LAVORO DI MATURITÀ - GB

BIOLOGIA E CHIMICA (BIC)

GABRIEL BOGADO
LICEO CANTONALE DI MENDRISIO (ANNO 2015-2016)

Indice

LAVORO DI MATURITÀ

Abstract	3
Introduzione	4
Materiali e metodi	6
Risultati e commento	8
Discussione	13
Conclusioni e prospettive future	13
Glossario	14
Ringraziamenti	15
Bibliografia e Sitografia	15
Allegati	16

ALLEGATI PER LA COMPRENSIONE

Vedi Indice separato!

Capacità citotossica di cellule T citotossiche CD8$^+$ OT-1 trasdotte in modo da esprimere un recettore invariante (CAR-L363 *receptor*) che sia in grado di riconoscere il complesso non variabile CD1d+α-GalCer, di solito riconosciuto dalle cellule *i*NKT con il loro TCR a bassa variabilità

The killing ability of T CD8$^+$ OT-1 cells transduced in order to express an invariant receptor (CAR-L363 receptor) capable of identifying the invariant CD1d+α-GalCer complex seems to increase. The iNKT cells have the habit of recognizing this complex with their TCR, which have a lower variability

Gabriel Bogado, IV C

Maturity work in Biology and Chemistry (BIC)

Responsible teachers: Luigi Croci e Federico Imbesi

Premessa

Questo lavoro di maturità è stato sviluppato sul lavoro di Master di Nina Dumauthioz, in fase di svolgimento, presso l'università di Losanna (UNIL) sotto la supervisione del Prof. Pedro Romero e della Dr. Alena Donda.

Foreword

This maturity work has been expanded upon the Nina Dumauthioz's Master work, under development at the University of Lausanne (UNIL) and under the supervision of Prof. Pedro Romero and Dr. Alena Donda.

ABSTRACT

Cellule citotossiche T CD8$^+$ H-2Kb/OVA (OT-1), caratterizzate dall'espressione di un TCR transgenico capace di riconoscere un singolo peptide dall'antigene *ovalbumin*, sono state trasdotte affinché esprimano un recettore invariante chiamato CAR-L363 in grado di riconoscere il complesso CD1d+α-GalCer, espresso particolarmente da APCs.

L'obiettivo principale è di aumentare le interazioni tra cellule T e APCs, permettendo potenzialmente un *priming* antigenico più forte e preciso. Questo innovativo approccio di immunoterapia verso i melanomi offrirebbe una doppia via di attivazione delle cellule T, TCR tumore-specifico e CAR. Si potrebbe ottenere un effetto "additivo", oppure addirittura sinergizzante. Le questioni di sicurezza richiedono una particolare attenzione e valutazione in modo da evitare qualsiasi attivazione non desiderata: finora la specificità dell'anticorpo L363 sembra essere ristretta a CD1d caricato con il ligando glicolipide sintetico α-GalCer.
Con questo approccio si spera di poter combattere i tumori principalmente in due modi: 1. migliorando il *priming* delle cellule T verso gli antigeni tumorali. 2. eliminando direttamente le cellule mieloidi esprimenti CD1d conosciute per rendere immunosoppressivo l'ambiente tumorale.

L'articolo discute il progetto nella sua totalità. Sfortunatamente, non è stato possibile seguire il progetto nella sua interezza di persona a causa della sua lunga durata. La parte sperimentale dove ero personalmente presente è la fase dove si creano i vettori retrovirali da utilizzare successivamente per indurre la trasduzione di CAR-L363 *receptor* nelle cellule T CD8$^+$ OT-1. Sono stati testati tre differenti *linkers* tra i domini della catena pesante e leggera di L363.

H-2Kb/OVA cytotoxic CD8$^+$ T cells (OT-1) were transduced to express an invariant receptor called CAR-L363 capable of recognizing the complex of CD1d+α-GalCer expressed in particular by Antigen Presenting Cells (APC).

The aim was to increase the crosstalk between T cells and APCs which would potentially lead to a stronger antigen priming. This innovative approach of cancer immunotherapy would offer a dual activation of the T cells via the tumor-specific TCR and via the interaction with CD1d, which might be additive or even synergize. Safety issues will have to be carefully evaluated to avoid any unspecific activation, although the antigen specificity of the L363 antibody has been so far restricted to CD1d only when loaded with the synthetic glycolipid ligand α-GalCer.
This approach is expected to fight against the tumors in two ways, 1) by enhancing the T cell priming against tumor antigens, OVA being the model antigen used in this study, 2) by directly killing CD1d-expressing myeloid cells known to render the tumor environment immunosuppressive.

