



Unione Europea



*Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca*



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE E BIOMEDICHE

Dottorato di ricerca in
Biochimica e patologia dell'azione dei farmaci
IX ciclo
2011-2012

Tesi di dottorato in Il sistema adenosinico: principali targets molecolari ad attività anti-tumorale

Dottorando	Giovanni Forte
Tutor	Ch.mo Prof. Aldo Pinto
Coordinatore	Ch.ma Prof. Antonietta Leone

INDICE

RIASSUNTO ABSTRACT

CAPITOLO 1

Adenosina e cancro

1.1	Adenosina	pag. 4
1.2	Meccanismi di trasporto dell'adenosina	pag. 5
1.3	I recettori dell'adenosina	pag. 6
1.3.1	<i>Recettore A₁</i>	pag. 7
1.3.2	<i>Recettore A_{2A}</i>	pag. 8
1.3.3	<i>Recettore A_{2B}</i>	pag. 9
1.3.4	<i>Recettore A₃</i>	pag. 10
1.4	Adenosina e cancro	pag. 11
1.4.1	<i>Ruolo dei recettori dell'adenosina nel cancro</i>	pag. 11
1.4.1a	<i>Ruolo del recettore A₁ nel cancro</i>	pag. 11
1.4.1b	<i>Ruolo del recettore A_{2A} nel cancro</i>	pag. 12
1.4.1c	<i>Ruolo del recettore A_{2B} nel cancro</i>	pag. 13
1.4.1d	<i>Ruolo del recettore A₃ nel cancro</i>	pag. 14

Capitolo 2

Il carcinoma tiroideo

2.1 Introduzione

2.1.1	Il carcinoma tiroideo	pag. 15
-------	-----------------------	---------

2.2 Scopo

pag. 17

2.3 Risultati

2.3.1	<i>Espressione del recettore A₃</i>	pag. 18
2.3.2	<i>Il CI-IB-MECA inibisce la crescita delle cellule NPA</i>	pag. 19
2.3.3	<i>Il CI-IB-MECA arresta il ciclo cellulare delle cellule NPA nelle fasi G₀/G₁</i>	pag. 20
2.3.4	<i>Gli effetti anti-proliferativi del CI-IB-MECA non dipendono dall'attivazione del recettore A₃</i>	pag. 22
2.3.5	<i>Gli effetti anti-proliferativi del CI-IB-MECA non dipendono da altri sottotipi recettoriali dell'adenosina</i>	pag. 23
2.3.6	<i>Inibitori dei trasportatori dell'adenosina</i>	pag. 24

2.4 Discussione

pag. 25

CAPITOLO 3

Adenosina e TRAIL

3.1 Introduzione

3.1.1	TRAIL	pag. 26
3.1.2	Trasduzione del segnale di TRAIL	pag. 26
3.1.3	Segnali cellulari di tipo non apoptotico	pag. 28
3.1.4	Ruolo di TRAIL nel sistema immunitario	pag. 28
3.1.5	TRAIL nell'immunità tumorale	pag. 29

3.2 Scopo

pag. 30

3.3 Risultati

3.3.1	<i>Il CI-IB-MECA facilita l'apoptosi indotta da TRAIL in un modello di carcinoma tiroideo</i>	pag. 31
3.3.2	<i>Il CI-IB-MECA aumenta in maniera specifica la morte cellulare indotta da TRAIL</i>	pag. 33
3.3.3	<i>Ruolo di cRel nell'apoptosi indotta da TRAIL e</i>	pag. 34

3.3.4	<i>CI-IB-MECA</i> <i>Il CI-IB-MECA riduce i livelli di espressione delle molecole anti-apoptotiche Bcl₂, cFLIP, pAkt in cellule di carcinoma tiroideo trattate con TRAIL</i>	pag. 35
3.3.5	<i>Il CI-IB-MECA regola l' espressione dei recettori di TRAIL</i>	pag. 36
3.4	Discussione	pag. 37
CAPITOLO 4		
L'adenosina nell'immunità tumorale		
4.1 Introduzione		
4.1.1	<i>Il cancro: un'entità multicellulare</i>	pag. 39
4.1.2	<i>Infiammazione cronica e cancro: ruolo del sistema immunitario</i>	pag. 39
4.1.3	<i>Tumor-associated Macrophages (TAM)</i>	pag. 40
4.1.4	<i>Immunità tumorale ed immunoeediting</i>	pag. 42
4.1.5	<i>Tolleranza tumore-specifica</i>	pag. 42
4.1.6	<i>Il ruolo dell'adenosina nel sistema immunitario</i>	pag. 44
4.1.6a	<i>Linfociti</i>	pag. 44
4.1.6b	<i>Neutrofili</i>	pag. 45
4.1.6c	<i>Natural Killer</i>	pag. 45
4.1.6d	<i>Cellule Dendritiche</i>	pag. 46
4.1.6e	<i>Macrofagi</i>	pag. 46
4.2 Scopo		
4.3 Risultati		
4.3.1	<i>Attività antitumorale del CI-IB-MECA in un modello murino di melanoma: studio degli effetti diretti sulle popolazioni infiltrate nel tumore</i>	pag.49
4.3.2	<i>Effetti del CI-IB-MECA sul rilascio di TNF-α nei macrofagi</i>	pag. 52
4.3.3	<i>L'antagonista selettivo A3 MRS1191 inibisce gli effetti del CI-IB-MECA sul rilascio del TNF</i>	pag. 52
4.3.4	<i>Ruolo di PKC e PI3K/Akt sul rilascio di TNF-α indotto dal CI-IB-MECA da parte dei macrofagi stimolati con LPS</i>	pag. 54
4.4	Discussione	pag. 57
CAPITOLO 5		
CD73 e cancro		
5.1 Introduzione		
5.1.1	<i>Il CD73 nei processi di sviluppo e di progressione tumorale</i>	pag. 58
5.2 Scopo		
5.3 Risultati		
5.3.1	<i>L'attività antitumorale dell' APCP è associata ad un aumento del rilascio di citochine T_H17/T_H1-like</i>	pag. 61
5.3.2	<i>Il trattamento con APCP aumenta i livelli di linfociti B infiltrati nella lesione tumorale</i>	pag. 63
5.3.3	<i>I linfociti B contribuiscono agli effetti anti-tumorali dell'APCP</i>	pag. 64
5.3.4	<i>Gli effetti anti-tumorali dell'APCP dipendono dal rilascio di IL-17</i>	pag. 66
5.3.5	<i>L'APCP non altera la crescita tumorale nei topi nudi</i>	pag. 67

5.4 Discussione

CAPITOLO 6 pag. 70
Conclusioni

CAPITOLO 7 pag. 72
Materiali e metodi

CAPITOLO 8 pag. 76
Bibliografia

L'Adenosina (Ado) è una molecola segnale di origine purinica che esplica le sue funzioni metaboliche mediante quattro recettori metabotropici (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3). L'Ado è un autacoide ad attività pleiotropica, che regola numerosi processi fisiopatologici, inclusi i processi a carattere infiammatorio/immunitario come il cancro (Ramkumar et al., 1993). L'Ado è prodotta da due enzimi, il CD39 e il CD73, la cui attività aumenta in condizioni ipossiche determinando un accumulo di Ado ad elevate concentrazioni, nel tessuto interessato dall'ipossia, come quello tumorale. In tali condizioni, l'Ado esercita complessivamente potenti effetti immuno-soppressivi, mediati dal recettore A_{2A} , che favoriscono la crescita tumorale. Tuttavia, in ragione della sua *signaling pathway* il recettore A_3 può presentare effetti opposti a quelli dell' A_{2A} . Studi clinici hanno evidenziato che il recettore A_3 dell'Ado, la cui espressione aumenta significativamente nei tessuti cancerosi rispetto a quelli "normali", potrebbe essere considerato un importante marker tumorale. Inoltre, agonisti selettivi del recettore A_3 dimostrano potenziali effetti antitumorali sia *in vitro* che *in vivo*.

Recenti studi hanno dimostrato che la riduzione dei livelli di Ado generata dal CD73 nel tumore può rappresentare un'altra importante strategia terapeutica per limitare la crescita tumorale.

Alla luce di ciò, lo scopo del presente progetto di ricerca, è stato quello di studiare il ruolo di potenziali *targets* molecolari ad attività anti-tumorale del sistema adenosinico, individuati nelle vie di trasduzione del segnale come il recettore A_3 , o nei processi metabolici di sintesi e di degradazione dell'Ado, come il CD73. I risultati ottenuti durante i quattro anni di dottorato sono stati ripartiti, nei seguenti obiettivi:

1. nella prima parte del progetto è stata valutata l'attività anti-tumorale di un agonista selettivo del recettore A_3 , il 2-chloro- N^6 -(3-iodobenzyl)adenosine-5'- N -methylcarboxamide (CI-IB-MECA), in un modello *in vitro* di carcinoma tiroideo, utilizzando una linea cellulare di carcinoma papillare differenziato (NPA), in quanto, statisticamente, è la forma più comune di carcinoma della tiroide. Dai nostri esperimenti è emerso che il CI-IB-MECA è in grado di ridurre significativamente la proliferazione delle NPA attraverso un blocco del ciclo cellulare nelle fasi G_0/G_1 .

2. alla luce dei dati ottenuti *in vitro* dai precedenti esperimenti, è stato studiato l'effetto del CI-IB-MECA in associazione con il TRAIL, attualmente in *clinical trial* per il trattamento del carcinoma tiroideo, ampiamente studiato anche in ragione della sua elevata selettività farmacologica. Gli esperimenti sono stati effettuati su linee cellulari di carcinoma tiroideo follicolare (FRO) e anaplastico (ARO), considerati i due isotipi più aggressivi nell'uomo, che difatti, come già riportato in letteratura, evidenziano una diversa resistenza al trattamento con TRAIL. Sebbene il CI-IB-MECA non influenzi la proliferazione di nessuna delle due linee cellulari di carcinoma tiroideo, somministrato in associazione con TRAIL è in grado di incrementarne significativamente gli effetti apoptotici osservati nelle FRO rispetto alla somministrazione di solo TRAIL, attraverso un meccanismo NF- κ B-dipendente.

3. data la stretta correlazione tra infiammazione e tumore, nonché tra rilascio di Ado, espressione di A_3R e crescita tumorale, abbiamo valutato l'attività del CI-IB-MECA su diverse popolazioni cellulari della risposta immunitaria, tra cui macrofagi ($M\phi$), cellule dendritiche (DCs) e linfociti T, la cui presenza a livello della lesione tumorale aumenta significativamente dopo trattamento con CI-IB-MECA in animali impiantati con cellule di melanoma B16-F10, come dimostrato in uno studio parallelo al presente progetto. Da studi *in vitro* è emerso che il CI-IB-MECA è in grado di incrementare significativamente la produzione delle citochine pro-infiammatorie IL-12 e TNF- α da parte delle suddette popolazioni cellulari, attraverso un meccanismo d'azione dipendente dalla modulazione delle *signaling pathways* dell' cAMP, PI3K/Akt, PKC e NF- κ B.

4. Infine, l'obiettivo ultimo del presente progetto è stato quello di studiare un secondo target molecolare del sistema adenosinico, attualmente di grande interesse scientifico, il CD73, considerato l'enzima limitante la sintesi dell'Ado. A tal proposito lo studio è stato

Riassunto

effettuato *in vivo* in un modello murino di melanoma B16F10, utilizzando un inibitore selettivo del CD73, l' α,β -metilene adenosine-5'-diphosphate (APCP). Nel nostro modello sperimentale, l'APCP riduce significativamente la crescita tumorale. L'attività anti-tumorale dell'APCP è associata a un significativo aumento della percentuale di linfociti T CD8⁺ e linfociti B CD19⁺ correlato ad un corrispettivo incremento del rilascio di IFN- γ e IgG2b. Inoltre gli effetti anti-tumorali dell'APCP sono strettamente dipendenti dai livelli di IL-17 rilasciata nel microambiente tumorale. Nel presente progetto di Dottorato, è stato evidenziato il potenziale terapeutico ottenibile mediante la manipolazione del sistema adenosinergico il quale, alla luce dei risultati ottenuti, potrebbe rappresentare un efficace *tool* farmacologico per la terapia anti-neoplastica.

Adenosine (Ado) is an endogenous and ubiquitous nucleoside, which synthesis is induced by the activation of two membrane surface ectonucleotidases, CD39 and CD73. Ado exerts many biological functions through the interaction with 4 distinct subtypes of G protein-coupled receptors named A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃. Increasing evidence demonstrate that adenosine plays a crucial role in inflammation and tumorigenesis.

In this study, we observed that A₃, highly expressed in cancerous tissues, has functional anti-tumor activity by inhibiting tumor cell proliferation and favoring the anti-tumor activity of some immune cells. Indeed, CI-IB-MECA (CIM), a selective A₃ adenosine receptor agonist, inhibited proliferation of cancerous thyroid cells and facilitated TRAIL-induced cell death of follicular (FRO) and anaplastic (ARO) thyroid cancer cells. These data suggested a potential activity of CIM as anti-cancer agent. Indeed, in our group we demonstrated that CIM administration reduced tumour growth in a mouse model of melanoma. In support, we observed that macrophages were able to produce more TNF- α , cytotoxic cytokine, when stimulated with CIM and LPS. This effect was NF- κ B dependent and partly explain the anti-tumour activity of CIM in a mouse model of melanoma. Moreover, the stimulation of dendritic cells (DCs) with CIM similarly increased TNF- α levels, supporting the hypothesis that A₃ stimulation changes immune cell phenotype to induce a cytotoxic immune response against cancer, as observed *in vivo*. To confirm the cytotoxic nature of CIM onto tumour cells we observed that CD8⁺ T cells, isolated from spleen of naïve C57Bl6j mice, were able to produce higher levels of TNF- α . The adoptive transfer of these CIM-stimulated CD8⁺ T cells facilitated tumor arrest in a mouse model of melanoma.

In the last year of my PhD, I focused on the metabolic activity of CD73, limiting enzyme for the extracellular Ado synthesis. The pharmacological inhibition of CD73, significantly inhibited tumor growth in melanoma-bearing mice. This phenomenon was accompanied by higher recruitment of B, CD4⁺ Th17-producing and CD8⁺ T cells into the tumor lesion,. In conclusion, this project highlighted the relevance of two potential molecular targets, A₃ and CD73, as good candidates for cancer therapy.

CAPITOLO 1

1.1 L'Adenosina

L'adenosina (Ado) è un nucleoside purinico presente in vari tessuti e organi, coinvolto nella modulazione di diversi meccanismi omeostatici cellulari (sintesi degli acidi nucleici, metabolismo degli aminoacidi e regolazione del metabolismo cellulare) (Noji *et al.*, 2004). Essa rappresenta inoltre un costituente importante di diverse molecole biologicamente rilevanti, soprattutto nei processi di tipo energetico, quali nicotinamide adenina dinucleotide (NAD), flavin adenin dinucleotide (FAD), coenzima A (Poulsen *et al.*, 1998). In condizioni patologiche (stress, dolore, ipossia, infiammazione) la produzione di questo autocoide subisce un incremento significativo a fronte di un'augmentata richiesta di energia a livello cellulare e quindi di una maggiore degradazione di adenosina trifosfato (ATP) (Cronstein, 1995; Latini Pedata, 2001). Per quanto riguarda la localizzazione cellulare della biosintesi dell'Ado, sono state descritte due vie principali: una principalmente in condizioni fisiologiche, si svolge a livello intracellulare attraverso l'azione della nucleotidasi S-adenosilomocisteina (SAH) (Fig.1A); l'altra, in condizioni patologiche, prevede la degradazione sequenziale a livello extracellulare di ATP ad ADP e successivamente ad AMP, mediante l'azione dell'apirasi CD39, per terminare con la produzione di Ado ad opera dell'enzima ecto-5'-nucleotidasi CD73, considerato l'enzima limitante dell'intero processo biosintetico (Latini and Pedata, 2001) (Fig.1B). Questa via biosintetica è utilizzata quando il fabbisogno energetico cellulare risulta aumentato ma non adeguatamente sostenuto da un incremento delle disponibilità di ossigeno come ad esempio nei processi infiammatori.

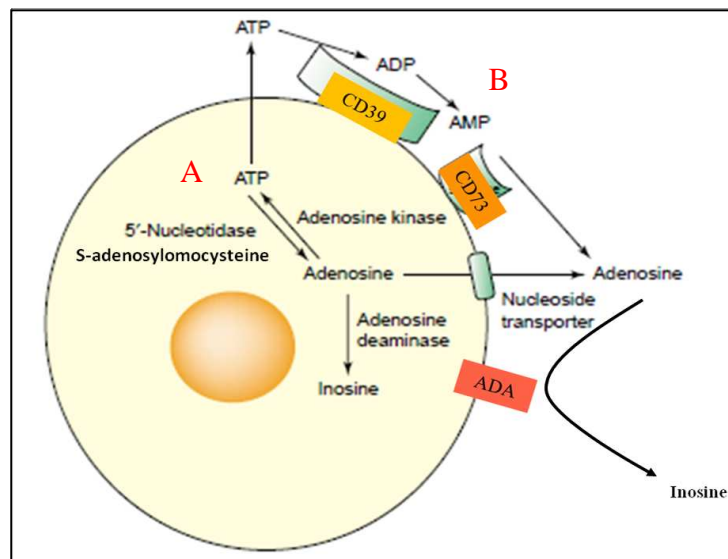


Fig.1 Biosintesi e metabolismo dell'Ado. Sintesi dell'Ado in condizioni fisiologiche (A) e patologiche (B).

1.2 Meccanismi di trasporto dell'adenosina

Il trasporto dell'Ado attraverso le membrane cellulari avviene per mezzo di *carrier* nucleosidici, i quali svolgono un ruolo importante nella regolazione dei livelli extracellulari di quest'autacoido (Cass *et al.*, 1999; Cabrita *et al.*, 2002). I trasportatori nucleosidici sono classificati in base alle loro caratteristiche funzionali e alla loro struttura molecolare in due principali categorie: 1) trasportatori nucleosidici equilibrativi; 2) trasportatori nucleosidici concentrativi (Cass *et al.*, 1998; Casado *et al.*, 2002).

I **trasportatori nucleosidici equilibrativi (ENT)** agiscono attraverso meccanismi di trasporto passivo e di diffusione facilitata. Essi facilitano il flusso di nucleosidi attraverso le membrane cellulari sfruttando il gradiente di concentrazione dell'Ado nel compartimento intra ed extracellulare. I trasportatori equilibrativi sono presenti in vari tessuti (cervello, fegato, pancreas, intestino, cuore, timo, polmone, milza, rene, muscolo scheletrico) e partecipano alla regolazione di diverse funzioni fisiologiche (Fig.2).

Attualmente sono stati identificati 4 tipi di trasportatori equilibrativi (ENT1, ENT2, ENT3 e ENT4) (Podgorska *et al.*, 2005). I trasportatori nucleosidici equilibrativi vengono classificati sulla base della loro diversa sensibilità all'inibizione da parte dell'analogo nucleosidico nitrobenziltioinosina (NBTI) (Yao *et al.*, 1997; Hyde *et al.*, 2001). Si distinguono infatti in: a) trasportatori equilibrativi-sensibili (*es*), potentemente inibiti a concentrazioni nanomolari di NBTI (ENT1 e ENT3); b) trasportatori equilibrativi-insensibili (*ei*) bloccati solo in presenza di concentrazioni micromolari di NBTI (ENT2) (Buolamwini, 1997). Le caratteristiche del trasportatore ENT4, di recente identificazione, non sono state per il momento determinate (Podgorska *et al.*, 2005).

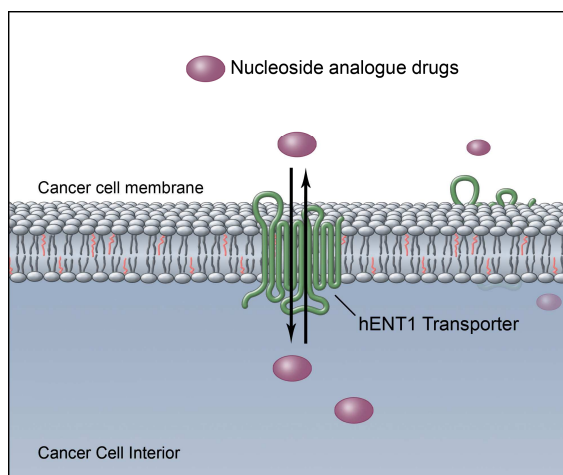


Fig.2 Rappresentazione schematica di un trasportatore per nucleosidi del tipo equilibrativo (ENT)

I **trasportatori nucleosidici concentrativi (CNT)** (Fig.3) promuovono il flusso di nucleosidi all'interno delle cellule contro gradiente di concentrazione attraverso meccanismi di trasporto attivo sodio-dipendenti. I trasportatori nucleosidici concentrativi sono suddivisi in tre sottotipi (CNT1, CNT2, CNT3), in base alla loro selettività nei confronti di diversi substrati (Wang *et al.*, 1997; Ritzel *et al.*, 2001). I trasportatori CNT1 trasportano selettivamente le pirimidine, ma hanno la capacità di legare anche le purine. Questi trasportatori rappresentano un bersaglio per vari farmaci antivirali (zidovudina, lamivudina) e per alcuni farmaci ad attività antineoplastica (citarabina, gemcitabina). I trasportatori CNT2 sono implicati nel trasporto di nucleosidi a struttura purinica. Farmaci antivirali quali didanosina e ribavirina sfruttano questo sistema di trasporto per penetrare

all'interno della cellula e svolgere la propria attività farmacologica (Gray *et al.*, 2004). La maggior parte degli studi condotti sui trasportatori nucleosidici si è concentrata sul sottotipo es poiché questi sono ampiamente espressi in molti distretti dell'organismo, dove partecipano alla regolazione di numerose funzioni fisiologiche (Noji *et al.*, 2004).

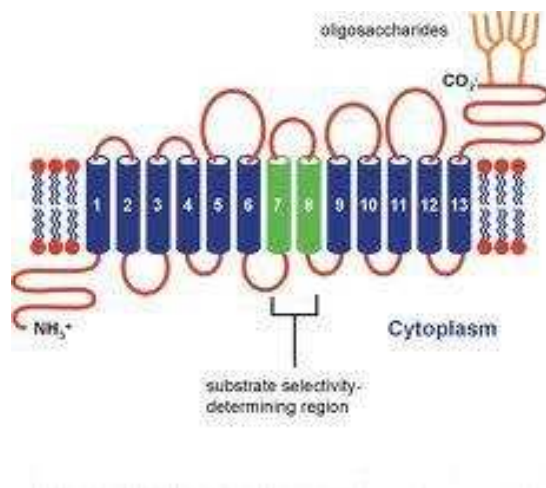


Fig.3 Rappresentazione schematica di un trasportatore per nucleosidi di tipo concentrativo (CNT)

1.3 I recettori dell'adenosina

I recettori per l'Ado sono di tipo metabotropico ovvero monomeri molecolari costituiti da una singola catena peptidica che attraversa la membrana cellulare sette volte, interagendo, nello spazio citoplasmatico, con una proteina G. Nel 1978 Burnstock propose l'esistenza di almeno due tipi di recettori per le purine, denominati P1 e P2. La sigla P1 identifica la famiglia di recettori maggiormente sensibili ad Ado, mentre i recettori P2 sono preferenzialmente attivati da ATP e ADP (Burnstock, 1978). L'antagonismo funzionale tra ATP e Ado è molto interessante, in quanto l'ATP, presente nelle terminazioni sinaptiche e parasinaptiche, genera Ado. L'ATP induce attività rapide e transitorie di tipo eccitatorio, mentre l'Ado evoca effetti lenti e inibitori. L'Ado regola quindi con un meccanismo di *feedback* inibitore sia le attività eccitatorie dell'ATP, che quelle di neurotrasmettitori co-liberati con ATP dai terminali nervosi. Questa complessa regolazione suggerisce che più elevato è il grado di attivazione iniziale, e quindi maggiore è la liberazione di ATP, maggiore sarà il controllo inibitore esercitato dall'Ado, in quanto maggiore sarà la quantità di nucleoside che si forma a partire dall'ATP (Sawynok, 2007). Un ulteriore criterio di differenziazione tra recettori P1 e P2 è basato sulla diversa sensibilità agli antagonisti di tipo xantinico: infatti i recettori P1 sono inibiti competitivamente da farmaci xantini quali caffeina, teofillina e teobromina, che sono inattivi sui recettori P2. Questa suddivisione generale in recettori P1 e P2 ha rappresentato la base per l'attuale classificazione e nomenclatura di questi recettori. Ciascuna delle due famiglie comprende diversi sottotipi recettoriali identificabili in base al profilo farmacologico, al meccanismo di traduzione del segnale e alla struttura molecolare (Fredholm *et al.*, 2001).

L'Ado può interagire con 4 sottotipi recettoriali (P1) localizzati a livello della membrana citoplasmatica (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) e che hanno una distribuzione variabile in diversi sistemi (sistema nervoso centrale, cardiovascolare, renale, respiratorio, immunitario e gastrointestinale) dove partecipano alla modulazione delle normali funzioni biologiche (Ralevic and Burnstock, 1998).

In passato, i recettori dell'Ado sono stati classificati in base alla loro struttura molecolare, al loro profilo farmacologico e al loro meccanismo di trasduzione del segnale (Fredholm *et al.*, 2001). Ciascun sottotipo è accoppiato ad un determinato tipo di proteina G, che può essere stimolatrice (Gs) o inibitrice (Gi). La stimolazione di questi recettori può determinare l'attivazione o l'inibizione dell'adenilato ciclasi, rispettivamente. Inoltre, in alcuni tessuti, i recettori A₁ e A₃ sono capaci di modulare l'attività della fosfolipasi C e, nel caso del recettore A₁, di canali ionici per il Ca²⁺ o K⁺ (Fredholm *et al.*, 2001).

1.3.1 Recettore A₁

Ampiamente espresso in tutti i distretti dell'organismo, il recettore A₁ presenta la sua massima espressione a livello cerebrale, spinale, cardiaco e adiposo (Ciruela *et al.*, 2010). Attraverso l'interazione con questo recettore, l'Ado regola diverse funzioni fisiologiche tra cui gittata cardiaca, filtrazione glomerulare, rilascio di renina e lipolisi (Elzein and Zablocko 2008). Il recettore A₁ è un recettore accoppiato a proteina G_i, la cui attivazione comporta una rapida diminuzione dei livelli di cAMP intracellulari, attraverso l'inibizione dell'adenilato-ciclasi. Tuttavia ulteriori studi hanno evidenziato diverse *pathways* associate all'attività di questo recettore tra cui l'attivazione di canali per il potassio, l'inattivazione di canali per il calcio (di tipo N, P e Q), l'attivazione della fosfolipasi C e la regolazione di diverse chinasi mitogene (Fredholm *et al.*, 2001). Infatti alcuni autori hanno dimostrato che la stimolazione del recettore A₁ transientemente espresso in cellule COS-7, determina l'attivazione della chinasi mitogena ERK1/2 attraverso la mobilizzazione della subunità βγ di una proteina G_i. Successivi studi effettuati su cellule CHO dimostrano inoltre, che lo stato di fosforilazione di ERK1/2 può essere direttamente correlato alla *pathway* dell'asse PI3K-Akt (Schulte and Fredholm, 2000; Dickenson *et al.*, 1998). (Fig.4)

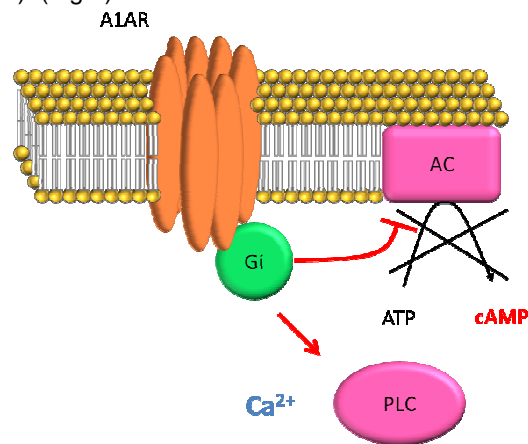


Fig.4 Rappresentazione schematica del recettore A1 con le sue principali *signaling pathways*

1.3.2 Recettore A_{2A}

Questo sottotipo recettoriale è stato identificato insieme al sottotipo A_{2B} nei mastociti presenti nel fluido broncoalveolare umano, e per questo è stato ipotizzato un suo ruolo importante nella patogenesi dell'asma e della broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) (Polosa *et al.*, 2002). La trasduzione del segnale avviene attraverso una proteina G_s (Klinger *et al.*, 2002). L'effettore coinvolto è l'adenilato ciclasi (Fredholm *et al.*, 2001). L'identificazione e la caratterizzazione di ligandi potenti e selettivi per il recettore A_{2A} ha permesso un'analisi delle diverse risposte funzionali indotte dall'attivazione o dall'inibizione del recettore e, di conseguenza, è stata compresa la sua importanza biologica in condizioni sia fisiologiche che patologiche, quali ischemia/ipossia, infiammazione e cancro (Pedata *et al.*, 2005). Anche l'attivazione del recettore A_{2A} determina un aumento dell'attività di ERK1/2. Infatti agonisti selettivi- A_{2A} esercitano effetti mitogeni sulle cellule endoteliali attraverso l'attivazione della *signaling pathway* cAMP-ras-MEK1 (Sexl *et al.*, 1997). Tuttavia le *signaling pathways* utilizzate da questo recettore dipendono dal *background* molecolare e dal *network* di segnali cellulari che contraddistingue il tipo di cellula. Infatti in molti casi ad esempio, l'attivazione di ERK1/2 non dipende dall'asse G_s -cAMP-PKA, ma dalla PKC. Inoltre in alcuni casi l'attivazione del recettore A_{2A} non aumenta lo stato di fosforilazione di ERK, ma bensì lo riduce (Seidel *et al.*, 1999) (Fig.5).

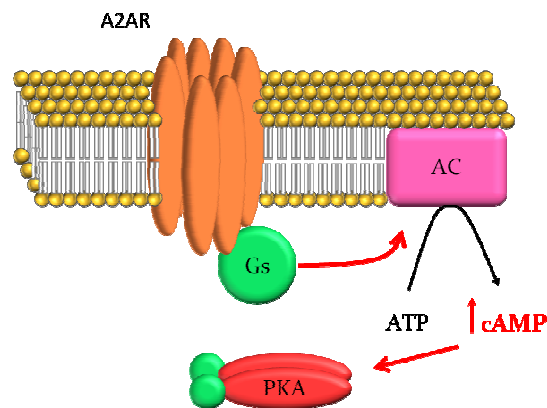


Fig.5 Rappresentazione schematica del recettore A_{2A} con le sue principali *signaling pathways*

1.3.3 Recettore A_{2B}

I recettori A_{2B} sono stati clonati dall'ipotalamo di ratto (Rivkees e Reppert, 1992), dall'ippocampo umano (Pierce *et al.*, 1992) e dai mastociti di topo (Marquardt *et al.*, 1994), utilizzando la tecnica di *polymerase chain reaction* (PCR). La trasduzione del segnale avviene attraverso una proteina G_s che induce un aumento dei livelli di cAMP e successiva attivazione di proteinchinasi (Polosa, 2002). Il recettore A_{2B} possiede inoltre la capacità di aumentare i livelli di IP_3 , suggerendo un accoppiamento anche con una proteina di tipo G_q , e determinando quindi la liberazione degli ioni calcio dai depositi cellulari (Klinger *et al.*, 2002). Tuttavia, il recettore A_{2B} è il solo sottotipo adenosinico capace di attivare non solo ERK1/2, ma anche le chinasi mitogene JNK e p38 (Feoktistov *et al.*, 1999) (Fig.6).

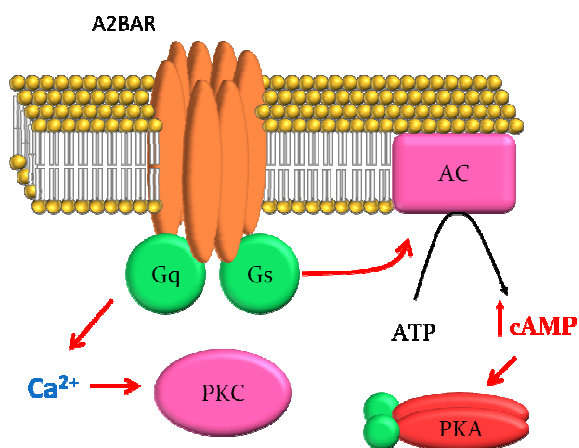


Fig.6 Rappresentazione schematica del recettore A_{2B} con le sue principali *signaling pathways*

1.3.4 Recettore A_3

I recettori A_3 sono stati identificati nel ratto a livello di reni, tessuto cardiaco, cervello, polmone e testicoli. Nell'uomo i recettori A_3 sono presenti a livello di fegato, placenta, reni, cervello, aorta, cuore, polmoni, testicoli e tratto gastrointestinale (Fredholm *et al.*, 2001). Questo sottotipo recettoriale presenta un meccanismo di trasduzione analogo a quello dei recettori A_1 , dove la proteina G è di tipo inibitore, ed ha quindi la capacità di bloccare l'attività dell'adenilato ciclastasi riducendo i livelli di AMPc. Tuttavia, questa non sembra essere l'unica via di trasduzione, poiché è stato dimostrato che anche un incremento dei livelli di IP_3 , con conseguente attivazione dei canali al calcio, attraverso l'attivazione di una proteina G_q (Poulsen *et al.*, 1998). Analogamente agli altri recettori anche il recettore A_3 è in grado di attivare direttamente ERK1/2, anche se, come per tutti i recettori adenosinici, i suoi effetti dipendono dal tipo cellulare e dallo stato di differenziazione, e dai livelli di espressione di tutti i recettori (Fig.7).

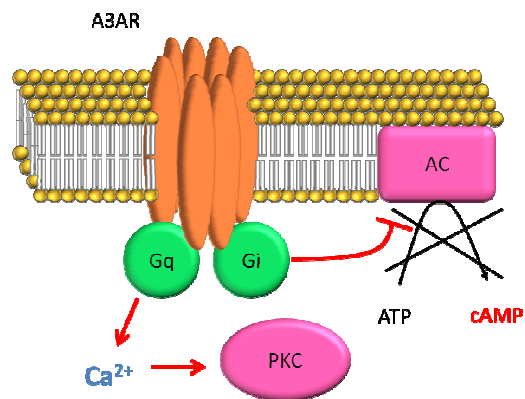


Fig.7 Rappresentazione schematica del recettore A_3 con le sue principali *signaling pathways*

1.4 Adenosina e cancro

Nel corso degli ultimi decenni la ricerca contro il cancro ha cercato di studiare nuovi *targets* molecolari che mostrassero elevata specificità di espressione soprattutto a livello della lesione neoplastica, tanto da poter essere identificati, in taluni casi, come *marker* tumorali. Elevati livelli di Ado sono stati osservati nei liquidi interstiziali delle lesioni neoplastiche e l'alta concentrazione di questo autacoide sembra essere uno dei principali fattori che partecipa ai processi di crescita e di progressione tumorale. Essendo l'Ado una molecola altamente instabile (di breve emivita), i suoi effetti sono limitati al microambiente in cui viene rilasciata e dipendono principalmente dai diversi livelli di espressione dei quattro recettori metabotropici da essa attivati. Infatti è stato osservato che il livello di espressione dei recettori dell'Ado varia quando si passa da una condizione fisiologica ad una condizione patologica come il cancro. A tal proposito, al fine di studiare il ruolo dell'Ado nella fisiopatologia tumorale, negli ultimi anni sono stati effettuati numerosi studi per mettere in luce il ruolo biologico e funzionale dei recettori dell'Ado.

1.4.1 Ruolo dei recettori dell'Adenosina nel cancro

La prima evidenza scientifica del coinvolgimento dell'Ado nella fisiopatologia del cancro deriva dai risultati ottenuti dagli studi riguardanti la risposta immunitaria contro il tumore. E' oramai ben noto infatti che la capacità del sistema immunitario di combattere le cellule tumorali è fondamentale affinché l'organismo reagisca contro la patologia neoplastica. E' riportato in letteratura che l'Ado, la cui concentrazione risulta essere particolarmente elevata nelle regioni ipossiche della lesione neoplastica, è in grado di ridurre il reclutamento dei linfociti CD8⁺ citotossici, alterandone inoltre, l'attività citolitica (Blay et al., 1997; Merighi et al., 2003). L'immunoterapia adottiva mediante l'utilizzo di *Lymphokine-activated Killer* (LAK), ovvero di cellule del sistema immunitario preventivamente attivate e iniettate nel paziente, si è dimostrata una promettente strategia terapeutica per il trattamento di alcuni carcinomi non responsivi alla chemioterapia convenzionale. Tuttavia l'adenocarcinoma di colon dimostra una certa resistenza alla terapia con LAK, probabilmente a causa di una condizione di immunosoppressione tissutale caratteristica del microambiente della lesione stessa. E' stato così dimostrato che l'attività dei LAK nel microambiente tumorale veniva inibita dal rilascio di un fattore solubile diverso dal TGF- β e dalle prostaglandine (Hoskin et al., 1994) che successivamente è stato identificato nell'Ado. Esperimenti eseguiti su cellule ed animali AR knock-out e mediante l'utilizzo di ligandi selettivi per i singoli recettori hanno dimostrato che l'Ado attraverso l'attivazione del recettore A_{2A} sopprime l'attività citotossica dei LAK mediante l'incremento dei livelli di cAMP intracellulare. Per ottenere informazioni più dettagliate riguardo al ruolo svolto dall'Ado nei processi di sviluppo e di progressione tumorale è necessario analizzare individualmente gli effetti dell'attivazione dei quattro recettori adenosinici in maniera più approfondita..

