

Ogni mio piccolo traguardo è dedicato a te nonno,
che possa renderti orgoglioso sempre.



**Università degli Studi di Genova
Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali**

**Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Sanitaria
Anno 2020/2021**

**“Approcci immunoterapeutici basati sull’utilizzo delle cellule NK:
Il ruolo degli inibitori dei checkpoint immunitari nel trattamento
del carcinoma ovarico.”**

Relatrici: Prof.ssa Emanuela Marcenaro

Candidata: Valentina Aragona

Prof.ssa Simona Candiani

Co-relatrice: Prof.ssa Sara Ferrando

Indice

1. I Linfociti Natural Killer	5
1.1 Cosa sono le cellule NK?	5
1.2 Recettori delle cellule NK	6
1.3 Le sottopopolazioni di cellule NK	13
1.4 Checkpoint immunitari delle cellule NK	16
2. Introduzione allo studio	17
2.1 Caratteristiche immunologiche del carcinoma ovarico.....	17
2.2. Le cellule NK nel carcinoma ovarico	18
2.3. Scopo dello studio	19
3. Materiali e metodi	20
3.1 Pazienti	20
3.2 Dichiarazioni etiche	20
3.3 Isolamento e coltura di leucociti umani	20
3.4 Analisi di citometria a flusso e anticorpi monoclonali.....	20
3.5 Linee cellulari e saggi funzionali	21
3.6 Strategie di gate.....	21
3.7 Analisi CFSE.....	21
3.8 Immunoistochimica	22
3.9 Analisi statistica	22
4. Risultati	23
4.1 Le cellule NK PD-1+ sono presenti in elevata quantità nel liquido peritoneale/ascitico (PF) e nel sangue periferico (PB) di pazienti con carcinoma ovarico (OC).....	23
4.2 Le cellule PF-NK di pazienti con carcinoma ovarico esprimono molteplici checkpoint inibitori (CI)	24
4.3 Le cellule PF-NK PD-1+ sono caratterizzate da un fenotipo immaturo	25
4.4 Analisi di marker aggiuntivi su cellule NK PD-1+ derivate da pazienti con OC.....	26
4.5 Le cellule di OC esprimono ligandi per gli IC delle cellule NK.....	26
4.6 Analisi funzionali delle cellule NK PD-1+	27
4.7 PD-1 è espresso su cellule NK infiltranti sia il tumore primario sia il tumore metastatico, dove la sua espressione è ancora più evidente.....	28
5. Discussione	29
6. Figure	33
7. Esperimenti pilota per lo xenotrapianto di cellule tumorali in zebrafish	43
8. Referenze	45

1. I Linfociti Natural Killer

1.1 Cosa sono le cellule NK?

Dalla loro identificazione nel 1975, le cellule Natural Killer (NK) sono state classificate come linfociti sulla base della loro morfologia, dell'espressione di marker linfoidi e dall'origine da un progenitore comune linfoide nel midollo osseo (Vivier E. et al, Science 2011).

Tuttavia, le NK sono considerate componenti dell'immunità innata, in quanto mancano di recettori di superficie specifici per l'antigene e, di conseguenza, esplicano la loro attività citotossica indipendentemente da stimolazione e attivazione antigenica. Recentemente le cellule NK sono state incluse nella famiglia delle cellule linfoidi innate (ILC) e, in particolare, fanno parte dell'ILC di tipo 1 per la loro capacità di produrre citochine di tipo 1: interferone- γ (IFN- γ), fattore di necrosi- tumorale- α (TNF- α) e fattore stimolante le colonie granulociti-macrofagi (GM-CSF). In questo sottogruppo, si distinguono per la loro attività citotossica, quindi sono dette ILC1 citotossiche (André P et al., Cell. 2018 ; Di Vito C. et al, Semin Immunol. 2019).

In condizioni normali, le NK sono localizzate preferenzialmente a livello di sangue periferico, midollo osseo, milza e fegato, da cui, durante i processi infiammatori, migrano per arrivare al tessuto danneggiato.

In particolare, si sono dimostrate essere molto attive ed efficaci nel controllo precoce di infezioni virali, causate ad esempio da Herpesvirus, e nell'immuno-sorveglianza nei confronti dei tumori. Le cellule NK presentano una duplice azione nell'immunità innata: in prima battuta, agiscono come cellule effettrici citolitiche nei confronti delle cellule bersaglio rilasciando perforine e granzimi, sia attraverso meccanismi di attività citotossica diretta, sia attraverso attività citotossica dipendente da anticorpi (ADCC), mediata dal legame tra il recettore CD16, espresso dalla maggior parte delle cellule NK, e la porzione Fc di un anticorpo, che a sua volta è legato a cellule bersaglio (Di Vito C. et al, Semin Immunol. 2019).

Inoltre, le cellule NK svolgono funzioni regolatorie, rilasciando citochine, fattori di crescita e chemochine. In questo modo modulano e regolano l'azione di altre cellule del sistema immunitario innato, quali cellule dendritiche, macrofagi, granulociti e influenzano la risposta antigene-specifica dei linfociti T e B (Moretta A. et al. Trends Immunol. 2005).

1.2 Recettori delle cellule NK

L'attività citotossica delle cellule NK è regolata da un complesso bilanciamento tra segnali derivati da recettori inibitori e segnali derivati da recettori attivatori, espressi sulla loro superficie. In condizioni normali, i principali recettori inibitori (iNKR) riconoscono molecole del complesso maggiore di istocompatibilità MHC di classe I (antigene leucocitario umano HLA, nell'uomo) bloccando l'azione litica delle NK e prevenendo così reazioni autoimmuni. In questo modo le NK esplicano la loro attività citotossica solo su cellule che hanno perso o esprimono quantità insufficienti di molecole HLA I, evento frequente a seguito di trasformazione tumorale o infezione virale (al fine di eludere l'immunosorveglianza mediata dalle cellule T), e/o su cellule che overesprimono ligandi per recettori attivatori (Di Vito C. et al, Semin Immunol. 2019; Moretta L. et al, 2002). In condizioni patologiche, quindi, i recettori inibitori non legano i propri ligandi e quindi non possono funzionare, permettendo il funzionamento di una pletera di recettori attivatori (aNKR), che riconoscono specifici ligandi sulle cellule trasformate o infettate, causandone la lisi (**Figura A**) (Moretta A. et al, Immunol 2001).

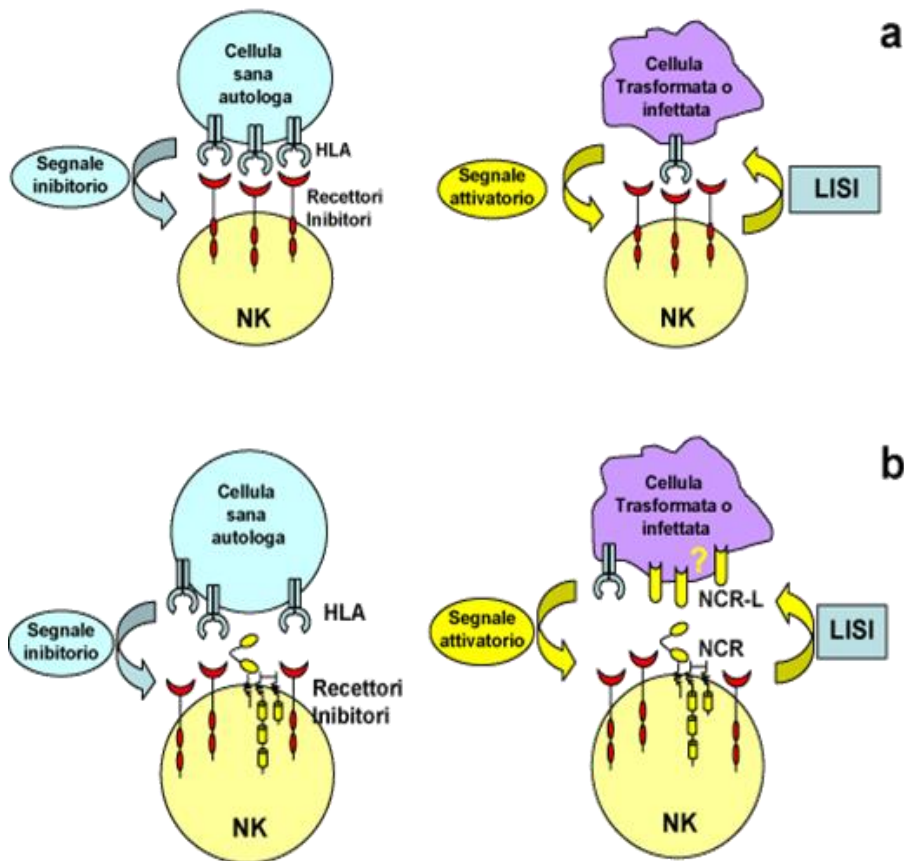


Figura A. Rappresentazione schematica del meccanismo di attivazione delle NK in seguito a riconoscimento del bersaglio cellulare.

I recettori inibitori

- **Recettori inibitori HLA-I specifici**

I principali recettori inibitori NK comprendono recettori HLA specifici di classe I: i Killer Ig-like Receptors (KIR, CD158), che riconoscono molecole HLA di classe I classiche (HLA-A, -B, -C), l'eterodimero CD94/NKG2A riconosce molecole HLA di classe I non classiche HLA-E, mentre LILRB-1 (recettore leucocitario immunoglobulina-simile-1) riconosce molecole HLA di classe I classiche e non classiche (Ljunggren H. G., Kärre K., Immunol. 1990; Cosman D. et al, Immunity 1997).

Lo studio della specificità di riconoscimento dei recettori inibitori ha mostrato che i KIR sono specifici per determinanti allotipici, comuni a differenti alleli dell'HLA di classe I (denominati "KIR ligands"). I KIR riconoscono gruppi di alleli dell'HLA di classe I che sono individuati in base ai residui amminoacidici presenti nella porzione carbossi-terminale della catena α dell'MHC di classe I. In particolare, il recettore KIR2DL2/3 riconosce un gruppo di alleli dell'HLA-C, detto gruppo C1, caratterizzato da un'asparagina (Asn) in posizione 80, mentre il recettore KIR2DL1 riconosce un gruppo di alleli dell'HLA-C, detto gruppo C2, caratterizzato da una lisina (Lys) in posizione 80. Il recettore KIR3DL1 riconosce, invece alleli dell'HLA-A e dell'HLA-B appartenenti alla specificità supertipica Bw4 (HLA-Bw4, o gruppo Bw4), mentre il recettore KIR3DL2 riconosce alcuni alleli dello HLA-A tra cui A3 e A11 (Moretta A et al., Exp Med 1990; Moretta A et al., Immunol 1996; Moretta L et al., Immunol 2000). L'eterodimero CD94/NKG2A, come già detto, riconosce HLA-E, una molecola di classe I non classica. In particolare, HLA-E è una molecola di classe Ib capace di legare i peptidi "leader" derivati dalla maggior parte delle molecole di HLA di classe I. La specificità di questo recettore è più ampia di quella dei KIR, dal momento che tutte le cellule possono esprimere HLA-E (Braud VM et al., Nature 1998).

La trasduzione del segnale inibitorio all'interno delle cellule NK da parte di tutti questi recettori avviene grazie alla presenza di uno o più motivi ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) a livello della coda citoplasmatica (Bolland et al., 1999). In seguito al riconoscimento specifico del ligando, i motivi citoplasmatici ITIM dei KIR e di CD94/NKG2A vengono fosforilati ad opera della chinasi p56^{lck} (Bottino et al., 1994) e diventano capaci di reclutare le fosfatasi SHP-1 e SHP-2 (*Src Homology 2-containing Phosphatases*), essenziali per la trasduzione del segnale inibitorio (Burshtyn et al., 1996; Campbell et al., 1996).

L'inibizione della funzionalità NK prevede, inoltre, come condizione essenziale, l'associazione dei recettori inibitori con quelli attivatori, al fine di consentire alle fosfatasi SHP, portate in stretta prossimità dei recettori attivatori, di interrompere la cascata di segnali generata da questi ultimi. In condizioni fisiologiche, quindi, il segnale inibitorio prevale sul segnale attivatorio.

In condizioni patologiche, generalmente funzionano i segnali attivatori, in quanto la maggior parte delle cellule trasformate perde i ligandi dei recettori inibitori NK (molecole HLA-I) per sfuggire al controllo dei linfociti T citotossici e questo porta al funzionamento dei recettori attivatori. Tuttavia, può succedere che le cellule tumorali mantengano l'espressione delle molecole HLA-I in superficie, diventando così resistenti alla lisi NK-mediata. In questo caso, i recettori inibitori NK HLA-I specifici si comporteranno come dei veri e propri checkpoint inibitori, generando un segnale inibitorio che bloccherà il funzionamento delle cellule NK contro il tumore. Di questo parleremo meglio più avanti.

- **Recettore PD-1**

Il gene della morte programmata 1 (PD-1; CD279) appartiene alla super famiglia del gene delle immunoglobuline e codifica per una proteina transmembrana di tipo I di 55 kDa (Agata, Y. et al., Immunol. 1996; Vivier E. & Daëron M. I, Immunology Today 1997). La struttura della proteina include un dominio IgV extracellulare, seguito da una regione transmembrana e una coda citoplasmatica. La coda intracellulare contiene 2 siti di fosforilazione, uno situato in un motivo inibitorio e l'altro in un motivo di commutazione, localizzati sulla tirosina del recettore.

Il recettore PD-1 è uno dei checkpoint inibitori più conosciuti ed è stato originariamente identificato sui linfociti T CD8⁺. Come tutti i checkpoint inibitori, PD-1 è coinvolto nella tolleranza periferica a causa della sua capacità modulare l'ampiezza e la durata delle risposte immunitarie, prevenendo reazioni autoimmuni e danni collaterali ai tessuti (Keir M. E. et al., Immunology 2008).

Tuttavia, in contrasto con questo importante ruolo benefico nel mantenimento della tolleranza periferica e dell'omeostasi dei linfociti T, l'interazione di PD-1 con i ligandi PD-1 (PD-L1 [CD274] e PD-L2 [CD273]) espressi su cellule infettate da tumore e / o virus, inibisce la funzione dei linfociti T, contribuendo ai meccanismi di *escape* immunitario, che si verificano frequentemente in pazienti con cancro e infezioni virali croniche (Watanabe T., et al., Journal of Viral Hepatitis 2010). In particolare, nei linfociti T attivati l'interazione tra PD-1 e i suoi ligandi espressi sulle cellule tumorali impedisce l'espansione e la funzione delle cellule T effettrici (portando alla generazione di cellule T "esauste"), con conseguente grave compromissione delle risposte dei linfociti T antitumorali e antivirali (Gajewski L. et al., Blood 2009; Day C. L. et al., Nature 2006; Tabora N. A. et al., 2015).

Successivamente è stato dimostrato che PD-1 è espresso anche da una sottopopolazione di cellule NK rilevabile nel sangue periferico di circa un quarto dei soggetti sani, che sono omogeneamente sieropositivi per Citomegalovirus umano (HCMV) (Pesce S. et al., JACI, 2016; Beldi-Ferchiou A. et al., Oncotarget, 2016). Questa sottopopolazione di cellule NK PD-1⁺ è composta principalmente da cellule NK terminalmente differenziate, caratterizzate da un fenotipo di superficie CD56^{dim} CD16^{bright} KIR⁺LILRB-1⁺ NKG2A⁻ NCR^{dim}CD57⁺. Questo fenotipo correla con una ridotta attività citotossica nei confronti di cellule tumorali esprimenti i ligandi per PD-1 (PD-L1/L2) (Pesce S et al., JACI 2017).

Percentuali più elevate di cellule NK PD-1⁺ CD56^{dim} possono essere rilevate in pazienti affette da diversi tumori, tra cui il sarcoma di Kaposi (Wang P. et al., Immunol 1996), la carcinomatosi peritoneale (PC) (Anderson A. C. et al., Immunity 2016) e il carcinoma ovarico (OC) (Beldi-Ferchiou, A. et al., Oncotarget 2016; Vari F. et al., Blood 2018; Niu C. et al., IJMS 2020). Inoltre, le cellule PD1 + NK sono state trovate anche nel linfoma di Hodgkin (HL), ma la sua espressione sembra principalmente limitata al sottogruppo CD56^{bright}.

È stato riscontrato che l'espressione di PD-1 sulle cellule NK abbia un possibile ruolo prognostico sfavorevole, essendo particolarmente aumentata nei pazienti con carcinosi peritoneale di alto grado (Pesce S et al., Front Immunol 2019). Poiché la dimensione del sottoinsieme NK PD-1⁺ è arricchita nel microambiente tumorale, rispetto al sangue periferico dello stesso paziente, è concepibile che fattori solubili e /o cellule nel microambiente tumorale possano indurre l'espressione di PD-1. Più di recente, altri studi hanno confermato il ruolo chiave per HCMV nell'induzione del sottoinsieme NK PD-1⁺ (Quatrini L. et al., Nat. Immunol. 2018; Pesce S. et al. JACI, 2017).

L'attività anti-tumorale di linfociti T e di cellule NK può essere parzialmente ripristinata bloccando le interazioni tra PD-1 e i suoi ligandi tramite l'uso di specifici anticorpi monoclonali. In questo contesto,

diversi mAb diretti contro PD-1 o PD-L1 sono stati approvati per il trattamento di differenti tumori in monoterapia o in comboterapia: nivolumab (anti-PD-1), pembrolizumab (anti-PD-1), atezolizumab (anti-PD-L1), durvalumab (anti-PD-L1) e avelumab (anti-PD-L1) (Ribas A. et al., Science 2018). Questi approcci terapeutici sono in grado di ripristinare le funzioni effettrici delle cellule immunitarie all'interno del microambiente tumorale di diversi tipi di tumori la cui prognosi fino a poco tempo fa era considerata infausta, tra cui melanoma e carcinoma polmonare (Sakuishi K. et al., Exp. Med 2010; Wolchok J. D. et al., Med 2013; Ribas, A et al., Med. 2012).

- **Altri recettori inibitori non HLA-I specifici**

Oltre a KIR, NKG2A e PD-1, altri checkpoint inibitori possono essere espressi sulle cellule NK, ad esempio, TIGIT, CD96 (TACTILE), LAG-3 e TIM-3.

TIGIT e CD96 sono co-recettori inibitori espressi su cellule T e NK e competono con il recettore attivatorio DNAM-1 per il legame a PVR (CD155) e Nectin-2 (CD112) (Martinet L. et al., Nature Reviews Immunology 2015).

Insieme esercitano un controllo sinergico delle funzioni effettrici delle cellule NK. Infatti, a seguito dell'interazione con i suoi ligandi, TIGIT modula la citotossicità anti-tumorale delle cellule NK, mentre CD96 ostacola la produzione di IFN- γ delle cellule NK, controbilanciando l'attivazione mediata da DNAM-1 (Wang P. et al., Immunol 1996; Anderson A. C. et al., Immunity 2016).

TIM-3 è un checkpoint inibitorio che lega diversi ligandi, tra cui galectina-9 (Gal-9) e fosfatidilserina su cellule apoptotiche. TIM-3 è espresso su cellule immunitarie sia adattive che innate in stato *resting* e la sua espressione è up-regolata in seguito ad attivazione (Di Vito C et al., Semin Immunol. 2019). Livelli aumentati di questo checkpoint inibitorio sono associati ad esaurimento dei linfociti T e disfunzioni delle cellule NK, in particolare quando sia TIM-3 sia PD-1 sono espressi simultaneamente a livelli elevati su queste cellule. E' stato osservato che il blocco di TIM-3 ripristina la funzione effettrice dei linfociti T in modelli preclinici e provoca un aumento della citotossicità dell'NK in pazienti con melanoma avanzato e adenocarcinoma polmonare (Da Silva I. P. et al., Cancer Immunol. 2014).

