

Immunoreattività e carcinoma renale*

Vanessa Proserpio¹, Manuela Beretta¹, Clizia Chinello², Monica Soldi¹, Natalia Tiberti¹, Francesca Raimondo², Cristina Bianchi², Stefano Ferrero³, Stefano Casellato⁴, Fulvio Magni², Cecilia Sarto¹, Paolo Mocarrelli¹, Paolo Brambilla^{1,2}

¹Servizio Universitario di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Desio (MI)

²Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università Milano-Bicocca, Monza (MI)

³Servizio di Anatomia Patologica, Ospedale San Paolo, Milano

⁴Istituto di Urologia, Ospedale Maggiore di Milano IRCCS, Milano

ABSTRACT

Immunoreactive proteins in renal cell carcinoma. Renal cell carcinoma (RCC) represents the most common tumor affecting the adult kidney and is characterised by a variety of histological subtypes. Several molecules, such as proteins involved in the cell cycle, apoptosis, and cell-cell interaction, have been investigated, but unfortunately none of these has been validated as an ideal biomarker. During spontaneous remissions it has been shown that the immune system of cancer patients is activated against specific tumor antigens that might represent new potential biomarkers. In this study we applied a serological proteomic-based approach (SERPA) to identify tumor antigens that induce a humoral immune response in RCC. Protein patterns derived from RCC cases were separated by two-dimensional electrophoresis and western blot. Tumor antigens were immunodetected using autologous and healthy donor sera as primary antibodies. The analysis of immunoreactive spots from normal and RCC tissues pointed out 14 spots that immunoreacted with sera of at least three patients. None of these protein spots were immunoreactive with the healthy donor sera. Among these proteins, identified by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, vimentin and lamin A/C were already found immunoreactive in RCC and in other cancer. They might be useful as diagnostic and therapeutic targets for RCC and could represent new tools for clinical use.

INTRODUZIONE

Il carcinoma renale (RCC) rappresenta circa il 3% delle neoplasie maligne dell'adulto e il 90% di tutti tumori del rene con un'incidenza in continuo aumento (1, 2). Lo sviluppo asintomatico della malattia e la mancanza di marcatori sierologici specifici per RCC implicano che un terzo dei casi venga diagnosticato quando la malattia è già allo stadio metastatico. Benché il carcinoma renale possa essere curato con la chirurgia, la malattia metastatica è resistente alla chemioterapia citotossica e quindi difficile da trattare. Attualmente il trattamento sistemico più promettente per il carcinoma renale sembra essere l'immunoterapia; questo tipo di approccio terapeutico, sul quale sono in corso numerosi studi, è avvalorato dal possibile ruolo svolto dal sistema immunitario dell'ospite nella regolazione della crescita tumorale e suggerito dal riscontro di occasionali regressioni spontanee. Poiché il sistema immunitario è potenzialmente in grado di riconoscere e distruggere cloni di cellule trasformate prima che possano crescere, l'obiettivo primario della terapia immunologica è sfruttare e potenziare le risposte nei confronti

di specifiche sequenze peptidiche, di modificazioni post-traduzionali o di prodotti di geni mutati (3).

Nell'era post-genomica è ragionevole supporre che nuove strategie proteomiche possano essere impiegate nello studio del RCC per l'identificazione di marcatori da usare sia per la diagnosi che per la terapia dei pazienti affetti da tale tumore. Combinando l'approccio sperimentale proteomico con l'analisi sierologica, la tecnica SERPA ("SERological Proteome Analysis") consente di individuare proteine che hanno indotto una risposta anticorpale nei pazienti affetti da RCC (4). Di conseguenza, l'identificazione di antigeni tumorali mediante autoanticorpi sierici dei pazienti potrebbe fornire un set di molecole utilizzabili come potenziali nuovi target terapeutici e/o come biomarcatori diagnostici e prognostici, utili anche per meglio comprendere la fisiopatologia della comparsa e della crescita del RCC.

