



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

Il melanoma dell'uvea (MU) è un raro tumore oculare che, in Italia, si stima colpisca ogni anno circa 400-500 persone. Sebbene il tumore primario venga trattato con successo nel 90% dei casi, circa il 50% dei pazienti sviluppa metastasi epatiche. Ad oggi, le opzioni terapeutiche efficaci risultano estremamente limitate.

I linfociti Natural Killer (NK) rappresentano la sottopopolazione di cellule dell'immunità innata con la più potente attività citotossica nei confronti delle cellule neoplastiche. Tuttavia, è stato osservato che, in diverse tipologie di tumore, i linfociti NK possono acquisire un fenotipo pro-tumorale e pro-angiogenico, noto come *decidual-like* (dNK-like). Si ritiene che questa trasformazione sia indotta da fattori rilasciati dal tumore nel microambiente, tra cui, in particolare, il Tumor Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ).

Attualmente, i dati disponibili sull'interazione tra i linfociti NK e il MU sono limitati, e le strategie adottate dal MU per sfuggire al controllo delle cellule NK richiedono ulteriori approfondimenti. Per questo motivo, il nostro progetto si è proposto di indagare la capacità del MU di indurre il fenotipo dNK-like come meccanismo di escape immunologico, con particolare attenzione al ruolo svolto dal TGF $\beta$  in questo processo.

Al fine di valutare i livelli di espressione di TGF $\beta$  in pazienti affetti da MU, il nostro laboratorio ha condotto un'analisi bioinformatica sul database TCGA, che raccoglie dati di espressione genica di 80 pazienti affetti da MU. I nostri risultati hanno evidenziato che il 20% dei pazienti presenta un'elevata espressione di TGF $\beta$ , la quale è associata a una ridotta sopravvivenza, suggerendo una correlazione tra alti livelli di TGF $\beta$  e tumori più aggressivi. Inoltre, abbiamo riscontrato un'elevata espressione di TGF $\beta$ , sia a livello genico che proteico, nelle tre linee cellulari umane di MU utilizzate nel nostro studio. Successivamente, abbiamo caratterizzato le alterazioni fenotipiche e funzionali indotte dal MU nei linfociti NK. A tal fine, abbiamo sviluppato un modello sperimentale in cui le cellule mononucleate del sangue periferico, isolate da donatori sani, sono state trattate per 72 ore con il terreno condizionato delle cellule di MU. Mediante analisi citofluorimetrica, abbiamo valutato l'espressione dei principali recettori attivatori dei linfociti NK e dei marcatori caratteristici del fenotipo *decidual-like*. I nostri risultati dimostrano che il terreno condizionato delle linee di MU riduce significativamente l'espressione dei recettori attivatori NKG2D, NKG2A e DNAM-1, mentre aumenta in modo significativo i livelli dei marcatori dNK-like CD9 e CD49a. È interessante notare che il co-trattamento con un anticorpo neutralizzante anti-TGF $\beta$  inibisce la capacità del terreno condizionato delle linee di MU di modulare l'espressione di tali recettori e marcatori.

Per determinare se le alterazioni fenotipiche fossero accompagnate da modificazioni nella capacità citotossica, le cellule mononucleate del sangue periferico, pretrattate come descritto in precedenza, sono state analizzate per quantificare i livelli di granzima B e perforina contenuti nei lisosomi secretori delle cellule NK. I nostri dati mostrano che il trattamento con il terreno condizionato delle linee di MU riduce significativamente i livelli di perforina e granzima B. Parallelamente, è stato eseguito un saggio di degranolazione utilizzando la linea eritroleucemica umana K562 come target, in quanto facilmente riconosciuta ed eliminata dai linfociti NK. L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato una ridotta efficienza di degranolazione. Questo risultato, associato alla ridotta espressione di enzimi litici, suggerisce una compromissione della capacità citotossica dei linfociti NK esposti al terreno condizionato prodotto dalle cellule di MU. Anche in questo caso, il co-trattamento con un anticorpo neutralizzante anti-TGF $\beta$  inibisce la capacità del MU di modulare la funzione citotossica dei linfociti NK, suggerendo il ruolo fondamentale di questa citochina nel microambiente tumorale oculare.

In conclusione, i nostri dati indicano che il MU è in grado di inibire la funzionalità dei linfociti NK attraverso il TGF $\beta$ , contribuendo alla creazione di un microambiente immuno-tollerante. Questi risultati forniscono le basi per futuri studi finalizzati all'identificazione di nuovi target terapeutici, con l'obiettivo di migliorare la prognosi dei pazienti.

