

XXII CONGRESSO
AIRO
ROMA 2012
17-20 novembre
Ergife Palace Hotel



L'autofagia cellulare come potenziale target terapeutico nel Glioblastoma

Paolo Tini*

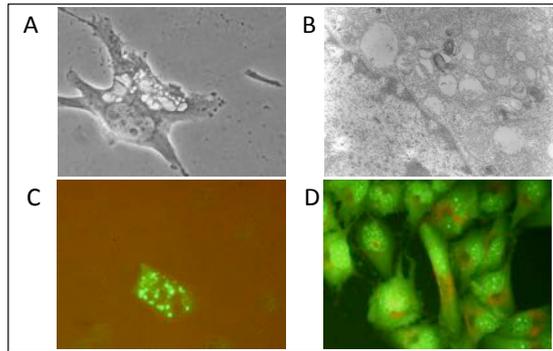
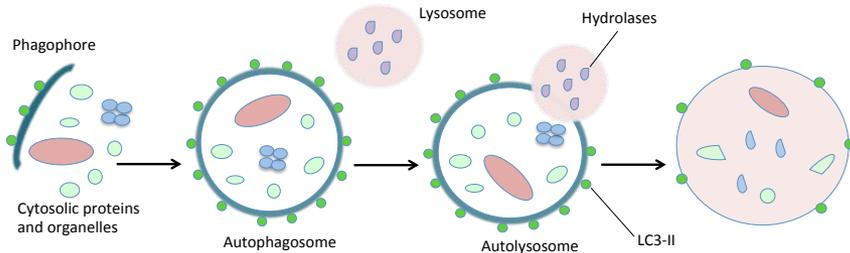
Con la collaborazione di: Silvia Palumbo§, Gabriele Cevenini*, Clelia Miracco*, Sergio Comincini§, Luigi Pirtoli*

**Università ed AOU, Siena, Dip. di Patologia Umana ed Oncologia.*

§Università di Pavia, Laboratorio di Oncogenomica Funzionale,

Dip. Di Genetica e Microbiologia.

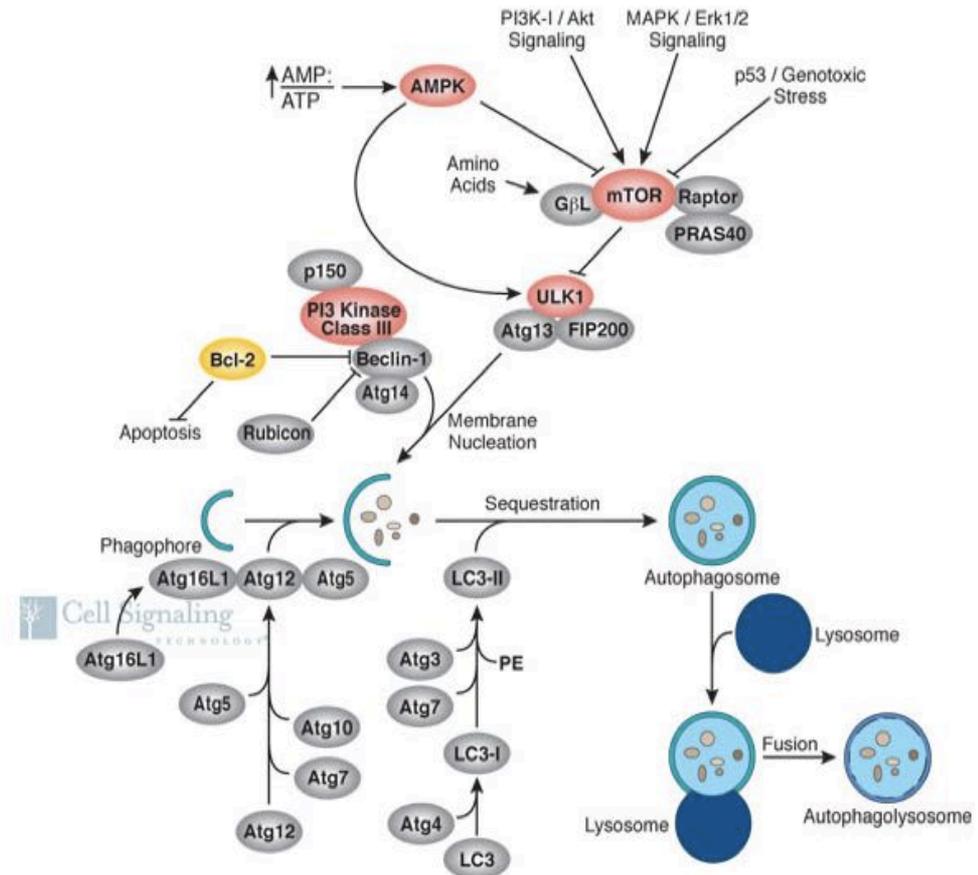
Autofagia cellulare



Autophagy: a phylogenetic-preserved mechanism devoted to degrade long-lived proteins, and cytoplasmic organelles could act as:

1) **a pro-survival mechanism**

2) **a pro-death mechanism (the so-called Type II programmed cell death [PCD], or autophagy-associated PCD)**



Autofagia e Cancro

Iniziazione e promozione tumorale:

- Tumor suppressor activity (prevention of tumorigenesis)

