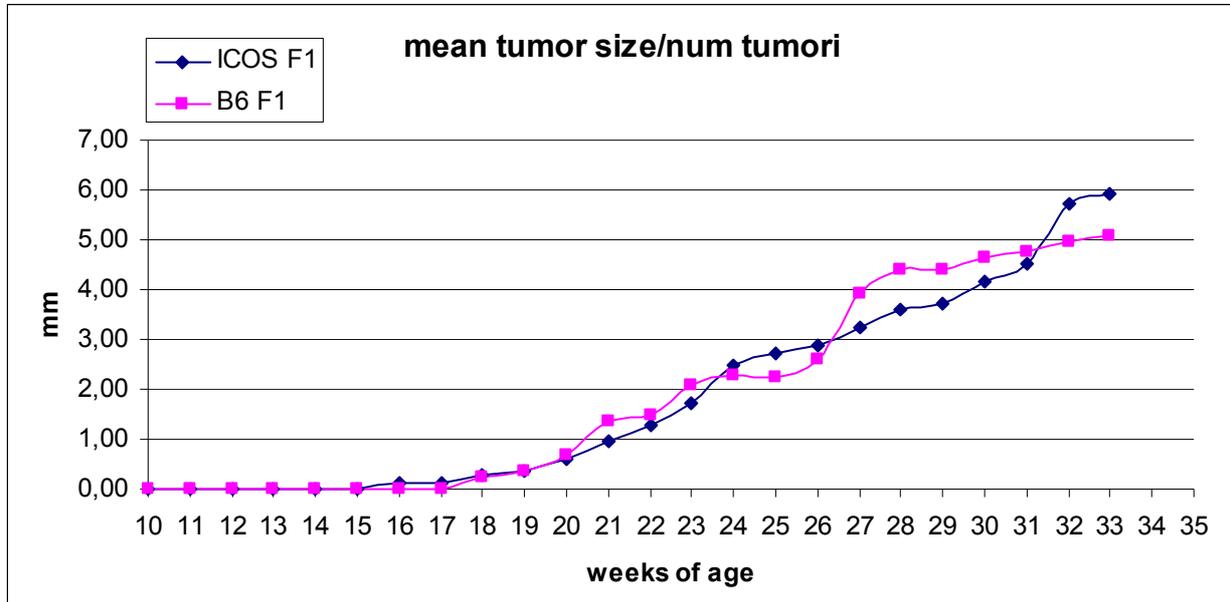


Fig 12

t test	p value
	0,58

Tab 12

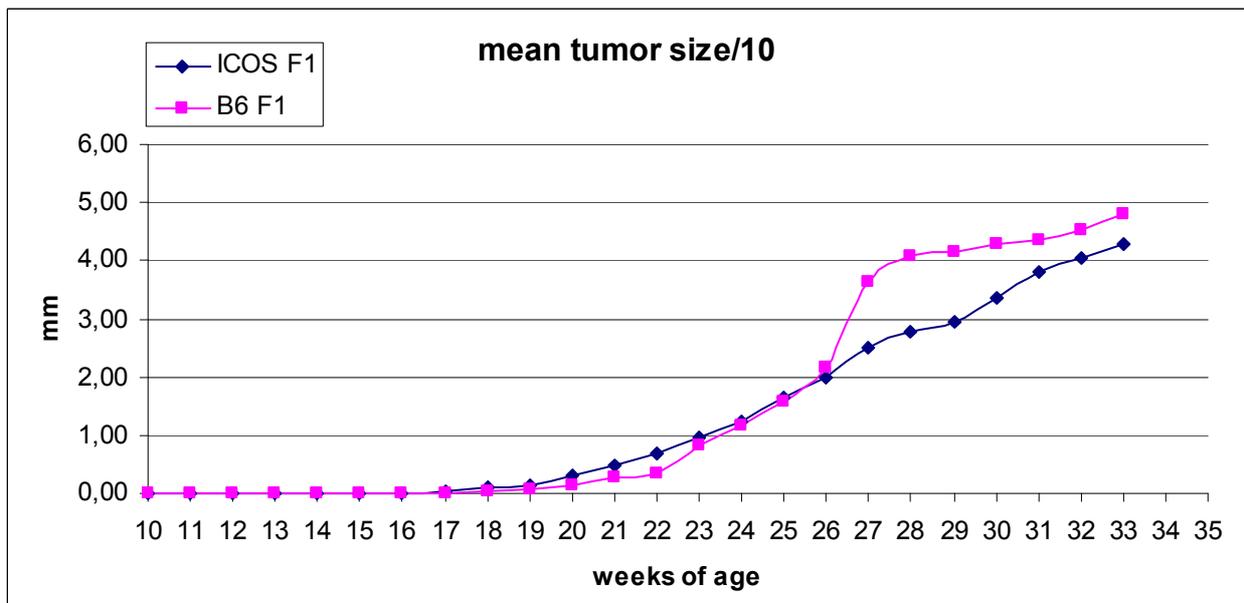


Fig 13

t test	p value
	0,042

Tab 13

Sembra notarsi una differenza significativa ( $p < 0,05$ ) solo analizzando le dimensioni dei tumori in relazione al numero totale di mamelle per topo. In particolare le femmine WT per ICOS (B6F1) sembrerebbero avere un forte incremento nello sviluppo dei tumori a partire dalla settimana 27 di vita, non registrato invece nelle femmine eterozigote per ICOS (ICOS F1)

## 2.5- Tumor multiplicity

A partire dalla settimana 24 di vita le femmine B6F1 mostrano