LAG-3 è una molecola di superficie strutturalmente simile al CD4 ed è espressa su cellule T e NK attivate. I ligandi ad alta affinità per LAG-3 sono molecole MHC-II che sono espresse principalmente dalle cellule presentanti l'antigene ma anche da alcune cellule tumorali. LAG-3 riconosce anche le lectine di tipo C delle cellule endoteliali sinusoidali del fegato e dei linfonodi che sono ampiamente espresse su molti tumori (Baixeras E. et al., Exp. Med 1992; Xu F. et al., Cancer Res 2014). Tuttavia, sebbene il ruolo specifico del LAG-3 sulle cellule NK rimanga completamente da chiarire, questo checkpoint inibitorio è attualmente considerato un buon bersaglio nell'immunoterapia anti-tumorale.

I recettori attivatori

L'assenza o la ridotta espressione di molecole HLA di classe I sulle cellule dell'organismo, come avviene nel caso di numerosi tumori o infezioni virali (Alcami et al., 2000; Algarra et al., 2004; Vivier et al., 2011), e la conseguente mancanza dell'interazione tra i recettori inibitori HLA-specifici e i propri ligandi, determinano il funzionamento di molecole attivatorie espresse dalle cellule NK. Tali molecole, in seguito al riconoscimento di specifici ligandi presenti sulle cellule trasformate o infettate, inducono le NK alla citolisi delle cellule bersaglio attraverso il rilascio di granzimi e perforine (contenuti nei lisosomi secretori) e attraverso l'attivazione del processo apoptotico.

I principali recettori coinvolti nella trasmissione del segnale attivatorio sono tre molecole appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline, denominate *Natural Cytotoxicity Receptor* (NCR): NKp30 (Pende et al., 1999), NKp44 (Vitale et al., 1998), NKp46 (Sivori et al., 1997).

Gli NCR, contrariamente ai KIR e a CD94/NKG2A, sono espressi equamente dalle sottopopolazioni NK CD56^{dim} o CD56^{bright} e la loro distribuzione non è clonale. NKp30 e NKp46 sono presenti sia sulle cellule NK non stimolate (*resting*) sia su quelle attivate, mentre NKp44 è espresso solo in seguito a esposizione ad uno stimolo attivatorio (ad esempio, IL-2) (Moretta L. et al., 2000; Bottino et al., 2000; Moretta A. et al., 2001).

Tutti e tre i recettori sono proteine trans-membrana di tipo I la cui coda citoplasmatica, molto corta, non possiede motivi funzionali capaci di innescare l'attivazione di una cascata di segnali intracellulari.

In particolare, NKp46 è caratterizzato da due domini immunoglobulinici extracellulari di tipo C, una stretta sequenza amminoacidica che connette il dominio extracellulare alla porzione trans-membrana e, infine, una corta coda citoplasmatica. Alla porzione trans-membrana, contenente l'amminoacido arginina, carico positivamente, si associano la catena ζ del CD3 o la catena γ del Fc γ RI, entrambe contenenti numerosi motivi ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motif*) essenziali per consentire a NKp46 la trasduzione del segnale attivatorio all'interno della cellula (Pessino et al., 1998).

La caratterizzazione molecolare di NKp30 ha mostrato un polipeptide costituito da una porzione extracellulare con un dominio immunoglobulinico di tipo V e una regione ricca di amminoacidi idrofobici (potenzialmente coinvolti in interazioni proteina-proteina), seguita, analogamente a quella di NKp46, da una porzione trans-membrana ricca di arginina alla quale si associano la catena ζ del CD3 o la catena γ del Fc γ RI (Pende et al., 1999).

Il terzo recettore attivatorio, NKp44, presenta, invece, una struttura polipeptidica lievemente dissimile da quelle di NKp30 e NKp46. La porzione extracellulare, costituita, come per NKp30, da un dominio immunoglobulinico di tipo V, è seguita da una porzione prossimale alla membrana ricca di prolina, serina e treonina, che fa da ponte tra la zona extracellulare e la porzione trans-membrana. Quest'ultima, si presenta ricca di lisina, un amminoacido coinvolto nell'associazione del recettore a due molecole, KARAP e DAP12, contenenti numerosi motivi ITAM, che abilitano NKp44 alla trasduzione del segnale all'interno della cellula (Vitale et al., 1998; Cantoni et al., 1999).

Analisi fenotipiche e funzionali, volte ad approfondire le conoscenze a riguardo di questi tre recettori attivatori, hanno rivelato che, nonostante la loro espressione sia omogenea all'interno della popolazione NK, la densità superficiale degli NCR varia da individuo a individuo (NCR^{bright} o NCR^{dull}) e correla in modo diretto con la maggiore o minore capacità delle cellule *Natural Killer* di uccidere i diversi bersagli tumorali (**Figura B**). Individui che presentano NK altamente citolitiche esprimono alti livelli di NCR, cioè sono caratterizzati da un fenotipo NCR^{bright}, mentre individui che presentano NK scarsamente citolitiche

mostrano una bassa densità di superficie di NCR e sono quindi caratterizzati da un fenotipo NCR^{dull} (Sivori et al., 1999; Pende et al., 1999).

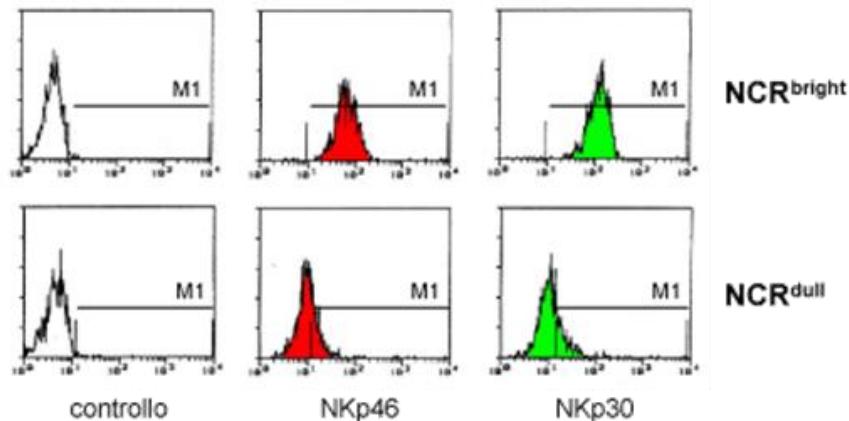


Figura B. Espressione dei recettori attivatori NKp30 e NKp46 su donatori NCR^{bright} e NCR^{dull}.

Cellule NK derivate da due diversi donatori rappresentativi sono state incubate con anticorpi anti-NKp30 (istogramma verde) o anti-NKp46 (istogramma rosso) e poi analizzate al citofluorimetro. Il primo istogramma a sinistra rappresenta il controllo negativo.

Oltre a NKp30, NKp44 e NKp46, le cellule NK possiedono un altro importante recettore attivatorio, espresso anche da alcune sottopopolazioni di linfociti T, denominato NKG2D (Bauer S. et al., Science, 1999).

Questa molecola appartiene alla famiglia delle lectine ed è in grado di complementare il ruolo degli NCR nella lisi delle cellule tumorali. In particolare, la funzionalità di NKG2D può essere apprezzata in cloni NK che, a dispetto del loro fenotipo NCR^{dull}, proprio grazie alla presenza di NKG2D, sono capaci di lisare efficacemente diverse linee tumorali (Pende et al., 2001). NKG2D è espresso in membrana sottoforma di omodimero e, come gli NCR, possiede una corta coda citoplasmatica che non presenta motivi funzionali capaci di trasdurre segnali intracellulari, ma si associa con la molecola segnale DAP10, che, in seguito a fosforilazione tirosinica, recluta la proteina chinasi PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), responsabile della trasduzione del segnale attivatorio (Wu et al., 1999).

Esistono poi una serie di co-recettori attivatori espressi dalle cellule NK, tra cui DNAX Accessory Molecule 1 (DNAM-1) (Shibuya A. et al., Immunity, 1996), 2B4 (Garni-Wagner B. A. et al., J.Immunol. 1993), NTB-A (Moretta A. et al., Annu. Rev. Immunol. 2001; Falco M. et al., Eur. J. Immunol. 2004), NKp80 (Vitale M. et al., Eur. J. Immunol. 2001) e NKG2C, la controparte attivatoria di NKG2A, (Della Chiesa M et al, Front Immunol 2016), che possono svolgere un ruolo importante nell'attivazione delle cellule NK, in quanto sono capaci di potenziare i segnali attivatori derivati dagli NCR.

Generalmente, i recettori attivatori non-HLA-specifici riconoscono come ligandi, molecole overesprese su cellule che abbiano subito modificazioni in seguito a trasforazione tumorale o infezione virale (Biassoni R. et al., Curr Protoc Immunol. 2002).

Nonostante questa serie di recettori NK non-HLA specifici a funzione attivatoria siano principalmente responsabili dell'attività citotossica NK-mediata, un ruolo fondamentale appare ricoperto anche da recettori di tipo KIR con funzione attivatoria. Questi recettori sono altamente omologhi ai KIR inibitori nella porzione extracellulare e comprendono KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS4, KIR2DS5 e KIR3DS1, ma solo per KIR2DS1 e KIR2DS4 è stato possibile identificare la specificità (Moretta A. et al., 1995; Stewart et al.,

2005; Graef et al., 2009; Pesce S, 2015a). In particolare, KIR2DS1 è specifico per alleli del gruppo C2 esattamente come la controparte inibitoria di questo recettore.

1.3 Le sottopopolazioni di cellule NK

All'interno della popolazione linfocitaria umana, le cellule *Natural Killer* si distinguono per l'espressione della molecola CD56 (un'isoforma della molecola di adesione delle cellule neurali dalla funzione ignota) e, contemporaneamente, per la mancanza del CD3 (co-recettore del TCR, caratteristico dei linfociti T) (**Figura C**) (Robertson et al., 1990).

Tuttavia, le cellule NK non costituiscono una popolazione omogenea nel fenotipo e nella funzione. Sono state identificate diverse sottopopolazioni di NK caratterizzate dalla diversa densità superficiale dei due marcatori CD56 e CD16, dall'eterogeneità dei recettori e da capacità funzionali distinte (**Figura D**). Queste caratteristiche distintive sono determinate da una complessa serie di segnali intrinseci (che le indirizzano verso un particolare destino di differenziamento) e da segnali estrinseci tessuto-specifici dettati dal microambiente. È stato dimostrato che le cellule NK CD56^{bright} e CD56^{dim} rappresentino due livelli sequenziali di differenziazione (Romagnani C. et al., Immunol. 2007).

Le cellule CD56^{bright} CD16^{-/low} sono poco rappresentate nel sangue periferico, in cui rappresentano circa il 10% delle NK, ma predominano nei compartimenti linfoidi secondari; sono le più immature, esprimono in maniera omogenea il recettore inibitorio CD94/NKG2A e non esprimono KIRs e LILRB-1. Presentano una ridotta attività citotossica diretta e ADCC, in linea con la mancanza del recettore CD16 e con una bassa espressione di perforine e granzimi, e svolgono prevalentemente funzioni immunoregolatorie: rilasciano elevate quantità di citochine pro-infiammatorie (INF γ e TNF α) e chemochine (Di Vito C. et al., Semin Immunol. 2019).

Le cellule CD56^{dim} CD16⁺ sono più mature, rappresentano la maggior parte della popolazione NK del sangue periferico e sono caratterizzate da un'espressione clonale di diversi membri della famiglia KIRs, dalla capacità di esprimere i recettori LILRB-1 e l'eterodimero CD94 / NKG2A; svolgono funzioni citotossiche nei confronti di cellule alterate, poiché mostrano un alto livello di granuli citotossici contenenti perforine e granzimi (Cooper M. A. et al., Trends in Immunology 2001; Marcenaro E. et al., Transplant Immunology 2006). Le cellule CD56^{dim} possono differenziarsi ulteriormente durante la loro vita, originando cellule terminalmente differenziate, caratterizzate dal fenotipo CD57⁺ KIR⁺ LILRB-1⁺ NKG2A (Sivori S. et al., Front Immunol. 2014; Pesce S. et al., JACI 2017).

Si è osservato che l'infezione da HCMV può indurre un'espansione delle cellule NK terminalmente differenziate, e un'alterazione del loro repertorio di recettori, causando upregolazione del recettore attivatorio NKG2C e una downregolazione del recettore inibitorio Siglec -7 (Pesce S. et al., JACI 2017). Queste NK più mature NKG2C⁺ acquisiscono anche nuove proprietà, quali espansione clonale, persistenza a lungo termine, maggiore efficienza funzionale. Per queste nuove caratteristiche queste NK ricordano le cellule dell'immunità adattativa, motivo per il quale vengono denominate "memory like NK cells" o "adaptive NK cells" (Della Chiesa et al., Front Immunol 2016). È interessante dire che cofattori sconosciuti associati all'infezione da HCMV possono anche indurre l'insorgenza di un sottogruppo di cellule NK terminalmente differenziate e caratterizzate dall'espressione del recettore inibitorio PD-1 e da una ridotta espressione degli NCR. Questo fenotipo corrisponde a una ridotta attività antitumorale delle cellule NK (Pesce S. et al., JACI 2017).

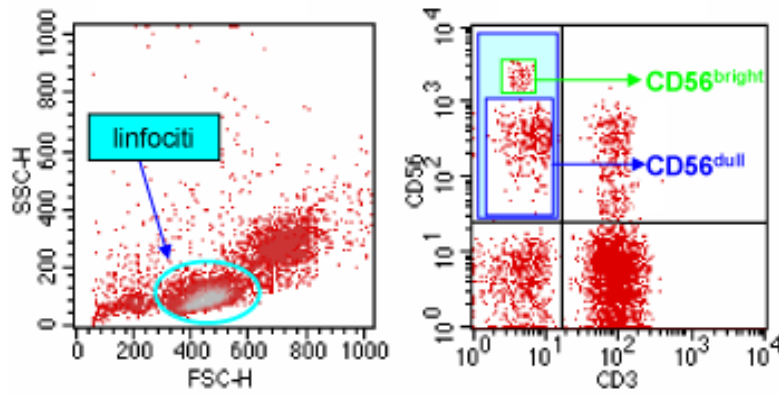


Figura C. Analisi citofluorimetrica delle sottopopolazioni NK $CD56^{bright}$ e $CD56^{dull}$ nel sangue periferico di donatori sani.

All'interno della popolazione linfocitaria (*dot-plot* a sinistra, cerchio azzurro) separata da sangue periferico, è possibile riconoscere le cellule Natural Killer $CD56^+/CD3^-$ (*dot plot* a destra, riquadro pieno azzurro), che si distinguono in una sottopopolazione $CD56^{bright}$, che costituisce circa il 10% delle cellule NK del sangue periferico (*dot plot* a destra, riquadro vuoto verde), e in una sottopopolazione $CD56^{dull}$, che costituisce il restante 90% (*dot plot* a destra, riquadro vuoto blu).

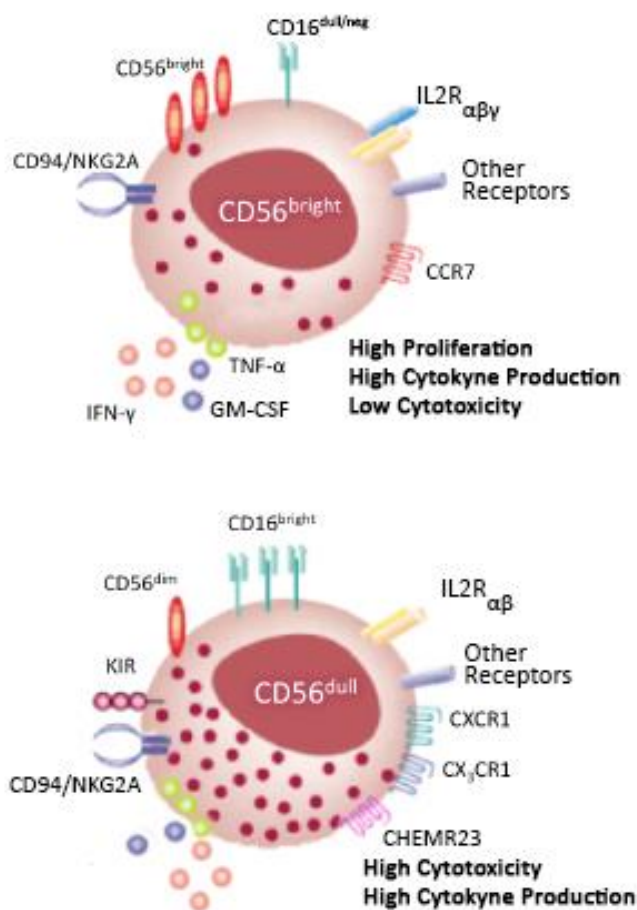


Figura D. Rappresentazione schematica del fenotipo e delle funzioni caratterizzanti i subset NK CD56^{bright} (a) e CD56^{dim} (b).

Le differenze fenotipiche corrispondono a ruoli immunoregolatori ben distinti. Infatti, le NK CD56^{bright} sono in grado di proliferare efficientemente e di secernere alte quantità di citochine, quali IFN- γ , ma sono poco citotossiche, mentre le cellule CD56^{dim}, in particolare le KIR⁺ sono altamente citotossiche nei confronti sia di cellule tumorali o infettate da virus sia di cellule allogeniche, e sono comunque capaci di rilasciare grandi quantità di IFN- γ in risposta a stimoli specifici.

1.4 Checkpoint immunitari delle cellule NK

Evidenze cliniche e sperimentali hanno evidenziato un chiaro ruolo delle cellule NK nel controllo dello sviluppo e nella progressione dei tumori: di solito la loro presenza è correlata a una prognosi migliore e ad un ridotto potenziale metastatico nei tumori umani (López-Soto et al., Cancer Cell 2017). Inoltre, la loro capacità di riconoscere ed eliminare le cellule nascenti trasformate è corroborata dall'osservazione che gli individui con una ridotta attività citotossica naturale hanno un aumentato rischio di insorgenza del cancro (Imai K. et al., Lancet 2000).

In alcuni casi, la capacità anti-tumorale delle cellule immunitarie può essere fortemente compromessa nel microambiente tumorale. Infatti, come conseguenza della continua pressione immunitaria, il fenotipo tumorale subisce continui rimodellamenti ("immuno-editing"), favorendo lo sviluppo di tumori in grado di sfuggire all'attività delle cellule immunitarie. Vi sono diversi meccanismi di *escape* messi in atto dal tumore, come l'alterazione dell'elaborazione e presentazione dell'antigene nel contesto di alleli specifici delle molecole HLA di classe I, l'attivazione delle vie del checkpoint inibitori (CI), attraverso l'espressione di ligandi per questi recettori, e la modulazione dell'espressione dei recettori inibitori e attivatori, che compromettono la funzione effettrice delle cellule NK (Di Vito C. et al., Semin Immunol. 2019).