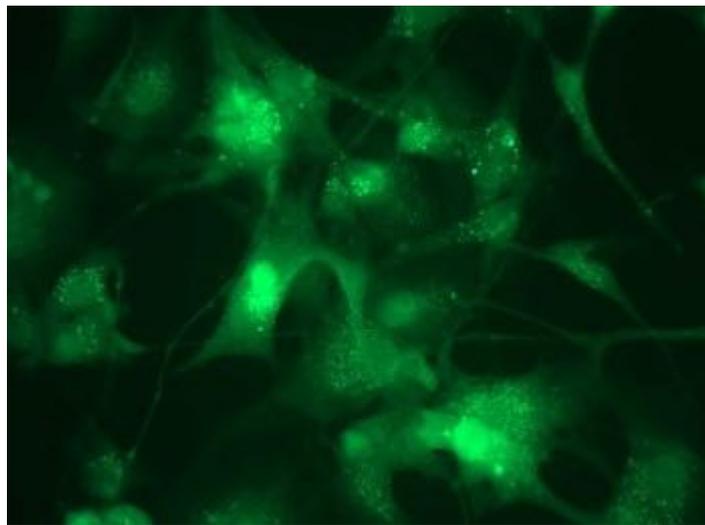
Risposta al trattamento

(molti agenti terapeutici agiscono sull'autofagia):

- Tumor survival activity (resistance to treatment)
- Tumor cell death mechanism (response to treatment)

Autofagia nei Gliomi

Nell'ultima decade è cresciuto molto l'interesse per il ruolo che l'autofagia cellulare riveste nella tumorigenesi dei gliomi cerebrali e nei meccanismi di risposta al trattamento radio-chemioterapico



Autofagia nei Gliomi

Tumorigenesi

I livelli espressivi *in vivo* di molecole regolatorie del processo di autofagia cellulare (Beclin1 e LC3B-II) sembrano essere più bassi nei gliomi alto grado rispetto ai gliomi di basso grado o al tessuto cerebrale sano, definendo l'ipotesi che una riduzione dell'attività autofagica sia legata all'acquisizione di fenotipi neoplastici più aggressivi.

Miracco 2007

Huang 2010

Nei gliomi di alto grado bassi livelli espressi di Beclin1 identificavano sottogruppi di pazienti con neoplasie più aggressive (peggior KPS e peggior sopravvivenza)

[Autophagy 5:7, 930-936; 1 October 2009]; ©2009 Landes Bioscience

Review

The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas

Luigi Pirtoli,¹ Gabriele Cevenini,² Paolo Tini,¹ Marta Vannini,¹ Giuseppe Oliveri,³ Stefania Marsili,⁴ Vasileios Mourmouras,⁵ Giovanni Rubino¹ and Clelia Miracco^{5,*}

Autofagia nei Gliomi

Autofagia nella terapia dei tumori cerebrali

Studi pre-clinici e clinici hanno ormai messo in evidenza, direttamente o indirettamente, come **l'autofagia cellulare svolga un ruolo chiave nella risposta al trattamento dei GB** sia a terapie convenzionali che sperimentali.

Il contestuale ruolo pro-death o prosurvival e i meccanismi di questo switch nel GB **non sembrano essere definiti.**

Brain Pathology ISSN 1015-6305

MINI-SYMPOSIUM: Autophagy Dysregulation in Neuropathology

Autophagy in Brain Tumors: A New Target for Therapeutic Intervention

Niroop Kaza¹; Latika Kohli^{1,2}; Kevin A. Roth¹

¹ Department of Pathology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA.
² Department of Cell Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA.

Acta Biochim Biophys Sin (2009) 341-351 | © The Author 2009. Published by ABBS Editorial Office in association with Oxford University Press on behalf of the Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences. DOI: 10.1093/abbs/gmp028. Advance Access Publication 3 April 2009.

ABBS

Review

The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy

Wenzhuo Zhuang¹, Zhenghong Qin², and Zhongqin Liang^{1,2*}

¹Department of Pharmacology, Soochow University School of Medicine, Suzhou 215123, China
²Laboratory of Aging and Nervous Diseases, Soochow University School of Medicine, Suzhou 215123, China
*Correspondence address. Tel: +86-512-65880119; Fax: +86-512-65190599; E-mail: lq2003cn@yahoo.com.cn

J Neurooncol (2012) 106:281–290
DOI 10.1007/s11060-011-0684-4

LABORATORY INVESTIGATION - HUMAN/ANIMAL TISSUE

Modulation of pediatric brain tumor autophagy and chemosensitivity

Jean M. Mulcahy Levy · Andrew Thorburn

Clinical Science (2009) 116, 697–712 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/CS20080508 497

■ R E V I E W

Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential

Wim MARTINET*, Patrizia AGOSTINIS†, Barbara VANHOECKE‡, Michael DEWAELE† and Guido R. Y. DE MEYER*

*Division of Pharmacology, University of Antwerp, B-2610 Antwerp, Belgium, †Department of Molecular and Cell Biology, Catholic University of Leuven, B-3000 Leuven, Belgium, and ‡Laboratory of Experimental Cancer Research, Ghent University Hospital, B-9000 Ghent, Belgium

Autofagia e risposta al trattamento

tipo di trattamento

HDAC inhibitors (e.g. butyrate and suberoylanilide hydroxamic acid)
Tamoxifen
EB1089
Radiation
Angiogenesis inhibitors (eg. Kringles, ADI-1, AG013736 and anti-VEGF antibodies)
Tyrosine kinase inhibitor (Imatinib)
Resveratrol
Alkylating agent (temozolomide)
Arsenic trioxide
Akt inhibitors (eg. 1L-6-hydroxymethyl-chiro-inositol 2(R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonate)
HIV protease inhibitors (eg. Ritonavir, saquinavir, nelfinavir)
mTOR inhibitors (Rapamycin, CCI-779, RAD-001, AP23573.)