un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) del numero di tumori rispetto alle ICOSF1 di pari età (Fig 14, Tab 14).

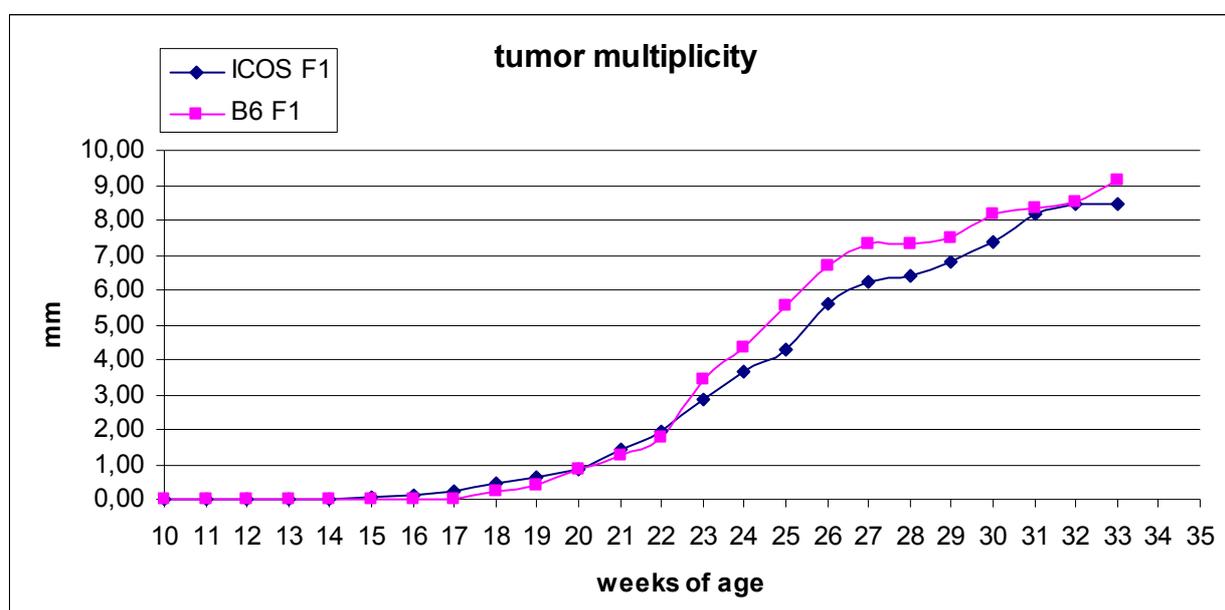


Fig 14

t test	p value
	0,0099

Tab 14

## 2.6- Percentuale di topi liberi da tumore

I topi ICOS F1 mostrano un ritardo nella comparsa dei tumori rispetto ai B6 F1. La differenza in numero di topi affetti da tumore per gruppo sperimentale è particolarmente accentuata tra la settimana 18 e la settimana 22 (Fig 15). Il ritardo nella comparsa dei tumori spiega la differenza significativa nel numero di tumori per topo riscontrato tra la settimana 23 e la settimana 30 (Fig 14, Tab 14).