1.4.1a Ruolo del recettore A₁ nel cancro

Allo stato attuale non è ancora ben chiaro il ruolo svolto dal recettore A₁ nei processi di sviluppo e progressione tumorale. Elevati livelli di espressione del recettore A₁ sono stati osservati in tessuti e modelli cellulari di diversi tipi di tumore, come adenocarcinoma colon-rettale, *human leukemia Jurkatt cell*, e cellule di melanoma umano A375 (Gessi et al., 2001; Merighi et al., 2001). Studi *in vitro* dimostrano che l'attivazione del recettore A₁ determina un blocco della proliferazione cellulare (D'Ancona et al., 1994; Shaban et al., 1995), suggerendo un potenziale effetto anti-tumorale. Tuttavia altri autori hanno dimostrato che il recettore A₁, espresso su linee cellulari di melanoma, favorisce la chemiotassi tumorale favorendo al contrario il fenomeno delle metastasi (Woodhouse et al., 1998). Inoltre una maggiore espressione di tale recettore è stata rilevata in tessuti di tumore di carcinoma della mammella e sulle corrispondenti linee cellulari MDA-MB-468,

sulle quali, la deplezione del recettore A_1 determina una riduzione della crescita e della proliferazione cellulare. A tal proposito, infatti, silenziando l'espressione del recettore A_1 , mediante siRNA, si osserva un arresto del ciclo cellulare che determina un accumulo di cellule in fase G2/M. Studi più approfonditi, hanno dimostrato che la deplezione del recettore A_1 mediante siRNA determina un aumento dell'espressione di diversi regolatori chiave del ciclo come p27, ed una riduzione dell'espressione di ciclina E e CDK4, e rende le cellule neoplastiche più predisposte alla morte programmata. Tali dati quindi suggeriscono che il recettore A_1 può modulare la crescita ed la sopravvivenza delle cellule di carcinoma alla mammella (Mirza et al., 2005). Elevati livelli di espressione del recettore A_1 sono stati riscontrati nelle regioni di tessuto che circondano il tumore in un modello di glioblastoma F98 e le analisi immunologiche identificano negli astrociti i principali elementi cellulari a mostrare una sovra-espressione del recettore (Bauer et al., 2005). L'elevata distribuzione del recettore A_1 in modelli di ratto di tumori al cervello è stata confermata in diversi studi (Dehnhardt et al., 2007; Castillo et al., 2007). In particolare è riportato in letteratura che gli effetti inibitori dell'Ado sulla crescita del glioblastoma dipendono dall'attivazione del recettore A_1 espresso sulle cellule di microglia (Synowitz et al., 2006). Ciò quindi implica che l'attivazione del recettore A_1 riduce la crescita tumorale in diversi modelli sperimentali di glioblastoma. Quindi concludendo, il recettore A_1 svolge un ruolo pro- o anti-apoptotico a seconda del tessuto e del tipo di tumore preso in considerazione.

1.4.1b Ruolo del recettore A_{2A} nel cancro

Come per gli altri recettori dell'Ado, i dati relativi al ruolo del recettore A_{2A} sulla biologia e sulla fisiopatologia del cancro sono ancora poco chiari e a volte contrastanti. Alcuni autori dimostrano che l'attivazione del recettore A_{2A} , su cellule di carcinoma della mammella MCF-7, induce un aumento della proliferazione cellulare ed interferisce con la trasduzione del segnale estrogeno-dipendente indotta da etanolo, dimostrando un effetto pro-tumorale (Etique et al., 2009). Per contro, altri autori dimostrano che l'attivazione del recettore A_{2A} induce apoptosi in cellule di melanoma umano A375 ed in cellule di carcinoma del colon Caco-2 in maniera caspasi-dipendente (Merighi et al., 2002; Yasuda et al., 2009). Tuttavia è opportuno notare che tali studi sono stati effettuati *in vitro* e non tengono conto degli effetti dell'Ado sulla componente stromale e soprattutto su quella immunitaria sulla quale il recettore A_{2A} svolge le sue principali funzioni omeostatiche. Infatti, studi *in vivo* effettuati su diversi modelli di tumore solido, dimostrano che il recettore A_{2A} , attivato dagli elevati livelli di Ado rilasciata nel microambiente della lesione neoplastica, svolge un'azione immunosoppressiva soprattutto nei confronti dei linfociti T, sopprimendo significativamente la risposta anti-tumorale (Koshiba et al., 1997). Inoltre numerosi studi dimostrano che l'Ado promuove l'angiogenesi attraverso l'attivazione del recettore A_{2A} che favorisce la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali ed incrementando il rilascio di importanti fattori di crescita quali il *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Sexl et al., 1997; Montesinos et al., 2002; Leibovich et al., 2002; Luty et al., 2003). Gli effetti immunosoppressivi del recettore A_{2A} e la capacità dello stesso di promuovere l'angiogenesi suggeriscono che tale recettore giochi un ruolo importante nel promuovere la sopravvivenza e l'*immune escape* dei tumori solidi in condizioni ipossiche. In ragione della sua funzione omeostatica che protegge il tessuto dell'ospite da una eccessiva risposta immunitaria, il recettore A_{2A} partecipa a fenomeni di *immuno-editing*, favorendo l'*escape* delle cellule tumorali dalla sorveglianza del sistema immunitario. A tal proposito importanti studi sono stati effettuati dai gruppi di ricerca di Otha e Sitkovsky i quali, attraverso l'utilizzo di animali A_{2A} AR-KO hanno dimostrato per la prima volta che il recettore A_{2A} riveste un ruolo non ridondante nel mediare gli effetti anti-infiammatori dell'Ado. (Otha and Sitkovsky 2001). Gli animali A_{2A} AR-KO inoltre risultano incapaci di controllare gli stati infiammatori, fino alla massiva distruzione dei tessuti che risultava, il

più delle volte, fatale. Alla luce di tali risultati si ipotizzò un modello fisio-patologico in cui condizioni infiammatorie determinano il rilascio di elevati livelli di Ado, la quale, mediante l'attivazione del recettore A_{2A} AR svolge l'importante ruolo di ridurre la risposta infiammatoria attraverso la modulazione dell'attività della componente immunitaria di derivazione ematopoietica. In accordo con tale modello, inoltre, altri autori hanno dimostrato che l'attivazione del recettore A_{2A} -AR sullo stipite macrofagico e sulle cellule dendritiche, ne limita notevolmente l'attività effettrice. (Erdmann et al., 2005; Huang et al., 1997; Khoa et al., 2001; Lappa et al., 2005; Naganuma et al., 2006; Panther et al., 2001; Schnurr et al., 2004). Analogamente l'Ado è in grado di sopprimere la risposta immunitaria mediata dai linfociti T $CD4^+$ e $CD8^+$ citotossici, caratterizzando una condizione di anergia (Zarek et al., 2008). In accordo con i dati già noti in letteratura, alcuni autori hanno dimostrato che i segnali adenosinergici mediano anche gli effetti immuno-soppressivi delle cellule Treg, mediante la produzione di Ado stessa e l'interazione col recettore A_{2A} . Quest'ultima osservazione ha indotto a rivedere i *cluster* molecolari di differenziazione cellulare al punto tale da cominciare a considerare il recettore A_{2A} uno dei markers fenotipici con la maggiore specificità di questo sottotipo linfocitario. Inoltre è stato osservato che la stimolazione del recettore sui linfociti T, non solo inibisce la generazione di cellule effettrici TH1, TH17 ma promuove anche la differenziazione e maturazione delle cellule Treg (Zarek et al., 2008). Infatti in accordo con quanto detto fin'ora, in topi A_{2A} AR-KO si osserva un importante effetto anti-tumorale mediato dai linfociti $CD8^+$ associata ad una drammatica riduzione della crescita tumorale in diversi modelli sperimentali di tumore (Hoskin et al., 2008)

1.4.1c Ruolo del recettore A_{2B} nel cancro

Nonostante l'elevata distribuzione tissutale, l'attivazione del recettore A_{2B} avviene solamente in condizioni patologiche, ovvero quando i livelli di Ado raggiungono valori 100 volte superiori a quelli fisiologici. Tuttavia, data la sua elevata espressione a livello delle cellule che costituiscono la micro-vascolarizzazione, riveste un ruolo particolarmente significativo nei processi di angiogenesi, attraverso il rilascio di diversi fattori pro-angiogenetici. Infatti in condizioni infiammatorie, elevati livelli di Ado determinano l'attivazione del recettore A_{2B} che regola l'espressione di fattori angiogenetici come il VEGF, l'IL-8 e il basic fibroblast growth factor (bFGF). Alla luce di ciò, quindi, l'utilizzo di antagonisti del recettore A_{2B} potrebbe rappresentare una possibile strategia terapeutica per bloccare la neovascolarizzazione a livello delle lesioni neoplastiche. (Feoktistov et al., 2002). Tuttavia, oltre agli effetti indiretti che lo vedono coinvolto nei fenomeni di neovascolarizzazione, il recettore A_{2B} è direttamente implicato nella modulazione della proliferazione cellulare. In cellule di carcinoma mammario estrogeno-indipendenti MDA-MB-231 l'attivazione del recettore A_{2B} è responsabile della riduzione dei livelli di attivazione della chinasi mitogena ERK1/2 e di conseguenza, della crescita cellulare (Bieber et al., 2008). Per contro, topi A_{2B} -KO inoculati con cellule di carcinoma polmonare di Lewis (LLC), mostrano una attenuazione della crescita tumorale ed una più lunga sopravvivenza rispetto agli animali di controllo (Ryzhov et al., 2008). Poche e a volte, contrastanti sono le informazioni riportate in letteratura riguardo al ruolo del recettore A_{2B} nei fenomeni di carcinogenesi e progressione tumorale e pertanto ulteriori studi sono necessari al fine di chiarirne il significato biologico.

1.4.1d Ruolo del recettore A₃ nel cancro

L' utilizzo di ligandi selettivi del recettore A₃ come potenziali agenti anti-tumorali per il trattamento di alcuni tipi di carcinoma, sta suscitando di recente l'interesse di numerosi ricercatori. L'ipotesi secondo la quale il recettore A₃ possa svolgere un ruolo cruciale nella regolazione della crescita tumorale è avvalorata da numerosi studi condotti su numerose linee cellulari tumorali (Fishman et al., 2002; Merighi et al., 2003; Morello et al., 2007). Sono ampiamente riportati in letteratura gli effetti regolatori del recettore A₃ sul ciclo cellulare, e la capacità di indurre apoptosi in diversi modelli di tumore (Jacobson, 1998; Yao et al., 1997; Gao et al., 2001; Merighi et al., 2005a; Nakamura et al., 2006 and Gessi et al., 2007). E' stato dimostrato che l'attivazione del recettore A₃ è in grado di inibire la crescita tumorale attraverso la regolazione della *pathway* Wnt (Fishman et al., 2004). La *pathway* Wnt ha un'importanza cruciale durante i processi di embriogenesi e tumorigenesi in quanto favorisce la progressione del ciclo cellulare. Il modulatore molecolare di questa *signalling pathway* è il GSK-3 β , il quale attraverso la fosforilazione della β -catenina, impedisce la trascrizione dei geni responsabili della progressione del ciclo cellulare. La somministrazione di un agonista selettivo A₃R induce un aumento dei livelli di espressione di GSK-3 β il quale, interferendo con il ciclo cellulare, determina il blocco della proliferazione. Inoltre gli effetti anti-proliferativi del recettore A₃ sono anche mediati dalla modulazione dell'attività di NF- κ B, un importante fattore di trascrizione implicato nei segnali di sopravvivenza, responsabile dell'espressione di diverse molecole coinvolte nel ciclo cellulare (Fishman et al., 2003 and Fishman et al., 2004). Altri autori dimostrano che gli effetti anti-tumorali del recettore A₃ su cellule di carcinoma prostatico sono direttamente correlati ad una riduzione dei livelli di fosforilazione di ERK1/2. Oltre agli effetti anti-proliferativi osservati sia *in vitro* che *in vivo*, gli agonisti del recettore A₃ dimostrano un importante effetto mielo-stimolante, attraverso l'aumento della produzione del fattore G-CSF da parte delle cellule mononucleate. Quest'ultimo aspetto ha indotto i ricercatori a considerare il recettore A₃ un potenziale target terapeutico per il trattamento di alcune neoplasie come il carcinoma del colon (Jacobson & Gao, 2006). A supporto di tali osservazioni altri autori dimostrano che l'agonista selettivo CI-IB-MECA è in grado di ridurre la proliferazione cellulare delle cellule tumorali *in vitro* (Merighi et al., 2005). A sostegno di un possibile impiego di agonisti selettivi del recettore A₃ per il trattamento dei tumori, esistono studi *in vivo* effettuati su diversi modelli singenici, xenografici alcuni dei quali ortotopici come il melanoma, in cui si è visto che la somministrazione di agonisti selettivi del recettore A₃ riduce efficacemente la crescita tumorale (Morello et al., 2001). Inoltre in un modello murino di metastasi, l'IB-MECA riduce significativamente le metastasi polmonari indotte da cellule B16-F10 (Bar-Yehuda et al., 2001). Anche in questo caso i ricercatori per constatare l'effettiva implicazione del recettore A₃ hanno somministrato un antagonista recettoriale A₃ osservando un annullamento degli effetti indotti dall'IB-MECA. Infine, in regimi terapeutici associativi, agonisti A₃AR incrementano significativamente gli effetti anti-tumorali di agenti chemioterapici come la ciclofosfamide (Fishman et al., 2001). Alla luce di quanto detto fin'ora, in ragione della sua efficacia terapeutica per il trattamento di diverse neoplasie, e soprattutto, per le sue caratteristiche di sicurezza terapeutica, il recettore A₃ rappresenta uno dei target molecolari con maggiori prospettive di impiego per la cura del cancro.

CAPITOLO 2

2.1 Introduzione

2.1.1 Il carcinoma tiroideo

Il carcinoma tiroideo rappresenta meno dell'1% di tutti i casi di tumori maligni diagnosticati ogni anno. Si può manifestare a tutte le età con massima incidenza tra i 25 e i 60 anni e con una maggiore prevalenza nel sesso femminile. La sopravvivenza è molto elevata superando il 90% a 5 anni nelle forme differenziate. I tumori della tiroide originano nella maggior parte dei casi dalle cellule follicolari (che compongono il tessuto tiroideo insieme alle cellule parafollicolari o C) e da un punto di vista istologico si distinguono in 4 isotipi:

- Carcinoma Papillare (PTC): è la forma più frequente di carcinoma differenziato della tiroide (circa il 75% dei casi). È caratterizzato da papille con nuclei a vetrino di orologio, non capsulato ed a crescita lenta. Può dare luogo a metastasi che interessano i linfonodi del collo. In alcuni pazienti il tumore è multifocale e può interessare entrambi i lobi della tiroide.
- Carcinoma Follicolare (FTC): rappresenta il 15% dei carcinomi differenziati della tiroide e colpisce per lo più persone di età superiore ai 50 anni. Si presenta in differenzioni follicolari, con invasione della capsula e dei vasi. Può dar luogo a metastasi polmonari e ossee per via ematogena.
- Carcinoma Midollare (MTC): origina dalle cellule parafollicolari (o cellule C) e si caratterizza per la presenza di elevati livelli circolanti di calcitonina. Si presenta con cellule aventi nuclei molto grandi.
- Carcinoma Anaplastico (UTC): è un tumore molto raro (<1% dei casi di tumore alla tiroide) ma particolarmente aggressivo perché molto invasivo e quindi di difficile gestione, in quanto può dar luogo a metastasi a distanza molto precocemente.

I tumori papillare, follicolare e anaplastico derivano dall'epitelio follicolare, mentre il tumore midollare deriva dalle cellule parafollicolari della tiroide (Gimm, 2000).

Altri casi riguardano tumori di origine linfatica (linfomi) o di origine muscolare e cartilagineo a livello dei tessuti che circondano la ghiandola (sarcomi), o infine tumori metastatici, ovvero che originano da altri organi (Gimm, 2000). Il carcinoma papillare rappresenta l'80% di tutte le neoplasie tiroidee ed in rari casi può dar luogo a metastasi distanti prevalentemente a livello polmonare (Lin et al., 2004), mentre il carcinoma follicolare è il secondo più comune (10%) (Gimm, 2000). La prognosi dipende dal tipo di tumore, dallo stadio di progressione, dalle eventuali metastasi, dall'età del paziente e dal suo stato di salute generale. Alcuni tipi di carcinoma tiroideo proliferano molto più rapidamente di altri. Le forme di carcinoma differenziato hanno una buona prognosi in quanto le cellule conservano ancora la loro attività fisiologica, mentre quelle indifferenziate, come appunto l'anaplastico, presentano prognosi infausta, in quanto estremamente aggressivi e poco responsivi alle terapie (Braverman and Utiger, 1996). L'eziologia di molti tumori tiroidei è ancora sconosciuta. Probabilmente nei tumori differenziati la componente familiare potrebbe essere una delle cause. Alterazioni genetiche di diversi oncogeni come *ras*, *ret*, *rtk* e di oncosoppressori come *p53*, *Rb*, *p21/Waf1* sono coinvolti nella tumorigenesi della tiroide (Shi et al., 1996). La prevalenza di mutazioni del gene *p53* è stata riportata nel 75-80% dei tumori anaplastici rispetto allo 0-9% osservate nei tumori differenziati (Donghi et al, 1993). Il trattamento dei pazienti con cancro alla tiroide prevede 4 diversi approcci medici:

- Chirurgia
- Radioterapia
- Terapia ormonale

- Chemioterapia

La chirurgia rappresenta il tipo più comune di trattamento per il cancro alla tiroide. In base al tipo di tumore ed al grado di aggressività essa può prevedere lobectomia, tiroidectomia subtotale, tiroidectomia totale, dissezione linfonodale.

La radioterapia si serve di radiazioni ad elevata frequenza per distruggere le cellule tumorali. Tale procedura può essere effettuata mediante un'apparecchiatura che investe il tumore con radiazioni provenienti dall'esterno, o mediante l'utilizzo di iodio radioattivo che per i tumori differenziati, ovvero quei tumori che conservano la capacità fisiologica di ricaptare lo iodio, risulta particolarmente efficace.

La terapia ormonale prevede l'utilizzo di ormoni allo scopo di arrestare la crescita delle cellule cancerose. La somministrazione in genere avviene per via orale.

La chemioterapia è fondamentalmente un trattamento di tipo sistemico che utilizza farmaci ad attività citotossica che potenzialmente dovrebbero essere maggiormente efficaci nei confronti delle cellule tumorali rispetto al tessuto circostante. La combinazione e l'utilizzo di queste terapie dipendono dal tipo di tumore preso in considerazione.

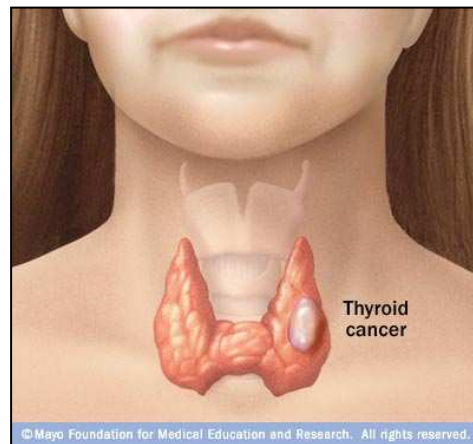


Fig.5 Carcinoma Tiroideo

2.2 Scopo

Il carcinoma tiroideo rappresenta una delle più comuni forme neoplastiche che interessano il sistema endocrino, nonché uno dei tumori maligni più difficili da gestire. Sebbene il 95% delle neoplasie tiroidee origini a livello follicolare e si presenti piuttosto differenziata, l'individuazione della lesione neoplastica viene il più delle volte, effettuata in rilevante ritardo rendendo difficile di conseguenza, l'intervento di qualsiasi approccio clinico. La maggior parte delle terapie convenzionali si dimostra molto spesso, inefficace ed altamente tossica ed inoltre i diversi isotipi istologici del carcinoma tiroideo presentano una diversa risposta agli agenti chemioterapici dimostrandosi, a volte completamente resistenti. Alla luce di ciò, risulta sempre più evidente l'esigenza di individuare nuovi target molecolari con elevata specificità tissutale sui quali poter intervenire, al fine di ottenere una migliore risposta clinica limitando al minimo la tossicità del trattamento chemioterapico. Diversi autori dimostrano che nel tessuto neoplastico è possibile rilevare una maggiore espressione del recettore A_3 rispetto al tessuto sano circostante. A tal proposito quindi, lo scopo della prima parte del presente studio è stato quello di valutare l'espressione del recettore A_3 su campioni istologici tiroidei prelevati da pazienti sani ed affetti dalla patologia neoplastica e, successivamente, sulla base dei risultati ottenuti dagli esami istologici, valutare gli effetti di un agonista selettivo del recettore A_3 , il CI-IB-MECA in un modello cellulare di carcinoma tiroideo papillare NPA.

2.3 Risultati

2.3.1 Espressione del recettore A₃ nel tessuto tiroideo

Il primo approccio sperimentale per la realizzazione del presente studio consiste nella valutazione dell'espressione del recettore A₃ attraverso un'analisi istochimica effettuata su campioni di tessuto tiroideo marcati con anticorpo anti-A₃AR, ottenuti da pazienti affetti da carcinoma tiroideo di tipo follicolare, di tipo midollare e da pazienti affetti da una rara forma di carcinoma tiroideo anaplastico. I risultati ottenuti in questi campioni sono stati paragonati a quelli ottenuti su tessuto "normale", circostante la massa tumorale. Dall'esame istologico è emerso che mentre il tessuto sano risultava relativamente negativo allo *staining* con anticorpo anti-A₃AR, tutti e tre i tessuti malati mostravano una significativa positività d'espressione del recettore A₃ (Fig.1).

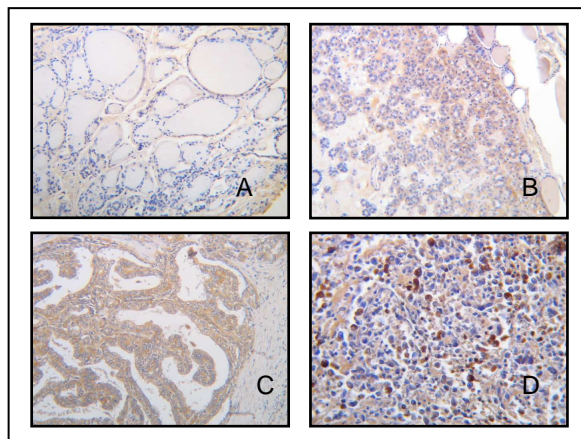


Table 1 **A3AR localization in normal and pathological human thyroid tissues**

Histological types of thyroid samples	N° positive cases / n° total cases analyzed by IHC	A3AR staining score		
		1+	2+	3+
Normal thyroid	0/4			
Follicular adenoma	2/4	2		
Papillary carcinoma	7/7	2	2	3
Follicular carcinoma	4/4		1	3
Anaplastic carcinoma	5/5	1	1	3

Fig1. Analisi immunohistochimica relativa all' espressione del recettore A₃ in tessuto tiroideo normale (A), tessuto di carcinoma tiroideo follicolare (B), papillare (C) e anaplastico (D). Tuttavia, come emerge dalla tabella 1 non abbiamo osservato differenze nel grado di espressione tra i diversi tipi di tumore. Questi dati suggeriscono quindi che il recettore A₃ è espresso in tessuti di carcinoma tiroideo, tuttavia non vi è alcuna correlazione tra l'espressione di tale recettore e il grado di differenziazione cellulare dei tumori analizzati.

2.3.2 Il CI-IB-MECA inibisce la crescita delle cellule NPA

L'elevata espressione del recettore A_3 nei tessuti tiroidei dei pazienti affetti da carcinoma, dimostra come il recettore A_3 possa rappresentare un potenziale target anti-tumorale ad elevata specificità tissutale. A tal proposito, quindi, lo *step* successivo è stato quello di studiare gli effetti di un potente agonista selettivo del recettore A_3 , il CI-IB-MECA, su una linea cellulare di carcinoma tiroideo papillare (NPA). Le NPA sono state trattate con concentrazioni crescenti di CI-IB-MECA (0.1-80 μ M) per 24 h e sono state analizzate mediante un saggio di citotossicità MTT. Dai dati è emerso che il CI-IB-MECA riduce la proliferazione cellulare delle NPA in maniera concentrazione –dipendente con una $IC_{50} = 38.29 \pm 0.062 \mu$ M (Fig.2A). Tuttavia la riduzione della proliferazione cellulare non risulta associata ad un aumento dell'apoptosi in quanto non si osservano variazioni relative alle % di nuclei ipodiploidi (Fig.2B) ed ai livelli di attivazione delle caspasi-3 e -8 (Fig.2C), suggerendo che gli effetti osservati siano da attribuire ad un blocco della crescita cellulare piuttosto che a morte programmata.

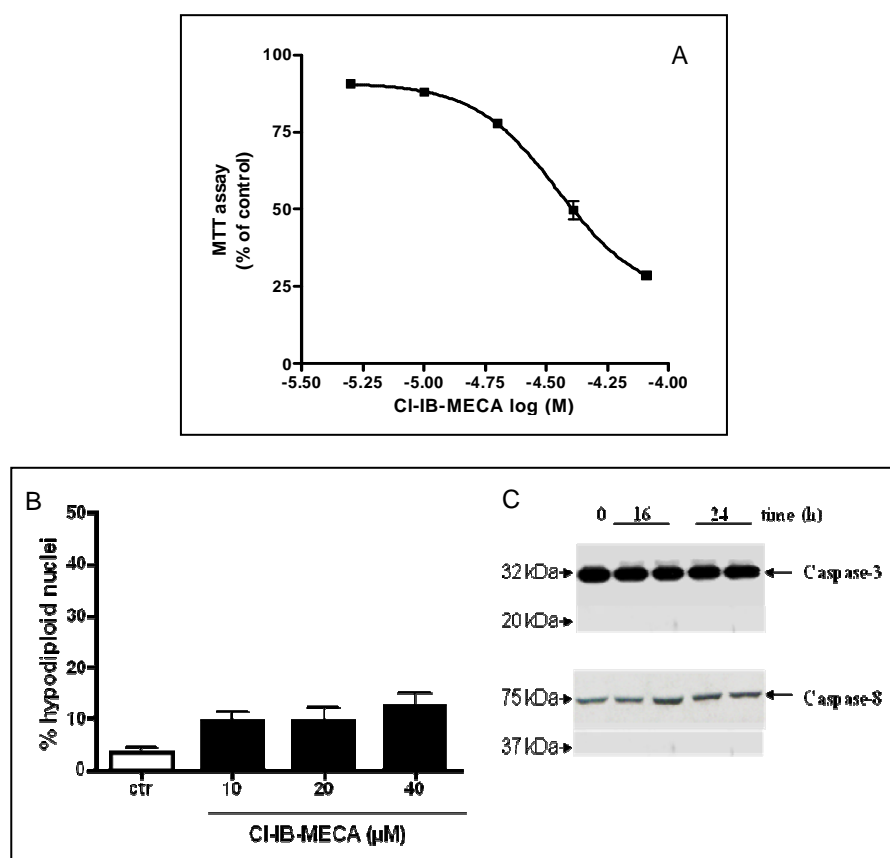


Fig2. Effetti del CI-IB-MECA sulle cellule i carcinoma umano NPA. La citotossicità è stata misurata mediante saggio MTT. Le NPA sono state trattate con CI-IB-MECA alle concentrazioni indicate per 24 h. I risultati sono stati espressi come percento di OD relativa alla vitalità cellulare confrontata con quella di cellule non trattate considerata 100%. I valori sono indicati come medie \pm SEM.

2.3.3 Il CI-IB-MECA arresta il ciclo cellulare delle cellule NPA nelle fasi G₀/G₁

Sulla base dei risultati ottenuti in precedenza, sono stati analizzati gli effetti del CI-IB-MECA sul ciclo cellulare. Dall'analisi citofluorimetrica si osserva un chiaro arresto del ciclo cellulare in fase G₀/G₁ delle cellule trattate con CI-IB-MECA (10-20-40 μ M) rispetto alle cellule di controllo, con un accumulo in fase G₁ superiore al 40% ($p < 0.001$) ed una corrispondente riduzione delle cellule in fase S (minore del 63% $p < 0.001$) (Fig.3A e B).

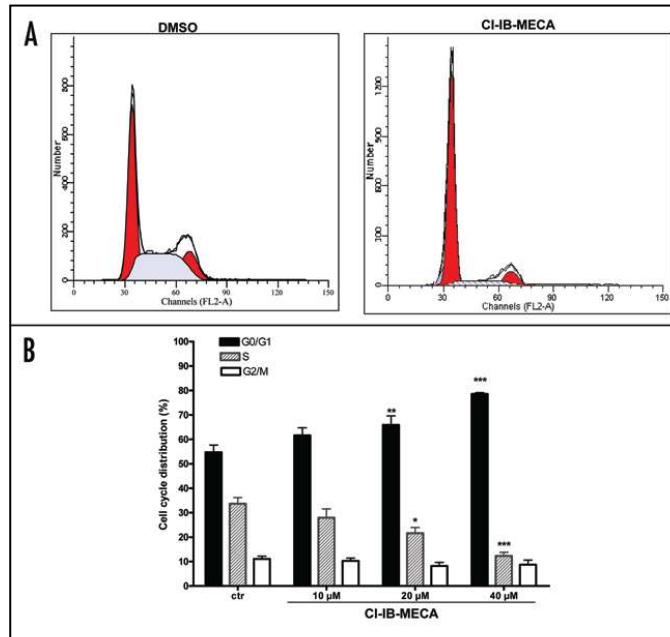


Fig3. Analisi del ciclo cellulare delle cellule NPA dopo 24 h di trattamento con CI-IB-MECA. Rappresentazione grafica della distribuzione cellulare nelle fasi del ciclo di crescita, rispettivamente controllo DMSO e CI-IB-MECA (40 μ M) 24 h (A). Analisi quantitativa della distribuzione cellulare nelle fasi G₀/G₁, S e G₂//M, dopo trattamento. I dati sono espressi come medie \pm SEM della percentuale di cellule calcolata nelle fasi del ciclo, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs controllo.

Inoltre l'arresto del ciclo cellulare osservato nelle NPA trattate con CI-IB-MECA è direttamente correlato ad una riduzione dei livelli di espressione delle cicline E_2 e D_1 (Fig.4A e B).

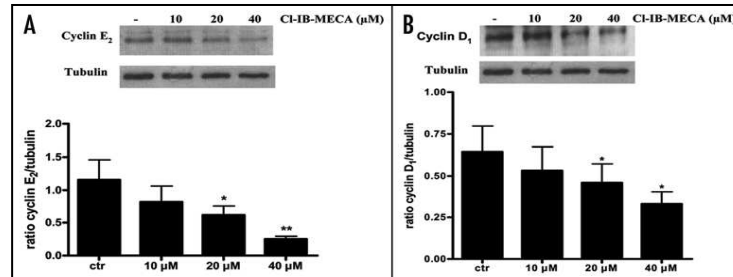


Fig4. Western Blotting relativo all'espressione di E_2 (A) e D_1 (B) dopo trattamento con CI-IB-MECA a 24 h. I dati sono espressi come media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs controlli.

Al fine di indagare sulla *signalling pathway* alla base degli effetti anti-proliferativi precedentemente osservati le NPA sono state trattate con CI-IB-MECA a concentrazioni crescenti e a tempi diversi, per analizzare i livelli di fosforilazione di ERK1/2 mediante *Western Blotting*. Come mostrato in figura 5A e B, nelle cellule trattate con CI-IB-MECA si osserva un incremento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 in maniera concentrazione-dipendente. Inoltre lo stato di fosforilazione della chinasi mitogena risulta sostenuto anche a due ore dalla somministrazione.

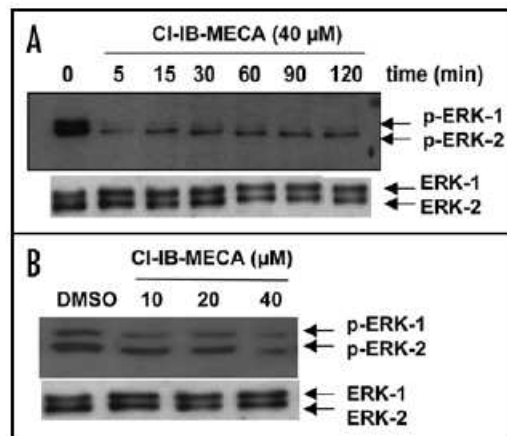


Fig.5 Effetti del CI-IB-MECA sui livelli di fosforilazione di ERK1/2 a concentrazioni crescenti in tempi diversi. Le cellule NPA sono state stimulate con CI-IB-MECA 40 μ M nei tempi indicati (A). Relazione concentrazione-effetto del CI-IB-MECA sui livelli di fosforilazione di ERK1/2 dopo 15 min di trattamento (B).

2.3.4 Gli effetti anti-proliferativi del CI-IB-MECA non dipendono dall'attivazione del recettore A₃

E' importante sottolineare che gli effetti osservati sono indotti da concentrazioni relativamente elevate di CI-IB-MECA (range μM), rispetto a dati precedentemente riportati in letteratura (range nM di CI-IB-MECA). Per verificare se gli effetti antiproliferativi del CI-IB-MECA osservati fossero mediati dall'attivazione del recettore A₃, le NPA sono state trattate con CI-IB-MECA in presenza di due antagonisti selettivi A₃AR, l'MRS1523 (0.03-10 μM) e l'FA385 (0.5-5 μM). Il trattamento con CI-IB-MECA inibisce la proliferazione delle NPA sia in presenza di MRS1523 che in presenza di FA385 (Fig.6A e B). Analogamente, i livelli di fosforilazione di ERK1/2, inibiti dal CI-IB-MECA, non sono influenzati dalla presenza degli antagonisti A₃. Tali dati quindi, suggeriscono che gli effetti del CI-IB-MECA nelle NPA sono indipendenti dall'attivazione del recettore A₃.

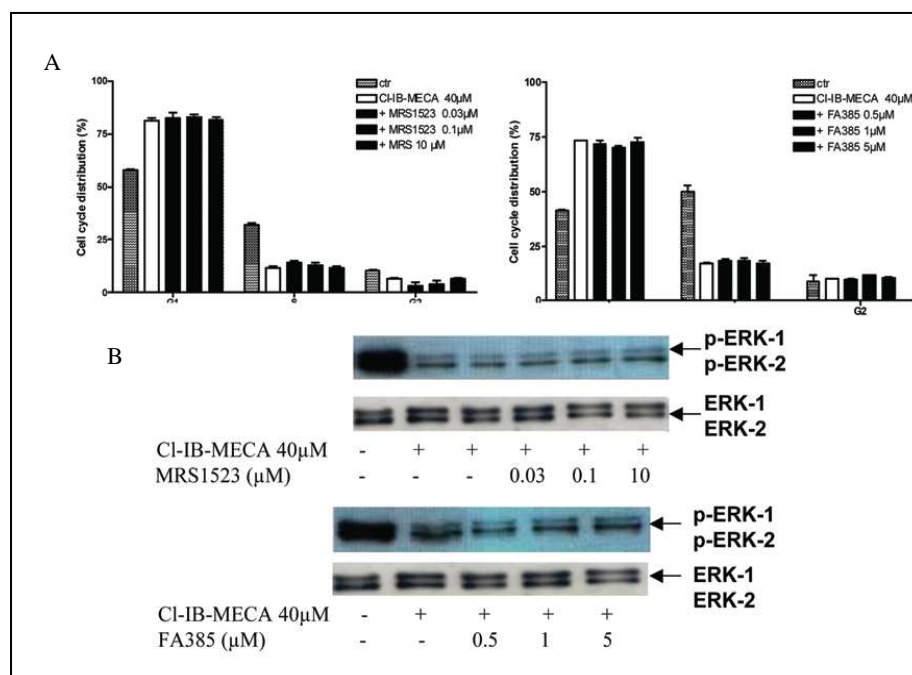


Fig6. Effetti del CI-IB-MECA sul ciclo cellulare in presenza degli antagonisti selettivi del recettore A₃ MRS1523 e FA385. Le cellule NPA sono state incubate con gli antagonisti MRS1523 e FA385 30 minuti prima della somministrazione di CI-IB-MECA 40 μM per 24 h. La distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare è stata effettuata mediante analisi citofluorimetrica (A). Fosforilazione di ERK1/2 mediante analisi di Western Blotting (B).

