



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO

DIPARTIMENTO DI ONCOLOGIA

Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche ed Oncologia Umana

Indirizzo Oncologia Umana

Ciclo XXXI

**Espressione intrinseca del recettore PD-1 in NSCLC: ruolo
funzionale e potenziale modulazione terapeutica**

Tesi presentata da: Dott.ssa Ramona Rotolo

Tutors:

Prof. Massimo Aglietta

Dott. Dario Sangiolo

Coordinatore del Dottorato: Prof. Emilio Hirsch

Anni Accademici: 2018-2019

Settore Scientifico-Disciplinare di Afferenza: MED/06

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	pag.6
1. Le diverse funzioni della via inibitoria della proteina recettoriale Programmed Cell Death 1 (PD-1).....	pag.7
1.1 Espressione ed attivazione di PD-1.....	pag.7
1.2 Struttura del recettore PD-1 ed attivazione delle vie di segnale	pag.8
1.3 Ruolo immunoregolatorio di PD-1	pag.10
1.4 Inibizione dell'attività anti-tumorale del sistema immunitario.....	pag.11
1.5. Inibizione dell'asse di PD-1 ed effetti nelle terapie anti-tumorale.....	pag.12
2. Il tumore del polmone non a piccole cellule (NSCLC).....	pag.15
2.1 NSCLC: trattamenti correnti e future terapie.....	pag.15
2.2 Applicazione clinica e studi clinici della terapia anti-PD-1 nel NSCLC.....	pag.17
3. Espressione intrinseca di PD-1 sul tumore.....	pag.18
3.1 Espressione di PD-1 su cellule di melanona	pag.19
CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO.....	pag.22
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI.....	pag.25
5.1 Valutazione bioinformatica dell'espressione dell'mRNA.....	pag.26
5.2 Coltura di linee tumorali di NSCLC.....	pag.26
5.3 Coltura di cellule tumorali primarie di NSCLC.....	pag.27
5.4 Coltura di pneumosfere stem-like.....	pag.27

5.5	Valutazione citofluorimetrica dell'espressione di PD-1.....	pag.27
5.6	Valutazione dei livelli di espressione dell'mRNA di PD-1.....	pag.28
5.7	Valutazione dell'espressione di PD-1 mediante Western blot.....	pag.28
5.8	Valutazione dell'espressione di PD-1, PDL-1 e PDL-2 su pneumosfere mediante immunofluorescenza.....	pag.29
5.9	Trasduzione con il vettore LV-Oct-4.eGFP.....	pag.30
5.10.	Inibizione dell'espressione di PD-1 mediante RNA Interference.....	pag.30
5.11	Generazione della linea di pneumosfere H1975PD-1 KO.....	pag.31
5.12	Farmaci.....	pag.31
5.13	Valutazione dei livelli di fosforilazione delle proteine chinasi.....	pag.32
5.14	Analisi statistica.....	pag.32
CAPITOLO 4: RISULTATI.....		pag.33
6.1	Espressione dell'mRNA di PD-1 in NSCLC	pag.34
6.2	PD-1 è espresso da una limitata frazione cellulare in NSCLC.....	pag.35
6.3	L'espressione di PD-1 in NSCLC aumenta in condizioni di staminalità.....	pag.36
6.4	PD-1 trasduce un segnale pro-tumorigenico promuovendo la formazione di pneumosfere stem-like.....	pag.39
6.5	Aumento della frazione cellulare PD-1 ⁺ dopo trattamento con chemioterapia....	pag.41

6.6 Il trattamento con anticorpo bloccante anti-PD-1 inibisce la ripresa proliferativa delle cellule di NSCLC dopo chemioterapia.....	pag.43
6.7 Valutazione delle vie di segnale attivate da PD-1 sulle NSCLC.....	pag.44
CAPITOLO 5: DISCUSSIONE.....	pag.45
CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA.....	pag.51
CAPITOLO 7: RIASSUNTO.....	pag.57
CAPITOLO 8: RINGRAZIAMENTI.....	pag.64

INTRODUZIONE

1. Le diverse funzioni della via inibitoria della proteina recettoriale *Programmed Cell Death 1 (PD-1)*

1.1 Espressione ed attivazione di PD-1

Il sistema immunitario adattativo si è evoluto per eliminare virtualmente ogni forma di minaccia dall'organismo grazie all'azione combinata dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ e dei linfociti B. Il sistema immunitario allo stesso tempo deve risparmiare le cellule sane e mantenere la tolleranza verso i tessuti dell'organismo stesso. Questo è possibile grazie a multipli controlli ed equilibri che si instaurano durante la risposta immunitaria e che si hanno sia durante lo sviluppo dei linfociti negli organi centrali linfoidi (tolleranza centrale) sia in periferia (tolleranza periferica).

Per quanto riguarda i linfociti T, diversi meccanismi regolatori sono indotti nella fase iniziale di attivazione antigene-mediata, che coinvolge innanzitutto il legame del peptide presentato dalla molecola MHC e il recettore dei linfociti T (TCR) e poi i segnali di co-stimolazione positiva derivanti, per esempio, dall'interazione tra il CD28 sui linfociti T e il CD80 (noto anche come B7.1) e/o CD86 (B7.2) sulle cellule presentanti l'antigene (APC). Nella fase precoce di attivazione, segnali di regolazione negativa sono indotti per controbilanciare il programma di attivazione. La proteina recettoriale *Programmed cell death protein 1* (PD1, nota anche come PDCD1 e CD279) viene espressa e contrasta il segnale positivo del TCR e del CD28 ingaggiando i suoi ligandi PD-L1 (noto anche come CD274 e B7-H1)¹⁻³ e PD-L2 (CD273 e B7-DC), chiamati collettivamente Ligandi di PD-1^{4,5}. PD-1 non è espresso dai linfociti T naïve ma la sua espressione avviene durante la fase iniziale di attivazione mediata dall'antigene attraverso il TCR. Diversi fattori di trascrizione regolano l'espressione di PD-1 nei linfociti T attivati, i più importanti sono: *nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1* (NFATC1), *forkhead box protein O1* (FOXO1), T-bet (noto anche come TBX21) and *B lymphocyte-induced maturation protein 1* (BLIMP1) e *serine-threonine kinase glycogen synthase kinase 3* (GSK3)^{6,7}. Sebbene la

maggior regolazione dell'espressione di PD-1 derivi dall'ingaggio del TCR sui linfociti T, esistono anche meccanismi TCR-indipendenti. L'espressione di PD-1 potrebbe subire anche una regolazione epigenetica, ma sono necessari ulteriori studi per capire come queste alterazioni possano controllare l'espressione di PD-1^{8,9}. I recettori co-inibitori come PD-1 funzionano come punti di controllo per il sistema immunitario che devono essere superati per esercitare la sua piena funzione.

1.2 Struttura del recettore PD-1 ed attivazione delle vie di segnale

La proteina PD-1 è un recettore di superficie cellulare scoperto nel 1992 da Tasuku Honjo et al. all'Università di Kyoto da uno screening di geni coinvolti nella morte cellulare programmata appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline B7-CD28, ed è uno dei più importanti co-recettori inibitori espressi dalle cellule T. L'espressione di PD-1 è indotta rapidamente attraverso il segnale dato dal TCR ed è modulata da citochine¹⁰⁻¹³. La proteina PD-1 consiste di un dominio N-terminale seguito da un dominio transmembrana di circa 20 amminoacidi e una coda citoplasmatica contenente 2 residui indipendenti di tirosina: un "immuno receptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) prossimale alla membrana e un "immuno receptor tyrosine-based switch motif (ITSM)¹⁴. PD-1 può inibire la funzione dei linfociti T reclutando delle fosfatasi sul motivo ITSM della coda citoplasmatica, SHP2 è la fosfatasi chiave che media il segnale di PD-1¹⁵. Le fosfatasi reclutate possono spegnere l'attivazione dei linfociti T inibendo, per esempio, le proteine ZAP70¹⁶ e le vie di segnale di *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)-AKT, RAS, *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK), VAV and *phospholipase Cγ* (PLCγ)¹⁷⁻¹⁹. Nell'insieme questo porta ad una minore attivazione di fattori di trascrizione, come *Activator Protein 1* (AP-1), *Nuclear Factor of Activated T cells* (NFAT) and *Nuclear Factor-κB* (NF-κB), importanti per guidare l'attivazione, la proliferazione, la sopravvivenza, la produzione di citochine e alterare il metabolismo dei linfociti T. PD-1 inoltre può inibire i linfociti T

aumentando l'espressione di fattori di trascrizione come *Basic leucine zipper Transcriptional Factor ATF-like* (BATF)²⁰.

PD-1 riconosce e lega PD-L1 e PD-L2 entrambi appartenenti alla famiglia di geni B7^{2,4,6}. Queste 2 proteine presentano una struttura simile ma differenti cinetiche ed espressione su tipologie diverse di cellule⁶. PD-L1 è ampiamente espresso in quasi tutti i tessuti sani e in vari tipi tumorali (NSCLC, melanoma, carcinoma renale, gastrico, epatocarcinoma, tumori cutanei, varie leucemia, mieloma multiplo)^{21,22}. Segnali pro-infiammatori sono in grado di indurre un aumento dei livelli di espressione di PD-L1^{6,23-25}. L'espressione di PD-L2, invece, è più ristretta e la si trova prevalentemente su cellule dendritiche, macrofagi⁶ e linfociti B^{26,27}. La sua espressione è generalmente molto bassa in condizioni normali ma, come per PD-L1, è aumentata da stimoli infiammatori. Entrambi i ligandi di PD-1 possono essere espressi dalle cellule tumorali, il più comunemente espresso su queste cellule è PD-L1^{21,22}.

Le citochine (INF γ , LPS, GM-CSF, IL-4 e IL-10) sono regolatori cruciali dell'espressione di PD-L1 e PD-L2, in particolare gli interferoni di tipo I e tipo II sono tra i più potenti attivatori di PD-L1^{1,6,23,24,26}. La capacità degli interferoni di regolare PD-L1 ha contribuito alla nascita del concetto di "resistenza adattativa", che afferma che le citochine pro-infiammatorie prodotte dai linfociti T infiltranti il tumore (TIL) inducono un incremento dei livelli di PD-L1 e quindi promuovono l'immunosoppressione nel microambiente tumorale²⁸.

Numerosi studi evidenziano una connessione tra il segnale mediato da PD-1 e lo stato metabolico dei linfociti T²⁹⁻³². Durante la loro attivazione, per produrre l'energia di cui hanno bisogno per la proliferazione e differenziazione, la glicolisi aerobica aumenta e diminuisce la fosforilazione ossidativa³². Il segnale mediato da PD-1 influenza la programmazione dello stato metabolico durante la fase di attivazione, inibendo l'aumento del metabolismo del glucosio e della glutammina, che è guidato dai segnali provenienti dal

TCR e dal CD28³⁰. Il blocco di PD-1 invece promuove l'attività glicolitica nei TIL³¹. Considerando che la competizione metabolica nel microambiente tumorale può provocare la progressione tumorale rendendo i linfociti T iporesponsivi attraverso la deprivazione del glucosio, la comprensione di come il metabolismo regoli PD-1 e i suoi ligandi e di come il segnale mediato da PD-1 agisca sul metabolismo della cellula sta divenendo sempre più importante. Composti che possano attivare direttamente vie di segnale chiavi del metabolismo, incluse le vie di *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), *AMP-activated protein kinase* (MAPK) e *PPAR γ co-activator 1 α* (PGC1 α), potrebbero agire in sinergia con i bloccanti di PD-1 per aumentare l'efficacia di questa terapia³³.

1.3 Ruolo immunoregolatorio di PD-1

Sebbene PD-1 abbia ricevuto considerevole attenzione per il suo ruolo nell'esaurimento funzionale dei linfociti T e nell'immunosoppressione nel tumore, PD-1 non ha solo questo ruolo. I linfociti T attivati esprimono PD-1 durante l'attivazione, quindi PD-1 è un marcatore dei linfociti T effettori. PD-1 inoltre è espresso da una sottopopolazione di linfociti T tolleranti, regolatori (T_{reg}), follicolari helper (T_{fh}), follicolari regolatori (T_{FR}) e della memoria^{6,34} e da diversi altri tipi di cellule come i linfociti B, le cellule natural killer (NK), alcune cellule mieloidi³⁵ e alcune cellule tumorali³⁶⁻³⁸. Linfociti T CD8⁺ si possono trovare nella circolazione sanguigna di individui sani e non hanno il fenotipo di linfociti T esausti³⁹. Di conseguenza, la via di segnale di PD-1 può avere diversi contesti: il luogo, il tempo di attivazione, lo stato differenziativo dei linfociti T, i livelli di infiammazione, lo stato metabolico e altri fattori influenzano l'esito dell'attivazione del recettore PD-1.

Funzione cruciale di PD-1 è limitare la risposta immunologica nei tessuti promuovendo la risoluzione dell'infiammazione e il ritorno dell'omeostasi immunitaria: PD-1 è espresso da tutti i linfociti T durante l'attivazione ed agisce come un freno per evitare una eccessiva

risposta dei linfociti T stessi. In assenza di PD-1, i danni causati ai tessuti per l'eccessiva attivazione dei linfociti possono provocare serie conseguenze per l'organismo ospite²⁷.

Poiché il ruolo di PD-1 è di modulare in maniera fine il segnale del TCR, PD-1 di conseguenza ha un ruolo anche nella formazione dei linfociti T della memoria e la loro risposta. Multipli fattori che avvengono nella fase iniziale di attivazione dei linfociti T contribuiscono alla quantità e qualità del pool di linfociti T della memoria che si forma in seguito all'eliminazione di un antigene⁴⁰. PD-1 inoltre esercita un ruolo importante nella tolleranza centrale e periferica, favorendo la protezione dei tessuti da risposte auto-immuni. Durante lo sviluppo nel timo PD-1 ha un ruolo nel regolare l'intensità del segnale del TCR durante la selezione positiva e in periferia ha diversi ruoli nel regolare i linfociti T autoreattivi⁴¹⁻⁴³.

1.4 Inibizione dell'attività anti-tumorale del sistema immunitario

La via di segnale del PD-1 viene utilizzata sia da patogeni in infezioni croniche sia da cellule tumorali per evadere il sistema immunitario. Il blocco del legame tra PD-1 e i ligandi di PD-1 può migliorare la funzionalità dei linfociti T e quindi portare a una riduzione della carica virale o della dimensione del tumore.

Il tumore fornisce un esempio unico di inibizione della risposta immunitaria mediata da PD-1. PD-1 ha la potenzialità di fermare la migrazione dei linfociti T verso il tumore e impedire le loro funzioni dopo essere stati attivati. Il contributo di PD-1 in questa fase probabilmente varia da tumore a tumore⁴⁴⁻⁴⁸, data l'alta eterogeneità tra microambienti tumorali e i meccanismi di tolleranza tessuto-specifici. Le mutazioni che avvengono nel tumore possono provocare una robusta risposta immunitaria, per questo motivo diverse strategie sono attualmente in uso per aumentare le risposte verso i neo-antigeni (per esempio indicando mutazioni con radio- o chemio-terapia)⁴⁹. I linfociti T che riconoscono i neo-antigeni possono comunque divenire esausti a causa di una stimolazione cronica e

dell'ambiente infiammatorio del tumore, in cui citochine pro-infiammatorie prodotte dai TIL possono inoltre indurre l'espressione dei ligandi di PD-1 sul tumore e promuovere la resistenza adattativa e l'immunosoppressione^{27,50}.

