

PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT (max 5 pagine / max 5 pages)

Borse DM 351/2022 Scholaships DM 351/2022 Vedi scheda del corso e art. 2 del bando. <i>Refer to PhD Sheet and art. 2 of the Call.</i>	Selezionare una sola opzione. <i>Select only one option:</i> <input type="checkbox"/>]PA <input type="checkbox"/>]PC <input type="checkbox"/>]PNRR <input type="checkbox"/>]TDA
Borse DM 352/2022 Scholaships DM 352/2022 Vedi scheda del corso e art. 3 del bando. <i>Refer to PhD Sheet and art. 3 of the Call.</i>	Indicare il codice della borsa DM 352/2022 per la quale si intende partecipare. <i>Insert the code of the DM 352/2022 scholarship to apply.</i> [PNNR. _____]
Borse di Ateneo su tema vincolato Scholarships on specific research topic Vedi scheda del corso. <i>Refer to PhD sheet.</i>	Indicare il codice della borsa di ateneo con tema vincolato per la quale si intende partecipare. <i>Insert the code of the University scholarship on specific research topic:</i> [BA. _____]

Cognome / Surname	
Nome / Name	
Titolo del progetto / Project title	STUDIO DEI MECCANISMI MOLECOLARI REGOLATI DA CD271 NELLA PROGRESSIONE DEL TUMORE AL COLON
Corso di dottorato / PhD	ONCOLOGIA E CHIRURGIA SPERIMENTALI
Firma del candidato/ Applicant's signature	

1 - Sommario / Abstract

Nonostante gli sforzi compiuti negli ultimi anni, il cancro al colon-retto (CRC) rimane ancora la seconda causa di morte per cancro, a causa dell'insorgenza di recidive e metastasi [1]. Uno dei maggiori limiti nel trattamento del CRC è rappresentato dalla eterogeneità intratumorale che determina i progressi dei pazienti e la risposta ai farmaci. A livello cellulare, i driver principali di questi fenomeni sono rappresentati dalle cellule staminali tumorali (CSC), un sottoinsieme cellulare altamente dinamico, con capacità di auto-rinnovamento e con un incremento dell'attivazione dei pathway di anti-apoptosi e di riparazione del danno al DNA, considerato come il responsabile sia dell'iniziazione che della progressione tumorale [2, 3]. Inoltre, il contributo del microambiente tumorale svolge un ruolo fondamentale nei processi di progressione tumorale e metastatizzazione del CRC. Recentemente, la comunità scientifica si è focalizzata sullo studio dei meccanismi molecolari del cross-talk tra tumore e microambiente, studiando dei putativi target che possano svolgere un ruolo nello switch fenotipico tumorale durante la progressione. I nostri dati preliminari indicano come la molecola di membrana CD271, con un riconosciuto ruolo di oncosoppressore nel CRC, possa aver un ruolo chiave, insieme ai suoi ligandi e partner funzionali, nei processi di metastatizzazione tumorale, in particolare nell'arricchimento di una sub-popolazione di CSCs di CRC (CR-CSCs) in un fenotipo ibrido CMS1-CMS4. In tal modo, alla luce delle evidenze scientifiche e dei dati ottenuti, questo progetto mira allo studio del ruolo del recettore CD271, analizzandone i meccanismi molecolari che regolano la progressione tumorale, affiancando l'utilizzo di anticorpi o farmaci contro putativi target coinvolti nei pathways a monte dello switch fenotipico da tumore (bulk) a metastasi.

2 - Descrizione del progetto / Project

Il tumore al colon-retto (CRC) rappresenta il 10% di tutti i tumori ed è la seconda causa di morte nel mondo [4]. È una patologia eterogenea che include forme ereditarie (5%) e sporadiche (95%). Entrambe le forme sono caratterizzate dall'insorgenza di *driver mutation* a carico di oncogeni e oncosoppressori (APC, KRAS, TP53). In base all'espressione genica e all'infiltrato immunitario il CRC può essere classificato in 4 gruppi chiamati