Chloroquine
Omeprazole
BMS1,2,3 and 4
Microtubuli disturbing agents (e.g. vincristine and paclitaxel)

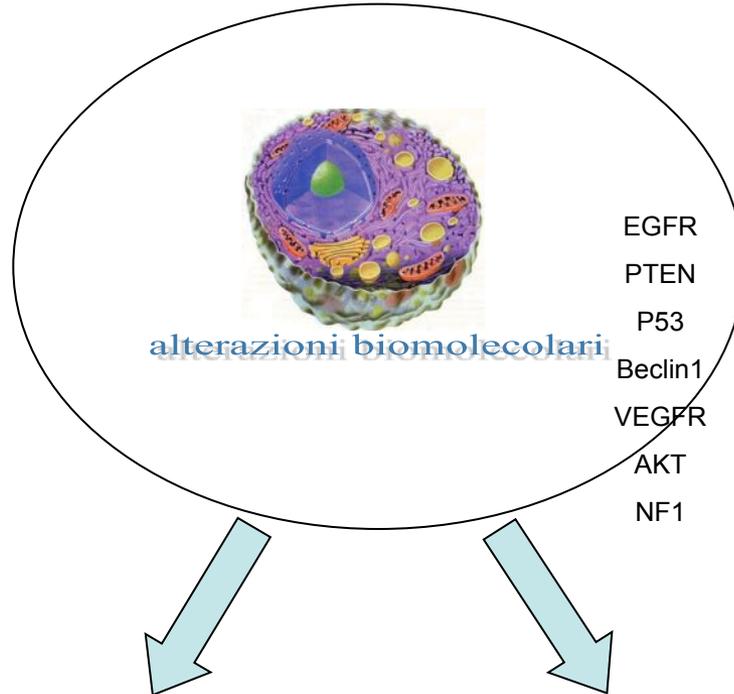
Modello Dose-Risposta
Complesso, multifasico, multiparametrico

intensità/durata del trattamento

HDR/LDR

Frazionamento RT

Dose CHT



alterazioni biomolecolari

EGFR
PTEN
P53
Beclin1
VEGFR
AKT
NF1

microambiente

Vascolarizzazione
Barriera emato-encefalica
Ipossia
Edema
Infiammazione

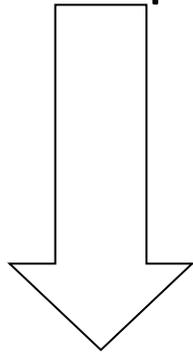
Sopravvivenza

Morte cellulare

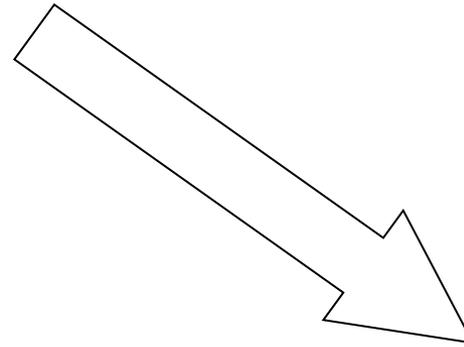
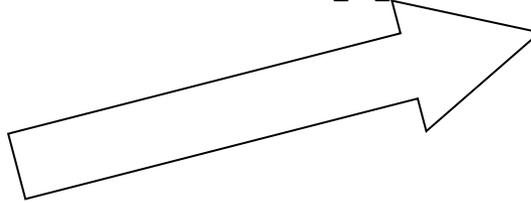
Modello dose-risposta multifasico, multiparametrico...

Approccio bio-molecolare

(Non esaustivo in termini di comprensione del fenomeno)

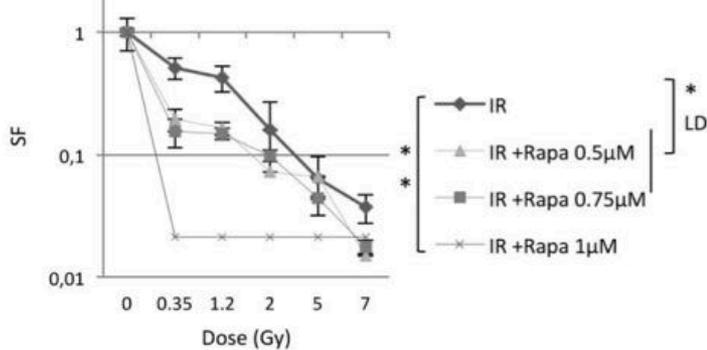


Approccio modellistico
(Non implementabile)

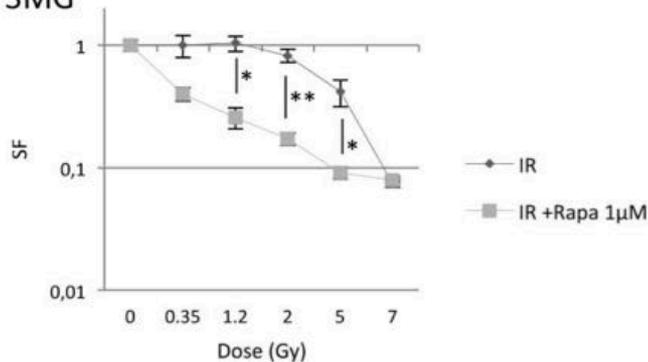


Approccio integrato?

T98G



U373MG



Different^{Q1} Involvement of Autophagy in Human Malignant Glioma Cell Lines Undergoing Irradiation and Temozolomide Combined Treatments

Silvia Palumbo,^{1*} Luigi Pirtoli,² Paolo Tini,² Gabriele Cevenini,³ Francesco Calderaro,¹ Marzia Toscano,⁴ Clelia Miracco,⁵ and Sergio Comincini¹

¹ *Department^{O2} of Genetics and Microbiology, University of Pavia, Pavia, Italy*

² *Section of Radiological Sciences, Department of Human Pathology and Oncology, University of Siena, Siena, Italy*

³ *Section of Bioengineering, Department of Surgery and Bioengineering, University of Siena, Siena, Italy*

⁴ *Department of Physiopathology, Experimental Medicine and Public Health, University of Siena, Siena, Italy*

⁵ *Section of Pathological Anatomy, Department of Human Pathology and Oncology, University of Siena, Siena, Italy*



Sulla base di una sperimentazione preliminare

Nuova sperimentazione della modulazione processo autofagico:

(**Basale**, **Induzione**, **Silenziamento**)