The article discusses the project in its entirety. The experimental phase where I was personally present is the step where the retroviral vectors have been developed. Three different linkers between the domains of the L363 heavy and light chains have been tested. These vectors have been used to transduce the CAR-L363 receptor in the OT-1 CD8$^+$ T cells. Unfortunately, it has been impossible for me to follow all the project due to its length.

INTRODUZIONE

Uno degli obiettivi principali di questo progetto è trovare dei meccanismi funzionanti e applicabili per facilitare l'avvio dell'attività citotossica delle cellule T $CD8^+$ verso le proprie cellule bersaglio, specialmente verso i melanociti.

Le cellule T citotossiche $CD8^+$ sono dei linfociti che eliminano, stimolando l'apoptosi, le loro cellule bersaglio. La loro azione è diretta, efficace e specifica, di conseguenza finemente controllata da processi biologici che la regolano per evitare dei problemi di autoimmunità. Perché vi sia l'azione effettrice di queste cellule devono infatti essere soddisfatte tutta una serie di condizioni. Come tutte le cellule T *naive* per attivare un linfocita T $CD8^+$ *naive* sono necessari tre segnali di attivazione. Il primo segnale è costituito dal legame del recettore TCR con la molecola MHC di classe I che contiene, all'interno della propria tasca, l'antigene estraneo. Questo legame viene determinato dalla specificità di queste cellule per l'antigene patogeno o tumorale e per la molecola MHC di classe I. Il secondo segnale è dato dalle interazioni costimolatrici specializzate nel controllo della sopravvivenza e dell'espansione cellulare che si creano tra le APCs e la cellula T *naive*. Le citochine che si occupano della differenziazione in tipi diversi cellulari effettori costituiscono il terzo segnale. Questo sistema si rivela molto efficiente e rappresenta un'ottima »valvola di sicurezza« per evitare problemi autoimmunitari; è sufficiente però che uno di questi passi non venga rispettato affinché si giunga, all'annullamento dell'attività citotossica, alla delezione clonale o all'anergia invece che all'attivazione, questo permette purtroppo, a volte, a cellule cancerogene di eludere le difese immunitarie.

Le cellule T $CD8^+$ *naive* risultano particolarmente avare di IL-2 per la loro differenziazione e proliferazione. L'alta capacità costimolatrice delle cellule dendritiche mature (APC), che induce la produzione di IL-2 da parte delle cellule T e stimola anche la proliferazione e differenziazione delle cellule T $CD8^+$ attivate, è stata sfruttata negli ultimi anni proprio per combattere i tumori. Anche le cellule T $CD4^+$ possono produrre in parte IL-2.
Le cellule T $CD8^+$ attivate producono anche IFN-γ, TNF-α e LT-α, che contribuiscono ulteriormente, attraverso meccanismi diversi dall'apoptosi, alla difesa dell'ospite.