consensus molecular subtype (CMS). I CMS1 (14% di tutti i CRC) sono caratterizzati da mutazioni a carico di BRAF e da un elevato infiltrato linfocitario. In presenza di un microambiente con un'elevata azione antitumorale le cellule tumorali riescono ad evadere la risposta del sistema immunitario dell'ospite tramite l'espressione di molecole coinvolte negli immuno-checkpoint (PD-1, PD-L1, CTLA-4). I CMS2 (37% di tutti i CRC) presentano up-regolazione nei pathway di segnalazione di WNT, MYC e uno scarso infiltrato immunitario, costituito da bassi livelli di linfociti, monociti e cellule mieloidi. Il sottotipo CMS3 (13% di tutti i CRC) è definito "metabolico" e frequentemente si riscontrano mutazioni a carico di KRAS, un esiguo infiltrato immunitario con arricchimento in cellule che esprimono PD-L1 e un incremento di linfociti Th17. Il tipo CMS4 definito "mesenchimale" è caratterizzato da transizione epitelio mesenchima (EMT) associata a rimodellamento della matrice extracellulare, attivazione dei pathway di segnalazione del TGF- β e angiogenesi. Inoltre, presentano alti livelli di linfociti infiltranti il tumore e macrofagi di tipo M2; questi ultimi però sono in grado di creare un microambiente pro-tumorale mediante il rilascio di citochine anti-infiammatorie (IL-10). L'identificazione di una sottopopolazione tumorale presente all'interno della massa, nota come cellule staminali tumorali (CSC), contraddistinte dall'espressione del marcatore di superficie CD44v6, ha permesso di spiegare l'elevata aggressività e potenziale metastatico dei CRC [5]. Infatti, le CSC sono caratterizzate da capacità di auto-rinnovamento, potenziale metastatico e chemio-resistenza, in seguito all'acquisizione di alterazioni genetiche ed epigenetiche, e sono in grado di dare inizio e supportare la progressione tumorale [6, 7].

Negli ultimi anni numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato che il microambiente tumorale (TME), composto da diversi tipi cellulari come fibroblasti, cellule adipose stromali (ASCs) e cellule del sistema immunitario, gioca un ruolo importante nella proliferazione, invasione ed EMT delle CSC [8]. Il nostro gruppo di ricerca ha infatti recentemente dimostrato come le ASCs arricchite in pazienti obesi, tramite il rilascio di HGF e IL-6, siano in grado di riprogrammare le CSCs, passando da un fenotipo CMS2 (poco metastatico) a uno ibrido CMS1/CMS4, up-regolando l'attività del pathway di STAT3 e up-regolando ZEB2, con conseguente aumento di positività di CD44v6 nelle CSCs. Parallelamente, le stesse CSC-CD44v6+, rilasciando neurotrofine (BDNF, NGF, NT-3 e NT-4) ligandi di CD271, richiamano le ASCs a livello tumorale, attraverso un meccanismo di tipo paracrino. In questo modo, le ASCs, a seguito di rilascio di VEGF da parte delle CSC-CD44v6+, subiscono una modifica fenotipica che le direziona verso un fenotipo endothelial-like che potrebbe co-adiuvare le CSCs nei processi di intravasazione e formazione di metastasi a distanza [9] (Figura 1).

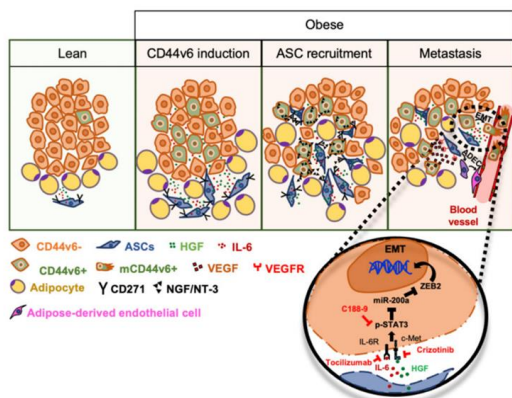


Figura 1. Schema cross-talk TME e cellule tumorali

Secondo un recente studio [17], è stato evidenziato come nel tumore primario al colon retto, la regione promotrice del gene di CD271 sia ipermetilata, causando una diminuzione dell'espressione e/o un silenziamento genico. Infatti, attraverso l'over espressione di CD271 è stato dimostrato una soppressione della proliferazione tumorale e della capacità di formare colonie nel CRC, con riduzione dei processi di invasione e migrazione. In particolare, CD271 sembra che inibisca la proliferazione cellulare inducendo l'apoptosi e un arresto in fase G1, come nel cancro alla prostata [18]. L'insieme di questi dati indica CD271 come potenziale *onco* - *soppressore*.