IR; *Intensità/durata: LDR vs HDR*

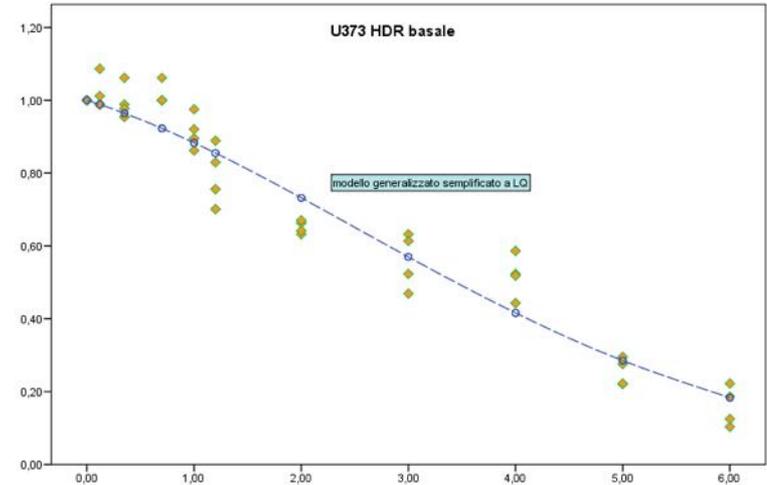
Linee cellulari: T98 e U373

(DATI NON PUBBLICATI)

Risposta

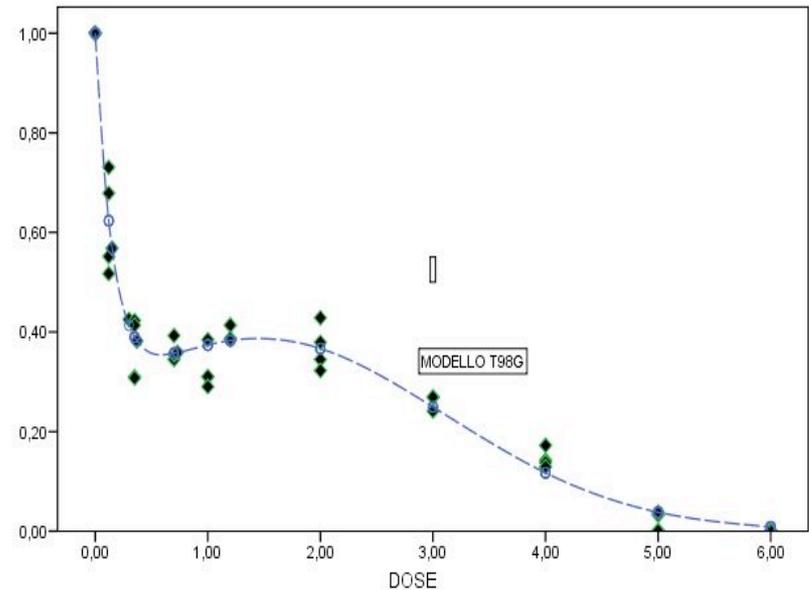
U373

Metilazione MGMT (TMZ responder)
Livelli più bassi Beclin1
P53 mutata
Scarsa radiosensibilità
Attivazione autofagica in risposta alle IR



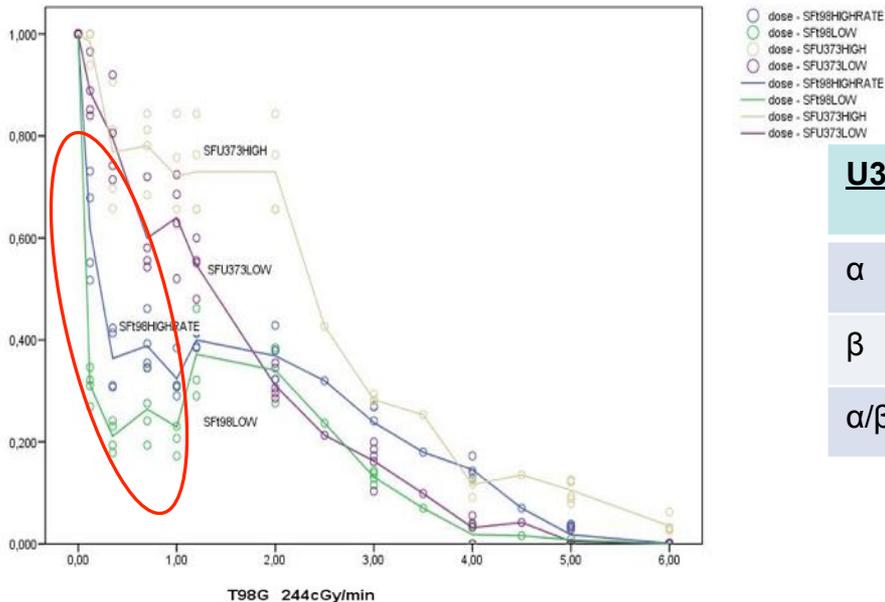
T98G

No Metilazione MGMT (TMZ no responder)
Alti livelli di Beclin1
P53 mutata
Radiosensibilità intermedia
Hypersensitivity to low dose (LD-HRS)
Attivazione autofagica in risposta alle IR



Condizioni basali

Modellizzare per estrapolare,
confrontare e
quantizzare il fenomeno...