In questo lavoro, abbiamo scelto di utilizzare la tecnica SERPA per individuare autoanticorpi prodotti da pazienti affetti da RCC. Le proteine, estratte da RCC e da tessuto renale sano adiacente al tumore, sono state separate mediante elettroforesi bidimensionale (2D-

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 40° Congresso Nazionale SIBioC, 28-31 ottobre 2008, Rimini, sotto forma di poster (*Biochim Clin* 2008;32:463), ricevendo, nella persona del suo primo autore (M. Beretta), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

PAGE) ed in seguito trasferite su membrana di polivinilidenefluoruro (PVDF) per le successive analisi. L'indagine sierologica è stata effettuata ibridando le proteine tumorali, trasferite su PVDF, con siero dello stesso paziente (siero autologo) prelevato immediatamente prima dell'intervento chirurgico e, dopo "stripping", con pool di sieri di donatori sani. Analogamente, si è scelto di ibridare le proteine ottenute dal tessuto sano, con lo scopo di escludere quelle immunoreattive in condizioni fisiologiche ed evidenziare solo quelle in grado di suscitare una risposta umorale specifica verso il tumore.

MATERIALI E METODI

Reagenti

"Roswell Park Memorial Institute medium" (RPMI) 1640 addizionato con inibitori delle proteasi (fenilmetil-sulfonilfluoruro, leupeptina, benzamidina), urea, tiourea, 3-[(3colamidopropil) dimetilammonio]-1-propano-sulfonato (CHAPS), ditioeritrolo, iodoacetamide, tween 20, Tris e glicina sono stati acquistati da Sigma; metanolo, glicerolo, NaCl, KCl, Na₂PO₄ da Merck; sodio dodecilsolfato da Fluka Biochemika; acrilamide 2X e agarosio da Serva; Zwittergent 3-10 da Calbiochem. Membrane PVDF, ammonio persolfato e il colorante per gel flamingo sono stati forniti da BioRad; Immobiline DryStrips da Pharmalyte, Ecl plus da GE Healthcare; Sypro Ruby "blot stain" da Invitrogen; anticorpi di coniglio anti-IgG umane coniugati con perossidasi di rafano da Dako.

Campioni

Sono stati arruolati, previo consenso informato, 13 pazienti (9 maschi e 4 femmine) affetti da RCC e sottoposti a nefrectomia presso il Policlinico di Milano. Nessuno di essi era stato in precedenza sottoposto a chemioterapia antitumorale. I tumori sono stati classificati dal punto di vista istologico in base alle raccomandazioni WHO (5,6): 12 erano a cellule chiare ed uno cromofilo. Lo stadio ed il grado dei tumori sono riportati nella Tabella 1 (7).

Immediatamente dopo la nefrectomia porzioni rappresentative di tessuto sano e tumorale sono state poste in RPMI contenente inibitori delle proteasi e trasferiti al laboratorio. Da ogni paziente arruolato, sono stati inoltre raccolti campioni di sangue immediatamente prima della nefrectomia. Tali campioni sono stati centrifugati per la separazione del siero e conservati a -80 °C. Sono stati anche raccolti campioni di sangue da 6 donatori sani (tre uomini e tre donne).

Elettroforesi bidimensionale

Sono stati utilizzati 500 µg di proteine per "immobilized pH gradient" (IPG)-strip da 7 cm con gradiente di pH non lineare 3-10 per la prima dimensione (isoelettrofocalizzazione). Le proteine sono state concentrate con il sistema Microcon, prima della reidratazione in gel della striscia. La migrazione delle proteine in prima dimensione (in base al pI) era ottenuta nella camera di migrazione Multiphor II (GE Healthcare), applicando un voltaggio

di 10 kV totali in 4,5 ore ad una temperatura costante di 18 °C. Al termine della corsa le strisce erano messe per 12 min in un primo tampone di equilibratura (urea 6M, glicerolo 30% v/v, sodio dodecil-solfato (SDS) 2% w/v, Tris-HCl 50 mM, a pH 8,4) contenente ditioeritrolo, e successivamente per 5 min nello stesso tampone di equilibratura contenente iodoacetamide. La seconda dimensione è stata eseguita su gel al 12% di poli(acrilamide/piperazine diacrilamide) (PDA) utilizzando l'apparato Mini-Protean II (BioRad) a 100 V per 2 ore circa.