Il recettore CD271 è un membro della superfamiglia dei TNFR ed è stato dimostrato essere un gene soppressore condizionale nella maggior parte dei tumori [10]. Infatti, la sua espressione è stata osservata in molti tumori come il carcinoma alla tiroide, il cancro allo stomaco e al fegato [11-13]. Inoltre, risulta essere espresso sulle CSCs, dove risulta avere un ruolo in diversi pathway di segnalazione e sviluppo, e nei tumori metastatici dove è stato evidenziato come l'over-espressione di CD271 sia associata a una maggiore migrazione e invasività [14-16]. Consultando i database TCGA - COAD e TCGA - READ, si nota come CD271 sia maggiormente espresso nella mucosa sana rispetto al tumore bulk in pazienti affetti da CRC (Figura 2).

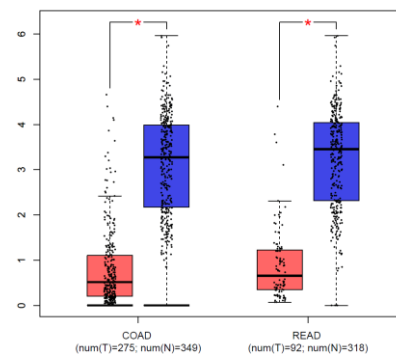


Figura 2. Livelli di espressione di CD271 in tessuti sani e tumorali

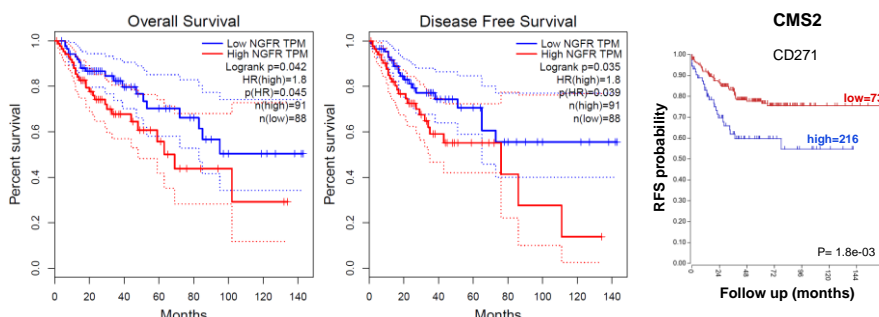


Figura 3. Overall survival, Disease Free Survival e RFS in pazienti con diversa espressione di CD271

Nonostante ciò, osservando l'overall survival, la disease-free survival si può notare come nei pazienti affetti da CRC, alti livelli di CD271 siano associati a una peggiore prognosi (Figura 3).

Infatti, è stato riportato che nei CRC con un fenotipo CMS2, un basso livello di espressione di CD271 sia legato a una

maggior percentuale di sopravvivenza libera da recidiva (relapse-free survival, RFS) mettendo in discussione il ruolo di CD271 come potenziale oncosoppressore (**Figura 3**).

Inoltre, a supporto del ruolo determinante di CD271 nella progressione tumorale, l'espressione di CD271 aumenta all'aumentare dello stage tumorale (**Figura 4**).

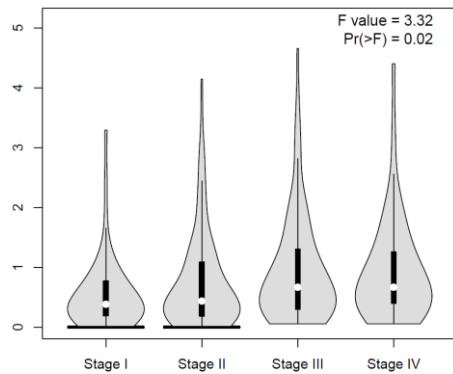


Figura 4. Correlazione tra espressione di CD271 e staging tumorale

Tuttavia, ad oggi non si conoscono i meccanismi molecolari che regolano la differenziale espressione di CD271 nel CRC, dunque il nostro obiettivo sarà proprio quello di valutare come i meccanismi molecolari regolati da CD271 possano regolare il cross-talk tra cellule tumorali e stromali, determinando un fenotipo più aggressivo nei pazienti affetti da CRC.