2.3.5 Gli effetti anti-proliferativi del CI-IB-MECA non dipendono da altri sottotipi recettoriale dell' Ado

Per escludere una eventuale aspecificità del CI-IB-MECA nei confronti degli altri tre sottotipi recettoriali, le NPA sono state trattate con CI-IB-MECA in presenza di antagonisti degli altri quattro recettori dell'Ado, DPCPX (antagonista del recettore A₁), ZM241385 (antagonista selettivo del recettore A_{2A}) o PSB1115 (antagonista selettivo del recettore A_{2B}). Nessuno degli antagonisti recettoriali è stato in grado di inibire gli effetti anti-proliferativi del CI-IB-MECA nè di ridurre i livelli di attivazione di ERK1/2 (Fig.7A e 7B). E' importante notare che gli antagonisti utilizzati per la realizzazione di questi esperimenti non hanno alcun effetto sulla proliferazione delle NPA e sullo stato di fosforilazione di ERK1/2. Questi dati suggeriscono che gli effetti antiproliferativi del CI-IB-MECA non dipendono dall'attivazione aspecifica dei recettori dell'Ado.

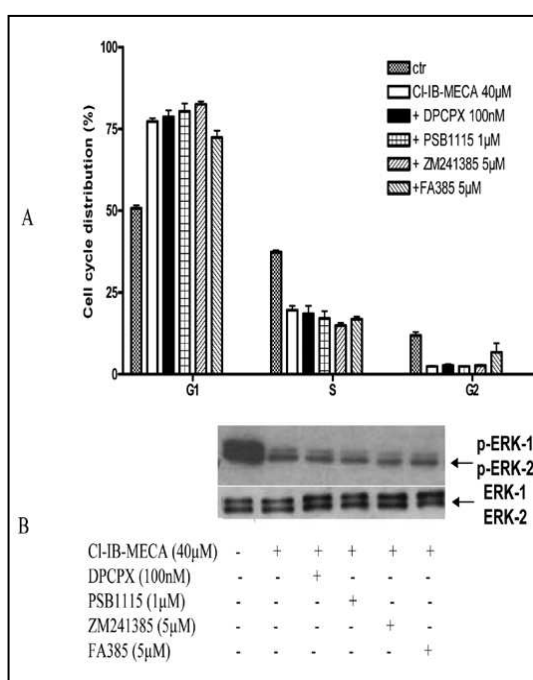


Fig.7 Effetti del CI-IB-MECA sul ciclo cellulare e sulla fosforilazione di ERK1/2 in presenza di DPCPX (100 nM) (antagonista A₁AR), PSB1115 (1 µM) (antagonista A_{2A}AR), ZM241385 (5 µM) (antagonista A_{2B}AR), e FA385 (5 µM) (antagonista A₃). Le cellule NPA sono state incubate con gli antagonisti recettoriali dei diversi recettori adenosinici 30 min prima del trattamento con CI-IB-MECA (40 µM). L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata 24 h dopo i trattamenti mentre i livelli di fosforilazione di ERK1/2 dopo 15 min mediante Western Blotting (B).

2.3.6 Inibitori dei trasportatori dell'Ado

Sulla base dei risultati ottenuti dagli esperimenti effettuati con gli antagonisti recettoriali dell' Adenosina, dai quali è emerso che gli effetti antiproliferativi del CI-IB-MECA non dipendono da nessuno dei recettori adenosinici si è ipotizzato che il CI-IB-MECA potesse in qualche modo entrare all'interno della cellula. A supporto di tale ipotesi è stato recentemente dimostrato che gli effetti citotossici, indotti soprattutto da concentrazioni μM di CI-IB-MECA, dipendono da un meccanismo intracellulare, secondo il quale il CI-IB-MECA si accumula a livello intracellulare (Mlejnek et al., 2011). A tal proposito quindi, le NPA sono state trattate con CI-IB-MECA in presenza di inibitori dei trasportatori dei nucleosidi. Nè l'NBTI ($10 \mu\text{M}$) nè il dipiridamolo ($10 \mu\text{M}$) inibiscono gli effetti anti-proliferativi del CI-IB-MECA (Fig.8A e B). Inoltre la somministrazione di solo NBTI o di solo dipiridamolo non influenza la crescita cellulare delle NPA.

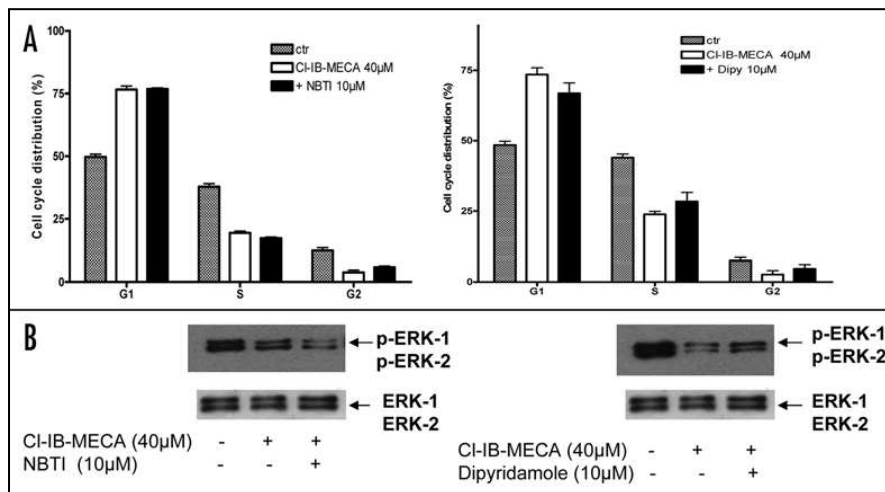


Fig.8 Effetti del CI-IB-MECA sul ciclo cellulare e sullo stato di fosforilazione di ERK1/2 in presenza degli inibitori dei trasportatori dei nucleosidi NBTI ($10 \mu\text{M}$) e dipiridamolo ($10 \mu\text{M}$). Le cellule NPA sono state incubate in presenza degli inibitori 15 min prima della somministrazione di CI-IB-MECA ($40 \mu\text{M}$). L'analisi del ciclo cellulare è stata eseguita 24h dopo i trattamenti mentre quella relativa allo stato di fosforilazione di ERK1/2 dopo 15 min.

2.4 Discussione

Nel presente studio per la prima volta viene mostrata l'espressione del recettore A₃ nel tessuto tiroideo e in cellule di carcinoma tiroideo. Le analisi immunostochimiche mettono in evidenza una maggiore espressione di tale recettore nei tessuti tiroidei prelevati da pazienti affetti da carcinoma rispetto ai tessuti sani. Inoltre, è stato possibile constatare che i livelli di espressione del recettore A₃ non sembrano essere correlati con lo stato di differenziazione cellulare del tessuto tumorale. Sulla base di questi risultati sono stati saggiati gli effetti anti-proliferativi dell'agonista selettivo del recettore A₃ CI-IB-MECA su una linea cellulare di carcinoma tiroideo papillare NPA indagando sul meccanismo molecolare alla base degli effetti osservati. Il CI-IB-MECA a concentrazioni μM si è mostrato capace di inibire la proliferazione cellulare delle NPA attraverso un blocco del ciclo cellulare in fase G₁. L'arresto della crescita tumorale in questa fase del ciclo risulta correlata con la riduzione dell'espressione delle cicline E₂ e D₁. Inoltre nelle cellule trattate con CI-IB-MECA è stato possibile osservare una riduzione dello stato di fosforilazione di ERK1/2, una chinasi particolarmente implicata nei segnali cellulari di proliferazione e differenziazione. Nonostante i dati riportati in letteratura relativi al ruolo dei recettori adenosinici sulla crescita e sullo sviluppo tumorale, dal presente studio è emerso che la presenza di antagonisti selettivi del recettore A₃ non alterano l'attività anti-tumorale del CI-IB-MECA. Tuttavia è stato possibile escludere la possibilità di un'interazione aspecifica del CI-IB-MECA con altri recettori adenosinici, in quanto la presenza di antagonisti degli altri recettori non altera la risposta farmacologica indotta dal trattamento. Alla luce di tali risultati si è ipotizzato che il CI-IB-MECA potesse essere trasportato all'interno della cellula mediante trasportatori di membrana, ma la presenza di inibitori specifici dei trasportatori dei nucleosidi in regime di trattamento non interferisce con il meccanismo d'azione della molecola. Tuttavia, non possiamo escludere che gli effetti indotti dal CI-IB-MECA siano dipendenti da un meccanismo intracellulare, così come dimostrato recentemente da Mlejnek e collaboratori. Questi ultimi hanno osservato che gli effetti citotossici del CI-IB-MECA sono correlati ad elevati livelli intracellulari della molecola che interagisce con la proteina P-gp (Mlejnek et al., 2011). I risultati ottenuti dal presente studio suggeriscono in definitiva, che il CI-IB-MECA interferisce con la crescita tumorale del carcinoma tiroideo mediante un meccanismo molecolare indipendente dall'attivazione del recettore A₃. A supporto di tali risultati altri autori hanno già precedentemente descritto in letteratura un meccanismo indipendente dall'attivazione recettoriale sugli effetti anti-tumorali indotti dal trattamento di agonisti selettivi del recettore A₃.

In conclusione, il CI-IB-MECA si dimostra un potenziale candidato farmacologico in un ipotetico regime chemioterapico per il trattamento del carcinoma tiroideo anche se ulteriori studi occorrono per la comprensione del preciso meccanismo d'azione responsabile degli effetti anti-proliferativi osservati.

CAPITOLO 3

3.1 Introduzione

3.1.1 TRAIL

La famiglia di citochine del *tumor necrosis factor* (TNF) comprende una serie di proteine strutturalmente correlate, coinvolte in meccanismi di difesa cellulare, processi infiammatori e risposta immunitaria. *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL), conosciuto anche come Apo2 ligand, è un membro della famiglia del TNF, oggetto di numerosi studi come agente pro-apoptotico in diversi tipi di neoplasie. E' espresso in molti tessuti umani soprattutto a livello della prostata e della milza (Wiley et al., 1995). In quanto membro della superfamiglia di molecole del TNF, TRAIL è presente soprattutto come proteina trans-membrana di tipo II, il cui clivaggio a livello del terminale carbossilico porta alla formazione dell'isoforma solubile (Kimberly and Screaton, 2004). Da un punto di vista molecolare, TRAIL tende a formare omo-trimeri che interagiscono con specifici recettori di membrana. La forma omo-trimerica presenta la massima attività biologica rispetto alla forma monomerica (Wiley et al., 1995). Il meccanismo d'azione di TRAIL è il risultato della sua interazione con cinque recettori di membrana: i recettori di morte DR4/TRAIL-R1/TNFRSF10A (Pan et al., 1997a) e DR5/TRAIL-R2/KILLER/TNFRSF10B (Pan et al., 1997b), i recettori decoy DcR1/TRAIL-R3/TNFRSF10C (Pan et al., 1997b) e DcR2/TRAIL-R4/TNFRSF10D (Marsters et al., 1997) e un recettore di tipo solubile a cui si lega con bassa affinità conosciuto come osteoprotegerina (OPG) (Emery et al., 1998).

3.1.2 Trasduzione del segnale di TRAIL

L'interazione di specifici ligandi con i recettori di morte rappresenta la prima tappa della *pathway* di segnali cellulari che caratterizzano la via apoptotica di tipo "estrinseca". Il legame di TRAIL con i recettori DR4 e DR5 determina un cambiamento conformazionale a livello dei domini DD (*Death Domain*), che porta all'attivazione funzionale dei recettori. I cambiamenti conformazionali indotti dall'attivazione consentono ai recettori di morte di reclutare FADD (*Fas-associated protein with death domain*), una molecola adattatrice che ha un ruolo cruciale nella formazione del complesso di morte DISC (*Death-inducing signaling Complex*) (Klichkel et al., 1995). In qualità di molecola adattatrice, FADD è in grado di reclutare e contemporaneamente di attivare, mediante i domini DED (*Death Effector Domain*) le pro-caspasi iniziatrici -8/-10, completando in tal modo, l'assemblaggio del complesso DISC (Medema et al., 1997). Alternativamente in cellule di tipo II (Ozoren and El-Deiry, 2002), ovvero in cellule in cui l'attivazione recettoriale della caspasi-8 è limitata, TRAIL può servirsi della via apoptotica mitocondriale. Le caspasi iniziatrici attivate, infatti, sono in grado di clivare ed attivare Bid (*BH3-interacting domain death agonist*), un membro pro-apoptotico della famiglia Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*). Tuttavia in base al tipo cellulare, tBid può dar inizio alla via apoptotica intrinseca o mitocondriale nel caso si tratti di cellule di tipo II, o semplicemente amplificare la *signaling* della via estrinseca (ovvero dipendente dall'attivazione recettoriale), se si tratta di cellule di tipo I. Nella sua forma tronca tBid, dà inizio alla via apoptotica mitocondriale mediante l'interazione con le proteine BAX (*Bcl-2-associated X protein*) e BAK (*Bcl-2 homologous antagonist killer*), favorendone la loro oligomerizzazione e traslocazione sulla membrana mitocondriale esterna. Una volta localizzato sulla membrana mitocondriale, il dimerico BAX-BAK determina un'alterazione del potenziale di membrana mitocondriale, con formazione di pori di grandi dimensioni (MOMP) (Waterhouse et al., 2002) che consentono l'esternalizzazione di molecole pro-apoptotiche normalmente localizzate nello spazio intermembrana del mitocondrio.

Il citocromo *c* è una proteina solubile che rappresenta un elemento essenziale della catena mitocondriale di trasporto di elettroni; è normalmente situato nello spazio

intermembrana ed è debolmente legato alla superficie interna della membrana mitocondriale. Nel corso del processo apoptotico il citocromo c è rilasciato nel citoplasma ed innesca la cascata delle caspasi (Liu et al., 1996). Una volta rilasciato nel citosol il citocromo c interagisce con la proteina Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*) partecipando alla formazione di un complesso multimerico formato dallo stesso citocromo c, da dATP e dalla caspasi-9, conosciuto come apoptosoma (Cain et al., 2000). Il legame del citocromo c determina un cambiamento conformazionale in Apaf-1, che consente alla molecola di esporre il dominio CARD (*caspase-recruitment domain*), la cui funzione è quella di reclutare ed attivare la procaspasi-9 in caspasi-9. In condizioni normali Apaf-1 lega solo debolmente l'ATP, nonostante la presenza della sequenza consenso di *walker* per il legame dei nucleotidi; tuttavia l'interazione del citocromo c ne aumenta l'affinità (Jiang and Wang, 2000). Una volta attiva la caspasi-9 attiva le caspasi effettrici -7 e -3 dando inizio alla cascata proteolitica.

Smac/DIABLO (*second mitochondrial derived activator of caspase*) è una proteina mitocondriale di 25 kDa, di origine citosolica, che presenta all'estremità N-terminale una sequenza segnale di 55 aminoacidi; tale sequenza è rimossa quando la proteina giunge nei mitocondri e si genera la forma Smac matura (che presenta una nuova sequenza N-terminale), che è collocata nello spazio intermembrana (Du et al., 2000). I primi quattro aminoacidi della proteina Smac, Ala-Val-Pro-Ile (AVPI), si legano al dominio BIR (*Baculovirus IAP [inhibitor of apoptosis protein] repeat*) (Chai et al., 2001).

Le proteine IAP sono una famiglia di proteine intracellulari che inibiscono la caspasi nella forma attiva; tali proteine presentano uno o più domini BIR che chelano ioni zinco in una configurazione simile ai motivi a dita di zinco. Sono state identificate nei mammiferi sei proteine contenenti domini BIR (BIRP, *BIR containing proteins*): IAP (*inhibitor of apoptosis*) -1 e -2, XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*), NIAP (*neuronal inhibitor of apoptosis*), BRUCE (*BIR-repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme*) e survivina. La sequenza amminoacidica con la quale Smac si lega ai domini BIR3 di XIAP è identica a quella con la quale la caspasi-9 attiva interagisce con XIAP; la sequenza che lega IAP è esposta solo dopo il clivaggio proteolitico della caspasi-9. Gli effetti inibitori delle IAP nei confronti delle caspasi vengono neutralizzati dalla proteina Smac, la quale interagendo col dominio BIR2, forma un complesso stabile con le IAP, che mediante ingombro sterico, destabilizza il legame tra caspasi e IAP favorendo il rilascio della caspasi attiva e la degradazione proteosomica delle IAP (Chai et al., 2001). L'abilità di Smac di controbilanciare l'azione inibitoria delle proteine IAP, rappresenta uno dei meccanismi chiave del processo apoptotico. Infatti nonostante il rilascio del citocromo c, se i livelli citosolici delle IAP sono particolarmente elevati, l'apoptosi mitocondriale non ha luogo. Tuttavia, poiché la via intrinseca ed estrinseca convergono a livello dell'attivazione della caspasi-3, elevati livelli di IAP come XIAP, possono inibire anche la morte cellulare mediata da recettori di membrana (Yang et al., 1998; Suzuki et al., 2001).

HtrA2/Omi è una molecola appartenente alla famiglia delle proteasi a serina che è in grado, una volta rilasciata nel citosol, di incrementare significativamente l'attività delle caspasi, attraverso l'inibizione diretta delle IAP mediante clivaggio proteolitico (Hedge et al., 2002).

AIF (*apoptosis inducing factor*) è una flavo proteina di 57 kDa che è in grado di indurre la degradazione del DNA in maniera caspasi-indipendente, in maniera indiretta (in quanto priva di attività nucleasica) mediante l'azione nucleasica di una seconda proteina non ancora identificata (Susin et al., 1999).

L' *Endonucleasi G* (*EndoG*) è una nucleasi di 30 kDa, tradotta nel citosol e traslocata nel mitocondrio. Consente all'apoptosi di procedere anche in assenza di attività caspasica quando i mitocondri sono danneggiati. EndoG, come AIF, è in grado di indurre la condensazione della cromatina e la frammentazione del DNA. In questo caso AIF ed EndoG danno inizio ad un programma apoptotico parallelo a quello dell'attivazione delle caspasi (Widlak et al., 2001).

3.1.3 Segnali cellulari di tipo non-apoptotico

Numerosi studi dimostrano che TRAIL, oltre ad essere uno dei principali attivatori di morte cellulare programmata, è anche in grado di attivare una serie di segnali cellulari di tipo non apoptotico. A tal proposito è stato ipotizzato che, in seguito alla formazione del complesso DISC possa verificarsi la formazione di un secondo complesso supermolecolare capace di attivare una diversa *pathway* di segnali. Tale complesso molecolare può essere costituito dalle seguenti proteine: FADD, RIP1 (*active caspase-8, receptor interacting protein 1*), TRAF-2 (*TNF receptor associated protein*), TRADD (*TNF associated death domain*) e IKK γ (*inhibitor of κ B kinase*). Attraverso la fosforilazione di I κ B e la successiva attivazione di NF- κ B (Degli-Espositi et al., 1997; Ehrhardt et al., 2003; Li and Lin, 2008; Harper et al., 2001), questo nuovo complesso, paradossalmente, è capace di promuovere la sopravvivenza cellulare attraverso l' *up-regulation* di diverse molecole antiapoptotiche quali cFLIP, Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*), Mcl-1 [*Myeloid cell leukemia sequence 1 (Bcl2- related)*] e cIAPs. Inoltre questo complesso molecolare è anche in grado di attivare delle *pathways* addizionali che portano alla fosforilazione di PI3K-Akt (*phosphoinositide 3-kinase*) (Secchiero et al., 2003; Joy et al., 2003) o all'attivazione delle chinasi mitogene (MAPK) quali JNK (*Jun N-terminal kinase*) ed Erk2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*) (Secchiero et al., 2003, 2004; Varfolomeev et al., 2005; Belyanskaya et al., 2008). Alla luce di quanto detto fin ora, studi più approfonditi sono necessari per meglio comprendere gli effetti di questa promettente molecola chemioterapica soprattutto in considerazione di dati clinici ottenuti da sperimentazioni in regime monoterapeutico.

3.1.4 Ruolo di TRAIL nel sistema immunitario

L'interesse di numerosi gruppi di ricerca verso un ruolo fisiologico e funzionale di TRAIL nel sistema immunitario nasce nel momento in cui diversi studi dimostrano l'espressione di tale molecola sulla superficie cellulare di varie componenti della risposta immunitaria innata e adattativa. Inoltre, il semplice fatto di essere una citochina la cui espressione può essere indotta, suggerisce che essa possa avere un ruolo fondamentale nell'omeostasi della risposta immunitaria. In monociti stimolati con LPS o con IFN-I/II si osserva un aumento dei livelli di espressione di entrambe le isoforme di TRAIL, sia quella solubile che quella legata in membrana, direttamente correlata ad un incremento della risposta citotossica nei confronti di cellule tumorali. Infatti diversi autori dimostrano che un aumento dell'espressione di TRAIL si osserva nei \emptyset stimolati con LPS e IFN- β (Ehrlich et al., 2003) e sulla superficie cellulare di monociti, cellule dendritiche (DCs) e Natural Killer (NK) stimolati con IFN- γ (Fange et al., 1999; Griffith et al., 1999). L'isoforma di TRAIL legata in membrana rappresenta uno dei principali meccanismi effettori delle NK, giocando un ruolo fondamentale nella citotossicità cellulo-mediata. Infatti, Kayagaki e coll. mediante studi *in vitro* dimostrano che la neutralizzazione combinata di TRAIL, perforine e CD95 compromette la citotossicità delle NK nei confronti delle cellule tumorali (Kayagaki et al., 1999). Tali dati sono stati confermati da successivi studi *in vivo* in cui Takeda e coll. dimostrano che TRAIL gioca un ruolo chiave nel blocco della crescita tumorale mediata dalle NK (Takeda et al., 2001). Un aumento dell'espressione di TRAIL in termini di mRNA è stato osservato in linfociti umani isolati dal circolo periferico, in seguito a stimolazione con anticorpo anti-CD3, o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)/ionomicina (Jeremias et al., 1998). TRAIL e CD95 sono anche coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria T_H1 e T_H2. In seguito a stimolazione con anticorpo anti-CD3 *in vitro*, si osserva, infatti, un aumento dell'espressione di CD95L nelle T_H1 ed un aumento dei livelli di espressione di TRAIL nelle T_H2. Inoltre le T_H1 presentano una maggiore sensibilità all'apoptosi indotta da TRAIL rispetto alle T_H2, probabilmente perché in quest'ultime, la stimolazione con l'anticorpo anti-CD3 causa un' *up-regulation* dell'espressione di cFLIP (Zhang et al., 2003). In studi recenti, diversi autori dimostrano che TRAIL ha un ruolo di rilievo nell'omeostasi di una particolare sottopopolazione di linfociti T CD8⁺ conosciuta

come “*helpless*”, caratterizzata dal fatto di poter essere attivata anche in assenza di linfociti T_H CD4⁺. Tale popolazione non è capace di una seconda espansione clonale in seguito a presentazione dell'antigene (Shedlock et al., 2003). Tuttavia, neutralizzando gli effetti di TRAIL utilizzando, ad esempio, cellule TRAIL-deficienti, si osserva un ripristino di tale fenomeno. Alla luce di quanto detto fin'ora, è stato ipotizzato che le cellule “*helpless*” CD8⁺ vengano eliminate immediatamente dopo la seconda presentazione dell' antigene, mediante un meccanismo di morte programmata dipendente da TRAIL. Recentemente, è stata attribuita all'IL-15 la capacità di rendere i linfociti CD8⁺ “*helped*” resistenti agli effetti apoptotici di TRAIL.

3.1.5 TRAIL nell'immunità tumorale

Un essenziale sistema di controllo dello sviluppo e della crescita tumorale è rappresentato dalla sorveglianza esercitata da parte della componente immunitaria. Uno degli strumenti più efficaci del sistema immunitario per combattere lo sviluppo tumorale è rappresentato da TRAIL, una citochina rilasciata da diverse componenti della risposta immunitaria tumore-specifica, la quale dimostra una elevata selettività nei confronti delle cellule tumorali (Walczak et al., 1999; Ashkenazi et al., 1999). Il primo lavoro che mette in luce una funzione antitumorale di TRAIL in un modello *in vivo* in cui la citochina viene prodotta sistematicamente in maniera fisiologica, appartiene al gruppo di Sedger e coll. i quali dimostrano che, impiantando una linea tumorale singenica di linfoma a cellule B, in topi deficienti di TRAIL (TRAIL^{-/-}) si osserva un aumento della crescita tumorale (Sedger et al., 1999). Una prima evidenza del potenziale antineoplastico ed anti-metastatico di TRAIL è stata osservata in modelli *in vivo* di carcinogenesi indotta mediante *9,10-dimethylbenz-A-anthracene* (DMBA) o *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA), su topi TRAIL/TRAIL-R deficienti in cui si è osservato un aumento delle metastasi linfonodali nei topi TRAIL-R deficienti, attribuibile al fatto che, le cellule tumorali, che diventano sensibili al TRAIL perdono anche la capacità di aderire ai tessuti e quindi la capacità di stabilirsi e metastatizzare. Inoltre il grande potenziale terapeutico dell'uso di agonisti selettivi per il recettore di TRAIL in una terapia immunitaria antitumorale è stata dimostrata mediante l'applicazione di complessi regimi terapeutici caratterizzati dalla somministrazione combinata di tre diversi anticorpi. Questo innovativo approccio terapeutico conosciuto come “TrimAb”, è costituito essenzialmente di tre specifici anticorpi: un anticorpo che lega il recettore di TRAIL capace di indurre la morte immunogenica delle cellule tumorali; un anticorpo specifico per la proteina CD40 in grado di attivare le DCs, e in fine un anticorpo anti-4-1BB che ha attività co-stimolatoria nei confronti delle cellule CD8⁺ citotossiche (Uno et al., 2006). La combinazione di questi tre anticorpi determina il rigetto dei tumori conclamati mediante il reclutamento dei linfociti CD8⁺ ed il rilascio di IFN- γ . Inoltre la terapia TrimAb risulta anche efficace contro il 10% dei tumori resistenti a TRAIL. Il successo della terapia con TrimAb è il risultato degli effetti sinergici dell'anticorpo anti-DR5 che induce apoptosi nelle cellule target, e delle cellule esprimenti il recettore Fc, quali M ϕ e dendritiche che risultano essere attive nei confronti delle cellule tumorali apoptotiche. Per il suo potenziale terapeutico attualmente il TrimAb è in *clinical trial*.

3.2 Scopo

Sulla base di quanto detto fin'ora il TRAIL è una citochina appartenente alla famiglia del *tumor necrosis factor* in grado di indurre apoptosi in diverse linee cellulari tumorali, attraverso l'interazione con specifici recettori di membrana TRAIL-R1 (DR4) e TRAIL-R2(DR5) (Pitti *et al.*, 1996; Ashkenazi, 2002). Inoltre TRAIL è attualmente in *trial* clinico per il trattamento chemioterapico di numerose neoplasie della per la sua elevata selettività nei confronti delle cellule tumorali. Tuttavia, è stato osservato che le cellule di carcinoma tiroideo follicolare e midollare sono resistenti agli effetti apoptotici indotti da TRAIL (Mitsiades *et al.*, 2000). Diversi studi dimostrano che il CI-IB-MECA, agonista selettivo del recettore A₃ (A₃AR) è in grado di inibire la crescita tumorale sia *in vitro* che *in vivo* (Fishman *et al.*, 2000; Morello *et al.*, 2007, 2011). Gli effetti del CI-IB-MECA sulle cellule tumorali dipendono dal tipo cellulare e dalla concentrazione utilizzata. L'obiettivo del presente lavoro è stato quindi quello di valutare gli effetti del CI-IB-MECA sull'apoptosi indotta da TRAIL in cellule di carcinoma tiroideo follicolare ed anaplastico, e quindi di indagare sul meccanismo alla base degli effetti osservati.

3.3 Risultati

3.3.1 Il CI-IB-MECA facilita l'apoptosi indotta da TRAIL in un modello di carcinoma tiroideo

Sono ampiamente riportati in letteratura gli effetti antitumorali di TRAIL verso diverse linee cellulari tumorali (Walczak et al., 1999). Per valutare la sensibilità del carcinoma tiroideo agli effetti apoptotici indotti da TRAIL sono stati condotti studi *in vitro* su linee cellulari di carcinoma tiroideo FRO (carcinoma tiroideo follicolare differenziato) e ARO (carcinoma tiroideo anaplastico altamente metastatizzante), due degli isotipi clinici più comuni di carcinoma tiroideo. In accordo con studi precedenti, le FRO risultano essere maggiormente sensibili al trattamento con TRAIL alla concentrazione di 0.5 ng/ml, rispetto alle ARO (Fig.1). Infatti le ARO si dimostrano completamente resistenti all'azione apoptotica di TRAIL (10% di nuclei ipodiploidi) anche a concentrazioni più elevate (1-2.5-5 ng/ml) (Fig.1).

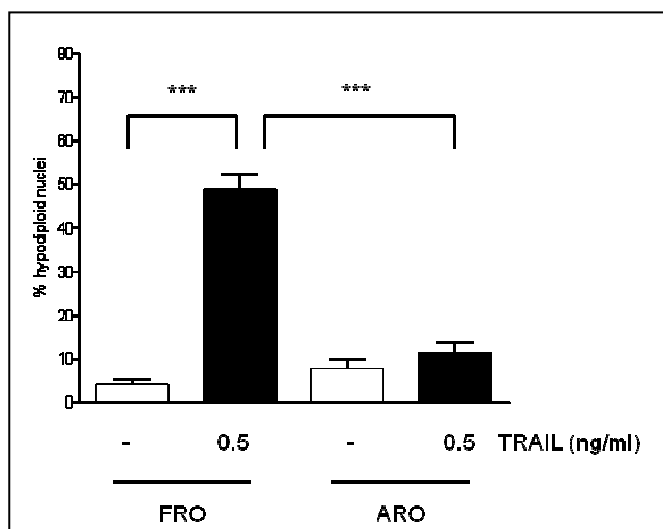


Fig.1 Le cellule FRO sono più sensibili delle ARO all'apoptosi indotta da TRAIL. Le FRO e le ARO sono state trattate con TRAIL (0.5 ng/ml) per 24 h. I nuclei ipodiploidi sono stati analizzati mediante saggio allo ioduro propidio e quantificati attraverso un'analisi citofluorimetrica. I risultati sono espressi come medie \pm SEM, n=4.

Interessante oggetto di studio per la sua attività antitumorale, l'agonista selettivo del recettore A₃ CI-IB-MECA, presenta un'efficace attività antiproliferativa nei confronti di diverse linee tumorali (Fishman et al., 2003; Lu et al., 2003; Merighi et al., 2005; Morello et al., 2008). Al fine di valutare gli effetti del CI-IB-MECA sull'apoptosi indotta da TRAIL, le linee cellulari FRO ed ARO sono state trattate per 24h con l'agonista A3R alla concentrazione di 20 μ M e con TRAIL a diverse concentrazioni (0.05-2.5 ng/ml), in somministrazione singola o in somministrazione combinata. Come è possibile osservare dall'analisi citofluorimetrica, il CI-IB-MECA alla concentrazione di 20 μ M non altera la vitalità cellulare delle FRO e delle ARO se somministrato da solo, ma, è in grado di aumentare significativamente la percentuale dei nuclei ipodiploidi delle FRO ma non delle ARO quando somministrato in associazione con TRAIL (Fig.2A e 2B). A supporto dei dati precedentemente mostrati, sono stati analizzati i livelli di attivazione delle caspasi-3 e -9, e i livelli di taglio (cleavage) del substrato delle caspasi, PARP. Il TRAIL (0.1 ng/ml) è in grado di aumentare i livelli di attivazione delle caspasi nelle FRO ma non nelle ARO,

facendo registrare un aumento delle forme clivate di caspasi-3 (20-19-17 kDa) e di PARP (85 kDa), ed una riduzione dei livelli di pro-caspasi-9 (Fig.2D). E' stato particolarmente interessante notare che il trattamento combinato con il CI-IB-MECA aumenta ulteriormente, in maniera significativa, i livelli di attivazione delle caspasi ed il clivaggio del substrato PARP1 (Fig.2D). In fine per valutare se gli effetti osservati in seguito al trattamento fossero circoscrivibili alle sole cellule tumorali, le somministrazioni sono state ripetute su una linea cellulare non tumorale, le HUVEC sulle quali, sia il trattamento con il solo TRAIL e con il solo CI-IB-MECA che il trattamento combinato, non hanno mostrato alcun effetto citotossico (Fig. 2C).

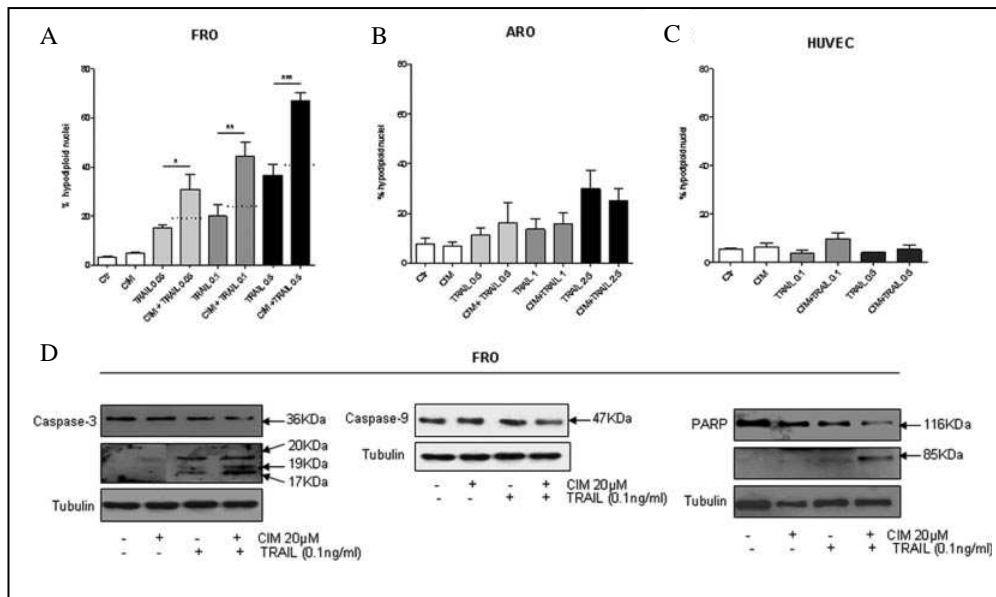


Fig.2 Il CI-IB-MECA (CIM 20 µM) aumenta significativamente gli effetti apoptotici di TRAIL nelle cellule FRO (A) ma non nelle ARO (B). In associazione o non con il CI-IB-MECA, il TRAIL è stato somministrato alle cellule FRO, alle concentrazioni di 0.05, 0.1, 0.5 ng/ml (A) e alle cellule HUVEC (C). Le ARO invece, sono state trattate con CI-IB-MECA 20 µM + TRAIL alle concentrazioni di 0.5, 1, 2.5 ng/ml (B) in ragione della loro resistenza al trattamento. I nuclei ipodiploidi sono stati analizzati mediante saggio allo ioduro propidio e quantificati attraverso un'analisi citofluorimetrica. I risultati sono espressi come medie ± SEM, n=10. I segnali cellulari di tipo apoptotico sono stati analizzati mediante Western Blotting sul clivaggio delle caspasi-3,-9 e sul clivaggio del substrato delle caspasi PARP1.

3.3.2 Il CI-IB-MECA aumenta in maniera specifica la morte cellulare indotta da TRAIL

Per escludere una possibile aspecificità del CI-IB-MECA verso altri membri appartenenti alla famiglia del TNF, le FRO e le ARO sono state trattate con CI-IB-MECA (20 μ M) e/o rTNF- α (0,1-10 ng/ml). All'analisi citofluorimetrica non si osservano variazioni della percentuale di nuclei ipodiploidi sia nelle FRO (A) che nelle ARO (B) quando il CI-IB-MECA viene somministrato contemporaneamente al TNF- α (Fig.4).

