



PROGETTO DI RICERCA di **Darina Očadlíková**

TITOLO DEL PROGETTO: **“Studio dell’interazione tra microambiente immune e cellule leucemiche nello sviluppo della AML e nella risposta alla chemioterapia”**



La Dottorssa **Darina Očadlíková** (seconda a sinistra, nella foto) insieme al Team del Laboratorio di Terapia Cellulare dell'Istituto di Ematologia “L. e A. Seràgnoli”.

Analisi di contesto

La **Ricerca Ematologica** è stata per molto tempo focalizzata quasi esclusivamente sull'identificazione di **mutazioni genetiche** specifiche in grado di trasformare le cellule staminali emopoietiche, che danno origine a tutte le cellule del sangue, in cellule leucemiche. Tuttavia, negli ultimi anni, sta emergendo con sempre maggiore chiarezza, che altri elementi appartenenti al microambiente immunologico che circonda le cellule leucemiche, contribuiscono all'insorgenza e all'evoluzione della leucemia. In particolare, il **microambiente immunologico** della leucemia acuta mieloide (**LAM**), è tipicamente 'soppressivo', cioè tende ad inibire la risposta immunitaria che dovrebbe contribuire ad eliminare le cellule leucemiche. Tra gli elementi che compongono il microambiente immunologico appartengono soprattutto le cellule T regolatorie (Tregs) che ricoprono un ruolo chiave nel mantenimento della leucemia, sia perché favoriscono la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule leucemiche, sia perché interagiscono con le cellule effettrici del sistema immunitario come le cellule T citotossiche (CTLs), le cellule dendritiche (DCs) e le cellule NK inibendo la risposta immune contro le cellule leucemiche.

Lo studio del ruolo delle DCs e Tregs nella regolazione del microambiente leucemico e della sopravvivenza e resistenza alla chemioterapia delle cellule leucemiche, rappresenta uno dei filoni di Ricerca più promettenti e più seguiti degli ultimi anni nel campo delle malattie ematologiche.

Nel nostro laboratorio studiamo come l'interazione tra le cellule leucemiche e il microambiente immunologico ne modifichi reciprocamente le caratteristiche biologiche e la funzione durante la chemioterapia e quali effetti possano produrre sullo sviluppo della AML e sulla risposta alla chemioterapia.

Ipotesi e scopo del progetto

L'ipotesi generale alla base del progetto, che è stato al centro della nostra attività negli ultimi anni, e che pensiamo di sviluppare in futuro, è che le cellule leucemiche trattate con la chemioterapia rilasciano dei fattori (in particolare l'ATP) in grado di reagire con le DCs inducendone sia l'attivazione che la loro conversione nelle DCs tollerogeniche. Recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha scoperto che la stessa molecola di ATP rilasciata dalle cellule leucemiche trattate con la chemioterapia è in grado di causare sia la maturazione delle DCs e successiva produzione di IL-1beta che stimola le cellule T effettrici, sia l'induzione dell'enzima indoleammina-2,3-diossigenasi 1 (IDO1) nelle DCs, responsabile dell'induzione dei Tregs e di conseguenza di un microambiente tollerogenico. In questo progetto vogliamo approfondire i meccanismi tollerogenici indotti durante la chemioterapia nella LAM che potrebbero essere coinvolti nella resistenza alla chemioterapia.

Risultati ottenuti:

1. Nei pazienti con LAM trattati con la chemioterapia composta da Daunorubicina (DNR) e Citarabina (Ara-C) è stato rivelato un aumento dei Tregs con il fenotipo soppressorio.

Analizzando campioni di cellule isolate da pazienti AML trattati con la DNR e Ara-C, abbiamo rilevato i numeri più alti dei CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs. Dopo una caratterizzazione più dettagliata dei Tregs abbiamo trovato un aumento significativo della sottopopolazione soppressoria definita come CD4⁺CD25⁺CD127⁻Foxp3⁺ Tregs ed esprime le molecole dette "immune check points" CTLA-4, CD39 e PD-1. In particolare, l'espressione di PD-1 identifica una popolazione altamente soppressoria con un ruolo cruciale nell'ambito tumorale. Questi dati ottenuti *ex vivo* sono stati confermati anche negli esperimenti *in vitro* e ci hanno spinto a determinare il ruolo della chemioterapia nell'induzione del microambiente soppressorio nella LAM.

2. Negli esperimenti *in vitro* e *in vivo* è stato dimostrato che il rilascio di ATP dalle cellule leucemiche trattate con la chemioterapia è correlato con la generazione dei Tregs e con un up-regolazione di IDO1 nelle DCs.

