

Titolo del progetto:

**Linfociti Natural Killer e melanoma dell'uvea: studio dei meccanismi di polarizzazione pro-tumorale/pro-angiogenica nella metastatizzazione tumorale**

Descrizione della ricerca:

### **Premessa**

Il melanoma dell'uvea (MU, classificazione Orphanet dei tumori rari **#ORPHA-39044**) è una neoplasia intraoculare primitiva rara che colpisce la popolazione con un'incidenza di 5,3-10,9 casi/milione di persone per anno, il che si traduce in circa 50.000 nuovi malati ogni anno nel mondo [1, 2]. Il picco diagnostico si verifica nella popolazione caucasica nella sesta decade di vita, ad un'età media di 55 anni. In Italia si stima che il melanoma uveale colpisca circa 400-500 persone l'anno.

I trattamenti attualmente disponibili garantiscono un controllo del tumore in sede primaria (*i.e.* oculare) in oltre il 90% dei casi trattati [2, 3]. Ciononostante, il tasso di mortalità dei pazienti affetti da MU valutato entro 5 anni dalla diagnosi si assesta tra il 26 e il 32% e non è cambiato in modo significativo nel corso degli anni [1-3]. Infatti, quasi il 50% dei pazienti con MU sviluppa malattia metastatica al fegato attraverso la diffusione delle cellule tumorali per via esclusivamente ematogena, come conseguenza di fenomeni di angiogenesi patologica [2, 4, 5]. La sopravvivenza media dopo la diagnosi di MU metastatico è pari a 5-7 mesi [3]. Anche se oggi è possibile identificare con estrema precisione quali pazienti svilupperanno metastasi grazie alla stadiazione clinica del tumore e all'analisi istologica e genetica, la chemioterapia raramente prolunga la sopravvivenza a lungo termine [6]. Sebbene negli anni numerosi studi e trial clinici abbiano tentato di identificare trattamenti farmacologici efficaci, ad oggi non esiste alcuna terapia sistemica che abbia ricevuto l'approvazione dagli organi competenti [2, 6]. In questo contesto, gli approcci terapeutici volti a potenziare la risposta immunitaria antitumorale costituiscono una strategia particolarmente innovativa che risulta tuttavia ancora poco efficace a causa della limitata comprensione dei meccanismi patologici attraverso cui il MU altera il sistema immunitario dei pazienti.

I linfociti Natural Killer (NK) sono la sottopopolazione di linfociti dotata della più potente attività citotossica nei confronti dei tumori e partecipano alla modulazione del sistema immunitario producendo numerose citochine e chemochine [7, 8]. La loro funzione è regolata da un bilanciamento coordinato di recettori inibitori e recettori attivatori [9]. La maggior parte dei recettori inibitori delle cellule NK riconosce le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I), il quale è presente su tutte le cellule sane dell'organismo. Tale legame previene l'eliminazione della cellula bersaglio, che viene riconosciuta dal linfocita NK come *self* [9-11]. Al contrario, la perdita o l'alterazione dell'MHC-I, evento frequente durante le infezioni virali e le trasformazioni tumorali, porta all'attivazione delle cellule NK e alla conseguente lisi della cellula bersaglio [10-12]. La funzione di lisi è mediata dall'esistenza di diversi recettori attivatori, responsabili dell'attività citotossica delle cellule NK. Tra di essi, CD16, NKG2D e i recettori della citotossicità naturale (NCR) NKp46, NKp30 e NKp44 giocano un ruolo predominante nell'attivazione dei linfociti NK [13-16].

È stato recentemente descritto in diversi tipi di cancro che nel microambiente tumorale le cellule NK possano acquisire oltre al fenotipo pro-tumorale, anche delle caratteristiche pro-infiammatorie/pro-angiogeniche [17-19]. Questa polarizzazione dei linfociti NK, definita *decidual-like*, è caratterizzata dalla downregolazione del contenuto di perforina litica, granzima B, e interferone  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), da una riduzione dell'espressione di NKG2D, da una ridotta funzionalità degli NCR ed infine dalla produzione di citochine e chemochine angio-infiammatorie, tra cui il fattore pro-angiogenico *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) [17-20]. Ciò significa che, oltre a contribuire all'*escape* tumorale, questa sottopopolazione di linfociti NK partecipa attivamente ai processi di neovascolarizzazione patologica coinvolti sia nella crescita che nella metastatizzazione tumorale [19].