CD271 viene anche definito un Dependence Receptors, ovvero che in assenza di un ligando ha un'attività pro-apoptotica e di promozione della quiescenza, invece in presenza di ligandi come NGF, BDNF, NT3, e NT-4 porterebbe ad attivazione di una serie di pathway coinvolti nella proliferazione e migrazione cellulare, il che potrebbe spiegare la difficoltà nel definire CD271 nel

dualismo oncosoppressore/oncogene [10].

Altri dati preliminari, ottenuti dall'interrogazione di database clinici, affermano che l'espressione di CD271 nei tumori bulk è inversamente proporzionale all'espressione di Ki-67, un noto marker di proliferazione cellulare (**Figura 5**).

Dunque, si ipotizza un modello secondo il quale l'espressione di CD271 possa indurre uno stato di quiescenza nelle cellule staminali tumorali (poco rappresentate all'interno del bulk tumorale), le quali a seguito di stimolazione dei ligandi, attivano pathways di proliferazione/migrazione, uscendo dallo stato di quiescenza e promuovendo la progressione tumorale.

Questo porterebbe le cellule staminali tumorali a migrare verso organi a distanza, al fine di identificare un microambiente vantaggioso, nel quale riprendere la proliferazione, portando così alla formazione di metastasi, come già dimostrato nel melanoma [19] (**Figura 6**).

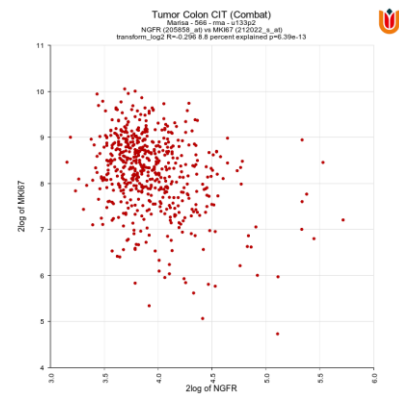


Figura 5. Correlazione tra CD271 e Ki-67 in CRC

A supporto della nostra ipotesi, l'espressione di CD271 risulta downregolata a livello di tumore primario, e incrementata a livello di metastasi, suggerendo un possibile arricchimento a livello metastatico della sottopopolazione cellulare overesprimente CD271, sottorappresentata nel tumore primario, probabilmente a seguito di stimolazione da parte di citochine/fattori di crescita del microambiente tumorale (**Figura 7**).

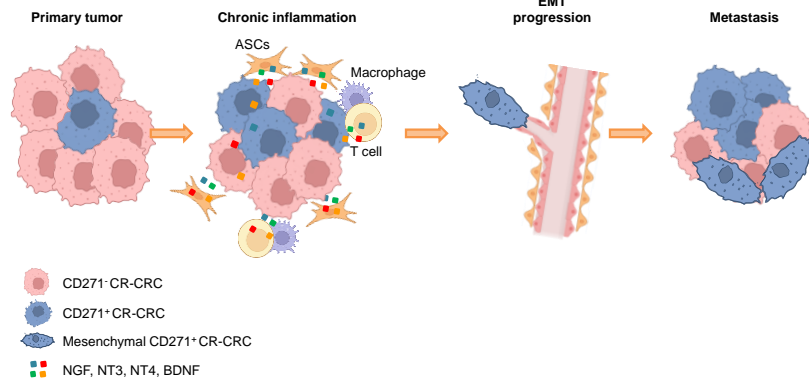


Figura 6. Diagramma schematico dei meccanismi alla base del processo metastatico mediato da CD271