Diversi studi in modelli murini di tumore hanno evidenziato un ruolo di PD-1 nel regolare la risposta immunitaria anti-tumorale⁵¹⁻⁵³. In molti di questi modelli, i TIL over-esprimono PD-1 mentre le cellule tumorali esprimono i ligandi di PD-1. I modelli murini di tumore rispondono con diversa efficacia al blocco di PD-1 usato in mono-terapia. Cellule MCA di sarcoma e cellule MC38 di adenocarcinoma hanno riportato risposte migliori all'azione dell'anticorpo bloccante PD-1 rispetto alle cellule B16 di melanoma e le cellule MB49 di tumore alla vescica^{31,54,55}. La maggior parte di tumori nei modelli murini richiedono una combinazione di terapie per essere eradicati.

1.5. Inibizione dell'asse di PD-1 ed effetti nelle terapie anti-tumorali

La mancanza di un'effettiva risposta immunitaria ha spinto la messa a punto di farmaci che hanno come bersaglio molecole immunoregolatorie (checkpoint): gli anticorpi monoclonali inibitori dei checkpoint (ICIs).

Anticorpi monoclonali bloccanti PD-1 (anti-PD-1) sono stati tra i primi inibitori dei *checkpoint* immunitari introdotti nella pratica clinica rivelandosi rapidamente un promettente approccio terapeutico per il trattamento di vari tipi di tumore⁵⁶. Inizialmente l'applicazione dell'anticorpo anti-PD-1 era confinata al melanoma⁵⁷ ma in seguito il suo utilizzo è stato approvato per il trattamento di numerosi tipi di tumore. La più alta attività antitumorale dell'anti-PD-1 è stata osservata trattando tumori come il linfoma di HOGKIN, il carcinoma a cellule di MERKEL, tumori con elevata instabilità microsatellitare (MSI-H) e il melanoma desmoplastico, con tassi di risposta che raggiungevano il 50-80%⁵⁸. Successivamente tassi di risposta relativamente alti 20-40% sono stati osservati anche in tumori con elevata immunogenicità come il melanoma metastatico, carcinoma polmonare

non a cellule piccole (NSCLC), carcinoma a cellule renali (RCC) e carcinoma epatocellulare (HCC)⁵⁸.

Dall'approvazione nel settembre 2014 dell'anticorpo anti-PD-1 "Pembrolizumab" per il trattamento del Melanoma in stadio avanzato ad oggi, sono stati condotti almeno 500 studi clinici che hanno testato 9 anticorpi anti-PD-1 prodotti da 8 aziende farmaceutiche diverse. Più recentemente l'FDA ha approvato l'anti-PD-1 "nivolumab" per il trattamento del melanoma in stadio avanzato, carcinoma a cellule squamose, NSCLC, tumore al fegato, linfoma di HODGKIN e per il carcinoma uroteliale. Il Pembrolizumab invece è stato approvato per il trattamento del melanoma non resecabile, il NSCLC in stadio avanzato e per il carcinoma del colon retto (CRC) con elevata instabilità microsatellitare (MSI-H).

L'approvazione da parte dell'FDA è giunta dopo studi clinici in cui la terapia anti-PD-1 ha riportato un gran successo in termini di tasso oggettivo di risposta complessiva, durata della risposta e aumento del tasso di sopravvivenza del paziente.

L'utilizzo di anticorpi bloccanti PD-1 o PD-L1 ha ottenuto grandi successi in studi clinici⁵⁹⁻⁶¹. Molti pazienti comunque non hanno raggiunto una remissione stabile dopo terapia anti-PD-1. Le relazioni tra il tumore e il sistema immunitario sono complesse, sia i tumori sia le risposte immunitarie sono diverse ed eterogenee ed entrambi influenzano la risposta alle terapie. Molti sforzi sono attualmente dedicati per definire i biomarcatori che possano predire quali pazienti potranno beneficiare delle terapie anti-PD-1 in monoterapia o in combinazione ad altri trattamenti in caso di non risposta alla monoterapia.

In caso di utilizzo di anticorpi bloccanti PD-1 come monoterapia, la presenza di linfociti T CD8⁺ ai margini del tumore e alti livelli di espressione di PD-L1 nel tumore correlano con una migliore risposta⁶²⁻⁶⁴. In molti casi l'espressione di PD-L1 nei tumori correla con una infiltrazione di linfociti T CD8⁺, suggerendo la presenza di una risposta infiammatoria in corso^{26,65}. I livelli di PD-L1 comunque non sempre corrispondono con l'esito terapeutico del trattamento: alcuni tumori PD-L1⁺ rispondono molto poco al blocco di PD-1, mentre

alcuni tumori PD-L1⁻ rispondono molto bene^{59,60,66}. In alcuni tumori, delle mutazioni possono causare l'espressione costitutiva di PD-L1 anche in assenza di una risposta infiammatoria²⁶. Di conseguenza sono necessari multipli bio-marcatori per predire la risposta alla terapia con gli inibitori di PD-1⁶⁷.

Ci sono studi in corso dedicati a identificare una mappa di geni che possa predire la risposta all'utilizzo degli inibitori dei *checkpoints* immunitari⁶⁸. Altri studi hanno mostrato che una maggiore clonalità del TCR nel tumore correla con una migliore risposta agli inibitori di PD-1, suggerendo che una inferiore diversità di TCR o una più alta clonalità della popolazione di linfociti T possa correlare con una migliore risposta immunitaria agli inibitori di PD-1^{49,69}. Mutazioni somatiche nel tumore sono una opportunità per il sistema immunitario per sviluppare una risposta anti-tumorale. Un'analisi su una larga gamma di tumori umani ha rivelato che il numero di mutazioni somatiche che possono avvenire ha un vasto *range*, da basso (come nella leucemia mieloide e nel glioblastoma) ad alto (come nel melanoma e nel NSCLC)⁷⁰. Studi clinici hanno riportato vari gradi di correlazione tra la carica mutazionale e l'esito clinico a seguito di terapie con inibitori dei checkpoints immunitari (inibitori di PD-1 e CTLA-4)^{71,72}. Il melanoma e il NSCLC in genere hanno un alto carico mutazionale e le più alte frequenze di risposta all'inibizione di PD-1. Nel NSCLC⁷³⁻⁷⁶, alte frequenze di mutazioni correlano con durevoli benefici clinici dopo trattamento con pembrolizumab. Un gruppo di pazienti con NSCLC (5/18) comunque con alto grado di mutazioni non ha raggiunto una risposta durevole alla terapia⁷¹.

Questi dati supportano la nozione che le mutazioni somatiche possono correlare con una migliore risposta al blocco di PD-1, ma una bassa carica mutazionale non preclude necessariamente ai benefici⁷⁷.

La terapia anti PD-1 può essere combinata con altri tipi di terapia. Per comprendere come combinare le terapie con gli anticorpi bloccanti PD-1, è importante valutare come i diversi trattamenti convergono e possono influire sia sulla risposta immunitaria sia sul tumore

stesso, poiché entrambe le tipologie di risposta detteranno l'esito terapeutico. E' cruciale comprendere come le terapie vanno ad agire sulle vie di segnale intracellulare nel tumore e nel sistema immunitario, su diversi tipi di cellule e in diversi stadi differenziativi, o in luoghi anatomici diversi (per esempio in organi linfoidi secondari o nel microambiente tumorale). Strategie di combinazione di terapie con inibitori di PD-1 includono l'inibizione di altri recettori inibitori (es. LAG3, TIM3 o TIGIT); il blocco di citochine immunoregolatorie (es. IL-10 e l'interferone di tipo I); la somministrazione di agonisti per molecole, costimolatorie (es. CD40 or ICOS), la somministrazione di citochine omeostatiche (es. IL-2, IL-7 or IL-15); vaccini e la somministrazione di linfociti T ingegnerizzati^{78,79}.

2. Il tumore del polmone non a piccole cellule (NSCLC)

2.1 NSCLC: trattamenti correnti e future terapie

Il NSCLC si suddivide in 3 tipologie: carcinoma a cellule squamose (25-30% dei casi di tumore al polmone), adenocarcinoma (è la forma più comune, 40% dei casi di tumore al polmone), carcinoma a cellule larghe (5-10%)⁸⁰⁻⁸². A seconda della stadiazione, i pazienti sono eleggibili per determinati tipi di trattamento che vanno dalla chirurgia alla radioterapia alla chemioterapia e alla terapia a bersaglio molecolare.

Circa il 40% dei nuovi casi diagnosticati di NSCLC è allo stadio IV. Per pazienti allo stadio IV, la combinazione di chemioterapia è la prima linea di trattamento. La società *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) ha stabilito per i pazienti con un *performance status* (PS) 0-1 un regime di platino (cisplatino o carboplatino) più paclitaxel, gemcitabine, docetaxel, vinorelbine, irinotecan, o pemetrex⁸³. Studi con un singolo trattamento non hanno dimostrato superiorità rispetto a qualsiasi tipo di combinazione terapeutica. La sopravvivenza totale media per i pazienti in questi studi è di circa 8-10 mesi⁸⁴. Pazienti con un PS di 2 possono ricevere il trattamento singolo, tipicamente non a

base di platino⁸⁵. Pazienti con un PS di 3 di norma non hanno benefici dalla chemioterapia poiché il rischio di eventi avversi potrebbe peggiorare la loro qualità di vita in maniera significativa.

La medicina personalizzata con terapie a bersaglio molecolare ha contribuito a migliorare la sopravvivenza di pazienti con NSCLC⁸⁶. Mutazioni in importanti oncogeni come EGFR, BRAF e HER2 o il riarrangiamento di ALK e ROS1 sono presenti solo nella metà dei pazienti con adenocarcinoma, per gli altri pazienti con NSCLC privi di alterazioni geniche che non possano essere bersaglio delle terapie a bersaglio molecolare, l'unica possibilità terapeutica è rappresentata dalla convenzionale doppia terapia di mantenimento basata su platino^{87,88}.

Negli ultimi 10 anni l'immunoterapia basata sugli inibitori dei checkpoint immunitari (ICIs), in particolare gli inibitori dell'asse di PD-1, hanno modificato le modalità di trattamento del NSCLC. Inizialmente dimostratisi efficaci come seconda o successiva linea di trattamento nel migliorare l'esito in stadi avanzati, gli ICIs hanno migliorato la sopravvivenza totale in confronto alla chemioterapia in prima linea di trattamento per quei pazienti che esprimevano PD-L1 almeno sul 50% del tumore. Più recentemente, la combinazione degli ICIs con la chemioterapia ha migliorato la sopravvivenza di pazienti con NSCLC, indipendentemente dall'espressione di PD-L1. Nivolumab, una immunoglobulina monoclonale umana (Ig)G4 anti PD-1, è stato il primo inibitore di PD-1 approvato nel trattamento del NSCLC avanzato. Nivolumab è diventato un perno del trattamento in prima linea del NSCLC avanzato/metastatico senza alterazioni geniche⁸⁹. Attualmente i principali inibitori di PD-1 sono Nivolumab e Pembrolizumab⁶⁰.

2.2 Applicazione clinica e studi clinici della terapia anti-PD-1 nel NSCLC

Negli ultimi anni sono stati avviati numerosi studi clinici focalizzati alla valutazione dell'effetto antitumorale di ICIs in pazienti affetti da NSCLC. Attualmente per il

trattamento del NSCLC l'FDA ha approvato l'utilizzo di 3 tipi di ICI: 2 anti-PD-1 (nivolumab e pembrolizumab) e 1 anti-PDL-1 (atezolizumab).

L'efficacia della monoterapia con ICI è stata provata dalla seconda alla prima linea di trattamento. Grazie all'efficacia e profilo di sicurezza dimostrato da pembrolizumab nello studio clinico Keynote001, l'FDA ha approvato pembrolizumab come trattamento di seconda linea per il NSCLC avanzato. Successivamente, lo studio Keynote 001⁷⁶ ha dimostrato che rispetto al trattamento con docetaxel, pazienti positivi a PD-L1 (punteggio per la proporzione su tumore, TPS \geq 1%) potevano ottenere significativi benefici sulla sopravvivenza con il trattamento con pembrolizumab, specialmente coloro con TPS \geq 50%, l'incidenza di eventi avversi è stata bassa⁹⁰. I risultati inoltre dello studio Keynote 024 e 042 supportano l'uso di pembrolizumab in monoterapia come prima linea di trattamento per pazienti di NSCLC positivi all'espressione di PD-L1, soprattutto per espressioni elevate^{91,92}. Sebbene la terapia con ICI abbia già riformulato le strategie di trattamento nel NSCLC avanzato, vi è tuttora una grande proporzione di pazienti che non rispondono⁹³. È stato riportato che la chemioterapia basata su platino possa contribuire a sensibilizzare il tumore agli ICI incrementando l'infiltrazione dei linfociti T CD8⁺⁹⁴. Lo studio Keynote 021 è il primo studio in cui si è avuto successo nella combinazione di chemioterapia basata su platino e ICI per il trattamento di NSCLC avanzato negativo a mutazioni⁹⁵.

Indipendentemente dall'espressione di PD-L1, la frequenza di risposta oggettiva (objective response rate, ORR) è stata quasi il doppio in pazienti con pembrolizumab e chemioterapia, rispetto alla sola chemioterapia. Successivamente, gli studi Keynote 189 e 407 hanno riportato risultati simili nel carcinoma squamoso e non squamoso^{96,97}, rafforzando le evidenze per l'utilizzo della combinazione di ICI e chemioterapia come prima linea terapeutica. Gli studi Impower131 (NCT02367794) e 132 (NCT02657434) inoltre hanno raggiunto il loro obiettivo principale, provando che i pazienti possono

ottenere più benefici per la sopravvivenza e meno rischi dalla combinazione di atezolizumab e chemioterapia piuttosto che dalla singola chemioterapia.

Al congresso ASCO 2018, Borghaei et al. hanno riportato i risultati dell'analisi di un sottogruppo dello studio Checkmate 227 (NCT02477826): nivolumab più chemioterapia hanno una tendenza nel migliorare la sopravvivenza libera da malattia (patient free survival, PFS) rispetto alla singola chemioterapia in pazienti negativi per l'espressione di PD-L1. Nivolumab più chemioterapia, inoltre, può significativamente migliorare la frequenza di PFS a 1 anno in quei pazienti che hanno un alto carico mutazionale (Tumor Mutation Burden, $TMB \geq 10$ Mut/Mb) rispetto alla sola chemioterapia, suggerendo che un alto TMB può essere un buon predittore per i benefici derivanti dalla combinazione.