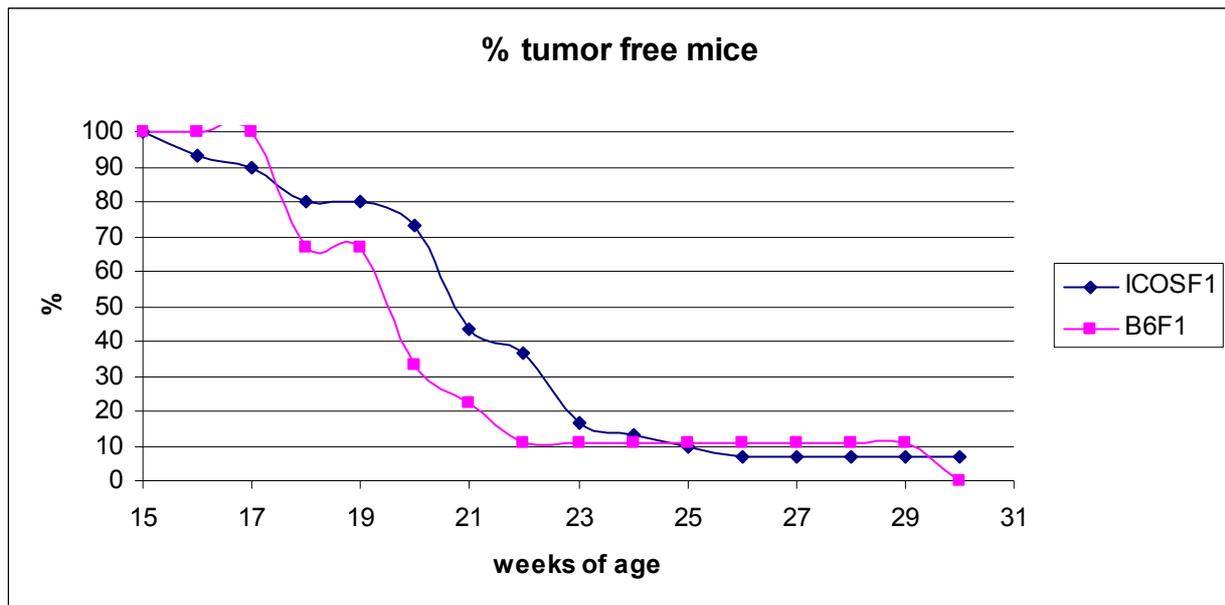


Fig 15

## 2.7 - Analisi citofluorimetriche

Sono state condotte analisi citofluorimetriche su cellule totali estratte da milza per valutare eventuali differenze tra topi ICOSF1 e B6F1 nell'espressione dei marcatori delle Treg (CD25 e FoxP3) ma non è stata notata nessuna differenza. Nemmeno la percentuale di NK sembra variare nei 2 gruppi sperimentali.

## 3 – [BALB-neuT x ICOS KO C57BL/6] F2 (ICOS F2)

Questo tipo di incrocio è stato la strategia inizialmente utilizzata per ottenere F2. Il problema incontrato però è stato l'elevata mortalità della prole tra la terza e la quinta settimana di vita per cause sconosciute: i topi in questione erano di dimensioni inferiori rispetto ai fratelli e il loro deperimento peggiorava fino alla morte (Tab. 15)

	%survival	% ♀ neu+
<b>F1 ICOS x ICOS KO</b>	42,94	8,59
<b>F1ICOSxB6</b>	32,43	16,22
<b>F1B6xB6</b>	37,04	5,56

Tab 15

Le femmine HER2/neu +/- ICOS -/- vengono monitorate durante tutta la vita per valutare la cinetica di sviluppo dei tumori in comparazione con le sorelle ICOS +/- e ICOS +/-.

I maschi sono stati eliminati. Attualmente non è stato ancora possibile genotipizzare con accuratezza i topi KO e quelli eterozigoti.

## 4 – [ICOSF1 neu+ x ICOS F1 neu-] F2h (ICOS F2h)

Per ottenere prole progressivamente *inbred* e per superare il problema dell'elevata mortalità dovuta all'incrocio tra BALB-neuT e ICOS KO C57BL/6, ho cominciato a incrociare fratelli e sorelle della F1. Tutti i nati sono sopravvissuti.

Le femmine Her2/neu +/- ICOS -/- vengono monitorate durante tutta la vita per valutare la cinetica di sviluppo dei tumori in comparazione con le sorelle ICOS +/+ e ICOS +/-.