Immunoblotting

Le proteine separate in 2-D PAGE sono state trasferite su membrane PVDF, dopo aver equilibrato per 30 min nel tampone di transfer (glicina 1,44% w/v, Tris 0,3% w/v, metanolo 20% v/v) sia i gel che le membrane PVDF. E' stato utilizzato l'apparato Mini Trans-Blot (BioRad) e il trasferimento è avvenuto in immersione applicando una corrente costante (1 mA/cm²) per 3 ore con Mini-Protean II. Per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine, le membrane sono state colorate con Sypro Ruby "blot stain" e le immagini acquisite mediante lo scanner Typhoon 9400 (GE Healthcare) equipaggiato di laser verde (532 nm)/610BP30. A questo punto le membrane sono state poste nella soluzione di "blocking" [10% w/v latte in polvere scremato in tampone fosfato salino (PBS)-tween 20] per 2 ore a temperatura ambiente dopo essere state equilibrate 5 min in PBS-tween 20 pH 7,2; successivamente, esse sono state incubate "overnight" a 4 °C con il siero autologo diluito 1:50 in una soluzione di PBS, tween 20 e latte in polvere scremato (1% w/v). L'anticorpo secondario (anti-IgG umane di coniglio coniugate con perossidasi di rafano) è stato diluito 1:1000 in PBS-tween 20 e latte (1% w/v) e le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente,

Tabella 1

Casi arruolati con tipo istologico, stadio tumorale e grado

Paziente	Tipo istologico	Stadio	Grado
1	RCC-cellule chiare	T1- Nx	3
2	RCC-cellule chiare	T1- Nx	2
3	RCC-cellule chiare	T2 - Nx	2
4	RCC-cellule chiare	T1 - Nx	2
5	RCC-cellule chiare	T1 - N0	2
6	RCC-cellule chiare	T1 - N0	2
7	RCC-cellule chiare	T2 - N0	3
8	RCC-cellule chiare	T1- N0	2
9	RCC cromofilo	T1- N0	2
10	RCC-cellule chiare	T1 - Nx	2
11	RCC-cellule chiare	T1 - N0	3
12	RCC-cellule chiare	T1 - Nx	2
13	RCC-cellule chiare	T'3 - Nx*	2

*RCC, carcinoma renale; Nx, linfonodi regionali non valutabili. *sviluppo di metastasi polmonari 3 anni dopo la nefrectomia.*

prima di aggiungere la soluzione chemiluminescente (ECLTM PLUS: soluzione A e soluzione B in rapporto 40:1) per 5 min. Le immagini derivate da immunoblot sono state acquisite con lo scanner Typhoon 9400 (laser blu 457 nm/520PB40) e analizzate con l'ausilio del "software" Image Master 2D Platinum 6.01 (GE Healthcare). L'immunoblotting con il siero dei donatori sani è stato effettuato seguendo la stessa procedura, dopo aver trattato le membrane per 30 min a 50 °C con la soluzione di "stripping" (ditioeritolo 3% w/v, SDS 2% w/v, Tris-acido acetico pH 6,7) per eliminare l'ibridazione precedentemente effettuata.

Identificazione proteica

Le macchie proteiche di interesse sono state escisse dal gel preparativo mediante la piattaforma Ettan Spot Picker (GE Healthcare). Le proteine, dopo digestione triptica, sono state sottoposte ad analisi in spettrometria di massa con lo strumento Bruker Reflex IV MALDI. Gli spettri sono stati analizzati con i "software" X-TOF e Biotoools e l'identificazione proteica è stata effettuata utilizzando il programma Mascot (www.matrixscience.com) che effettua ricerche nelle banche dati proteiche Swiss-Prot (accessibile da www.expasy.org) e NCBIInr (www.ncbi.nlm.nih.gov).