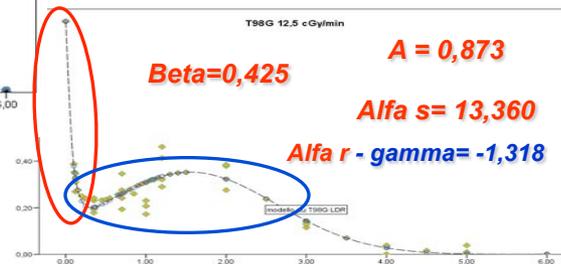
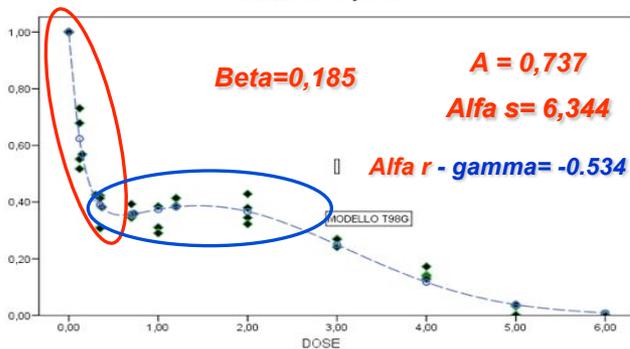


U373MG 244.5 cGy/m		U373MG 12.5 cGy/m'	
α	0.093Gy ⁻¹	α	0.123Gy ⁻¹
β	0.032 Gy ⁻¹	β	0.026Gy ⁻¹
α/β	2.90Gy	α/β	4.26 Gy

U373 - modello LQ : ottimo fitting

In T98G, il modello LQ non è applicabile, data la LD-HRS:

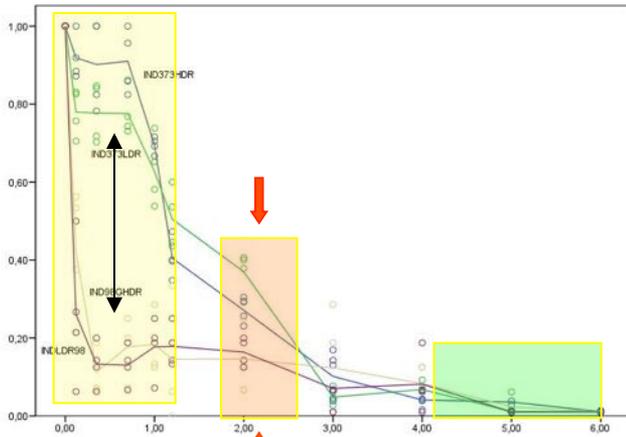
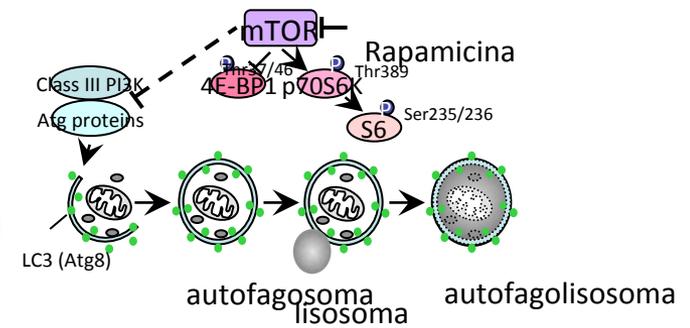
$$SF = A * \text{Exp}(-\alpha_f s * D) + (1-A) * \text{Exp}[-(\alpha_r - \gamma) * D - \beta * D^2]$$



A = peso LD-HRS
Alfa s = autophagy pro-death LD-HRS
Alfa r = autophagy pro-death
Gamma = autophagy pro-survival
Beta = Quadratic component autophagy

Induzione autofagica

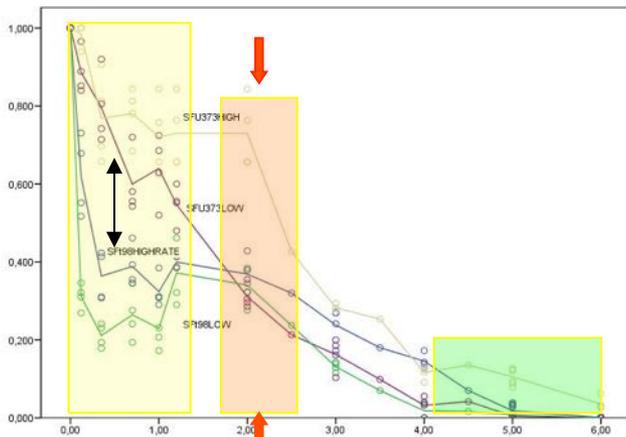
(Inibizione di mTOR con Rapamicina)



○ DOSE - IND373DR
○ DOSE - IND373LDR
○ DOSE - IND98CHDR
○ DOSE - INLD9898
○ DOSE - IND373DR
○ DOSE - IND373LDR
○ DOSE - IND98GHDR
○ DOSE - INLD9898

Ind U373MG 244.5 cGy/m'		Ind U373MG 12.5 cGy/m'	
α	0.693Gy ⁻¹	α	0.716Gy ⁻¹
β	0.011Gy ⁻¹	β	0.12Gy ⁻¹
α/β	63 Gy	α/β	63Gy

- U373: Notevole incremento della radiosensibilità complessiva



○ dose - SF198HIGHRATE
○ dose - SF198LOW
○ dose - SFU373HIGH
○ dose - SFU373LOW
○ dose - SF198HIGHRATE
○ dose - SF198LOW
○ dose - SFU373HIGH
○ dose - SFU373LOW

Ind T98G 244.5 cGy/m		Ind T98G 12.5 cGy/m'	
α_s	7.107 Gy ⁻¹	α_s	10.798 Gy ⁻¹
$\alpha_r - \varphi$	-4,809 Gy ⁻¹	$\alpha_r - \varphi$	-4.117 Gy ⁻¹
A	0.990	A	0.991
β	1,798Gy ⁻¹	β	1.333 Gy ⁻¹