3. Espressione intrinseca di PD-1 sul tumore

Fino a poco tempo fa, l'espressione del recettore PD-1 è stata principalmente riportata su cellule immunocompetenti della linea ematopoietica. Recentemente è stata descritta un'espressione intrinseca di PD-1 su cellule tumorali: nel melanoma³⁶⁻³⁸, nel carcinoma epatocellulare (HCC)⁹⁸ e nell'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC)⁹⁹. Il ruolo attribuito a PD-1 è stato di promuovere la proliferazione e la crescita tumorale. Nel melanoma PD-1 è stato descritto agire attraverso la via di segnale di mTOR, promuovendo a valle la fosforilazione di S6, nel HCC sono ipotizzate due vie di segnale parallele, quella di eIF4E e p70S6K, che si attivano a valle di mTOR. Nel PDAC si ipotizza una via diversa, in cui PD-1 interagisce con *Mps1-One binder* (MOB1), ne impedisce la fosforilazione e promuove la via di segnale Hippo attivando le molecole a valle

3.1 Espressione di PD-1 su cellule di melanoma

Il primo studio preclinico a descrivere la presenza di PD-1 sul tumore è quello di Schatton et al. che dimostra la sua espressione su cellule tumorali di melanoma³⁸. Gli autori descrivono questo recettore espresso su una frazione di cellule dotate di caratteristiche di staminalità, definite cellule inizianti il melanoma maligno (MMIC). Dimostrano in particolare la presenza di PD-1 sulla sottopopolazione di MMIC positiva per l'espressione della proteina connessa alla chemioresistenza *ATP-Binding Cassette B5* (ABCB5), la cui espressione correla con la progressione di malattia e alla maggiore capacità clonale di queste cellule.

Secondo questo studio, l'espressione di PD-1 sulla frazione MMIC ABCB5⁺ conferisce ad una popolazione di cellule dotata di aumentata pro-tumorigenicità e chemioresistenza, proprietà immunoevasive e potenziale resistenza ai trattamenti immunoterapici.

Risultati simili sono stati pubblicati 5 anni dopo da un altro gruppo di ricerca. In questo studio gli autori³⁶ dimostrano un'espressione intrinseca di PD-1 su cellule tumorali di melanoma, sia su linee commerciali sia su cellule derivanti da biopsie chirurgiche e confermano l'espressione confinata di PD-1 su una piccola frazione di cellule con caratteristiche di staminalità e dotate di una maggiore capacità tumorigenica. Dimostrano, inoltre, sia in modelli *in vitro* che *in vivo*, un'implicazione di PD-1 nella tumorigenicità. Secondo questo studio PD-1 espresso sulle cellule di melanoma, in seguito ad interazione con il suo ligando PD-L1, trasduce un segnale pro-tumorigenico all'interno delle cellule promuovendo la crescita tumorale. Questi risultati dimostrano che PD-1 espresso sui linfociti T inibisce l'attività immunitaria antitumorale, mentre PD-1 espresso sulle cellule tumorali promuove la crescita tumorale con un meccanismo indipendentemente dal sistema immunitario adattativo. Gli stessi autori mostrano anche, sia in modelli *in vitro* che in modelli murini *in vivo*, che il trattamento con anticorpo bloccante PD-1 sulle cellule tumorali inibisce la crescita del tumore.

Grazie alla coltura *in vitro* delle cellule di melanoma in condizioni di staminalità, che favoriscono la formazione di sfere, è stato possibile dimostrare che la percentuale di cellule esprimenti PD-1 è più alta in queste cellule più indifferenziate e il trattamento con anticorpo bloccante PD-1 significativamente inibisce la crescita e la formazione di sfere staminali di melanoma, supportando l'idea che la presenza di PD-1 sulle MMIC potenzialmente possa favorire la proliferazione e le recidive di malattia.

Lo stesso studio mostra delle prime evidenze sulla via di segnale attivata da PD-1 nelle cellule tumorali. A differenza di quanto avviene nelle cellule T, in cui PD-1 inibisce la proliferazione dei linfociti T, PD-1 sulle cellule tumorali trasduce un segnale di crescita attivando una via che induce un aumento della fosforilazione della molecola mTOR e della proteina ribosomale S6 in maniera indipendente dalla via PI3K/AKT. L'espressione intrinseca di PD-1 sulle cellule tumorali di melanoma dotate di caratteristiche di staminalità e di potenziale pro-tumorigenico, ha fornito a noi il razionale per ipotizzare che la frazione di cellule tumorali PD-1⁺ fosse implicata nello sviluppo di meccanismi di resistenza alle terapie contro il tumore. Il mio gruppo di ricerca in uno studio preclinico recentemente pubblicato³⁷ ha dimostrato che la frazione di cellule di melanoma PD-1⁺ aumenta significativamente durante il trattamento con gli inibitori di BRAF e MEK (BRAF/MEKi) e ha mostrato come questo trattamento possa avere beneficio dalla combinazione con l'anticorpo anti PD-1 in assenza di linfociti in un modello *in vivo* immunocompromesso.

Abbiamo utilizzato un modello murino immunodeficiente impiantato sottocute con cellule umane di melanoma. Durante il trattamento non abbiamo osservato alcuna differenza tra la sola terapia con BRAF/MEKi e la terapia combinata BRAF/MEKi con anti-PD-1. L'associazione dei due trattamenti ha però ritardato in maniera significativa lo sviluppo di resistenza al farmaco e la ripresa della crescita tumorale dopo la fine del trattamento rispetto al gruppo trattato solo con BRAF/MEKi. Questi risultati forniscono il razionale

indipendente da linfociti per esplorare una strategia di trattamenti farmacologici in combinazione con l'anticorpo anti PD-1.

SCOPO DEL LAVORO

Il nostro lavoro mira ad esplorare il ruolo intrinseco del recettore PD-1 nell'ambito di cellule di NSCLC e la sua possibile modulazione con Ab bloccanti anti-PD-1. Lo studio è di natura preclinica/traslazionale e intende indagare da una nuova prospettiva il recettore PD-1 fornendo basi traslazionali per nuovi sviluppi terapeutici, indipendenti dalla nota azione sui linfociti, potenzialmente integrabili alle strategie attuali in ambito di NSCLC.

4.1.2 Obiettivi e disegno sperimentale

a) Espressione di PD-1 in cellule di NSCLC

L'espressione del recettore PD-1 sarà valutata sia a livello bioinformatico che direttamente in laboratorio su linee di NSCLC ottenute da banche cellulari (ATCC) o da biopsie chirurgiche. Nel primo caso i dati "in silico" comprenderanno l'espressione di mRNA per PD-1 di tutte le linee di NSCLC riportati nel data set "Cancer Cell Line Encyclopedia" (CCLE). L'espressione di PD-1 in laboratorio sarà esplorata su linee di NSCLC sia a livello proteico mediante citofluorimetria, western blot e immunofluorescenza, che a livello molecolare valutando i livelli di mRNA trascritto mediante PCR quantitativa (qPCR REAL TIME). Considerando l'ipotetica espressione preferenziale di PD-1 a livello di cellule tumorali con caratteristiche di staminalità, le analisi in laboratorio verranno condotte su colture di NSCLC in condizioni di adesione, in condizioni preferenziali di staminalità che inducono formazione di "pneumofere *stem-like*" in sospensione e dopo trattamento *in vitro* con chemioterapia (Cisplatino).

b) Valutazione del ruolo funzionale di PD-1 in NSCLC

Valuteremo l'ipotizzato ruolo pro-tumorigenico di PD-1 sulle cellule di NSCLC operando una sua stimolazione sperimentale con il rispettivo ligando solubile (PD-L1s), e valutando come *endpoint* la capacità di formare pneumofere in condizioni di staminalità. A livello

meccanicistico esploreremo, tramite *protome profilier antibody array*, le principali molecole coinvolte nella via di trasduzione del segnale a valle di PD-1 dopo interazione con PD-L1s

c) Valutazione della potenziale modulazione terapeutica di PD-1

Esploreremo la possibile modulazione terapeutica del recettore PD-1 attraverso un suo blocco specifico. Valuteremo l'effetto dell' Ab bloccante anti PD-1 sull'attività pro-tumorigenica, mediata dall'interazione PD-1/PD-L1. Controlli paralleli comprenderanno l'inibizione della trascrizione di PD-1 mediante RNA-interference ed un controllo con linea NSCLC^{PD-1ko} ottenuta tramite sistema CRISP-Cas9. In esperimenti selezionati, esploreremo l'azione inibitoria dell'Ab anti-PD1, sequenziale a trattamento in vitro di NSCLC con Cisplatino.

MATERIALI E METODI

5.1 Valutazione bioinformatica dell'espressione dell'mRNA

I valori di espressione dell'mRNA di PD-1 in linee cellulari di Adenocarcinomi e linee cellulari di carcinomi a Cellule Squamose sono stati ottenuti dal data set cancer cell line encyclopedia (CCLE) (<http://www.broadinstitute.org/ccle>, access September 2015).

5.2 Coltura di linee tumorali di NSCLC

Sono state utilizzate linee cellulari commerciali di NSCLC (H1975, EBC-1, H23, H820, HCC827) ottenute dalla banca cellulare ATCC (American Type Culture Collection). Le linee sono state coltivate in terreno RPMI (Sigma) addizionato con 10% di FBS (EuroClone), 1% di glutammina (Q) (Gibco BRL, Grand Island, NY), 1% di penicillina (100U/ml) streptomicina (100 µg/ml) (Sigma). La temperatura dell'incubatore è stata mantenuta costante a 37°C, con atmosfera satura di vapore acqueo ad una concentrazione di CO² pari al 5%. Le linee commerciale sono state seminate in piastre tipo Petri e divise una volta raggiunte le condizioni di subconfluenza.

5.3 Coltura di cellule tumorali primarie di NSCLC

Le colture primarie di NSCLC (SL165, SL166) sono state gentilmente concesse, nell'ambito di una collaborazione, dalla Prof.ssa Silvia Novello e il Prof. Giorgio Scagliotti del dipartimento di Oncologia dell'ospedale San Luigi Gonzaga (Università degli studi di Torino). Nello specifico le biopsie chirurgiche da cui derivano le linee sono state eseguite su pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare. Le cellule sono state coltivate in terreno F12 Nutri Mix HAM's (Gibco) addizionato con 10% di FBS (EuroClone), 1% di penicillina (100U/ml) streptomicina (100 µg/ml) (Sigma) e 5% di B-27™ Supplement

(GIBCO). La temperatura dell'incubatore è stata mantenuta costante a 37°C, con atmosfera satura di vapore acqueo ad una concentrazione di CO₂ pari al 5%. Le cellule primarie sono state seminate in piastre tipo Petri e divise una volta raggiunte le condizioni di subconfluenza.

5.4 Coltura di pneumosfere *stem-like*

Le pneumosfere *stem-like* sono state generate ponendo le cellule tumorali di NSCLC in condizioni di coltura che promuovono le caratteristiche staminali. Tali condizioni sono tali da non consentire la sopravvivenza della quasi totalità delle cellule differenziate, mentre le cellule staminali presenti nella coltura entrano in uno stato di attiva proliferazione. La progenie ottenuta per divisione delle cellule staminali tende a raggrupparsi formando delle masse sferiche “pneumosfere” che crescono in sospensione. Tali condizioni di coltura prevedono terreno DMEM F12 (Sigma) addizionato di 1% di penicillina (100U/ml) streptomicina (100 µg/ml) (Sigma) e 10 % di B-27™ Supplement (GIBCO). Nelle colture di pneumosfere primarie il terreno è stato inoltre addizionato di Fattore di Crescita delle cellule Epidermiche (EGF) ad una concentrazione finale di 20 ng/ml e Fattore di Crescita dei Fibroblasti 2 (FGF-2) ad una concentrazione finale di 20 ng/ml. Per garantire la formazione in masse sferiche le cellule sono state coltivate in fiasche che non consentono l'adesione (Corning® Ultra-Low Attachment 75cm², Corning), disgregate e divise una volta raggiunte le dimensioni di 100 µm.

5.5 Valutazione citofluorimetrica dell'espressione di PD-1

Le cellule tumorali primarie e le linee commerciali sono state analizzate citofluorimetricamente per l'espressione di PD-1. I campioni di cellule tumorali, circa

2×10^5 cellule, sono state colorate con mAb anti PD-1 (Anti-Human PD-1 APC, MACS Miltenyi Biotec). L'acquisizione citofluorimetrica è stata eseguita tramite strumento CyAN (Dako).

5.6 Valutazione dei livelli di espressione dell'mRNA di PD-1

L'RNA totale è stato estratto da tutte le linee di NSCLC utilizzate sia in condizioni di adesione che in condizioni di pneumosfere. Per estrarre l'RNA è stata utilizzata una procedura di purificazione automatica che prevede l'utilizzo dello strumento Maxwell® RSC Instrument (Promega). Prima dell'estrazione i campioni sono stati preparati seguendo il protocollo del Kit di estrazione RNA (Maxwell® RSC RNA tissue Kit, Promega). Successivamente i campioni preparati sono stati posti all'interno dello strumento Maxwell® (Promega) per procedere con l'estrazione automatica. L'RNA estratto è stato quantificato mediante spettrofotometro (The DeNovix DS-11 FX Series of Spectrophotometers/Fluorometers) e successivamente retrotrascritto in cDNA con SuperScript II RT-PCR (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). In seguito i prodotti retrotrascritti sono stati amplificati, utilizzando primers specifici per PD-1 e OCT-4, mediante PCR quantitativa (REAL-TIME qPCR). I livelli di trascritto sono stati calcolati utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5.7 Valutazione dell'espressione di PD-1 mediante Western Blot

Il western blot (WB) è stato condotto utilizzando gel di poliacrilammide (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, BIORAD). Gli estratti cellulari sono stati denaturati mediante bollitura per 10 minuti in buffer di caricamento contenente 15 mM TRIS-HCl pH 6.8, glicerolo (2.5%), SDS (sodio dodecil solfato) (0.5%), Bromofenolo Blu (0,25%) e

β -mercaptoetanololo (0.3 M). La miscela proteica è stata separata mediante SDS-PAGE (elettroforesi mediante gel di poliacrilammide). Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa mediante (The Trans-Blot Turbo Transfer, BIORAD). Dopo il trasferimento, i siti di legame non specifici sono stati bloccati mediante incubazione con una soluzione di BSA 5% in TBS. La membrana è stata poi incubata con anticorpi monoclonale contro PD-1 (PD-1 D4W2J XP® Rabbit mAb, Cell-Signaling). Dopo lavaggio con PBS contenente lo 0.1% di Tween 20 (PBS-T), la membrana nitrocellulosa è stata incubata con l'anticorpo secondario anti-IgG di topo coniugato con perossidasi di rafano. Il legame antigene-anticorpo è stato visualizzato mediante chemiluminescenza (Fujifilm LAS-3000 Imager) dopo aver posto le membrane a contatto con emulsioni fotografiche. L'intensità delle bande specifiche è stata valutata usando il software ImageLab (BIO-RAD), dopo normalizzazione con controlli interni di proteine house-keeping.

