

# IDENTIFICAZIONE DI NUOVE ONCOPROTEINE E STUDI SU SISTEMI DI NANO *DELIVERY* NATURALI E/O BIOMIMETICI: L'ESEMPIO DEGLI ESOSOMI

Francesco Lozupone, Mariantonia Logozzi, Luana Lugini, Cristina Federici, Martina Borghi, Giulietta Venturi, Andrea Canitano, Stefano Fais  
*Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Dopo le malattie cardiocircolatorie, il cancro è la seconda causa di morte nei Paesi dell'Unione Europea. In Italia il cancro è causa di circa il 30% del totale dei decessi.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità un terzo dei tumori potrebbe essere curato se diagnosticato precocemente e trattato con farmaci adeguati. Uno degli obiettivi più importanti della ricerca oncologica è quello di individuare nuovi marcatori di diagnosi e/o di prognosi che consentano sia di diagnosticare precocemente la malattia, sia di comprenderne lo stadio di malignità. A questo scopo, adottando tra l'altro un approccio che per alcuni aspetti può definirsi "antico", basato sulla osservazione al microscopio delle cellule tumorali sono stati riscontrati fenomeni piuttosto trascurati dalla oncologia sperimentale. Ciò ovviamente non si è limitato ad una semplice e veloce analisi della morfologia delle cellule in coltura; sono state accuratamente prese in considerazione le alterazioni morfo-fisiologiche indotte da pressioni selettive micro ambientali, paragonabili in qualche modo a quanto avviene nei tumori *in vivo* quali la scarsità di nutrienti dovuti a scarsa vascolarizzazione e le alterazioni del pH extracellulare. Il fenomeno che ha più colpito usando questo tipo di approccio è stata la elevata frequenza di fenomeni cannibalici. Il cannibalismo cellulare viene classicamente descritto come una cellula apparentemente intatta contenuta in un'altra più grande all'interno di un grosso vacuolo, che spinge il nucleo alla periferia della cellula, facendo assumere allo stesso un aspetto schiacciato "a semiluna o luna crescente" (1-2). Cellule con questo fenotipo sono state individuate in tumori di diversa origine e la presenza di queste cellule viene sempre correlata con una prognosi infausta (3-5). Nel nostro laboratorio (Dipartimento del Farmaco-Reperto Farmaci Antitumorali) abbiamo recentemente dimostrato che cellule di melanoma derivanti da lesioni metastatiche, ma non quelle derivanti da lesioni primarie, sono in grado di fagocitare cellule apoptotiche o materiale inerte, con un comportamento apparentemente simile a quello di fagociti professionisti quali i macrofagi, con i quali condividono il corredo enzimatico e i *marker* tipici della fagocitosi. Inoltre, analogamente a quanto osservabile negli eucarioti monocellulari quali le amebe, colture cellulari di melanoma metastatico sono anche in grado di ingerire cellule vive, come i linfociti del sangue periferico, e anche di nutrirsi di essi (6-7), suggerendo quindi che il cannibalismo tumorale può rappresentare di per sé un meccanismo di evasione dalla risposta immunitaria.

Gli esosomi sono nanovesicole di un diametro che va dai 60 ai 100 nm, che sembrano originare da un fenomeno di multi fusione fra vari organuli intracellulari, che porta a sua volta alla formazione dei *Multivesicular Bodies* (MVB). I MVB, dopo essersi fusi con la membrana plasmatica, rilasciano all'esterno della cellula il proprio contenuto esosomale. Queste vescicole sono composte da un doppio strato fosfolipidico contenente varie proteine del comparto endolisosomale, proteine di membrana (tra cui varie tetraspanine come CD9 e CD81), proteine

presentanti l'antigene e proteine del citoscheletro. È stato dimostrato inoltre che gli esosomi contengono al proprio interno non solo proteine ma anche tra acidi nucleici: RNA (tra cui i microRNA, RNA messaggeri), DNA a singolo filamento e retrotrasposoni. (8-9).