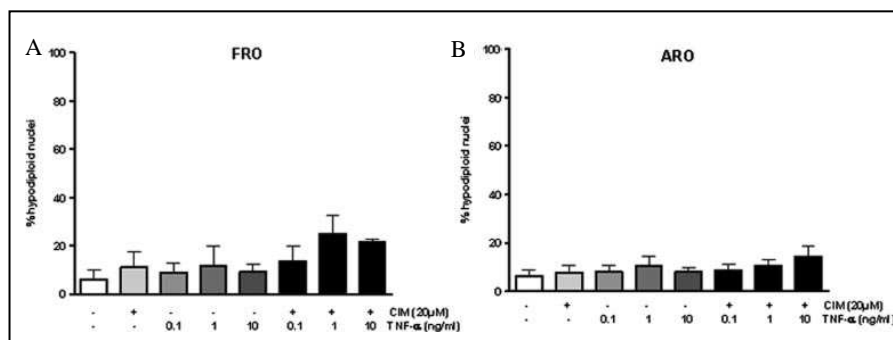


Fig.4 Il trattamento combinato di CI-IB-MECA (20 μ M) e rTNF- α (0.1-1-10 ng/ml) per 24 h non induce apoptosi nelle FRO (A) e nelle ARO (B). I nuclei ipodiploidi sono stati analizzati mediante saggio allo ioduro propidio e quantificati attraverso un'analisi citofluorimetrica. I risultati sono espressi come medie \pm SEM, n=3.

3.3.3 Ruolo di c-Rel nell'apoptosi indotta da TRAIL e CI-IB-MECA

Uno dei meccanismi molecolari alla base degli effetti apoptotici indotti da TRAIL vede il coinvolgimento della *pathway* di NF- κ B (Ravi et al., 2001). Al fine di indagare sulla implicazione di questa *pathway* molecolare nel nostro sistema, è stata valutata la traslocazione nucleare delle subunità p65/NF- κ B e c-Rel/NF- κ B nelle FRO a diversi tempi (15-30 min) di trattamento, mediante saggio di immunofluorescenza. In accordo con lo stato dell'arte attuale, il trattamento delle FRO con TRAIL (0,1 ng/ml) promuove una precoce traslocazione nucleare di c-Rel (15-30 min), che tende a decrescere dopo 1 h di trattamento, seguita da una più tardiva traslocazione di p65/RelA (1-4 h) (Fig.5a e 5b). Sebbene il C-IB-MECA non mostri alcun effetto sull'attivazione di p65/RelA ai medesimi intervalli di trattamento, è però in grado di promuovere la traslocazione nucleare di c-Rel dopo 4 h (Fig.5d). In seguito a trattamento combinato con CI-IB-MECA e TRAIL, invece, oltre ad un blocco completo della traslocazione nucleare di p65/RelA (Fig.5a), è possibile osservare un aumento della traslocazione di c-Rel, già individuabile dopo 15 min, che permane fino a 4 h dopo il trattamento (Fig.5d).

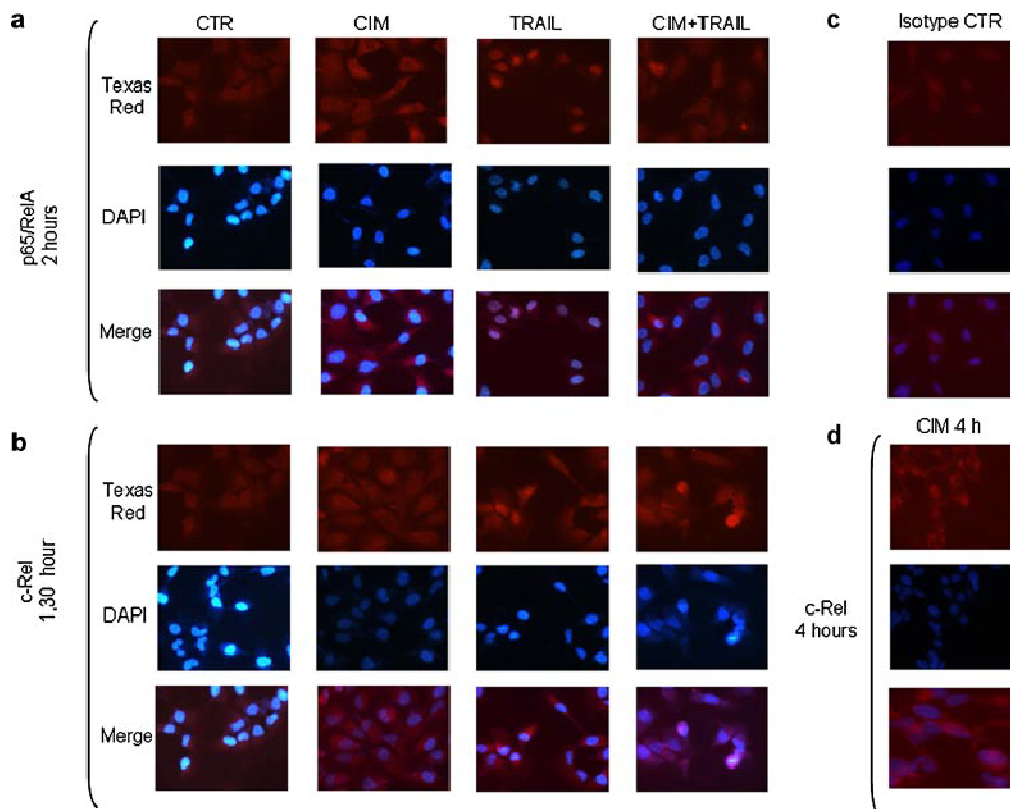


Fig.5 Il trattamento combinato di CI-IB-MECA e TRAIL favorisce la traslocazione nucleare delle subunità c-Rel/RelA, di NF- κ B, nelle cellule FRO. La traslocazione nucleare del fattore di trascrizione NF- κ B è stata visualizzata mediante microscopia a fluorescenza su cellule marcate con anticorpo anti-p65 e anti-c-Rel. Le immagini mostrano la localizzazione cellulare delle sub unità p65 e c-Rel di NF- κ B in seguito a trattamento con CI-IB-MECA, con TRAIL e con il trattamento combinato CI-IB-MECA + TRAIL, a 2 h (a e b), e a 4 h (d) dal trattamento.

3.3.4 Il CI-IB-MECA riduce i livelli di espressione delle molecole anti-apoptotiche Bcl-2, cFLIP, pAKt in cellule di carcinoma tiroideo trattate con TRAIL

Ravi e coll. (2001) hanno dimostrato come l'attivazione della subunità p65/RelA possa essere associata ad una over-espressione di Bcl-2 e cFLIP (Karin 2006). Come mostrato in Fig.6a,b e c, l'associazione di CI-IB-MECA e TRAIL riduce significativamente l'espressione delle molecole anti-apoptotiche Bcl-2 e cFLIP nelle FRO ma non nelle ARO. Per meglio comprendere il meccanismo d'azione con il quale il CI-IB-MECA aumenta l'apoptosi indotta da TRAIL sono stati analizzati anche i livelli di attivazione della proteina di sopravvivenza cellulare Akt. A tale scopo le cellule FRO sono state stimulate con CI-IB-MECA e/o TRAIL per 5 minuti e, successivamente, sono stati analizzati i livelli di fosforilazione di Akt mediante Western Blotting. Contrariamente a quanto avviene per il CI-IB-MECA la somministrazione del solo TRAIL non altera i livelli di fosforilazione di Akt. Tuttavia è possibile osservare una significativa riduzione dello stato di attivazione di Akt quando il CI-IB-MECA è somministrato in combinazione con TRAIL (Fig.6d).

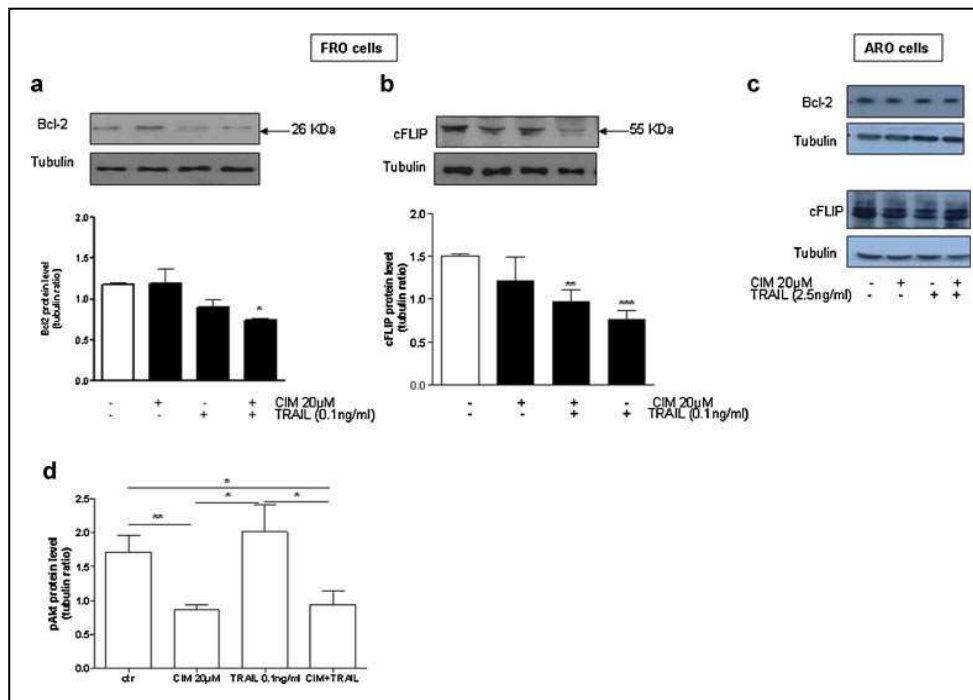


Fig.6 Espressione di molecole ad attività anti-apoptotica: Bcl-2, c-Flip e Akt. Il trattamento combinato di CIIB-MECA + TRAIL riduce significativamente l'espressione di Bcl-2 (a), c-Flip (b) e Akt (d) nelle cellule FRO ma non nelle ARO (c). I grafici rappresentano l'analisi quantitativa relativa alle medie dei valori densitometrici ottenuti dalla scansione con GelDoc scanner. I risultati sono espressi come medie \pm SEM, n=3. I livelli di espressione proteica sono stati rapportati a quelli della proteina housekeeping tubulina.

3.3.5 Il CI-IB-MECA regola l'espressione dei recettori di TRAIL

In ultima analisi è stata eseguita un'ulteriore indagine sul profilo di espressione dei recettori di TRAIL, DR5, DcR1 e DcR2, su entrambe le linee cellulari di carcinoma tiroideo (FRO e ARO). L'analisi citofluorimetrica evidenzia un diverso profilo d'espressione dei recettori di TRAIL tra le due linee cellulari, ed in particolare per quanto concerne il rapporto tra recettori di morte e recettori decoy (Fig.7a, b, e). Infatti mentre le FRO presentano più alti livelli di espressione del recettore di morte DR5 e più bassi livelli di espressione dei recettori decoy DcR1 e DcR2, le ARO mostrano un profilo d'espressione completamente contrapposto (Fig.7). Inoltre sebbene il TRAIL somministrato da solo non mostra alcun effetto sulle ARO, esso induce un significativo aumento dei livelli di espressione del recettore DR5 nelle FRO (Fig.7c, d, e). Tuttavia si assiste ad un ulteriore significativo aumento dei livelli di espressione del recettore DR5 quando il CI-IB-MECA viene somministrato in associazione con TRAIL (Fig.7a).

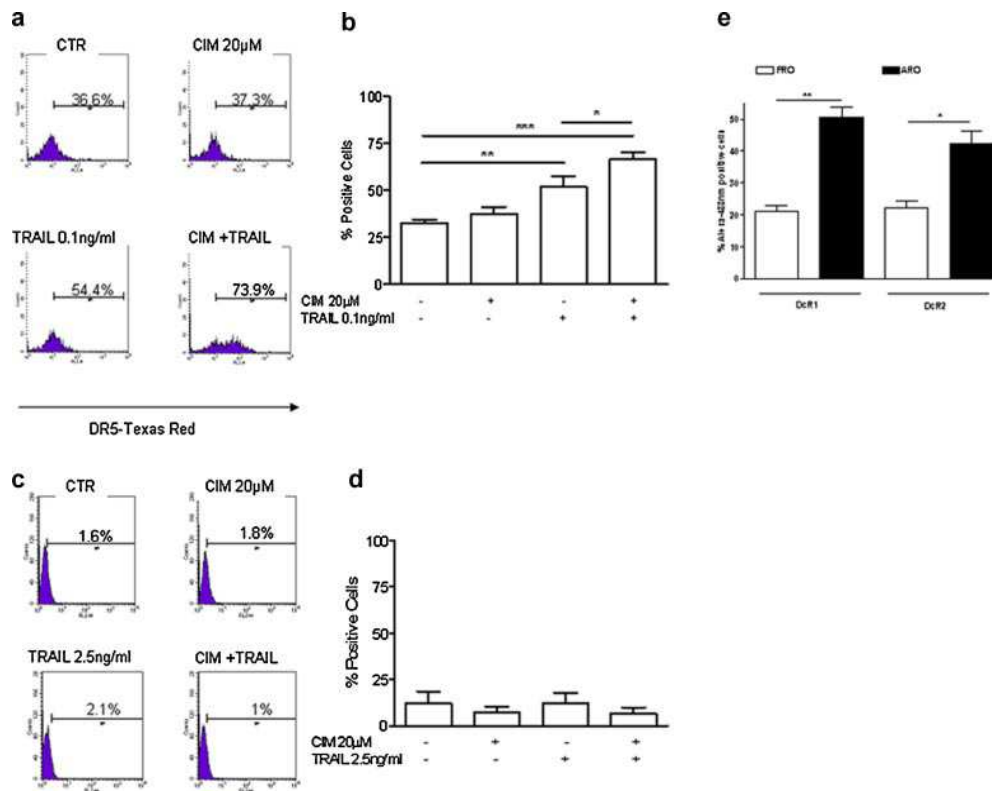


Fig.7 Il recettore di morte DR5 è maggiormente espresso nelle FRO (a,b) che nelle ARO (c,d) in seguito a trattamento combinato CI-IB-MECA + TRAIL. I recettori decoy DcR1 e DcR2 risultano maggiormente espressi nelle cellule Aro rispetto alle FRO. I risultati sono espressi come medie ± SEM, n=5 del % di cellule positive allo staining.

3.4 Discussione

Da un punto di vista istologico si identificano quattro isotipi di carcinoma tiroideo, che differiscono l'uno dall'altro, non solo per la diversa localizzazione tissutale, ma anche per il loro grado di differenziazione. Il carcinoma tiroideo anaplastico risulta la variante maggiormente aggressiva e con prognosi infausta, il cui unico approccio clinico prevede la resezione chirurgica e l'utilizzo della radioterapia/chemioterapia (Bartolazzi e Gasbarri 2000). Il presente studio mette in risalto il potenziale antitumorale dell'associazione chemioterapica di CI-IB-MECA e TRAIL, come possibile approccio terapeutico per il trattamento del carcinoma tiroideo. Dal presente studio è emerso che il CI-IB-MECA è virtualmente capace di incrementare gli effetti apoptotici di TRAIL nelle cellule FRO favorendo la traslocazione nucleare della subunità c-Rel di NF- κ B, che concorre ad attivare la cascata apoptotica. Le cellule FRO risultano essere maggiormente sensibili all'apoptosi indotta dalla somministrazione contemporanea di CI-IB-MECA e TRAIL, anche in conseguenza della riduzione dei livelli d'espressione di proteine di sopravvivenza quali Bcl-2, cFLIP e pAkt. Per contro, la linea cellulare anaplastica ARO si dimostra particolarmente resistente alla combinazione farmacologica, e ciò è dovuto probabilmente, ad una sovrappresione di proteine anti-apoptotiche come Bcl-2 e cFLIP, ad una riduzione dei livelli di espressione del recettore di morte DR5 e ad una sovraespressione dei recettori *decoy* DcR1 e DcR2, i quali, competendo con i recettori di morte nel legare TRAIL, neutralizzano gli effetti apoptotici indotti da quest'ultimo. Il fattore di trascrizione NF- κ B è un complesso eterodimerico formato da 5 distinte sub unità, RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50) e NF- κ B2 (p52) (Gosh et al., 1998), che ha un importante ruolo nel controllare la risposta immunitaria ed infiammatoria. Diversi modelli animali evidenziano un ruolo fondamentale di NF- κ B nello sviluppo e nella progressione tumorale, dimostrando che un'attivazione costitutiva di NF- κ B rappresenta una delle caratteristiche più comuni delle alterazioni molecolari che portano all'insorgenza della patologia neoplastica (Palayoor et al., 1999; Li et al., 2004; Karin, 2006; Saitoh et al., 2008). La traslocazione nucleare di NF- κ B promuove l'espressione di diversi geni, e, paradossalmente, sia geni che codificano per proteine di sopravvivenza come Bcl-2 e Bcl-XL (Wang et al., 1999; Chen et al., 2000; Bai et al., 2005) che geni che codificano per proteine pro-apoptotiche come gli stessi recettori di morte (Abbadie et al., 1993; Ryan et al., 2000; Ravi et al., 2001; Milani et al., 2003). A tal proposito, di fondamentale importanza nel discriminare i diversi segnali cellulari correlati all'attivazione di NF- κ B, è il tipo di subunità del fattore di trascrizione il quale trasloca nel nucleo in seguito a specifici stimoli. Infatti, è stato dimostrato in diversi modelli di tumore, che la traslocazione nucleare della subunità di NF- κ B p65/RelA è un evento che si presenta il più delle volte in maniera costitutiva, in grado di garantire la sopravvivenza delle cellule cancerose, mediante la sovrappresione di molecole anti-apoptotiche. Per contro invece, la traslocazione nucleare della subunità c-Rel, associata principalmente all'espressione di molecole pro-apoptotiche come il recettore di morte DR5, è in grado di rendere le cellule maggiormente sensibili ad eventi di morte cellulare programmata (Ravi et al., 2001; Karin, 2006). Il presente studio in accordo con altri, dimostra che TRAIL è in grado di modulare positivamente l'attivazione di NF- κ B a favore di una "signaling pathway" di tipo pro-apoptotico (Ravi et al., 2001; Che Net et al., 2003). Tuttavia ciò che si dimostra particolarmente interessante da un punto di vista farmacologico è il fatto che l'associazione di CI-IB-MECA con TRAIL determina una riduzione dei livelli nucleari di p65/RelA ed un aumento sostenuto della traslocazione nucleare di c-Rel. Infatti mentre il trattamento col solo CI-IB-MECA aumenta i livelli nucleari di c-Rel dopo 4 ore, il trattamento combinato di TRAIL e CI-IB-MECA non solo induce la traslocazione nucleare di c-Rel già dopo un ora, ma è in grado di sostenerla fino a 4 ore dopo il trattamento. Come conseguenza della traslocazione nucleare di c-Rel si verifica un aumento d'espressione di diverse molecole pro-apoptotiche. Nei campioni trattati con TRAIL+CI-IB-MECA infatti, è stato possibile osservare un aumento delle forme

clivate di caspasi-3 e di PARP, substrato delle caspasi effettrici, ed una riduzione dei livelli di pro-caspasi-9. Inoltre in accordo con i dati precedenti, le proteine anti-apoptotiche cFLIP e Bcl-2 risultano significativamente ridotte. Un'altra proteina ampiamente descritta in letteratura per le sue caratteristiche anti-apoptotiche, che risulta significativamente modulata dal trattamento combinato, è la chinasi Akt. Sebbene TRAIL somministrato da solo aumenti i livelli di attivazione di Akt, in presenza di CI-IB-MECA si registra una significativa riduzione della forma fosforilata pAkt. Un'altra fondamentale differenza tra la linea cellulare FRO e la sua isoforma anaplastica ARO risiede nella diversa espressione dei recettori di morte DR5 e dei recettori Decoy DcR1 e DcR2. Infatti ciò che rende le cellule ARO particolarmente resistenti all'apoptosi indotta da TRAIL è l'elevata espressione dei recettori Decoy DcR1 e DcR2 che vanificano l'azione di TRAIL. Nonostante il CI-IB-MECA venga ampiamente descritto in letteratura come un potente agonista selettivo del recettore A_3 dell'Ado, come già precedentemente dimostrato dal presente gruppo di ricerca (Morello et al., 2008), gli effetti di tale molecola risultano essere indipendenti dall'attivazione del recettore A_3 , in quanto, anche in presenza degli antagonisti selettivi MRS1191 e FA385, si osserva un aumento significativo dei livelli di apoptosi in seguito al trattamento combinato. Inoltre, il recettore A_3 risulta espresso in entrambe le linee cellulari, come è stato possibile constatare mediante RT-PCR. Studi recenti dimostrano che il dipiridamolo, un inibitore dei trasportatori dei nucleosidi, è in grado di aumentare l'apoptosi indotta da TRAIL in una linea cellulare di colon-carcinoma umano, mediante la sovrespressione dei recettori di morte ed il blocco del ciclo cellulare in fase G1 (Goda et al., 2008). Tuttavia i nostri dati dimostrano che anche in presenza di dipiridamolo alla concentrazione di 10 μ M, il CI-IB-MECA è in grado di aumentare l'apoptosi indotta da TRAIL nelle cellule FRO (dati non mostrati). Molto probabilmente la discrepanza tra i nostri risultati e i lavori precedenti è dovuta al diverso sistema, alla diversa linea cellulare adottata e alle diverse condizioni sperimentali. Concludendo, il presente studio mette in luce un nuovo potenziale approccio terapeutico per il trattamento di neoplasie DR5-positive, che si avvale dell'attivazione della subunità c-Rel, nei tumori in cui il fattore di trascrizione NF- κ B, gioca un ruolo cruciale per la loro sopravvivenza. Tuttavia sebbene gli studi *in vitro* presentano delle limitazioni, il CI-IB-MECA si presenta come un promettente agente chemioterapico per il trattamento del carcinoma tiroideo, in un regime terapeutico associativo di CI-IB-MECA e TRAIL.

CAPITOLO 4

4.1 Introduzione

4.1.1 Il cancro: un'entità multicellulare

Il microambiente tumorale è un tessuto altamente dinamico ed eterogeneo, in cui la cellula neoplastica è in continua interazione con lo stroma e le componenti cellulari della risposta infiammatoria. Più precisamente il cancro può essere definito come un'entità multicellulare, costituita da cellule di diversa derivazione tissutale e fenotipica, che interagendo le une con le altre e con la matrice extracellulare (ECM), caratterizzano uno specifico microambiente, in cui il rilascio di molecole solubili garantisce la sopravvivenza delle cellule tumorali, favorendone la crescita. In tale contesto quindi, il sistema immunitario, insieme col restante microambiente, ha un ruolo cruciale nel determinare la sorte delle cellule tumorali in via di sviluppo.

I tessuti sono costituiti da un insieme di cellule che, lavorando in armonia, garantiscono il mantenimento della normale fisiologia di quello specifico organo o sistema. Tali cellule presentano una specifica identità di posizione, così che la loro localizzazione risulti essere ben definita, ed il loro numero controllato e limitato. Inoltre l'omeostasi fisiologica dei tessuti normali è caratterizzato da un equilibrio finemente controllato tra cellule che muoiono e cellule che proliferano. Diversi autori hanno dimostrato che il mantenimento di una corretta fisiologia d'organo consente di prevenire le trasformazioni neoplastiche a carico dei tessuti normali, garantendone inoltre una stabile architettura funzionale. Ad esempio Mintz e colleghi hanno dimostrato che il microambiente di blastociti murini era in grado di sopprimere il potenziale tumorigenico di cellule di teratocarcinoma; tuttavia la cosa più interessante fu notare che il microambiente dei blastociti era inoltre capace di riprogrammare le cellule di teratocarcinoma convertendole in cellule normali, generando topi chimerici privi di tumore (Mintz et al., 1975). Studi successivi hanno confermato gli esperimenti di Mintz, evidenziando l'elevato potenziale del microambiente embrionale nel riprogrammare il fenotipo cellulare di vari tipi di tumore, incluso quello delle cellule localizzati nei siti metastatici, generando cellule tumorali dalle caratteristiche meno aggressive o addirittura convertendo le cellule neoplastiche in cellule normali (Pierce et al., 1982; Dolberg et al., 1984; Postovit et al., 2006; Gerschenson et al., 1986; Hendrix et al., 2007). Altri gruppi, infine dimostrano che, tra i diversi elementi cellulari che costituiscono la componente stromale, i fibroblasti hanno un importante ruolo nel modulare la progressione tumorale, limitandone la crescita e riprogrammandone il fenotipo (Olumi et al., 1999). Tuttavia, alla luce di quanto detto precedentemente, durante le fasi iniziali di tumorigenesi, l'instaurarsi di condizioni croniche a carattere infiammatorio determina la formazione di uno specifico microambiente tumorale in cui la componente stromale ha un ruolo fondamentale nel promuovere la crescita e lo sviluppo delle cellule neoplastiche.

4.1.2 Infiammazione cronica e cancro: ruolo del sistema immunitario

Negli anni passati, la presenza di un infiltrato leucocitario a livello del sito di origine di una lesione neoplastica veniva considerato indice di malignità, in quanto esso rappresentava il fallimento del sistema immunitario nel riconoscere e rigettare le cellule tumorali. Tuttavia sebbene le cellule tumorali sono capaci di condizionare fenotipicamente diverse componenti dello stroma circostante, tra cui le stesse cellule del sistema immunitario, non tutti gli infiltrati cellulari che si localizzano a livello delle lesioni neoplastiche sono da attribuire ai fenomeni di riconoscimento di antigeni tumorali; infatti il danno tissutale che si genera in conseguenza dello sviluppo della lesione tumorale, determina l'instaurarsi di una condizione cronica a carattere infiammatorio caratterizzata dal rilascio di diverse molecole segnale e fattori di crescita solubili, che favoriscono il

reclutamento di cellule di origine mieloide (Mantovani et al. 2008). La condizione di infiammazione cronica che caratterizza la maggior parte delle lesioni neoplastiche, innesca una cascata di eventi che amplificano ulteriormente gli effetti del sistema immunitario sulla crescita tumorale, e che, paradossalmente, sono conseguenza diretta dei processi di riparazione tissutale indotti dall'infiammazione stessa. Il ruolo del sistema immunitario nella complessa fisiologia, alla base dei processi di sviluppo e di crescita tumorale, non è ancora ben chiaro. Tuttavia i recenti progressi ottenuti nel campo dell'immunologia, hanno messo in luce l'esistenza di sottopopolazioni cellulari del sistema immunitario, con funzioni completamente opposte. Ad esempio, mentre i linfociti T_H di tipo1 (T_{H1}) sono coinvolti nei fenomeni di rigetto tumorale attraverso l'attivazione dei linfociti T citotossici (CTL) $CD8^+$ (Ostrand-Rosenberg et al., 2008), le cellule $CD4^+$ T_H di tipo2 (T_{H2}) e le Treg rappresentano i sottotipi cellulari principalmente responsabili dei fenomeni di tolleranza immunitaria e di "tumor escape". Analogamente, a seconda del contesto di segnali cellulari che caratterizza il microambiente in cui si trovano, i $M\phi$ possono promuovere la crescita tumorale o, al contrario, impedire lo sviluppo della lesione neoplastica favorendone il rigetto (Ostrand-Rosenberg et al., 2008). Recenti studi hanno evidenziato l'esistenza di una mutua correlazione tra il tipo di infiltrato cellulare e la prognosi del paziente oncologico. Ad esempio l'infiltrazione di linfociti T $CD8^+$ e di cellule dendritiche mature (DC), a livello della lesione tumorale, è associata in genere ad una prognosi favorevole nei casi di tumore al colon-retto e di tumore alla testa e al collo (Talmadge et al., 2007). Tuttavia, la massiva presenza di cellule $M\phi$ a livello delle lesioni neoplastiche, è attualmente considerato, per oltre l'80% dei casi, un indice di prognosi infausta (Bingle et al., 2002).

4.1.3 Tumor-associated Macrophages (TAMs)

Negli anni passati, gli immunologi consideravano la presenza di $M\phi$ a livello delle lesioni neoplastiche un fenomeno direttamente correlato al riconoscimento degli antigeni tumorali da parte del sistema immunitario dell'ospite. Infatti, numerosi studi *in vitro*, evidenziavano il potenziale anti-tumorale di $M\phi$ opportunamente stimolati, ad esempio con lipopolisaccaride (LPS) o interferone- γ (IFN- γ) e messi in co-cultura con cellule tumorali (Mannel et al., 1980; Drysdale et al., 1983; Fisch et al., 1983). Tuttavia stimoli di origine batterica o quanto meno segnali che favoriscono una risposta macrofagica di tipo 1 (M1) non sono quasi mai presenti nel microambiente tumorale dove al contrario predomina una condizione di immunosoppressione, che in genere è caratterizzata da un contesto immunologico di tipo 2 e che pertanto favorisce una polarizzazione fenotipica delle cellule macrofagiche in M2. In base a ciò, negli anni successivi gli studiosi hanno rivalutato il ruolo delle cellule mieloidi dello stipite monocitario-macrofagico nei processi di sviluppo tumorale, arrivando a comprendere che tali cellule, in realtà, sono strettamente coinvolte nei processi di crescita e di invasività metastatica. Studi *in vivo* infatti dimostrano che l'attivazione di una risposta infiammatoria (in larga parte mediata dai $M\phi$) rappresenta un requisito essenziale per una completa trasformazione e progressione neoplastica (Balkwill et al., 2005). A supporto di ciò, diversi studi clinici hanno infine confermato che una massiva infiltrazione tumorale di $M\phi$ è strettamente correlata ad una prognosi infausta. Alla luce di quanto detto fin'ora quindi, il "network" di citochine espresse nel microambiente tumorale ha un ruolo centrale nel condizionare la polarizzazione fenotipica dei fagociti mononucleati, favorendo soprattutto una risposta immunitaria di tipo 2.

Nel microambiente tumorale le citochine immunosoppressive IL-10 e TGF- β vengono rilasciate sia dalle cellule tumorali che direttamente dagli stessi tumour-associated macrophages (TAM) (Mantovani et al., 2002). Una volta rilasciata nel microambiente, l'IL-10 promuove la maturazione dei $M\phi$ bloccando, contemporaneamente, quella delle DCs (Allavena et al., 2000). Se è vero che l'IL-10 favorisce la maturazione dei $M\phi$ è anche vero però, che ne influenza la differenziazione fenotipica inducendo l'attivazione della *pathway* alternativa M2c, la quale, favorendo il

rilascio di fattori solubili come TGF- β , IL-10 e prostaglandine (PG), contribuisce complessivamente nel sopprimere le funzioni immunitarie antitumorali (Mantovani et al., 2002). Inoltre, contrariamente al fenotipo M1, i TAM presentano alcune caratteristiche distintive:

- sono localizzati soprattutto all'interno della massa tumorale.
- sono scarsi produttori di NO. Infatti i M \emptyset esprimenti iNOS sono localizzati soprattutto a livello delle regioni periferiche della lesione neoplastica (Klimp et al., 2001).
- sono scarsi produttori di intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI), che invece caratterizzano il fenotipo M1 (Klimp et al., 2001).
- esprimono bassi livelli di citochine pro-infiammatorie (IL-12, IL-1 β , TNF- α , IL-6) (Mantovani et al., 2002).

L'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B rappresenta un requisito indispensabile per la trascrizione di diversi geni a carattere pro-infiammatorio. Da recenti studi è emerso che i TAM presentano un'attivazione 'difettosa' di NF- κ B, e non rispondono efficacemente agli stimoli pro-infiammatori indotti da LPS o IL-1 β (Sica et al., 2006). Tuttavia, in accordo con la loro caratteristica fenotipica M2, i TAM esprimono elevati livelli di Arginasi, di recettori scavenger di tipo A (SR-A) e di recettori per il mannosio, ed inoltre sono scarsamente capaci di presentare l'antigene, che invece rappresenta una caratteristica peculiare di tutti i membri appartenenti alla classe APC (*antigen presenting cell*) (Mantovani et al., 2002).

Un altro evento di fondamentale importanza per la crescita e la progressione tumorale, attribuibile al fenotipo M2 è rappresentato dall'angiogenesi. In diversi studi effettuati su tumori umani è stato possibile constatare che, l'accumulo di TAM a livello della lesione neoplastica era direttamente correlabile con un aumento dell'angiogenesi peritumorale, attribuibile ad un incremento dei livelli di espressione di fattori angiogenici come VEGF e *platelet-derived endothelial cell growth factor* (PDEGF) (Mantovani et al., 2002). In studi molto recenti, si è visto che il fattore angiogenico VEGF-C potrebbe essere direttamente coinvolto nei fenomeni di linfo-angiogenesi peri-tumorale e che, favorendo la disseminazione delle cellule neoplastiche attraverso le vie linfatiche neo formate, contribuirebbe alla formazione di metastasi linfonodali (Schoppmann et al., 2002). Infine, mediante la produzione del fattore angiogenico timidina fosforilasi (TP), (molecola che si è dimostrata capace di promuovere la migrazione delle cellule endoteliali *in vitro* e i cui livelli di espressione sono associati ai fenomeni di neovascolarizzazione) i TAM possono direttamente partecipare ai processi di pro-angiogenesi iniziale (Schwartz et al., 2003).

Il profilo di molecole e fattori solubili rilasciato nel microambiente tumorale, rappresenta la chiave di volta degli effetti immuno-modulanti dei TAM nei confronti della risposta immunitaria adattativa. Vista la loro caratteristica M2, le principali molecole rilasciate da questa sottopopolazione macrofagica sono l'IL-10, il TGF- β , e IDO (Mantovani et al., 2004). Inoltre i TAM, sebbene opportunamente stimolati con LPS e IFN- γ sono completamente incapaci di produrre IL-12 (Sica et al., 2000). In un contesto immunologico come quello appena descritto, i M \emptyset che infiltrano le lesioni tumorali sono pressoché incapaci di polarizzare la risposta immunitaria locale verso un profilo di tipo T_H1, ma al contrario contribuiscono all'attivazione e al reclutamento di cellule T di tipo regolatorio Treg. Per la loro caratteristica anergia fenotipica le Treg che si accumulano nella lesione tumorale, sopprimono l'attività effettrice locale dei linfociti CTL CD8⁺ e di altre cellule della risposta infiammatoria, tra cui gli stessi monociti, contribuendo in tal modo, alla crescita della massa tumorale (Curiel et al., 2004).

4.1.4 Immunità tumorale ed immunoediting

La prima ipotesi di *immune surveillance* tumorale è stata postulata da Burnet e Thomas negli anni 50' i quali appunto, pensavano che la crescita tumorale fosse efficientemente controllata dal sistema immunitario, dal quale dipendeva la sorte delle cellule cancerose (Dunn et al., 2002). Successivamente a conferma di tale ipotesi, modelli di tumorigenesi indotta da agenti chimici o da virus trasformanti dimostravano che, topi a cui veniva danneggiata la componente immunitaria, risultavano maggiormente suscettibili all'insorgenza di cancro.

Il concetto di immunosorveglianza tumorale si è evoluto, successivamente, in quello di "*cancer immuno-editing*" inizialmente introdotto da Ikeda, Old e Shreiber (Ikeda et al., 2002) nel quale si identificano tre eventi chiave: *Elimination*, *Equilibrium*, *Escape*. Nel modello di *immunoediting*, la fase di eliminazione (*Elimination*) corrisponde a quella che viene definita immunosorveglianza tumorale, in cui le cellule tumorali sono riconosciute e distrutte da diversi componenti della risposta immunitaria.

Nella fase di *equilibrium*, l'eliminazione da parte del sistema immunitario è bilanciata contemporaneamente dalla crescita del tumore. La condizione di equilibrio che si stabilisce durante questa fase determina un sorta di "modellamento" cellulare fenotipico che coinvolge sia le cellule tumorali che le componenti del sistema immunitario stesso; quest'ultimo, in tali circostanze, diventa responsabile della selezione di varianti tumorali che crescendo in maniera incontrollata, riescono ad evaderne il controllo (Koebel et al., 2007). E' proprio durante la fase di equilibrio che le interazioni tra le diverse componenti del sistema immunitario con il tumore determinano il tipo di risposta immunitaria. Infatti quando il tumore comincia a svilupparsi, si genera un particolare infiltrato leucocitario caratterizzato dal reclutamento di diversi sottotipi cellulari tra cui le stesse cellule effettrici, i linfociti T helper, e i linfociti T regolatori (Treg), che interagendo con le *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs), definiscono un microambiente dalle caratteristiche "immunosoppressive" che garantisce in tal modo la progressione del tumorale (fase di *escape*) (Dunn et al., 2002).