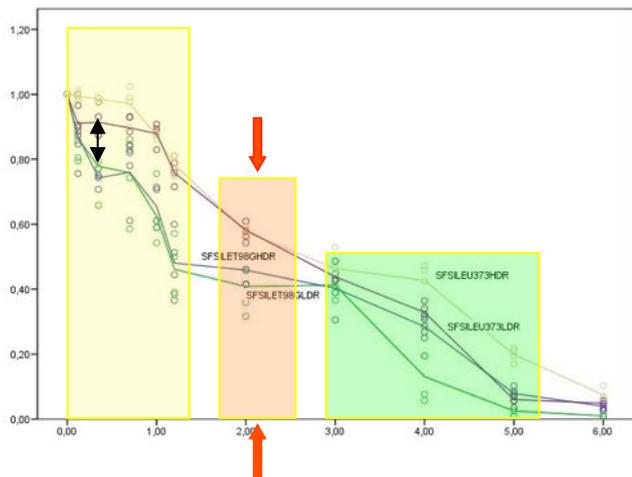
- T98G: incremento della LD-HRS e della radiosensibilità complessiva
- Incremento complessivo della radiosensibilità a Dosi terapeutiche (1,8 – 2,5 Gy) non a dosi > 4Gy

Induzione autofagica

migliora in termini assoluti la risposta al trattamento radiante.

Silenziamento

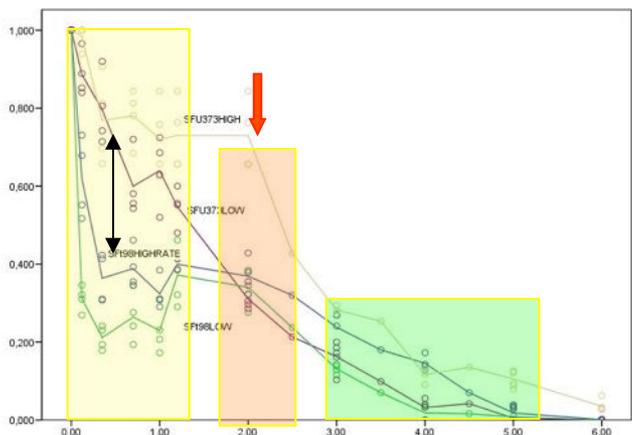
(inibizione autofagica: SiRNA Atg7)



○ DOSE - SFSLET98GHDR
○ DOSE - SFSLET98GLDR
○ DOSE - SFSLET98LDR
○ DOSE - SFSLET98GHDR
○ DOSE - SFSLET98GLDR
○ DOSE - SFSLET98LDR
○ DOSE - SFSLET98GHDR
○ DOSE - SFSLET98GLDR
○ DOSE - SFSLET98LDR

<u>Sil U373MG 244.5 cGy/m'</u>		<u>Sil U373MG 12.5 cGy/m'</u>	
α	0.129Gy ⁻¹	α	0.136Gy ⁻¹
β	0.038Gy ⁻¹	β	0.052Gy ⁻¹
α/β	3.3Gy	α/β	2.6Gy

- U373: Non differenza alle basse e medie dosi, sembra aumentare la radioresistenza alle alte dosi (complessivamente non cambia la radiosensibilità)



○ dose - SFU373HIGH
○ dose - SFU373LOW
○ dose - SFU373MID
○ dose - SFU373HIGH
○ dose - SFU373LOW
○ dose - SFU373MID
○ dose - SFU373HIGH
○ dose - SFU373LOW
○ dose - SFU373MID

<u>SilT98G 244.5 cGy/m'</u>		<u>Sil T98G 12.5 cGy/m'</u>	
α_s	n.s	α_s	n.s
$\alpha_r - \varphi$	0.233Gy ⁻¹	$\alpha_r - \varphi$	0.211Gy ⁻¹
A	0	A	0
β	0.049Gy ⁻¹ ($\alpha/\beta = 4.7Gy$)	β	0.096 Gy ⁻¹ ($\alpha/\beta = 2.2Gy$)

- T98G: riduce notevolmente la LD-HRS (modellizzazione LQ) e la radiosensibilità complessiva.
- Incremento complessivo della radioresistenza per dosi > 3 Gy

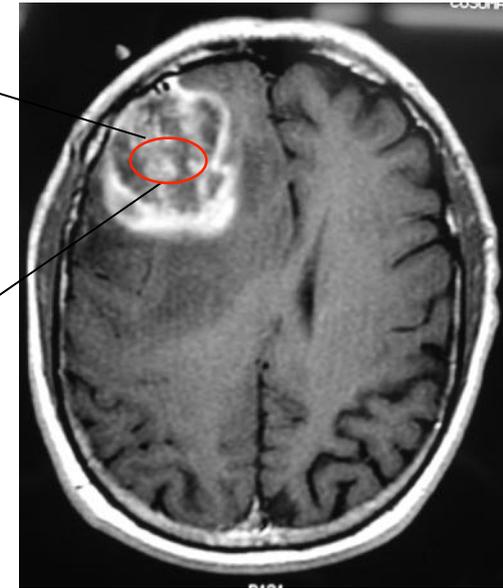
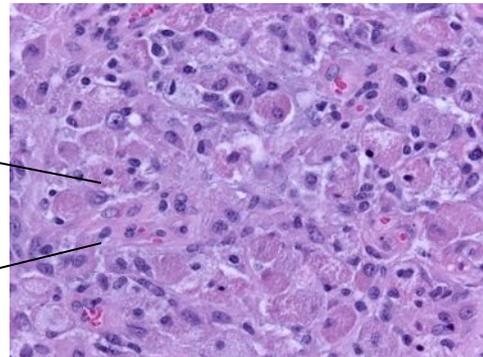
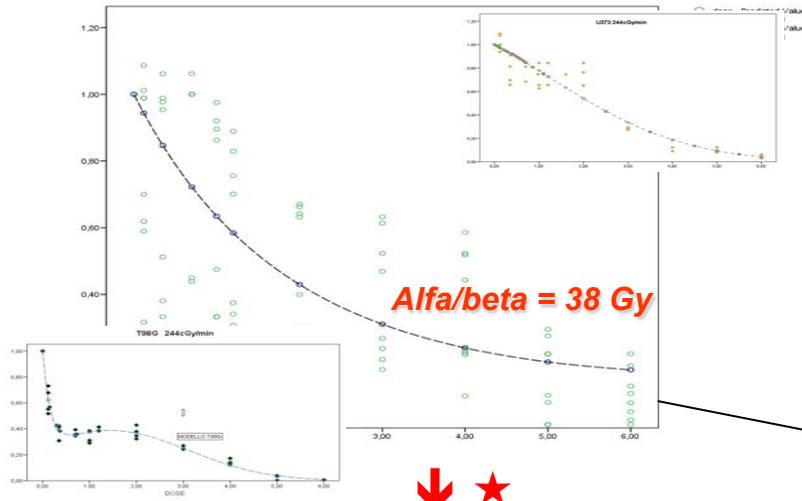
↑ Inibizione autofagica