Gli esosomi vengono rilasciati da diversi tipi cellulari "sani" quali i macrofagi, i neutrofilii, epatociti, ecc., ma anche da cellule tumorali. In particolare le cellule tumorali rilasciano una gran quantità di esosomi tanto da far ipotizzare un meccanismo diverso dalle cellule normali sia nella loro formazione che nel loro rilascio. Una delle ipotesi è che soprattutto nelle cellule tumorali gli esosomi rappresentino un meccanismo di eliminazione di sostanze tossiche o comunque di scarto, in cellule con un *turnover* esagerato e in grado di produrre in poco tempo detriti di ogni natura. Più di recente è stato dimostrato che gli esosomi hanno in generale una funzione legata alla comunicazione tra le cellule (10) essendo in grado di fondersi con la membrana delle cellule bersaglio, ove possono trasferire il proprio contenuto di proteine e acidi nucleici pienamente funzionanti (11).

Fluidi biologici come sangue, urine, saliva e liquido spermatico contengono grandi quantità di esosomi. È stato dimostrato che il numero di queste vescicole, la loro origine cellulare e la loro composizione proteica sono correlabili con varie patologie tra cui il cancro, dove è stata descritta una correlazione tra progressione della malattia, diffusione metastatica e quantità di esosomi (12-13).

È noto che una caratteristica tipica dei tumori maligni è un basso pH dell'ambiente peritumorale. È noto inoltre che le alterate condizioni di pH influenzano sia il rilascio di esosomi sia la fusione degli stessi con la membrana delle cellule bersaglio (14).

Lo studio delle interazioni tra alterazioni del pH tumorale e del ruolo che tale fenomeno gioca nei processi di endocitazione e nel traffico vescicolare potrà fornire importanti informazioni per la comprensione delle dinamiche alla base della progressione maligna dei tumori.

## Stadio di sviluppo

### Studio di nuovi biomarcatori: lo studio di TM9SF4

Uno dei modelli più caratterizzati per lo studio della fagocitosi è l'ameba *Dyctiostelium discoideum*. In questo organismo un ruolo chiave nella fagocitosi è svolto dalla proteina Phg1A (15-16). L'omologo umano di questa proteina è TM9SF4 una proteina pressoché sconosciuta e caratterizzata per la prima volta nell'uomo da Lozupone e collaboratori, 2009 (17) nel Reparto di Farmaci antitumorali del Dipartimento del Farmaco. Questa proteina appartiene ad una famiglia di proteine trans membrana, la *Transmembrane 9 Superfamily*, composta da 4 proteine (TM9SF1-4) altamente simili tra loro e altamente conservate da un punto di vista filogenetico. La funzione di queste proteine nei vertebrati è quasi completamente sconosciuta. TM9SF4 si compone di una regione N-terminale extracitoplasmatica e una regione C-terminale caratterizzata da 9 domini trans membrana. L'analisi dell'espressione di questa proteina mediante tecniche di RT-PCR e di *Western Blot* condotta su melanociti, cellule endoteliali e cellule del sangue periferico provenienti da donatori sani, e su un pannello di linee di melanoma, ha rivelato che sia i trascritti sia la proteina (di circa 70 kDa) sono identificabili esclusivamente nei melanomi con fenotipo maligno. Osservazioni di microscopia a fluorescenza hanno inoltre consentito di proporre una localizzazione di TM9SF4 sui fagosomi e sugli endosomi primari, giacché questa proteina colocalizza con marcatori tipici dei fagosomi e degli endosomi primari Rab5 ed EEA1, mentre non colocalizza con marcatori tipicamente lisosomiali come il Lysotracker e Lamp-1, né con *marker* nucleari o mitocondriali (17).

Per quel che riguarda la funzione di TM9SF4, esperimenti di *RNA-interference* hanno evidenziato che silenziando questa proteina si inibiscono quasi del tutto sia i processi di endocitazione di materiale inerte come lieviti fissati, sia i processi di fagocitosi nei confronti di linfociti vivi, suggerendo un suo ruolo nell'insorgenza del fenotipo cannibale (17).