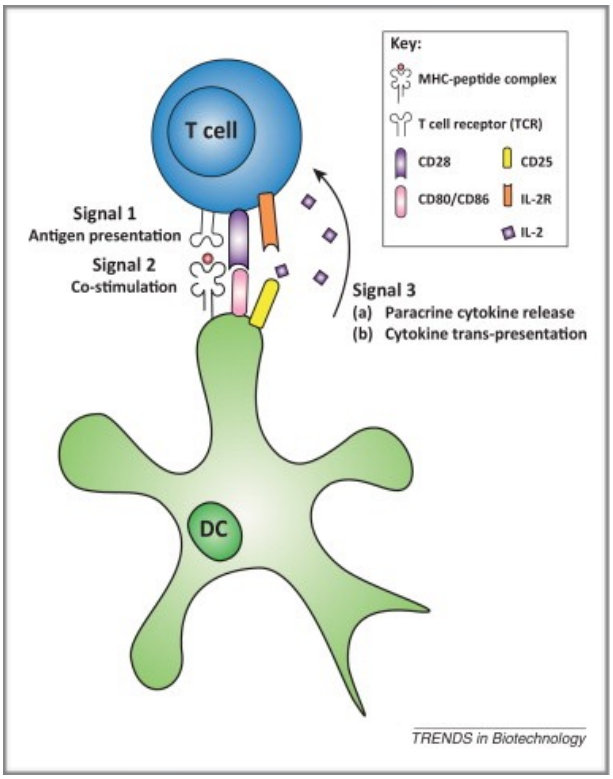


Figura 1: I tre segnali per l'attivazione dei linfociti T

I melanomi possono eludere la sorveglianza delle cellule T $CD8^+$ sfruttando diversi stratagemmi, come per esempio, la

presentazione di un antigene *self* sulla tasca della molecola MHC di classe I, rendono le cellule citotossiche totalmente innocue, dato che normalmente le cellule T che risultano *self*-reattive vengono già eliminate nel timo per evitare dei problemi autoimmunitari nell'organismo. Un altro punto critico è rappresentato dalla processazione dei peptidi per venire presentati sulle molecole MHC di classe I. Questo meccanismo è molto complesso ed elaborato e mediante appositi sistemi (es. evasine) può essere interrotto o compromesso, indebolendo o vanificando la risposta dei linfociti T $CD8^+$. Un ulteriore metodo per eludere la sorveglianza delle cellule T $CD8^+$ utilizzato dai melanomi è la secrezione di fattori immunosoppressivi e l'espressione di ligandi inibitori, i quali inibiscono le funzioni delle cellule T. Tenendo conto anche del polimorfismo della molecola MHC di classe I e della variabilità dei TCR sulle cellule T $CD8^+$ l'attività citotossica diventa molto selettiva e puntuale.

Una piccola sottopopolazione di linfociti chiamati *i*NKT *cells* presentano sulla loro superficie un particolare TCR che è in grado di interagire con le molecole della famiglia CD1 (molecole MHC di classe Ib). La prima caratteristica importante riguarda il TCR di queste cellule, che presenta una variabilità minore rispetto a quello dei linfociti »classici«. CD1d è un complesso tipo MHC di classe I, presente nel topo e nell'uomo, che, a differenza delle molecole MHC »classiche«, non è polimorfo e presenta antigeni lipidici piuttosto che antigeni peptidici.

Le cellule *i*NKT hanno un'attività principalmente regolativa e una capacità di rapida produzione di diverse citochine (IL-4, IL-10, IFN-γ, ecc.), svolgendo il loro ruolo specialmente nelle fasi iniziali di una risposta immunitaria. Questo fatto, assieme alla loro capacità di interagire con molteplici protagonisti del sistema immunitario innato e specifico (NK *cells*, APCs, ecc.) e di essere potenzialmente in grado di regolarne la differenziazione, le rende particolarmente interessanti. Purtroppo queste cellule presentano anche un grande »difetto« per lo sviluppo di tecniche terapeutiche contro i tumori: sono molto difficili da coltivare *in vitro*. Ciò che rende, nonostante le grandi potenzialità, lo studio e la creazione di una terapia, utilizzando queste cellule, molto costoso e complicato.

La famiglia CD1 è espressa sulle cellule dendritiche, sui monociti e su alcuni timociti. L'uomo possiede cinque geni CD1 (da CD1a fino a CD1e), mentre il topo ne possiede solo due che sono molto omologhi (CD1d1 e CD1d2). Come detto in precedenza queste molecole sono specializzate nel legare e nel presentare dei lipidi e dei glicolipidi piuttosto che dei peptidi.

Lo scopo sperimentale di questo studio è di ingegnerizzare la cellula "T citotossica OT-1", così che esprima, fra i suoi recettori di membrana, un recettore CAR capace di riconoscere CD1d esponente un lipide di nome α-GalCer (CAR-L363). In seguito si vuole valutare se l'aggiunta e l'espressione di questo particolare recettore sia in grado di aumentare la capacità citotossica delle cellule T $CD8^+$ verso le cellule *target* ed eventualmente se questo recettore sia in grado di attivare la cellula autonomamente senza il bisogno ulteriore dell'interazione del TCR »classico« delle cellule T $CD8^+$ con la cellula bersaglio.