L'ATP è noto come uno stimolo fondamentale per l'attivazione e la funzione delle DCs. Negli esperimenti *in vitro* e *in vivo* è stato osservato un rilascio significativo dell'ATP da parte delle cellule LAM dopo il trattamento con la chemioterapia. Il nostro gruppo di ricerca ha confermato i dati noti dalla letteratura, che ATP induce la maturazione delle DCs e l'attivazione dell'inflammasoma. Successivamente però abbiamo dimostrato che le DCs trattate con ATP inducono una popolazione funzionale di CD4⁺CD25⁺CD127^{-/dim} Tregs. Esistono vari meccanismi dell'induzione dei Tregs attraverso le DCs, il più noto è l'up-regolazione di IDO1 nelle DCs. Per questo motivo abbiamo studiato un possibile coinvolgimento di ATP nell'up-regolazione di IDO1 durante la chemioterapia e abbiamo dimostrato che l'ATP up-regola l'espressione di IDO1 nelle DCs insieme alla loro maturazione sia *in vitro* che *in vivo*. Infine, l'inibizione di IDO1 ha ridotto significativamente l'induzione dei Tregs attraverso le DCs dimostrando che la chemioterapia induce le DCs tollerogeniche esprimenti IDO1 che portano all'induzione dei Tregs, rendendo così il microambiente leucemico soppressorio.

3. Durante la chemioterapia viene indotto il pathway catabolico di ATP nelle DCs attraverso la modulazione dell'espressione delle ectonucleotidasi CD39 e CD73.

Dopo aver indagato nelle DCs gli effetti di ATP sulla maturazione e sugli effetti intracellulari per quanto concerne l'espressione di IDO1, è stato ulteriormente approfondito il fenotipo tollerogenico di queste cellule. L'ATP extracellulare viene metabolizzato da due ectonucleotidasi, CD39 che lo converte in AMP, e da CD73 che converte AMP in adenosina. L'adenosina extracellulare è nota per

esercitare un ruolo immunosoppressorio all'interno del microambiente tumorale. A fronte di queste informazioni è stata analizzata la presenza delle due ectonucleotidasi sulle DCs in presenza di ATP. Abbiamo dimostrato che il trattamento chemioterapico induce l'espressione delle ectonucleotidasi CD73 e CD39, che vengono espresse sulla superficie delle DCs ed hanno la funzione di generare gradienti di concentrazione di ATP attorno alle cellule tumorali. In particolare, CD39 catalizza la degradazione di ATP in AMP e CD73 converte ulteriormente AMP in adenosina.

4. Il fenotipo dei Tregs viene stabilizzato attraverso l'espressione dei "fitness marker" mediante le DCs esprimenti CD39 e CD73 negli esperimenti *in vitro* e *in vivo*.

Complessivamente i nostri dati dimostrano come la chemioterapia in modelli murini di LAM e nel modello umano *in vitro* induca nel microambiente leucemico l'espansione e la stabilizzazione di Tregs "more fit" dal fenotipo estremamente immunosoppressorio, caratterizzato dalla presenza di "immune check points" come PD-1. I dati suggeriscono come questa stabilizzazione possa essere mediata dall'ATP rilasciato dalle cellule morenti trattate con chemioterapia; infatti, in questi esperimenti è stato evidenziato come Ara-C induca nei Tregs "more fit" un'up-regolazione di CD39 e CD73, il che è coerente con l'ipotesi secondo cui l'ATP rilasciato possa stimolare l'espressione delle due ectonucleotidasi per produrre infine adenosina. Tale meccanismo che è stato osservato anche nelle DCs.

Sviluppo del progetto

Questo progetto si è dimostrato molto promettente ed avrà uno sviluppo futuro molto ampio nei prossimi **tre anni**.

► Nel **primo anno**, a completamento dei risultati ottenuti fino a questo momento, ci proponiamo di portare avanti i seguenti esperimenti:

1. Nel **modello murino** che abbiamo messo a punto, in collaborazione con l'Istituto Tumori di Milano, verrà valutato l'effetto della chemioterapia sulle cellule del microambiente leucemico, in particolare sulle DCs e linfociti T (Tregs compresi) nei topi knock out (KO) per il recettore P2X7, che è il recettore del ATP nelle DCs.
2. Negli **esperimenti *in vitro*** con le cellule dei donatori sani viene studiato il ruolo dei recettori purinergici (in particolare P2X7 e P2Y11) nell'induzione dei meccanismi tolerogenici nelle DCs come l'espressione di IDO1 e delle ectonucleotidasi CD39 e CD73 durante la chemioterapia. A questo scopo verranno utilizzati degli inibitori specifici di questi recettori: anti-P2X7 e anti-P2Y11.

► Nel corso del **secondo** anno pensiamo di sviluppare il progetto seguendo due modelli di Ricerca per approfondire il ruolo del microambiente immune nello sviluppo della AML e nella risposta alla chemioterapia:

1. **Modello murino *in vivo***

Attraverso il modello murino verranno studiati i Tregs e la loro funzionalità nel microambiente leucemico dei topi trattati con la chemioterapia. In particolare, verrà studiato il fenotipo dettagliato dei Tregs indotti dalla chemioterapia con il focus sulla loro capacità di secernere ed esprimere l'IL-10 (citochina notoriamente tollerogena) in combinazione con l'espressione degli "immune check points" come PD-1, OX-40, ICOS ed ectonucleotidasi CD39 e CD73. Viene quindi identificata una sottopopolazione specifica, fortemente tollerogena e responsabile del microambiente soppressorio. Inoltre, i Tregs verranno isolati e testati *ex vivo* per la capacità di inibire la proliferazione dei linfociti T effettori. Per questi esperimenti verranno utilizzati sia i topi wild type (WT) che i topi P2X7 KO.