La presenza di TM9SF4 sulle membrane dei fagosomi e degli endosomi primari e la sua conformazione con 9 domini transmembrana ci ha indotto a supporre che TM9SF4 sia una pompa o un canale ionico e che possa essere coinvolta nella regolazione dell'acidità delle vescicole su cui si esprime. Esperimenti di analisi del pH delle vescicole endo-lisomiali condotti su linee di melanoma metastatico hanno infatti evidenziato che inibendo l'espressione di TM9SF4 mediante l'utilizzo di iRNA si induce una sensibile alterazione del pH vescicolare. Queste evidenze sembrano confermare l'ipotesi di un suo ruolo nella acidificazione di queste vescicole, processo peraltro fondamentale nei processi di fagocitosi. Tirando le somme, l'inibizione della espressione di TM9SF4 sembra far perdere alle cellule silenziate alcune caratteristiche tipiche dei tumori metastatici, suggerendo che questa proteina possa avere un ruolo chiave nella progressione maligna dei tumori.

### **Studio di nuovi biomarcatori: gli esosomi**

Il nostro gruppo di ricerca si occupa da un decennio dello studio degli esosomi umani di origine tumorale. Abbiamo dimostrato che gli esosomi isolati da cellule di melanoma e di carcinoma del colon e quelli presenti nel plasma dei pazienti con tumore hanno capacità immunosoppressive, in quanto sono in grado di indurre l'apoptosi dei linfociti T citotossici grazie all'espressione in membrana delle proteine pro-apoptotiche Fas Ligando e TRAIL (18-19). Inoltre abbiamo dimostrato, per la prima volta, che gli esosomi tumorali entrano nelle cellule tumorali tramite un meccanismo di fusione con la membrana plasmatica cellulare, mediato dai lipidi di membrana e che sono in grado di trasferire nelle cellule riceventi la caveolina, proteina coinvolta nella progressione tumorale. Un dato interessante è che l'efficienza di fusione degli esosomi con le cellule di tumore metastatico è significativamente più alta rispetto alle cellule di tumore primario e normali, cioè i linfociti del sangue periferico (14).

Un protagonista importante nella regolazione del traffico degli esosomi è il pH del microambiente cellulare. È noto che il pH dei tumori è acido (20) e che le cellule tumorali riescono a sopravvivere in condizioni di acidità che non sono invece tollerate dalle cellule normali.

Noi abbiamo evidenziato che l'acidità tumorale determina un aumento del traffico degli esosomi sia in entrata che in uscita dalla cellula. Il trattamento farmacologico con specifici inibitori delle pompe protoniche V-ATPasi (tra le responsabili dell'insorgenza dell'acidità tumorale) riduce in maniera consistente il traffico degli esosomi (14).

Nell'ambito della ricerca sugli esosomi, un filone di studio riguarda il possibile potenziale patogenetico e come marcatore diagnostico/prognostico di esosomi rilasciati in tumori associati al virus EBV, in particolare veicolanti componenti virali (proteine e/o acidi nucleici). L'analisi di esosomi prodotti *in vitro* da linee cellulari linfoblastoidi ha rilevato la presenza delle proteine della fase latente di EBV LMP1 e LMP2a, di miRNAs codificati dal genoma virale, e anche di sequenze di mRNA codificanti per LMP2a. Gli sviluppi di questo studio riguarderanno la possibilità di trasferimento di componenti virali a cellule non infette mediante esosomi prodotti da cellule EBV infette, e la valutazione della presenza e della composizione di esosomi in campioni biologici di pazienti con patologie EBV correlate.

## Conclusioni e prospettive future

I meccanismi che controllano il pH delle cellule tumorali hanno un ruolo cruciale nella regolazione dei processi di endocitosi e di fagocitosi. L'alterazione del pH delle cellule tumorali stesse e del microambiente, svolge inoltre un ruolo nella progressione maligna dei tumori, alterando il traffico vescicolare e l'interazioni del tumore stesso con i tessuti circostanti. Noi abbiamo suggerito che TM9SF4, proteina associata all'attività cannibalica, ha un ruolo chiave in questi processi ipotizzando che TM9SF4 possa essere coinvolta sia nella diffusione metastatica, sia nell'insorgenza del fenotipo resistente.