4.1.5 Tolleranza tumore-specifica

La progressione di un tumore è il risultato di una serie di modificazioni che hanno luogo all'interno del microambiente, che possono intersare sia direttamente le cellule tumorali, rendendole meno immunogeniche, che il microambiente tumorale circostante rendendolo immunologicamente più tollerante. A supporto di tale teoria meccanicistica, vi sono diversi studi effettuati su modelli animali tra cui gli esperimenti di Willimsky e Blankenstein i quali, ideando un modello di tumorigenesi sporadica spontanea, mediante la generazione di topi transgenici che presentavano un particolare costrutto contenente la sequenza genetica di un noto oncogene virale, l'*SV40 large T cancer-promoting gene*, hanno ottenuto animali che presentavano tumori spontanei con diversa localizzazione e origine anatomica (Willimsky e Blankenstein, 2005). Gli autori constatarono che, sebbene in un primo momento era possibile osservare in tutti gli animali una risposta immunitaria diretta contro la proteina oncogenica SV40 large T, gli stessi topi sviluppavano, successivamente, una condizione di tolleranza immunitaria. Sorprendentemente, se i tumori isolati da tali animali venivano trasferiti in topi sani, erano in grado di indurre una potente risposta immunitaria tumore-specifica. Gli esperimenti di Willimsky e Blankenstein sono un ulteriore conferma del meccanismo di *immunoediting* tumorale in cui le cellule cancerose sono in grado di evadere la sorveglianza immunitaria interferendo sulla capacità del sistema immunitario, ad esercitare una efficace risposta antitumorale (*escape*). Inoltre i topi impiantati con un tumore sono in grado di rigettare lo stesso tumore se impiantato in un altro sito anatomico distante dal primo, nonostante il tumore del primo impianto continui a crescere (Kurt et al., 1995; Kurt et al., 2000; Blohm et al., 2002). Ciò spinse gli studiosi ad ipotizzare che, molto probabilmente, a livello del sito di impianto

primario, l'immunità tumore-specifica viene sovvertita dall'attività di diversi sottotipi cellulari con funzione immunosoppressiva tra cui gli stessi linfociti T regolatori CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Treg), i quali, aumentano considerevolmente nel microambiente tumorale (North et al., 1984; Turk et al., 2004). I cambiamenti che hanno luogo durante la fase di *escape* e che contribuiscono allo sviluppo di una tolleranza funzionale, corrispondono sia a quelli che si verificano a carico delle cellule tumorali, che a quelli che coinvolgono il microambiente circostante. Ad esempio, l'espressione di molecole che inibiscono la funzione dei linfociti T come PD-L1 (*programmed cell death ligand 1*), B7-H3, B7x, HLA-G e HLA-E da parte delle cellule tumorali e del parenchima circostante, possono inibire direttamente l'attività delle cellule T effettrici (Dong et al., 2007; Thompson et al., 2005; Roth et al., 2007; Sun et al., 2006; Zang et al., 2007; Tripathi et al., 2006; Derre et al., 2006). In maniera analoga, diversi fattori solubili come l'IL-10, il fattore di crescita trasformante $-\beta$, (TGF- β) ed il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), concorrono alla soppressione della risposta immunitaria antitumorale (Kawamura et al., 2002; Zhang et al., 2005; Chen et al., 2005; Gorelik et al., 2001; Fahlen et al., 2005; Gabrilovich et al., 1999; McKallip et al., 1999). L'espressione dell'indolamina 2,3-diossigenasi (IDO) da parte delle cellule tumorali o da parte delle antigen-presenting cells (APCs) "IDO-competenti" può ulteriormente contribuire all'acquisizione di un profilo immunotollerante sia attraverso la soppressione diretta delle cellule T effettrici, sia mediante l'amplificazione diretta dell'attività immunosoppressiva delle cellule Treg (Munn et al., 2007; Mellor et al., 2008). La IDO è un enzima che riveste un ruolo chiave nel fenomeno di tolleranza immunitaria. L'interesse da parte di numerosi gruppi di ricerca per tale fattore risiede nel fatto che la sua attività biologica è in grado di condizionare l'attività di diverse popolazioni del sistema immunitario, e per tale motivo, i suoi effetti immunosoppressivi risultano amplificati. Ad esempio, Sharma e collaboratori hanno dimostrato che le cellule dendritiche plasmacitoidi (pDCs) residenti nei linfonodi drenanti esprimono elevati livelli di IDO e sono in grado di attivare direttamente le Treg mature, le quali a loro volta, aumentando l'espressione di PD-L1 sulla superficie cellulare di altre cellule dendritiche (DCs), inibiscono la proliferazione e l'attività delle cellule T effettrici (Sharma et al., 2007). Concludendo quindi, la presenza di un "pattern" specifico di popolazioni cellulari ad attività immuno-soppressiva come le CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg, i linfociti T *natural killer CD1d-restricted* (NKT), le DCs immature, le pDCs e le MDSCs, ha un ruolo essenziale nell'induzione e/o mantenimento di una condizione locale di "privilegi" immunitari, che garantiscono la crescita e lo sviluppo delle cellule tumorali (Mellor et al., 2008; Zitvogel et al., 2006; Nagaraj et al., 2007).

4.1.6 Il ruolo dell'Ado nel sistema immunitario

L'Ado è una molecola segnale ad attività paracrina ed autocrina, con funzione omeostatica locale, coinvolta in numerose condizioni fisiopatologiche soprattutto a carattere infiammatorio ed immunologico. Per tale motivo numerosi studi sono stati condotti al fine di comprenderne gli effetti diretti nei confronti delle diverse popolazioni cellulari che costituiscono la componente immunitaria soprattutto in condizioni patologiche. I livelli di Ado aumentano considerevolmente nello spazio extracellulare in risposta a stress metabolici e danni tissutali, ed infatti alti livelli di Ado sono riscontrabili in patologie ischemiche, in condizioni ipossiche, ed in condizioni infiammatorie di tipo traumatologico (Linde et al., 2001; Fredholm et al., 2001). Il rapido rilascio di Ado in risposta a stimoli di insulto o alterazione tissutale esercita una efficace azione omeostatica attraverso l'attivazione di due sistemi di ripristino. Un primo effetto dell'Ado lo si può osservare subito dopo il suo rilascio, in quanto essendo una molecola segnale, la sua azione autocrina /paracrina ristabilisce rapidamente le condizioni locali di alcuni parametri biochimici tissutali. Contemporaneamente, l'Ado può favorire una risposta di tipo fisiologico che vede il coinvolgimento di altre popolazioni cellulari, le quali, una volta reclutate presso il sito del danno, partecipano ai processi omeostatici di protezione d'organo. Per tale motivo, gli effetti fisiologici dell'Ado si ripercuotono su diverse popolazioni cellulari dello stroma tumorale soprattutto sulle cellule del sistema immunitario.

4.1.6a Linfociti

Recenti studi effettuati su topi KO per i recettori dell'Ado hanno dimostrato che essa è in grado di influenzare direttamente l'attività dei linfociti, condizionandone la risposta immunitaria. Modelli murini A_{2A} -KO hanno dimostrato che i principali effetti immunosoppressivi dell'Ado nei confronti dei linfociti sono mediati dall'attivazione del recettore A_{2A} . Mediante l'attivazione di tale recettore l'Ado è in grado di inibire la secrezione di IL-2 e quindi di ridurre i livelli di proliferazione dei linfociti T $CD4^+$ (Naganuma et al., 2006; Sevigny et al., 2007). Inoltre mediante l'attivazione del medesimo recettore l'Ado sopprime la produzione di IFN- γ e IL-4 nei linfociti $CD4^+$ condizionandone quindi la polarizzazione T_{H1}/T_{H2} . In realtà studi più approfonditi hanno dimostrato che l'Ado mediante l'attivazione del recettore A_{2A} favorisce la polarizzazione delle $CD4^+$ verso un fenotipo T_{H2} (Lappas et al., 2005). Gli effetti immunosoppressivi dell'attivazione del recettore A_{2A} sono anche dovuti ad un aumento dell'espressione di ligandi costimolatori a funzione negativa come *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA4) e PD1, e ad una diminuzione dell'espressione di molecole costimolatrici come CD40L (Sevigny et al., 2007). In maniera analoga alla popolazione $CD4^+$, l'Ado, attraverso l'attivazione del recettore A_{2A} , è in grado di inibire la produzione di IL-2 da parte dei linfociti $CD8^+$ citotossici di tipo 1 e 2 (TC1 e TC2) e di condizionarne negativamente le funzioni immunitarie inibendo il rilascio di IFN- γ da parte delle TC1 e IL-4/5 da parte delle TC2 (Erdmann et al., 2005). Di recente alcuni autori hanno dimostrato che l'Ado ha un ruolo fondamentale nel regolare gli effetti immunosoppressivi delle cellule Treg. Infatti, i linfociti T a funzione regolatoria $CD4^+CD25^+$ FoxP3⁺ esprimono elevati livelli di CD39 e CD73, i due enzimi ad attività apirasi e nucleotidasica necessari per la sintesi extracellulare dell'Ado a partire dall'ATP (Deaglio et al., 2007; Kobie et al., 2006). Inoltre recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di un legame tra il fattore di trascrizione FoxP3 e l'espressione di CD39 (Borsellino et al., 2007). Infatti, esperimenti condotti su topi CD39-KO dimostrano che le Treg prive dell'enzima apirasi, perdono la capacità di inibire la proliferazione dei linfociti $CD4^+$ mentre, l'aggiunta di una forma solubile esogena del CD39 ristabilisce le funzioni immuno-soppressive delle Treg (Deaglio et al., 2007). Inoltre, a supporto di tali dati altri autori hanno dimostrato che linfociti $CD4^+$ A_{2A} -KO proliferano maggiormente se messi in coltura con *wild-type* Treg. Oltre alle cellule target, le stesse Treg esprimono elevati livelli del recettore A_{2A} , l'attivazione del quale determina un aumento significativo dell'espressione di FoxP3

(Zarek et al., 2008). Il ruolo funzionale del recettore A_{2A} sulla funzione delle Treg è stato dimostrato da Naganuma e colleghi in un modello murino di colite in cui è stato osservato che il trasferimento adottivo di Treg A_{2A} -KO non è in grado di sopprimere il processo infiammatorio (Naganuma et al., 2006). In conclusione, dato che le funzioni immunitarie dei linfociti sono principalmente modulate dall'attivazione del recettore A_{2A} , gli effetti anti-infiammatori che si osservano in modelli animali di patologie autoimmuni e condizioni di ischemia, in seguito all'utilizzo di agonisti selettivi per questo recettore, potrebbero essere attribuibili, principalmente ad un effetto diretto dell'Ado soprattutto sui linfociti.

4.1.6b Neutrofili

I neutrofili rappresentano una delle prime linee di difesa dell'organismo, in quanto sono le prime cellule della risposta immunitaria innata a migrare e raggiungere il sito di infiammazione, proteggendo l'ospite da eventuali attacchi da parte di microrganismi patogeni attraverso la produzione ed il rilascio di mieloperossidasi (MPO) e radicali liberi. Oltre al rilascio di agenti ossidanti ed enzimi coinvolti nei sistemi di difesa dell'ospite, i neutrofili producono diverse molecole segnale che rilasciano soprattutto durante il processo di transmigrazione attraverso il monostrato epiteliale dei tessuti, tra cui elevate quantità di AMP, che nello spazio extra cellulare viene rapidamente convertita ad Ado attraverso l'attività enzimatica del CD39 e del CD73. A questo punto, l'Ado prodotta, interagendo col recettore A_{2A} , esercita un'azione autocrina sopprimendo la risposta infiammatoria dei neutrofili, attraverso la riduzione del rilascio di radicali liberi, citochine varie, leucotriene B4 e molecole di adesione (Cronstein et al., 1995; Flamand et al., 2000). L'attivazione del recettore A_1 invece, aumenta l'attività infiammatoria dei neutrofili soprattutto a livello dei tessuti o dei siti anatomici dove i livelli di Ado sono molto bassi, come ad esempio nel derma, o in determinate condizioni fisiopatologiche in cui la produzione di Ado risulta inferiore a quella stimata durante i tipici processi infiammatori come quelli indotti da microrganismi patogeni (Hasko e Cronstein, 2004). Infatti diversi studi dimostrano che l'attivazione del recettore A_1 favorisce la chemiotassi dei neutrofili, attraverso l'espressione di molecole di adesione, mentre l'attivazione del recettore A_{2A} riduce il reclutamento delle cellule polimorfonucleate a livello del sito infiammato (Hasko e Cronstein, 2004). Inoltre, alcune condizioni infiammatorie come l'asma, riducono l'espressione del recettore A_1 aumentando invece quella del recettore A_{2A} (Versluis et al., 2008a,b). Il recettore A_3 , invece, ha un ruolo fondamentale nella chemiotassi dei neutrofili a livello polmonare, soprattutto in condizioni di sepsi (Inoue et al., 2008). Il gruppo di ricerca di Inoue e coll., hanno dimostrato che topi A_3 -KO esibiscono una ridotta infiltrazione di neutrofili a livello polmonare accompagnata ad un ridotto danno d'organo durante i processi di sepsi.

4.1.6c Natural Killer

Con la definizione di *Natural killer* si identifica una popolazione della componente immunitaria innata che, come altri costituenti del sistema immunitario, si origina da cellule staminali del tessuto ematopoietico. Pur condividendo con i linfociti T gli stessi progenitori cellulari, le NK presentano uno sviluppo extra-timico, diversamente dalle cellule T le quali necessitano di raggiungere il timo per completare la propria maturazione fenotipica, (Raulet, 1999). Le NK hanno un ruolo chiave nella patogenesi di diverse malattie infettive causate da virus parassiti ed alcuni batteri intracellulare, e, in risposta ad essi, producono diverse citochine e chemiochine come IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, MIP-1 α/β , e RANTES (Scott e Trinchieri, 1995; Unanue, 1997; Biron e Brossay, 2001). In condizioni patologiche a carattere infiammatorio come il cancro, l'accumulo di Ado sopprime la risposta immunitaria delle NK attraverso l'attivazione del recettore A_{2A} , riducendone la capacità litica (Raskovalova et al., 2005). Infatti Lokshin e coll. hanno dimostrato che gli effetti immunosoppressivi dell' Ado nei confronti delle NK sono determinati da un aumento dei livelli di cAMP intracellulare indotti dall'attivazione del recettore A_{2A} . L' aumento di cAMP

infatti determina la fosforilazione e quindi l'attivazione della protein chinasi cAMP-dipendente, la PKA di tipo 1, responsabile della soppressione della produzione di citochine pro-infiammatorie (Lokshin et al., 2006). Per contro invece, un'attivazione selettiva del recettore A_3 è capace di aumentare l'attività antitumorale delle NK (Arie et al., 2003). Infatti Harish e coll., servendosi di un modello murino di melanoma, hanno osservato che la somministrazione orale dell'agonista selettivo del recettore A_3 CI-IB-MECA, incrementa la citotossicità delle NK nei confronti delle cellule tumorali, riducendone la crescita (Harish et al., 2003). Inoltre altri autori hanno anche riportato un aumento dei livelli di IL-12 a livello del microambiente tumorale (Lokshin et al., 2006). Tali dati quindi mettono in luce la possibilità di utilizzare un agonista selettivo del recettore A_3 per il trattamento di patologie neoplastiche.

4.1.6d Cellule Dendritiche

Le cellule dendritiche DCs rappresentano l'elemento di congiunzione cellulare tra la risposta immunitaria innata e quella adattativa in quanto sono responsabili dell'attivazione dei linfociti T (Banchereau et al., 1998). Durante gli stress metabolici, in assenza di stimoli, l'Ado si comporta da chemiotassina mediante l'attivazione dei recettori A_1 e A_3 favorendo la chemiotassi delle cellule dendritiche immature verso il sito dell'insulto (Panther et al., 2001; Fossetta et al., 2003). E' noto che le cellule dendritiche plasmacitoidi (pDCs) sono potenti modulatori della risposta immunitaria e producono elevati livelli di interferoni di tipo 1 durante le infezioni virali, sebbene la loro presenza sia stata osservata anche a livello di siti interessati da danno tissutale in diverse condizioni infiammatorie come allergie, patologie autoimmuni e cancro. Le pDCs immature esprimono elevati livelli di recettore A_1 e bassi livelli di recettore A_{2A} (Schnurr et al., 2004). L'attivazione del recettore A_1 nelle pDCs immature ne stimola la migrazione verso il sito d'insulto. Tuttavia, una volta raggiunto lo stato di maturazione, le pDCs esprimono elevati livelli di recettore A_{2A} la cui attivazione sopprime la produzione di molecole pro-infiammatorie come IL-6, IL-12 e IFN- α (Schnurr et al., 2004). In cellule dendritiche completamente mature, l'Ado sopprime il rilascio di IL-12 indotto dall'attivazione dei recettori Toll-like Receptors (TLRs), attraverso l'aumento di cAMP intracellulare indotto dalla stimolazione del recettore A_{2A} , aumentando per contro, la produzione di IL-10. Inoltre l'attivazione del recettore A_{2A} riduce la capacità delle cellule dendritiche di attivare le cellule T CD45RA⁺ (Panther et al., 2003). Diversi autori hanno osservato che cellule DCs pre-condizionate con Ado favoriscono la crescita tumorale, una volta iniettate nel sito della neoplasia (Novitskiy et al., 2008). Tale effetto era direttamente correlato ad una riduzione del rilascio di citochine T_H1 e ad un aumento di citochine di tipo T_H2 come IL-10, TGF- β e IDO (Novitskiy et al., 2008). In conclusione, l'influenza dell'Ado sui processi di differenziazione cellulare e sul diverso comportamento delle DCs potrebbe rappresentare un importante meccanismo di tolleranza immunitaria con il quale le cellule tumorali riescono ad evadere la sorveglianza della componente immunitaria dell'ospite.

4.1.6e Macrofagi

Un'altro importante anello di congiunzione tra la componente immunitaria innata e quella adattativa è rappresentato dai MØ, i quali attraverso la produzione di molecole infiammatorie e la presentazione dell'antigene alle cellule effettrici, rappresentano una prima linea di difesa nei confronti delle cellule tumorali. Mediante l'utilizzo di animali KO per i recettori dell'Ado, recenti studi hanno permesso di delineare dettagliatamente, gli effetti dell'Ado sulla funzione delle diverse componenti cellulari della risposta immunitaria. Ad esempio, diversi studi sono in accordo col considerare il recettore A_{2A} il principale responsabile degli effetti inibitori dell'Ado sulla produzione di TNF- α (Hasko et al., 2000; Ryzhov et al., 2008). Inoltre la possibilità che qualche altro recettore potesse essere coinvolto negli effetti inibitori dell'Ado, nasce dal fatto che sia il NECA che l'IB-MECA (CF-101) sono in grado di inibire la produzione di TNF- α in topi A_{2A} KO (Hasko et al., 2000; Kreckler et al., 2006). Un'approccio sperimentale caratterizzato dall'utilizzo di animali A_{2A} KO in combinazione con agonisti selettivi del recettore A_{2B} dimostra che anche questo recettore svolge un'azione inibitoria sul rilascio di TNF- α nei MØ (Kreckler et al., 2006). Tuttavia sembra che gli effetti del recettore A_{2B} siano di minore rilevanza rispetto a quelli del recettore A_{2A} , in quanto una delezione genetica del primo non altera gli effetti inibitori indotti dall'attività del secondo (Kreckler et al., 2006; Ryzhov et al., 2008). In maniera analoga a quanto accade per la produzione di TNF- α , il recettore A_{2A} incrementa il rilascio di IL-10 da parte dei MØ. Tali risultati emergono da recenti esperimenti in cui l'Ado si è dimostrata incapace di incrementare il rilascio di IL-10 indotta da *Escherichia coli* in MØ deficienti del recettore A_{2A} (Csokaet al., 2007). Se è vero che il recettore A_{2B} non ha quasi alcuna influenza sulla produzione di TNF- α e IL-10 nei MØ, tuttavia ha un ruolo chiave sul rilascio di IL-6 (Ryzhov et al., 2008). Infatti Ryzov e coll. hanno osservato che la somministrazione di NECA in MØ A_{2B} KO non induce il rilascio di IL-6 rispetto al controllo (Ryzhov et al., 2008). E' opportuno considerare che tali dati vanno, in ogni caso, interpretati con molta cautela, in quanto derivano da approcci di tipo farmacologico anche in ragione del fatto che molti dei ligandi utilizzati al fine degli studi sopra citati non sono particolarmente selettivi.

4.2 Scopo

Nonostante numerosi studi siano stati effettuati al fine di delineare un profilo funzionale dei diversi sottotipi recettoriali dell'Ado, nella risposta immunitaria, soprattutto in condizioni patologiche, scarse e poco precise risultano le informazioni relative al ruolo svolto dal recettore A_3 sul sistema immunitario. Al contrario invece, numerosi studi al riguardo concordano col considerare il recettore A_{2A} il principale responsabile degli effetti immunosoppressivi dell'Ado. Come già detto in precedenza, sulla base dello stato dell'arte attuale, il recettore A_3 è un recettore metabotropico accoppiato principalmente a proteina Gi che diversamente dal recettore A_{2A} che invece è accoppiato a proteina Gs, riduce drasticamente i livelli di cAMP intracellulare. Inoltre mediante l'attivazione di una proteina Gq il recettore A_3 è capace di attivare, attraverso una rete di segnali dipendenti dai livelli di Ca^{2+} intracellulare, diverse *signaling pathways* ad attività mitogena, come ERK, JNK, P38, Akt. Uno studio *in vivo* effettuato in parallelo al presente progetto di ricerca ha dimostrato che il CI-IB-MECA è capace di ridurre la crescita tumorale in un modello murino di melanoma (Fig.1). Inoltre, in associazione all'inibizione della crescita tumorale è stato osservato un significativo incremento del numero di linfociti T $CD8^+$, DCs e $M\emptyset$, a livello della lesione neoplastica (Fig.2). Alla luce di ciò e sulla base dello stato dell'arte, lo scopo di questa terza sezione del progetto di dottorato è stato quello di studiare gli effetti diretti del CI-IB-MECA, sulle popolazioni cellulari immunitarie sopracitate attraverso indagini più approfondite sul comportamento e sull'espressione fenotipica conseguenti al trattamento con il CI-IB-MECA. Infine ulteriori studi molecolari sono stati effettuati sulla linea mieloide monocitaria-macrofagica, al fine di caratterizzare la farmaco dinamica alla base degli effetti osservati in seguito al trattamento con CI-IB-MECA.

4.3 Risultati

4.3.1 Attività anti-tumorale del CI-IB-MECA in un modello murino di melanoma: studio degli effetti diretti sulle popolazioni cellulari infiltrate nel tumore

Topi C57Bl/6j sono stati inoculati s.c. con 2×10^5 cellule di melanoma B16-F10/topo al giorno 0 (Fig.1A). Dieci giorni dopo l'inoculo i topi sono stati trattati con CI-IB-MECA (CIM, 0.1-1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) per 3 giorni consecutivi (10, 11 e 12) e sacrificati il 13° giorno per le opportune analisi (Fig.1A). Da alcuni risultati preliminari ottenuti *in vitro* su cellule B16F10, è emerso che il CI-IB-MECA non ha alcun effetto diretto sulla crescita cellulare delle B16F10 (dati non mostrati). Tuttavia, il trattamento con CI-IB-MECA in vivo riduce significativamente la crescita tumorale in maniera dose-dipendente rispetto agli animali di controllo (PBS), con il maggiore effetto soppressivo alla dose di 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (665.3 ± 142.3 vs $274.8 \pm 69.45 \Delta$ (mm^3); Figure 1B).

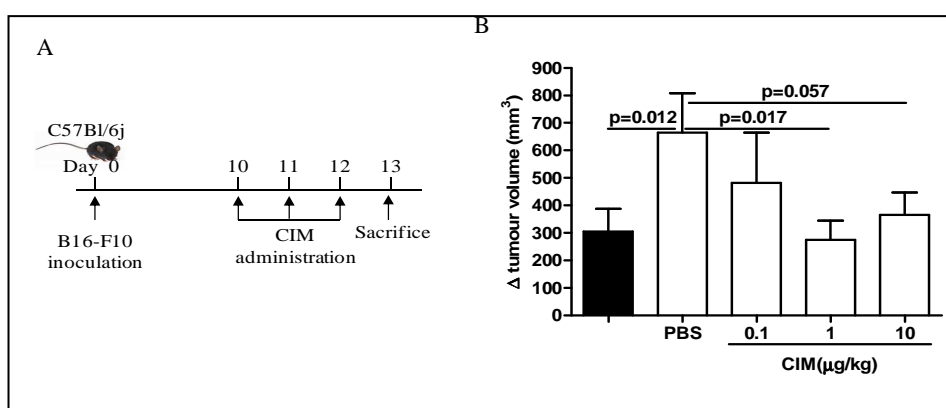


Fig.1 Il CIM inibisce la crescita tumorale in topi impiantati con cellule di melanoma. Protocollo sperimentale: 10 giorni dopo l'inoculo delle cellule B16F10, topi C57Bl/6j sono stati trattati con CIM (0.1-1-10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) o PBS nei giorni 10, 11 e 12 e sacrificati il giorno 13. Le misurazioni relative alla crescita tumorale sono state effettuate nei giorni 10 e 13 e la crescita della lesione rappresentata come incremento di volume (Δmm^3). Il volume tumorale misurato il giorno 10 era di $305.4 \pm 82.48 \text{mm}^3$ (B). Negli animali trattati con PBS il volume tumorale aumenta in maniera significativa dal giorno 1 al giorno 13. Invece, negli animali trattati con CI-IB-MECA la crescita tumorale risulta significativamente ridotta rispetto agli animali di controllo (PBS).

Il trattamento con CI-IB-MECA aumenta significativamente i livelli di cellule dello stipe monocitico/macrofagico $\text{CD11b}^+\text{F4/80}$ (Fig.2A) e di cellule dendritiche di derivazione mieloide $\text{mDCs CD11c}^+\text{CD11b}^+$ infiltranti la lesione tumorale (Fig.2B). In ragione della loro principale funzione di cellule presentanti l'antigene, le DCs e i $\text{M}\phi$ possono direttamente regolare le funzioni dei linfociti T CD8^+ . Per tale motivo sono stati analizzati i livelli di cellule CD8^+ a livello della lesione tumorale. La somministrazione di CI-IB-MECA aumenta significativamente la percentuale di cellule CD8^+ infiltranti il tumore (Fig.2C).

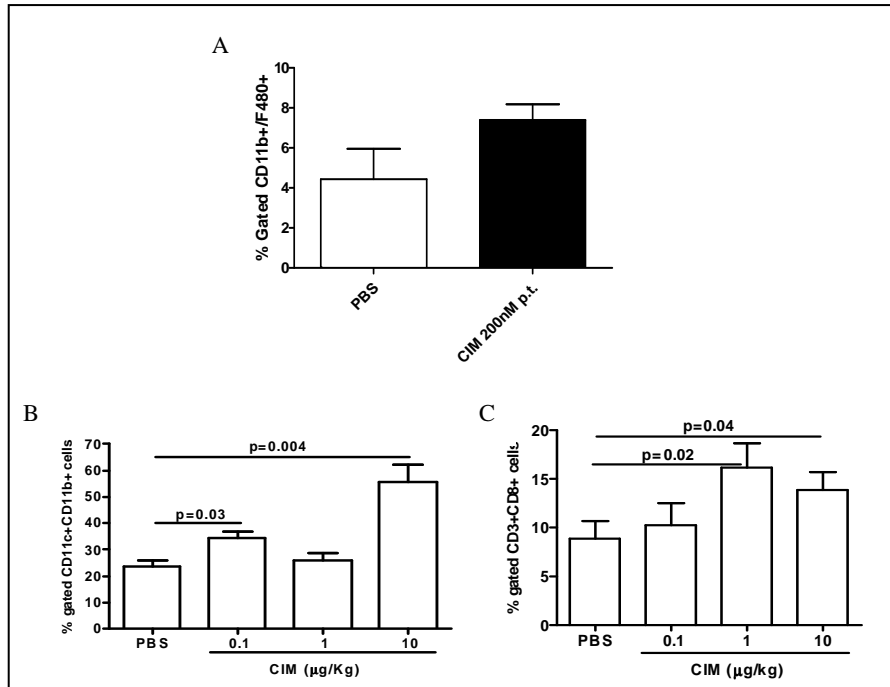


Fig.2 Cellule infiltranti la lesione tumorale in topi impiantati con B16F10 e trattati con CIM. Gli animali trattati con CIM mostrano un significativo aumento dei livelli di cellule dello stipite monocitico/macrofagico CD11b⁺F4/80⁺ (A), di DCs CD11c⁺CD11b⁺ (B), e di linfociti T CD3⁺CD8⁺ (C) a livello della lesione neoplastica

Tali dati suggeriscono che l'attività anti-tumorale del CI-IB-MECA osservata *in vivo* non dipenda da un effetto diretto dell'agonista A₃ sulle cellule di melanoma ma piuttosto su alcune popolazioni della risposta immunitaria, come DCs, MØ e linfociti T i cui livelli risultano aumentati negli animali trattati con CI-IB-MECA. Sulla base di tale ipotesi abbiamo verificato gli effetti diretti del CI-IB-MECA sulle popolazioni sopra citate. Per prima cosa abbiamo verificato l'espressione del recettore A₃ sulle popolazioni prese in esame, mediante RT-PCR. Tutte e tre le popolazioni cellulari esprimono il recettore A₃ (Fig.3)

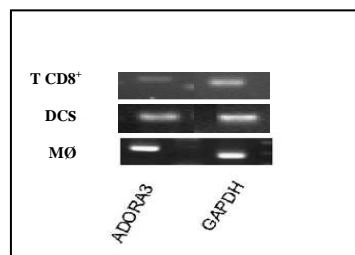


Fig.3 Analisi RT-PCR relativa all'espressione del recettore A₃ su linfociti T CD8⁺, DCs e MØ.

Una volta verificata l'espressione del recettore A₃ sulle popolazioni cellulari sopra citate, le cellule sono state messe in coltura e trattate con CI-IB-MECA a diverse

concentrazioni per 24 h Il trattamento con CI-IB-MECA induce il rilascio di citochine pro-infiammatorie come IL-12 e TNF- α da parte delle cellule DCs (Fig.4A e B). Analogamente anche da parte dei linfociti T CD8⁺ si osserva un significativo aumento della produzione di TNF- α (Fig.4C). Tuttavia, sebbene non si osservi alcun effetto sui M \emptyset trattati con CI-IB-MECA, è stato osservato un significativo incremento del rilascio di TNF- α da parte dei M \emptyset stimolati con LPS e trattati con CI-IB-MECA rispetto al controllo e al trattamento con solo LPS (Fig.4D).

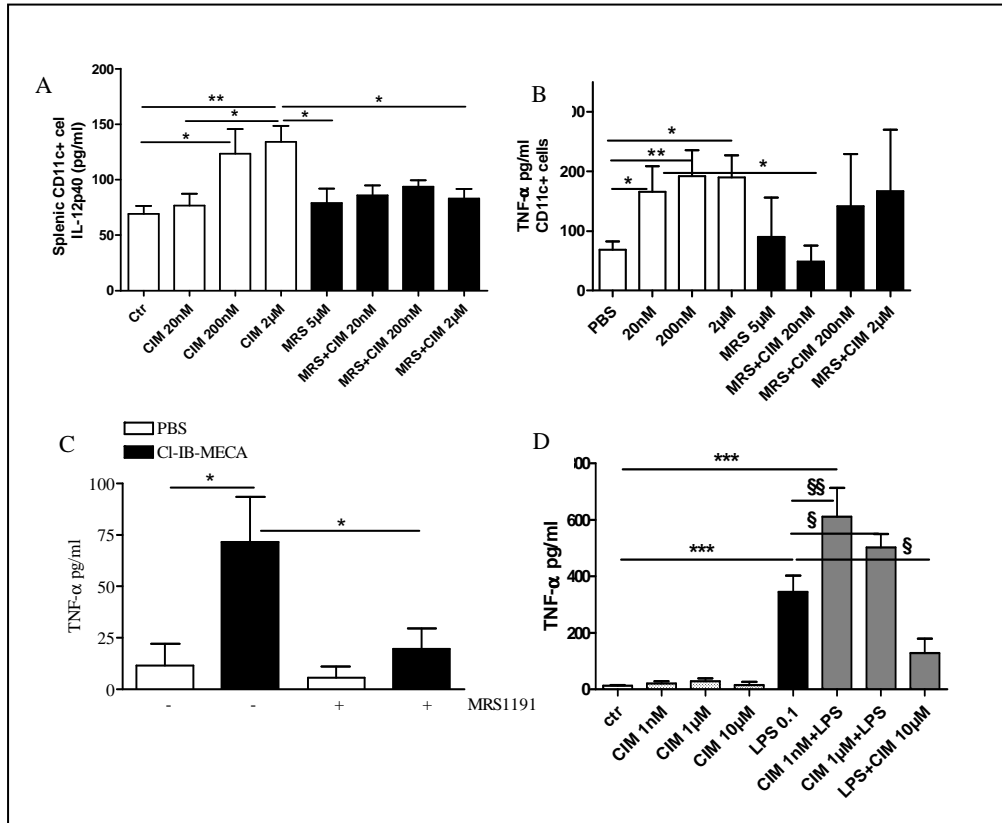


Fig.4 Il CI-IB-MECA favorisce il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte di M \emptyset , DCs e linfociti T CD8⁺ in maniera A₃-dipendente. Le DCs spleniche CD11c⁺CD11b⁺ isolate da milze provenienti da topi C57Bl6j sono state trattate con CI-IB-MECA (20nM-200nM-2 μ M) in presenza e non dell'antagonista selettivo del recettore A₃ MRS1191 (0.5 μ M). (A) Il CI-IB-MECA induce il rilascio di IL-12 e TNF- α da parte delle DCs spleniche. Inoltre la somministrazione di MRS1191 (0.5 μ M) annulla gli effetti di CI-IB-MECA. I linfociti T CD3⁺CD8⁺ sono stati isolati da linfonodi prelevati da topi C57Bl6j e trattati con CI-IB-MECA (200 nM) in presenza e non di MRS1191 (0.5 μ M). (D) Il CI-IB-MECA induce il rilascio di TNF- α da parte dei linfociti T CD8⁺. La presenza di MRS1191 (0.5 μ M) annulla gli effetti del CI-IB-MECA. I M \emptyset peritoneali isolati da topi C57Bl6j sono stati trattati con CI-IB-MECA (1 nM-1 μ M-10 μ M) e/o LPS in presenza e non di MRS1191 (0.5 μ M). (D) Il CI-IB-MECA aumenta il rilascio di TNF- α da parte dei M \emptyset stimolati con LPS. Inoltre la presenza dell'antagonista MRS1191 annulla gli effetti del CI-IB-MECA

Alla luce dei dati mostrati fin'ora, avendo ottenuto analoghi risultati su tutte le popolazioni cellulari prese in esame gli studi sono stati approfonditi sui M \emptyset peritoneali allo scopo di indagare sul possibile meccanismo molecolare alla base degli effetti osservati.

4.3.2 Effetti del CI-IB-MECA sul rilascio del TNF- α nei macrofagi

I M \emptyset peritoneali murini sono stati trattati con CI-IB-MECA (1 nM-10 nM) per 24 h in presenza o in assenza di LPS (0,1 μ g/ml) ed il rilascio di TNF- α è stato misurato mediante saggio ELISA.

Come è possibile osservare in Fig.5 il CI-IB-MECA (1 nM) non ha alcun effetto sui M \emptyset peritoneali se somministrato da solo, ma al contrario induce un significativo incremento del rilascio di TNF- α nei M \emptyset stimolati con LPS (0.1 μ g/ml), rispetto al controllo e al trattamento con solo LPS (611.3 \pm 102.2 vs 12.2 \pm 3.37, $p < 0.0001$, and 611.3 \pm 102.2 vs 344.7 \pm 57.45, $p < 0.001$, rispettivamente) (Fig. 5). Tuttavia è opportuno notare che il CI-IB-MECA non incrementa il rilascio di TNF- α nei M \emptyset attivati con LPS se somministrato a concentrazioni maggiori (1-10 μ M) (Fig.5). Da tali risultati, quindi, si evince che il CI-IB-MECA è in grado di incrementare il rilascio di TNF- α in M \emptyset stimolati con LPS.