RISULTATI

Dopo l'analisi delle immagini delle membrane SERPA è stato possibile evidenziare per ogni paziente con RCC quattro gruppi di proteine immunoreattive:

1. autoantigeni del tessuto sano riconosciuti da siero autologo;
2. autoantigeni del tessuto sano riconosciuti da siero di donatori sani;
3. autoantigeni del tessuto tumorale riconosciuti da siero di donatori sani;
4. autoantigeni del tessuto tumorale riconosciuti da siero autologo.

Le proteine immunogene identificate nei diversi gruppi sono state confrontate tra loro: quelle appartenenti ai gruppi 1, 2, e 3 e comuni con il gruppo 4 sono state escluse dall'analisi. In questo modo è stato possibile identificare esclusivamente gli autoantigeni tumorali verso i quali solo i pazienti affetti da neoplasia sviluppano una risposta anticorpale. Nella Figura 1 sono evidenziate su una membrana SERPA le 14 proteine riconosciute dal siero dei pazienti affetti da RCC unicamente nel tessuto tumorale e risultate immunoreattive in almeno tre campioni su 13. Tali spot sono state escisse da un gel bidimensionale preparativo ed analizzate con tecnologia MALDI-TOF, che ha portato all'identificazione di 10 proteine mediante "peptide mass fingerprint" (Tabella 2). In particolare, nelle macchie 237, 202, 322 e 208 comigravano due diverse proteine. Inoltre, sono state individuate tre isoforme di fibrinogeno catena β , 4 di lamin A/C, due di collagene catena α -1(VI) e due di collagene α -3(VI), mentre la spot 362 non era identificata probabilmente perché la quantità di proteina era inferiore al limite di rilevamento dello strumento.

DISCUSSIONE

L'eterogeneità istopatologica, genetica e clinica, la mancanza di marcatori specifici e la chemio-radioresistenza rendono il RCC un tumore difficile da diagnosticare precocemente e da trattare con efficacia. La creazione di profili trascrizionali ha permesso di individuare specifici set genici deregolati, ma spesso presenta il limite di non riconoscere isoforme proteiche con modificazioni post-traduzionali. L'immunoproteomica, combinando tecniche proteomiche e sierologiche, è volta all'individuazione ed all'identificazione di antigeni tumorali capaci di attivare il sistema immune dell'ospite a produrre anticorpi. Le procedure analitiche disponibili comprendono le classiche metodiche "gel-based" (SERPA) e le più innovative "gel-free" ("protein microarrays"), che sono state utilizzate per studiare la risposta immunitaria in vari tipi di patologie neoplastiche, come il cancro del colon, del polmone, della mammella e delle ovaie (8-11). Lo studio dell'immunoreattività tumorale, grazie all'individuazione di proteine "aberranti", sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo, potrebbe rivelarsi uno strumento utile alla comprensione del comportamento biologico dei tumori e rappresentare inoltre una valida alternativa all'approccio proteomico classico per individuare nuovi marcatori biologici (12). L'identificazione di biomarcatori potrebbe consentire sia lo sviluppo di indagini diagnostiche rapide e non invasive, che la ricerca di nuovi approcci terapeutici specifici e selettivi, basati sull'utilizzo di vaccini o anticorpi monoclonali.

Nel nostro studio, l'analisi differenziale degli autoanticorpi presenti nel siero dei pazienti e di donatori sani, diretti contro proteine derivate da tessuto renale sano e da RCC, ha portato all'identificazione di 10 proteine immunoreattive. Non siamo stati in grado di evidenziare una singola proteina che abbia stimolato la produzione di autoanticorpi in tutti i 13 pazienti arruolati, che, al contrario, hanno complessivamente mostrato una risposta immunitaria non omogenea probabilmente a causa della diversa suscettibilità individuale agli antigeni, già riporta-

