

## Esosomi delle cellule Natural Killer umane: supporto acellulare nell'immunosorveglianza antitumorale

Luana Lugini\*, Serena Cecchetti<sup>†</sup>, Cristina Federici\*, Elisabetta Iessi\*, Marisa Colone<sup>¶</sup>, Veronica Huber<sup>‡</sup> and Stefano Fais\*

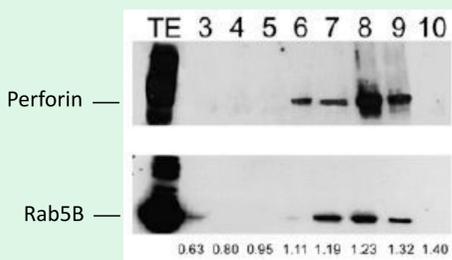
\*Dipartimento di Oncologia e Medicina Molecolare/ex. Dip. del Farmaco; <sup>†</sup>Servizio tecnico scientifico grandi Strumentazioni e Core Facilities/ex Dip. di Biologia Cellulare e Neuroscienze; <sup>¶</sup>Centro Nazionale di Ricerca per la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci/ex Dip. di Tecnologia e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma. <sup>‡</sup>Unità di Immunoterapia dei Tumori Umani, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano.

Le cellule Natural Killer (NK) rappresentano la prima effettiva barriera di difesa del corpo umano dall'insorgenza dei tumori. Gli individui con un deficit di NK presentano un rischio più alto di sviluppare il cancro. Nei pazienti con tumore le cellule NK mostrano pesanti difetti nella degranolazione e nella capacità di eliminare le cellule tumorali. Gli esosomi sono delle vescicole di dimensioni nanometriche, secrete nel microambiente extracellulare dalle cellule sane e non, e sono coinvolte in numerosi network biologici. In studi preclinici è stato dimostrato che queste nanovesicole hanno proprietà immunologiche sia stimolatorie che tollerogeniche e ciò supporta il loro possibile e futuro utilizzo nell'immunoterapia del cancro. E' in continua crescita l'interesse per l'utilizzo degli esosomi come biomarcatori, grazie al loro semplice rilevamento nei fluidi biologici. Noi abbiamo purificato e caratterizzato per la prima volta gli esosomi delle NK isolate dal plasma di donatori sani (NKExo). Abbiamo dimostrato che gli NKExo presentano attività citolitica contro diversi istotipi tumorali (Lugini et al., 2012) e hanno attività immunostimolatoria. Abbiamo inoltre sviluppato un test immunoenzimatico, NKExoELISA, in grado di misurare gli NKExo circolanti, isolati dal plasma, grazie al riconoscimento simultaneo delle proteine costitutive esosomiali e delle proteine tipicamente espresse dalle NK. Pertanto, gli esosomi delle NK potrebbero rappresentare uno strumento acellulare utile sia per misurare l'attività delle cellule NK nel plasma, sia per revertire lo stato anergico dell'immunità antitumorale, comunemente osservata nei pazienti con il cancro.

Questo studio è attualmente in corso ed è supportato da un Grant assegnato alla Dr.ssa Luana Lugini dal Ministero della Salute, Ricerca Finalizzata, Bando Giovani Ricercatori, GR-2011-02351400.

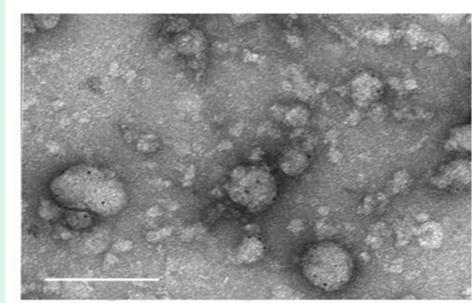
### Caratterizzazione morfologica e biochimica degli esosomi delle NK

#### Analisi in Western Blot



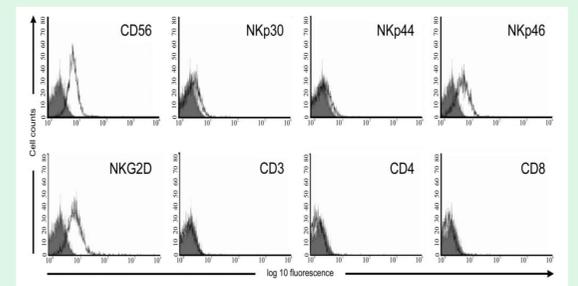
NKExo isolati dal plasma di un donatore sano, sottoposti ad ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio e analizzati in Western Blot per l'espressione della proteina perforina (proteina killer, citolitica) e Rab5B (proteina marker degli esosomi)

#### Analisi al TEM



Immuno-microscopia elettronica (TEM) di NKExo marcati con l'anticorpo anti-CD56 (marker specifico delle NK). La barra corrisponde a 100 nm.