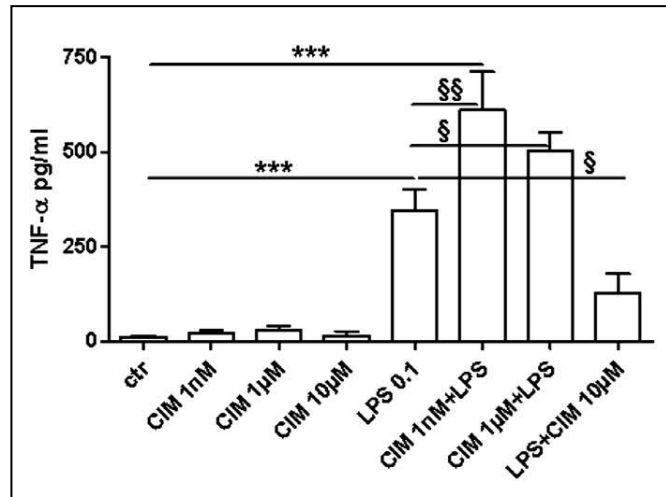


Fig.5 Livelli di TNF- α quantificati mediante saggio ELISA nel surnatante di macrofagi peritoneali, isolati da topi C57Bl6j e trattati con LPS (0.1 μ g/ml), CI-IB-MECA (CIM; 1nM up to 10 μ M) o con entrambi i reagenti. I risultati sono espressi come medie \pm SEM, $n=5$. § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.3.3 L' antagonista selettivo del recettore A_3 MRS1191 inibisce gli effetti del CI-IB-MECA sul rilascio di TNF- α indotto da LPS

Per le successive indagini effettuate allo scopo di delineare il meccanismo d'azione alla base degli effetti osservati, si è scelto di utilizzare il CI-IB-MECA alla concentrazione di 1 nM. Il primo step è stato quello di valutare l'espressione del recettore A_3 sui MØ peritoneali, mediante RT-PCR. Dai dati risulta che il recettore A_3 è espresso dai MØ peritoneali ed i suoi livelli di espressione non variano in seguito a stimolazione con LPS (Fig.6A e B, rispettivamente). Per dimostrare che gli effetti del CI-IB-MECA osservati sui MØ sono dipendenti dall'attivazione del recettore A_3 gli esperimenti sono stati effettuati in presenza dell'antagonista del recettore A_3 MRS1191 (0.5 μ M). Come mostrato in figura 2C l'antagonista MRS1191 riduce significativamente gli effetti del CI-IB-MECA nei MØ stimolati con LPS (611.3 ± 102.2 vs 283.5 ± 107.7 , $p < 0.05$). Inoltre l'MRS1191 non altera il rilascio di TNF- α sia nei controlli che nelle cellule trattate con CI-IB-MECA che con LPS da solo (Fig.6C). Successivamente gli esperimenti sono stati condotti in presenza di Forskolina, un attivatore dell'adenilato ciclasi che determina un incremento dei livelli di cAMP intracellulare. Il rilascio di TNF- α indotto dalla somministrazione di CI-IB-MECA e LPS risulta significativamente ridotto in presenza di Forskolina (1 μ M) (611.3 ± 102.2 vs 258.1 ± 83.16 , $p < 0.05$) (Fig.6D). Il rilascio di TNF- α indotto da LPS risulta solo debolmente ridotto dalla presenza di Forskolina (344.7 ± 57.45 vs 196.8 ± 66.18) (Fig.6D). Non sono stati osservati cambiamenti nel rilascio di TNF- α nelle cellule trattate con solo CI-IB-MECA (1nM) (Fig.6D). Sulla base di tali risultati quindi, si evince che il CI-IB-MECA aumenta il rilascio di TNF- α da parte dei MØ stimolati con LPS attraverso una *signaling pathway* dipendente dall'attivazione di una proteina Gi.

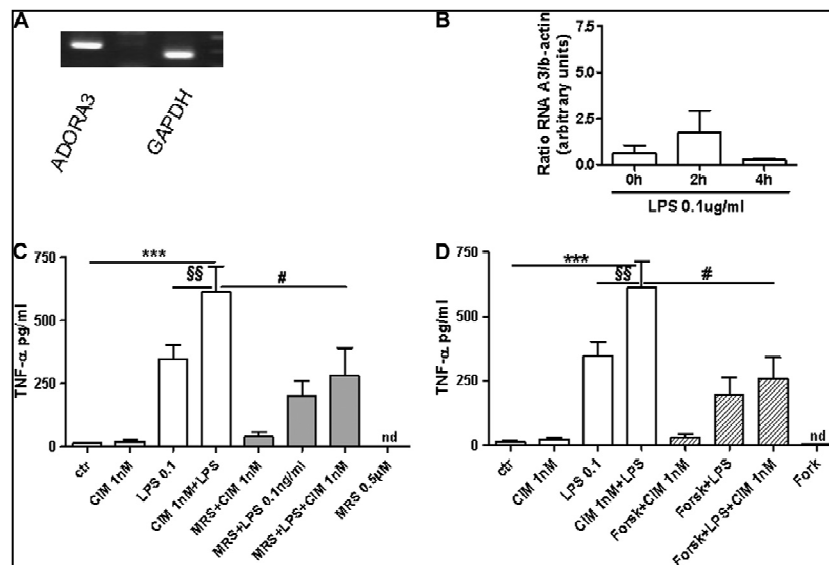


Fig.6 Gli effetti del CI-IB-MECA sul rilascio di TNF- α nei MØ stimolati con LPS dipendono dall'attivazione del recettore A_3 . Analisi RT-PCR dell' mRNA per la valutazione dell'espressione del recettore A_3 (A). In MØ trattati con LPS per 2 e 4 h i livelli di espressione del recettore A_3 non variano rispetto ai controlli (B). La somministrazione di MRS1191 (0.5 μ M) riduce significativamente il rilascio di TNF- α indotto dal CI-IB-MECA nei MØ stimolati con LPS (C). La Forskolina riduce significativamente il rilascio di TNF- α indotto da CI-IB-MECA nei MØ stimolati con LPS (D). Gli esperimenti sono stati effettuati in duplicato. I risultati sono espressi come medie \pm SEM, e gli esperimenti sono stati effettuati 3 volte. Le differenze statisticamente significative rappresentate con i simboli # $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.3.4 Ruolo di PKC e PI3K/Akt, sul rilascio di TNF- α indotto da CI-IB-MECA da parte di macrofagi stimolati con LPS

Numerosi effetti biologici del recettore A3 che si osservano in diverse condizioni fisiopatologiche sono mediati dall'attivazione di una proteina Gq. La mobilizzazione di una proteina Gq comporta l'innescò della cascata del Ca²⁺ e l'attivazione di una PKC che, nella maggior parte dei casi, è associata ad importanti *signaling pathways* che vedono l'attivazione di molecole come PI3K/Akt ed NF- κ B. Per tale motivo lo scopo delle successive indagini è stato quello di valutare il coinvolgimento di tali molecole nel *network* di segnali che caratterizzano gli effetti da noi osservati. Il primo step è stato quello di studiare l'attivazione della proteina Gq e per tale scopo gli esperimenti sono stati effettuati in presenza di staurosporina (1 nM), inibitore della PKC. Come è possibile osservare in Fig.7 la staurosporina riduce significativamente il rilascio di TNF- α indotto da CI-IB-MECA da parte dei M \emptyset stimolati con LPS (178.6 ± 14.96 vs 617.4 ± 94.9 , $p < 0.05$) (Fig.7). Non sono state osservate significative variazioni dei livelli di TNF- α su M \emptyset non stimolati o trattati con solo CI-IB-MECA o LPS in presenza di staurosporina (Fig.7). Da tali risultati è possibile dedurre che gli effetti del CI-IB-MECA sul rilascio di TNF- α nei M \emptyset peritoneali stimolati con LPS dipendono dall'attivazione di una PKC.

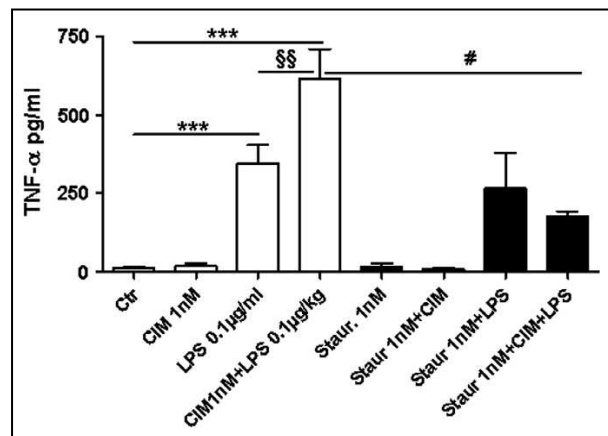


Fig.7 Il ruolo della PKC sul rilascio di TNF- α indotto dal CI-IB-MECA in M \emptyset stimolati con LPS. La staurosporina (1nM) è stata somministrata ai M \emptyset trattati con LPS e/o CI-IB-MECA ed i valori di TNF- α quantificati mediante saggio ELISA. Per ogni esperimento i trattamenti sono stati effettuati in duplicato. I risultati sono espressi come medie \pm SEM, e gli esperimenti sono stati effettuati 3 volte. # $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte dei M \emptyset è un fenomeno legato soprattutto all'attivazione di NF- κ B (Zhang et al., 2000). Per valutare se la *pathway* di NF- κ B fosse coinvolta nel meccanismo d'azione del CI-IB-MECA sul rilascio di TNF- α da parte dei M \emptyset stimolati con LPS, gli esperimenti sono stati effettuati in presenza di IMD 0354, un inibitore delle chinasi IKK β , la cui attivazione determina la traslocazione nucleare di NF- κ B. L'IMD 0354 (1 μ M) riduce significativamente il rilascio di TNF- α indotto dal CI-IB-MECA nei M \emptyset stimolati con LPS (611.3 ± 102.2 vs 173.8 ± 62.35 , $p < 0.001$) (Fig.8A). Inoltre l'IMD 0345 riduce anche il rilascio di TNF- α da parte dei M \emptyset stimolati con solo LPS (169.3 ± 59.23 vs 344.7 ± 57.45 , $p < 0.05$) (Fig.8A). Per approfondire il ruolo di NF- κ B negli effetti osservati, sono state effettuate delle analisi sui livelli di fosforilazione di I κ B α ed IKK β a diversi tempi (0,25-2h) mediante Western Blotting. Come mostrato in Fig.4B i

livelli di fosforilazione di I κ B α aumentano significativamente nei M \emptyset stimolati a 0.5 h con LPS e trattati con CI-IB-MECA se comparati con il trattamento del solo LPS. Inoltre, il trattamento combinato di CI-IB-MECA e LPS riduce ulteriormente la fosforilazione di IKK β se confrontato con LPS da solo tra 0,5 e 2h (Fig.8B). Una riduzione dei livelli di IKK β implica che tale chinasi subisce un processo di fosforilazione, che determina la traslocazione nucleare di NF- κ B. Lo studio della traslocazione nucleare delle sub-unità di NF- κ B ed in modo particolare di p65 è stato effettuato mediante kit TRANSAM. Come è possibile osservare in figura 4C la traslocazione nucleare di p65 risulta maggiore nei M \emptyset stimolati con LPS e trattati con CI-IB-MECA, rispetto al trattamento con solo LPS. La traslocazione di p65 risulta comunque maggiore per le cellule trattate con LPS rispetto al controllo (45.95 ± 16.16 vs 10.12 ± 5.0 , $p < 0.05$) (Fig.8C). Il CI-IB-MECA da solo non ha alcun effetto sulla localizzazione nucleare di p65 (Fig.8B). Tali dati fanno supporre che il rilascio di TNF- α indotto da CI-IB-MECA nei M \emptyset stimolati con LPS, sia dipendente da NF- κ B.

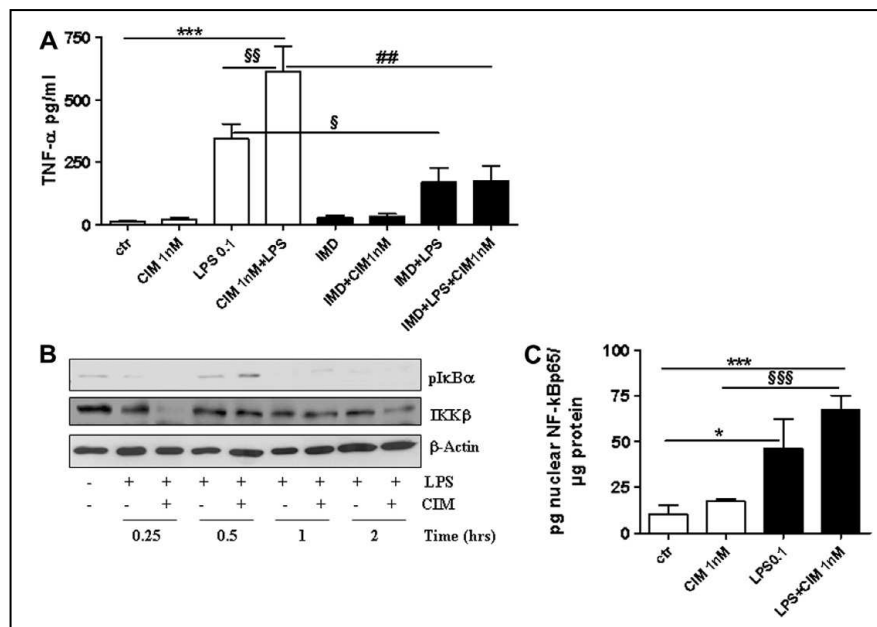


Fig.8 Attivazione di NF- κ B dopo somministrazione di CI-IB-MECA e/o LPS. L' IMD 0354 (1 μ M), inibitore della chinasi I κ k β è stato somministrato ai M \emptyset trattati con CI-IB-MECA e/o LPS ed i livelli di TNF- α sono stati valutati mediante saggio ELISA (A). Western Blotting per pI κ B α e IKK β (B). C) I M \emptyset peritoneali sono stati trattati con CI-IB-MECA e/o LPS e 15 min dopo il trattamento lisati per la valutazione della traslocazione nucleare di p65 mediante kit TRANSAM. I risultati sono espressi come medie \pm SEM, e gli esperimenti sono stati effettuati 3 volte. § $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Un'altra importante *pathway* che frequentemente può essere attivata dal recettore A $_3$ ed oggetto di studi per la sua implicazione in numerosi processi mitogeni sia a livello tumorale che a livello del sistema immunitario è quella dell' asse PI3K/Akt. Al fine di

indagare sulla possibile implicazione di Akt nel network di segnali cellulari alla base degli effetti osservati, gli esperimenti sono stati ripetuti in presenza dell'inibitore farmacologico di PI3K, LY-294002 (25 μ M). Come mostrato in figura 9A l'LY-294002 riduce la produzione di TNF- α indotta da CI-IB-MECA da parte dei M \emptyset stimolati con LPS (611.3 \pm 102.2 vs 292.0 \pm 86.67, $p < 0.05$). inoltre sono stati valutati i livelli di fosforilazione di Akt mediante analisi citofluorimetrica a flusso (FACS), ed è emerso che i livelli di fosforilazione di Akt risultano maggiore nelle cellule trattate con CI-IB-MECA+LPS rispetto al controllo (Fig.9B).

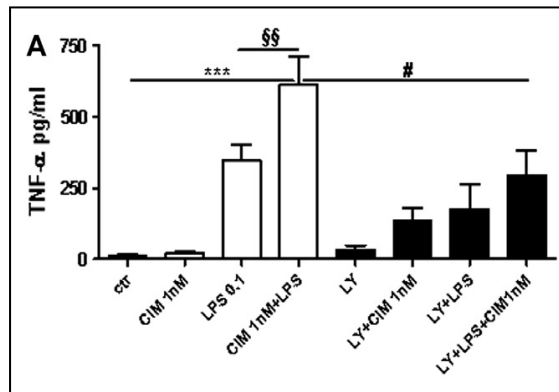


Fig.9 Gli effetti del CI-IB-MECA sul rilascio di TNF- α nei M \emptyset stimolati con LPS dipende dalla pathway di PI3K (A). LY-294002 (25 μ M) è stato somministrato a M \emptyset stimolati con LPS (0.1 μ g/ml) e/o trattati con CI-IB-MECA (CIM 1nM) e i livelli di TNF- α sono stati analizzati mediante saggio ELISA 24 h più tardi (A). B) Valutazione citofluorimetrica dei livelli di fosforilazione di Akt dopo 10 min di trattamento con CI-IB-MECA e/o LPS. I risultati sono espressi come medie \pm SEM, e gli esperimenti sono stati effettuati 3 volte. § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.4 Discussione

Dal presente studio è emerso che il CI-IB-MECA è capace di stimolare cellule della risposta immunitaria, come le DCs, i MØ e le cellule T CD8+, a produrre citochine pro-infiammatorie, in maniera A₃-dipendente, suggerendo che il recettore A₃ può modulare positivamente le risposte di alcuni tipi di popolazioni immunitarie.

Dall'analisi sul meccanismo alla base degli effetti osservati, eseguite su MØ peritoneali attivati e non con LPS, è emerso che gli effetti del CI-IB-MECA sul rilascio di TNF sono dipendenti dalla pathway PKC/Akt e da NF-κB. In accordo con studi precedenti a concentrazioni elevate di CI-IB-MECA (10 μM) il rilascio di TNF-α è ridotto nei MØ trattati con LPS rispetto al trattamento con solo LPS. Ciò presumibilmente potrebbe essere conseguenza dell'utilizzo dell'attivazione di altri recettori dell'Ado che maschererebbero gli effetti del recettore A₃. Alla luce delle informazioni estrapolabili dai numerosi dati riportati in letteratura, l'attivazione del recettore A_{2A} è in grado di ridurre il rilascio di TNF-α attraverso il coinvolgimento del sistema cAMP/PKA la cui attivazione sopprime direttamente il fattore di trascrizione NF-κB. Nel presente studio è stato possibile osservare che incrementando i livelli di cAMP mediante somministrazione di Forskolina, si otteneva una riduzione significativa dei livelli di TNF-α nei MØ indotti dal CI-IB-MECA, confermando l'importanza della pathway cAMP/PKA negli effetti immuno-modulatori dell'Ado. Tuttavia come detto in precedenza, l'attivazione del recettore A₃ è direttamente correlata ad un'ampia gamma di segnali cellulari che vedono il coinvolgimento di diverse chinasi particolarmente note nei processi di proliferazione e di differenziazione cellulare come ad esempio la PKC, che può essere attivata dalla mobilizzazione della proteina Gq (M Palmer et al., 1995; Abbracchio et al., 1995). A tal proposito quindi, abbiamo deciso di valutare il ruolo di tale chinasi nel nostro sistema, effettuando le somministrazioni in presenza della staurosporina, un inibitore specifico della PKC, ed abbiamo potuto constatare che essa riduce significativamente il rilascio di TNF-α nei MØ trattati con LPS + CI-IB-MECA. Oltre alla PKC, un'altra importante chinasi coinvolta nella *signaling* dell'LPS è la PI3K. Dai nostri dati risulta che l'inibizione della chinasi PI3K riduce solo debolmente il rilascio di TNF-α nei MØ stimolati con solo LPS, sebbene nei nostri esperimenti è stato possibile osservare un incremento dei livelli di pAkt dopo 10 min di stimolazione con LPS. Tuttavia, l'inibitore di PI3K LY-294002 riduce significativamente il rilascio di TNF-α indotto dal CI-IB-MECA. Nonostante non siano state osservate differenze dei livelli di pAkt nei MØ stimolati con CI-IB-MECA+LPS rispetto al solo LPS, abbiamo osservato che i livelli di fosforilazione di Akt sono maggiormente sostenuti nel tempo. Tale fenomeno è particolarmente complesso da spiegare e richiede ulteriori indagini. Tuttavia è ben noto in letteratura che la PI3K può attivare direttamente la PKC anche attraverso le chinasi PDK (Le Good et al., 1998; M Chou M et al., 1998) ed infine favorire la traslocazione nucleare di NF-κB. Inoltre essendo NF-κB una delle più importanti pathway dell'attività dell'LPS, la somministrazione dell'inibitore di IKKβ IMD-0354 riduce significativamente il rilascio di TNF-α da parte dei MØ trattati con LPS + CI-IB-MECA. È importante notare che il CI-IB-MECA da solo non ha alcun effetto su NF-κB al contrario dei MØ trattati con LPS. Inoltre i livelli di IKKβ risultano significativamente ridotti nei MØ trattati con LPS + CI-IB-MECA in confronto con i MØ trattati con solo LPS. I nostri dati, quindi, ci inducono ad ipotizzare che il CI-IB-MECA, mediante la *signaling* del recettore A₃ è in grado di supportare l'attivazione di NF-κB indotta da LPS, incrementando il rilascio di TNF-α.

In conclusione, gli effetti del CI-IB-MECA sul rilascio di TNF-α nei MØ trattati con LPS sono il risultato del coinvolgimento di diverse signaling pathways come PKC, PI3K, PKA le quali convergono contemporaneamente verso NF-κB potenziando gli effetti indotti dall'LPS.

CAPITOLO 5

5.1 Introduzione

5.1.1 Il CD73 nei processi di sviluppo e di progressione tumorale

Il CD73 è una proteina di membrana del tipo *GPI-linked* (ancorata ad una molecola di glicosil fosfatidil inositolo) ad attività 5'-nucleotidasica capace di convertire l'Ado 5'-monofosfato (AMP) presente a livello extracellulare nel suo intermedio bioattivo, Ado (Zimmerman H. et al., 1992). Oltre ad essere una delle molecole essenziali per la produzione di Ado, il CD73 rappresenta anche l'enzima limitante della *pathway* biosintetica in quanto dai suoi livelli di espressione dipendono le concentrazioni locali di Ado. Studi recenti dimostrano che il CD73 assolve un ruolo fondamentale in numerosi contesti fisiopatologici soprattutto a carattere infiammatorio come il pre-condizionamento ischemico, il danno tissutale, l'ipossia, il danno vascolare ed il cancro sebbene il ruolo attualmente si conosce ben poco (Resta et al., 1998; Colgan et al., 2006; Linden 2001). A tal proposito, numerosi studi dimostrano che il CD73 svolge un importante ruolo nei processi di crescita e di progressione tumorale oltre ad essere anche coinvolto in numerosi fenomeni di resistenza chemioterapica (Spychala et al., 2000). Analisi citofluorimetriche e studi genetici riportano una maggiore espressione del CD73 in diversi tessuti tumorali rispetto ai tessuti sani ed una elevata espressione dello stesso in una gran varietà di carcinomi umani (Jin D et al., 2010; Wang et al., 2008). Più precisamente, alcuni autori dimostrano che elevati livelli di CD73 sono strettamente associati ai fenomeni di neovascolarizzazione, invasività e metastasi tumorale in pazienti affetti da carcinoma mammario (Spychala et al., 2000; Wang et al., 2008). Tuttavia un fenomeno particolarmente frequente nella maggior parte dei tumori solidi è l'ipossia, una condizione fisiologica che favorisce l'accumulo intracellulare di AMP e il rilascio di elevate concentrazioni di Ado. Basandosi sull'idea secondo la quale la cellula neoplastica contribuisce già da sola ad incrementare i livelli di Ado e, vista l'elevata espressione del CD73 nei tessuti tumorali, alcuni autori hanno ipotizzato una possibile correlazione tra condizione ipossica ed espressione del CD73. Infatti Synnestvedt e coll. dimostrano che i livelli di espressione del CD73 a livello epiteliale sono significativamente regolati dall'attività del fattore ipossico HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*) (Synnestvedt et al., 2002).

Come già spiegato nei capitoli precedenti, in condizioni patologiche, gli effetti regolatori dell'Ado si riflettono su tutto il microambiente tissutale coinvolgendo una gran varietà di popolazioni cellulari. Infatti gli effetti modulatori dell'Ado si manifestano soprattutto sulla componente immunitaria, attivamente coinvolta nelle risposte omeostatiche tissutali, sulla quale il sistema adenosinico assolve un ruolo fondamentale. A tal proposito infatti, Jin e coll. hanno dimostrato che il CD73 espresso dalle cellule tumorali, attraverso la produzione di Ado, è in grado di inibire *in vitro* e *in vivo* l'attivazione e l'attività effettrice della risposta anti-tumorale T-mediata, promuovendo l'apoptosi delle cellule T (Jin et al., 2010). Inoltre silenziando l'espressione del CD73 mediante l'utilizzo di siRNA si assiste ad un completo ripristino dell'efficacia terapeutica del trattamento con trasferimento adottivo di linfociti T, associato ad un significativo incremento della sopravvivenza degli animali impiantati con tumore (Jin et al., 2010). Contemporaneamente lo stesso gruppo dimostra che il blocco del CD73, in animali mancanti della componente T, non ha alcun effetto sulla crescita tumorale, suggerendo che gli effetti positivi del CD73 sulla crescita tumorale dipendono quasi esclusivamente dall'attività dei linfociti T (Stagg et al., 2010). Nello specifico, numerosi studi dimostrano che il CD73 assolve un ruolo fondamentale sull'attività regolatoria delle Treg tanto da essere attualmente considerato un importante *marker* identificativo di questa popolazione linfocitaria. Infatti, Deaglio e coll. hanno dimostrato l'esistenza di una stretta correlazione tra la co-espressione di CD39 e CD73 e gli effetti immunosoppressivi delle Treg (Deaglio

et al., 2007). Alla luce di quanto detto fin'ora, l'inibizione farmacologica del CD73, per annullare o quanto meno limitare gli effetti immunosoppressivi del sistema adenosinergico, si dimostra una interessante strategia terapeutica per incrementare la risposta immunitaria T-mediata in numerose neoplasie.

5.2 Scopo

Della via biosintetica dell'Ado, il CD73 ne rappresenta l'enzima limitante, ovvero il fattore chiave da cui può dipendere l'entità ed il tipo di risposta regolatoria del sistema adenosinergico. La sua implicazione nei fenomeni di omeostasi tissutale e la sua importante funzione regolatoria in contesti patologici a carattere infiammatorio ed immunitario lo rendono un potenziale target molecolare sul quale poter agire in regimi terapeutici di tipo immunologico per il trattamento dei tumori. Alla luce di ciò e sulla base dello stato dell'arte attuale, l'obiettivo dell'ultima parte del mio progetto di dottorato è stato quello di studiare gli effetti di un inibitore del CD73 sulla crescita tumorale *in vivo*, in un modello murino di melanoma. Per la realizzazione del presente studio gli esperimenti sono stati condotti su topi C57Bl/6j, impiantati con cellule di melanoma B16F10 sotto cute, e trattati al decimo giorno dall'impianto, con un inibitore del CD73 (APCP), somministrato a giorni alterni per tre giorni. Il quarto giorno gli animali sono stati sacrificati per le opportune analisi.

5.3 Risultati

5.3.1 L'attività anti-tumorale dell'APCP è associata ad un aumento del rilascio di citochine T_H17/T_H1 -like

Per lo studio del CD73 sulla crescita tumorale è stato utilizzato un inibitore specifico di questa nucleotidasi, la 5'-(α,β -methylene) adenosine diphosphate (APCP), già ampiamente impiegato per lo studio dei tumori in diversi modelli murini (Jin D et al., *Canc Res* 2010; Wang et al., *J Clin Invest* 2011; Yegutkin GG et al., *Eu J Immunol* 2011). Topi C57Bl6j sono stati impiantati sotto cute con 3×10^5 B16-F10 e dieci giorni dopo l'impianto, trattati con APCP (400 μ g/topo p.t.). Il trattamento con APCP riduce significativamente la crescita tumorale rispetto agli animali di controllo (APCP: 254.4 ± 65.8 versus PBS: 816.2 ± 259.2 mm³) (Fig.1A). Inoltre, la riduzione della crescita tumorale è associata ad una riduzione dell'espressione del marcatore di proliferazione Ki67 (Figure 1B and 1C) ed ad una riduzione dell'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 (Fig.1D). In accordo con studi precedenti è possibile affermare che gli animali trattati con APCP mostrano una significativa riduzione della crescita tumorale rispetto agli animali di controllo. Tali effetti sono associati ad una riduzione della proliferazione cellulare e ad una maggiore sensibilità delle cellule tumorali all'apoptosi.

Essendo il CD73 un importante modulatore della risposta infiammatoria attraverso la produzione di Ado, lo step successivo è stato quello di analizzare il profilo citochinico (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-17A, IL-10, TGF- β) presente a livello della lesione neoplastica mediante saggi ELISA eseguiti su omogenati di tessuto di melanoma. Dai nostri risultati è emerso che l'APCP determina un significativo incremento dei livelli di IL-17A (Fig.1E), una citochina pro-infiammatoria molto importante nella fisiopatologia del melanoma. Inoltre, gli animali che hanno ricevuto l' APCP mostrano anche un aumento di citochine pro-infiammatorie di tipo T_H1 come TNF- α , IFN- γ and IL-12 (Figure 1F, 1G e 1H, rispettivamente); mentre i livelli di IL-10 e TGF- β rimangono bassi e non subiscono variazioni rispetto al controllo (dati non mostrati).

Questi dati suggeriscono che gli effetti anti-tumorali dell'APCP sono accompagnati da un incremento dei livelli di citochine pro-infiammatorie di tipo T_H1/T_H17 a livello della lesione tumorale.

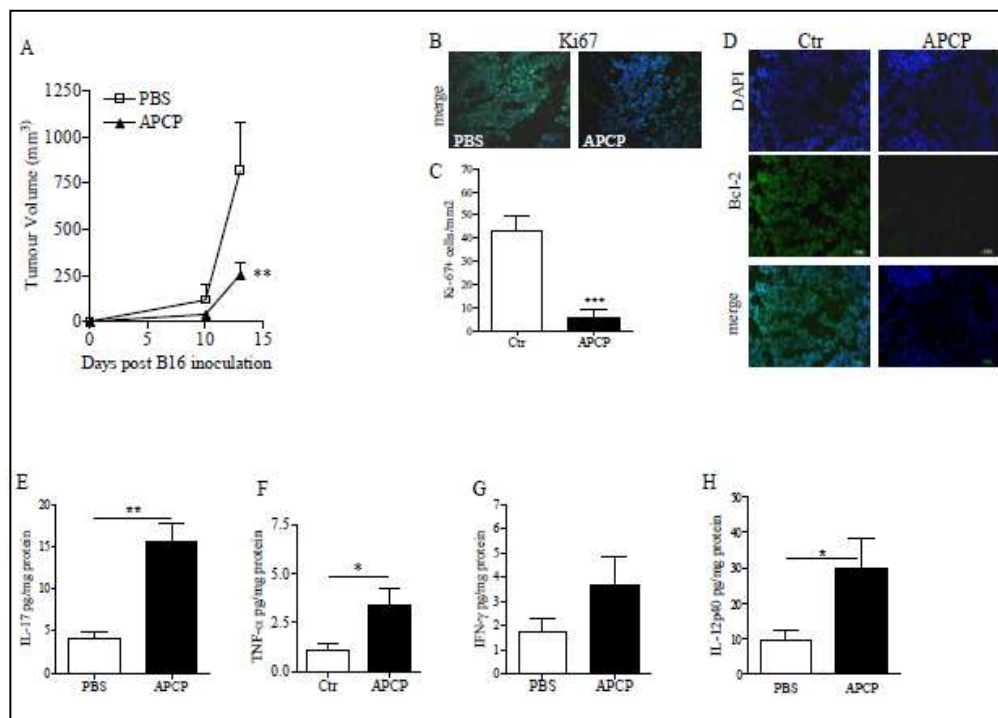


Fig. 1 La somministrazione di APCP riduce significativamente la crescita tumorale nei topi impiantati con le cellule di melanoma. Il volume tumorale (mm³) risulta significativamente ridotto negli animali trattati con APCP (400µg/mouse, p.t.) rispetto agli animali di controllo (PBS) (n=13) (A). Immagini rappresentative di sezioni di tessuto di melanoma provenienti da animali trattati con APCP e da animali di controllo (PBS) ottenute mediante tecnica di immunofluorescenza per la visualizzazione di Ki67 (magnificazione:x20). (B). Il trattamento con APCP riduce significativamente la percentuale di cellule positive al Ki67, rispetto al PBS (n=6) (C). L'espressione di Bcl-2 risulta significativamente ridotta nelle sezioni di tessuto provenienti da animali trattati con APCP rispetto agli animali di controllo (PBS) (D). Analisi quantitativa dei livelli di citochine IL-17A (E), TNF-α(F), IFN-γ (G) e IL-12 (H) ottenuta mediante saggio ELISA, n=13. Le differenze statisticamente significative sono state denotate con la seguente simbologia * P<0.05, ** P<0.01.

5.3.2 Il trattamento con APCP aumenta i livelli di linfociti B infiltrati nella lesione tumorale

Studi precedenti dimostrano che la ridotta crescita tumorale osservata in topi CD73-KO risultava direttamente correlata ad un aumento di linfociti T CD8⁺ e ad una riduzione di cellule Treg infiltrate a livello della lesione neoplastica (Stagg et al., 2011). Alla luce di ciò, al fine di valutare gli effetti dell'APCP sulla componente immunitaria sono state analizzate le popolazioni cellulari infiltrate a livello della lesione tumorale mediante citofluorimetria a flusso (FACS). In accordo con studi precedenti, il trattamento con APCP induce un significativo aumento dei linfociti T CD8⁺ (Fig.1A e B). Tuttavia negli animali trattati con APCP non si osservano variazioni in percentuale di altre popolazioni cellulari infiltrate come CD4⁺, NK1.1⁺, NKT, o cellule Treg FOXP3⁺ (dati non mostrati) rispetto agli animali di controllo. Di particolare interesse risulta l'aumento significativo dei linfociti B (CD19⁺B220⁺CD11c low) infiltrati nel tessuto tumorale (Fig. 2C e 2D) negli animali trattati con APCP rispetto agli animali di controllo, associato ad un aumento dei livelli di IgG2b (Fig.2E). Tali risultati, quindi, suggeriscono che la riduzione della crescita tumorale osservata negli animali trattati con APCP è strettamente correlata non solo ad un aumento di linfociti T CD8⁺, in accordo con studi precedenti, ma anche ad un aumento significativo di linfociti B e alla produzione di IgG2b.

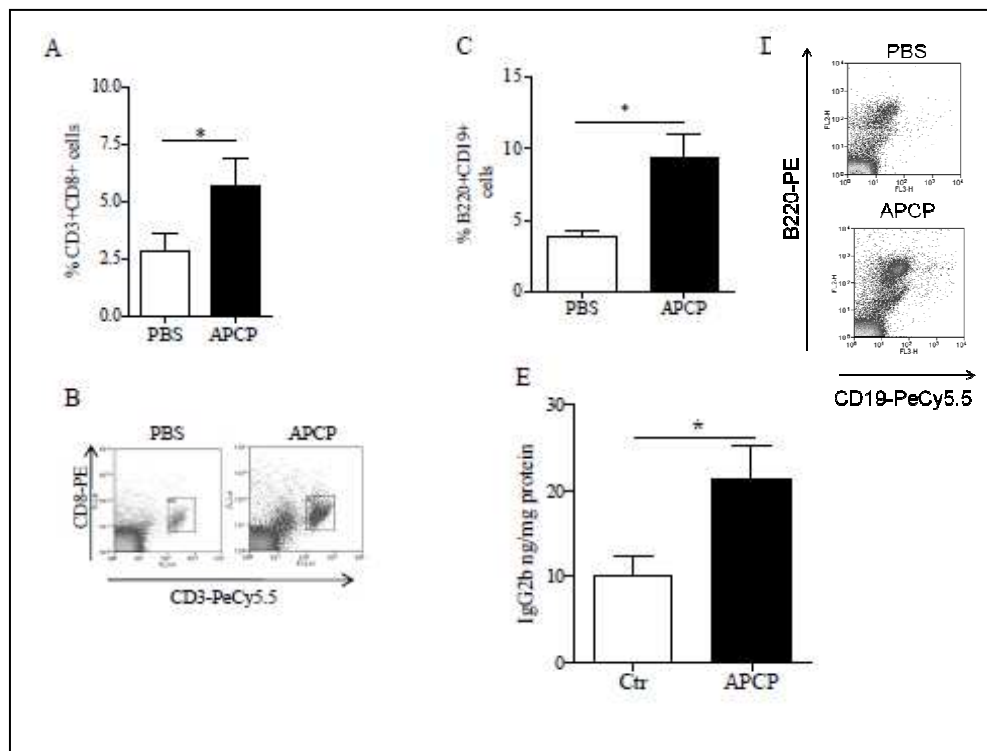


Fig.2 La somministrazione di APCP favorisce l'infiltrazione di linfociti T CD8⁺ e di linfociti B a livello della lesione tumorale. Gli animali trattati con APCP mostrano un aumento della percentuale di CD3⁺CD8⁺ (A e B) e di linfociti B CD19⁺B220⁺ (C e D) infiltrati negli animali trattati con APCP (400µg/mouse, p.t.) rispetto agli animali di controllo (PBS). I dot plots rappresentativi delle popolazioni CD3⁺CD8⁺ e CD19⁺B220⁺ sono mostrate in (B) e (D). E) I livelli di IgG2b sono significativamente più alti negli animali trattati con APCP rispetto agli animali di controllo (PBS). I risultati sono espressi come medie ± SEM per n=10. * P<0.05.

