

NUOVI APPROCCI DIAGNOSTICI/PROGNOSTICI BASATI SULLA QUANTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEGLI ESOSOMI PLASMATICI IN PAZIENTI CON TUMORI

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

Introduzione

Le aumentate probabilità di successo nella lotta ai tumori derivano soprattutto da una precoce diagnosi e da una più efficiente e precoce rimozione chirurgica del tumore piuttosto che da una aumentata efficacia delle cure. Sebbene grandi passi si siano compiuti nel campo della prevenzione e nella diagnosi basata su marcatori tumore specifici come la PSA (*Prostate-specific antigen*) per il tumore della prostata, a tutt'oggi non sono disponibili metodi diagnostici e *marker* prognostici oggettivi per la maggior parte dei tumori. Esempio tipo è il melanoma, tumore che nella maggior parte dei casi non risponde a nessuna terapia. Per questo tumore non sono noti marcatori diagnostici validi e l'unico marcatore prognostico è costituito dalla valutazione dei livelli serici di LDH (Lattico deidrogenasi) (1-3). Uno degli obbiettivi chiave della ricerca oncologica è quindi quello di individuare nuovi metodi diagnostici e prognostici basati su marcatori specifici che consentano sia di diagnosticare precocemente la malattia sia di comprenderne lo stadio di progressione.

Negli ultimi anni sta emergendo in modo evidente l'importanza degli esosomi come potenziali marcatori tumorali. Gli esosomi sono nanovesicole (60-100 nm di diametro) che si originano dal compartimento endosomale. Queste vescicole vengono racchiuse dalla cellula in ampie strutture definite *multivescicular bodies* per poi essere attivamente secrete per esocitosi da quasi tutti i tipi cellulari sani o patologici. I *multivesicular bodies*, dopo essersi fusi con la membrana plasmatica, riversano il proprio contenuto di esosomi nell'ambiente extracellulare (4-6). Il profilo molecolare degli esosomi circolanti nei fluidi biologici rispecchia grossomodo quello delle cellule da cui si sono originate. Queste microvesicole possono contenere sulla propria superficie proteine di membrana, proteine del comparto endolisosomale, molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) e proteine costimolatorie. Gli esosomi inoltre contengono al proprio interno acidi nucleici quali, mRNA o microRNA (7-9). Gli esosomi nascono da un punto di vista evolutivo come meccanismo di eliminazione di detriti e di sostanze "non gradite" alla cellula quali cataboliti tossici. Di recente è stato dimostrato che gli esosomi hanno una funzione nella comunicazione tra le cellule (10) essendo in grado di fondersi con la membrana delle cellule bersaglio. Gli esosomi di derivazione tumorale oltre alle funzioni note, sono in grado di svolgere attività che favoriscono la crescita e lo sviluppo dei tumori. Essi infatti si comportano da soppressori delle funzioni delle cellule del sistema immune, e sono coinvolti nella progressione e nello sviluppo metastatico (10-14). Ad esempio gli esosomi derivanti dai glioblastomi stimolano la proliferazione delle cellule di glioma (15) e nel caso tumori alla prostata altamente metastatici gli esosomi rilasciati dai fibroblasti attivati dal tumore (*tumor activated fibroblasts*) ne promuovono l'invasività (16). Il ruolo degli esosomi rilasciati dai tumori è sicuramente molto complesso tanto che, al contrario di quanto suggerito nei lavori appena citati, numerosi studi hanno focalizzato il proprio interesse

sulle potenzialità di queste strutture nano-vescicolari come vaccini antitumorali. Questi studi si basano sul presupposto teorico che gli esosomi tumorali, ricchi di proteine antigeniche espresse anche sulla superficie delle cellule da cui derivano, siano in grado di stimolare una risposta immune verso queste ultime (*cross-priming* cellule dendritiche/linfociti T) (17-18).