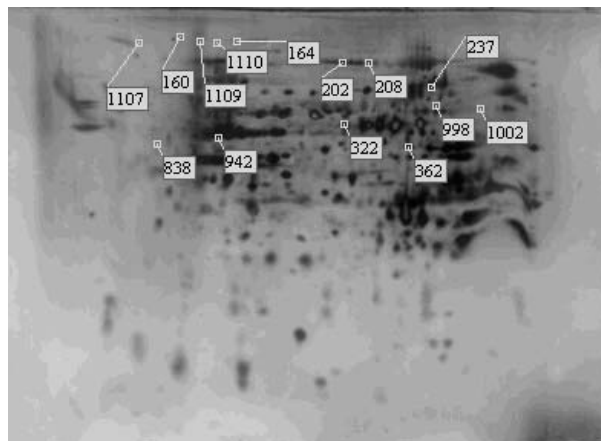


Figura 1

Immagine di una membrana SERPA con tessuto tumorale ibridato con siero autologo. Le etichette mostrano le spot immunoreattive specifiche.

Tabella 2*Proteine identificate nelle spot immunoreattive specifiche*

N° spot	Numero seriale	Δ PM	Δ pl	Proteina	Score	Coverage
1110	P05783	41637	0	Cheratina citoscheletrica 18	64	18%
237	P02675	4389	-1,62	Fibrinogeno catena β (precursore)	205	46%
	P02545	-13822	-0,35	Lamin A/C	65	26%
942	P02675	-7929	-3,36	Fibrinogeno catena β (precursore)	64	26%
838	P08670	-6458	-0,52	Vimentina	161	33%
1107	P12109	-16957	-0,87	Collagene VI catena α -1	66	13%
160	P12109	-16004	-0,41	Collagene VI catena α -1	59	10%
1109	P12111	-251980	-1,29	Collagene VI catena α -3	101	10%
164	P12111	-252923	-1,12	Collagene VI catena α -3	58	4%
202	P02545	3451	-0,81	Lamin A/C	135	27%
	Q8TBZ8	13855	-3,23	Zinco-proteina 564	63	17%
322	P02675	-6277	-2,78	Fibrinogeno catena β	70	20%
	P11310	3063	-2,85	Acil-CoA deidrogenasi mitocondriale, catena media	61	20%
362	-	-	-	Nessuna identificazione	-	-
998	P02545	-19645	0,38	Lamin A/C	94	22%
208	P02545	2652	-0,73	Lamin A/C	184	35%
	Q99798	-8634	-1,52	Aconitato idratasi	58	14%
1002	P42765	12111	-0,67	3-Chetoacil-CoA tiolasi	98	21%

Δ PM, differenza PM sperimentale-teorico; Δ pl, differenza pl sperimentale-teorico.

"Score" indica la probabilità statistica di corretta identificazione (più è elevato, più l'identificazione è corretta); "Coverage" indica la percentuale di copertura della sequenza amminoacidica.

ta in letteratura (13,14). Sono quindi state selezionate per l'identificazione solo le macchie risultate immunoreattive in almeno tre pazienti su 13.

Tra le proteine immunoreattive è stata identificata la lamin A/C, un membro della famiglia di proteine dei filamenti intermedi, che contribuisce sia al sostegno del citoscheletro che alla trasduzione del segnale meccanico dalla membrana plasmatica al nucleo. Secondo Willis et al., in condizioni neoplastiche la lamin A/C potrebbe essere coinvolta nella perdita di adesione cellulare favorendo il potenziale invasivo del tumore (15). L'immunogenicità di questa proteina è stata riconosciuta, sempre mediante SERPA, anche in uno studio condotto su carcinoma epatocellulare (16). Nel nostro studio lamin A/C è stata identificata come unica proteina nella spot 998 e con altre specie proteiche con cui è comigrata nelle spot 202, 208 e 237. L'immunoreattività verso 4 diverse isoforme di lamin A/C suggerisce che proprio questa proteina sia antigenica nel tumore e che le sue modificazioni post-traduzionali possano essere alla base della immunogenicità.