5.3.3 I linfociti B contribuiscono agli effetti anti-tumorali dell' APCP

Per valutare se l'APCP può direttamente influenzare l'attività dei linfociti B, sono stati eseguiti degli esperimenti *in vitro* su cellule B CD19⁺ isolate da milze di topi C57Bl/6j naïve, e messe in coltura per 24h in presenza di APCP (5μM) o PBS. Dopo aver constatato che i linfociti B esprimono il CD73 (Fig.3A), sono stati eseguiti dei saggi ELISA per la quantificazione delle citochine (IL-10, TNF-α, IL-17A) e sono stati analizzati alcuni marcatori cellulari di differenziamento e di attivazione (MHC I, MHC II and CD20). Dai nostri risultati è emerso che l' APCP non solo non influenza il rilascio di citochine, da parte delle cellule B ma non ne modifica nemmeno il fenotipo cellulare (Fig.3).

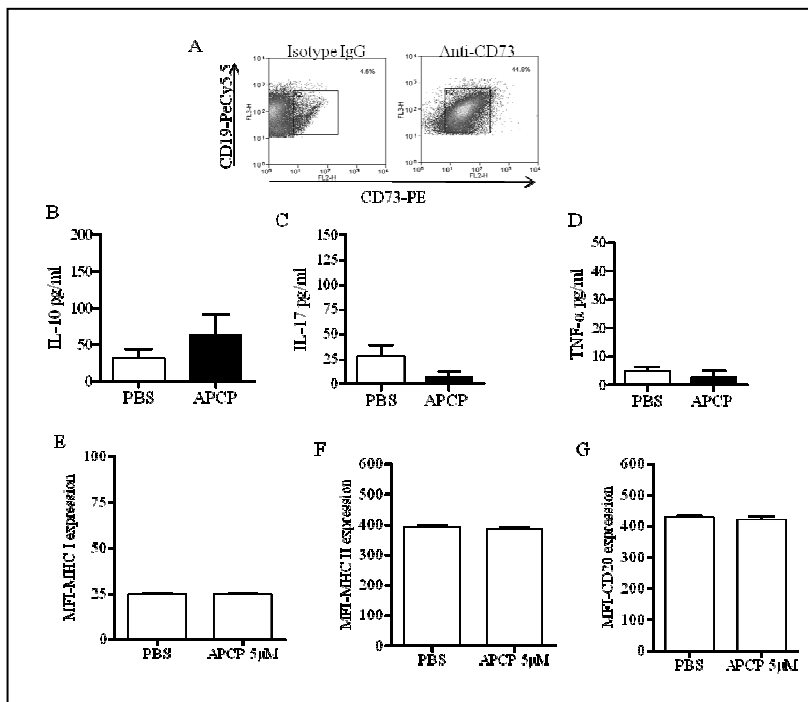


Fig.3 Plots rappresentativi delle celle CD19⁺CD73⁺ (A). IL-10 (B), IL-17A (C) e TNF-α (D) misurati mediante saggio ELISA nei surnatanti prelevati dalle cellule CD19⁺ trattate con APCP o PBS. Livelli di espressione di MHC di classe I (E), MHC di classe II (F) e CD20 (G), ottenuti dall'analisi citofluorimetrica effettuata su cellule B CD19⁺ trattate con APCP o PBS. I risultati sono espressi come media ± SEM n=5.

A questo punto, per meglio comprendere il ruolo dei linfociti B nell'attività anti-tumorale dell'APCP, gli stessi trattamenti sono stati ripetuti in topi depletati dei linfociti B mediante anticorpo anti-CD20 (250μg/mouse topo), somministrato i.p., una volta sola al giorno 10 dall'impianto, ed al giorno 13 gli animali sono stati sacrificati per le opportune analisi (Fig.4A).

Negli animali trattati con anticorpo anti-CD20 non si osservano variazioni significative della crescita tumorale rispetto agli animali di controllo. Al contrario invece, negli animali depletati dei linfociti B l'attività anti-tumorale dell'APCP è bloccata rispetto agli animali trattati con IgG di controllo (mAb anti-CD20+APCP: 780.2±134.1 *versus* IgG+APCP: 288.24±87.7 mm³) sebbene tale valore di crescita risulti significativamente più basso di quello degli animali di controllo (mAb anti-CD20+APCP: 780.2±134.1 *versus* IgG:

1195.4±248.98 mm³) (Fig.4B). Abbiamo poi effettuato un'analisi delle popolazioni infiltranti il tumore in queste condizioni sperimentali. Dalle analisi citofluorimetriche è emerso che la deplezione delle cellule B mediante anticorpo anti-CD20 non determina alcuna variazione significativa del numero di linfociti T CD3⁺CD8⁺ e dei livelli di IFN- γ indotti dall'APCP rispetto agli animali trattati con IgG di controllo (dati non mostrati). Tuttavia negli omogenati di melanoma prelevati da animali depleti di linfociti B si osserva una corrispettiva riduzione dei livelli di IgG2b (Fig.3C). Nel complesso questi dati ci suggeriscono che i linfociti B rivestono un ruolo importante nell'attività anti-tumorale dell'APCP.

Negli animali trattati con anticorpo anti-CD20 si osserva una parziale riduzione del rilascio di IL-17 indotto dall'APCP. Sebbene la deplezione delle cellule B può influenzare la produzione di IL-17A (Fig.4D) come dimostrato da altri autori (van de Veerdonk et al., 2011; Zhang et al., 2011), l'APCP è ancora in grado di aumentare significativamente, anche se in misura minore, il rilascio di IL-17 negli animali trattati con anti-CD20 rispetto agli animali di controllo (Fig.4D), suggerendo che l'IL-17 può avere un ruolo importante nell'attività anti-tumorale dell'APCP.

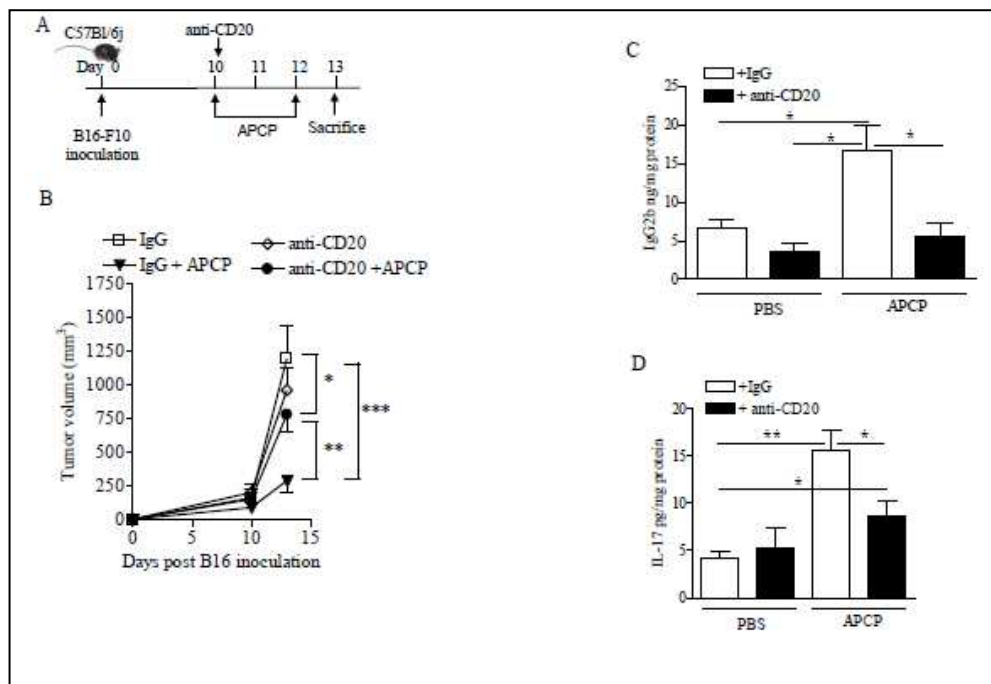


Fig.4 La deplezione delle cellule CD20⁺ riduce gli effetti anti-tumorali indotti dall'APCP. Protocollo sperimentale: l'anti-CD20 mAb (250 μ g/topo, i.p.) è stato somministrato agli animali il giorno 10° successivo all' impianto delle B16F10, ovvero quando gli animali hanno ricevuto l'APCP (400 μ g/topo) (A). La deplezione delle cellule B CD20⁺ riduce significativamente l' attività antitumorale dell'APCP rispetto agli animali di controllo (PBS e IgG isotipo) (B). Negli animali depletati delle cellule B (barra nera) i livelli tissutali di IgG2b indotti dall'APCP sono significativamente ridotti rispetto agli animali di controllo (PBS e IgG) (barra bianca) dopo trattamento con APCP. Negli animali depletati dei linfociti B CD20⁺ i livelli di IL-17 risultano significativamente ridotti in seguito a trattamento con APCP rispetto agli animali di controllo (D). I risultati sono espressi come medie \pm SEM per n=7. Le differenze statisticamente significative sono state denotate con la seguente simbologia * P<0.05 **P<0.01, ***P<0.001.

5.3.4 Gli effetti anti-tumorali dell'APCP dipendono dal rilascio di IL-17

Per poter indagare sul ruolo dell'IL-17 nell'attività anti-tumorale dell'APCP, agli animali impiantati con tumore è stata somministrato un anticorpo neutralizzante anti-IL17 (20 µg/topo i.p.) o IgG di controllo, ogni giorno partendo dal giorno 10 dall'impianto del tumore (Fig.5A). Gli animali sono stati trattati al giorno 10 e al giorno 12 con APCP o PBS come descritto in precedenza e sacrificati il giorno 13 (Fig.5A). La somministrazione dell'anticorpo anti-IL17 non altera la crescita tumorale negli animali di controllo ma annulla completamente gli effetti anti-tumorali indotti dall' APCP (mAb anti-IL-17A+APCP: 828.4 ± 122.1 versus IgG+APCP: 445.75 ± 94.2 mm³) (Fig.5B). Inoltre è stato possibile osservare che la neutralizzazione dell' IL-17 riduce significativamente la percentuale di linfociti T CD8⁺ infiltranti il tumore, negli animali trattati con APCP, riducendo contemporaneamente il rilascio di IFN-γ (Fig.D). Abbiamo anche osservato che la neutralizzazione dell' IL-17 riduce la percentuale di cellule B CD19⁺ e i livelli di IgG2b nel tessuto tumorale (Fig.F). Nell' insieme questi dati ci suggeriscono che l' IL-17 assolve un ruolo fondamentale nell' attività anti-tumorale dell' APCP influenzando la presenza nella lesione tumorale sia dei linfociti T CD8⁺ che delle cellule B CD19⁺.

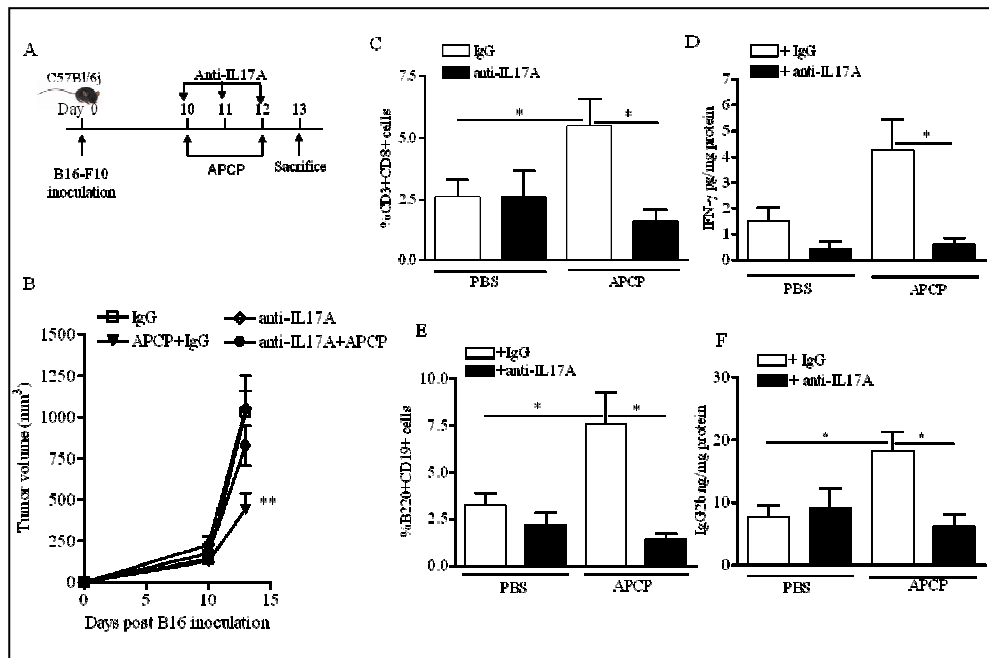


Fig.5 L' IL-17 è essenziale per l'attività anti-tumorale dell'APCP. Protocollo sperimentale: l' anticorpo monoclonale anti-IL-17 (20µg/topo, i.p.) è stato somministrato ogni giorno a partire dal giorno 10 successivo all'impianto delle cellule B16F10, ovvero quando i topi ha cominciato a ricevere APCP (400 µg/topo) (A). La neutralizzazione dell' IL-17 mediante anticorpo monoclonale annulla completamente gli effetti antitumorali dell'APCP rispetto all' isotipo di controllo (B). Negli animali che hanno ricevuto il mAb anti-IL-17 trattati con APCP la percentuale di cellule CD3⁺CD8⁺ infiltranti il tumore (C) e i livelli di IFN-γ (D) risultano significativamente ridotti, rispetto agli animali che avevano ricevuto l' isotipo di controllo. Negli animali che hanno ricevuto il mAb anti-IL-17 trattati con APCP la percentuale di cellule CD19⁺B220⁺ (E) e i livelli di IgG2b (F) risultano significativamente ridotti rispetto agli animali di controllo. I risultati sono espressi come medie ± SEM per n=6. * P<0.05 **P<0.01.

5.3.5 L'APCP non altera la crescita tumorale nei topi nudi

Infine sono stati valutati gli effetti anti-tumorali dell'APCP in topi nudi, animali atimici che non presentano linfociti T maturi. Per la realizzazione di questo esperimento è stato adottato lo stesso protocollo già descritto per gli esperimenti precedenti. La crescita tumorale nei topi nudi non subisce variazioni significative in seguito a trattamento con APCP (APCP: 990.4 ± 414.7 versus PBS: 1066.8 ± 520.4 mm³) (Fig.5A). Ciò suggerisce che la componente T è essenziale per l'attività anti-tumorale dell'APCP. Inoltre in tali animali non si osservano variazioni del numero di linfociti B e dei livelli di IgG2b; ciò potrebbe significare che l'APCP non influenza direttamente l'attività delle cellule B *in vivo*, ma necessita della presenza della componente T (Fig.5B)

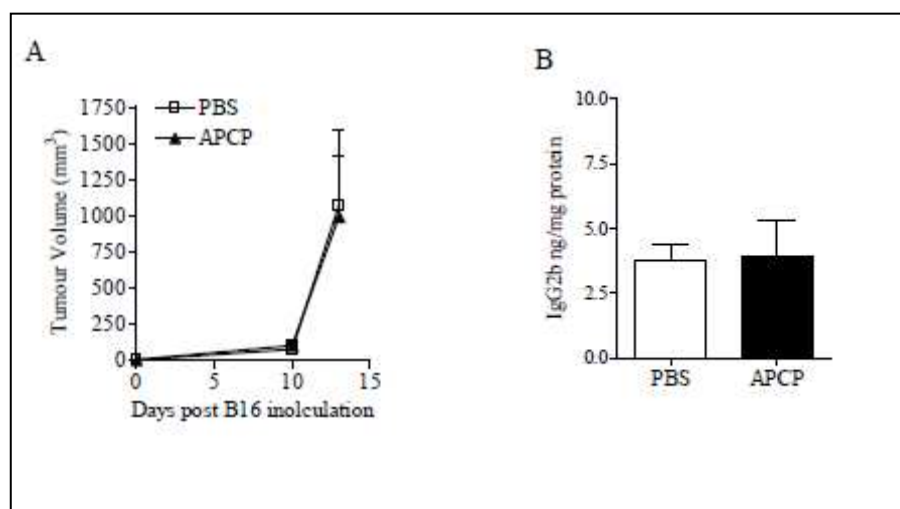


Fig.5 L'APCP non altera la crescita tumorale nei topi nudi. Topi atimici inoculati con B16F10 sono stati trattati con APCP 10 giorni dopo l' impianto. (A) Crescita tumorale dopo trattamento con APCP. (B) Livelli di IgG2b analizzati negli omogenati di tessuto tumorale prelevato da animali trattati con APCP o PBS. I risultati sono espressi come medie \pm SEM per n=6

5.4 Discussione

Il presente lavoro rivela un nuovo meccanismo d'azione alla base degli effetti anti-tumorali dell'APCP in un modello murino di melanoma sottocute. Lo studio dimostra che l'APCP promuove una risposta immunitaria locale di tipo T_H1/T_H17 , che si traduce in una riduzione della crescita tumorale. Inoltre si è osservato un aumento della percentuale di linfociti B ed un aumento dei livelli di IgG2b a livello della lesione neoplastica.

Il CD73 è un importante promotore della crescita tumorale in diversi modelli sperimentali di carcinoma, mediante la produzione di Ado. L'accumulo di Ado dovuta all'attività del CD73 espresso sulle cellule tumorali e su quelle dell'ospite (incluse Treg), determina una potente condizione immunosoppressiva, derivante soprattutto da una soppressione dell'attività dei linfociti T CD8+ (Stagg et al., 2010; jin et al., 2010). Infatti Wang e coll. hanno dimostrato che bloccando il CD73 mediante un anticorpo monoclonale, si osserva una riduzione della crescita tumorale associata ad un aumento del numero di linfociti T CD8⁺ infiltranti il tumore, ed una riduzione della percentuale di Treg (Wang et al., 2009). I dati presenti in letteratura quindi, supportano l'idea secondo la quale l'attività anti-tumorale dell'APCP è dipendente dall'attività della componente T. In accordo con essi, il presente studio dimostra che l'APCP è in grado di ridurre la crescita tumorale *in vivo* in un modello murino di melanoma B16F10 attraverso il reclutamento dei linfociti T CD8⁺. Per la prima volta, il presente lavoro dimostra che i linfociti B sono particolarmente coinvolti nell'attività anti-tumorale dell'APCP.

Diversi studi evidenziano l'importante contributo delle cellule B nell'immunità anti-tumorale, in alcuni modelli sperimentali. Infatti alcuni autori dimostrano che animali mancanti della componente B si presentano maggiormente resistenti ai tumori (Qin et al., 1998; Shah et al. 2005; Brodt et al., 1978; Kim et al. 2008; Barbera-Guillem et al., 2000). Per contro altri autori dimostrano in alcuni modelli sperimentali che i linfociti B possono contribuire a controllare la crescita tumorale (Dilillo et al., J Immunol 2010; Sorrentino et al., 2011). Probabilmente la discrepanza tra questi studi può dipendere dal diverso fenotipo e stato di attivazione delle cellule B nei diversi modelli sperimentali. Infine altri autori dimostrano che l'attività anti-tumorale delle cellule B in vari casi dipende dalla produzione di IgG2b di tipo citotossico (Li et al., 2009; Sorrentino et al., 2011). Studi precedenti dimostrano che l'espressione del CD73 sulle cellule B (Anderson et al., 2007 J Exp Med) attraverso un accumulo locale di Ado inibisce, via A_{2A} , l'attivazione di NF-KB indotta dai recettori BCR (Minguet et al., 2005). Nel presente studio la somministrazione diretta di APCP a cellule B *in vitro* non ha indotto alterazioni del fenotipo e del profilo citochinico, sebbene *in vivo* sia stato osservato un aumento tissutale di linfociti B infiltranti il tumore in associazione ad un aumento di IgG2b. Tuttavia la deplezione dei linfociti B mediante l'utilizzo di un anticorpo anti-CD20 determina una significativa riduzione degli effetti anti-tumorali indotti dall'APCP. Inoltre la deplezione delle cellule B negli animali trattati con APCP determina una significativa riduzione dei livelli di IL-17, conseguenza quest'ultima, della somministrazione di anti-CD20, il quale, come già riportato in letteratura, può inibire la produzione di IL-17 (van de Veerdonk et al., Arthritis and Rheumatism, 2011; Zhang et al., Cell Immunol 2011). È stato interessante notare negli animali depletati delle cellule B che i livelli di IL-17 risultano comunque significativamente più alti rispetto agli animali di controllo facendo ipotizzare che l'IL-17 rivesta un ruolo essenziale per l'attività anti-tumorale dell'APCP. L'IL-17 è una citochina pro-infiammatoria il cui ruolo nell'immunità tumorale non è ben chiaro e a volte controverso. In topi immuno-deficienti l'over-espressione dell'IL-17 promuove la crescita tumorale favorendo i fenomeni di angiogenesi (Numasaki et al., 2003). Per contro altri studi effettuati su topi immuno-competenti dimostrano che l'IL-17 inibisce la crescita tumorale (Benchetrit et al., 2002; Hirahara et al., 2001). A tal proposito recenti studi hanno dimostrato che l'IL-17 riduce la crescita tumorale attraverso il reclutamento e l'attivazione di cellule DCs, e di linfociti T CD8⁺. Nel presente lavoro la somministrazione di APCP determina un significativo incremento dei livelli di IL-17 associato naturalmente, ad una

riduzione della crescita tumorale. Inoltre, bloccando l' IL-17 mediante anticorpo neutralizzante, l' APCP non è più in grado di ridurre la crescita tumorale. Tale effetto risulta associato ad una ridotta infiltrazione tumorale di linfociti T CD8⁺ e ad una ridotta produzione di IFN- γ . Inoltre gli animali che avevano ricevuto l' anticorpo anti-IL-17, presentavano un significativo aumento della percentuale di linfociti B infiltranti il tumore associato a produzione di IgG2b. La somministrazione di anticorpo anti-IL-17 annulla completamente gli effetti anti-tumorali dell'APCP, attraverso una riduzione di linfociti T CD8⁺ infiltranti il tumore e di IFN- γ prodotto. Inoltre la neutralizzazione dell'IL-17 negli animali trattati con APCP determina anche una riduzione della percentuale di linfociti B CD19⁺ e di IgG2b prodotte. In accordo con i nostri risultati recenti studi dimostrano che la produzione di IL-17 promuove la risposta umorale e favorisce la proliferazione delle cellule B. (Mitsdoerffer et al., 2010; Wu et al., 2010; Doreau et al., 2009).

Alla luce dei dati ottenuti, è possibile concludere che i linfociti B hanno un ruolo fondamentale nell' attività anti-tumorale dell'APCP probabilmente attraverso la produzione di immunoglobuline. Questo tipo di risposta immunitaria è una diretta conseguenza dell'accumulo nel microambiente tumorale di IL-17 indotto dall' APCP, citochina essenziale sia per la risposta citotossica che umorale. Per tale motivo, l'inibizione farmacologica del CD73 potrebbe rappresentare un' interessante strategia terapeutica per il trattamento di tumori solidi altamente dipendenti dal sistema adenosinergico.

CAPITOLO 6

Conclusioni

Numerosi studi ad oggi hanno evidenziato il coinvolgimento del sistema adenosinergico nel cancro. In condizioni infiammatorie, sia acute che croniche, la sintesi e l'accumulo extracellulare dell'Ado risulta 100 volte superiore rispetto alle condizioni di *steady state*. Tale fenomeno è correlato ad un aumento di ipossia e di produzione di radicali liberi che in una condizione infiammatoria/cancerosa sono i principali protagonisti del reclutamento cellulare, responsabile dell'immune escape. Nel corso del mio Dottorato di Ricerca ho messo in evidenza come la stimolazione di un recettore adenosinergico, quale A_3AR , accoppiato a proteina Gq/i, è in grado di modulare la crescita tumorale in un modello *in vitro* di carcinoma tiroideo e in un modello *in vivo/ex vivo* di melanoma. La stimolazione del recettore A_3 con il CI-IB-MECA riduceva la crescita di cellule neoplastiche NPA attraverso il blocco in fase G1 del ciclo cellulare. Analogamente, la co-stimolazione di cellule di carcinoma tiroideo FRO con CI-IB-MECA e TRAIL riduceva la proliferazione cellulare favorendo la morte cellulare attraverso un meccanismo NF-kB-dipendente. Allo stesso modo, in un modello murino di melanoma, il trattamento di topi C57Bl6/j con CI-IB-MECA riduceva significativamente la crescita tumorale. In quest'ultimo caso la principale attività del CI-IB-MECA era correlata all'attivazione delle cellule citotossiche $CD8^+$. Ciononostante, studi *in vitro* hanno evidenziato che il CI-IB-MECA contribuiva al rilascio di $TNF-\alpha$ da parte di $M\phi$ attivati, differenziandoli verso un fenotipo M1. Analogamente, DCs stimolate con CI-IB-MECA erano in grado di produrre maggiori quantità di $TNF-\alpha$. Alla luce di ciò, è possibile ipotizzare un meccanismo molecolare alla base dell'attività anti-tumorale del CI-IB-MECA, secondo il quale l'attivazione di cellule del sistema immunitario innato quali $M\phi$ e DCs sono in grado di promuovere una specifica risposta adattativa tale da esplicare effetti inibitori sulla crescita tumorale. Tale fenomeno sembrerebbe correlato alla sintesi/rilascio del $TNF-\alpha$ come dimostrato sia in studi *in vitro* che *in vivo*. Il $TNF-\alpha$ è una citochina di tipo pro-infiammatorio e citotossica, in grado di alterare la proliferazione cellulare, nonché la crescita tumorale. A supporto di ciò, studi attualmente in corso nel nostro laboratorio hanno dimostrato che la neutralizzazione del $TNF-\alpha$ attraverso un anticorpo monoclonale è in grado di revertire l'effetto anti-tumorale del CI-IB-MECA. Inoltre, il CI-IB-MECA si è dimostrato in grado di inibire la crescita tumorale delle cellule FRO dopo stimolazione con TRAIL, potenziando in modo significativo la morte cellulare indotta da TRAIL. TRAIL appartiene alla super famiglia di citochine del $TNF-\alpha$ in grado di indurre apoptosi selettivamente in cellule esprimenti i recettori di morte (maggiormente espressi su cellule tumorali). Per tale motivo questa molecola è attualmente in *clinical trial* per il trattamento di numerose patologie neoplastiche. Il rilascio *in vivo* ed *ex vivo* del $TNF-\alpha$ a seguito di stimolazione con CI-IB-MECA supporta la nostra ipotesi sulla potenziale attività del recettore A_3 nel modulare la risposta infiammatoria/immunitaria attraverso un meccanismo $TNF-\alpha$ dipendente. A conferma di tale ipotesi, il CI-IB-MECA era in grado di promuovere e facilitare la traslocazione di cRel nel nucleo cellulare facilitando un meccanismo NF-kB-dipendente in grado di indurre alla morte cellulare. Il $TNF-\alpha$ è una citochina che viene prodotta a seguito di attivazione di NF-kB sia in cellule immunocompetenti che stromali. Resta ancora da chiarire in che modo il CI-IB-MECA sia in grado di stimolare la risposta innata ed in che modo gli altri recettori adenosinici intervengano in tale processo. Infatti, i principali effetti fisiologici dell'Ado sono dovuti alla maggiore espressione del recettore A_{2A} che assolve una funzione di tipo immunosoppressiva, sia per il suo ruolo fisiologico sulle cellule Treg che sulle cellule stromali. Infatti, l'accumulo di Ado in un processo canceroso è associato ad un aumento della crescita tumorale sia per la maggiore affinità recettoriale dell'Ado per il recettore A_{2A} che per la predominante attività immunosoppressiva dello stesso recettore. Il CI-IB-MECA è un agonista selettivo del recettore A_3 e pertanto esplica attività anti-tumorale nei modelli

sperimentali utilizzati nel presente progetto di ricerca, in quanto in grado di sovvertire il ruolo fisiopatologico dell'Ado endogena prodotta durante i fenomeni infiammatori/neoplastici. Conferme dei dati ottenuti fin'ora, relativi al recettore A_3 e del ruolo dell'Ado nel cancro, sono state ottenute, studiando l'attività anti-tumorale di un inibitore farmacologico (APCP) del CD73, l'enzima limitante la biosintesi extracellulare dell'Ado. La somministrazione di APCP in topi impiantati con cellule di melanoma favoriva l'arresto della crescita tumorale sia aumentando la percentuale di cellule B infiltranti il tessuto canceroso sia facilitando una risposta immunitaria adattativa di tipo citotossica, mediata dalle cellule T $CD8^+$. Quindi l'inibizione farmacologica di CD73 mediante APCP riduce la produzione extracellulare di Ado e di conseguenza gli effetti A_{2A} dipendenti. In conclusione, dagli studi effettuati fin'ora durante il mio Dottorato di Ricerca, ho evidenziato che la manipolazione del sistema adenosinergico potrebbe rappresentare un potenziale *tool* farmacologico per la terapia anti-neoplastica, sia favorendo una risposta immunitaria di tipo citotossica sia riducendo la proliferazione di cellule neoplastiche.

CAPITOLO 7

MATERIALI E METODI

Topi

C57Bl/6j e i topi nudi Athymic Nude-Foxn1^{nu} sono stati acquistati dall' Harlan Laboratories (Udine, Italia). Gli animali sono stati stabulati presso l' Istituto Nazionale dei Tumori "G.Pascale" Animal Facility (Napoli, Italia), in accordo con le linee guida istituzionali Italiane sulla cura degli animali, D.L. no. 116 del 27 Gennaio 1992 e del Concilio Diretivo Europeo del 24 Novembre 1986 (86/609/EC).

Studi *in vivo*

Topi femmine di 6-8 settimane sono stati impiantati sotto cute (s.c.) nel fianco destro con 3×10^5 cellule B16-F10. Dieci giorni dopo l'impianto, i topi hanno ricevuto ogni 2 giorni Ado 5'-(α,β -metilene) difosfato (APCP 400 $\mu\text{g}/\text{topo}$) mediante iniezione peritumorale (p.t.). Il volume tumorale è stato monitorato mediante calibro digitale e calcolato con la seguente formula: $V = 4/3 \pi \times (D/2) \times (d/2)^2$, dove V = volume (mm^3), D = diametro lungo (mm) e d = diametro corto (mm). I topi sono stati sacrificati il 13° giorno dopo l' impianto delle cellule B16-F10, ed i tessuti di melanoma e quelli linfoidi prossimali sono stati isolati per le opportune analisi.

Negli esperimenti in cui è stata effettuata la deplezione delle cellule B sono stati somministrati 250 $\mu\text{g}/\text{topo}$ di anticorpo monoclonale anti-CD20 (rat IgG) diluito in 100 μl di PBS e iniettato per somministrazione intra-peritoneale (i. p.). L'anti-CD20 è stato somministrato gli stessi giorni in cui ricevevano l'APCP e sacrificati 13 giorni dopo l' inoculo delle cellule. La deplezione è stata stimata pari al 90% rispetto all'isotipo di controllo IgG (Sorrentino et al., 2011).

In alcuni esperimenti è stata eseguita la neutralizzazione dell'IL-17A mediante anticorpo monoclonale (mouse IgG, 20 $\mu\text{g}/\text{topo}$) iniettato ogni giorno partendo dal giorno di somministrazione dell'APCP o PBS (giorno 10). La somministrazione di anti-IL-17 ha ridotto i livelli tissutali di IL-17 di circa il 95% rispetto all' IgG di controllo (Dato non mostrato).

Colture cellulari

Linee cellulari. La linea cellulare di carcinoma tiroideo umano NPA, le cellule di carcinoma follicolare tiroideo FRO le cellule di carcinoma tiroideo anaplastico ARO e la linea cellulare murina di melanoma (B16-F10, ottenute dall' American Type Culture Collection, LGC S.r.l. Milano, Italia) sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) supplementato con 2mM di L-Glutamina, 10% di Fetal Bovine Serum (FBS), 10000 U/ml di penicillina e 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di streptomina (PEN/STREP), e mantenute a 37° C in un'atmosfera costituita da 95% di O₂ e 5% di CO₂. La linea endoteliale ombelicale umana HUVEC è stata mantenuta in coltura con piastre di tipo *gelatin-coated* in mezzo base MI99 (Cambrex Bioscience Microtech) supplementato con FBS al 20%. All' occorrenza di ogni esperimento le cellule NPA, sono state ricoltivate in mezzo fresco per essere trattate con CI-IB-MECA (PA 10-20-40) o con gli altri reagenti utilizzati per le analisi. Analogamente le FRO, ARO e HUVEC sono state trattate con CI-IB-MECA (20 μM ; Tocris Cookson Ltd., London UK) e/o TRAIL solubile ricombinante (0.05-2.5 ng/ml; Alexis Corporation, Vinci-Biochem Firenze, Italia) o rTNF- α ricombinante (0.1-10 ng/ml; Sigma-Aldrich, Milano Italia) per 24 h. Inoltre ad alcuni trattamenti è stato aggiunto un antagonista A3AR, ovvero MRS1191 (0.5 μM ; Sigma-Aldrich) o FA385 (1 μM ; Colotta et al., 2004).

Colture primarie. I MØ sono stati isolati da topi C57Bl/6j mediante lavaggio peritoneale con 0.5 mM EDTA e messe in coltura in RPMI supplementato con FBS 10% e P/S 1%. I

MØ peritoneali sono stati trattati con CI-IB-MECA (1nM-1µM) per 24 h con e senza LPS (0.1µg/ml) e i livelli di TNF- α misurati mediante ELISA. In alcuni esperimenti è stato utilizzato l'antagonista A3 MRS 1191 o l'attivatore dell'adenilato ciclastasi Forskolin (1µM). Le cellule dendritiche CD11c positive, così come le cellule T CD8+, sono state isolate dalla milza di topi C57Bl/6j mediante il kit di selezione Mylteni e messe in coltura in RPMI completo. Dopo trattamento con CI-IB-MECA sono stati misurati i livelli di diverse citochine quali TNF- α , IL-12p40. Per alcuni esperimenti le cellule sono state pre-incubate, prima dei trattamenti sopra menzionati, con l'attivatore dell'adenilato ciclastasi Forskolin (1 µM; Alexis, Vinci-Biochem, Firenze Italia) o IMD 0354 inibitore della chinasi IKK β (1 µM; Tocris Cookson Ltd., Londra, UK) o staurosporina, un inibitore della protein chinasi C (PKC), (1 nM; Tocris Cookson Ltd., Londra, UK), o ancora l'inibitore della chinasi PI3K, LY294002 (25 µM, Stressgen, TEMA ricerca s.r.l., Bologna Italia).

I linfociti B CD19⁺ sono stati purificati dalle milze di topi C57Bl6j mediante Kit di isolamento magnetico CD19⁺ secondo protocollo del kit (EasySep Stem Cell, Voden, Milano, Italia). La purezza delle popolazioni CD19⁺, pari a circa il 90% è stata analizzata mediante analisi citofluorimetrica usando anticorpi anti-CD19 ed anti-CD220 (eBioscience, CA, USA). Una volta isolate le cellule B CD19⁺ sono state messe in coltura in RPMI supplementato con FBS 10% e trattate con APCP (5 µM; Sigma-Aldrich, Milano Italia) per 24 h. Infine i surnatanti sono stati prelevati per la quantificazione delle citochine mediante saggio ELISA, mentre le celle sono state analizzate al FACS per l'identificazione dei marcatori cellulari MHC I, MHC II e CD220.

ELISA

I MØ peritoneali sono stati piastrati in multiwell da 96 pozzetti ed incubati per 24 h con i trattamenti sopra indicati. I surnatanti raccolti sono stati analizzati con kit ELISA per TNF- α e IL-12 secondo istruzioni (BD eBioscience PharMingen, San Diego, CA). La concentrazione delle citochine rilevate nei surnatanti è stata calcolata come psicogrammi per millilitro (pg/ml).

I tessuti di melanoma sono stati omogenati per essere analizzati, mediante kit ELISA (eBioscience, San Diego, CA, USA; R&D System, Abington, UK; Bethly Laboratories, Montgomery TX.), per la quantificazione delle seguenti citochine: IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β , IL-12p40 e IgG2b.

Immunoistochimica

Tessuti tiroidei. I campioni provenienti da tessuto tiroideo normale e malato sono stati lavati e fissati con formalina al 4% e solidificati con paraffina. I tessuti così ottenuti sono stati tagliati in sezioni di 5-6 µM, deparaffinizzati e immersi in un soluzione di metanolo assoluto allo 0.3% di perossido di idrogeno per 30 min ed in fine lavati con PBS prima dello staining con immuno-perossidasi. I vetrini sono stati incubati a 4 C° tutta la notte con anticorpo antiA3AR diluito 1:100 in PBS, successivamente con goat anti-rabbit biotinilato per 20 min ed in fine in reagente ABC (Vector Laboratories) per altri 20 min. I vetrini sono stati sviluppati utilizzando diaminobenzidina (Dako), lavate e deidratate con alcol e xilene per essere montati.