CAR-L363 è un recettore costruito artificialmente affinché sia in grado di riconoscere il complesso CD1d+α-GalCer,

mantenendo una trasduzione del segnale simile a quella del TCR »classico«.
I recettori CAR sono dei recettori artificiali costruiti in laboratorio in modo da avere una specificità arbitraria, vengono definiti chimerici perché le loro parti vengono da fonti diverse. Questo tipo di recettori presentano diversi vantaggi: non solo limitati all'attività e alla processazione peptidica delle molecole MHC "classiche", e riconoscono antigeni non peptidici. Queste caratteristiche risultano di primaria importanza visto che alcuni tumori attuano delle strategie immuno-evasive che interessano proprio la processazione e la presentazione dell'antigene da parte delle molecole MHC "classiche"; inoltre parecchi antigeni tumore-specifici risultano essere carboidrati o glicolipidi. Oltre a ciò, risultando CAR una singola catena, si evitano dei problemi conformazionali che i "classici" TCR delle cellule T potrebbero subire durante la formazione e combinazione delle due catene.
Un grande difetto di questi recettori è che essi sono limitati al riconoscimento di peptidi di superficie. Questo non dipende dalla processazione degli antigeni.

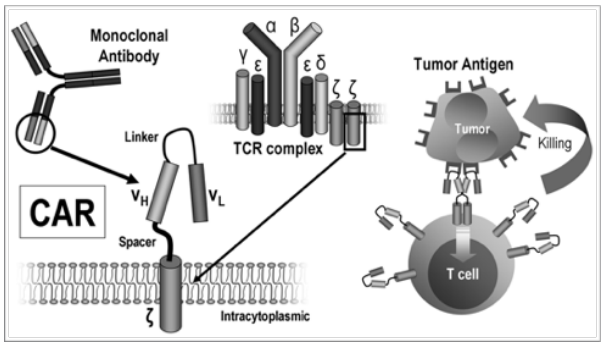


Figura 2: Struttura basica di un recettore CAR derivato da un anticorpo monoclonale

Nello studio rientrerà anche una valutazione sulla capacità di produrre citochine da parte delle cellule T citotossiche OT-1 che esprimono il recettore per CD1d+α-GalCer.

MATERIALI E METODI

Costruzione del segmento genico codificante CAR-L363

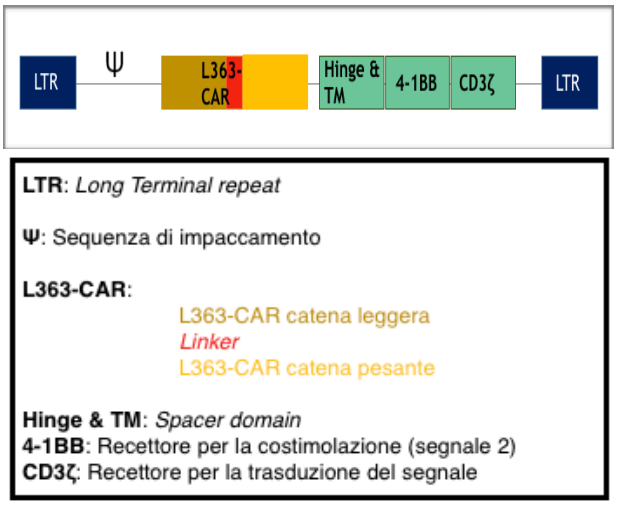


Figura 3: Frammento genico codificante CAR-L363

La prima fase consiste nel costruire un segmento genico che contenga le componenti necessarie per codificare il recettore CAR. Sono stati creati 3 tipi di CAR, introducendo una certa variabilità nella lunghezza dei segmenti (*linkers*) che collegano le due regioni V (V_H e V_L) che compongono la regione extracellulare del recettore CAR.

La trasduzione del segnale è mantenuta simile a quella del TCR »classico«.

Trasfezione[1] del recettore

La seconda fase consiste nell'inserire questo segmento genico all'interno del genoma della cellula T $CD8^+$ OT-1. Per questo *step* si è optato per una trasduzione[2].

Utilizzando un polimero cationico (*TurboFect method*), la regione che codifica CAR-L363 è

[1] Trasduzione(vedi 2) che utilizza come vettore per trasportare il materiale genetico esogeno dei virioni.

[2] Inserimento di materiale genetico esogeno all'interno del genoma di una cellula.

stata inserita nel plasmide delle *eco-phoenix-cells*[3].