I checkpoint immunitari si riferiscono a una pletera di recettori inibitori espressi dalle cellule del sistema immunitario che svolgono un ruolo cruciale nel mantenere l'autotolleranza e nel regolare la durata e l'ampiezza delle risposte immunitarie fisiologiche, per ridurre al minimo i danni collaterali ai tessuti. La rottura di questo delicato equilibrio porta a condizioni patologiche, compreso il cancro. In quest'ambito, lo sviluppo di inibitori dei checkpoint immunitari (ICI), anticorpi monoclonali (mAbs) che mirano ai recettori inibitori o ai relativi ligandi espressi sulle cellule tumorali, con lo scopo di ripristinare l'attività citotossica delle cellule immunitarie, ha fornito un'importante svolta nella terapia del cancro. Gli ICI inizialmente sviluppati per invertire l'esaurimento funzionale nelle cellule T, recentemente sono emersi come attori importanti nell'immunoterapia basata su cellule natural killer (NK). Inoltre, la scoperta che anche le altre classi di ILC esprimano checkpoint inibitori, suggerisce che gli ICI potrebbero modulare anche le funzioni delle altre sottopopolazioni di ILC nel microambiente tumorale (Pesce S et al., Cancers 2020).

2. Introduzione allo studio

2.1 Caratteristiche immunologiche del carcinoma ovarico

Il carcinoma ovarico (OC) è ancora oggi l'undicesimo tipo più comune nelle donne, la quinta causa di morte correlata al cancro nelle donne e il più fatale di tutti i tumori riproduttivi femminili (Slatnik C. L. P. & Duff E., *Nurse Pract* 2015). Questo è dovuto al fatto che nella maggior parte dei casi, questo tipo di tumore viene diagnosticato in fase avanzata, a causa della mancanza di sensibilità degli screening di prima fase e a causa di una sintomatologia trascurabile. Sebbene molte pazienti beneficino inizialmente della chirurgia debulking e chemioterapia a base di platino/taxani, nel 90% dei casi si ha sviluppo di recidiva entro pochi anni. Inoltre, il 70% dei pazienti con malattia avanzata soccombe alla recidiva del tumore entro meno di cinque anni (Ahmedin J. et al., *Global cancer statistics*). Questa prognosi infausta è attribuita allo sviluppo di farmaco-resistenza attraverso la selezione di cloni chemioresistenti, diffusione intraperitoneale di cellule tumorali e formazione di lesioni metastatiche e recidiva tumorale.

Quindi, a causa dell'elevata letalità dell'OC e della sua intrinseca resistenza alle terapie tradizionali, sta diventando strettamente necessario identificare nuovi biomarcatori per consentire una diagnosi precoce e specifica e nuovi approcci terapeutici efficienti. In questo contesto può venire in aiuto l'immunoncologia, che nell'ultimo decennio ha rivoluzionato la cura del cancro.

L'OC è caratterizzato da un microambiente tumorale (TME) favorevole, che fornisce percorsi metastatici specifici ed efficaci, altera la sorveglianza immunitaria e media la resistenza alla terapia (Pesce S. *et al.*, *Oncoimmunology* 2015; Greppi, M. *et al.*, *IJMS* 2019). In particolare, negli stadi più avanzati si osserva massiccia produzione di ascite/liquido peritoneale (PF), versamento che si accumula nella cavità peritoneale, che consente la diffusione delle cellule tumorali ad altri organi pelvici e peritoneali, dando origine a lesioni metastatiche. Anche in una fase in cui il tumore primario è ancora confinato all'ovaio, le cellule tumorali possono essere rilevate nel liquido di lavaggio peritoneale (Greppi M. et al., *Int J Mol Sci.* 2019).

L'ascite è ricca di fattori solubili che promuovono il tumore, vescicole extracellulari e cellule tumorali distaccate, nonché un gran numero di cellule immunitarie, come le cellule NK, le cellule T e i macrofagi associati al tumore. Dopo essere state influenzate dal microambiente tumorale, queste cellule non sono in grado di difendere il nostro corpo dai tumori, ma collaborano invece con le cellule ospiti residenti per supportare la progressione del tumore e l'evasione immunitaria. I tumori sviluppano diverse strategie durante la loro evoluzione per sfuggire alla risposta immunitaria: la secrezione di citochine immunosoppressive o fattori inibitori solubili di origine tumorale; l'induzione dell'espressione di recettori inibitori (ad es. checkpoint inibitori); la down-modulazione dei recettori costimolatori sui linfociti infiltrati (Greppi M. et al., *Int J Mol Sci.* 2019; Pesca S. et al., *Oncoimmunol.* 2015; Kulbe H. et al., *Cancer Res.* 2012).

2.2. Le cellule NK nel carcinoma ovarico

Nonostante le cellule NK mostrino una potente attività citolitica contro le cellule tumorali in vitro, questa capacità viene compromessa nel microambiente tumorale (TME). La presenza di IL-18 e TGF β nell'ascite può indurre una forte down-regolazione di CD16 sulle cellule NK, con conseguente diminuzione della citotossicità cellulo-mediata (ADCC) anticorpo-dipendente contro le cellule tumorali autologhe. Inoltre, il TGF β può anche contribuire alla downmodulazione dei recettori attivatori delle cellule NK NKp30 e NKG2D, compromettendo così la citotossicità naturale mediata dalle cellule NK. L'espressione di NKG2D può anche essere compromessa dal fattore inibitorio della migrazione dei macrofagi (MIF), che è un altro fattore solubile rilevabile nell'ascite. Recentemente sono stati descritti ulteriori meccanismi di fuga del tumore, inclusa la capacità delle cellule tumorali di rilasciare forme solubili di ligandi dei recettori attivatori delle cellule NK. L'interazione cronica recettore-ligando può down-modulare l'espressione superficiale dei recettori NK attivatori, influenzando così la capacità delle cellule NK di uccidere le cellule tumorali che esprimono ligandi per quei recettori. In particolare, le cellule di carcinoma ovarico possono rilasciare una forma solubile di B7-H6, il principale ligando di NKp30, portando alla perdita dell'espressione di NKp30 sulle cellule NK nella TME. Un'elevata quantità di B7-H6 solubile è correlata ad una maggiore downmodulazione di NKp30. Queste cellule NK mostrano una ridotta produzione di IFN γ e funzione citolitica alterate, mostrando così una scarsa eliminazione mediata dalle cellule NK delle cellule tumorali ovariche B7-H6⁺ (Greppi M. et al., Int J Mol Sci. 2019).

E' importante dire che è stato dimostrato che le cellule NK dei pazienti con carcinoma ovarico esprimono elevati livelli di PD-1. Questo suggerisce che l'espressione del checkpoint inibitorio PD-1 può essere indotta sulle cellule NK dal microambiente tumorale (Pesce S. et al., JACI 2017; Pesce S. et al., Front Immunol. 2019).

In condizioni normali, i checkpoint immunitari evitano risposte autoimmuni contro i tessuti sani e modulano le risposte immunitarie; di contro, spesso le cellule tumorali esprimono ligandi per questi iNKR, sopprimendo il controllo immunitario. Tra i recettori inibitori implicati nell'*escape* tumorale ritroviamo recettori HLA specifici di classe I, come i membri delle famiglie KIR, LIR-1 e NKG2A, e recettori HLA non specifici, come PD-1. E' stato inoltre dimostrato che il blocco anticorpo-mediato di questi checkpoint inibitori è capace di ristabilire la funzione immunitaria contro le cellule tumorali (Pesce S. et al., JACI 2017; Pesce S. et al., Cancers 2020). Negli ultimi anni, quindi, gli studi sulle terapie contro i tumori si stanno concentrando proprio in questa direzione. Sono stati sviluppati diversi anticorpi monoclonali (mAb), capaci di interagire con iNKR o con i rispettivi ligandi espressi sulle cellule tumorali capaci di bloccare le interazioni inibitorie recettore/ligando.

Si è osservato che la terapia con mAb che bloccano le interazioni PD-1 / PD-L1 ha un impressionante effetto di lunga durata e una minore tossicità almeno in una porzione di pazienti affetti da diversi tipi di tumori umani, incluso il melanoma metastatico, carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), carcinoma a cellule renali (RCC), carcinoma renale, carcinoma della vescica, linfoma di Hodgkin e tumori solidi con elevata instabilità dei microsatelliti o "mismatch repair (MMR)-deficient" (Okazaki T. et al., Nature Immunology 2013; Okazaki T. et al., International Immunology 2007; Baumeister S. H. et al., Immunol. 2016; Schumacher T. N. & Schreiber, Science 2015; Sharma P. & Allison J. P., Science 2015). Tuttavia, sebbene gli anticorpi che bloccano i checkpoint immunitari abbiano mostrato risultati significativi nel mediare la regressione del tumore in diversi tumori solidi, i tassi di risposta nell'OC sono stati modesti. Qual è la causa? Alcuni studi recenti suggeriscono che l'aumento dei livelli di cellule T e NK che infiltrano il tumore si traduce in prognosi favorevole. Tuttavia, dati meccanicistici limitati spiegano

questi risultati. Prove recenti suggeriscono che non è solo la quantità, ma piuttosto la qualità dell'immuno-infiltrato a influenzare il trattamento immunoterapico. A tal proposito, se le cellule T infiltranti sono state analizzate a fondo, il ruolo e le caratteristiche delle cellule NK infiltranti riservano ancora molti aspetti da chiarire, sebbene questi linfociti innati rappresentino una sfida importante su cui scommettere.

2.3. Scopo dello studio

Lo scopo di tale studio è stato quello di approfondire la nostra conoscenza sull'espressione di diversi checkpoint immunitari tra cui KIR, LILRB-1, NKG2A, PD-1 sulle cellule NK, nonché di ulteriori recettori che si sono dimostrati importanti per la regolazione delle risposte di queste cellule (come recettori attivatori) nei pazienti affetti da OC sieroso di alto grado, confrontando cellule NK derivate da diversi distretti tra cui PB, PF, ma anche tessuti tumorali primari e metastatici. Un'analisi dettagliata del pattern dei checkpoint immunitari potrebbe chiarire il significato clinico e il contributo di questi recettori nell'immunoterapia di blocco del checkpoint immunitari e potrebbe aiutare a progettare nuovi approcci immunoterapeutici per i pazienti con OC sieroso di alto grado.

3. Materiali e metodi

3.1 Pazienti

Questo studio ha incluso 60 pazienti con carcinoma ovarico di istotipo sieropapillare, sottoposte a chirurgia primaria prima della chemioterapia. Lo stadio clinico dei pazienti era IIIC, secondo le classificazioni FIGO (International Federation of Gynecologists & Obstetricians).

3.2 Dichiarazioni etiche

Questo studio è stato condotto in accordo con le raccomandazioni degli standard etici del comitato di ricerca istituzionale e/o nazionale. Il protocollo è stato approvato dal comitato etico della Regione Liguria, Genova, Italia (n. 39/2012 per donatori sani e n. 326/2018 per pazienti affetti da OC) e dal comitato etico istituzionale Spedali Civili di Brescia (n. 1892/2010 per pazienti affetti da OC). Tutti i soggetti hanno fornito il consenso informato scritto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki.

3.3 Isolamento e coltura di leucociti umani

Cellule mononucleate sono state ottenute da sangue periferico (PB) eparinizzato di donatori sani e da PB e liquido peritoneale/ascitico (PF) eparinizzato di pazienti con OC mediante centrifugazione in gradiente di densità su Ficoll (Sigma, St Louis, Mo) e quindi risospese in RPMI 1640 integrato con 2 mmol/L di glutammina, 50 µg/mL di penicillina, 50 µg/mL di streptomina e 10% di FCS inattivata al calore (Società Prodotti Antibiotici, Milano, Italia). Dal PF sono state ottenute anche cellule del OC. Per ottenere linfociti e cellule OC dal tumore solido primario o metastatico abbiamo utilizzato il dissociatore gentleMACS Octo.

3.4 Analisi di citometria a flusso e anticorpi monoclonali

Le analisi citofluorimetriche sono state eseguite su un FACSVerse (Becton Dickinson, Mountain View, Calif) e i dati sono stati analizzati con il software FACSuite versione 1.0.3. e con il software di analisi FlowJo, versione 9.4.11 (TreeStar, Ashland, Ore).

Per queste analisi sono stati utilizzati i seguenti mAb isolati nel nostro laboratorio: anti-DNAM-1 (KRA236, IgG1), anti-NKp30 (AZ20, IgG1), anti-NKp44 (Z231, IgG1), anti-NKp46 (VIS83, IgG1) e (BAB281, IgG1; Beckman Coulter/Immunotech, Marsiglia, Francia), anti-NKG2D (BAT221 IgG1), anti-Siglec-7 (QA79, IgG1; R&D Systems, Abingdon, Regno Unito), anti-nectina-2 (L14 IgG2A) e anti-PVR (5A10 IgG1), anti-LIR-1 (F278, IgG1; www.hcdm.org/index.php?option=com_molecole&cdnumber=5CD85J), KIR3DL1/L2-S1 (AZ158, IgG2a; brevetti/WO2010081890A1?cl5en). Sono stati utilizzati anche i seguenti mAb originariamente isolati presso il Laboratoire Immunologie des Tumeurs, CRCM, Marseille-Luminy (Francia): l'anti-PD-1 mAb purificato (clone PD1.3.1.3, IgG2b), l'anti-PD-L1 purificato (PDL1 .3.1 clone, IgG1), l'anti-PD-L2 purificato (clone 326.35, IgG1); mentre l'anti-PD-1-ficoeritrina (PE) o l'anti-PD-1-alloficocianina (APC; clone PD1.3.1.3, IgG2b) è stata acquistata da Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germania). Ulteriori mAb utilizzati in questo studio sono stati i seguenti: anti-KIR3DL1/S1-APC (clone Z27), anti-NKG2A-APC

(clone Z199) e anti-CD56-PC7 (clone N901) sono stati acquistati da BeckmanCoulter/Immunotech; anti-CD16-PerCP-Cy5.5 (clone 3G8), anti-KIR2DL2/L3-S2-FITC (clone CH-L), anti-CD107a-PE (anti-LAMP1) e 7AAD di BD Biosciences PharMingen.; e anti-KIR3DL1-FITC (clone DX9), anti-KIR2DL1-S1 FITC (clone 11PB6), anti-CD3-VioGreen (clone BW264/56), anti-CD19-VioGreen (clone LT19), anti-CD57-VioBlue (TB03 clone) e), anti-NKG2C Vio Bright FITC (clone REA205), anti-CD90, anti-EpCam APCVio770 (clone HEA125), anti-CD90 PeVio770 (clone DG3), anti-CD45 Vioblue (clone 5B1), anti-CD14 (clone TUK4), sono stati acquistati da Miltenyi Biotec; anti-CD69 (clone FN50, IgG1) sono stati acquistati da BioLegend (San Diego), anti-TIM-3 (F38-2E2, IgG1) e anti-LAG-3 (17B4, IgG1) sono acquistati da Novus Biological; l'anti-HLA-E (3D12 IgG1) acquistato da Biolegend (San Diego, California), l'anti-B7-H6 (#8750011 IgG1) e l'anti-TIGIT (#741182, IgG2b) sono acquistati da R&D.

3.5 Linee cellulari e saggi funzionali

In questo studio sono state utilizzate le seguenti cellule bersaglio: la linea cellulare di eritroleucemia umana K562, la linea cellulare ovarica umana OVCAR5 e la linea cellulare di mastocitoma murino FcRγ+P815.

Per il saggio di degranolazione, i linfociti derivati da PB e PF sono stati coltivati O.N. in presenza di basse dosi di rhIL-15 (0,2 ng/mL) e poi co-incubati con cellule bersaglio a un rapporto E/T di 1:2 in un volume finale di 200 µl in piastre a fondo tondo da 96 pozzetti a 37°C e 5% CO₂ per 3 h in terreno di coltura addizionato con mAb anti-CD107a-PE. Le co-culture con linea cellulare FcRγ+P815 sono state eseguite in presenza di mAb anti-CD16 (c127, IgG1; Anticorpi-Online, Aachen, Germania) in combinazione o meno con anti-KIR2DL2/L3 (clone GL183 IgG1), anti-KIR2DL1/S1 (clone 11PB6 IgG1), anti-KIR3DL2 (clone IgG2a AZ158), anti-NKG2A (clone IgG1 Z270) e un anti-PD-1 (clone PD1.3.1.3, IgG2b), come indicato nell'apposita figura (R-ADCC). Le co-culture con la linea cellulare di carcinoma ovarico OVCAR5 sono state eseguite in presenza o assenza di anti-PDL-1/2 (clone PD-L1.3.1, clone IgG1 e 326.35, IgG1), anti-HLA-I (A6/136) , mAbs anti-CD94 (Y9, IgM), anti-KIR2DL1/S1(XA141, IgM) e anti KIR2DL2/L3/S2 (Y249, IgM) come indicato nell'apposita figura (esperimenti di masking). La colorazione superficiale è stata eseguita incubando le cellule con mAbs anti-CD3, anti-CD56, anti-CD19 e anti-CD14, anti-NKG2A, anti-KIR e anti PD-1 per 30 minuti a 4°C. Le cellule sono state lavate e analizzate mediante citoflorimetria a flusso.

3.6 Strategie di gate

Le informazioni sulle strategie di gate sono indicate in ciascuna figura.

3.7 Analisi CFSE

La capacità proliferativa delle popolazioni di cellule PD-1⁺ rispetto alle cellule PD-1⁻NK è stata valutata colorando le cellule NK derivate da HD e pazienti con CFSE prima della stimolazione con rhIL-15 (20ng/ml) e come indicato nella **Fig. 8**.

In **Fig 8**, l'analisi delle cellule NK è stata effettuata su cellule CD56^{dim}NK con gate su cellule NKG2A⁺KIR⁺.

3.8 Immunoistochimica

La colorazione immunoistochimica è stata eseguita su una serie FFPE spessa 2 µm con un sistema di colorazione IHC automatizzato (Ventana BenchMark ULTRA, Ventana Medical Systems, Italia). L'IHC sequenziale è stata eseguita su Ventana BenchMark ULTRA, utilizzando un kit di rilevamento DAB universale ultraView. Il recupero dell'epitopo indotto dal calore è stato eseguito utilizzando il tampone CC1 (standard CC1, Roche Ventana) facendo bollire per 36 minuti per CD3, 64 minuti per RORyt, 8 minuti per NKp46/NCR1, 30 minuti per PD-1. Successivamente, i vetrini sono stati incubati con anticorpi: anticorpo CD3 (clone 2GV6, Ventana, prediluito) per 44 minuti a 37°C; RORyt (clone 6F3.1, Millipore, diluizione 1:20) per 36 minuti a 37°C; PD-1 (clone PD1.3.1.3, IgG2b, diluizione 1:50) per 16 minuti a 37°C, NKp46/NCR1 (195314 R&D Systems numero di catalogo bio-technie MAB1850) per 20 minuti a 37°C, quindi visualizzato con cromogeno DAB. I vetrini interi sono stati digitalizzati manualmente con un ingrandimento 10X utilizzando un Olympus BX60 e il software Microvisioneer Manual WSI.

Per valutare la co-localizzazione di NKp46 e PD-1, sono state utilizzate due sezioni consecutive, una trattata con anticorpo anti-NKp46 e l'altro con anticorpo anti-PD-1. Per mostrare la co-localizzazione, le cellule positive per NKp46 sono state evidenziate digitalmente in rosso e sovrapposte alla sezione con cellule positive per PD-1, utilizzando il software Adobe Photoshop 6.0.

3.9 Analisi statistica

Il t test su campioni indipendenti è stato utilizzato per valutare le variabili quantitative quando vengono confrontati due gruppi e l'ANOVA unidirezionale è stata utilizzata quando sono stati confrontati tre o più gruppi. Il livello di significatività statistica è stato preimpostato a 0,05. La rappresentazione grafica e le analisi statistiche sono state eseguite con GraphPad Prism 8 (Software GraphPad, La Jolla, California).