Sezioni di melanoma. Per le sezioni di tessuto di melanoma prelevato dagli animali è stato eseguito il seguente protocollo. I tessuti sono stati fissati in OCT (Pella, Milano, Italia) e tagliati in criosezioni di 7 µM. Le sezioni sono state incubate con anticorpo anti-Ki67 (Abcam, Cambridge, UK) o Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., DDBA, Milano, Italia) e identificati mediante anticorpo secondario fluoresceinato FITC anti-rabbit o FITC anti-mouse. Per la corretta valutazione dei risultati, i dati sono stati confrontati con un controllo con isotipo IgG, un controllo con solo anticorpo secondario ed un controllo negativo agli anticorpi. I vetrini sono stati analizzati con un microscopio a fluorescenza (Carl Zeiss, Milano, Italia) mediante software Axioplan Imaging Programme (Carl Zeiss).

Immunofluorescenza

Le cellule FRO sono state seminate (2×10^5 cellule/well) per 24 h prima del trattamento. I trattamenti con TRAIL (0.1 ng/ml) e CI-IB-MECA (20 μ M) sono stati effettuati in maniera tempo-dipendente, 15 min - 4 h. Dopo il trattamento le cellule sono state fissate con paraformaldeide (4%, v/v) per 25 min, permeabilizzate con metanolo pre-raffreddato (100%, v/v) a -20°C per 10 min e successivamente incubate con anticorpo rabbit anti-p65/Rel-A (C-20) o rabbit anti-c-Rel (N-466) (Santa Cruz Biotechnology, DBA). Come anticorpo secondario è stato utilizzato un anti-rabbit Texas Red lasciato in incubazione per 1-2 h a temperatura ambiente. Inoltre è stato adottato un anticorpo isotipo Rabbit IgG di controllo (Santa Cruz Biotechnology, DBA). Le analisi relative alla traslocazione nucleare sono state effettuate con microscopio a fluorescenza (Carl Zeiss, Milano, Italia) mediante software Axioplan Imaging Programme (Carl Zeiss).

Immunoblotting

Le cellule NPA sono state piastrate alla densità di 5×10^6 cellule/ml in normale mezzo di coltura e incubate in presenza o meno di CI-IB-MECA a tempi diversi. Dopo la lisi, i campioni sono stati caricati in un gel al 10% di poli-acrilammide alla concentrazione di 40 μ g di proteine per campione e trasferiti su di una membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata bloccata con latte scremato al 5% in TBS-Tween 20 (0.1% v/v) ed incubati tutta la notte a 4°C con anticorpi primari. Dopo la successiva incubazione con anticorpo secondario coniugato a idroperossidasi di rafano, le proteine target sono state individuate mediante kit per chemiluminescenza amplificata ECL. Ogni filtro è stato in fine incubato con anticorpo mouse anti-tubulina allo scopo di quantificare la quantità di proteina housekeeping per campione utilizzata per la normalizzazione delle concentrazioni di proteine target ottenute. Le bande sviluppate su lastre sono state quantificate mediante analisi densitometrica.

Analogamente le cellule FRO e ARO sono state incubate con i seguenti anticorpi primari, anti-caspasi-3 (H-277), anti-PARP-I (F-2), anti-caspasi-9 (3C122), anti-Bcl-2 (100), anti-cFLIP (G-II), anti-pAkt (Santa Cruz Biotechnology, DBA Milano, Italia).

I MØ sono stati piastrati alla densità di 1×10^6 cellule/ml in condizioni standard di coltura. Dopo essere stati raccolti e lisati, i campioni sono stati processati per essere caricati in un gel SDS-PAGE 8-12% ed analizzati come descritto in precedenza. Gli anticorpi utilizzati sono un anti-p-I κ B α e un anti-IKK β (Santa Cruz Biotechnology, DBA, Italia).

Regolazione trascrizionale di NF- κ B

L'attività trascrizionale di NF- κ B è stata valutata mediante l'utilizzo di saggio ELISA TransAMTM (Active Motif, Cambridge, UK). I MØ peritoneali (1×10^6 cellule/well) sono stati trattati con LPS (0.1 μ g/ml) e/o CI-IB-MECA (1nM) per 15 min e successivamente processati per la separazione della frazione nucleare da quella citoplasmatica. Il saggio è stato eseguito secondo le istruzioni del kit.

RT-PCR

Le cellule FRO e ARO e i MØ peritoneali sono stati seminati in piastre da 35 cm^2 . Una volta raccolte le cellule, l'RNA è stato isolato mediante RNASPIN MINI extraction kit secondo istruzioni (GE Healthcare, Milano Italia). La trascrizione inversa è stata effettuata mediante kit di sintesi per cDNA a singolo filamento (GE Healthcare, Milano Italia) mediante PCR. Le condizioni dei cicli sono state 5 min a 95°C , 35 cicli di 45 s a 94°C , 20 s a 58°C , 30 s a 72°C . A3AR Primer: forward 5'-GTTCCGTGG TCAGTTTGGAT-3'; reverse 5'-GCGCAAACAAGAAGAGAACC-3'

I MØ peritoneali sono stati seminati in piastre da 35 cm^2 e processati come precedentemente descritto per la PCR alle stesse condizioni sperimentali. L'analisi è stata effettuata su MØ trattati con LPS 0.1 μ g/ml per 2 h o 4 h.

Saggio MTT

Le cellule NPA sono state piastrate in multiwell da 96 pozzetti (1×10^5 cellule/well) ed incubate per 24 h con diverse concentrazioni di CI-IB-MECA. Dopo il trattamento vi è stato aggiunto MTT (5 mg/ml in PBS) e sono state lisate con DMSO. La lettura è stata effettuata ad una assorbanza di 620 nm ed i risultati ottenuti espressi come percentuale relativa verso i controlli.

Analisi citofluorimetriche

Ciclo Cellulare. Le cellule NPA (1×10^6 cell/ml in multiwell da 12) sono state incubate per 24 h in presenza o non di CI-IB-MECA. Una volta lavate con PBS sono state raccolte mediante tripsina, centrifugate a $2000 \times g$ per 10 min ed incubate a 4°C per 30 min con staining solution contenete 0.1% di citrati di sodio, 0.1% di Triton X-100 e 50 mg/ml di ioduro propidio. In fine i campioni sono stati analizzati con citofluorimetro Becton Dickinson FACScan. La distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo G_0/G_1 , S e G_2/M stata calcolata mediante l' utilizzo del programma ModFit LT 3.0. Le cellule apoptotiche, invece sono state espresse come percentuale di nuclei ipodiploidi.

Espressione proteica. Dopo stimolazione con CI-IB-MECA e/o LPS i $M\phi$ sono stati raccolti ed incubati con anticorpo anti-pSer473-Akt (Santa Cruz Biotechnology, DBA Milano, Italia) dopo fissazione e permeabilizzazione. Come anticorpo secondario è stato utilizzato un FITC-coniugato (eBioscience, USA).

Analisi della purezza fenotipica. La purezza fenotipi cade della popolazione $CD11c^+ F4/80^+$ (pari al 98%) è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica effettuata sulle cellule aderenti ottenute dall'isolamento peritoneale. Le analisi sono state effettuate mediante citofluorimetro Becton Dickinson FACScan.

Identificazione delle popolazioni cellulari. I tessuti tumorali, i linfonodi e le milze sono state digerite mediante collagenasi A 1U/ml (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). L'analisi fenotipica delle diverse popolazioni cellulari è stata effettuata mediante l' utilizzo di un citofluorimetro FACS Calibur, Milano, Italia). Per l'identificazione cellulare sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: CD8-PE, CD3-PeCy5.5, CD4-FITC, CD25-PE, NK1.1-PE, CD11c-FITC, CD19-PeCy5.5, B220-PE (eBioscience, San Diego, CA, USA). L'anticorpo anti CD73 mouse (TY/23 clone, DB Pharmingen, San Diego, CA, USA) è stato accoppiato ad un anticorpo anti-rat APC-coniugato (eBioscience, San Diego, CA, USA,; Invitrogen, Milano Italia).

Analisi Statistica

I risultati sono stati espressi come medie \pm SEM. Le differenze statistiche sono state analizzate sia mediante test di t di Student, sia mediante test ANOVA ad una via, seguito da un Bonferroni post test. Valori di P inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Poulsen SA, Quinn RJ. Adenosine receptor: new opportunities for future drugs. *Bioorg Med Chem* 1998, 6: 619-641.

Cronstein BN. A novel approach to the development of anti-inflammatory agents: adenosine release at inflamed sites. *J Investig Med*, 1995, 43: 50-57.

Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 2001, 939: 74-84.

Cass CE, Young JD, Baldwin SA, *et al.* Nucleoside transporters of mammalian cells. *Pharm Biotechnol* 1999, 12: 313-352.

Casado FJ, Lostao MP, Aymerich I, *et al.* Nucleoside transporters in absorptive epithelia. *J Physiol Biochem* 2002, 58: 207-216.

Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T. Recent advances on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters. *Acta Biochim Pol* 2005, 52: 749-758.

Yao SY, Ng AM, Myzyka WR, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzyl thiosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transport proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissue. *J Biol Chem* 1997, 272: 28423-28430.

Wang J, Schaner ME, Thomassen S, *et al.* Functional and molecular characteristics of Na⁺-dependent nucleoside transporters. *Pharm Res* 1997, 14: 1524-1532.

Ritzel MW, Nog AM, Yao SY, *et al.* Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺ dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib.). *Mol Membr Biol* 2001, 18: 65-72.

Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* 2004, 447: 728-734.

Fredholm BB, Ljzerman AP, Jacobson KA, *et al.* International union of pharmacology: XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001, 53: 527-552.

Murayama T, Itahashi Y, Nomura Y. Possible involvement of pertussis toxin-sensitive G proteins and D2 dopamine receptors in the A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 1990, 55: 1631-1638.

A. Jacobson, Adenosine A3 receptors: novel ligands and paradoxical effects, *Trends Pharmacol Sci* 19 (1998), pp. 184–191.

Yao, Y. Sei, M.P. Abbracchio, J.L. Jiang, Y.C. Kim and K.A. Jacobson, Adenosine A3 receptor agonists protect HL60 and U937 cells from apoptosis induced by A3 antagonists, *Biochem Biophys Res Commun* 232 (1997), pp. 317–322.

- Z. Gao, B.S. Li, Y.J. Day and J. Linden, A3 adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cell from apoptosis, *Mol Pharmacol* 59 (2001), pp. 76–82.
- P. Fishman, S. Bar-Yehuda, G. Ohana, S. Pathak, L. Wasserman and F. Barer et al., Adenosine acts as an inhibitor of lymphoma cell growth: a major role for the adenosine receptor, *Eur J Cancer* 36 (2000), pp. 1452–1458.
- P. Fishman, S. Bar-Yehuda, G. Ohana, F. Barer, A. Ochaion and A. Erlanger et al., An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 β and NF- κ B, *Oncogene* 23 (2004), pp. 2465–2471.
- Fishman, S. Bar-Yehuda, G. Ohana, F. Barer, A. Ochaion and A. Erlanger et al., An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 β and NF- κ B, *Oncogene* 23 (2004), pp. 2465–2471.
- K.A. Jacobson and Z.-G. Gao, Adenosine receptors as therapeutic targets, *Nat Rev Drug Discov* 5 (2006), pp. 247–264.
- S. Merighi, A. Benini, P. Mirandola, S. Gessi, K. Varani and E. Leung et al., A3 adenosine receptor activation inhibits cell proliferation via phosphatidylinositol 3 kinase/Akt-dependent inhibition of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in A375 human melanoma cells, *J Biol Chem* 280 (2005), pp. 19516–19526.
- Blay J., White T.D., Hoskin D.W., The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentration of adenosine, *Cancer Res*, 57 (1997) 2602-2605
- Hoskin D.W, Reynolds T., Blay J. colon adenocarcinoma cells inhibit anti-CD3-activated killer cell induction; *Cancr Immunol. Immunother.* 38 (1994) 201-207
- S. Gessi, K., Varani, S. Merighi, A. Morelli, D. Ferrari, E. LLeung, P.G. Baraldi, G. Spalluto, P.A. Borea, Pharmacological and biochemical characterization of A3 adenosine receptors in Jukart T cells, *Br. J. Pharmacol.* (134)(2001) 116-126
- S. Merighi, K. Variani, S. Gessi, E. Cattabriga, V. Iannotta, C. Ulouglu, E. Leung, P.A. Borea, Pharmacological and biochemical characterization of adenosine in the human malignant melanoma A375 cell line, *Br. J. Pharmacol.* (134)(2001) 1215-1226
- E.C. Woodhouse, D.F. Amanatullah, J.A. Schetz, L.A. Liotta, M.L. Stracke, T. Clair, Adenosine receptor mediates motility in human melanoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1998) 888–894
- A. Mirza, A. Basso, S. Black, M. Malkowski, L. Kwee, J.A. Pachter, J.E. Lachowicz, Y. Wang, S. Liu, RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis, *Cancer Biol. Ther.* 4 (2005) 1355–1360
- A. Bauer, K.J. Langen, H. Bidmon, M.H. Holschbach, S. Weber, R.A. Olsson, H.H. Coenen, K. Zilles, 18 F-CPFPX PET identifies changes in cerebral A1 adenosine receptor density caused by glioma invasion, *J. Nucl. Med.* 46 (2005) 450–454.
- M. Dehnhardt, C. Palm, A. Vieten, A. Bauer, U. Pietrzyk, Quantifying the A1AR distribution in peritumoural zones around experimental F98 and C6 rat brain tumors, *J. Neurooncol.* 85 (2007) 49–63.

- C.A. Castillo, J.L. Albasanz, M. Fernández, M. Martín, Endogenous expression of adenosine A1, A2 and A3 receptors in rat C6 gliomacells, *Neurochem. Res.* 32 (2007) 1056–1070.
- M. Synowitz, R. Glass, K. Färber, D. Markovic, G. Kronenberg, K. Herrmann, J. Schnermann, C. Nolte, N. van Rooijen, J. Kiwit, H. Kettenmann, A1 adenosine receptors in microglia control glioblastoma–host interaction, *Cancer Res.* 66 (2006) 8550–8557.
- N. Etique, I. Grillier-Vuissoz, J. Lecomte, S. Flament, Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ER alpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells, *Oncol. Rep.* 21 (2009) 977–981
- S. Merighi, P. Mirandola, D. Milani, K. Varani, S. Gessi, K.N. Klotz, E. Leung, P.G. Baraldi, P.A. Borea, Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells, *J. Invest. Dermatol.* 119 (2002) 923–933.
- Y. Yasuda, M. Saito, T. Yamamura, T. Yaguchi, T. Nishizaki, Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A(2a) adenosine receptors, *J. Gastroenterol.* 44 (2009) 56–65.
- M. Koshiba, H. Kojima, S. Huang, S. Apasov, M.V. Sitkovsky, Memory of extracellular adenosine A2A purinergic receptor-mediated signalling in murine T cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 25881–25888
- M.C. Montesinos, A. Desai, J.F. Chen, H. Yee, M.A. Schwarzschild, J.S. Fink, B.N. Cronstein, Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A2A receptors, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 2009–2018.
- S.J. Leibovich, J.F. Chen, G. Pinhal-Enfield, P.C. Belem, G. Elson, A. Rosania, M. Ramanathan, C. Montesinos, M. Jacobson, M.A. Schwarzschild, J.S. Fink, B. Cronstein, Synergistic upregulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A2A receptor agonists and endotoxin, *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 2231–2244.
- G.A. Luty, D.S. McLeod, Retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy: a role for adenosine, *Prog. Retin. Eye Res.* 22 (2003) 95–111.
- V. Sexl, G. Mancusi, C. Holler, E. Gloria-Maercker, W. Schutz, M. Freissmuth, Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 5792–5799.
- A. Ohta, M. Sitkovsky, Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage, *Nature* 414 (2001) 916–920.
- A.A. Erdmann, Z.G. Gao, U. Jung, J. Foley, T. Borenstein, K.A. Jacobson, D. Fowler, Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion in vitro and IL-2- driven expansion in vivo, *Blood* 105 (2005) 4707–4714.
- S. Huang, S. Apasov, M. Koshiba, M. Sitkovsky, Role of A2a extracellular adenosine receptor mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion, *Blood* 90 (1997) 1600–1610

- N.D. Khoa, M.C. Montesinos, A.B. Reiss, D. Delano, N. Awadallah, B.N. Cronstein, Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A2A receptors in human monocytic THP-1 cells, *J. Immunol.* 167 (2001) 4026–4032.
- C.M. Lappas, J.M. Rieger, J. Linden, A2A adenosine receptor induction inhibits IFN γ production in murine CD4 $^{+}$ T-cells, *J. Immunol.* 174 (2005) 1073–1080
- M. Naganuma, E.B. Wiznerowicz, C.M. Lappas, J. Linden, M.T. Worthington, P.B. Ernst, Cutting edge: critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis, *J. Immunol.* 177 (2006) 2765–2769.
- E. Panther, M. Idzko, Y. Herouy, H. Rheinen, P.J. Gebicke-Haerter, U. Mrowietz, S. Dichmann, J. Norgauer, Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells, *FASEB J.* 15 (2001) 1963–1970.
- M. Schnurr, T. Toy, A. Shin, G. Hartmann, S. Rothenfusser, J. Soellner, I.D. Davis, J. Cebon, E. Maraskovsky, Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells, *Blood* 103 (2004) 1391–1397.
- P.E. Zarek, C.T. Huang, E.R. Lutz, J. Kowalski, M.R. Horton, J. Linden, C.G. Drake, J.D. Powell, A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T-cells, *Blood* 111 (2008) 251–259.
- D.W. Hoskin, J.S. Mader, S.J. Furlong, D.M. Conrad, J. Blay, Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells, *Int. J. Oncol.* 32 (2008) 527–535.
- I. Feoktistov, A.E. Goldstein, S. Ryzhov, D. Zeng, L. Belardinelli, T. Voyno-Yasenetskaya, I. Biaggioni, Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation, *Circ. Res.* 90 (2002) 531–538.
- D. Bieber, K. Lorenz, R. Yadav, K.N. Klotz, A2B adenosine receptors mediate an inhibition of ERK-1/2 phosphorylation in the breast cancer cell line MDA-MB-231, *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 377 (2008) 1–98.
- S. Ryzhov, S.V. Novitskiy, R. Zaynagetdinov, A.E. Goldstein, D.P. Carbone, I. Biaggioni, M.M. Dikov, I. Feoktistov, Host A2B adenosine receptors promote carcinoma growth, *Neoplasia* 10 (2008) 987–995
- Morello S, Sorrentino R, Montinaro A, Luciano A, Maiolino P, Ngkelo A, Arra C, Adcock IM, Pinto A. NK1.1 cells and CD8 T cells mediate the antitumor activity of CI-IB-MECA in a mouse melanoma model, *Neoplasia.* (2011) 13(4):365-73.
- S. Bar-Yehuda, F. Barer, L. Volfsson, P. Fishman, Resistance of muscles to tumor metastasis: a role for A3 adenosine receptor agonists, *Neoplasia* 3 (2001) 125–131
- P. Fishman, S. Bar-Yehuda, F. Barer, L.Madi, A.F.Multani, S. Pathak, The A3 adenosine receptor as a new target for cancer therapy and chemoprotection, *Exp. Cell Res.* 269 (2001) 230–236.

- Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J., Din W.S., Huang C.P., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Smith T.D., Rauch C., Smith C.A. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3 (6), 673-682
- Kimberley F.C., Screaton G.R. 2004. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.* 14 (5), 359-372
- Pan G., O'Rourke K., Chinnayan A.M., Gentz R., Ni J., Dixit V. M. 1997a. The receptor for cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276 (5309), 111-113
- Pan G., Ni J., Wey Y. F., Yu G., Gentz R., Dixit V. M. 1997b. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277 (5327), 815-818.
- Marsters S.A., Sheridan J.P., Pitti R.M., Huang A., Skubatch M., Baldwin D., Yuan J., Gurney A., Goddard A.D., Godowski P., Ashkenazi A. 1997. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr.Biol.* 7 (12), 1003-1006
- Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R.A., James, I.E., Rosenberg, M., Lee, J.C., Young, P.R., 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 273 (23), 14363–14367.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14 (22), 5579–5588.
- Ozoren, N., El-Deiry, W.S., 2002. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia* 4 (6), 551–557.
- Pai, S.I., Wu, G.S., Ozoren, N., Wu, L., Jen, J., Sidransky, D., El-Deiry, W.S., 1998. Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer. *Cancer Res.* 58 (16), 3513–3518
- Waterhouse, N.J., Ricci, J.E., Green, D.R., 2002. And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 84 (2–3), 113–121.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* 86, 147-157
- Cain K., Bratton SB, Langlais C., Walker G., Brown DG., Sun XM. Cohen GM., 2000. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complex. *J Biol. Chem.* 275: 6067-70
- Jiang X., and Wang X., 2000. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* 275: 31199-31203
- Du C., Fang M., Li Y., Li L. and Wang X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42
- Chai J., Shozaki E., Srinivasula SM., Wu Q., Dataa PP., Alnemri ES., Shi Y., 2001. Structural basis of caspase-7 inhibition of XIAP. *Cell* 104: 769-780

Yang X., Chang D., Baltimore D 1998. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol. Cell* 1: 319-325

Suzuki Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., Takahashi R., 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* 8: 613-621.

Hedge R., Srinvasula SM., Zhang Z., Wassell R, Cilenti L., Dubois G., Lazebnik Y., Zervos A.S., Fernandes-Alnemri T., 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* 277: 413-438

Susin SA., Lorenzo HK., Zamzami N., Marzo I., Snow BE., Brothers GM., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446

Widlak P., Li LY., Wang X., Garrad WT., 2001. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J. Biol. Chem.* 276: 48404-9

Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A., Goodwin, R.G., 1997. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7 (6), 813–820.

Ehrhardt, H., Fulda, S., Schmid, I., Hiscott, J., Debatin, K.M., Jeremias, I., 2003. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene* 22 (25), 3842–3852.

Li, H., Lin, X., 2008. Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation. *Cytokine* 41 (1), 1–8.

Harper, N., Farrow, S.N., Kaptein, A., Cohen, G.M., MacFarlane, M., 2001. Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand-induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J. Biol. Chem.* 276 (37), 34743–34752.

Secchiero, P., Gonelli, A., Carnevale, E., Milani, D., Pandolfi, A., Zella, D., Zauli, G., 2003. TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation* 107 (17), 2250–2256

Joy, A.M., Beaudry, C.E., Tran, N.L., Ponce, F.A., Holz, D.R., Demuth, T., Berens, M.E., 2003. Migrating glioma cells activate the PI3-K pathway and display decreased susceptibility to apoptosis. *J. Cell Sci.* 116 (Pt 21), 4409–4417.

Secchiero, P., Zerbinati, C., Rimondi, E., Corallini, F., Milani, D., Grill, V., Forti, G., Capitani, S., Zauli, G., 2004. TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cell Mol. Life Sci.* 61 (15), 1965–1974.

Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D., Ashkenazi, A., 2005. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Biol. Chem.* 280 (49), 40599–40608.

Belyanskaya, L.L., Ziogas, A., Hopkins-Donaldson, S., Kurtz, S., Simon, H.U., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U., 2008. TRAIL-induced survival and proliferation of SCLC cells is mediated by ERK and dependent on TRAIL-R2/DR5 expression in the absence of caspase-8. *Lung Cancer* 60 (3), 355–365.

Ehrlich, S., Infante-Duarte, C., Seeger, B., Zipp, F., 2003. Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. *Cytokine* 24 (6), 244–253.

Griffith, T.S., Chin, W.A., Jackson, G.C., Lynch, D.H., Kubin, M.Z., 1998. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.* 161 (6), 2833–2840.

Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Eto, H., Okumura, K., Yagita, H., 1999a. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J. Exp. Med.* 189 (9), 1451–1460.

Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H., Okumura, K., 2001. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol.* 214 (2), 194–200.

Zhang XR, Zhang LY, Devadas S, Li L, Keegan AD, Shi YF. Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation. *Cell Death Differ* 2003; 10:203–10.

Shedlock DJ, Whitmire JK, Tan J, MacDonald AS, Ahmed R, Shen H. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 2003; 170:2053–63.

Walczak H, Miller RE, Ariail K et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999; 5:157–63.

Ashkenazi A, Pai RC, Fong S et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999; 104:155–62.

Sedger LM, Shows DM, Blanton RA, Peschon JJ, Goodwin RG, Cosman D, Wiley SR. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. *J Immunol* 1999; 163:920–6.

Uno T, Takeda K, Kojima Y et al. Eradication of established tumors in mice by a combination antibody-based therapy. *Nat Med* 2006; 12:693–8.

Linden, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 775–787 (2001).

Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Klotz, K. N. & Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 527–552 (2001).

Naganuma, M. et al. Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *J. Immunol.* 177, 2765–2769 (2006).

- Sevigny, C. P. *et al.* Activation of adenosine A2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition. *J. Immunol.* **178**, 4240–4249 (2007).
- Lappas, C. M., Rieger, J. M. & Linden, J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN- γ production in murine CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **174**, 1073–1080 (2005).
- Sevigny, C. P. *et al.* Activation of adenosine 2^o receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition. *J. Immunol.* **178**, 4240–4249 (2007).
- Erdmann, A. A. *et al.* Activation of Th1 and Tc1 cell adenosine A2A receptors directly inhibits IL-2 secretion *in vitro* and IL-2-driven expansion *in vivo*. *Blood* **105**, 4707–4714 (2005).
- Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* **204**, 1257–1265 (2007).
- Kobie, J. J. *et al.* T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J. Immunol.* **177**, 6780–6786 (2006).
- Borsellino, G. *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **110**, 1225–1232 (2007).
- Zarek, P. E. *et al.* A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* **111**, 251–259 (2008).
- Cronstein, B.N., Rosenstein, E.D., Kramer, S.B., Weissmann, G., Hirschhorn, R., 1985. Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. *J. Immunol.* **2**, 1366–1371
- Flamand, N., Boudreault, S., Picard, S., Austin, M., Surette, M.E., Plante, H., Krump, E., Vallee, M.J., Gilbert, C., Naccache, P., Laviolette, M., Borgeat, P., 2000. Adenosine, a potent natural suppressor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, S88–S94.
- Hasko, G., Cronstein, B.N., 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* **25**, 33–39.
- Versluis, M., Postma, D.S., Timens, W., Hylkema, M.N., 2008a. Effects of IL-4 and IL-13 on adenosine receptor expression and responsiveness of the human mast cell line 1. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 866–873.
- Versluis, M., Van den Berge, M., Timens, W., Lujik, B., Rutgers, B., Lammers, J.-W.J., Postma, D.S., Hylkema, M.N., 2008b. Allergen inhalation decreases adenosine receptor expression in sputum and blood of asthma patients. *Allergy* **63**, 1186–1194.
- Inoue, Y., Chen, Y., Hirsh, M.I., Yip, L., Junger, W.G., 2008. A3 and P2Y2 receptors control the recruitment of neutrophils to the lungs in a mouse model of sepsis. *Shock* **30**, 173–177.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), 2003. *AIDS Epidemic Update-December*. UNAIDS, Geneva
- Raulet, D.H., 1999. Development and tolerance of natural killer cells. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 129–134.

- Scott, P., Trinchieri, G., 1995. The role of natural killer cells in host–parasite interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 34–40
- Unanue, E.R., 1997. Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 35–43.
- Biron, C.A., Brossay, L., 2001. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 458–464.
- Raskovalova, T., Huang, X., Sitkovsky, M., Zacharia, L.C., Jackson, E.K., Gorelik, E., 2005. Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK Cells. *J. Immunol.* 175, 4383–4391.
- Lokshin, A., Raskovalova, T., Huang, X., Zacharia, L.C., Jackson, E.K., Gorelik, E., 2006. Adenosine-mediated inhibition of the cytotoxic activity and cytokine production by activated natural killer cells. *Cancer Res.* 66, 7758–7765.
- Arie, H., Gil, H., Pnina, F., Oshra, A., Sara, B.-Y., 2003. A3 adenosine receptor agonist potentiates natural killer cell activity. *Int. J. Oncol.* 23, 1245–1249.
- Harish, A., Hohana, G., Fishman, P., Arnon, O., Bar-Yehuda, S., 2003. A3 adenosine receptor agonist potentiates natural killer cell activity. *Int. J. Oncol.* 23 (4), 1245–1249.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Panther, E., Idzko, M., Herouy, Y., Rheinen, H., Gebicke-Haerter, P.J., Mrowietz, U., Dichmann, S., Norgauer, J., 2001. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J.* 15, 1963–1970
- Fossetta, J., Jackson, J., Deno, G., Fan, X., Du, X.K., Bober, L., Soude-Bermejo, A., de Bouteiller, O., Caux, C., Lunn, C., Lundell, D., Palmer, R.K., 2003. Pharmacological analysis of calcium responses mediated by the human A3 adenosine receptor in monocyte derived dendritic cells and recombinant cells. *Mol. Pharmacol.* 63, 342–350.
- Schnurr, M., Toy, T., Shin, A., Hartmann, G., Rothenfusser, S., Soellner, J., Davis, I.D., Cebon, J., Maraskovsky, E., 2004. Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 103, 1391–1397.
- Panther, E., Corniti, S., Idzko, M., Herouy, Y., Napp, M., Sala, A.I., Girolomoni, G., Norgauer, J., 2003. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 101, 3985–3990.
- Novitskiy, S.V., Ryzhov, S., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A.E., Huang, Y., Tikhomirov, O.Y., et al., 2008. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* 17 (June).
- Hasko, G. *et al.* Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 14, 2065–2074 (2000).
- Ryzhov, S. *et al.* Effect of A2B adenosine receptor gene ablation on adenosine-dependent regulation of proinflammatory cytokines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324, 694–700 (2008).

Kreckler, L. M., Wan, T. C., Ge, Z. D. & Auchampach, J. A. Adenosine inhibits tumor necrosis factor- α release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**, 172–180 (2006).

Csoka, B. *et al.* A2A adenosine receptors and C/EBP β are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to *Escherichia coli*. *Blood* **110**, 2685–2695 (2007).

M Palmer T, Gettys TW, Stiles GL. Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. *J Biol Chem* 1995;270(28):16895–902.

Abbracchio MP, Brambilla R, Ceruti S, Kim HO, von Lubits DK, Jacobson KA, *et al.* G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol* 1995;48(6):1038–45. Dec.

Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 1998;281:2042–5.

M Chou M, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, *et al.* Regulation of protein kinase C δ by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* 1998;8:1069–77.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991–998.

Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:95–109.
Koebel CM, *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007;450:903–907.

Willimsky G, Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 2005;437:141–146.

Kurt RA, *et al.* T lymphocytes infiltrating sites of tumor rejection and progression display identical V β usage but different cytotoxic activities. *J Immunol* 1995;154:3969–3974.

Kurt RA, Park JA, Schluter SF, Marchalonis JJ, Akporiaye ET. TCR ν (β) usage and clonality of T cells isolated from progressing and rejected tumor sites before and after *in vitro* culture. *Int Immunol* 2000;12:639–646.

Blohm U, Roth E, Brommer K, Dumrese T, Rosenthal FM, Pircher H. Lack of effector cell function and altered tetramer binding of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 2002;169:5522–5530.

North RJ, Bursucker I. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+effector T cells. *J Exp Med* 1984; 159:1295–1311

Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 2004;200:771–782.

Dong H, Chen L. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity. *J Mol Med* 2003;81:281–287.

Dong H, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793–800
nman BA, et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* 2007;109:1499–1505.

Thompson RH, et al. B7-H1 glycoprotein blockade: a novel strategy to enhance immunotherapy in patients with renal cell carcinoma. *Urology* 2005;66:10–14.

Roth TJ, et al. B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy. *Cancer Res* 2007;67:7893–7900.

Sun Y, et al. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006;53:143–151.

Zang X, et al. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:19458–19463.

Tripathi P, Agrawal S. Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. *Cancer Invest* 2006;24:178–186.

Derre L, et al. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol* 2006; 177:3100–3107.

Kawamura K, Bahar R, Natsume W, Sakiyama S, Tagawa M. Secretion of interleukin-10 from murine colon carcinoma cells suppresses systemic antitumor immunity and impairs protective immunity induced against the tumors. *Cancer Gene Ther* 2002;9:109–115.

Zhang Q, et al. Adoptive transfer of tumorreactive transforming growth factor-beta-insensitive CD8+ T cells: eradication of autologous mouse prostate cancer. *Cancer Res* 2005;65:1761–1769.

Chen ML, et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:419–424.

Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 2001; 7:1118–1122.

Fahlen L, et al. T cells that cannot respond to TGF- β escape control by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005;201:737–746.

Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE, Carbone DP. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 1999;5:2963–2970.

McKallip R, Li R, Ladisch S. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J Immunol* 1999;163:3718–3726.

Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 2007;117:1147–1154.

Mellor AL, Munn DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefit friends, but protects foes. *Nat Rev Immunol* 2008;8:74–80.

Sharma MD, et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007;117:2570–2582.

Mellor AL, Munn DH. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat Rev Immunol* 2008;8:74–80.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006;6:715–727.

Nagaraj S, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007;13:828–835.

Mintz, B. & Illmensee, K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **72**, 3585–3589 (1975).

Pierce, G. B., Pantazis, C. G., Caldwell, J. E. & Wells, R. S. Specificity of the control of tumor formation by the blastocyst. *Cancer Res.* **42**, 1082–1087 (1982).

Dolberg, D. S. & Bissell, M. J. Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature* **309**, 552–556 (1984).

Postovit, L. M., Seftor, E. A., Seftor, R. E. & Hendrix, M. J. A three-dimensional model to study the epigenetic effects induced by the microenvironment of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **24**, 501–505 (2006).

Gerschenson, M., Graves, K., Carson, S. D., Wells, R. S. & Pierce, G. B. Regulation of melanoma by the embryonic skin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 7307–7310 (1986).

Hendrix, M. J. *et al.* Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nature Rev. Cancer* **7**, 246–255 (2007).

Olumi, A. F. *et al.* Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* **59**, 5002–5011 (1999).

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444 (2008).

Ostrand-Rosenberg, S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 11–18 (2008).

Talmadge, J. E., Donkor, M. & Scholar, E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 373–400 (2007).

Bingle, L., Brown, N. J. & Lewis, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* **196**, 254–265 (2002).

Mannel, D. N., Moore, R. N., and Mergenhagen, S. E. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor necrotizing factor). *Infect. Immun.*, 30: 523-530, 1980.

Drysdale, B. E., Zacharchuk, C. M., and Shin, H. S. Mechanism of macrophage mediated cytotoxicity: production of a soluble cytotoxic factor. *J. Immunol.*, 737: 2362-2367, 1983.

Fisch, H., and Gifford, G. E. In vitro production of rabbit macrophage tumor cell cytotoxin. *Int. J. Cancer*, 32: 105-112, 1983.

Matthews, N. Production of an anti-tumor cytotoxin by human monocytes. *Immunology*, 44: 135-142, 1981.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005;7:211-7.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23:549-55.

Allavena P, Sica A, Vecchi A, Locati M, Sozzani S, Mantovani A. The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. *Immunol Rev* 2000;177:141-9.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23:549-55.

Klimp AH, Hollema H, Kempinga C, van der Zee AG, de Vries EG, Daemen T. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages. *Cancer Res* 2001;61:7305-9.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006 Apr;42(6):717-27.

Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphoangiogenesis. *Am J Pathol* 2002;161:947-56.

Hotchkiss KA, Ashton AW, Klein RS, Lenzi ML, Zhu GH, Schwartz EL. Mechanisms by which tumor cells and monocytes expressing the angiogenic factor thymidine phosphorylase mediate human endothelial cell migration. *Cancer Res* 2003;63:527-33.

Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* 2004;40:1660-7.

Sica A, Sacconi A, Bottazzi B, et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF- κ B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol* 2000;164:762-7.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10:942–9.

Zimmerman H. 50-nucleotidase: Molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 1992; 285: 345Y65

Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 1998;161:95–109

Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2006;2:351–60.

Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:775–87.

Spychala J. Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 2000;87:161–73.

Jin D, Fan J, Wang L, et al. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res* 2010;70:2245–55.

Wang L, Zhou X, Zhou T, et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:365–72.

Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 2002;110:993–1002.

Jin D, Fan J, Wang L, et al. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res* 2010;70:2245–55.

Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1547–52

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007;204:1257-1265.