La presenza degli esosomi nel plasma e nelle effusioni neoplastiche dei pazienti con tumore supporta ulteriormente il ruolo degli esosomi tumorali nella crescita e progressione tumorale (13-14). Tuttavia, nonostante l'importanza di queste peculiari microvescicole, ben pochi sono gli studi volti ad una caratterizzazione degli esosomi circolanti quali potenziali marcatori di diagnosi o di progressione della malattia. Il limite principale deriva dalla mancanza di metodi utili e poco laboriosi per la quantificazione degli esosomi nei fluidi biologici.

Risultati e stadio di sviluppo

Nel nostro laboratorio abbiamo sviluppato un metodo, l'EXOTEST, in grado di rilevare e quantificare gli esosomi di melanoma nel supernatante di colture cellulari, nel plasma di topi SCID inoculati con melanoma umano e nel plasma di pazienti con tumore (19). Gli esosomi utilizzati per la messa a punto del test sono stati purificati dal surnatante di colture cellulari di linee di melanoma umano per centrifugate successive a velocità crescente fino ad un massimo di 100.000g. Ciò consente di separare tutte le particelle non esosomali (ad esempio detriti cellulari, microvescicole non esosomali), dagli esosomi stessi che costituiscono il pellet dell'ultima centrifugata. In breve il test di basa sull'impiego di un anticorpo immobilizzato su piastre per ELISA in grado di catturare tutti gli esosomi e una seconda incubazione degli esosomi catturati con uno o più anticorpi diretti verso proteine esosomali. I livelli di espressione delle proteine riscontrate sulla superficie degli esosomi vengono misurati come valori di densità ottica OD ottenuti con un lettore ELISA. In questo studio per la cattura degli esosomi abbiamo utilizzato piastre coperte con un anticorpo anti Rab5B, una proteina del comparto endosomale che noi abbiamo dimostrato essere espressa sulla superficie di tutti gli esosomi sia di derivazione tumorale, sia di quelli derivanti da cellule sane (19). L'identificazione e la quantificazione degli esosomi è stata ottenuta utilizzando un anticorpo anti CD63 per quantificare tutti gli esosomi raccolti, sia di origine tumorale che da cellule normali, o un anticorpo diretto verso CAV-1. Per la messa a punto del test ELISA oltre agli esosomi derivanti dalle colture di melanoma sono stati utilizzati esosomi purificati dal surnatante di colture di macrofagi derivanti dal sangue periferico di donatori sani. Gli esosomi sono stati preliminarmente analizzati al FACS e in *Western Blot*. I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di Rab5, CD63 su tutti gli esosomi, a prescindere dalla propria origine, mentre CAV-1 è stata individuata solo sugli esosomi di origine tumorale, confermando l'ipotesi di CAV-1 come potenziale *marker*. Gli stessi campioni sono stati quindi testati in ELISA, utilizzando il test sopradescritto (EXOTEST). I risultati ottenuti hanno confermato quanto osservato con le altre metodiche. Nel processo di validazione dell'EXOTEST sono stati analizzati esosomi purificati dal siero di topi xenotrapiantati con linee di melanoma umano. I dati di analisi al FACS e l'EXOTEST eseguiti su questi "plasma-esosomi" hanno confermato la validità di questo test nel caratterizzare e quantificare esosomi umani plasmatici. Questi risultati hanno consentito di formulare l'ipotesi che tale test possa essere in grado di analizzare e quantificare esosomi derivanti da plasma umano di pazienti con tumore. Lo studio è stato condotto utilizzando piccole quantità di plasma derivanti da 90 pazienti con melanoma e da 58 donatori sani. Gli esosomi purificati dai plasmi dopo essere stati analizzati al FACS per l'espressione di Rab5, CD63 e CAV-1, sono stati testati con l'EXOTEST. Gli esosomi plasmatici mostrano livelli significativamente più elevati di CD63 (504 ± 315 O.D.) e Caveolina (619 ± 310 O.D.) nei pazienti con melanoma in confronto ai