5.8 Valutazione dell'espressione di PD-1, PDL-1 e PDL-2 su pneumosfere mediante immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è stata effettuata su pneumosfere fissate in paraformaldeide (PAF) su vetrini polilisinati. Le pneumosfere fissate sono state permeabilizzate con PBS-Triton 0.2%. Successivamente le sfere sono state lavate con PBS e sottoposte a saturazione con PBS-BSA 4% per bloccare i siti non specifici. Dopo saturazione sono state incubate con anticorpi primari diluiti in PBS-BSA 0.4% anti-PD1, PDL-1 e PDL-2 (PD-1 D4W2J XP® Rabbit mAb, PD-L1 E1L3N® XP® Rabbit mAb e PD-L2 D7U8C™ XP® Rabbit mAb, Cell Signaling). In seguito lavate con PBS e incubate con anticorpi secondari anti-Rabbit coniugati con fluorocromo AF 555 diluiti in PBS-BSA 0.4% e successivamente incubati con colorante fluorescente per i nuclei DAPI diluito in PBS-BSA 0.4%. Tutte le immagini

di immunofluorescenza sono state acquisite con un microscopio confocale (Leica SPIIE confocal laser-scanning microscope, Leica Microsystems).

5.9 Trasduzione con il vettore LV-Oct-4.eGFP

Le cellule sono state trasdotte con il vettore lentivirale LV-Oct-4.eGFP prodotto e validato in passato nel nostro laboratorio¹⁰⁰.

Le cellule sono state piastrate a concentrazione 100.000 cellule/ml. Dopo 24 ore, il terreno è stato cambiato con terreno fresco e le cellule sono state infettate con il lentivirus LV-Oct-4.eGFP alla dose di 400ng P24/100.000 cellule. In parallelo sono state effettuate trasduzioni alla medesima dose con il lentivirus LV-PGK.eGFP per avere un controllo dell'efficienza di trasduzione. Dopo 16 ore, il terreno addizionato con il virus è stato sostituito con terreno fresco e, per ottenere una valutazione corretta dell'efficienza di trasduzione, le cellule sono state analizzate al Cyan (Dako) almeno 10 giorni dopo.

5.10 Inibizione dell'espressione di PD-1 mediante *RNA Interference*

Per silenziare l'espressione di PD-1 è stata utilizzata la tecnica dell'*RNA Interference*. Le cellule sono state piastrate a concentrazione 100.000 cellule/ml. Dopo 24 ore, il terreno è stato cambiato con terreno fresco e le cellule sono state infettate con 4 lentivirus LV-pGFP-C-shRNA (OriGene) codificanti ognuno per una diversa cassetta shRNA-PD-1 e per la proteina GFP entrambe posti sotto il controllo del promotore U6 che consente l'espressione in cellule di mammifero. La dose di virus usata per ognuno è stata 2MOI. In parallelo sono state effettuate trasduzioni alla medesima dose con il lentivirus LV-pGFP-C-MOCK (OriGene) per avere un controllo di silenziamento. Dopo 16 ore, il terreno addizionato con il virus è stato sostituito con terreno fresco e, per ottenere una valutazione

corretta dell'efficienza di trasduzione, le cellule sono state analizzate al Cyan (Dako) 7 giorni dopo.

5.11 Generazione della linea di pneumosfere H1975^{PD-1 KO}

La linea di pneumosfere H1975^{PD-1 KO} è stata generata dal laboratorio di Gene Transfer Therapy del nostro istituto, con a capo la dott.ssa Elisa Vigna, nell'ambito di una collaborazione con il mio gruppo di ricerca.

L'RNA guida specifica per la sequenza PD-1 (PD-sg: AGGCGCCCTGGCCAGTCGTC), disegnata usando il programma <https://zlab.bio>, è stata clonata in un vettore commerciale seguendo il protocollo descritto da Ran F.A. et al., Nat Protoc. 2013. Il vettore è stata poi trasfettato nella linea di pneumosfere H1975 usando il kit TransIT®-mRNA Transfection. 48h dopo la trasfezione il terreno di coltura è stato cambiato e sostituito con terreno fresco addizionato di 11 µg/ml di puromicina. La selezione in puromicina è stata mantenuta per 15 giorni. Terminata la selezione abbiamo isolato singoli cloni e coltivato questi in piste da 96 pozzetti per dare origine a colonie derivanti dallo stesso clone. Successivamente, appena formate, le colonie sono state purificate e analizzate.

5.12 Farmaci

Per bloccare PD-1 le colture di pneumosfere sono state trattate con l'anticorpo monoclonale bloccante PD-1 (inVivoMAb anti-human PD-1 (CD279), Clone: J110, Bio X Cell) alla concentrazione di 100 µg/ml. Le colture usate come controllo sono state trattate con l'anticorpo isotipico (inVivoMAb mouse IgG1 isotype control, Clone: MOPC-21, Bio X Cell) alla concentrazione di 100 µg/ml.

Le cellule coltivate in condizioni di adesione sono state trattate con Chemioterapico (Cisplatino) alla concentrazione IC50.

5.13 Valutazione dei livelli di fosforilazione delle proteine chinasi

I livelli di fosforilazione delle proteine chinasi stimulate a valle dal recettore PD-1 sono stati valutati utilizzando il kit *proteome profiler antibody array* (R&D system) che permette di confrontare i livelli relativi di fosforilazione di 24 proteine chinasi attivate da mitogeno (MAPKs) e altre serin/treonine chinasi (AKT2, AKT3, CREB, ERK1, ERK2, GSK-3a/b, GSK-3b, HSP27, JNK1, JNK2, JNK pan, MKK3, MKK6, MSK2, p38a, p38b, p38d, p38y, p53, p70 S6 Kinasi, RSK1, RSK2). I campioni proteici sono stati ottenuti e trattati seguendo la procedura riportata dalle istruzioni del kit.

5.14 Analisi statistica

I livelli di espressione genica e proteica, l'effetto del blocco di PD-1 sulla formazione di pneumosfere e sulla ripresa della crescita cellulare dopo CDDP sono stati comparati statisticamente usando T test non parametrico (Mann-Whitney test) che compara 2 gruppi sperimentali. I dati analizzati con software Prism graphPad5, valori di significatività accettati per $p < 0.05$.

RISULTATI

6.1 Espressione dell'mRNA di PD-1 in NSCLC

Per valutare la potenziale espressione di PD-1 nel NSCLC, abbiamo analizzato dati in silico di espressione dell' mRNA di PD-1 in linee cellulari di NSCLC presenti sul dataset CCLE. Sono stati analizzati i valori di mRNA in 67 linee cellulari di Adenocarcinomi (Affimetryx RNA value 4,348 [3,882-6,361]) e in 28 linee cellulari di carcinomi a Cellule Squamose (RNA value 4,338 [3,995-5,178]) e dall'analisi eseguita l'mRNA di PD-1 è risultato espresso in tutte le linee analizzate, **figura 1**. Nella maggior parte dei casi analizzati i valori di espressione dell'mRNA di PD1 erano comparabili a quelli dei suoi ligandi (PD-L1, PD-L2) **figura 1**. I valori di mRNA di TTF1 e delle citocheratine (KRT5/6) sono stati usati come marcatori specifici di controllo rispettivamente di Adenocarcinoma e di carcinoma a Cellule Squamose.

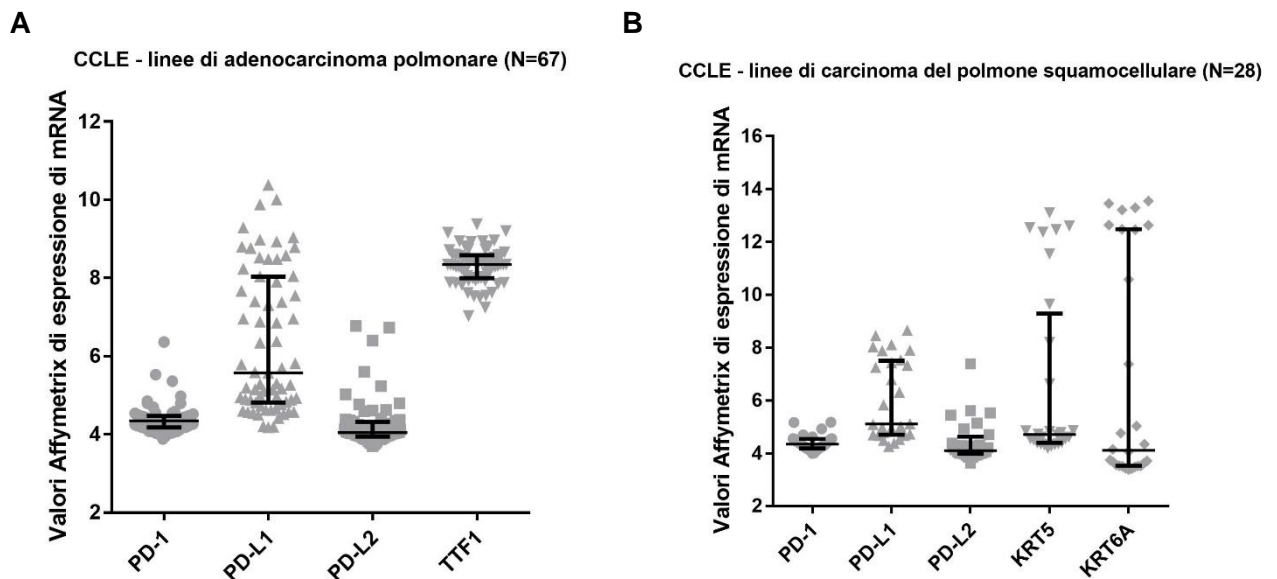


Figure 1. Analisi dell'espressione dell'mRNA di PD1 in linee di NSCLC presenti sul dataset CCLE. Box plots dei valori di espressione Affimetryx dell'mRNA di PD-1, PD-L1, and PD-L2 in 67 linee di Adenocarcinomi (A) e in 28 linee di Carcinoma polmonare a Cellule Squamose (B) presenti sul *dataset* CCLE. I valori di mRNA di TTF1 e delle citocheratine (KRT5/6) sono stati usati come marcatori specifici di controllo rispettivamente di adenocarcinoma e di carcinoma a cellule squamose.

6.2 PD-1 è espresso da una limitata frazione cellulare in NSCLC

Abbiamo voluto dimostrare che effettivamente PD1 fosse espresso sulla membrana di linee cellulari di NSCLC. Sono state analizzate mediante saggio citofluorimetrico 7 linee di NSCLC: 6 linee di adenocarcinoma, comprendenti 2 linee primarie derivate da paziente (H1975, H23, H820, HCC827, SL165, SL166) e una linea di carcinoma a cellule squamose (EBC-1). L'analisi citofluorimetrica ha dimostrato la costante presenza di una piccola frazione cellulare positiva per l'espressione in membrana di PD1 in tutte le linee analizzate (mediana 2% range[1-5] n=6) **figura 2 (A)**. La presenza di PD1 su tutte le nostre linee di NSCLC è stata inoltre confermata sia a livello proteico con un immunoblot per la proteina PD-1 sia a livello trascrizionale tramite retrotrascrizione e amplificazione di un frammento della sequenza dell'mRNA di PD-1 (n=6) **figura 2 (B)**.

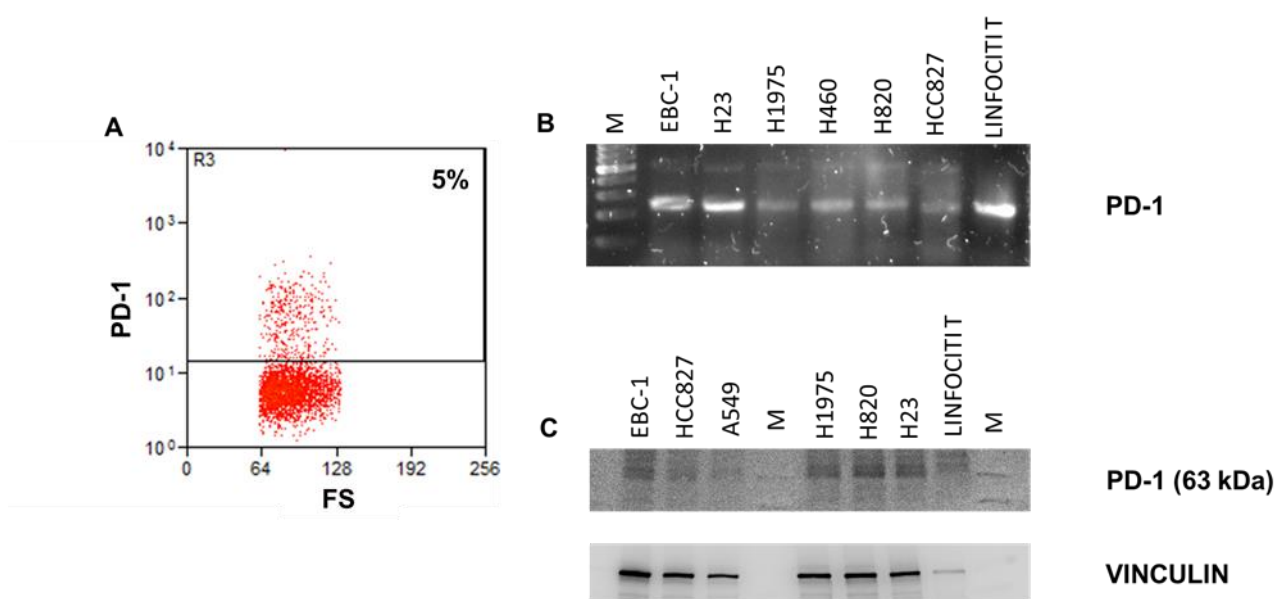


Figura 2. Espressione della proteina PD-1 in linee di NSCLC. Plot citofluorimetrico rappresentativo dell'espressione in membrana di PD-1 su linee cellulari di NSCLC. La percentuale di cellule positive per l'espressione di PD-1 è stata valutata considerando le cellule vitali identificate dal colorante fluorescente DAPI (A). Analisi di espressione dell'mRNA di PD-1 mediante RT-PCR (B) e immunoblot (C) dell'espressione della proteina PD-1 in linee di NSCLC. Linfociti T sono stati utilizzati come controllo positivo.

6.3 L'espressione di PD-1 in NSCLC aumenta in condizioni di staminalità

Nel melanoma PD-1 è preferenzialmente espresso da una frazione di cellule tumorali, con caratteristiche staminali (*stem-like*) dotate di una maggiore capacità tumorigenica³⁶⁻³⁸.

Basandoci su tale razionale abbiamo valutato l'espressione di PD-1 su pneumosfere *stem-like* ottenute ponendo le cellule tumorali in condizioni di coltura che promuovono le caratteristiche staminali. Tali condizioni di coltura sono tali da non consentire la sopravvivenza della quasi totalità delle cellule differenziate, mentre le cellule staminali presenti nella coltura entrano in uno stato di attiva proliferazione. La progenie ottenuta per divisione delle cellule staminali tende a raggrupparsi formando delle masse sferiche “*pneumosfere*” che crescono in sospensione.

L'espressione di PD-1 su pneumosfere è stata valutata mediante citofluorimetro. L'analisi ha riportato un significativo aumento della frazione di cellule tumorali PD1⁺ nelle pneumosfere rispetto alle cellule poste in condizioni di adesione, con una mediana di espressione pari a 12% [4-36] vs 2% [1-5] (P<0,0001, n=6). L'espressione di PD-1 su pneumosfere è stata anche confermata in immunofluorescenza (n=4) **figura 3**. Una ulteriore conferma dell'arricchimento della proteina PD-1 nelle pneumosfere è stata ottenuta mediante RTqPCR, dove abbiamo dimostrato che i livelli di mRNA di PD-1 e del gene di staminalità Oct4 aumentano a livelli paragonabili rispetto alla controparte presente nelle cellule coltivate in adesione (4.5 vs 4 fold, n=5) **figura 3**.