Ad oggi, le conoscenze relative al ruolo giocato dai linfociti NK nel MU sono molto limitate [21]. I risultati ottenuti in modelli sperimentali di MU e le analisi condotte sui tumori primari ci dicono che la funzionalità della popolazione NK è inibita a causa della presenza di fattori solubili di origine tumorale quali, ad esempio, il *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) [22-24]. In questo contesto, lo studio e la comprensione dei meccanismi e delle alterazioni molecolari e/o funzionali a carico delle cellule NK e l'identificazione dei mediatori coinvolti nella polarizzazione *decidual-like* acquisisce un'importanza fondamentale per lo sviluppo di nuove (immuno)terapie mirate.

## Razionale della proposta

Sebbene l'immunoterapia sia emersa come trattamento anti-tumorale di "nuova generazione", il fallimento dei protocolli testati nell'ambito del MU suggerisce chiaramente la necessità di comprendere meglio i meccanismi molecolari attraverso i quali il MU riprogramma il sistema immunitario dell'ospite.

Pertanto, sulla base di quanto riportato in letteratura e delle competenze in ambito oncologico e immunologico della richiedente e dei suoi collaboratori, questo progetto ha lo scopo di: studiare la polarizzazione *decidual-like* indotta dal MU nei linfociti NK (i); valutare l'effetto pro-angiogenico dei linfociti NK *decidual-like* su cellule endoteliali in modelli sperimentali *in vitro* ed *in vivo* (ii); identificare e inibire i fattori solubili prodotti dal MU e responsabili della polarizzazione *decidual-like* (iii).

## Metodologia utilizzata

In questo progetto verranno perseguiti tre obiettivi (ognuno dei quali rappresenta un *Task*):

### **Task 1.** Caratterizzazione delle alterazioni fenotipiche e funzionali indotte dal MU nei linfociti NK

Per valutare la capacità del MU di polarizzare i linfociti NK verso un fenotipo *decidual-like*, cellule NK isolate da donatori sani saranno incubate con i terreni condizionati di tre diverse linee cellulari di MU (*i.e.* 92.1, Mel270, Mel285). Dopo 72 ore, le cellule NK saranno analizzate al citofluorimetro per valutare l'espressione dei marcatori deciduali CD9, CD49a e CXCR4. La caratterizzazione fenotipica sarà inoltre completata dall'analisi dell'espressione dei recettori attivatori e inibitori CD16, NKG2D, NKp30, NKp46, Nkp44, NKG2A e KIRs e dei marcatori dello stadio di maturazione CCR7, CD57, CD62L, e CD69.

Le alterazioni nella capacità effettrice delle cellule NK esposte al terreno condizionato delle linee di MU saranno valutate nel saggio di degranulazione contro la linea cellulare K562 e analizzate al citofluorimetro quantificando i livelli di CD107a. Inoltre, saranno valutati i livelli di perforina, granzima B, e IFN $\gamma$ .

Infine, per studiare la capacità delle cellule NK attivate dai terreni condizionati di MU di produrre fattori pro-angiogenici, i lisati proteici saranno incubati su specifiche membrane (*i.e.* Human Angiogenesis Antibody Array), che permettono di valutare simultaneamente la presenza di numerosi fattori coinvolti nel processo di angiogenesi. I risultati più rilevanti saranno confermati mediante Western Blotting.

### **Task 2.** Valutazione dell'attività pro-angiogenica dei linfociti NK attivati dal MU

Linfociti NK ottenuti mediante *sorting* al FACS, saranno incubati per 72 ore con i terreni condizionati delle linee di MU (vedere *Task 1*). Terminata l'incubazione, le cellule NK attivate saranno lavate con soluzione fisiologica e coltivate con del terreno fresco per le successive 24 ore. Questo step di condizionamento ci permetterà di ottenere un terreno contenente i fattori prodotti e secreti dalle cellule NK, il cui potenziale pro-angiogenico sarà testato su cellule endoteliali *in vitro* ed *in vivo*:

- Cellule endoteliali umane isolate da cordone ombelicale (HUVEC) saranno stimulate con il terreno condizionato dai linfociti NK e l'effetto pro-angiogenico sarà valutato in saggi di proliferazione cellulare, migrazione cellulare (*e.g.* chemiotassi in camera di Boyden), nel saggio di *sprouting* nel modello tridimensionale di sferoidi endoteliali inclusi in gel di fibrina ed infine sulla formazione di strutture capillare-simili.
- Il terreno condizionato ottenuto dai linfociti NK sarà incluso in un pellet di alginato e impiantato sulla membrana corionallantoidea (CAM) dell'embrione di pollo. Dopo tre giorni, il numero di neovasi formati in direzione dello stimolo sarà quantificato.