Le *eco-cells* (70-80% confluenza) sono state trasdotte con 21.4 µg di costrutto retrovirale (CAR) e 14.34 µg di *phoenix-exo*: In 2 mL di *RPMI-serum free medium* con 10 mM di HEPES si è aggiunto 107 µL di *TurboFect*, dopo cinque minuti si ha prelevato 0.7 mL di questa soluzione e si sono aggiunti questi 0.7 mL al *plasmid mix* (21.4 µg *transfer plasmid* (CAR) e 14.34 µg di *phoenix-exo*) e immediatamente riportati alla mistura da trasfezione goccia a goccia. Si ha incubato questo miscuglio per 30 min. a temperatura ambiente, e infine la mistura da trasfezione è stata aggiunta alle *eco-cells* goccia a goccia. Le *eco-cells* sono state incubate per 1 min e, in seguito, si sono aggiunti 31 mL di *RPMI medium*.

In seguito sono stati prelevati »i virus delle 48h«, visto che in genere si rivelano i più efficienti nella trasfezione, e si è fatto in modo di »mettere a contatto« le cellule T citotossiche $CD8^+$ OT-1, prelevate e selezionate dalla milza di un topo utilizzando delle biglie magnetiche, con i vettori retrovirali con dei rapporti ben definiti (fissazione per *retronectin*). Questo fine controllo è necessario per evitare un eccessivo livello di stress cellulare durante la trasduzione delle cellule T citotossiche; massimizzando così il numero di cellule T $CD8^+$ OT-1 trasdotte funzionali e minimizzando l'apoptosi da stress cellulare.

Esperimenti *in vitro*

Inizialmente sono stati eseguiti dei *killing assays Chromiun 51* sulle cellule bersaglio variando il profilo molecolare superficiale di quest'ultime (CD1d±α-GalCer + MHC I±peptide), con l'obiettivo di valutare la citotossicità delle cellule T $CD8^+$ OT-1 trasdotte. In un secondo tempo si è proceduto con degli esperimenti al fine di misurare la produzione delle citochine (*cytokines' measurements by flow cytometry*) dopo l'attivazione delle cellule T $CD8^+$ via CAR e/o TCR »classico«.

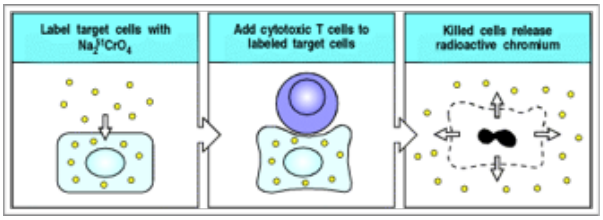


Figura 4: Schema *killing assay Chromium 51*

È stato fatto anche un esperimento che misura la variazione dell'espressione di CD107a (conosciuto anche come LAMP-1), che è un buon marcatore per la degranulazione e l'attività citotossica dei linfociti T $CD8^+$ e NK *cells*; indicando indirettamente la citotossicità di una determinata cellula: maggiore è l'espressione di CD107a più una cellula dovrebbe essere capace di eliminarne altre.

Esperimenti *in vivo*

In futuro si eseguiranno le prime sperimentazioni *in vivo*. Utilizzando dei topi col melanoma B16-OVA si compieranno dei trasferimenti adottivi di cellule T $CD8^+$ OT-1 trasdotte specifiche per questo melanoma e si confronterà se esiste un cambiamento nella variazione della massa tumorale rispetto a un topo malato che non riceve un trasferimento adottivo. Ovviamente la terapia non deve

[3] Ecotropiche significa che i virus prodotti da queste cellule possono infettare solo una specie. Le *eco-cells* contengono i tre geni fondamentali per la costruzione di vettori virali (GAG, ENV e POL). Le *eco-cells* costituiscono la »fonte produttiva« dei virioni e in questo caso sono stati creati dei retrovirioni.

essere dannosa per l'ospite, quindi la resistenza dell'ospite alla terapia potrebbe essere un possibile problema futuro da affrontare prima di pensare a uno sviluppo terapeutico per gli esseri umani.

Citometria a flusso e Tetrameri

Per diversi risultati sono stati utilizzati la citometria a flusso e i tetrameri di CD1d+α-GalCer.