Secondo recenti studi preclinici, le neurotrofine sono coinvolte nella immunosorveglianza tumorale, infatti insieme a CD271 e TrkA attivano dei pathway che giocano un ruolo chiave nella sopravvivenza e nella funzionalità delle cellule immunitarie sia innate che adattative. La maggior parte delle cellule del sistema immunitario produce NGF in maniera autocrina [20, 21] e risulta essere un fattore di crescita e di sopravvivenza per le cellule B [22]. Inoltre, durante l'infiammazione, la sintesi di NGF è incrementata da citochine infiammatorie quali IL-1 β , TNF- α , e IL-6). Tuttavia, non è chiaro se e attraverso quali meccanismi le neurotrofine, e in particolare l'NGF, possano essere coinvolte nella modulazione e nel perfezionamento dell'editing/escape tumorale. È noto che le cellule tumorali mettono in atto alcuni meccanismi in grado di evadere la risposta immunitaria dell'ospite mediante diversi meccanismi: i) perdita degli antigeni di superficie riconosciuti dal sistema immunitario; ii) rilascio di fattori immunosoppressivi; iii) perdita dei fattori che attivano le natural killer [23]. Uno dei principali meccanismi associato all'immunoescape è l'espressione di alcuni recettori coinvolti nell'induzione dell'anergia e della morte programmata dei linfociti T CD8+, come, ad esempio, PD-L1 [24]. Come dimostrato da un recente studio, le CR-CSC con mutazioni a carico di APC sono in grado di evadere la risposta immunitaria tramite l'incremento dell'espressione di PDL-1 per mezzo di una regolazione trascrizionale del pathway di Wnt, indotta dal legame del complesso β -catenina/TCF4 al promotore di PD-L1 [25]. Recenti studi hanno dimostrato come l'elevata espressione di PD-L1 sia associata a un tumore con un elevato infiltrato leucocitario, chiamati

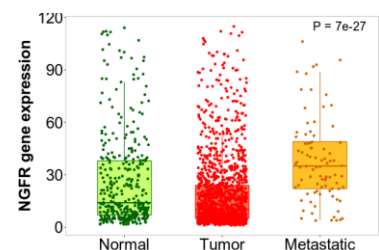


Figura 7. Analisi dei livelli di espressione di CD271 in colon sano, e tumore primario e metastasi di CRC

anche “Hot Tumors” [26]. Questi sembrerebbero rispondere meglio alle moderne immunoterapie [27]. In questo contesto, è importante notare come l'espressione di CD271 in CR-CSCs sia direttamente proporzionale a quella di PD-L1 (Figura 8). Questi risultati, combinati all'osservazione di un aumento dell'espressione di CD271 dal tumore

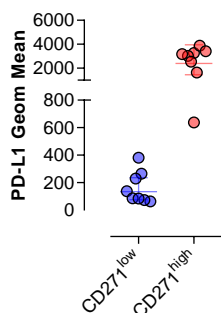


Figura 8. Correlazione tra i livelli di espressione di CD271 e PD-L1 in CR-CSCs

primario alla metastasi, suggeriscono un possibile switch da tumore “cold” a “hot” durante il processo di progressione tumorale. Per questo motivo, l'utilizzo di un eventuale trattamento combinatoriale del CRC basato sull'uso di inibitori di PD-L1 accoppiati ad una terapia target che possa mirare a inibire l'attività di CD271, o di pathways ad esso correlati, potrebbe rappresentare una valida strategia terapeutica per il trattamento di pazienti affetti da CRC.

Basandosi su questi dati preliminari, l'obiettivo di ricerca sarà quello di analizzare i meccanismi molecolari che regolano la maggiore attivazione di CD271 durante la progressione tumorale, focalizzandosi sul ruolo del recettore come marker prognostico, e il suo eventuale utilizzo come target terapeutico, come monoterapia o in combinazione con inibitori di checkpoint immunitari.

L'attività sperimentale conterà di tre fasi:

1) Caratterizzazione funzionale *in vitro* del ruolo di CD271 nelle CR-CSCs

Le CR-CSCs CMS2 sono state isolate a partire da biopsie di pazienti seguendo il protocollo messo a punto dal nostro laboratorio [5]. Tramite citofluorimetria (FACS) verranno isolate le cellule con espressione differenziale di CD271 (neg-low versus pos-high). Una volta isolate, tramite analisi trascrittomiche verrà caratterizzato il profilo di espressione genica al fine di individuare i geni coinvolti nei pathway di sopravvivenza, proliferazione e migrazione cellulare maggiormente differenzialmente espressi nei due compartimenti cellulari. Verrà inoltre investigato un possibile switch di CMS verso il fenotipo ibrido CMS1/CMS4 mediante staining con marcatori di questi sottotipi molecolari (CDX2, FRMD6, HTRB2B, ZEB1, β -catenin, cytokeratin) [28, 29]. Questi dati verranno successivamente confermati mediante saggi funzionali per dimostrare il coinvolgimento di CD271 nella regolazione del profilo proliferativo e migratorio delle CR-CSCs. In particolare, al fine di valutare se l'espressione di questo recettore possa regolare la capacità proliferativa delle CR-CSCs, valuteremo mediante FACS il profilo del ciclo cellulare e l'eventuale regolazione dell'apoptosi, mediante studio di espressione di Annexina V e marcatura con PI. I risultati verranno confermati tramite successive analisi proteomiche dei pathway direttamente coinvolti nella regolazione dei meccanismi cellulari sopracitati, tra i quali PI3K/Akt, MAPK, e Caspasi.