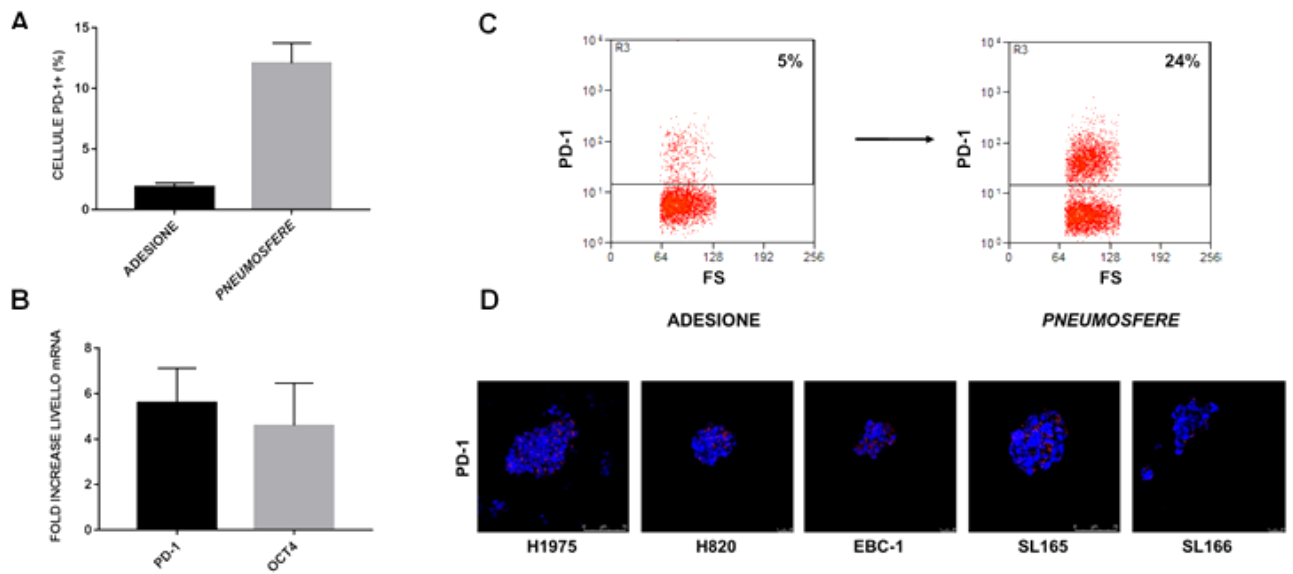


Figura 3. Espressione di PD-1 in pneumosfere stem-like. Aumento della percentuale di cellule PD-1⁺ in pneumosfere poste in condizioni *stem-like* ($P < 0,0001$, $n=6$) (A). Aumento dei livelli di espressione dell'mRNA di PD-1 e Oct4 in pneumosfere (4.5 VS 4 fold, $n=5$) (B). Plot citofluorimetrico rappresentativo della percentuale di cellule positive per l'espressione di PD-1 in condizioni di adesione e in condizioni stem-like (C). Immagini di immunofluorescenza rappresentative dell'espressione di PD-1 (AF 555, rosso) su pneumosfere fissate di 5 linee di NSCLC (H1975, H820, EBC-1, SL165 e SL166 da sinistra a destra). I nuclei sono stati marcati con il colorante fluorescente DAPI (blu) (D).

Sulle pneumosfere abbiamo anche esplorato l'espressione dei ligandi di PD-1 (PD-L1 e PD-L2) mediante immunofluorescenza, **figura 4**. Come dimostrato dalle immagini rappresentative di 5 linee di NSCLC della figura 4, abbiamo confermato che le pneumosfere esprimono anche PD-L1 e PD-L2.

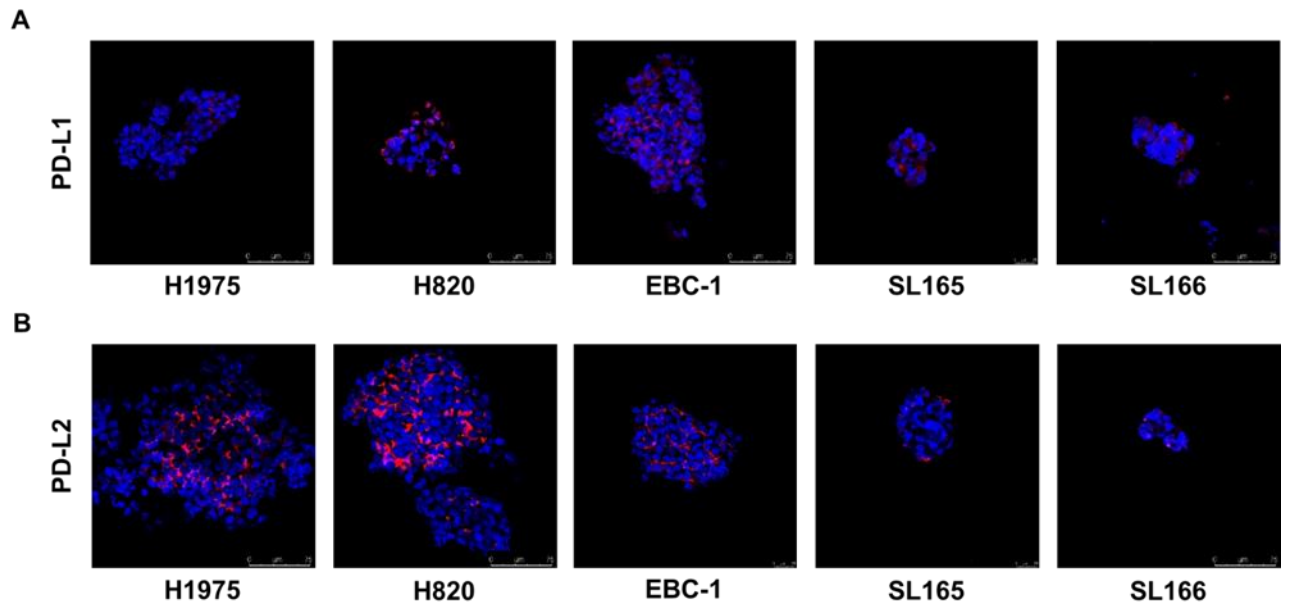


Figura 4. Espressione di PDL-1 e PDL-2 in pneumosfere. Immunofluorescenza su pneumosfere di 5 linee di NSCLC (H1975, H820, EBC-1, SL165 e SL166 da sinistra a destra) per l'espressione di PDL-1 (AF 555, rosso) (A) e PDL-2 (AF 555, rosso) (B). I nuclei sono stati marcati con il colorante fluorescente DAPI (blu).

Per sostenere l'ipotesi che PD-1 sia maggiormente espresso sulle cellule tumorali con caratteristiche di staminalità (*stem-like*) abbiamo esplorato, in immunofluorescenza, l'espressione di PD-1 su pneumosfere trasdotte con un vettore lentivirale (LV-Oct4.eGFP) codificante per il gene reporter GFP sotto il controllo del promotore del gene di staminalità Oct4. Questo vettore, precedentemente clonato e validato nel nostro laboratorio¹⁰⁰, consente di visualizzare le presunte cellule tumorali *stem-like* come GFP⁺. L'analisi di immunofluorescenza ha evidenziato la presenza di loci di co-espressione di PD-1 e GFP sulle pneumosfere *stem-like* **figura 5**, supportando l'idea di una potenziale preferenziale espressione del recettore PD-1 sulle cellule GFP⁺ dotate di caratteristiche staminali.

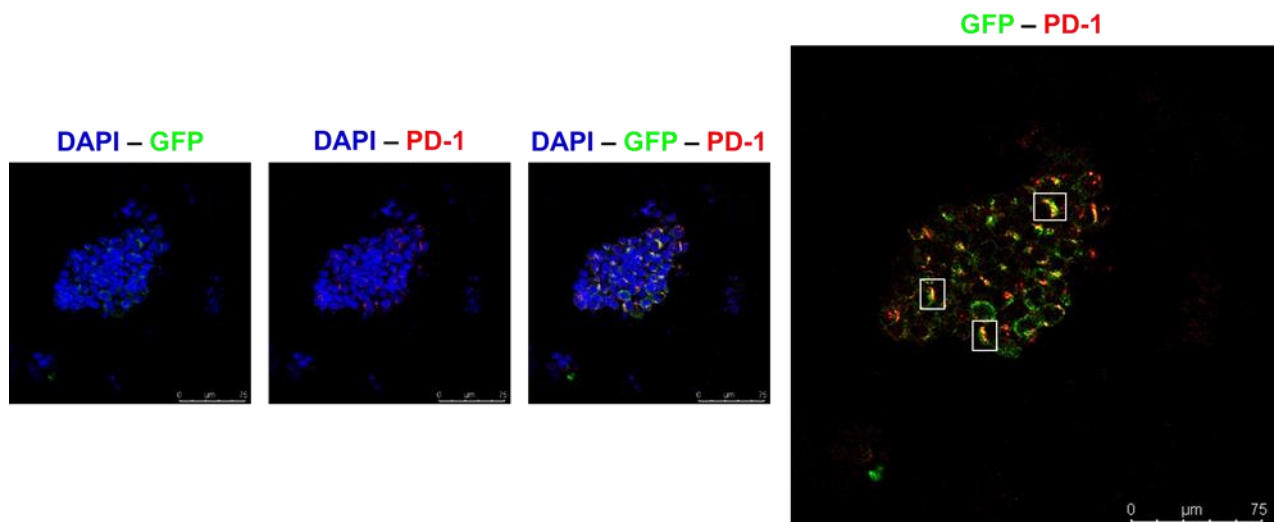


Figura 5. Localizzazione di PD-1 su cellule tumorali staminali GFP⁺. Immunofluorescenza rappresentativa per la co-localizzazione di PD-1 (AF 555, rosso) su cellule GFP⁺ (AF 488, verde) trasdotte con il vettore lentivirale (LV-Oct4.eGFP) codificante per il gene reporter GFP sotto il controllo del promotore del gene di staminalità Oct4. I nuclei sono stati marcati con il colorante fluorescente DAPI (blu). Immagine rappresentativa dell'acquisizione al microscopio confocale di immagini di immunofluorescenza per la co-espressione PD1/GFP di pneumosfere di n=5 linee di NSCLC.

6.4 PD-1 trasduce un segnale pro-tumorigenico promuovendo la formazione di pneumosfere *stem-like*

Per valutare il ruolo funzionale di PD-1 in NSCLC abbiamo svolto saggi di formazione di pneumosfere *stem-like* in presenza e assenza di un anticorpo bloccante PD-1 (anti-PD1). L'anticorpo è stato ripristinato nelle colture di pneumosfere ogni 72h. Dopo 10 giorni di coltura abbiamo verificato il numero di pneumosfere formate nelle colture trattate con anti-PD1 e con isotipo di controllo. Il trattamento di blocco con anti-PD-1 ha dato esito ad una riduzione significativa del numero di pneumosfere formate ($-30\% \pm 2$, n=6 P=0,0004) rispetto al numero osservato nelle colture trattate con l'anticorpo isotipico di controllo **figura 6**. Lo stesso risultato è stato confermato silenziando l'espressione di PD-1 nelle pneumosfere con la tecnica dell' *RNA interference*, **figura 6**. Questo dato supporta l'ipotesi che PD-1 possa trasdurre un segnale pro-tumorigenico promuovendo la formazione di pneumosfere stem-like.

Per esplorare se il segnale promosso da PD-1 si attivasse in seguito a interazione con il ligando PD-L1 abbiamo svolto saggi di formazione di pneumosfere in presenza o assenza del ligando solubile PD-L1 (PD-L1s). Il ligando è stato ripristinato in coltura ogni 72h per 10 giorni. Al termine dei 10 giorni il numero di pneumosfere formate nelle colture stimolate con PD-L1 è risultato significativamente maggiore ($25\% \pm 2$, $n=3$, $P=0,007$) rispetto al controllo non stimolato, **figura 6**. In esperimenti selezionati abbiamo trattato con PD-L1s colture di pneumosfere in cui il recettore PD-1 era stato silenziato mediante la tecnica dell'*RNA Interference* o inibito on ab anti-PD-1. In linea con l'ipotesi sperimentale in questo caso non è stato osservato alcun incremento nel numero di pneumosfere rispetto al controllo non trattato **figura 6**.

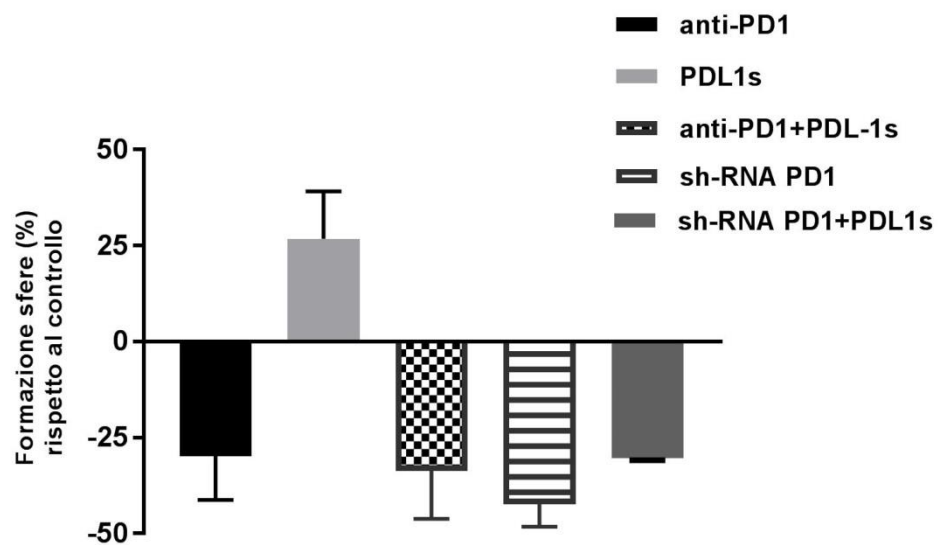


Figura 6. La stimolazione di PD-1 in NSCLC promuove formazione di pneumosfere. Percentuale media della riduzione di sfere \pm sem ($P=0,0004$) dopo trattamento con anti-PD1 (100 μ g/ml), nelle colture PDCD1 shRNA relativa al controllo trattato con anticorpo isotipico (100 μ g/ml) e al controllo shRNA MOCK e percentuale media dell'aumento di sfere dopo stimolo con PD-L1s (5 μ g/ml) relativo al controllo non trattato.

Per ulteriore conferma sperimentale abbiamo generato una linea di NSCLC PD-1 Knock out ($H1975^{PD-1KO}$) mediante il sistema CRISP-Cas9. L'*editing* di PD-1 è stato confermato mediante sequenziamento, western blot e immunofluorescenza, **figura 7**.