RISULTATI E COMMENTO

Allegato 1

Grafici ottenuti mediante la citometria a flusso che esprimono l'efficienza della trasduzione (per un solo linker: N3). Nota bene: la stimolazione del recettore CAR, mediante i complessi plastic-coated CD1d+α-GalCer produce una leggera down-regolazione del recettore che viene internalizzato dalla cellula!

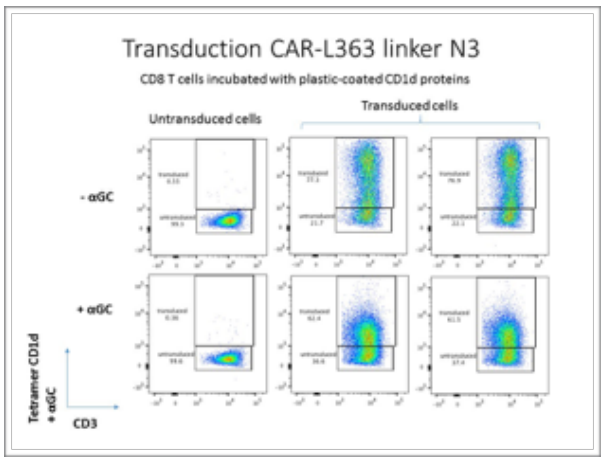


Figura 5: Efficienza di trasduzione del CAR-L363 col linker N3 [Allegato 1]

La prima riga di grafi ci illustra in modo più diretto l'efficacia della trasduzione, dato che in questo caso le cellule trasdotte e non trasdotte sono state incubate in piastre rivestite di CD1d, ma senza la presenza di α-GalCer (prima di eseguire analisi con la citometria a flusso). In queste condizioni non dovrebbe avvenire nessuna attivazione cellulare via CAR, quindi le cellule trasdotte non dovrebbero internalizzare i complessi CAR come normale processo dopo l'attivazione cellulare; anche le cellule non trasdotte non dovrebbero avere alcuna attivazione dato che presentano soltanto il »classico« TCR. I tetrameri quindi sono in grado di legare tutti i recettori CAR presenti sulla superficie cellulare dopo la trasduzione. L'efficacia supera in media il 75% e questo risulta essere molto buono tenendo conto dello stress cellulare che le cellule devono superare durante il processo trasduttivo. Nella seconda riga di grafici le piastre sono cambiate: si aggiunge al complesso CD1d il lipide α-GalCer e quindi in questo caso si cerca di attivare le cellule trasdotte nel periodo di incubazione antecedente l'analisi con la citometria a flusso. Per le cellule non trasdotte non dovrebbero esserci delle differenze rimarcabili; nel caso delle cellule trasdotte invece dovremmo avere una *down*-regolazione di CAR e quindi, con un'analisi successiva che utilizza i tetrameri, la percentuale di cellule trasdotte dovrebbe essere minore. Questo esperimento ci permette di verificare due questioni importanti del recettore CAR: la funzionalità e l'efficienza nella trasduzione del segnale di CAR; infatti avere delle cellule con CAR, il quale però non è in grado di trasmettere segnali all'interno della cellula T $CD8^+$ OT-1 sarebbe del tutto inutile. Anche in questo caso i risultati sono molto buoni, infatti il segnale di marcaggio sembra essere diminuito di circa il 15% in media nelle cellule trasdotte, invece, come previsto, nelle cellule non trasdotte non ci è stata alcuna differenza degna di nota.

Allegato 2

Istogrammi che illustrano il cambiamento dell'espressione di CD107a nelle cellule T $CD8^+$ OT-1 trasdotte e non trasdotte. Medium

è il controllo negativo (nessuna attivazione). Pma/iono è invece il controllo positivo (massimo livello di secrezione di citochine senza variazione dell'espressione di CD107a nelle diverse cellule trasdotte!). Il tempo di attivazione è di 30 min, quello di incubazione 4h. Per separare i vari tipi cellulari mischiati si sono utilizzati diversi markers specifici: Acquadead (elimina le cellule morte), Tetrameri CD1d+α-GalCer (selezione delle cellule che esprimono il CAR) e CD3 e CD8 (eliminazione delle cellule B16 [entrambi negativi]).