I nostri studi inoltre aggiungono alcuni tasselli alla conoscenza della rilevanza biologica che hanno gli esosomi come "nano dispositivi" per la comunicazione tra le cellule. In un microambiente tumorale gli esosomi possono aumentare la malignità del tumore usando diverse strategie: inducendo apoptosi in linfociti che dovrebbero controllarne la crescita, attraverso una interazione ligando recettore; ma anche inducendo profonde alterazioni in cellule nelle quali gli esosomi trasferiscono il loro contenuto attraverso un processo di fusione.

Sono in corso esperimenti allo scopo di caratterizzare molecolarmente e funzionalmente sia il TM9SF4 espresso dai tumori, sia altre proteine della *Tm9 superfamily*. Sono stati generati cloni produttori anticorpi diretti verso TM9SF4 ed esperimenti di selezione sulla espressione di TM9SF4 da parte di vari tumori umani sono tuttora in corso. Si spera di ottenere a breve dati che giustifichino l'uso di TM9SF4 come nuovo *marker* tumorale e potenziale nuovo target per strategie antitumorali.

Questi risultati inoltre supportano la ricerca di nuove terapie antitumorali che abbiano come target l'acidità tumorale e l'inibizione del rilascio degli esosomi tumorali e che sfruttino gli esosomi come possibile strumento selettivo di trasporto del farmaco.

## Bibliografia

1. Fais S. Cannibalism: A way to feed on metastatic tumors. *Cancer Lett* 2007;258:155-64.
2. Breier F, Feldmann R, Fellenz C, Neuhold N, Gschnait F. Primary invasive signet-ring cell melanoma. *J Cutan Pathol* 1999;10:533-36.
3. Caruso RA, Muda AO, Bersiga A, Rigoli L, Inferrera C. Morphological evidence of neutrophil tumor cell phagocytosis (cannibalism) in human gastric adenocarcinomas. *Ultrastruct Pathol* 2002;26:315-21.
4. DeSimone PA, East R, Powell RD. Phagocytic tumor cell activity in oat cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 1980;11:535-39.
5. Kojima S, Sekine H, Fukui I, Ohshima H. Clinical significance of "cannibalism" in urinary cytology of bladder cancer. *Acta Cytol* 1998;42:1365-69.
6. Lugini L, Lozupone F, Matarrese P, Funaro C, Luciani F, Malorni W, Rivoltini L, Castelli C, Tinari A, Piris A, Parmiani G, Fais S. Potent phagocytic activity discriminates metastatic and primary human malignant melanomas: a key role of ezrin. *Lab Invest* 2003;83:1555-67.
7. Lugini L, Matarrese P, Tinari A, Lozupone F, Federici C, Iessi E, Gentile M, Luciani F, Parmiani G, Rivoltini L, Malorni W, Fais S. Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cell. *Cancer Res* 2006;66:3629-38.
8. Thery C, Zitvogel L and Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2:569-79.
9. Simons M, Raposo G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(4):575-81.

10. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9(6):654-9.
11. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73(10):1907-20.
12. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2010;36(8):888-906.
13. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, Brambilla D, Venturi G, Lozupone F, Santinami M, Huber V, Maio M, Rivoltini L, Fais S. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 2009;4(4):e5219.
14. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 2009;284(49):34211-22.
15. Cornillon S, Pech E, Benghezal M, Ravanel K, Gaynor E, Letourneur F, Bruckert F, Cosson P. Phglp is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* 2000;275:34287-92.
16. Bergeret E, Perrin J, Williams M, Grunwald D, Engel E, Thevenon D, Taillebourg E, Bruckert F, Cosson P, Fauvarque MO. TM9SF4 is required for Drosophila cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis. *J Cell Sci* 2008;121:3325-34.
17. Lozupone F, Perdicchio M, Brambilla D, Borghi M, Meschini S, Barca S, Marino ML, Logozzi M, Federici C, Iessi E, de Milito A, Fais S. The human homologue of Dictyostelium discoideum phglA is expressed by human metastatic melanoma cells. *EMBO Rep* 2009;12:1348-54.
18. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 2002;195(10):1303-16.
19. Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ* 2008;15(1):80-8.
20. Gatenby RA, Gawlinski ET. The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Res* 2003;63(14):3847-54.