4. Risultati

4.1 Le cellule NK PD-1+ sono presenti in elevata quantità nel liquido peritoneale/ascitico (PF) e nel sangue periferico (PB) di pazienti con carcinoma ovarico (OC)

Eseguendo analisi citofluorimetriche multiparametriche su cellule NK circolanti (PB) e peri-tumorali (fluido peritoneale-PF) derivate da una coorte ampia e omogenea di pazienti con OC sieropapillare, abbiamo osservato l'accumulo di cellule NK PD-1+ sia nel PB (PB-NK) sia nel PF (PF-NK) di questi pazienti rispetto al PB di donatori sani (HD-NK). L'arricchimento in cellule NK PD-1+ era particolarmente evidente nel PF dove la quasi totalità dei pazienti esprimeva PD-1 su una discreta frazione di cellule NK (**Figura 1, A-C**).

In particolare, un quarto di HD da noi testati aveva una percentuale di cellule NK PD-1+ superiore all'1,5% ($1,54 \pm 3,79$); questa percentuale aumentava nel PB dei pazienti con OC, dove più della metà dei pazienti (51%) aveva una popolazione di cellule NK PD-1+ di almeno la stessa dimensione o di dimensione superiore ($2,77 \pm 3,38$), queste percentuali aumentavano in maniera ancora più significativa nel PF, dove la grande maggioranza dei pazienti (93%) presentava una popolazione di cellule NK PD-1+ di almeno la stessa dimensione o più frequentemente di dimensione superiore ($12,41 \pm 9,93$) (**Figura 1, A-C**). Ciò suggerisce una possibile induzione o accumulo del sottoinsieme PD-1+ NK nel microambiente tumorale (OC-TME) (**Figura 1, A, B**). Come nei donatori sani (Pesce S et al., JACI 2017), PD-1 è espresso esclusivamente dalla popolazione CD56^{dim} (e CD56^{neg} se presente), mentre è costantemente assente sulle cellule NK CD56^{bright} (**Figura 1, C**).

È importante sottolineare che la nostra analisi indica che nelle pazienti con OC, sottoposte a chemioterapia come unico trattamento, è possibile stabilire una correlazione inversa tra l'espressione di PD-1 sulle cellule NK associate al tumore e l'aspettativa di vita. In particolare, alti livelli di PD-1 sulle cellule PF-NK corrispondono a malattia di elevata gravità e prognosi complessivamente più sfavorevole con una sopravvivenza non superiore a un anno (**Figura 1, D**).

4.2 Le cellule PF-NK di pazienti con carcinoma ovarico esprimono molteplici checkpoint inibitori (CI)

Una volta analizzata l'espressione di PD-1 nella nostra coorte di pazienti con OC, abbiamo continuato con l'analisi di altri CI classici e non classici. A questo proposito, confrontando cellule NK di HD, con cellule NK da PB e da PF di pazienti con OC, abbiamo osservato un diverso pattern di espressione del repertorio dei CI delle cellule NK (**Figura 2,A**). In particolare, le cellule PF-NK di pazienti con OC esprimono livelli significativamente ridotti di KIR e LILRB-1 e livelli significativamente aumentati di CD94/NKG2A rispetto al PB autologo e di HD. Abbiamo anche osservato una diminuzione lieve ma significativa nell'espressione di TIM-3 e nessun cambiamento significativo nell'espressione di LAG-3 e TIGIT.

Analizzando la coespressione di PD-1 con gli altri CI, mentre non abbiamo riscontrato alcun trend di coespressione con i CI non classici TIM-3 LAG-3 e TIGIT, abbiamo riscontrato un'inversione significativa del trend di co-spressione di PD-1 con i principali CI-NK: NKG2A, KIR e LILRB-1 sulle cellule NK dei pazienti rispetto a quelle dei donatori sani.

In particolare, mentre in HD PD-1 è sempre coespresso con KIR e/o LILRB-1, ma mai con NKG2A, nei pazienti con OC PD-1 risultava essere coespresso anche con NKG2A e questo era soprattutto evidente nel PF di questi pazienti, dove il subset PD-1+ NKG2A+ era particolarmente abbondante (46,5% di PD-1+ PF-NK).

Questa tendenza era osservabile in tutti i pazienti analizzati, infatti tutti i pazienti presentavano un subset più grande di cellule NK PD-1+ NKG2A+ e un subset più piccolo di cellule NK PD-1+ KIR+ nel PF rispetto al PB autologo (**Figura 3**). In particolare, è interessante notare che mentre la percentuale di NKG2A (area nera) nelle cellule NK PD-1- del sangue periferico di HD e nel sangue periferico e nel PF dei pazienti è pressoché stabile, le cellule NK che coesprimevano PD-1 e NKG2A erano praticamente assenti negli HD, rilevabili nel PB dei pazienti e le più rappresentate nel PF dei pazienti (**Figura 3, C**).

4.3 Le cellule PF-NK PD-1+ sono caratterizzate da un fenotipo immaturo

Quindi, abbiamo caratterizzato meglio la popolazione di cellule NK PD-1+ e abbiamo osservato che questo subset nei pazienti con OC non solo coesprimeva NKG2A oltre ai KIR, ma mostrava una ridotta espressione di CD57, un marker di differenziazione delle cellule NK (**Figura 4, A**, pallini rossi). È importante sottolineare che in queste cellule PD-1+NKG2A+KIR-CD57-NK abbiamo osservato un'aumentata espressione di NCR, principalmente NKp46. Le variazioni nell'espressione di questi recettori erano molto più evidenti nel compartimento PF, dove un'ampia frazione di cellule NK PD-1+ era caratterizzata da una forte up-regolazione di NKG2A e NKp46 e una forte down-regolazione di CD57 (**Figura 4, A,B**). Sfruttando l'espressione di questi marcatori di superficie nell'algoritmo t-SNE siamo stati in grado di distinguere quattro diversi subset di cellule NK PD-1+, due più rappresentati negli HD (cerchio) e due presenti quasi esclusivamente nelle cellule NK di pazienti con OC (quadrati): il primo subset caratterizzato da un fenotipo completamente maturo (cioè KIR⁺NKG2A⁻CD57⁺NKp46^{low}) (indicato con un cerchio, chiamato numero 1 in **Figura 4, C**) era presente nelle HD-NK (Pesce S et al., JACI 2017), ancora presente in OC-PB, ma praticamente assente nel PF; un secondo subset (indicato con un cerchio tratteggiato, chiamato numero 2) caratterizzato da un fenotipo KIR⁺NKG2A⁻CD57⁻NKp46^{low}, presente negli HD; un terzo subset (indicato con quadrato tratteggiato, detto numero 3) caratterizzato da un fenotipo KIR⁺NKG2A⁺NKp46⁺CD57⁻, praticamente assente in HD, presente principalmente in PF ed un quarto subset (indicato con quadrato, detto numero 4), caratterizzato da un fenotipo NKG2A⁺KIR⁻NKp46⁺, totalmente assente in HD, prevalentemente caratteristico del compartimento PF, ma già presente nell'OC-PB (**Figura 4, C**).

Ciò significa che, mentre negli HD l'espressione di PD-1 (**Figura 4** cellule in rosso) è per lo più confinata alle cellule NK completamente mature caratterizzate dal fenotipo KIR⁺NKG2A⁻CD57⁺NKp46^{low}, nei pazienti con OC questa caratteristica è invertita. Infatti, nel TME, il subset PD-1+ NK è composto principalmente da cellule immature NKG2A⁺CD57⁻NKp46^{high} (**Figura 4**).

In particolare, il confronto tra le frazioni di cellule PD-1+ (puntini rossi) e PD-1- ha rivelato che le cellule NK PD-1+ derivate da PF hanno mostrato la più alta espressione di NKp46 e NKG2A e l'espressione più bassa di CD57 (**Figura 4, A**).

4.4 Analisi di marker aggiuntivi su cellule NK PD-1+ derivate da pazienti con OC

Per caratterizzare meglio la popolazione PD-1 nei pazienti con carcinoma ovarico, abbiamo effettuato ulteriori analisi che ci hanno permesso di osservare che l'espressione degli NCR (principalmente NKp46) era up-regolata sulle cellule NK PD-1+ della maggior parte dei pazienti analizzati rispetto al subset NK PD-1+ derivato dagli HD. Questo risultato è stato riscontrato anche in pazienti che mostravano una forte down-regolazione di NKp30 legata alla presenza di sB7-H6 e/o TGF β nel PF (Pesce S. et al., Front Immunol, 2019; Pesce S. et al., Oncoimmunology, 2015; Castriconi R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci 2004). In effetti, questa downregolazione era principalmente limitata alla popolazione di cellule NK PD-1- (**Figura 5** e dati non mostrati). Per quanto riguarda altri recettori attivatori, non è stata rilevata alcuna modifica significativa nell'espressione di NKG2D nelle cellule NK PD-1+ di pazienti con OC rispetto a quella degli HD, sebbene l'espressione di questo recettore sia più debole nel PB di questi pazienti rispetto al PF degli stessi pazienti e al PB degli PB. DNAM-1 era fortemente down-regolato sulle cellule NK PD-1+ nel compartimento PF e questa osservazione è coerente con dati precedentemente pubblicati (Pesce S et al., Oncoimmunol 2015; Carlsten M. et al, J. Immunol 2009) (**Figura 5**).

È interessante notare che la maggior parte delle cellule PF-NK PD-1+ mostra una significativa up-regolazione di CD69, un recettore chiave noto come marker di attivazione precoce, la cui espressione è anche legata alla residenza tissutale. Inoltre, le cellule PF-NK PD-1+ hanno mostrato una minore espressione del recettore Fc-gamma CD16 rispetto alle cellule HD- e PB-NK PD-1+ (**Figura 5**), che al contrario sono caratterizzate da un'elevata espressione di CD16 (Pesce S et al., JACI 2017).

Infine, abbiamo osservato una marcata down-regolazione di Siglec-7 sulle cellule PF-NK PD-1+, mentre non è stato osservato nessun cambiamento significativo per NKG2C, sebbene quasi tutti i pazienti analizzati fossero sieropositivi per HCMV, come tutti gli HD PD-1+, come mostrato in precedenza (Pesce S et al., JACI 2021) (**Figura 5**). Come mostrato anche nella **Figura 4**, CD57 era fortemente downregolato nel PF rispetto al PB autologo e al PB di HD (**Figura 5**).

4.5 Le cellule di OC esprimono ligandi per gli IC delle cellule NK

Abbiamo poi eseguito analisi citofluorimetriche su cellule OC (identificate come cellule CD45-CD14-7AAD-ESA+/-CD90+/-) derivate dal compartimento PF. In particolare, abbiamo analizzato l'espressione dei ligandi per i recettori delle cellule NK e abbiamo osservato che le cellule OC esprimono sia PD-L1 che PD-L2.

Abbiamo anche osservato che queste cellule tumorali esprimevano molecole HLA di classe I sia classiche che non classiche (come HLA-E) (ligandi rispettivamente per KIR e NKG2A) e ligandi per i recettori attivatori delle cellule NK tra cui B7-H6 (ligando per NKp30) e PVR e Nectin-2 (ligandi per DNAM-1) (**Figura 6, B, C**).

4.6 Analisi funzionali delle cellule NK PD-1+

Successivamente, abbiamo eseguito l'analisi funzionale delle cellule NK CD56^{dim} PD-1+ da pazienti con OC valutando la loro capacità di degranulare e cioè di esprimere in superficie CD107a in seguito all'interazione con diverse cellule bersaglio. In primo luogo, i subset PD-1+ e PD-1- sono stati analizzati comparativamente per la loro capacità di degranulare in presenza della linea di eritroleucemia K562. K562 è un classico bersaglio delle cellule NK, negativo per molecole HLA-I e positivo per una serie di ligandi per i recettori attivatori NK, tra cui B7-H6 che è riconosciuto da NKp30 e ligandi per NKp46. Come mostrato nella **Figura 7, A**, pannello di sinistra, le cellule HD-NK PD-1+ (NCR^{bright}), mostrano una degranolazione ridotta rispetto alle cellule HD-NK PD-1- (NCR^{dim}). Al contrario, le cellule PF-NK PD-1+ (NCR^{bright}) degranulano molto più efficientemente rispetto alle cellule PF-NK PD-1- (NCR^{dim}). Poiché le cellule K562 non esprimono PDL-1/PDL-2, le differenze rilevate non sono correlate con l'eventuale interazione tra PD-1 e i suoi ligandi ma piuttosto con l'interazione tra NCR (principalmente NKp46), espressi ad alti livelli su cellule NK PD-1+ del PF, e i loro ligandi espressi sul bersaglio tumorale.

Abbiamo quindi analizzato la degranolazione delle cellule CD56^{dim} KIR+NKG2A+PD-1+ PF-NK dopo l'esposizione alla linea tumorale OVCAR5, un bersaglio che esprime sia le molecole HLA-I che PD-L1/PD-L2. L'obiettivo era valutare se l'espressione simultanea sulle cellule NK di PD-1 con checkpoint inibitori HLA-I specifici potesse rappresentare un'ulteriore compromissione della funzione antitumorale delle cellule NK. In questo caso, abbiamo osservato che la degranolazione delle cellule PF-NK PD-1+ era ridotta rispetto alle cellule NK PD-1- (**Figura 7, A**) e questo difetto funzionale poteva essere ripristinato, almeno in parte, da anticorpi anti-PD-L1/L2 (**Figura 7, B**). Considerando che queste cellule tumorali esprimono anche le molecole HLA-I (Pesce S et al., JACI 2017), abbiamo condotto esperimenti anche in presenza di mAb in grado di interrompere le interazioni inibitorie tra KIR e/o NKG2A e molecole HLA-I. Abbiamo osservato che il blocco simultaneo mediato da mAb specifici di questi diversi checkpoint inibitori espressi dalle cellule PF-NK (PD-1, KIR e NKG2A), rendeva queste cellule capaci di degranulare efficacemente in presenza di cellule OC (**Figura 7, I B**). In questa condizione, abbiamo anche osservato che le cellule PF-NK PD-1+ degranulavano in modo più efficiente rispetto alle cellule PF PD-1- degli stessi pazienti e questo è probabilmente dovuto all'aumentata espressione di NKp46 su queste cellule.

Infine, il subset di cellule CD56^{dim} KIR+NKG2A+PD-1+ PF-NK è stato analizzato per la capacità di degranulare in un test di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente inverso (R-ADCC). Questi esperimenti sono stati eseguiti in presenza di mAb anti-CD16 e utilizzando un mAb anti-PD-1 da solo o in combinazione con mAb anti-KIR e/o anti-NKG2A con l'obiettivo di valutare se il cross-linking mediato da mAb di questi checkpoint inibitori potrebbe inibire l'attivazione delle cellule NK indotta dal cross-linking di CD16. Come mostrato nella **Figura 7, 1 C**, il cross-linking di PD-1 induceva una riduzione parziale ma significativa della degranolazione delle cellule NK PD-1+. Questa riduzione era molto più evidente combinando il cross-linking dei tre checkpoint inibitori. Ciò indica chiaramente che l'espressione simultanea di più checkpoint inibitori sulle cellule NK dei pazienti con OC può rappresentare un'importante compromissione della funzione antitumorale delle cellule NK.

Infine, i sottogruppi PD-1+ e PD-1- sono stati analizzati per la loro capacità di proliferare (utilizzando il saggio di diluizione dell'estere succinimidinico della carbossifluoresceina (CFSE) misurato a 10 giorni di coltura) in risposta a rhIL-15.

Come mostrato nella **Figura 8**, le cellule NK PF PD-1+ sia NKG2A+ sia KIR+ sono capaci di proliferare. Questo risultato appare ancora più interessante, considerando che le cellule NK PD-1+ derivate da HD sono quasi completamente incapaci di proliferare nelle stesse condizioni, come anche dimostrato in precedenza (**Figura 8**) (Pesce S et al., JACI 2017).

4.7 PD-1 è espresso su cellule NK infiltranti sia il tumore primario sia il tumore metastatico, dove la sua espressione è ancora più evidente

Infine, ci siamo chiesti se le cellule NK PD-1+ potessero avere la capacità di infiltrarsi nel tessuto tumorale poiché questo evento è un fattore chiave in termini di attività antitumorale.

A questo scopo, abbiamo eseguito una caratterizzazione immuno-fenotipica degli infiltrati infiammatori nei tessuti primari e metastatici valutando la presenza di cellule NK (identificate come cellule NKp46+, ROR γ τ -) e l'espressione di PD-1 su queste cellule. Come mostrato in **Figura 9**, abbiamo trovato l'espressione di CD3, PD-1, NKp46 ma nessuna espressione di ROR γ τ sugli infiltrati linfocitari. È importante sottolineare che le cellule NKp46 e quelle PD-1 erano in alcuni casi sovrapponibili come mostrato in **Figura 9** (frecche nere), indicando così la presenza di cellule NK associate al tumore esprimenti PD-1.

Abbiamo anche eseguito una valutazione immunohistochimica per PD-L1 che, coerentemente con l'analisi citofluorimetrica sulle cellule PF-OC (**Figura 6**), ha rivelato l'espressione di questo marcatore sulle cellule tumorali indicando la possibile esistenza di interazioni inibitorie PD-1/PD-L1 nel TME. Ciò accade sia nel tumore primario (ovaio), mostrato nella **Figura 9**, che nei tessuti tumorali metastatici mostrati nella **Figura 10**, con una crescente positività nel tessuto metastatico.

Abbiamo quindi isolato le cellule NK associate al tumore dai tessuti OC primari e metastatici e valutato l'espressione di PD-1 su queste cellule mediante analisi citofluorimetriche. Abbiamo nuovamente osservato la presenza di PD-1 sulle cellule NK di tutti questi compartimenti con un numero consistente di cellule NK PD-1+ nei tumori metastatici rispetto a quelli primari.

Inoltre, abbiamo osservato un'alta percentuale di PD-1+ che coesprimevano sia NKG2A che KIR principalmente nel PF e nei tessuti tumorali metastatici (dati non mostrati).

Pertanto, nel TME dell'OC, sebbene esistano cellule NK infiltranti il tumore, queste sembrano potenzialmente inefficaci nel generare una risposta antitumorale adeguata, a causa dell'esistenza di molteplici interazioni inibitorie tra le cellule NK e le cellule tumorali che ne bloccano il funzionamento.

5. Discussione

Nel presente studio, abbiamo analizzato le proprietà fenotipiche e funzionali delle cellule NK PD-1+ associate al tumore di un'ampia coorte di pazienti con OC sieroso di alto grado.

I nostri dati mostrano che nei pazienti con OC, le cellule NK PD-1+ possono infiltrarsi in diversi compartimenti tumorali, inclusa la nicchia metastatica. Diversamente dagli HD, dove le cellule PD-1+ sono confinate a cellule NK completamente mature (CD56^{dim}, KIR⁺, NKG2A⁻, NCR^{dim}, CD57⁺) (Pesce S et al., JACI 2017), nei pazienti con OC PD-1 può essere espresso non solo con KIR ma anche con NKG2A, principalmente nel TME. Inoltre, il subset PD-1 esprime alti livelli di NCR, principalmente NKp46, e bassi livelli di CD57, indicando così caratteristiche di immaturità. Le analisi funzionali indicano che il subset di cellule NK PD-1+ non è anergico, ma al contrario è in grado di proliferare efficientemente in risposta a stimolazione con citochine e degranulare in risposta a classici bersagli tumorali NK-sensibili (HLA-I, PD-L1/L2-). Tuttavia, le cellule PD-1+ mostrano un'inefficace risposta antitumorale in presenza di cellule di OC, esprimendo sia molecole PD-L che HLA-I, principalmente a causa della coespressione di ulteriori checkpoint immunitari, tra cui NKG2A e KIR. Pertanto, un trattamento innovativo per i pazienti con OC potrebbe basarsi sul blocco contemporaneo di diversi CI espressi dalle cellule NK.