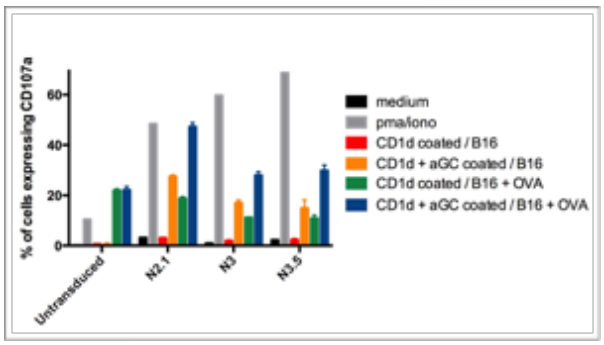


Figura 6: Espressione di CD107a (asse x: "configurazioni" delle cellule T CD8$^+$ OT-1; asse y: percentuale di cellule che esprimono CD107a) [Allegato 2]

Osservando l'allegato 2 possiamo formulare alcuni commenti: per prima cosa possiamo affermare che i nostri controlli (negativo e positivo) siano adatti dato che i nostri risultati si trovano all'interno del "*range*" creato da essi. Prevedibilmente nel caso in cui abbiamo soltanto il *medium* non abbiamo una *up*-regolazione importante nell'espressione di CD107a, riscontriamo soltanto un leggero aumento nelle cellule trasdotte forse dovuto proprio alla trasduzione. Anche nel caso in cui le cellule siano messe a contatto solo con CD1d e con B16 senza OVA sembra che non ci sia alcun effetto. Ci ritroviamo una situazione simile a quella del caso con solo il *medium*. Se invece le cellule vengono messe a contatto con CD1d+α-GalCer la situazione si modifica: rispetto alle cellule non trasdotte queste subiscono una *up*-regolazione dell'espressione di CD107a degna di nota, specialmente nel caso col linker N2.1, quindi da questo primo risultato sembra che il complesso CD1d+α-GalCer aumenti la citotossicità della cellula (almeno è un segnale indiretto, il *killing assay* dona dei dati più affidabili e tangibili). La quarta situazione è più particolare, in questo caso le cellule sono state poste con CD1d e con B16+OVA, ma CD1d non possedeva all'interno della sua "tasca" α-GalCer; e le cellule trasdotte hanno presentato una *down*-regolazione dell'espressione di CD107a (meno marcata con N2.1). Sembra quasi che l'aggiunta del recettore CAR alla cellula T CD8$^+$ implichi la necessità che anche esso si leghi alla cellula *target* e non solo il TCR "classico" in modo da permettere una *up*-regolazione di CD107a e non l'effetto contrario. Nel quarto caso (CD1d+α-GalCer e B16+OVA) troviamo i livelli più alti di espressione di CD107a, ciò nonostante, escluso N2.1, l'aumento dell'espressione non è così marcato rispetto alle cellule non trasdotte. Una questione che appare ancora scura è il motivo per il quale l'espressione di CD107a cambi in modo così marcato tra cellule trasdotte e non trasdotte col controllo positivo (*pma/iono*) e la causa per la quale ci sia una discreta differenza tra i differenti *linkers* con lo stesso controllo. Interessante notare come le cellule che utilizzano il linker N2.1 abbiano una espressione di CD107a (caso CD1d+α-GalCer e B16+OVA) comparabile al livello del controllo positivo. Per concludere possiamo dire che si ottiene un "effetto sommativo" dell'espressione di CD107 con la doppia interazione (sia CAR sia TCR "classico") e che anche la singola interazione soltanto con CAR è promettente. Sembra che il recettore CAR (simile al TCR presente sulle *i*NKT *cells*) sia in grado di attivare una risposta più comparabile a una risposta immunitaria innata nelle cellule T CD8$^+$, e quindi più immediata

e con poche pretese costimolatrici (l'attivazione via TCR »classico« suole essere più avida di costimolazione).

Allegato 3

Il terzo allegato (allegato 3) illustra invece la produzione di IFN-γ e TNF-α da parte delle cellule OT-1 di questo studio. I metodi utilizzati per l'attivazione e la selezione delle cellule sono analoghi a quelli dell'allegato numero due. Nota bene: Controlli positivi raggiungono il 100%.