Invece le femmine HER2/neu -/- ICOS -/- verranno incrociate con maschi HER2/neu +/- ICOS -/-, per varie generazioni per ottenere un *inbred* neu +/- ICOS -/-.

## Bibliografia

Antonia SJ, Seigne J, Diaz J, et al., *Phase I trial of a B7.1 (CD80) gene modified autologous tumor cell vaccine in combination with systemic interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma*. J Urol 2002 (167) 1995-2000

Baskar S, Ostrand-Rosenberg S, Nabavi N, Nadler LM, Freeman GJ, Glimcher LH, *Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules*. PNAS 1993 (90) 5687-90

Bhardwaj N., 2007. *Harnessing the immune system to treat cancer*. The journal of clinical investigation (117) 5, 1130-6.

Buonfiglio D., Bragardo M., Redoglia V., Vaschetto R., Bottarel F., Bonisconi S., Bensi T., Mezzatesta C., Janeway jr. CA., Dianzani U., 2000. *The T cell activation molecule H4 and CD28-like molecule ICOS are identical*. Eur.J.Immunol. (30) 3463-3467

Chan L, Hardwick NR, Guinn BA et al., 2006. *An immune edited tumor versus a tumor edited immune system: prospects for immune therapy of acute myeloid leukaemia*. Cancer Immunol Immunother 2006 (55) 1017-24

Chen D., Juedes AE., Temann UA, Shrestal S., Allison JP., Ruddle NH., Flavell RA., 2001. *ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function*. Nature (409) 97-101

Chen L., Ashe S., Brady WA, et al., *Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA4*. Cell 1992 (71) 1093-1102

Guerra N., Tan Y.X., Joncker N.T., Choy A., Gallardo F., Xiong N., Knoblaugh S., Cado D., Greenberg N.R., Raulet D.H., *NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy*, 2008. Immunity (28): 571-580

Koebel C.M., Vermi W., Swann J.B., Zerafa N., Rodig S.J., Old L.J., Smyth M.J., Schreiber R.D., *Adaptative immunity mantains occult cancer in an equilibrium state*. Nature (450) 6-

dec-07; Swann J.B., Smyth M.J., *Immune surveillance of tumors*. The Journal of clinical investigation, 2007. 117 (5) 1137-46

Kryczek I., Wei S, Zou L., Altuwaijri S., Szeliga W., Kolls J. Chang A., Zou W., 2007. *Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment*. The Journal of Immunology, 178: 6730-3

Liu X, Bai XF, Wen J, et al., *B7h costimulates clonal expansion of, and cognate destruction of tumor cells by, CD8+ T lymphocytes in vivo*. J Exp Med 2001 (194) 1339-48  
Ljunggren H.G., *Cancer immunosurveillance: NKG2D breaks cover*, 2008. Immunity (28): 492-494

Mackie R.M., Reid R., Junor B., 2003. *Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery*. N.Engl.J.Med. 348, 567-8

McCarthy N., 2008. *Stalemate*, Nature Reviews Immunology, vol 8

Muller WJ, Sinn E., *Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene*, 1988. Cell (54) 105–115.

Nagaraj S., Gupta K., Pisarev V., Kinarsky L., Sherman S., Kang L., Herber D.L., Schneck J., Gabilovich D.I., *Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cells tolerance in cancer*. Nature Medicine, 13 (7) 2007, 828-835

Nakamura Y., Watchmaker P., Urban J., Sheridan B., Giermasz A., Nishimura F., Sasaki K., Cumberland R., Muthuswamy R., Mailliard R.B., Larregina A.T., Falo L.D., Gooding W., Storkus W.J., Okada H., Hendricks R.L., Kalinski P., 2007. *Helper function of memory CD8+ T cells: heterologous CD8+ T cells support the induction of therapeutic cancer immunity*. Cancer Res. 67 (20): 10012-8

Pannellini T., Forni G., Musiani P., 2004. *Immunobiology of Her-2/Neu Transgenic Mice*, Breast disease 20: 33-42

Prendergast G.C., Jaffee E.M., *Cancer immunologists and cancer biologists: why didn't talk then but need to now*. *Cancer Res.* 2007; 67 (8) 3500-4.