L'OC è la prima causa di morte per cancro ginecologico nei paesi occidentali (Jemal A. et al., Global cancer statistics). L'istotipo più frequente è il carcinoma sieroso di alto grado, caratterizzato da diagnosi a stadi avanzati nella maggior parte dei casi e responsabile del 70-80% dei decessi per OC (Bowtell D. D. et al., Nature Reviews Cancer 2015). Il trattamento per l'OC di solito comporta una combinazione di chirurgia e chemioterapia (Mirza M. R. et al., N. Engl. J. Med. 2016). Tuttavia, la maggior parte dei pazienti con OC alla fine recidiva e sviluppa resistenza al platino (Cecere S. C. et al., Gynecol. Oncol. 2020). Il tasso di risposta alla terapia con anticorpi anti-PD-1 è basso, non superiore all'8% nei pazienti con OC recidivante (Matulonis U. A. et al., Oncol. 2019), sebbene i dati sulla possibile correlazione tra l'espressione di PD-1 sui linfociti citotossici e le risposte non sono ancora disponibili. Pertanto, sono necessari studi sull'eterogeneità del TME per identificare le disfunzioni immunitarie e sviluppare nuove strategie terapeutiche. Considerando che le cellule NK mostrano un'elevata citotossicità contro i tumori e le cellule infettate da virus senza previa sensibilizzazione, possono rappresentare lo strumento ottimale come effettori primari o collaterali di questi nuovi approcci immunoterapeutici. Sulla base di diversi dati pubblicati che indicano la soppressione delle cellule NK da parte dell'OC-TME, il miglioramento della loro funzione effettrice nell'OC è una strategia sia fattibile che logica. Le cellule NK sono regolate da una varietà di recettori attivatori e inibitori, inclusi diversi CI costitutivi (ad esempio, la famiglia dei recettori KIR, LILRB-1, l'eterodimero CD94/NKG2A) e inducibili (come PD-1). Gli NK-CI possono compromettere la funzione effettrice delle cellule NK contro i tumori e rappresentano quindi possibili bersagli molecolari nelle immunoterapie di blocco dei CI.

In precedenza, abbiamo fornito prove inequivocabili che PD-1 è altamente espresso su un subset di cellule NK rilevabile nel PB di circa un quarto di HD. Questi donatori sono sempre sierologicamente positivi per HCMV. PD-1 è espresso da cellule CD56^{dim} (e da cellule CD56^{neg} se presenti), ma non da cellule NK CD56^{bright} e la sua espressione è confinata a cellule NK terminalmente differenziate caratterizzate dal fenotipo KIR⁺, LILRB-1⁺, NKG2A⁻, NCR^{dim}, CD57⁺. Questa espressione varia in dimensioni tra i diversi soggetti, raggiungendo in alcuni casi percentuali elevate, ed è stabile nel tempo. Il subset HD-NK PD-1+ mostra basse risposte proliferative e ridotta attività antitumorale che può essere parzialmente ripristinata dall'interruzione dell'interazione PD-1/ligandi, mediata da mAb.

Analizzando l'espressione di PD-1 su cellule NK derivate da una coorte ampia e omogenea di pazienti con OC sieroso di alto grado, abbiamo osservato che la dimensione del subset PD-1+ NK aumenta nelle cellule

NK di pazienti con OC rispetto a PB di HD, suggerendo una possibile induzione/accumulo di cellule PD-1+ nel TME. In particolare, nel PF la quasi totalità dei pazienti esprime PD-1 su una discreta frazione di cellule NK, e questa espressione è associata a prognosi complessivamente più sfavorevoli.

Sezionando le proprietà fenotipiche delle cellule NK PD-1+ associate al tumore, abbiamo osservato che nei pazienti con tumore OC, PD-1 è nuovamente confinato al subset di cellule NK CD56dim. Tuttavia, ulteriori analisi hanno rivelato che, mentre nei donatori sani le cellule NK PD-1+ erano in tutti i casi KIR+ ma NKG2A-, nei pazienti con OC, PD-1 poteva essere co-espresso non solo con KIR, ma anche con NKG2A. In particolare, nel compartimento PF, abbiamo osservato un ampio subset di cellule PD-1+ NKG2A+ KIR- NK e in alcuni casi questo subset era rilevabile anche nelle cellule NK derivate da PB di questi pazienti sebbene in misura minore. Questa inversione della co-espressione di PD-1 con KIR e NKG2A tra PB e PF è presente in tutti i pazienti. I nostri dati precedenti hanno rivelato che l'espressione dei principali recettori NK attivatori NKp46 e NKp30 sulle cellule NK CD56dim derivate da HD erano significativamente inferiori sulle cellule NK PD-1+ rispetto alle cellule NK PD-1-. È importante sottolineare che, come previsto, questa bassa espressione di NCR implica un'attività di degranolazione ridotta in presenza di cellule bersaglio esprimenti i ligandi per NCR. Qui, abbiamo osservato che l'espressione di questi NCR (principalmente NKp46) era up-regolata sulle cellule PD-1+ NK della maggior parte dei pazienti analizzati rispetto al subset PD-1+ NK derivato dagli HD. Questi risultati hanno un impatto importante sulla funzionalità delle cellule NK associate al tumore, considerando che la capacità delle cellule NK di lisare bersagli tumorali è correlata al livello di espressione dei recettori NK attivatori. D'altra parte, in accordo con studi precedenti che hanno rivelato che l'espressione del recettore attivatorio DNAM-1 sulle cellule NK derivate da PF di pazienti con OC era significativamente inferiore rispetto alle cellule NK isolate da PB, abbiamo trovato che l'espressione di questo recettore era diminuito sulle cellule NK PD-1+, mentre il recettore NKG2D mostrava livelli stabili nella maggior parte dei pazienti analizzati (Pesce S. et al., *Oncoimmunology* 2015; Carlsten M. et al., *J. Immunol.* 2009). In questo contesto, possiamo osservare che TIGIT, un checkpoint immunitario che compete con il recettore attivatorio DNAM-1 per il legame a PVR (CD155) e Nectin-2 (CD112), è espresso sia su PB- che PF- derivati da pazienti con OC, a differenza di TIM-3 e soprattutto LAG-3 (Di Vito C. et al., *Immunology* 2019), che sono molto poco espressi dalle NK di pazienti OC. Pertanto, anche TIGIT può contribuire alla downmodulazione della citotossicità delle cellule NK antitumorali controbilanciando i segnali attivatori mediati dal DNAM-1, considerando che il DNAM-1 è fortemente downregolato sulle cellule NK associate al tumore, come abbiamo detto precedentemente (Pesce S. et al., *Oncoimmunology* 2015; Carlsten M. et al., *J. Immunol.* 2009; Solomon B. L. & Garrido-Laguna, *Cancer Immunology* 2018).

È interessante notare che la maggior parte delle cellule PF-NK PD-1+ ha mostrato una significativa upregolazione di CD69, un recettore noto come marker di attivazione precoce ed espresso dalla maggior parte dei linfociti non circolanti. Attualmente, CD69 è considerato anche un marker tessutale, perché promuove l'internalizzazione del recettore 1 della sfingosina-1-fosfato (S1PR1). L'espressione di S1PR1 consente la migrazione dei linfociti verso il gradiente S1P, che è più alto nel sangue rispetto ai tessuti. Nel compartimento PF, la sovraespressione di CD69 suggerisce l'origine tissutale di queste cellule NK PD-1+ (Hashemi E. & Malarkannan S., *Cancers* 2020).

Analizzando ulteriori marker informativi, abbiamo riscontrato bassi livelli di CD16 (il recettore Fc-gamma) responsabile della citotossicità cellulare anticorpo-dipendente-ADCC (Yeap W. H. et al., *Sci.* 2016). A questo proposito, è importante considerare che una downregolazione di questo recettore è stata precedentemente descritta su cellule PF-NK di pazienti con OC come conseguenza della presenza di fattori solubili, come IL-18 e TGF-beta (Carlsten M. et al., *J. Immunol.* 2009; Pesce S. et al., *Oncoimmunology* 2015) in questo compartimento.

È importante ricordare che tutti gli HD PD-1+ sono sieropositivi per HCMV (Pesce S. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017). Nelle cellule NK umane, HCMV si è dimostrato in grado di indurre l'espansione di un subset NK CD56dim NKG2C+CD57+ altamente differenziato, che persiste nel tempo. Tali cellule NK espanse sono caratterizzate dall'acquisizione de novo di diverse caratteristiche adattative (tra cui l'espressione di KIR, LILRB-1, CD2 e l'assenza o la bassa espressione di NKG2A, Siglec-7 e CD161) e da modificazioni epigenetiche, come la downregolazione della proteina di segnalazione FcεRγ, che ne modulano le caratteristiche fenotipiche e funzionali. Recentemente sta diventando sempre più chiaro che HCMV potrebbe anche rappresentare un cofattore per indurre un'espressione de novo di PD-1 sulle cellule NK (Pesce S. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017). In questo contesto, abbiamo osservato che quasi tutti i pazienti con OC erano sieropositivi per HCMV.

Nei pazienti con OC abbiamo osservato una netta downregolazione di Siglec-7 e CD57, mentre non è stata osservata alcuna variazione significativa per NKG2C rispetto al PB degli stessi pazienti e di HD. La downmodulazione di Siglec-7 può essere collegata a modificazioni indotte da HCMV, sebbene resti da chiarire perché questa variazione fenotipica sia così pronunciata principalmente nel OC-TME. CD57 è un marker di funzione sconosciuta che si pensa possa identificare le cellule NK terminalmente differenziate. Le cellule NK CD57+ sembrano essere una sottopopolazione stabile, che aumenta con l'età e l'esposizione agli agenti patogeni (soprattutto HCMV). Il fatto che le cellule NK PD-1+ nel PF non esprimano questo marker suggerisce che queste cellule NK siano di recente generazione. Inoltre, sebbene manchi ancora una caratterizzazione dettagliata delle cellule NK residenti nei tessuti per molti tessuti umani, dati recenti indicano livelli non rilevabili di CD57 come una caratteristica associata alle cellule residenti nei tessuti in alcuni tipi di tumore (Stabile H. et al., *Haematologica* 2015; Roberto A. et al., *Haematologica* 2018; Vulpis E. et al., *Cancers* 2018).

Per capire meglio il possibile impatto del blocco PD-1/PD-L1 in un protocollo immunoterapeutico per i pazienti con OC, ci siamo chiesti se le cellule tumorali derivate dal PF di questi pazienti potessero esprimere o meno i ligandi per PD-1. Analizzando le cellule ESA+ (co-esprimenti o meno CD90) derivate dal compartimento PF, abbiamo osservato che queste esprimono buoni livelli di entrambi i ligandi di PD-1 (PD-L1 e PD-L2). Inoltre, esprimono molecole HLA di classe I sia classiche che non classiche (rispettivamente ligandi per KIR e NKG2A) e ligandi per i recettori attivatori delle cellule NK tra cui B7-H6 (ligando per NKp30) e PVR e Nectin-2 (ligandi di DNAM-1) (Bottino C. et al., *J. Exp. Med.* 2003). Il fatto che una grande frazione di cellule NK PD-1+ associate al tumore coesprima NKG2A e/o KIR potrebbe implicare una forte compromissione delle cellule NK nella loro attività antitumorale, a causa delle molteplici interazioni negative che le cellule NK possono instaurare con il tumore, e suggerisce che una terapia basata sul blocco combinato di tutti questi CI possa beneficiare di un effetto sinergico principalmente confinato all'OC-TME.

In particolare, la capacità del subset NK PD-1+ associato al tumore (PF-NK) di fornire una citotossicità nettamente superiore rispetto alle cellule PF-NK PD-1-, in presenza di K562, un classico bersaglio delle cellule NK, negativo per HLA-I e PD-L1/L2 ed esponente una serie di ligandi per i recettori attivatori delle cellule NK (Brandt C. S. et al., *J. Exp. Med.* 2009) potrebbe riflettere l'interazione tra NCR (principalmente NKp46) espressi ad alto livello sulle cellule PF-NK PD-1+ e loro ligandi espressi sul bersaglio tumorale.

In linea con questo concetto, la ridotta degranulazione delle cellule NK PD-1+ dopo l'interazione con OVCAR5 riflette il segnale inibitorio mediato dall'interazione tra il recettore PD-1 e i ligandi PD-L1/PD-L2, espressi su queste cellule bersaglio. Pertanto, l'interruzione dell'interazione PD-1/PD-L mediata da mAb potrebbe parzialmente ripristinare l'inibizione funzionale delle cellule NK. Questo è un dettaglio importante perché sappiamo come in vivo l'utilizzo di anticorpi anti-PD-1 o anti-PD-L1 sia in grado di generare effetti benefici nei confronti della risposta antitumorale mediata dai linfociti T, ma

evidentemente anche dalle cellule NK. Questo è clinicamente rilevante per i pazienti con tumori che mostrino un fenotipo resistente alle cellule T (bassi livelli di HLA di classe I).

Tuttavia, nel caso di cellule tumorali che esprimano sia molecole PD-L che HLA-I, come le cellule di OC, abbiamo osservato che per ottenere un'efficace attività antitumorale delle cellule NK sia necessario combinare il blocco di KIR, NKG2A e PD-1.

Queste osservazioni, insieme alla capacità delle cellule PF-NK PD-1+ di proliferare in modo efficiente in risposta alle citochine esogene rispetto alle cellule PD-1+ NK di HD, indicano che le cellule PD-1+ NK associate al tumore non rappresentano semplicemente una popolazione di cellule esauste con un difetto funzionale intrinseco. Infatti, la loro compromissione funzionale sembra essere principalmente conseguenza di un profondo squilibrio tra segnali inibitori e attivatori, che riflette l'espressione/upregolazione di più recettori inibitori sulle cellule NK associate al tumore e l'espressione dei relativi ligandi sulle cellule OC.

Questi dati evidenziano l'esistenza di interazioni inibitorie critiche/salienti nell'OC-TME e suggeriscono una possibile soluzione per ripristinare l'attività antitumorale delle cellule NK, come l'uso di una combinazione di ICI per la cura di questi pazienti.

E' importante sottolineare che, le cellule NK PD-1+ hanno la capacità di infiltrare i tessuti tumorali sia primari che metastatici, con crescente positività nella nicchia metastatica. Questo evento è un fattore chiave in termini di attività antitumorale.

Tuttavia, anche se le cellule NK sono in grado di infiltrarsi in diversi compartimenti tissutali, sono inefficaci nel produrre un'adeguata risposta antitumorale a causa dell'espressione simultanea di diversi CI, che potrebbero fornire livelli multipli di soppressione alle risposte antitumorali di cellule NK.

L'analisi della coespressione e della funzione dei checkpoint immunitari su cellule NK di derivazione tumorale nonché l'analisi dei ligandi espressi dalle cellule tumorali è estremamente importante al fine di progettare strategie immunoterapeutiche precise e personalizzate dove combinare il blocco di diversi checkpoint immunitari espressi dalle cellule NK.

Questi approcci innovativi hanno una particolare rilevanza soprattutto se si pensa che le cellule T citotossiche infiltranti il tumore possano esprimere PD-1, ma anche KIR e/o NKG2A. Pertanto, il blocco combinato di diversi checkpoint potrebbe portare a un'attivazione simultanea sia delle risposte immunitarie innate sia di quelle adattative.

6. Figure

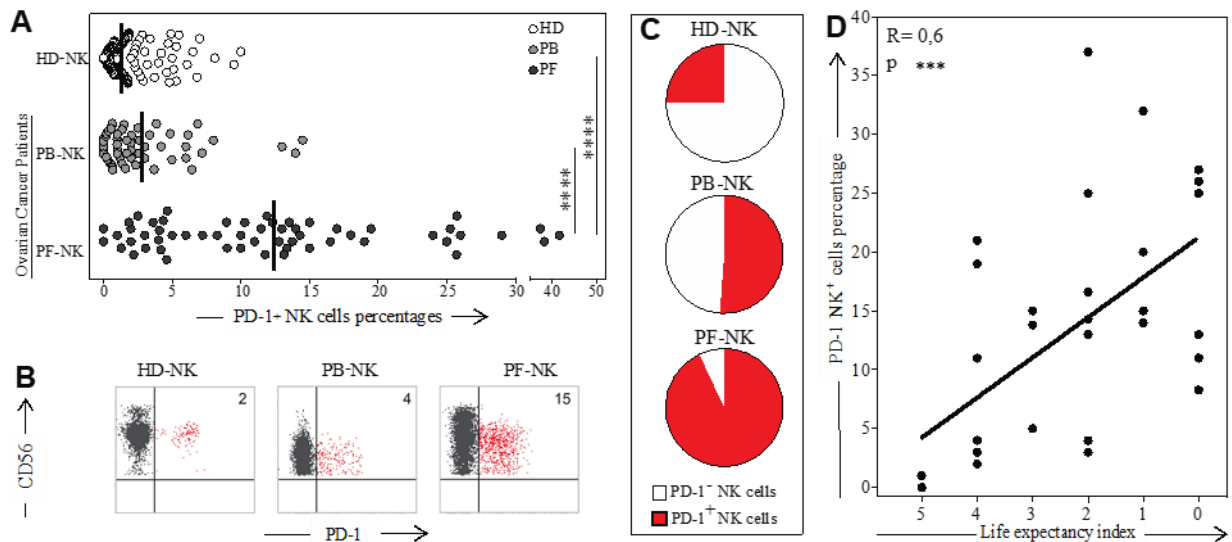


Figura 1. Pattern di espressione di PD-1 in pazienti con carcinoma ovarico

(A) Espressione di PD-1 sulle cellule NK del sangue periferico di donatori sani (HD-NK, puntini bianchi), sangue periferico di pazienti con carcinoma ovarico (PB-NK, puntini grigio chiaro) e liquido peritoneale di pazienti con carcinoma ovarico (PF-NK, puntini grigio scuro); (B) cellule NK PD-1+ (puntini rossi) nel sangue periferico di un donatore sano rappresentativo (HD-NK) e nel sangue periferico (PB-NK) e nel liquido peritoneale (PF-NK) di un paziente rappresentativo. (C) Grafico a torta che mostra il rapporto di soggetti con una popolazione di cellule NK PD-1+ superiore all'1,5% (in rosso) nel sangue periferico di donatori sani e nel sangue periferico e nel liquido peritoneale di pazienti con carcinoma ovarico. (D) Correlazione tra l'espressione di PD-1 sulle cellule NK nel liquido peritoneale di pazienti con carcinoma ovarico e l'aspettativa di vita. p:***, 0.001