NON migliora in termini assoluti la risposta al trattamento radiante.

..dal laboratorio alla clinica... un'ipotesi

• In vivo: popolazione cellulare mista (nel modello, abbiamo ipotizzato un mosaico T98 e U373, al 50%)

• *Espressione variabile di Beclin1*, come marcatore in vivo, conforterebbe un'ipotesi di questo tipo.



L'induzione autofagica * potrebbe portare ad un miglioramento della risposta terapeutica in vivo con una variabilità legata alla mosaicità delle cellule tumorali

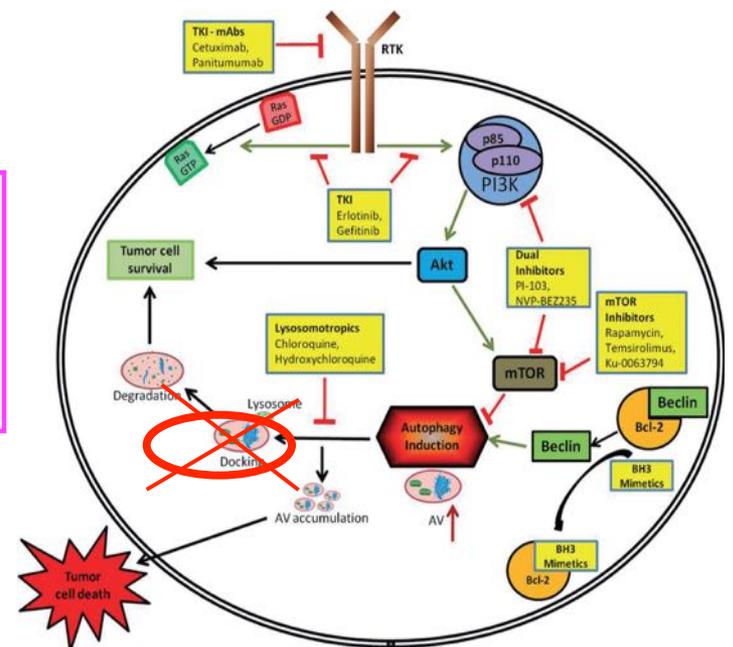
Come indurre *in vivo* il processo autofagico?

- Non eccessivamente tossico (Rapamicina è molto tossica!!)
- Passaggio della BEE
- Un solo induttore autofagico in vivo *potrebbe non essere sufficiente!!!*
- *Attività autofagica pro-death: teoria dell' accumulo degli autofagosomi (farmaco lisosomatotropo o massivo processo autofagico) a livello pre - fusione lisosomiale*

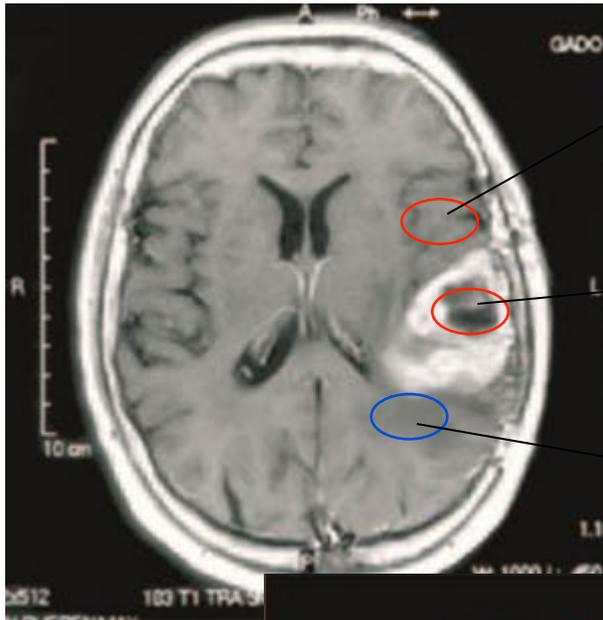
Chloroquine or Chloroquine-PI3K/Akt Pathway Inhibitor Combinations Strongly Promote γ -Irradiation-Induced Cell Death in Primary Stem-Like Glioma Cells

Elke Firat¹, Astrid Weyerbrock², Simone Gaedicke¹, Anca-Ligia Grosu¹, Gabriele Niedermann^{1*}

¹ Department of Radiation Oncology, University Hospital Freiburg, Freiburg, Germany, ² Department of Neurosurgery, University Hospital Freiburg, Freiburg, Germany



Induzione autofagica *in vivo*



Quale effetto sul tessuto sano?

EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE, Vol. 44, No. 2, 89-98, February 2012
Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases

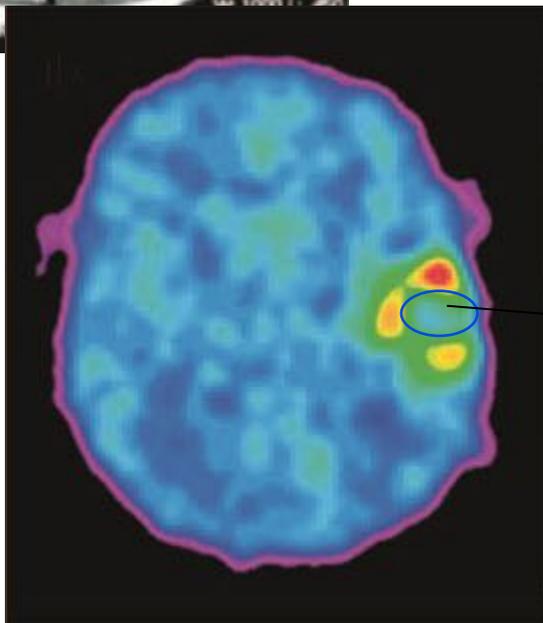
Quale effetto sulle GSCC?

Int. J. Cancer; 125, 717-722 (2009)
© 2009 UICC
SHORT REPORT
The induction of autophagy by γ -radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells
Stephanie L. Lomonaco¹, Susan Fajina¹, Cunli Xiang¹, Ama DeCarvalho¹, Felix Umansky¹, Steven N. Kalkanis¹, Tom Mikkelsen¹ and Chaya Brody^{1,2*}
¹William and Karen Davidson Laboratory of Cell Signaling and Tumorigenesis, Department of Neurosurgery, Hermitte Brain Tumor Center, Henry Ford Hospital, Detroit, MI
²Mina and Everard Goodman Faculty of Life-Sciences, Bar-Ilan University, Ramat-Gan, Israel

UICC
global cancer control
IJC
International Journal of Cancer
Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity
Wenzhuo Zhuang¹, Bingzong Li¹, Linmei Long¹, Liesong Chen¹, Qiang Huang¹ and Zhongqin Liang¹

Quale effetto sulla capacità di invasione?

Cell Cycle 11:10, 2022-2029; May 15, 2012; © 2012 Landes Bioscience
Inhibition of autophagy impairs tumor cell invasion in an organotypic model
Robin L. Macintosh¹, Paul Timpson¹, Jacqueline Thorburn², Kurt I. Anderson¹, Andrew Thorburn² and Kevin M. Ryan^{1*}
¹Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, UK; ²Department of Pharmacology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO USA

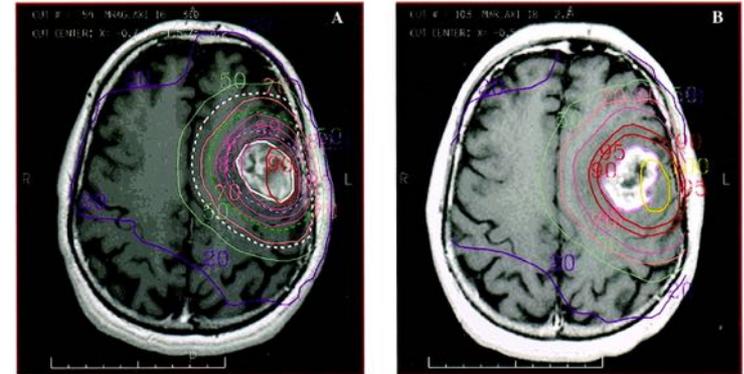


Quale effetto sulle aree ipossiche?

Cancer Res. 2012 April 1; 72(7): 1773-1783. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3831.
Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to anti-angiogenic treatment in glioblastoma
Yu-Long Hu¹, Michael DeLay^{1,†}, Arman Jahangiri^{1,†}, Annette M. Molinaro¹, Samuel D. Rose¹, W. Shawn Carbonell¹, and Manish K. Aghi¹

Implicazioni terapeutiche e autofagia

**Quale frazionamento ?
Quando la dose escalation?
Quali volumi?
Quando la TMZ ?
In quali pazienti?**



Research Article
Simulating Radiotherapy Effect in High-Grade Glioma by Using Diffusive Modeling and Brain Atlases
 Alexandros Roniotis,^{1,2} Kostas Marias,¹ Vangelis Sakkalis,¹ Georgios C. Manikis,¹ and Michalis Zervakis²
¹Institute of Computer Science, Foundation For Research and Technology-Hellas, 700 13 Heraklion, Crete, Greece
²Department of Electronic & Computer Engineering, Technical University of Crete, 73100 Chania, Greece

IOP PUBLISHING
 PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY
 Phys. Med. Biol. 55 (2010) 3271–3285
 doi:10.1088/0031-9155/55/12/001

Predicting the efficacy of radiotherapy in individual glioblastoma patients *in vivo*: a mathematical modeling approach

R Rockne¹, J K Rockhill², M Mrugala³, A M Spence³, I Kalit², K Hendrickson², A Lat⁴, T Cloughesy⁵, E C Alford Jr¹ and K R Swanson^{1,5,6}

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \underbrace{\nabla \cdot (D \nabla c)}_{\text{net dispersal of glioma cells}} + \underbrace{c \left(1 - \frac{c}{k}\right)}_{\text{net proliferation of glioma cells}} - \underbrace{R(x, t, \text{Dose}) c \left(1 - \frac{c}{k}\right)}_{\text{loss due to radiation therapy}}$$

Autofagia

modelli matematici predittivi integrati con parametri biologici (autofagici) *in vivo* potrebbero avere un ruolo?

Conclusioni

- Modulazione autofagica in **senso induttivo** come target terapeutico.
- Esiste una difficoltà nell'identificare un appropriato induttore in vivo.
- Potenziale vantaggi nell'utilizzo contemporaneo di un induttore e inibitore tardivo autofagici.
(si eviterebbe la possibilità dell'effetto sub-liminare con rischio di autofagia pro-survival)
- Molto utile potrebbe essere un **approccio integrato bio-molecolare** (identificazione del target e di marcatori autofagici in vivo) e **modellistico** (aspetto predittivo e conseguentemente di selezione dei pazienti) dell'autofagia come target terapeutico in vivo.