### **Task 3.** Identificazione e inibizione dei mediatori responsabili della polarizzazione *decidual-like*

Al fine di identificare i mediatori solubili responsabili della polarizzazione *decidual-like* dei linfociti NK, l'identificazione di citochine, chemochine e fattori di crescita nel secretoma delle cellule di MU sarà effettuata mediante analisi Bio-Plex® Multiplex sui terreni condizionati delle tre linee tumorali. Tra le molecole che saranno identificate, due/tre bersagli putativi saranno selezionati in base alle caratteristiche biologiche e alla letteratura scientifica disponibile.

Per valutare l'effetto biologico dei bersagli selezionati, i linfociti NK saranno incubati con i terreni condizionati di MU in assenza o in presenza di specifici anticorpi neutralizzanti. Infine, l'effetto dell'inibizione sulla polarizzazione *decidual-like* e sull'attività pro-angiogenica dei linfociti NK sarà valutato come precedentemente descritto nei *Task 1* e *2*.

### Analisi statistica

La significatività statistica tra due campioni indipendenti sarà valutata mediante il test *t* di Student. Per tre o più gruppi sarà applicata l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via. Le differenze saranno considerate significative con un *p value* < 0,05.

### Risultati attesi

Come spesso accade nell'ambito delle malattie rare in genere, la scarsa comprensione dei meccanismi disfunzionali che si instaurano nella progressione della malattia fa sì che identificare delle soluzioni valide sia estremamente difficoltoso. In questo contesto, la ricerca di base ricopre un ruolo fondamentale nell'ampliare le conoscenze scientifiche necessarie per sviluppare nuove strategie terapeutiche mirate ed efficaci.

Con questo progetto ci proponiamo di comprendere come il MU riprogrammi i linfociti NK dell'ospite rendendoli non solo incapaci di eliminare le cellule tumorali, ma persino alleati nel richiamare i vasi sanguigni necessari per la crescita e la diffusione metastatica del tumore stesso. Attraverso l'identificazione dei mediatori responsabili della polarizzazione *decidual-like*, il progetto pone le basi per lo sviluppo di nuove procedure (immuno)terapeutiche per ripristinare e potenziare il ruolo effetttore dei linfociti NK.

### Fattibilità del progetto

La proponente e le sue collaboratrici (Prof.ssa G. Tabellini e Prof.ssa S. Parolini) hanno una solida esperienza nello studio dei tumori oculari, dell'angiogenesi tumorale e dei linfociti NK, come testimoniato dalla rispettiva produzione scientifica. Inoltre, tutte le tecniche descritte in questo progetto sono utilizzate di routine nel laboratorio della proponente. Ciò, unitamente alla collaborazione con uno studente di dottorato di ricerca coinvolto nello studio (Dott.ssa A. Loda), garantisce la fattibilità tecnica del progetto proposto nei 18 mesi previsti dal bando.

Dal punto di vista economico, il contributo della Fondazione Camillo Golgi sarà integrato con fondi ottenuti dalla Fondazione Umberto Veronesi per il progetto dal titolo *Blocking the FGF/FGFR system to target the tumor-stroma crosstalk in uveal melanoma* (01/02/2023 – 31/01/2024) e da Fondazione Cariplo per il progetto dal titolo *Unravelling the mechanisms of drug resistance in Diabetic Retinopathy: translational implications* (01/06/2022 – 31/05/2025) e assegnati alla proponente.

### Attività di divulgazione

Durante gli anni svolti in qualità di borsista dell'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) e della Fondazione Umberto Veronesi, la proponente ha preso parte a numerose attività di divulgazione rivolte al pubblico, ponendo particolare attenzione agli studenti delle scuole secondarie e superiori.