Il potenziale clonogenico verrà studiato per mezzo del saggio di formazione delle colonie, che permette di valutare la capacità delle cellule di formare colonie in assenza di ancoraggio su un supporto semi-solido. Tramite extreme limiting dilution analysis (ELDA) verrà valutato il potenziale clonogenico di queste cellule, fornendo informazioni riguardo la capacità clonogenica (numero di colonie) e di proliferazione (grandezza delle colonie) delle CR-CSCs. Tramite invasion assay e wound healing assay verranno studiati rispettivamente la capacità di invasione e di migrazione di queste cellule. Inoltre, verranno studiate le citochine che questa popolazione cellulare rilascia nel mezzo, mediante Bio-plex, al fine di identificare un possibile meccanismo implicato nella riprogrammazione dell'aggressività e capacità metastatica delle CR-CSC.

2) Identificazione di meccanismi molecolari alla base del reprogramming delle CR-CSCs verso un fenotipo metastatico e immunosoppressivo

I nostri recenti studi hanno dimostrato come l'espressione di CD44v6 nelle CR-CSCs identifichi una sottopopolazione in grado di migrare dal sito primario e portare a formazione di metastasi a distanza [5]. È interessante notare che, alcune delle CR-CSCs CD44v6- possono essere riprogrammate a CD44v6+, rendendole altamente metastatiche, a seguito di stimoli del microambiente, come HGF, SDF-1 e OPN [5]. Tuttavia, distinguere le CD44v6- riprogrammabili, da quelle terminalmente differenziate, risulta ad oggi ancora non possibile. In questo contesto, risulta fondamentale definire il ruolo di CD271 nel reprogramming delle CR-CSCs, con particolare

attenzione alle CD44v6-. I nostri risultati preliminari mostrano inoltre una significativa correlazione tra l'espressione di CD271 e CD44v6 (Figura 9).

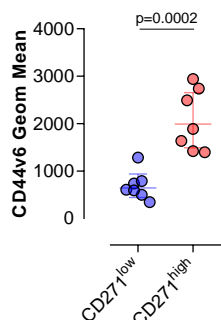


Figura 9. Correlazione tra CD271 e CD44v6 in CR-CSCs

Per questo motivo, le CR-CSCs CMS2 verranno sortate al fine di isolare le seguenti sottopopolazioni cellulari: 1) CD44v6^{neg-low}/CD271^{neg-low}; 2) CD44v6^{neg-low}/CD271^{pos-high}; 3) CD44v6^{pos-high}/CD271^{neg-low}; 4) CD44v6^{pos-high}/CD271^{pos-high}. Tutte queste sottopopolazioni verranno caratterizzate a livello trascrittomico, proteomico e funzionale, seguendo lo schema sperimentale utilizzato per la caratterizzazione di CD271. Inoltre, valuteremo il potenziale di riprogrammazione delle varie sottopopolazioni cellulari in risposta a stimoli del microambiente, incluse le neurotrofine e HGF/SDF-1/OPN.

Inoltre, dato che l'espressione di CD44v6 è strettamente associata all'attivazione del pathway di WNT/beta-catenin [30], tramite un'analisi FACS verrà valutata la correlazione tra l'attivazione del pathway di WNT/beta catenin e l'espressione di

CD271, che verrà ulteriormente confermata tramite analisi proteomica (GSK3b, Axin2, active beta- catenin).