Con lo stesso disegno sperimentale sopra esposto, abbiamo confrontato la capacità di formare sfere di una linea di NSCLC $PD-1^{KO}$ e della corrispondente controparte Wilde Type (WT). L'analisi del numero di pneumosfere formate dopo 10 giorni di coltura ha mostrato che la mancanza di espressione di PD-1 ha ridotto ($-30\% \pm 5$) la capacità di formare pneumosfere nella linea $H1975^{PD-1KO}$ rispetto al controllo WT, **figura 7**. Questi dati ottenuti con altra metodica sostengono il concetto che il recettore PD-1 in NSCLC possa mediare un segnale pro-tumorigenico che promuove la formazione di pneumosfere.

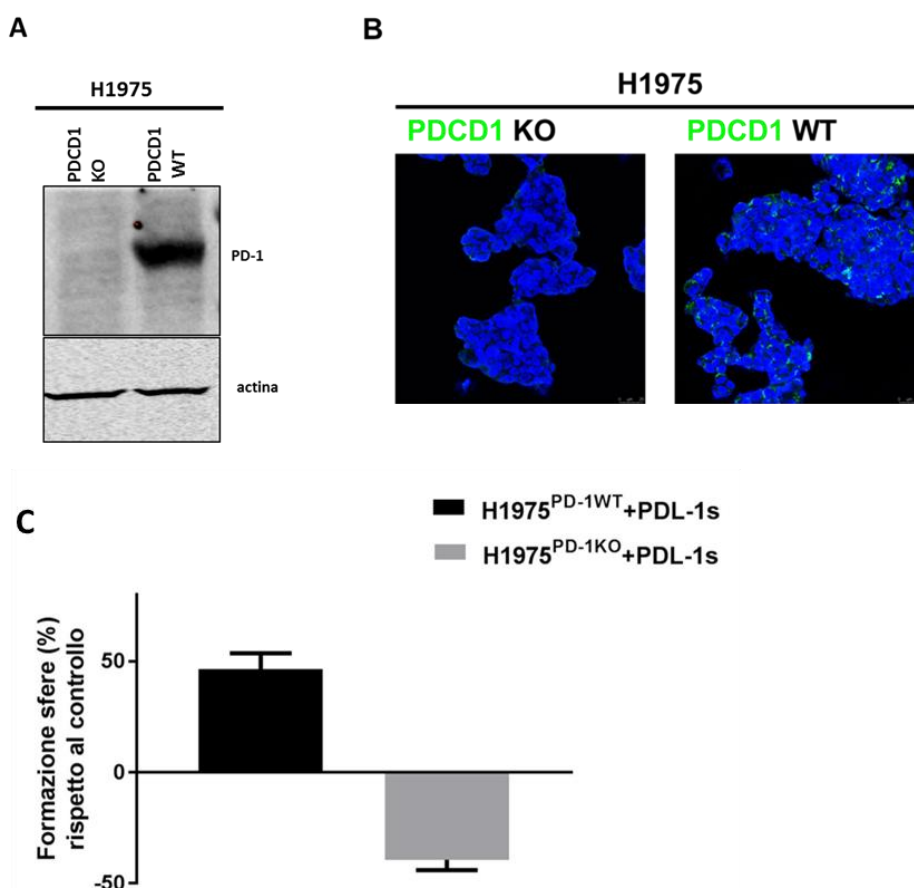


Figura 7. Analisi di espressione di PD-1 nella linea cellulare NSCLC $PD-1^{KO}$ e WT e relativo saggio funzionale di formazione di pneumosfere. Immunoblot dell'espressione della proteina PD-1 (A) e immunofluorescenza rappresentativa dell'espressione di PD-1 (B) nella linea NSCLC $PD-1^{KO}$ e WT. Percentuale media della riduzione di sfere \pm sem ($-30\% \pm 5$) nelle coltura di pneumosfere NSCLC $PD-1^{KO}$ rispetto al controllo WT (C).

6.5 Aumento della frazione cellulare PD-1⁺ dopo trattamento con chemioterapia

Considerando la riportata relativa chemoresistenza delle presunte CSC, abbiamo voluto esplorare se le cellule di NSCLC esprimenti il recettore PD-1 fossero meno sensibili ad un trattamento chemioterapico con Cisplatino (CDDP), comunemente utilizzato nella pratica clinica. Abbiamo quindi valutato la frazione di NSCLC PD1⁺ tra la popolazione cellulare sopravvissuta dopo trattamento (72h) in vitro con CDDP alla dose IC50.

Tramite analisi citofluorimetrica abbiamo riscontrato un significativo arricchimento relativo della frazione NSCLC PD-1⁺ ($2.5 \pm 0,3$ fold, $n=4$, $P=0,0014$) dopo CDDP rispetto al controllo non trattato, **figura 8**.

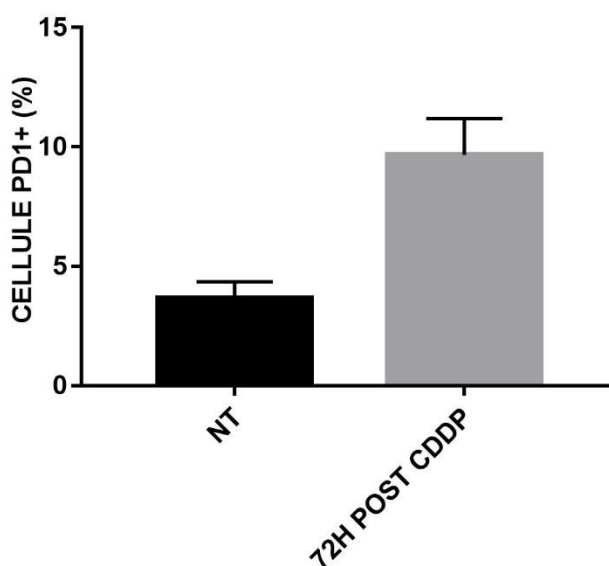


Figura 8. Incremento della frazione PD1⁺ in seguito a trattamento con CDDP. Percentuale media di cellule PD-1⁺ \pm sem dopo trattamento con CDDP alla concentrazione IC50 a 72h rispetto al controllo non trattato.

6.6 Il trattamento con anticorpo bloccante anti-PD-1 inibisce la ripresa proliferativa delle cellule di NSCLC dopo chemioterapia.

Le cellule sopravvissute a trattamento con CDDP, arricchite nella frazione di cellule PD1⁺ sono state poste in coltura in presenza e assenza di anticorpo (Ab) bloccante anti-PD1. I test sono stati condotti sia in condizioni di staminalità, che promuovono la formazione di pneumosfere in condizioni di aderenza, durante i quali l'Ab anti-PD-1 è stato ripristinato al terreno di coltura ogni 72h, abbiamo verificato il numero di pneumosfere formate in condizioni *stem-like* e il numero di cellule nelle colture poste in condizioni di aderenza. I dati hanno dimostrato che il sequenziale trattamento con Ab anti-PD-1 dopo CDDP inibisce (n=4, P=0,005) la ripresa proliferativa delle cellule in aderenza e la formazione di pneumosfere in condizioni rispetto ai rispettivi controlli non trattati, **figura 9**.

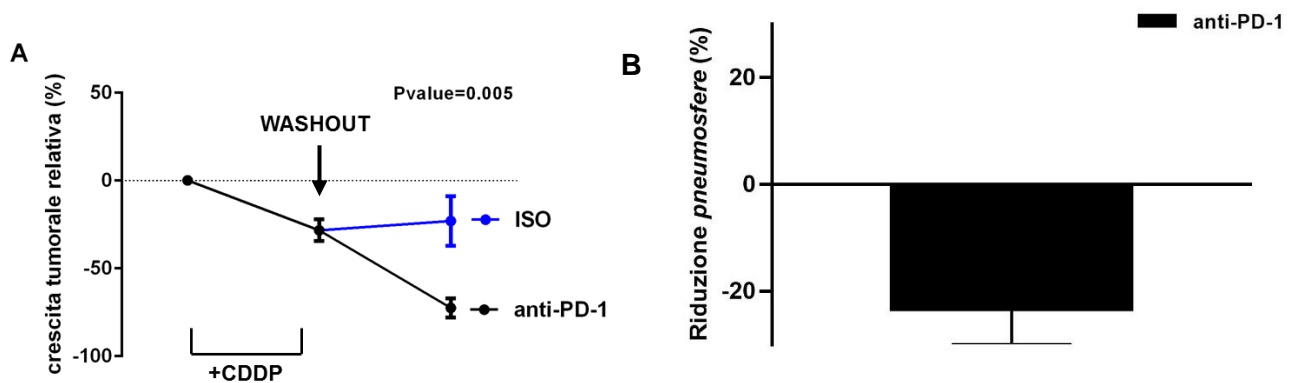


Figura 9. Effetto anti-tumorale dell'Ab bloccante anti-PD1 sulle cellule sopravvissute a trattamento con CDDP. Percentuale media \pm sem del numero di cellule in coltura in seguito a trattamento sequenziale con anti-PD1 dopo trattamento con CDDP alla concentrazione IC50 a 72h rispetto a controllo non trattato (A). Percentuale media \pm sem della riduzione del numero di pneumosfere in seguito a trattamento con anti-PD1 delle cellule sopravvissute a trattamento con CDDP poste in condizioni *stem-like* (B).

6.7 Valutazione delle vie di segnale attivate da PD-1 sulle NSCLC

Abbiamo iniziato ad esplorare quale potesse essere la via del segnale attivata da PD-1 sulle cellule di NSCLC. A tale scopo abbiamo utilizzato il *proteome profiler antibody array* che ci ha permesso di confrontare i livelli relativi di fosforilazione di 24 proteine chinasi attivate da mitogeno (MAPKs) e altre serin/treonine chinasi (AKT2, AKT3, CREB, ERK1, ERK2, GSK-3a/b, GSK-3b, HSP27, JNK1, JNK2, JNK pan, MKK3, MKK6, MSK2, p38a, p38b, p38d, p38y, p53, p70 S6 Kinasi, RSK1, RSK2) tra la linea di pneumosfere WT e la corrispettiva linea H1975^{PD-1KO} in seguito a stimolazione con PD-L1s. L'analisi ha rivelato che l'attivazione di PD-1 in seguito a legame di PD-L1s provoca in particolare un aumento della fosforilazione delle proteine RSK1, RSK2 e p70 S6 chinasi, mentre nelle pneumosfere H1975^{PD-1KO} prevale la fosforilazione delle proteine p38 α , JNK2 e HSP27, **figura 10.**

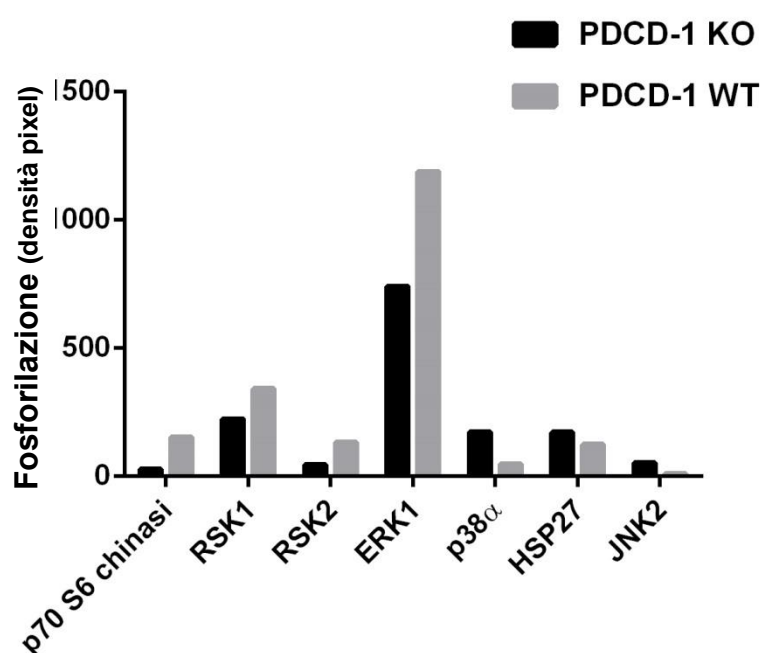


Figura 10. Livelli relativi di fosforilazione di proteine chinasi (MAPKs). Istogramma rappresentativo dei livelli di fosforilazione delle proteine RSK1, RSK2 e p70 S6, p38 α chinasi e JNK2 nelle pneumosfere PD-1 KO e PD-1 WT in seguito a stimolo con PDL-1.

DISCUSSIONE

Il nostro lavoro riporta per la prima volta l'espressione "ectopica" del recettore PD-1 espresso intrinsecamente da cellule di tumore polmonare (NSCLC), proponendone un ruolo pro-tumorigenico potenzialmente modulabile attraverso anticorpi bloccanti l'asse PD-1/PDL-1. La possibilità che il recettore PD-1 fosse espresso direttamente da cellule tumorali è stata recentemente descritta nell'ambito del melanoma³⁶, dove, anche il nostro gruppo, ha contribuito a definirne un ruolo potenziale nella ripresa tumorale dopo trattamento con farmaci a bersaglio molecolare³⁷. In questo lavoro abbiamo esplorato l'ipotesi che, anche nell'ambito del tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC), il recettore PD-1 potesse avere un'espressione ed un ruolo intrinseco, indipendente dal rapporto con il sistema immunitario. I nostri dati di prevalenza partono da un'ampia base "in silico" e sono poi confermati a livello proteico e molecolare in laboratorio su campioni cellulari tumorali in assenza di componente linfocitaria. Quanto emerge è che l'espressione di PD-1 da parte di cellule di NSCLC risulta costante, in tutti i campioni analizzati sebbene confinata ad una ristrettissima frazione cellulare. Abbiamo riportato come questa frazione, difficilmente riscontrabile in condizioni basali di equilibrio, si arricchisca, con importanti implicazioni funzionali solo in particolari condizioni che selezionano e favoriscono le cellule tumorali con caratteristiche di staminalità. Queste osservazioni sono in linea con quelle operate nell'ambito del melanoma, supportando l'ipotesi che il recettore PD-1 possa essere in qualche modo un marcatore legato a fenomeni di staminalità, indipendenti dall'istotipo tumorale. Una recente evidenza sembra portare ulteriore sostegno a questa teoria, con la descrizione del ruolo intrinseco pro-tumorale di PD-1 a livello del carcinoma duttale infiltrante⁹⁹.

La potenziale rilevanza di questi riscontri nasce dal ruolo funzionale mediato dal recettore PD-1 a livello tumorale e dalla sua potenziale modulabilità a scopo terapeutico. La nostra ipotesi è che, in ambito tumorale, possa avvenire una stimolazione del recettore PD-1 da parte dei suoi ligandi PD-L1/2 espressi dalle limitrofe cellule neoplastiche o stromali del

microambiente. Nel lavoro abbiamo dimostrato l'espressione di PD-L1 da parte delle cellule neoplastiche, riportando inoltre come il numero di pneumosfere e la crescita tumorale ulteriormente venga esaltata dall'aggiunta sperimentale di PD-L1 solubile. La specificità del recettore PD-1 nel mediare tale azione biologica è confermata dalla scomparsa della stessa a seguito di silenziamento dell'espressione di PD-1 in cellule di NSCLC. Non abbiamo al momento ancora esplorato l'azione additiva che potrebbe derivare dal contributo di cellule stromali o del secondo ligando PD-L2, ma è verosimile che questo possa espletare un'azione del tutto simile aumentando la rilevanza del fenomeno biologico descritto.