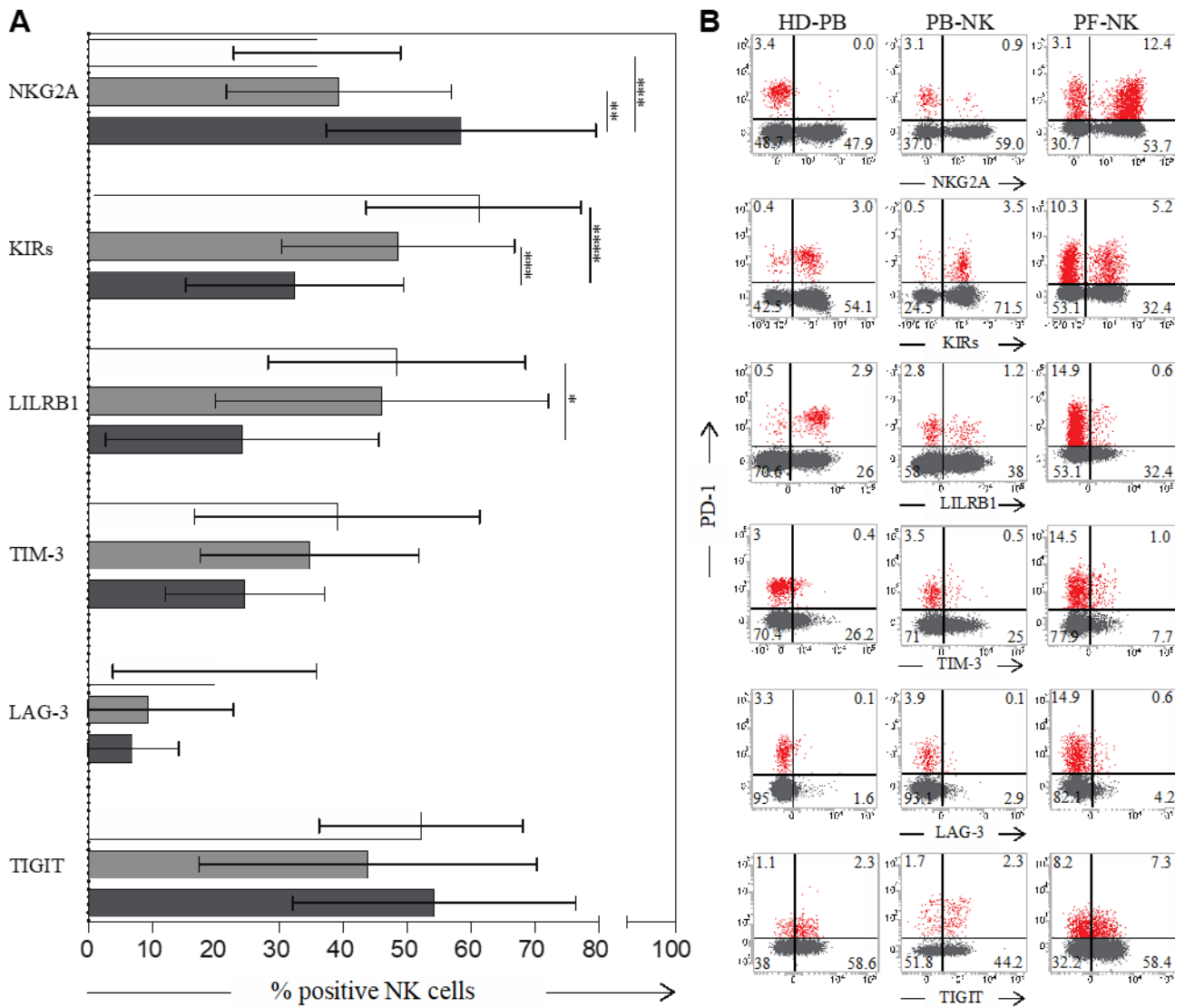


Figura 2. Espressione di altri checkpoint immunitari sulle cellule NK CD56dim

(A) Istogrammi dell'espressione di altri checkpoint immunitari classici (KIR, NKG2A, LILRB-1) e non classici (TIM-3, LAG-3, TIGIT) su cellule NK del sangue periferico di donatori sani (HD-NK, barre bianche), del sangue periferico (PB-NK, barre grigio chiaro) e del liquido peritoneale (PF-NK, barre grigio scuro) di pazienti con carcinoma ovarico; (B) dot plot rappresentativo del pannello A in cui le cellule NK PD-1+ sono in rosso. p:*, 0,05 p:**, 0,01 p:***, 0,001 p:****, 0,0001

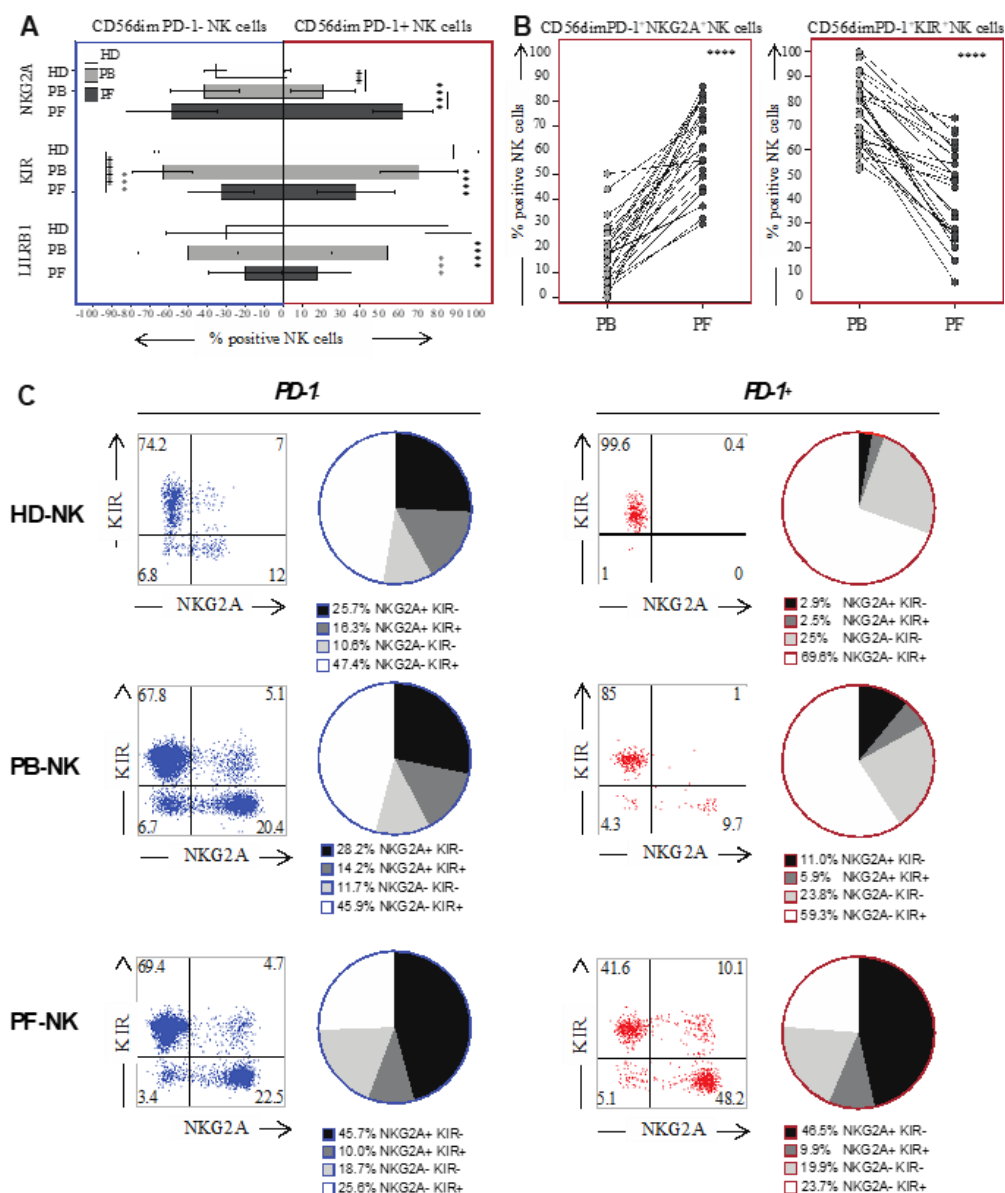


Figura 3. Coespressione di KIR e NKG2A con PD-1 nei diversi compartimenti indicati.

(A) Espressione di NKG2A, KIR e LILRB1 su cellule NK CD56dim PD-1- (contorno blu) e cellule NK CD56dim PD-1+ (contorno rosso) nel sangue periferico di donatori sani (HD-NK, barre bianche), sangue periferico (PB-NK, barre grigio chiaro) e liquido peritoneale (PF-NK, barre grigio scuro) di pazienti con carcinoma ovarico. (B) Variazione nella coespressione di KIR (sinistra) o NKG2A (destra) con PD-1 nel PB (puntini grigio chiaro) e nel PF (puntini grigio scuro) di pazienti con carcinoma ovarico (i campioni PB e PF dello stesso paziente sono collegati tramite una linea nera). (C) Dot plot rappresentativo e distribuzione del grafico a torta di KIR e NKG2A sulle cellule NK PD-1- (cellule blu e contorno blu della torta) e NK PD-1+ (cellule rosse e contorno rosso della torta) in HD-NK (in alto), PB-NK (al centro) e PF-NK (in basso). p:***, 0,001 p:****, 0,0001

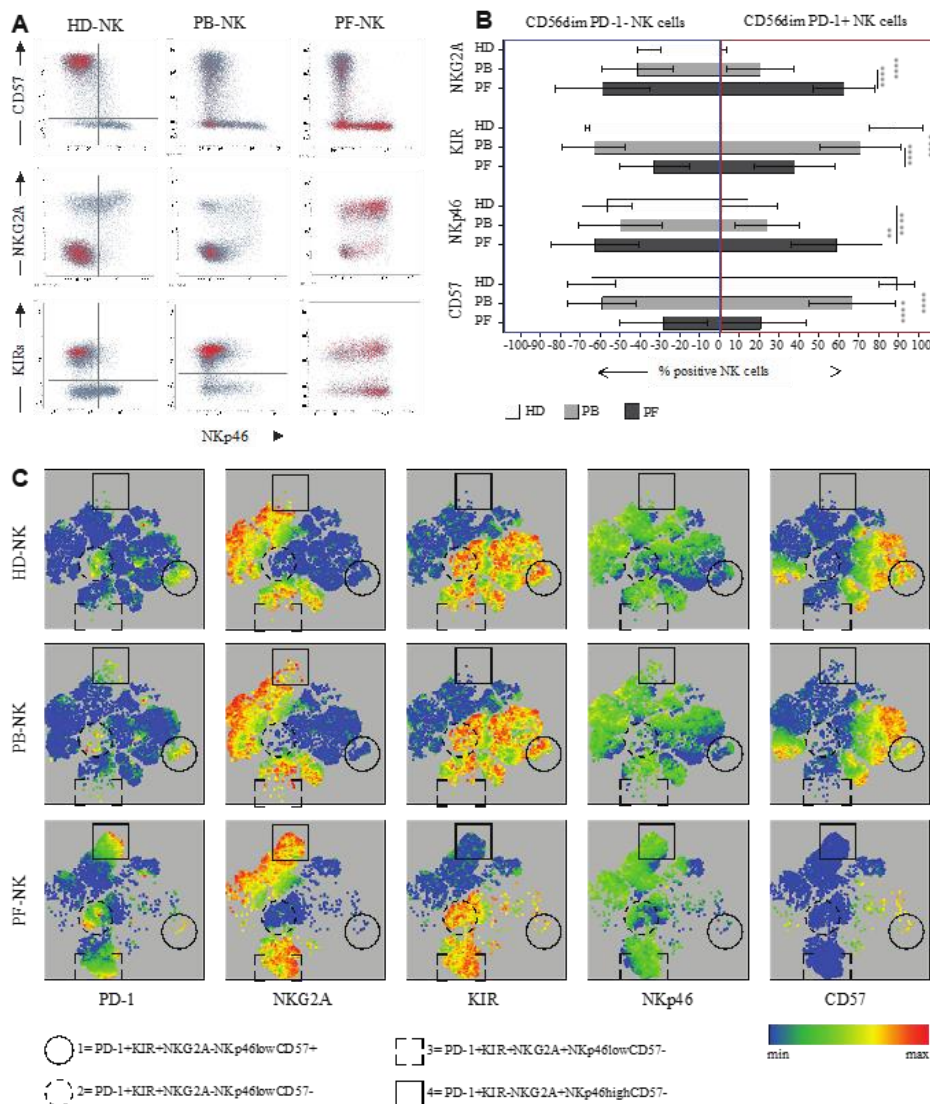


Figura 4. Confronto dell'espressione dei marcatori di maturazione in cellule NK PD-1+ di donatori sani e in pazienti con carcinoma ovarico.

(A) Espressione di NKp46, CD57, NKG2A e KIR sulle cellule NK PD-1+ (rosso) del sangue periferico di un donatore sano rappresentativo (HD-NK, a sinistra), del sangue periferico (PB-NK, centro) e del liquido peritoneale (PF-NK, a destra) di un paziente rappresentativo con carcinoma ovarico. (B) Istogrammi dell'espressione delle molecole indicate sulle cellule NK del sangue periferico di donatori sani (HD-NK, barre bianche), del sangue periferico (PB-NK, barre grigio chiaro) e del liquido peritoneale (PF-NK, grigio scuro) di pazienti con carcinoma ovarico. (C) Rappresentazione t-SNE della coespressione di NKG2A, KIR, PD-1, NKp46 e CD57 su HD-NK, PB-NK e PF-NK che identifica due popolazioni PD-1+ maggiormente rappresentate in HD-NK (quadrati grigi) e due popolazioni PD-1+ esclusive delle PF-NK (quadrati neri). p:**, 0,01 p:****, 0,0001

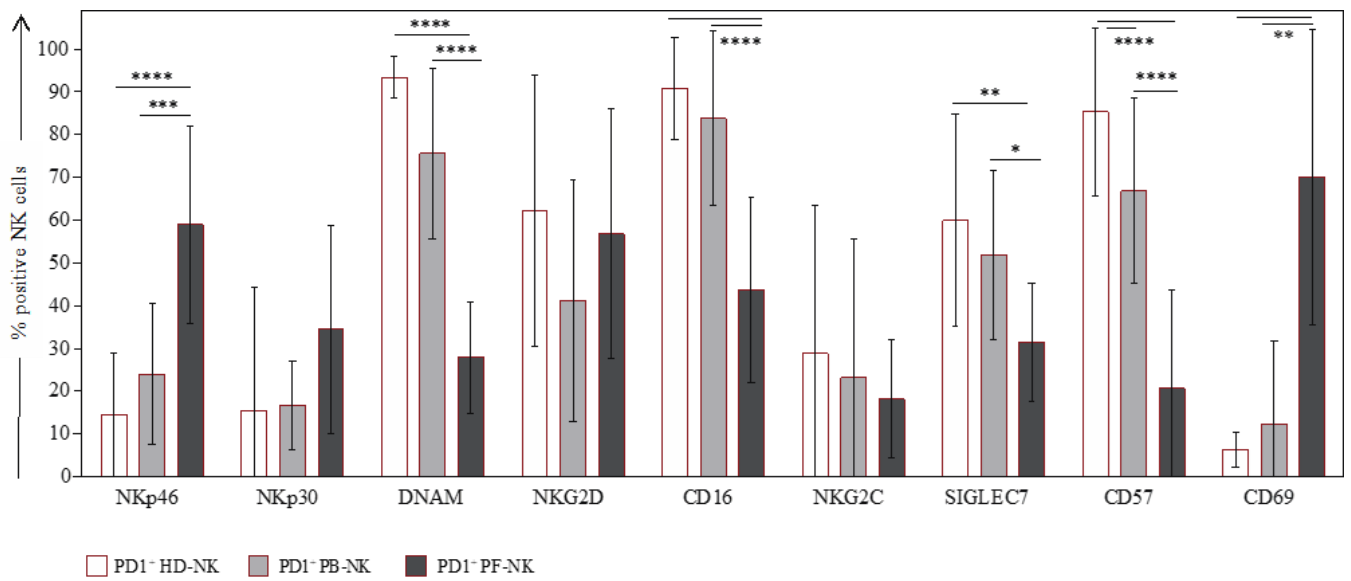


Figura 5. Molecole di interesse su cellule NK PD-1+

Istogramma di altre molecole di interesse espresse su cellule NK PD-1+ del sangue periferico di donatori sani (HD-NK, barre bianche), sangue periferico di pazienti con carcinoma ovarico (PB-NK, barre grigio chiaro) e PF degli stessi pazienti (PF-NK, barre grigio scuro). p:*, 0,05 p:**, 0,01 p:***, 0,001 p:****, 0,0001

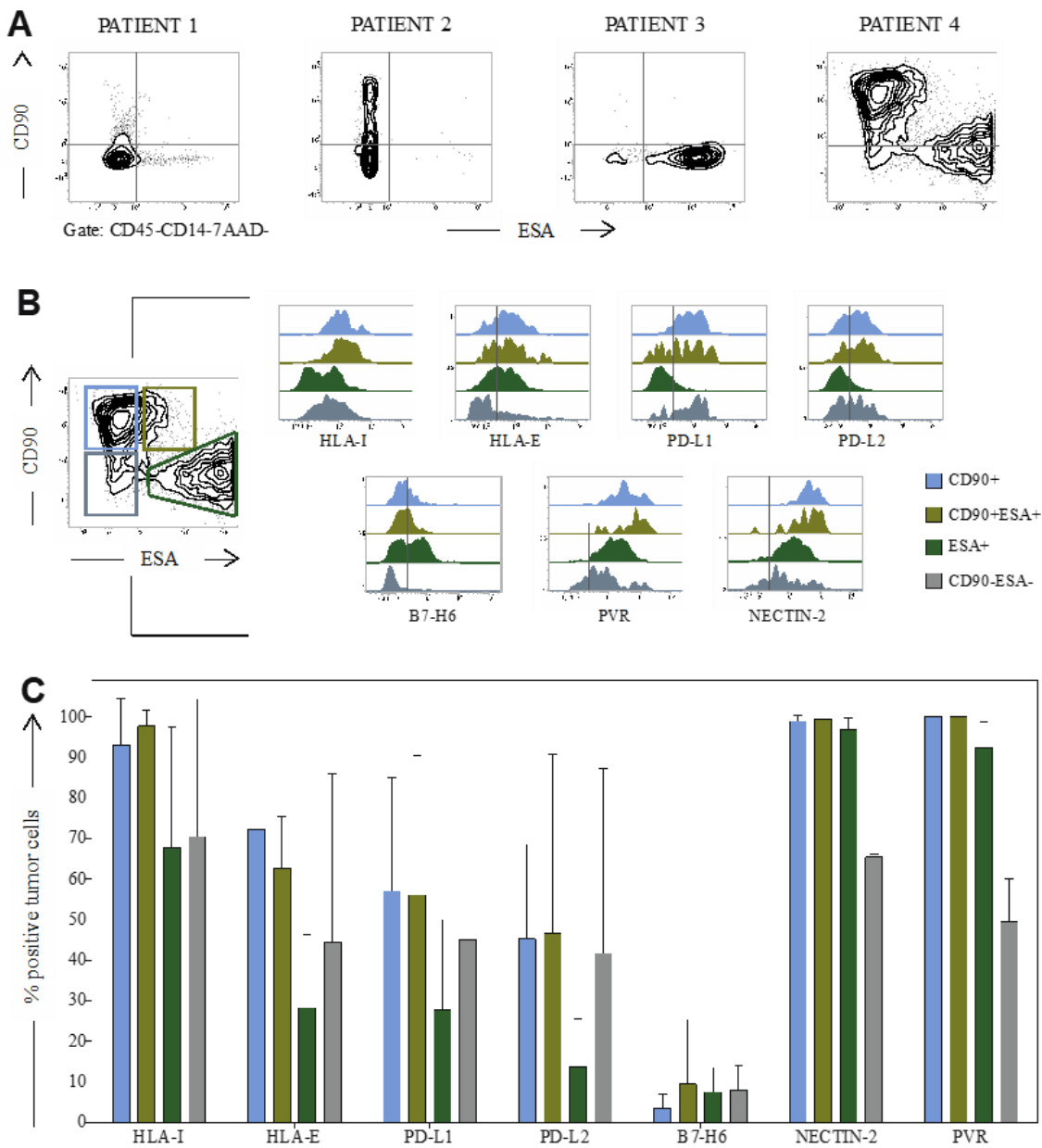


Figura 6. Fenotipo delle cellule di carcinoma ovarico

(A) Variazioni nell'espressione di CD90 e/o ESA in cellule CD45-CD14-7AAD- derivate dal PF di 4 pazienti rappresentativi con carcinoma ovarico. (B) Espressione di ligandi per recettori inibitori (HLA-I, -E, PD-L1, -L2) e attivatori (B7-H6, PVR, Nectin-2) sulle cellule CD90+ e/o ESA+ del PF del paziente 4. (C) Istogrammi che rappresentano l'espressione di ligandi di recettori inibitori e recettori attivatori sulle CD90+ e/o ESA+ del PF.