Un'altra proteina citoplasmatica strutturale di interesse è la vimentina, una proteina facente parte della famiglia dei filamenti intermedi del citoscheletro e coinvolta nella motilità cellulare. Kellner et al. hanno dimostrato un'associazione tra l'aumentata espressione di questa proteina e RCC a cellule chiare (17). Altri studi condotti sul cancro del colon suggeriscono che tale proteina svolga un ruolo chiave nel meccanismo di progressione tumorale (18). La capacità della vimentina di scatenare una risposta anticorpale nei pazienti affetti da RCC conferma ancora una volta un suo coinvolgimento in questa patologia.

L'analisi dettagliata dei "pathways" cellulari in cui sono coinvolte le proteine identificate in questo studio e la loro validazione è tuttora in corso. Inoltre, è fondamentale proseguire lo studio includendo l'ibridazione degli stessi campioni proteici con il siero dei pazienti raccolto mesi dopo l'intervento chirurgico per valutare come si modifica la risposta anticorpale una volta eliminato lo stimolo neoplastico. Infine, l'elevata eterogeneità di risposta individuale in RCC indica che per indagini di caratte-

re diagnostico e prognostico sarebbe forse più opportuno creare un pannello costituito da più antigeni piuttosto che focalizzare l'attenzione su singole proteine.

BIBLIOGRAFIA

1. McLaughlin JK, Lipworth L. Epidemiologic aspects of renal cell cancer. *Semin Oncol* 2000;27:115-23.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
3. Hanada K, Yewdell JW, Yang JC. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 2004;427:252-6.
4. Klade CS. Proteomics approaches towards antigen discovery and vaccine development. *Curr Opin Mol Ther* 2002;4:216-23.
5. Mostofi FK, Davis CJ. Histological typing of kidney tumours. In: *International histological classification of tumours*. 2nd ed. World Health Organization. Berlin: Springer; 1998:3-12.
6. Mostofi FK, Davis CJ. Histological typing of kidney tumours. In: *International histological classification of tumours*. 2nd ed. World Health Organization. Berlin: Springer; 1998:43-55.
7. Farrow GM, Murphy WM, Beckwith JB, eds. *AFI Atlas of tumor pathology*. Washington DC: AFI Press, 1994:1-192.
8. He Y, Wu Y, Mou Z, et al. Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor associated antigen in colorectal cancer. *Proteomics Clin Appl* 2007;1:336-42.
9. Yang F, Xiao ZQ, Zhang XZ, et al. Identification of tumor antigens in human lung squamous carcinoma by serological proteome analysis. *J Proteome Res* 2007;6:751-8.
10. Hamrita B, Chahed K, Kabbage M, et al. Identification of tumor antigens that elicit a humoral response in breast cancer patients' sera by serological proteome analysis (SERPA). *Clin Chim Acta* 2008;393:95-102.
11. Gagnon A, Kim JH, Schorge JO, et al. Use of a combination of approaches to identify and validate relevant tumor-associated antigens and their corresponding autoantibodies in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008;14:764-71.
12. Mou Z, He Y, Wu Y. Immunoproteomics to identify tumor-associated antigens eliciting humoral response. *Cancer Lett* 2009;278:123-9.
13. Unwin RD, Harnden P, Pappin D, et al. Serological and proteomic evaluation of antibody responses in the identification of tumor antigens in renal cell carcinoma. *Proteomics* 2003;3:45-55.
14. Seliger B, Menig M, Lichtenfels R, et al. Identification of markers for the selection of patients undergoing renal cell carcinoma-specific immunotherapy. *Proteomics* 2003;3:979-90.
15. Willis ND, Cox TR, Rahman-Casan SF, et al. Lamin A/C is a risk biomarker in colorectal cancer. *PLoS ONE* 2008;3:e2988.
16. Li L, Chen S, Yu C, et al. Identification of hepatocellular carcinoma-associated antigens and autoantibodies by serological proteome analysis combined with protein microarray. *J Proteome Res* 2008;7:611-20.
17. Kellner R, Lichtenfels R, Atkins D, et al. Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics* 2002;2:1743-51.
18. Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, et al. Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer. *Brit J Cancer* 2007;96:986-92.