donatori sani (rispettivamente 223 ± 125 e 228 ± 102 O.D.). Questi risultati inoltre suggeriscono che il test basato sull'utilizzazione dell'anti-Caveolina come anticorpo rivelatore ha una più alta sensibilità (68%) rispetto a quando si utilizza l'anti-CD63 (43%). Di contro l'analisi di CD63 consente di fare una valutazione quantitativa di tutti gli esosomi circolanti, compresi quelli originati da cellule sane. I risultati più interessanti sono stati ottenuti quando i valori di CD63 e Cav-1 sono stati comparati ai livelli serici di LDH. Nonostante la maggior parte dei pazienti da cui è stato prelevato il plasma fossero stati classificati come di stadio III e IV (86/90) solo 6 di essi mostravano livelli serici di LDH decisamente alti senza apparente correlazione con la stadiazione, mentre i restanti presentavano livelli di LDH estremamente eterogenei e comunque poco al di sopra la media. Di contro, i valori di OD di CAV-1 e CD63 si distribuivano secondo una scala compatibile con una correlazione tra quantità di esosomi (misurata attraverso i valori di CAV-1) e stadiazione del tumore. Ulteriori esperimenti condotti *in vivo* su topi xenotrapiantati con melanomi umani supportano tale ipotesi, poiché i livelli serici di esosomi in questi topi correla con le dimensioni del tumore.

Conclusioni e prospettive future

I nostri risultati suggeriscono che l'EXOTEST può essere usato per la determinazione e la quantificazione degli esosomi circolanti nei pazienti con melanoma. Il test inoltre è versatile, in quanto permette di valutare l'espressione non solo di proteine specifiche del melanoma, ma anche di proteine espresse da tutti gli esosomi circolanti, consentendo quindi un'analisi quantitativa e qualitativa delle popolazioni esosomali. Questa nuova metodica evidenzia come gli esosomi tumorali possano essere considerati biomarcatori e come potenziali strumenti da utilizzare nella prognosi del cancro. Sono in corso esperimenti allo scopo di valutare le potenzialità di questo test nello screening, nella diagnosi e nel follow-up dei pazienti con tumore.

Bibliografia

1. Brochez L, Naeyaert JM. Serological markers for melanoma. *Br J Dermatol* 2000;143:256-68.
2. Thompson JA. The revised American Joint Committee on Cancer staging system for melanoma. *Semin Oncol* 2002;29:361-69.
3. Hauschild A, Gläser R, Christophers E. Quantification of melanoma-associated molecules in plasma/serum of melanoma patients. Recent Results. *Cancer Res* 2001;158:169-77.
4. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002;2:569-79.
5. Van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem* 2006;140:13-21.
6. Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology* 2005;20:22-7.
7. Olver C, Vidal M. Proteomic analysis of secreted exosomes. *Subcell Biochem* 2007;43:99-131.
8. Lamparski HG, Metha-Damani A, Yao JY, Patel S, Hsu DH, *et al.* Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J Immunol Methods* 2002;270:211-26.

9. Wieckowski E, Visus C, Szajnik M, Szczepanski MJ, Storkus WJ, *et al.* Tumor-derived microvesicles promote regulatory T-cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 2009;183:3720-30.
10. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, *et al.* Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654-59.
11. Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, *et al.* Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2005;11:1010-20.
12. Liu C, Yu S, Zinn K, Wang J, Zhang L, *et al.* Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J Immunol* 2006;176:1375-85.
13. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, *et al.* Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 2008;180:7249-58.
14. Czystowska M, Han J, Szczepanski MJ, Szajnik M, Quadrini K, *et al.* IRX-2, a novel immunotherapeutic, protects human T cells from tumor-induced cell death. *Cell Death Differ* 2009;16:708-18.
15. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10:1470-76.
16. Millimaggi D, Mari M, D'Ascenzo S, Carosa E, Jannini EA, *et al.* Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia* 2007;9:349-57.
17. Andre F, Scharzt NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, Pomel C, Lhomme C, Escudier B, Le Chevalier T, Tursz T, Amigorena S, Raposo G, Angevin E, Zitvogel L. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 2002;360(9329):295-305.
18. Chaput N, Scharzt NE, Andre F, Zitvogel L. Exosomes for immunotherapy of cancer. *Adv Exp Med Biol* 2003;532:215-21.
19. 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.