In ambito clinico, si potrebbe speculare che questo tipo di interazioni descritte possano giocare un ruolo in situazioni in cui il comparto più staminale della compagine tumorale viene chiamato in causa e/o stimolato. Queste potrebbero essere ad esempio le condizioni di chemoresistenza, dove numerose evidenze sperimentali riportano un arricchimento di presunte "cellule staminali del cancro", e/o la recidiva e ricrescita tumorale dopo un'iniziale risposta terapeutica. Il riscontro di un arricchimento della frazione tumorale PD-1⁺, osservato nella compagine cellulare sopravvissuta a trattamento con Cisplatino supporta questa ipotesi, potendo speculare come cellule tumorali con caratteristiche più staminali siano maggiormente resistenti al farmaco chemioterapico. Una possibilità alternativa, almeno in linea teorica, potrebbe anche essere quella di una modulazione diretta operata dal chemioterapico sull'espressione di PD-1. Questa, sebbene non esplorata direttamente a livello molecolare, non appare comunque probabile dai riscontri sperimentali; la frazione cellulare PD-1⁺ tende, infatti, nel tempo a ritornare ai valori pre-trattamento facendo propendere più per un effetto "selettivo" alla base dell'aumentata espressione osservata al termine del trattamento.

Un attuale limite sperimentale presente nel lavoro è l'origine esclusivamente “*in vitro*” di queste osservazioni. La successiva fase di validazione dovrà comprendere esperimenti *in vivo* per esplorare il reale potenziale tumorigenico di cellule di NSCLC PD1⁺, rispetto alla controparte PD1⁻, quantificandolo con esperimenti di impianti seriali in animali immunocompromessi, in quantità progressivamente scalari con “*diluizioni limite*”. Anche in preparazione di questa fase sperimentale abbiamo generato una linea di NSCLC negativa, tramite metodologia CRISP-Cas9, per l'espressione del recettore PD-1.

L'inibizione della sintesi di PD-1 si è tradotta funzionalmente in una riduzione significativa della capacità delle cellule NSCLC PD-1^{ko} di formare pneumosfere in condizioni di staminalità, in linea quindi con l'ipotesi formulata di un ruolo pro-tumorigenico del recettore PD-1 e di una sua associazione con caratteristiche staminali. La linea NSCLC PD-1^{ko} verrà utilizzata nel prossimo futuro per esperimenti funzionali *in vivo*, paragonandone tumorigenicità e profilo funzionale con la controparte PD-1^{wt}.

Negli esperimenti presentati, la stessa linea è risultata fondamentale per esplorare il pathway di trasduzione del segnale legato alla stimolazione del recettore PD-1 a livello tumorale.

Nel nostro caso da un confronto sulla fosforilazione delle MAPK tra la linea NSCLC PD-1^{ko} e la controparte PD-1^{wt}, le principali differenze emerse a seguito di stimolazione con il ligando PD-L1s, risiedono nella prevalente fosforilazione nella linea PD-1^{wt} della proteina ERK1 e di alcune sue molecole target a valle, (RSK1, RSK2 e p70 S6). Nella linea NSCLC^{PD-1ko} prevale invece la fosforilazione di p38α MAPK, JNK e HSP27. Ci sono 3 principali famiglie di MAPK: la famiglia di *signal-regulated kinase 1 and 2* (Erk1/2 or p44/42), la famiglia di *c-Jun N-terminal kinases 1-3* (JNK1-3)/ *stress activated protein kinases* (SAPK1A, 1B, 1C) e infine la famiglia delle isoforme di p38 (p38α, β, γ, e δ) (ERK e p38 MAPK activated protein kinases: famiglia di proteine chinasi con diverse funzioni biologiche^{101,102}). I risultati emersi dal nostro confronto supportano l'ipotesi che

PD-1 attivato sulla cellula tumorale ha un effetto mitogeno trasducendo un segnale pro-tumorigenico attraverso la fosforilazione di ERK, risaputo intervenire in processi che favoriscono la divisione cellulare, la migrazione e la sopravvivenza. La mancanza di PD-1, invece, porta ad una prevalenza dell'attivazione delle altre due principali MAPK, note per essere solitamente attivate da segnali di stress: la via p38 MAPK è descritta coinvolta soprattutto in fenomeni di motilità cellulare, trascrizione, rimodellamento della cromatina, il segnale di JNK promuove processi di apoptosi e infiammazione¹⁰³.

I nostri dati, inoltre, sono in linea con i primi dati pubblicati in proposito a livello del melanoma e di HCC: PD-1 induce la fosforilazione p70S6. Esperimenti dedicati di blocco o attivazione specifica delle molecole coinvolte saranno in programma in prossime fasi sperimentali per validarne ulteriormente il ruolo. L'implicazione probabilmente principale, legata alla descrizione di un ruolo intrinseco di PD-1 a livello delle cellule tumorali, è la possibilità di modularne la funzione terapeuticamente. Il trattamento con anticorpi inibitori dell'asse PD-1/PD-L1 sono attualmente approvati per il trattamento di pazienti con NSCLC ed utilizzati con l'obiettivo-biologico di "sbloccare" la risposta immunitaria antitumorale inibita a vari livelli. In particolare il recettore PD-1 inibisce l'attivazione e l'attività citotossica di linfociti T diretti contro neo-antigeni tumorali. Il nostro lavoro propone a questo proposito una differente prospettiva, ipotizzando che gli stessi anticorpi bloccanti possano avere un'azione diretta su una frazione di cellule tumorali, indipendente dalla concomitante attivazione linfocitaria. Probabilmente questa non risulta rilevante in condizioni standard, in considerazione dell'estrema pochezza della frazione di cellule NSCLC PD-1⁺, ma potrebbe rivestire un ruolo in particolari condizioni. Al termine di un trattamento chemioterapico un arricchimento di cellule tumorali staminali, relativamente chemoresistenti, potrebbe costituire la base di una recidiva di malattia ed in questo contesto risultare utile una strategia di inibizione del recettore PD-1 a livello tumorale. Sperimentalmente le nostre evidenze, con il limite imposto dal modello in vitro, vanno

nella direzione ipotizzata. La ripresa della crescita tumorale, da parte della frazione tumorale sopravvissuta ad un trattamento con Cisplatino, è stata infatti sensibilmente inibita dal trattamento con anticorpi bloccanti il recettore PD-1.

Queste considerazioni sono ovviamente di tipo speculativo, le ipotesi di implicazioni terapeutiche dovranno essere esplorate in modelli animali ed, eventualmente, in studi clinici controllati. Una prima indicazione potrebbe in questo senso essere ottenuta valutando la variazione di espressione di PD-1 in preparati biotici ottenuti prima e dopo trattamenti chemioterapici, contesto ad esempio disponibile nei protocolli di terapia neo-adiuvante. Queste analisi permetterebbero di ottenere una prima prova concettuale della consistenza e riproducibilità, nei pazienti, dei dati osservati sperimentalmente in laboratorio.

In conclusione, i nostri dati riportano una nuova prospettiva nella considerazione dell'espressione e ruolo funzionale del recettore PD-1, evidenziandone una nuova dimensione biologica intrinseca alla cellula tumorale ed apparentemente indipendente dalla nota funzione di inibizione linfocitaria. Dal punto di vista conoscitivo queste evidenze aprono nuove prospettive di esplorazione biologica, dedicate alla comprensione del ruolo pro-tumorale di PD-1 e la delucidazione dei meccanismi molecolari sottostanti. Dal punto di vista terapeutico, il lavoro fornisce basi traslazionali per successive esplorazioni dedicate a nuove prospettive applicative per Ab anti-PD1, integrate agli schemi di terapia attuali, mirati a contrastare la frazione tumorale più staminale responsabile delle recidive e chemoresistenze.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* **5**, 1365-1369, doi:10.1038/70932 (1999).
- 2 Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* **192**, 1027-1034 (2000).
- 3 Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* **23**, 515-548, doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611 (2005).
- 4 Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* **2**, 261-268, doi:10.1038/85330 (2001).
- 5 Tseng, S. Y. *et al.* B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* **193**, 839-846, doi:10.1084/jem.193.7.839 (2001).
- 6 Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* **26**, 677-704, doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331 (2008).
- 7 Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* **44**, 955-972, doi:10.1016/j.immuni.2016.05.002 (2016).
- 8 McPherson, R. C. *et al.* Epigenetic modification of the PD-1 (*Pdcd1*) promoter in effector CD4(+) T cells tolerized by peptide immunotherapy. *Elife* **3**, doi:10.7554/eLife.03416 (2014).
- 9 Pauken, K. E. *et al.* Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* **354**, 1160-1165, doi:10.1126/science.aaf2807 (2016).
- 10 Yamazaki, F., Kuroiwa, T., Takikawa, O. & Kido, R. Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *Biochem J* **230**, 635-638 (1985).
- 11 Wherry, E. J. *et al.* Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* **27**, 670-684, doi:10.1016/j.immuni.2007.09.006 (2007).
- 12 Chikuma, S. *et al.* PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. *J Immunol* **182**, 6682-6689, doi:10.4049/jimmunol.0900080 (2009).
- 13 Terawaki, S. *et al.* IFN- α directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. *J Immunol* **186**, 2772-2779, doi:10.4049/jimmunol.1003208 (2011).
- 14 Cheng, X. *et al.* Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *J Biol Chem* **288**, 11771-11785, doi:10.1074/jbc.M112.448126 (2013).
- 15 Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* **173**, 945-954, doi:10.4049/jimmunol.173.2.945 (2004).
- 16 Sheppard, K. A. *et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett* **574**, 37-41, doi:10.1016/j.febslet.2004.07.083 (2004).
- 17 Riley, J. L. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* **229**, 114-125, doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00767.x (2009).
- 18 Patsoukis, N. *et al.* Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal* **5**, ra46, doi:10.1126/scisignal.2002796 (2012).
- 19 Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* **209**, 1201-1217, doi:10.1084/jem.20112741 (2012).

- 20 Barnes, S. E. *et al.* T cell-NF- κ B activation is required for tumor control in vivo. *J Immunother Cancer* **3**, 1, doi:10.1186/s40425-014-0045-x (2015).
- 21 Afreen, S. & Dermime, S. The immunoinhibitory B7-H1 molecule as a potential target in cancer: killing many birds with one stone. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* **7**, 1-17, doi:10.1016/j.hemonc.2013.09.005 (2014).
- 22 Sznol, M. & Chen, L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer--response. *Clin Cancer Res* **19**, 5542, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2234 (2013).
- 23 Atkins, M. B., Kunkel, L., Sznol, M. & Rosenberg, S. A. High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *Cancer J Sci Am* **6 Suppl 1**, S11-14 (2000).
- 24 Zou, W. & Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **8**, 467-477, doi:10.1038/nri2326 (2008).
- 25 Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* **8**, 793-800, doi:10.1038/nm730 (2002).
- 26 Ribas, A. & Hu-Lieskovan, S. What does PD-L1 positive or negative mean? *J Exp Med* **213**, 2835-2840, doi:10.1084/jem.20161462 (2016).
- 27 Sharpe, A. H. & Pauken, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* **18**, 153-167, doi:10.1038/nri.2017.108 (2018).
- 28 Eppihimer, M. J. *et al.* Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation* **9**, 133-145, doi:10.1038/sj/mn/7800123 (2002).
- 29 Chang, S. H. & Hla, T. Post-transcriptional gene regulation by HuR and microRNAs in angiogenesis. *Curr Opin Hematol* **21**, 235-240, doi:10.1097/MOH.0000000000000040 (2014).
- 30 Bengsch, B. *et al.* Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity* **45**, 358-373, doi:10.1016/j.immuni.2016.07.008 (2016).
- 31 Gubin, M. M. *et al.* Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* **515**, 577-581, doi:10.1038/nature13988 (2014).
- 32 Chamoto, K. *et al.* Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E761-E770, doi:10.1073/pnas.1620433114 (2017).
- 33 Chang, C. H. *et al.* Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* **162**, 1229-1241, doi:10.1016/j.cell.2015.08.016 (2015).
- 34 Yu, Y. *et al.* Single-cell RNA-seq identifies a PD-1. *Nature* **539**, 102-106, doi:10.1038/nature20105 (2016).
- 35 Benson, D. M. *et al.* The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* **116**, 2286-2294, doi:10.1182/blood-2010-02-271874 [pii] 10.1182/blood-2010-02-271874 (2010).
- 36 Kleffel, S. *et al.* Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell* **162**, 1242-1256, doi:10.1016/j.cell.2015.08.052 (2015).
- 37 Sanlorenzo, M. *et al.* BRAF and MEK Inhibitors Increase PD-1-Positive Melanoma Cells Leading to a Potential Lymphocyte-Independent Synergism with Anti-PD-1 Antibody. *Clin Cancer Res* **24**, 3377-3385, doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1914 (2018).
- 38 Schatton, T. *et al.* Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells. *Cancer Res* **70**, 697-708, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1592 (2010).
- 39 Duraiswamy, J. *et al.* Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol* **186**, 4200-4212, doi:10.4049/jimmunol.1001783 (2011).

- 40 Allie, S. R., Zhang, W., Fuse, S. & Usherwood, E. J. Programmed death 1 regulates development of central memory CD8 T cells after acute viral infection. *J Immunol* **186**, 6280-6286, doi:10.4049/jimmunol.1003870 (2011).
- 41 Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141-151 (1999).
- 42 Nishimura, H. *et al.* Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* **291**, 319-322, doi:10.1126/science.291.5502.319 (2001).
- 43 Lucas, J. A. *et al.* Programmed death ligand 1 regulates a critical checkpoint for autoimmune myocarditis and pneumonitis in MRL mice. *J Immunol* **181**, 2513-2521, doi:10.4049/jimmunol.181.4.2513 (2008).
- 44 Spranger, S. *et al.* Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* **2**, 3, doi:10.1186/2051-1426-2-3 (2014).
- 45 Juneja, V. R. *et al.* PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J Exp Med* **214**, 895-904, doi:10.1084/jem.20160801 (2017).
- 46 Noguchi, T. *et al.* Temporally Distinct PD-L1 Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape. *Cancer Immunol Res* **5**, 106-117, doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0391 (2017).
- 47 Lau, J. *et al.* Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nat Commun* **8**, 14572, doi:10.1038/ncomms14572 (2017).
- 48 Spitzer, M. H. *et al.* Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* **168**, 487-502.e415, doi:10.1016/j.cell.2016.12.022 (2017).
- 49 Ward, J. P., Gubin, M. M. & Schreiber, R. D. The Role of Neoantigens in Naturally Occurring and Therapeutically Induced Immune Responses to Cancer. *Adv Immunol* **130**, 25-74, doi:10.1016/bs.ai.2016.01.001 (2016).
- 50 Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 252-264, doi:10.1038/nrc3239 (2012).
- 51 Iwai, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12293-12297, doi:10.1073/pnas.192461099 (2002).
- 52 Blank, C., Gajewski, T. F. & Mackensen, A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 307-314, doi:10.1007/s00262-004-0593-x (2005).
- 53 Hirano, F. *et al.* Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* **65**, 1089-1096 (2005).
- 54 Woo, S. R. *et al.* Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res* **72**, 917-927, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1620 (2012).
- 55 Shi, L. Z. *et al.* Interdependent IL-7 and IFN- γ signalling in T-cell controls tumour eradication by combined α -CTLA-4+ α -PD-1 therapy. *Nat Commun* **7**, 12335, doi:10.1038/ncomms12335 (2016).
- 56 Postow, M. A., Callahan, M. K. & Wolchok, J. D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* **33**, 1974-1982, doi:10.1200/JCO.2014.59.4358 (2015).
- 57 Ribas, A., Kirkwood, J. M. & Flaherty, K. T. Anti-PD-1 antibody treatment for melanoma. *Lancet Oncol* **19**, e219, doi:10.1016/S1470-2045(18)30202-X (2018).
- 58 Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **359**, 1350-1355, doi:10.1126/science.aar4060 (2018).