Consapevole dell'importanza della divulgazione scientifica e della terza missione per il progresso della scienza, la proponente si impegna durante lo svolgimento del progetto a riconoscere il contributo di Fondazione Golgi non solo nelle pubblicazioni scientifiche, ma anche in tutte le attività di divulgazione (ad esempio attraverso la piattaforma web del laboratorio, i canali social, gli incontri nelle scuole programmati con la collaborazione di UniBS) così che al pubblico sia reso noto il supporto di Fondazione Golgi ai giovani ricercatori nell'ambito della ricerca sulle malattie rare.

### Piano finanziario

- Materiale di consumo:	€ 17.000,00
- Spese di pubblicazione e partecipazione a congressi:	€ 1.500,00
- Overheads:	€ 1.500,00
- <b>Totale:</b>	<b>€ 20.000,00</b>

## Reference

1. Jovanovic, P., et al., *Ocular melanoma: an overview of the current status*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(7): p. 1230-44.
2. Carvajal, R.D., et al., *Advances in the clinical management of uveal melanoma*. Nat Rev Clin Oncol, 2023.
3. Yonekawa, Y. and I.K. Kim, *Epidemiology and management of uveal melanoma*. Hematol Oncol Clin North Am, 2012. **26**(6): p. 1169-84.
4. Bedikian, A.Y., *Metastatic uveal melanoma therapy: current options*. Int Ophthalmol Clin, 2006. **46**(1): p. 151-66.
5. Rezzola, S., et al., *The Autocrine FGF/FGFR System in both Skin and Uveal Melanoma: FGF Trapping as a Possible Therapeutic Approach*. Cancers (Basel), 2019. **11**(9).
6. Croce, M., et al., *Targeted Therapy of Uveal Melanoma: Recent Failures and New Perspectives*. Cancers (Basel), 2019. **11**(6).
7. Abel, A.M., et al., *Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1869.
8. Paul, S. and G. Lal, *The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1124.
9. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. **112**(3): p. 461-9.
10. Moretta, A., et al., *NK cells at the interface between innate and adaptive immunity*. Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 226-33.
11. Tabellini, G., et al., *From Natural Killer Cell Receptor Discovery to Characterization of Natural Killer Cell Defects in Primary Immunodeficiencies*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1757.
12. Greppi, M., et al., *Strengthening the AntiTumor NK Cell Function for the Treatment of Ovarian Cancer*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(4).
13. De Maria, A., et al., *Identification, molecular cloning and functional characterization of NKp46 and NKp30 natural cytotoxicity receptors in Macaca fascicularis NK cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(12): p. 3546-56.
14. Pende, D., et al., *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells*. J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1505-16.
15. Pessino, A., et al., *Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 953-60.
16. Vitale, M., et al., *NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis*. J Exp Med, 1998. **187**(12): p. 2065-72.
17. Gallazzi, M., et al., *Prostate Cancer Peripheral Blood NK Cells Show Enhanced CD9, CD49a, CXCR4, CXCL8, MMP-9 Production and Secrete Monocyte-Recruiting and Polarizing Factors*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 586126.
18. Bosi, A., et al., *Natural Killer Cells from Malignant Pleural Effusion Are Endowed with a Decidual-Like Proangiogenic Polarization*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 2438598.
19. Albini, A. and D.M. Noonan, *Decidual-Like NK Cell Polarization: From Cancer Killing to Cancer Nurturing*. Cancer Discov, 2021. **11**(1): p. 28-33.
20. Albini, A., et al., *TIMP1 and TIMP2 Downregulate TGFbeta Induced Decidual-like Phenotype in Natural Killer Cells*. Cancers (Basel), 2021. **13**(19).
21. Javed, A. and M. Milhem, *Role of Natural Killer Cells in Uveal Melanoma*. Cancers (Basel), 2020. **12**(12).
22. Esser, P., S. Grisanti, and K. Bartz-Schmidt, *TGF-beta in uveal melanoma*. Microsc Res Tech, 2001. **52**(4): p. 396-400.
23. Ghiringhelli, F., et al., *The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 229-38.
24. Saika, S., *TGFbeta pathobiology in the eye*. Lab Invest, 2006. **86**(2): p. 106-15.