Raez LE, Cassileth PA, Schlesselman JJ, et al, *Allogenic vaccination with B7.1 HLA-A gene-modified adenocarcinoma cell line in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. *J clin Oncol* 2004 (22) 2800-7

Strid, J., Roberts, S.J., Filler, R.B., Lewis, J.M., Kwong, B.Y., Schpero, W., Kaplan, D.H., Hayday, A.C., Girardi, M., 2008. *Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis*. *Nature immunology* 9 (2) 146-154

Swann J.B., Smyth M.J., *Immune surveillance of tumors*. *The Journal of clinical investigation*, 2007. 117 (5) 1137-46

Tirapu I, Huarte E, Guiducci C, et al., *Low surface expression of B7.1 (CD80) in an immunoescape mechanism of colon carcinoma*. *Cancer Res* 2006 (66) 2442-50

Townsend S.E., Allison J.P., *Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells*. *Science* 1993 (259) 368-70

Wallin JJ, Liang L, Bakardjiev A, Sha WC, *Enhancement of CD8+ T cell responses by ICOS/B7h costimulation*. *J. Immunol.* 2001 (167) 132-9

Zang X., Allison J.P., *The B7 Family and cancer therapy: costimulation and coinhibition*, *Clin. Cancer Res.* 2007, 13 (18): 5271-9

## **ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA 2007-2008**

### **Seminari seguiti:**

LINFOCITOS T REGULADORES EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES. EFECTO DE AGENTES BIOLÓGICOS Y DE MOLÉCULAS INHIBIDORAS.

Dr Roberto González-Amaro

13 settembre 2007

ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA RAS EN LINFOCITOS T

Dr Juan Serrador

19 settembre 2007

PAPEL DE PI3K EN DIVISIÓN CELULAR

Dra Ana Carrera

27 settembre 2007

REGULACIÓN DE LA ADHESIÓN Y LA MIGRACIÓN DE FIBROBLASTOS, LINFOCITOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS POR WIP (WASP INTERACTING PROTEIN)

Dra Inés M. Antón

3 ottobre 2007

SIGNALLING MECHANISMS OF THE INTEGRIN TYPE COLLAGEN RECEPTORS

Dr Jyrki Heino

10 ottobre 2007

VITAMINA D, Wnt, Snail Y CÁNCER DE COLON

Dr Alberto Muñoz

25 ottobre 2007

ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA INTERACCIÓN LINFOCITO-ENDOTELIO MEDIADA POR Eph Y Ephrin DE LA FAMILIA A

Dr Luis Miguel Alonso Colmenar

15 novembre 2007

ONCOLOGÍA TRASLACIONAL: LA COLINA QUINASA COME NUEVO MARCADOR TUMORAL Y DIANA TERAPEUTICA EN CÁNCER

Dr Juan Carlos Lacal

21 novembre 2007

REGULACIÓN DE LA TUMORIGENESIS POR p38MAPK

Prof. Angel Nebreda

28 novembre 2007

CCR6

Dra Rosa Varona.

29 novembre 2007

Respuesta de las células T-CD8+ a macrófagos inducidos por vías fagocíticas o no fagocíticas

Dra. Isabel M. Olazábal

14 febbraio 2008

Señalización dependiente de Rap1 e invasión de células tumorales por quimioquina.

Dr. Pablo Hernández-Varas

13 marzo 2008

Macrófagos e inflamación: el bueno, el feo y el malo

Antonio Celada

14 marzo 2008

Función de Notch en la generación de las células madre hematopoyéticas en el embrión de ratón

Dra. Anna Bigas

27 marzo 2008

Funcion de APRIL sobre los linfocitos B. Implicaciones en patología

Dra. Lourdes Planelles

27 marzo 2008

Participación de quimioquinas homeostáticas en procesos inflamatorios: El modelo SDF1/CXCR4 en la Artritis Reumatoide

Dr. José Luis Pablos

17 aprile 2008

## *Partecipazione a congressi*

1) Variation of the perforin gene in patients with autoimmune disease

Seren-Bernardone I., Chiocchetti A., Orilieri E., Cappellano G., Comi C. and Dianzani U.

EMBO workshop: Citotoxicity, cell death and the immune system, 17-20 september 2008, Zaragoza, Spain

Comunicazione orale.

2) Interacciones moleculares de ICOS (Inducible COStimulator, CD278): estudio proteómico y funcional.

Saez de Guinoa J., Zafra MP., Seren-Bernardone I., Portolés P., Rojo JM.

XXXIV Congreso Nacional Sociedad Española de Inmunología (SEI), 21-24 mayo 2008, Palma de Mallorca, España.

Poster