Le CR-CSCs sono inoltre in grado di formare metastasi grazie a meccanismi di immunoescape basati sull'espressione di molecole implicate nell'induzione dell'anergia e apoptosi dei linfociti, come PD-L1. Sulla base delle analisi di citofluorimetria che mostrano come alti livelli di CD271 siano correlati con un aumento dell'espressione di PD-L1, verrà quindi valutato se le cellule caratterizzate da alta espressione di CD271 siano in grado a livello funzionale di inibire la risposta anti-tumorale cellulo-mediata. A tal scopo, effettueremo saggi di co-cultura di CR-CSCs CD271+/- con le PBMC, ottenute da sangue intero di donatori volontari sani, per valutare mediante FACS la variazione nel fenotipo e nella vitalità delle CR-CSCs e delle cellule del sistema immune. Inoltre, valuteremo la possibilità di inibire geneticamente e farmacologicamente il pathway mediato da PD-L1, per prevenire la regolazione negativa dell'attività anti-tumorale delle cellule del sistema immunitario, mediante trasduzione delle CR-CSCs con short hairpin specifico per PD-L1, o trattamento con Atezolizumab.

3) Validazione *in vivo* del ruolo di CD271 come biomarcatore prognostico nel CRC

Al fine di confermare i dati ottenuti *in vitro* riguardo il ruolo di CD271 nelle CR-CSCs, effettueremo degli inoculi ortotopici di CR-CSCs (CD44v6^{neg-low}/CD271^{neg-low}; CD44v6^{neg-low}/CD271^{pos-high}; CD44v6^{pos-high}/CD271^{neg-low}; CD44v6^{pos-high}/CD271^{pos-high}), pretrattate con vehicle o fattori del microambiente tumorale, in topi NSG per monitorarne il potenziale tumorigenico e metastatico. Per fare ciò, le CR-CSCs di colon saranno trasdotte con un vettore codificante la luciferasi al fine di monitorare, attraverso tecniche di bioimaging (IVIS Spectrum System, PerkinElmer), la crescita tumorale e la formazione di metastasi, in seguito alla somministrazione della luciferina e con il vettore Luc2-Turbo RFP (Addgene #136959) al fine di discriminare, nelle successive analisi, le cellule epiteliali (CR-CSCs di colon) dalla componente stromale murina. Inoltre, per poter validare il ruolo di CD271 nella regolazione della componente immunitaria infiltrante il tumore, verranno effettuati inoculi singenici di linee murine di CRC (CD271^{+/-}) nel sottocute, per valutare potenziale tumorigenico e infiltrato immunitario. Lo stesso setting sperimentale verrà condotto con cellule trasdotte con shRNA specifico per CD271, o a seguito di trattamento con anticorpo inibitore di PD-L1.

Gli xenografts ottenuti saranno caratterizzati a livello trascrittomico e proteomico. I tumori espantati verranno infatti impiegati per le successive analisi di real-time PCR (array specifico per geni coinvolti nella staminalità/chemioresistenza/EMT), IHC e IF (CD44v6, Ki-67, MMP-9, CD271, PD-L1 e caspasi 3), FACS (CD44v6, CD271, CD133, CD166, Wnt activity) e WB (pathway delle MAPK, PI3K/Akt, JAK/STAT). A tal fine, una parte di tumore (circa metà campioni, tagliato longitudinalmente) verrà inclusa in paraffina per analisi di IHC e IF per l'analisi di specifici markers di staminalità, proliferazione cellulare, e apoptosi. Una parte di campione tumorale verrà digerita per l'isolamento di cellule tumorali da poter caratterizzare mediante analisi FACS, o per saggi funzionali *in vitro* per valutare se i risultati ottenuti *in vivo* hanno ricapitolato quelli precedentemente ottenuti *in vitro*. Infine, 3 pezzi biotipici saranno dedicati all'isolamento di DNA, RNA e proteine.

3 - Bibliografia / References

1. PMID: 35020204; 2. PMID: 33806312; 3. PMID: 32974184; 4. PMID: 33208072; 5. PMID: 24607406; 6. PMID: 31167052; 7. PMID: 22300863; 8. PMID: 35625629; 9. PMID: 34408135; 10. PMID: 20173780; 11. PMID: 16647954; 12. PMID: 17510309; 13. PMID: 17395831; 14. PMID: 20596026; 15. PMID: 21393506; 16. PMID: 17696644; 17. PMID: 25244921; 18. PMID: 16460673; 19. PMID: 20726948; 20. PMID: 11529499; 21. PMID: 7963523; 22. PMID: 8616890; 23. PMID: 21376230; 24. PMID: 29716829; 25. PMID: 34385594; 26. PMID: 27084740; 27. PMID: 34888243; 28. PMID: 29589308; 29. PMID: 33721619; 30. PMID: 10549358.