- 59 Wolchok, J. D. *et al.* Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* **369**, 122-133, doi:10.1056/NEJMoa1302369 (2013).
- 60 Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* **366**, 2443-2454, doi:10.1056/NEJMoa1200690 (2012).
- 61 Brahmer, J. R. *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* **366**, 2455-2465, doi:10.1056/NEJMoa1200694 (2012).
- 62 Brahmer, J. R. *et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* **28**, 3167-3175, doi:10.1200/JCO.2009.26.7609 (2010).
- 63 Tumeu, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568-571, doi:10.1038/nature13954 (2014).
- 64 Herbst, R. S. *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **515**, 563-567, doi:10.1038/nature14011 (2014).
- 65 Taube, J. M. *et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* **4**, 127ra137, doi:10.1126/scitranslmed.3003689 (2012).
- 66 Postow, M. A. *et al.* Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med* **372**, 2006-2017, doi:10.1056/NEJMoa1414428 (2015).
- 67 Chen, P. L. *et al.* Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov* **6**, 827-837, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1545 (2016).
- 68 Roh, W. *et al.* Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Sci Transl Med* **9**, doi:10.1126/scitranslmed.aah3560 (2017).
- 69 Twyman-Saint Victor, C. *et al.* Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* **520**, 373-377, doi:10.1038/nature14292 (2015).
- 70 Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546-1558, doi:10.1126/science.1235122 (2013).
- 71 Rizvi, N. A. *et al.* Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124-128, doi:10.1126/science.aaa1348 (2015).
- 72 Van Allen, E. M. *et al.* Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* **350**, 207-211, doi:10.1126/science.aad0095 (2015).
- 73 Page, D. B., Postow, M. A., Callahan, M. K., Allison, J. P. & Wolchok, J. D. Immune modulation in cancer with antibodies. *Annu Rev Med* **65**, 185-202, doi:10.1146/annurev-med-092012-112807 (2014).
- 74 Robert, C. *et al.* Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* **384**, 1109-1117, doi:10.1016/S0140-6736(14)60958-2 (2014).
- 75 Topalian, S. L. *et al.* Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* **32**, 1020-1030, doi:10.1200/JCO.2013.53.0105 (2014).
- 76 Garon, E. B. *et al.* Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **372**, 2018-2028, doi:10.1056/NEJMoa1501824 (2015).
- 77 Pauken, K. E. & Wherry, E. J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol* **36**, 265-276, doi:10.1016/j.it.2015.02.008 (2015).
- 78 Hellmann, M. D., Friedman, C. F. & Wolchok, J. D. Combinatorial Cancer Immunotherapies. *Adv Immunol* **130**, 251-277, doi:10.1016/bs.ai.2015.12.005 (2016).
- 79 Sharma, P. & Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56-61, doi:10.1126/science.aaa8172 (2015).

- 80 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* **67**, 7-30, doi:10.3322/caac.21387 (2017).
- 81 Travis, W. D. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* **23**, 65-81, viii (2002).
- 82 Travis, W. D. *et al.* The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* **10**, 1243-1260, doi:10.1097/JTO.0000000000000630 (2015).
- 83 Masters, G. A., Johnson, D. H. & Temin, S. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Oncol Pract* **12**, 90-93, doi:10.1200/JOP.2015.008524 (2016).
- 84 Fossella, F. *et al.* Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. *J Clin Oncol* **21**, 3016-3024, doi:10.1200/JCO.2003.12.046 (2003).
- 85 Sacco, P. C., Maione, P., Palazzolo, G. & Gridelli, C. Treatment of advanced non-small cell lung cancer in the elderly. *Expert Rev Respir Med* **12**, 783-792, doi:10.1080/17476348.2018.1510322 (2018).
- 86 Riely, G. J., Marks, J. & Pao, W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* **6**, 201-205, doi:10.1513/pats.200809-107LC (2009).
- 87 Hanna, N., Johnson, D., Temin, S. & Masters, G. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update Summary. *J Oncol Pract* **13**, 832-837, doi:10.1200/JOP.2017.026716 (2017).
- 88 Barlesi, F. *et al.* Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet* **387**, 1415-1426, doi:10.1016/S0140-6736(16)00004-0 (2016).
- 89 Gunturi, A. & McDermott, D. F. Nivolumab for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **24**, 253-260, doi:10.1517/13543784.2015.991819 (2015).
- 90 Herbst, R. S. *et al.* Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1540-1550, doi:10.1016/S0140-6736(15)01281-7 (2016).
- 91 Mok, T. S. K. *et al.* Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* **393**, 1819-1830, doi:10.1016/S0140-6736(18)32409-7 (2019).
- 92 Reck, M. *et al.* Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **375**, 1823-1833, doi:10.1056/NEJMoa1606774 (2016).
- 93 Malhotra, J., Jabbour, S. K. & Aisner, J. Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* **6**, 196-211, doi:10.21037/tlcr.2017.03.01 (2017).
- 94 Tseng, C. W. *et al.* Pretreatment with cisplatin enhances E7-specific CD8+ T-Cell-mediated antitumor immunity induced by DNA vaccination. *Clin Cancer Res* **14**, 3185-3192, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0037 (2008).
- 95 Langer, C. J. *et al.* Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study. *Lancet Oncol* **17**, 1497-1508, doi:10.1016/S1470-2045(16)30498-3 (2016).
- 96 Gandhi, L. *et al.* Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **378**, 2078-2092, doi:10.1056/NEJMoa1801005 (2018).
- 97 Paz-Ares, L. *et al.* Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **379**, 2040-2051, doi:10.1056/NEJMoa1810865 (2018).
- 98 Li, H. *et al.* Programmed cell death-1 (PD-1) checkpoint blockade in combination with a mammalian target of rapamycin inhibitor restrains hepatocellular carcinoma growth induced by hepatoma cell-intrinsic PD-1. *Hepatology* **66**, 1920-1933, doi:10.1002/hep.29360 (2017).

- 99 Pu, N. *et al.* Cell-intrinsic PD-1 promotes proliferation in pancreatic cancer by targeting CYR61/CTGF via the hippo pathway. *Cancer Lett* **460**, 42-53, doi:10.1016/j.canlet.2019.06.013 (2019).
- 100 Gammaitoni, L. *et al.* Effective Activity of Cytokine Induced Killer Cells against Autologous Metastatic Melanoma including Cells with Stemness Features. *Clin Cancer Res*, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0061 (2013).
- 101 Karandikar, M., Xu, S. & Cobb, M. H. MEKK1 binds raf-1 and the ERK2 cascade components. *J Biol Chem* **275**, 40120-40127, doi:10.1074/jbc.M005926200 (2000).
- 102 Molina, J. R. & Adjei, A. A. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol* **1**, 7-9 (2006).
- 103 Avruch, J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1150-1160, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.11.006 (2007).

RIASSUNTO

Contesto e razionale

Nell'ultimo decennio, l'introduzione in ambito oncologico, dell'immunoterapia basata su anticorpi anti-PD-1 nella pratica clinica ha rivoluzionato il trattamento di tumori come il melanoma e NSCLC. Tale successo è stato attribuito al blocco dell'attività inibitoria di PD-1 sulla risposta immunitaria anti-tumorale. Tuttavia recenti studi preclinici suggeriscono un potenziale meccanismo aggiuntivo della terapia anti-PD-1, indipendente dall'azione linfocitaria.

Nell'ambito del melanoma è stata riportata, anche dal nostro gruppo, l'espressione intrinseca di PD-1 su una frazione di cellule tumorali con caratteristiche di staminalità promuoventi la crescita tumorale e potenzialmente modulabile con terapia anti-PD-1.

Obiettivi e disegno sperimentale

Ipotesi. La nostra ipotesi è che l'espressione tumorale intrinseca di PD-1 possa interessare anche l'ambito del tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC). Le cellule tumorali PD-1⁺ potrebbero caratterizzare un compartimento "stem-like", responsabile di chemio-resistenza e ripresa di malattia, con potenziali implicazioni terapeutiche.

Obiettivo. Lo scopo di questo studio è esplorare l'espressione intrinseca, il ruolo funzionale e la modulazione terapeutica del recettore PD-1 in cellule di NSCLC.

Disegno sperimentale. L'espressione di PD-1 è stata valutata in silico attraverso analisi bioinformatica della banca dati CCLE, e confermata in laboratorio a livello proteico e molecolare (citofluorimetria, western blot, RT-PCR, Immunofluorescenza). In considerazione dell'ipotetica espressione preferenziale di PD-1 a livello di cellule tumorali con caratteristiche di staminalità, le analisi in laboratorio sono state condotte su colture di NSCLC in condizioni di adesione, in condizioni preferenziali di staminalità che inducono formazione di "pneumofere stem-like" in sospensione e dopo trattamento *in vitro* con chemioterapia (Cisplatino).

Il ruolo pro-tumorigenico di PD-1 sulle cellule di NSCLC è stato esplorato tramite stimolazione sperimentale con il rispettivo ligando solubile (PD-L1s). A livello meccanicistico sono state indagate le principali molecole coinvolte nella via di trasduzione del segnale a valle di PD-1 tramite *proteome profiler antibody array*.

La possibile modulazione terapeutica del recettore PD-1 in NSCLC è stata attraverso un suo blocco funzionale specifico (Ab anti-PD-1 *shRNA-PD-1* e CRISP-Cas9)

Risultati

L'espressione intrinseca di PD-1 in NSCLC è stata confermata, analizzando dati in silico su CCLE, in 67 linee cellulari di Adenocarcinomi (Affimetryx RNA value 4,348 [3,882-6,361]) e in 28 linee cellulari di carcinomi a Cellule Squamose (RNA value 4,338 [3,995-5,178]). In laboratorio, l'espressione tumorale intrinseca di PD-1 è stata confermata in una ristretta ma costante frazione ($2\% \pm 0.3$ n=7) di tutte le linee di NSCLC analizzate, comprese quelle primarie derivate da paziente. I dati sono stati confermati mediante RT-PCR e WB. La frazione di cellule tumorali PD-1⁺ è risultata arricchita significativamente in pneumosfere *stem-like* generate in condizioni di coltura selettive per cancer stem cells (CSC), rispetto alle colture di controllo in adesione (12% [4-36] vs 2% [1-5] (P<0,0001, n=6). In pneumosfere l'espressione dell'mRNA di PD-1 e del gene di staminalità Oct4 è risultata aumentare a livelli paragonabili (4.5 vs 4 fold, n=5).

Funzionalmente, il blocco di PD-1 con Ab anti-PD-1 ha ridotto significativamente la formazione media di pneumosfere ($-30\% \pm 2$, n=6; P=0.0004), incrementata invece da stimolazione con PDL-1s ($25\% \pm 2$, n=3, P= 0.007). Questi risultati sono stati confermati silenziando l'espressione di PD-1 mediante RNA-Interference e CRISP-Cas9.

Il trattamento *in vitro* con Cisplatino (dose IC50) ha provocato un relativo arricchimento della frazione di cellule tumorali PD-1⁺ (2.5 ± 0.3 fold, n=4) rispetto al controllo non trattato. Dopo cisplatino, il sequenziale trattamento con Ab anti-PD-1 ha inibito

significativamente la ripresa proliferativa delle cellule in adesione e la formazione di pneumosfere rispetto ai relativi controlli non trattati.

A livello meccanicistico i dati sono risultati in linea con le iniziali osservazioni ottenute nel melanoma. L'attivazione di PD-1 in NSCLC, in seguito a legame con PD-L1s, ha determinato un aumento della fosforilazione delle proteine RSK1, RSK2 e p70 S6 chinasi, mentre nelle pneumosfere H1975^{PD-1KO} è prevalsa la fosforilazione delle proteine p38 α , JNK2 e HSP27

Conclusioni.

Le nostre osservazioni riportano come il recettore PD-1 sia intrinsecamente espresso con funzione pro-tumorigenica in cellule di NSCLC con caratteristiche staminali, potenzialmente modulabile da anticorpi bloccanti.

La frazione di cellule PD-1⁺ di NSCLC si arricchisce dopo chemioterapia supportando l'idea di una maggiore resistenza da parte di queste cellule alla chemioterapia.

L'inibizione, tramite Ab anti-PD1, della ripresa proliferativa di NSCLC dopo cisplatino è di potenziale rilevanza in prospettiva clinica.

In conclusione i nostri dati descrivono un nuovo, intrinseco ruolo del recettore PD-1 a livello di NSCLC, indipendente dall'azione linfocitaria. Il lavoro fornisce basi traslazionali per ulteriori esplorazioni funzionali e nuove potenzialità terapeutiche del trattamento con "checkpoint inhibitors" anti-PD1.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Professor Massimo Aglietta, relatore di questo lavoro di tesi, per avermi consentito di svolgere al meglio il mio progetto di Dottorato presso il suo laboratorio di ricerca.

Ringrazio il Dott. Dario Sangiolo, co-tutor del mio progetto, per la sua guida sapiente, per la competenza con cui mi ha indirizzato e per gli indispensabili consigli durante la progettazione e stesura del mio lavoro.

Un ringraziamento speciale va a Valeria che in questi anni ha rappresentato per me una guida e un sostegno sempre presente dal punto di vista lavorativo e nello stesso tempo una grande amica con cui ho condiviso gioie, difficoltà, successi e insuccessi. Grazie Valeria, non solo per quello che mi hai insegnato ma per come me lo hai insegnato.

Desidero inoltre ringraziare Chiara che nonostante la sua giovane età, oltre ad essere un'amica con cui trascorro le mie giornate in laboratorio condividendo sia momenti divertenti che di sconforto, mi ha insegnato e supportato tanto, rappresentando per me un punto di forza durante lo svolgimento del mio progetto di dottorato. Grazie Chiara per la tua disponibilità e gentilezza.

Voglio ringraziare le colleghe con cui ho condiviso centinaia di ore in laboratorio, a mensa, al bar...così diverse ma così importanti, ognuna per ragioni uniche. Grazie Giulia, Erika, Sonia e Lidia.

Grazie al mio fidanzato Francesco che mi ha sostenuta, tranquillizzata, incoraggiata e ridimensionato le mie preoccupazioni stimolando la mia ricerca. Grazie Francesco per tutto l'affetto e per tutta la forza che ogni giorno mi dai.

Grazie a mamma e papà: non so da dove cominciare per esprimere la mia gratitudine. Grazie per avermi amato e sostenuto, per avermi permesso di studiare, di scegliere la mia strada e di seguire le mie inclinazioni. Spero oggi possiate essere felici.

Grazie alle mie sorelline Giusy e Tina che riempiono la mia vita di gioia e nel viaggio della vita rendono più facile la salita. Vi voglio bene.