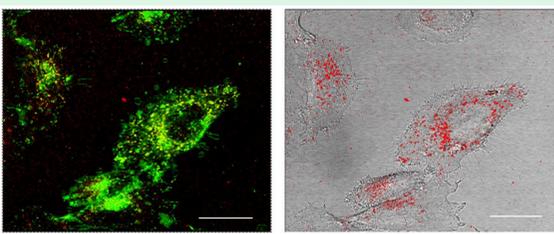
#### Analisi al FACS



Gli NKExo legati a biglie e analizzati in citofluorimetria (FACS) mostrano una significativa espressione di CD56, NKp46 e NKG2D e a livelli più bassi di NKp30 e NKp44, proteine markers delle NK.

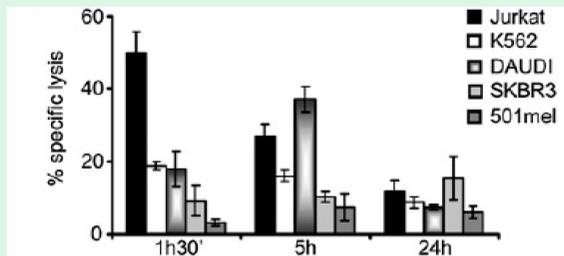
### Studi funzionali degli esosomi delle NK

#### Gli NKExo entrano nelle cellule bersaglio



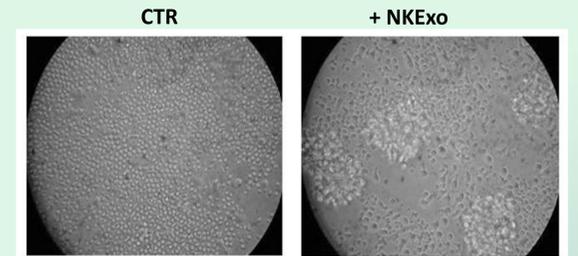
Microscopia confocale (pannello a sinistra) e microscopia a contrasto di fase (pannello a destra) di cellule di carcinoma della mammella (in verde/traslucide) incubate con gli NKExo di un donatore sano (in rosso). E' evidente la presenza degli NKExo nel citoplasma delle cellule.

#### Gli NKExo hanno attività citolitica



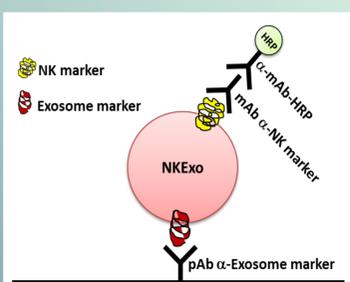
Studio al citofluorimetro dell'attività citolitica degli NKExo incubati con le cellule di diversi istotipi tumorali, sia ematologici che solidi.

#### Gli NKExo hanno attività immunostimolatoria

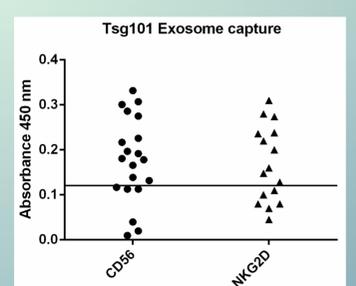


Microscopia a contrasto di fase di cellule mononucleate del sangue periferico, incubate per 3 giorni con gli NKExo di un donatore sano, mostrandone la formazione delle tipiche rosette di attivazione linfocitaria.

### NKExoELISA



L'NKExoELISA è un test immunoenzimatico in grado di riconoscere e quantificare gli esosomi secreti dalle cellule NK sia nel supernatante di coltura cellulare che nei fluidi biologici, quale il plasma. Gli esosomi vengono catturati con un anticorpo policlonale diretto verso un tipico marcatore esosomiale (i.e. tsg101), e vengono poi rivelati con un anticorpo monoclonale che riconosce i marcatori delle NK (i.e. CD56 o NKG2D). Il segnale viene in ultimo amplificato tramite un anticorpo anti-mouse coniugato all'enzima perossidasi e quantificato allo spettrofotometro. Lo studio condotto su 20 plasmi di donatori sani ha rivelato che circa il 70% dei soggetti analizzati presenta un livello di esosomi delle NK pressochè simile. Il restante 30% non ha livelli misurabili di NKExo, il che potrebbe essere un segnale di allarme, predittivo di uno stato di immunosorveglianza compromesso, da revertire verso la normalità.



### Studi in corso:

- Valutazione dell'attività citolitica degli NKExo purificati da donatori sani in modelli preclinici, ossia topi SCID inoculati con tumori solidi o ematopoietici;
- Caratterizzazione morfologica e biochimica degli NKExo purificati dal plasma di pazienti con melanoma a diversa stadiazione, comparati a quelli dei donatori sani, tramite i.e. la Tecnologia NTA (Nanosight Tracking Analysis) e l'NKExoELISA. I primi risultati dimostrano che gli NKExo dei pazienti con tumore sono significativamente diversi rispetto agli NKExo dei donatori sani, in termini quantitativi e qualitativi (dimensioni) mettendo in evidenza un quadro anormale/patologico che si discosta da un buono stato di salute.