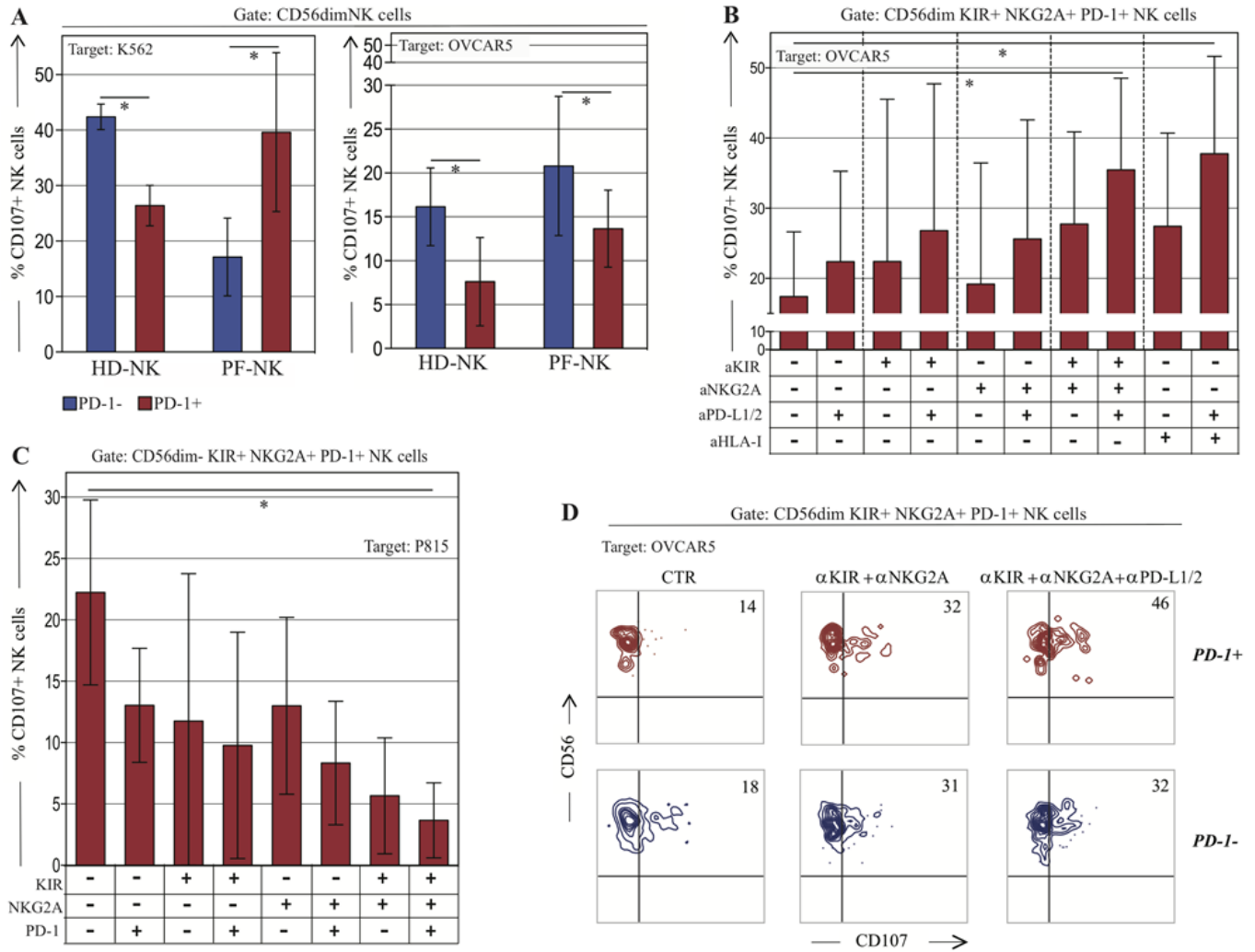


Figura 7. Saggio di degranolazione delle cellule NK derivate dal liquido peritoneale (PF-NK) di pazienti con carcinoma ovarico.

(A) Degranolazione basale delle cellule NK PD-1- (barre blu) e PD-1+ (barre rosse) del sangue periferico di donatori sani (HD-NK) e del liquido peritoneale (PF-NK) di pazienti con carcinoma ovarico dopo cocoltura con la linea cellulare PD-L- K562 (a sinistra) e la linea cellulare di carcinoma ovarico PD-L+ OVCAR5 (a destra). (B) Degranolazione delle cellule NK CD56dim KIR+ NKG2A+ PD-1+ in presenza o assenza di anticorpi che bloccano le interazioni inibitorie fra i recettori presenti nelle NK e i rispettivi ligandi presenti sulla linea cellulare di carcinoma ovarico OVCAR5 (PD-L+ HLA-I+). (C) Degranolazione delle cellule NK CD56dim KIR+ NKG2A+ PD-1+ in presenza di anticorpi anti-CD16 e presenza o assenza di anticorpi che simulano l'espressione dei ligandi di diversi checkpoint inibitori NK sulla linea cellulare murina Fc γ R+ P815. (D) Dot plot che mostra la degranolazione delle cellule NK CD56dim KIR+ NKG2A+ PD-1+ (cellule rosse in alto) e PD-1- (cellule blu in basso) derivate dal liquido peritoneale di un paziente rappresentativo. p:*, 0.05

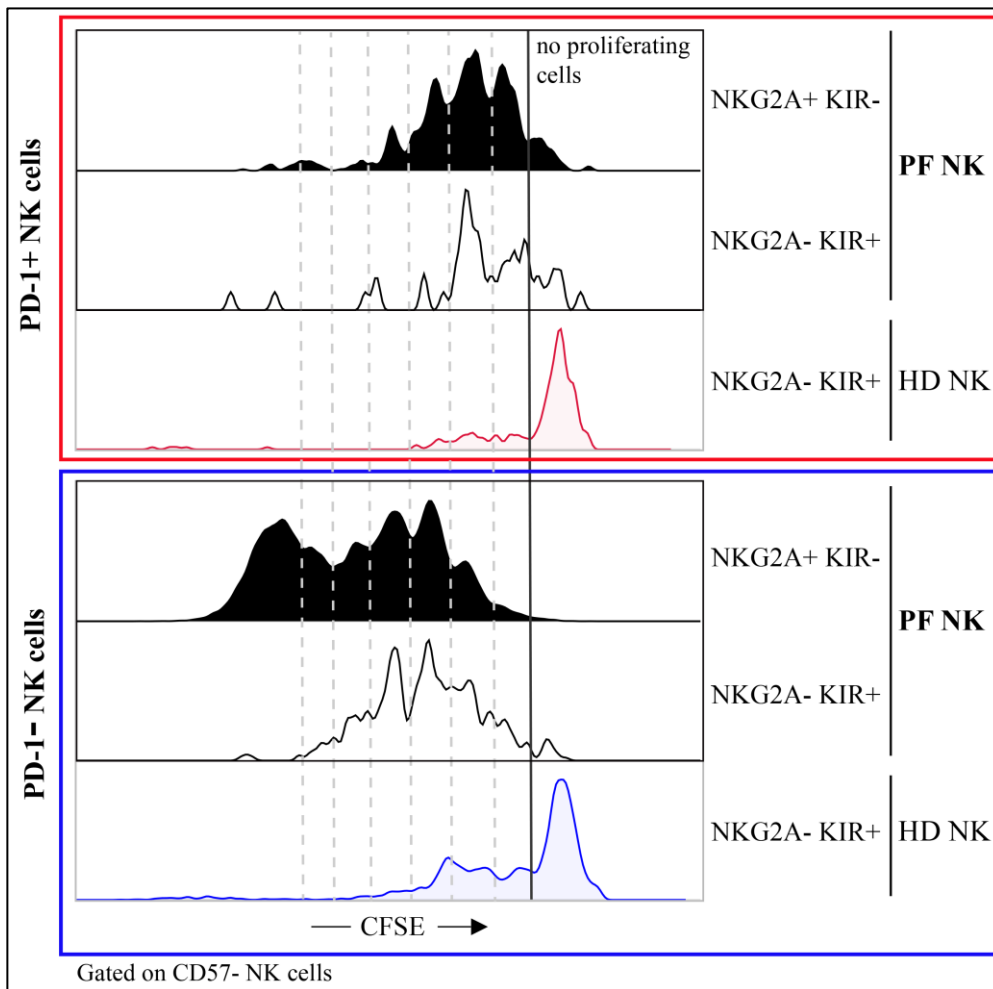


Figura 8. Saggio di proliferazione delle cellule NK derivate dal liquido peritoneale (PF-NK) di pazienti con carcinoma ovarico

Modificazione nell'espressione di CFSE di cellule NK PD-1+ (contorno rosso) e PD-1- (contorno blu) (coesprimenti NKG2A o KIR) derivate da sangue periferico di donatore sano rappresentativo e dal liquido peritoneale di un paziente con carcinoma ovarico dopo 7 giorni di coltura in presenza di IL-15.

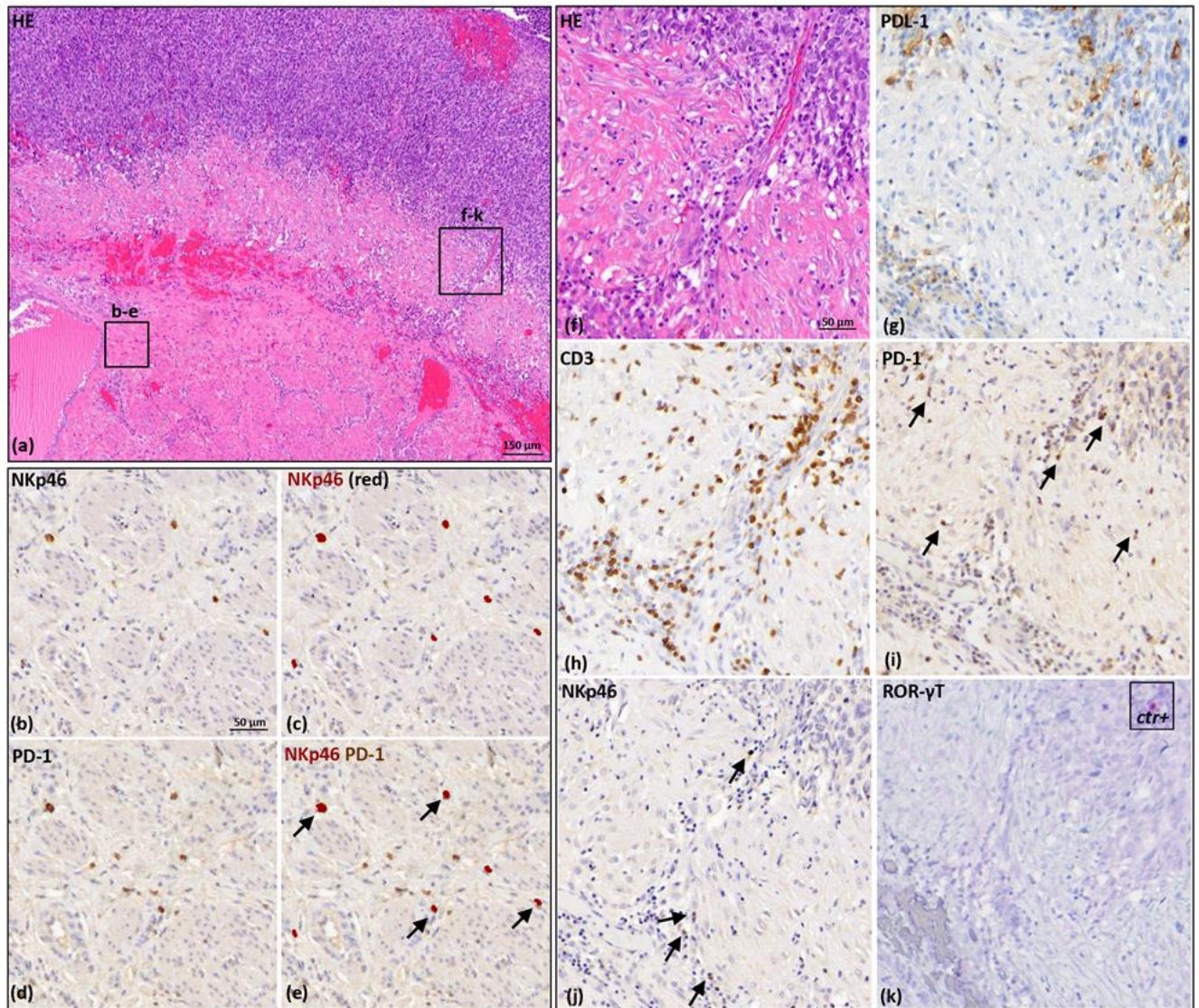


Figura 9. Analisi immunoistochimica di carcinoma ovarico sieroso di alto grado (tumore primario) che mostra infiltrati linfocitari che esprimono marcatori di cellule NK e PD-1.

(A) Ingrandimento dell'OC primario in cui sono racchiuse due regioni ingrandite nei pannelli indicati (B-E: regione peritumorale; F-K: regione intratumorale). Gli anticorpi utilizzati per l'immunoistochimica sono indicati in ciascun pannello. Nei pannelli H-K sono mostrati rispettivamente le cellule CD3+ (cellule T), PD-1+ (T o NK), NKp46+ e ROR γ T+. Le cellule NK sono identificate come cellule NKp46+ ROR γ T-. Nel pannello (C) sono mostrate le cellule NKp46+ in rosso, nel pannello (D) le cellule PD-1+ in marrone e nel pannello (E) la co-localizzazione di NKp46 e PD-1 (freccie). Nel pannello (G) sono mostrate le cellule tumorali PD-L1+. HE: Ematossilina-Eosina (pannelli a e f). La barra della scala in (B) è valida per tutti i pannelli.

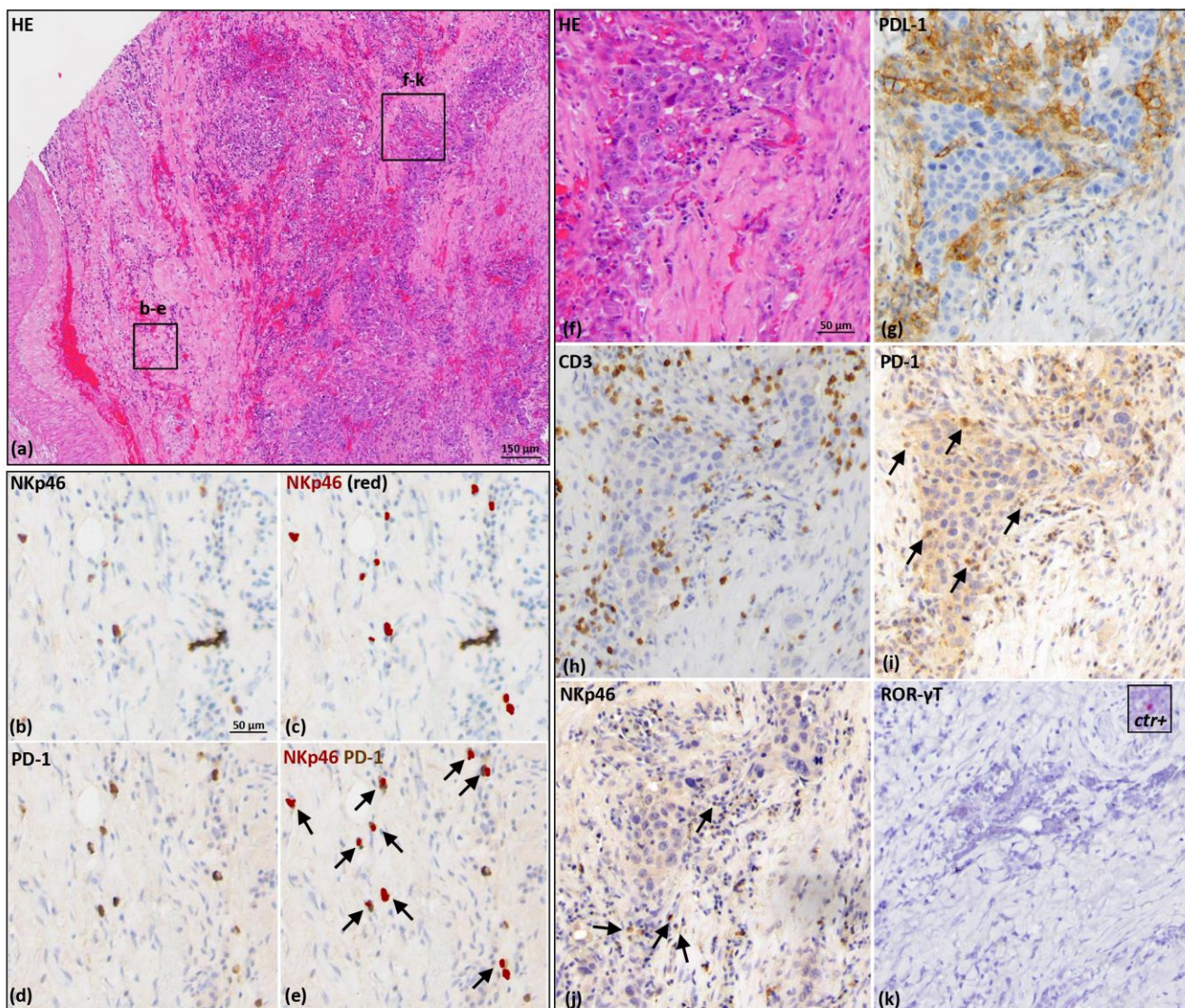


Figura 10. Analisi immunoistochimica di metastasi di carcinoma ovarico sieroso di alto grado che mostra infiltrati che esprimono marcatori di cellule NK e PD-1.

(A) Ingrandimento dell'OC metastatico in cui sono racchiuse due regioni ingrandite nei pannelli indicati (B-E: regione peritumorale; F-K: regione intratumorale). Gli anticorpi utilizzati per l'immunoistochimica sono indicati in ciascun pannello. Nei pannelli H-K sono mostrati rispettivamente le cellule CD3+ (cellule T), PD-1+ (T o NK), NKp46+ e ROR γ t+. Le cellule NK sono identificate come cellule NKp46+ ROR γ t-. Nel pannello (C) sono mostrate le cellule NKp46+ in rosso, nel pannello (D) le cellule PD-1+ in marrone e nel pannello (E) la co-localizzazione di NKp46 e PD-1 (freccie). Nel pannello G sono mostrate le cellule tumorali PD-L1+. HE: Ematossilina-Eosina (pannelli A e F). La barra della scala in (B) è valida per tutti i pannelli.