2. **Modello umano *in vitro***

A fronte dei risultati ottenuti in merito alle ectonucleotidasi, sarà indagato se le suddette DCs esprimenti CD39 e CD73 fossero in grado di produrre adenosina dall'ATP rilasciato dalle cellule leucemiche morenti. La produzione di adenosina da parte delle DCs sarà analizzata a seguito di trattamento con ATP, ma anche a seguito di stimolazione con cellule HL-60 di linea leucemica note per produrre ATP a seguito di trattamento con due agenti chemioterapici, DNR e Ara-C.

L'adenosina extracellulare è nota per esercitare un ruolo immunosoppressorio all'interno del microambiente tumorale, tanto da essere stata definita negli ultimi anni come "mediatore dei checkpoint immunologici". A fronte di queste informazioni sarà analizzata la presenza delle due ectonucleotidasi sulle DCs in presenza di ATP, in seguito a trattamento con inibitori anti-P2X7 e anti-P2Y11. In seguito, sarà analizzata la presenza di adenosina nei surnatanti delle coculture (DCs+cellule T). Successivamente sarà testata la stabilizzazione del fenotipo dei Tregs in presenza dell'inibitore del recettore per l'adenosina (A2A) presente sui Tregs.

► Nel corso del **terzo** anno continuiamo a sviluppare il progetto seguendo i due modelli dell'anno precedente (murino e umano) per approfondire il ruolo del microambiente leucemico dopo la chemioterapia:

1. **Modello murino *in vivo***

Nel modello murino verrà studiato il ruolo di IDO1 nell'induzione della popolazione dei Tregs particolarmente soppressoria. Per questo scopo verrà utilizzato l'inibitore di IDO1 e verranno valutati i Tregs al citofluorimetro. Un altro tipo di inibitore verrà utilizzato sia separatamente che insieme

all'inibitore dell'IDO1, un bloccante di CD73. La loro combinazione potrebbe contrastare in maniera completa l'induzione della popolazione altamente soppressoria dei Tregs durante la chemioterapia.

2. Modello umano *in vitro*

Nel modello umano *in vitro* verranno studiati i meccanismi intracellulari di regolazione dell'espressione di IDO1 nelle DCs a seguito di stimolo con ATP. La regolazione dell'espressione di IDO1 nelle DCs può essere stimolata da IFN- γ ed è legata all'attivazione del non canonical Nf-kB pathway; è stato osservato inoltre come questo pathway possa essere indotto anche da TGF- β , il quale promuove l'espressione di IDO1 con funzione di signaling e una risposta tollerogena di lunga durata. A fronte di questi dati noti dalla letteratura ci siamo dunque domandati se l'induzione di IDO1 attraverso ATP segua lo stesso pathway. Ne sarà quindi analizzata l'attivazione, in presenza di ATP e con gli inibitori anti-P2X7 e anti-P2Y11. Inoltre, sarà valutato un possibile coinvolgimento dell'inflammasoma nella regolazione dell'espressione di IDO1.

Risultati attesi

Ci aspettiamo di dimostrare che l'ATP rilasciato dalle cellule leucemiche trattate con la chemioterapia, oltre ad attivare meccanismi infiammatori ben noti, sia anche in grado di generare due meccanismi di tipo regolatorio che portano all'espansione di una popolazione di Tregs estremamente soppressoria. Questi due meccanismi sono l'up-regolazione di IDO1 e l'induzione del *machinery* del catabolismo di ATP, che porta alla produzione di adenosina, composto dalle ectonucleotidasi CD39 e CD73 nelle DCs. Successivamente vogliamo dimostrare che questi meccanismi contribuiscono all'induzione dei Tregs sia *in vivo* che *in vitro*, i quali giocano a loro volta un fondamentale ruolo immunosoppressorio. Ci aspettiamo inoltre di determinare *in vitro* il ruolo dei recettori purinergici P2X7 e P2Y11 nell'induzione di questi meccanismi tollerogenici nelle DCs e di identificare il pathway intracellulare responsabile dell'induzione dell'espressione di IDO1 durante la chemioterapia. In fine ci aspettiamo di dimostrare attraverso l'utilizzo dell'inibitore di IDO1 il suo fondamentale ruolo nel microambiente tollerogenico leucemico. In ottica traslazionale, per ottimizzare l'efficacia della chemioterapia bisogna conoscere e contrastare i meccanismi tollerogenici con i farmaci che possono essere combinati con la chemioterapia.