7. Esperimenti pilota per lo xenotrapianto di cellule tumorali in zebrafish

L'uso di zebrafish come modello di xenotrapianto è emerso di recente come un modello di sistema versatile, semplice, veloce ed economico che può essere utilizzato per sostituire il modello di xenotrapianto di topo nella ricerca sulle metastasi del cancro e per valutare la potenziale attività dei farmaci antitumorali. Grazie all'esistenza di un'alta omologia tra il genoma umano e quello di zebrafish si è evidenziato che le cellule tumorali umane trapiantate in zebrafish sono in grado di rispondere alle citochine prodotte in questo microambiente e di sfruttarne lo stroma per favorire la progressione del tumore.

Diverse linee cellulari tumorali, tra cui carcinoma pancreatico, carcinoma ovarico, glioma, carcinoma alla mammella al seno, cancro alla prostata, sarcoma di Ewing e leucemia, sono stati xenotrapiantati con successo in embrioni di zebrafish e alcuni di questi modelli di xenotrapianto sono stati successivamente utilizzati per lo screening di piccoli composti con funzioni antitumorali.

Gli xenotrapianti sono convenienti per diverse caratteristiche: presentano un costo basso rispetto ad altri esperimenti in vivo, il saggio è veloce e vengono iniettate solo poche cellule tumorali (in genere tra 50 e 300 cellule per embrione). Inoltre, a causa dell'assenza di un sistema immunitario funzionante negli stadi embrionali e larvali precoci di zebrafish, le cellule trapiantate non vengono rigettate (Pascoal S., *Cancers* 2020).

Durante il mio tirocinio ho pertanto partecipato alla creazione di un modello di xenotrapianto di zebrafish in vivo come strumento utile per lo screening/validazione degli approcci antitumorali basati sulle cellule NK. Lo scopo è quello di analizzare le interazioni tra cellule NK e cellule di carcinoma ovarico OVCAR5 nel microambiente che si stabilizza in un modello in vivo.

Le cellule tumorali marcate con Biotracker 490 (fluorescenza verde) e le cellule NK marcate con CiM-Dil (fluorescenza rossa) sono state iniettate nel sacco vitellino di embrioni di zebrafish a 24 ore post-fecondazione. A partire dalle 24 ore post-impianto abbiamo monitorato sia le dimensioni del tumore nel sito di iniezione sia la capacità delle cellule tumorali di migrare in siti distanti, andando a identificare le cellule marcate al di fuori della regione del sacco vitellino (nella testa, nel tronco e/o nella coda). Abbiamo inoltre valutato l'accumulo e la persistenza delle cellule NK nel sito del tumore e la loro capacità di ridurre le dimensioni del tumore.

In **Figura 11** mostriamo alcuni risultati dei nostri esperimenti che mostrano come iniettando cellule NK non attivate, dopo 24 ore dall'iniezione le cellule OVCAR5 sono capaci di proliferare e migrare nella coda (Figura 11, E-F). Al contrario usando cellule NK preattivate con citochine derivati dagli stessi donatori utilizzati nei pannelli E-F, le cellule tumorali diminuiscono (Figura 11, G-J) e la loro migrazione di conseguenza è compromessa. Questi esperimenti mostrano una persistenza delle cellule NK nel microambiente di zebrafish supportando la fattibilità degli esperimenti progettati nel modello da noi generato.

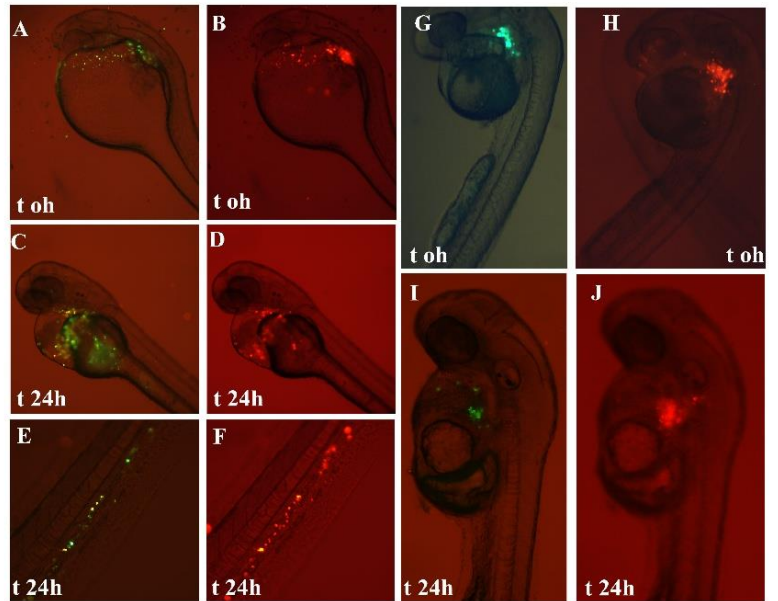
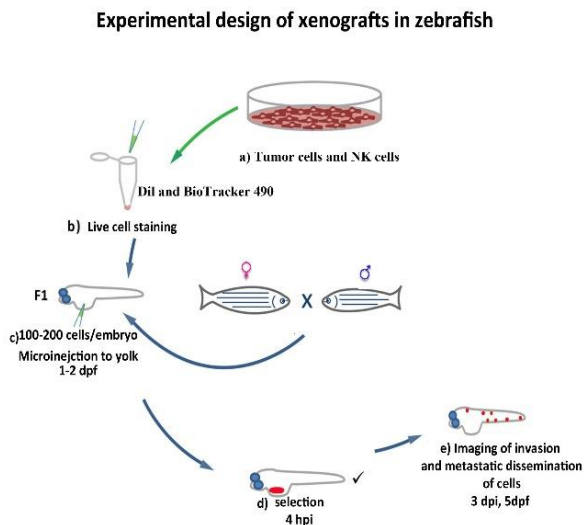


Figura 11. Xenograft di cellule tumorali in larve di zebrafish.

(A-J) Circa 250 cellule OVCAR5 marcate in verde con BioTracker 490 e cellule NK marcate in rosso con CM-Dil sono state co-iniettate nello spazio perivitellino di larve di 24 ore post-fecondazione. (A-F) Risultati rappresentativi osservabili utilizzando cellule NK non attivate che mostrano la proliferazione e migrazione delle cellule OVCAR5 nella coda. (G-J) Risultati rappresentativi osservabili utilizzando cellule NK preattivate con citochine che mostrano l'inibizione della crescita tumorale.

8. Referenze

- Agata, Y. et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* 8, 765–772 (1996)
- Alcami A and Koszinowski UH (2000) Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today* 21, 447-55
- Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, and Garrido F. (2004) The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 53, 904-10
- Anderson A.C., Joller N., Kuchroo V.K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity*, 44 (5) (2016), pp. 989-1004
- André P, et al., Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell*. 2018 Dec 13
- Baixeras E. et al., Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens *J. Exp. Med.*, 176 (2) (1992), pp. 327-337
- Baumeister, S. H., Freeman, G. J., Dranoff, G. & Sharpe, A. H. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 539–573 (2016).
- Beldi-Ferchiou, A. et al. PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget* 7, 72961–72977 (2016).
- Bolland S and Ravetch JV. (1999) Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors. *Adv Immunol* 72, 149-77.
- Bottino C, Biassoni R, Millo R, Moretta L and Moretta A. (2000) The human natural cytotoxicity receptors (NCR) that induce HLA class I-independent NK cell triggering. *Hum Immunol* 61, 1-6.
- Bottino C, Vitale M, Olcese L, Sivori S, Morelli L, Augugliaro R, Ciccone E, Moretta L, and Moretta A. (1994) The human natural killer cell receptor for major histocompatibility complex class I molecules. Surface modulation of p58 molecules and their linkage to CD3 zeta chain, Fc epsilon RI gamma chain and the p56lck kinase. *Eur J Immunol* 24, 2527-34.
- Bottino, C. et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* 198, 557–567 (2003).
- Bowtell, D. D. et al. Rethinking ovarian cancer II: Reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nature Reviews Cancer* vol. 15 668–679 (2015).
- Brandt, C. S. et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* 206, 1495–1503 (2009).
- Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, and McMichael AJ. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795-799
- Burshtyn DN, Scharenberg AM, Wagtmann N, Rajagopalan S, Berrada K, Yi T, Kinet J. P, and Long E. O. (1996) Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 4, 77-85.
- Campbell K. S, Dessing M, Lopez-Botet M, Cella M, and Colonna M. (1996) Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 184, 93-100.

- Carlsten, M. *et al.* Primary Human Tumor Cells Expressing CD155 Impair Tumor Targeting by Down-Regulating DNAM-1 on NK Cells. *J. Immunol.* 183, 4921–4930 (2009).
- Cecere, S. C. *et al.* Olaparib as maintenance therapy in patients with BRCA 1–2 mutated recurrent platinum sensitive ovarian cancer: Real world data and post progression outcome. *Gynecol. Oncol.* 156, 38–44 (2020).
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* vol. 22 633–640 (2001).
- Cosman, D. *et al.* A Novel Immunoglobulin Superfamily Receptor for Cellular and Viral MHC Class I Molecules. *Immunity* vol. 7 (1997)
- Da Silva, I. P. *et al.* Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunol. Res.* 2, 410–422 (2014)
- Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350–354 (2006).
- Della Chiesa M, Pesce S, Muccio L, Carlomagno S, Sivori S, Moretta A, Marcenaro E. Features of Memory-Like and PD-1(+) Human NK Cell Subsets. *Front Immunol.* 2016 Sep 14 Di Vito, C. *et al.* NK cells to cure cancer. *Seminars in Immunology* vol. 41 101272 (2019).
- Gajewski, T. F. & Kline, J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood* 114, 1545–1552 (2009).
- Garni-Wagner BA, Purohit A, Mathew PA, Bennett M, Kumar V. A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol.* 1993 Jul 1
- Graef T, Moesta AK, Norman PJ, Abi-Rached L, Vago L, Older Aguilar AM, Gleimer M, Hammond JA, Guethlein LA, Bushnell DA, Robinson PJ, Parham P. (2009) KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med.* 206(11):2557-72.
- Greppi M, Tabellini G, Patrizi O, Candiani S, Decensi A, Parolini S, Sivori S, Pesce S, Paleari L, Marcenaro E. Strengthening the AntiTumor NK Cell Function for the Treatment of Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb
- Hashemi, E. & Malarkannan, S. Tissue-Resident NK Cells: Development, Maturation, and Clinical Relevance. *Cancers (Basel).* 12, 1553 (2020).
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: An 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356, 1795–1799 (2000).
- López-Soto, A., Gonzalez, S., Smyth, M. J. & Galluzzi, L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell* vol. 32 135–154 (2017).
- Jemal A. *et al.*, Global cancer statistics
- Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology* vol. 26 677–704 (2008).
- Kulbe H., Chakravarty P., Leinster D.A., Charles K.A., Kwong J., Thompson R.G., Coward J.I., Schioppa T., Robinson S.C., Gallagher W.M., *et al.* A dynamic inflammatory cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment. *Cancer Res.* 2012
- Ljunggren, H. G. & Kärre, K. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11, 237–244 (1990)
- Marcenaro, E., Dondero, A. & Moretta, A. Multi-directional cross-regulation of NK cell function during innate immune responses. *Transplant Immunology* vol. 17 16–19 (2006).

- Martinet, L. & Smyth, M. J. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nature Reviews Immunology* vol. 15 243–254 (2015).
- Matulonis, U. A. *et al.* Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: results from the phase II KEYNOTE-100 study. *Ann. Oncol.* **30**, 1080–1087 (2019).
- Mirza, M. R. *et al.* Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 2154–2164 (2016).
- Moretta A, Bottino C, Pende D *et al.* (1990) Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 172: 1589-1598
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. (1996) Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol*; 14:619-48;
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari M. C, Biassoni R, and Moretta L. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19, 197-223.
- Moretta A, Sivori S, Vitale M, Pende D, Morelli L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L. (1995) Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med.* 182(3):875-84.
- Moretta A. *et al.* Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol.* 2005 Dec
- Moretta L, Biassoni R, Bottino C *et al* (2000) Human NK-cell receptors. *Immunol Today* 21: 420-422
- Moretta L. Biassoni R. Bottino C. Mingari M.C. Moretta A. Natural Killer Cells: A Mystery No More First published: 04 April 2002
- Niu, C. *et al.* Pd-1-positive natural killer cells have a weaker antitumor function than that of pd-1-negative natural killer cells in lung cancer. *Int. J. Med. Sci.* 17, 1964–1973 (2020).
- Okazaki, T. & Honjo, T. PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application. *International Immunology* vol. 19 813–824 (2007).
- Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S. & Honjo, T. A rheostat for immune responses: The unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nature Immunology* vol. 14 1212–1218 (2013).
- Pascoal S, Salzer B, Scheuringer E, Wenninger-Weinzierl A, Sturtzel C, Holter W, Taschner Mandl S, Lehner M, Distel M. A Preclinical Embryonic Zebrafish Xenograft Model to Investigate CAR T Cells In Vivo. *Cancers (Basel).* 2020 Feb 29
- Pende D, Cantoni C, Rivera P, Vitale M, Castriconi R, Marcenaro S, Nanni M, Biassoni R, Bottino C, Moretta A, and Moretta L. (2001) Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 31, 1076-86.
- Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, and Moretta A. (1999) Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1505-16.
- Pesce S, Greppi M, Grossi F, Del Zotto G, Moretta L, Sivori S, Genova C, Marcenaro E. PD/1-PDLs Checkpoint: Insight on the Potential Role of NK Cells. *Front Immunol.* 2019 Jun 4

- Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2017
- Pesce S, Tabellini G, Cantoni C, Patrizi O, Coltrini D, Rampinelli F, Matta J, Vivier E, Moretta A, Parolini S, Marcenaro E. (2015b) B7-H6-mediated downregulation of NKp30 in NK cells contributes to ovarian carcinoma immune escape. *Oncoimmunology*
- Pesce S., Vellone V.G., Marcenaro E., *Cancers*, 2020 Female Malignancies and Immunotherapy: What's New?
- Pesce, S. *et al.* B7-H6-mediated downregulation of NKp30 in NK cells contributes to ovarian carcinoma immune escape. *Oncoimmunology* 4, e1001224 (2015).
- Pesce, S. *et al.* Different Features of Tumor-Associated NK Cells in Patients With Low-Grade or High-Grade Peritoneal Carcinomatosis. *Front. Immunol.* 10, 1963 (2019).
- Pesce, S. *et al.* miRNAs in NK Cell-Based Immune Responses and Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 8 (2020).
- Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, Biassoni R, Moretta A. (1998) Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med*; 188:953-60;
- Quatrini, L. *et al.* Endogenous glucocorticoids control host resistance to viral infection through the tissue-specific regulation of PD-1 expression on NK cells. *Nat. Immunol.* 19, 954–962 (2018).
- Ribas A., Wolchok J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359 (6382) (2018), pp. 1350-1355
- Ribas, A. Tumor Immunotherapy Directed at PD-1. *N. Engl. J. Med.* 366, 2517–2519 (2012).
- Roberto, A. *et al.* The early expansion of anergic NKG2A pos /CD56 dim /CD16 neg natural killer represents a therapeutic target in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* **103**, 1390–1402 (2018).
- Robertson M. J, and Ritz J. (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421-38.
- Romagnani, C. *et al.* CD56 bright CD16 – Killer Ig-Like Receptor – NK Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56 dim NK Cells upon Activation. *J. Immunol.* 178, 4947–4955 (2007).
- Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 207, 2187–2194 (2010).
- Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* vol. 348 69–74 (2015).
- Sharma, P. & Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* (80-.). 348, 56–61 (2015).
- Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, Kitamura T, Nicholl J, Sutherland G. R, Lanier L. L, and Phillips J. H. (1996) DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4, 573-81.
- Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Vitale M, Marcenaro E. TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol.* 2014 Mar
- Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, Moretta L, Moretta A. (1999) NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol*; 29:1656-66;

- Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. (1997) p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med*; 186:1129-36;
- Sivori S. et al., Inhibitory Receptors and Checkpoints in Human NK Cells, Implications for the Immunotherapy of Cancer, 2020
- Slatnik, C. L. P. & Duff, E. Ovarian cancer: Ensuring early diagnosis. *Nurse Pract.* 40, 47–54 (2015).
- Solomon, B. L. & Garrido-Laguna, I. TIGIT: a novel immunotherapy target moving from bench to bedside. *Cancer Immunology, Immunotherapy* vol. 67 1659–1667 (2018).
- Stabile, H. et al. Multifunctional human CD56^{low}CD16^{low} natural killer cells are the prominent subset in bone marrow of both healthy pediatric donors and leukemic patients. *Haematologica* **100**, 489–498 (2015).
- Stewart CA, Laugier-Anfossi F, Vély F, Saulquin X, Riedmuller J, Tisserant A, Gauthier L, Romagné F, Ferracci G, Arosa FA, Moretta A, Sun PD, Ugolini S, Vivier E. (2005) Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(37):13224-9.
- Taborda, N. A. et al. Short Communication: Low Expression of Activation and Inhibitory Molecules on NK Cells and CD4 + T Cells Is Associated with Viral Control. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 31, 636–640 (2015).
- Vari, F. et al. Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* 131, 1809–1819 (2018).
- Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, and Moretta A. (1998) NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187, 2065-72
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011
- Vivier, E. & Daëron, M. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunology Today* vol. 18 286–291 (1997).
- Vulpis, E. et al. Key role of the CD56^{low}CD16^{low} natural killer cell subset in the recognition and killing of multiple myeloma cells. *Cancers (Basel)*. **10**, (2018).
- Wang P., Gyllner G., Kvist S. Selection and binding of peptides to human transporters associated with antigen processing and rat cim-a and -b. *J. Immunol.*, 157 (1) (1996), pp. 213-220
- Watanabe, T., Bertoletti, A. & Tanoto, T. A. PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* vol. 17 453–458 (2010).
- Wolchok, J. D. et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369, 122–133 (2013).
- Wu J, Song Y, Bakker A. B, Bauer S, Spies T, Lanier L. L, and Phillips J. H. (1999) An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730-2.
- Xu F. et al. LSECtin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res.*, 74 (13) (2014), pp. 3418-3428
- Yeap, W. H. et al. CD16 is indispensable for antibody dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* **6**, 1–22 (2016).

Ringraziamenti

Desidero ringraziare le professoresse Emanuela Marcenaro e Simona Candiani, relatrici di questa tesi, per avermi sostenuta e sopportata con pazienza ed entusiasmo in questo percorso, e per avermi trasmesso la passione per la ricerca.

Ringrazio la mia famiglia, per primi i miei genitori che, grazie ai loro sacrifici, hanno contribuito al raggiungimento di questo traguardo e mi hanno permesso di renderli orgogliosi. Spero sia per voi l'inizio di una lunga serie di soddisfazioni.

Ringrazio nonna Angela, i suoi occhi pieni di gioia per un bel voto e il suo rimprovero per uno meno bello mi hanno spinto sempre a dare il massimo. Una dedica speciale è per nonno Gaetano, il mio sostenitore numero uno, che ha sempre fatto di ogni mio traguardo il motivo del suo orgoglio. Grazie per avermi incoraggiata a studiare e per non avere mai lasciato la mia mano.

Ringrazio le mie amiche da sempre, Francesca, Michelle, Alessia e Teresa, per essere sempre accanto a me. Ringrazio di cuore anche Nevio e tutti i miei grandi amici, che sono la mia seconda famiglia; stasera vi tocca festeggiare!

Un grazie speciale va a Gabriele, per avere creduto in me sin dall'inizio ed avermi sostenuta in ogni momento. Sei un esempio da seguire per me.

Infine, mi auguro di raggiungere qualunque obiettivo io mi ponga, di superare con serenità le difficoltà che incontrerò durante il mio percorso e di migliorarmi ogni giorno.