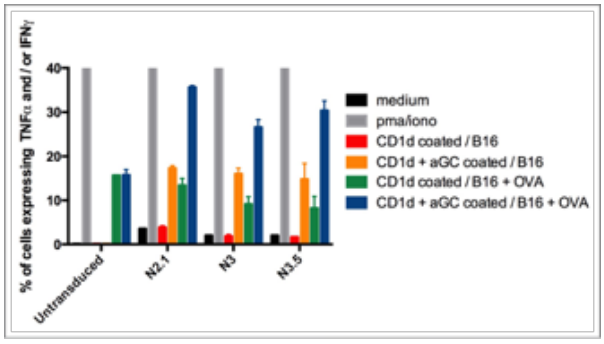


Figura 7: Produzione di TNF-α e/o IFN-γ (asse x: "configurazioni" delle cellule T CD8$^+$ OT-1; asse y: percentuale di cellule che esprimono TNF-α e/o IFN-γ) [Allegato 3]

I risultati dell'allegato 3 rispecchiano in parte quelli dell'allegato due, infatti le tendenze sono simili a quelle dell'allegato precedente. Troviamo però delle differenze: 1. Le variazioni tra i vari *linker* (cellule trasdotte) sono meno marcate, restano comunque le cellule col *linker* N2.1 quelle che hanno il risultato »apparentemente« migliore. 2. Il controllo positivo è equiparabile per tutti i casi. Questo dato può comunque essere fuorviante dato che *pma/iono* induce la massima produzione di citochine da parte delle cellule T. Anche in questo caso troviamo »l'effetto sommativo« con la doppia attivazione.

Allegato 4 e 5

Nell'allegato 4 e 5 troviamo i risultati dei killing assays visti da due prospettive differenti. Le cellule target per questi saggi sono state le cellule RMA-S-CD1d che come si può dedurre dalla denominazione, esprimono CD1d. Queste cellule sono state "costruite" con quattro configurazioni di profilo molecolare di membrana differenti: 1. Solo CD1d 2. Solo CD1d+α-GalCer 3. CD1d coniugato a OVA 4. CD1d+α-GalCer coniugato a OVA. In seguito le cellule target sono state messe a contatto con le cellule T CD8$^+$ OT-1 e si è misurata la percentuale di cellule target che sono state uccise. Sono stati fatti dei cambiamenti nel rapporto tra cellule target e cellule T CD8$^+$: le cellule target erano fisse a 1'000 unità, si è variato il numero di cellule citotossiche da 30'000 a 1'000 e si sono osservate le variazioni nella portata distruttiva delle cellule T CD8$^+$ OT-1 in studio. Ovviamente l'esperimento è stato eseguito per i tre possibili linkers del CAR ed è stato eseguito nelle medesime condizione in tutte e tre i casi.

Analizzando l'allegato 4 possiamo notare diversi aspetti. Iniziando con una vista d'insieme si può osservare come in generale con un rapporto maggiore (30:1) la percentuale di cellule uccise sia maggiore, ciò nonostante troviamo delle eccezioni (RMA-S-CD1d+α-GalCer + OVA linker N3 e N3.5) dove nel secondo rapporto (10:1) si trova un aumento della citotossicità. Utilizzando soltanto questi risultati è di difficile interpretazione questo cambiamento, sarebbero necessari degli ulteriori studi più specifici per chiarire questi coni d'ombra. Anche il caso con RMA-S-CD1d presenta un andamento "ballerino" simile a quello appena citato, ma con i linkers N2.1, N3 e con le cellule non trasdotte (meno marcato con queste ultime), oltre a ciò l'aumento di percentuale di cellule uccise, in questi casi, tende a spostarsi verso rapporti più bassi (3:1 e 1:1). Un altro aspetto che è comune tra le cellule trasdotte è il tipo di cellula eliminato

maggiormente ad alti rapporti (30:1), in tutte i tre si tratta di RMA-S-CD1d+α-GalCer, che poi subisce un brusco calo a rapporti più bassi e viene di solito superata dalla cellula che ha una doppia interazione; è presto per trarre delle conclusioni sul motivo di questa alta vulnerabilità di RMA-S-CD1d+α-GalCer ad alti rapporti; forse è dovuto al recettore CAR: questo recettore ha una funzione simile a quella del TCR delle *i*NKT cells che hanno un azione comparabile alle cellule del sistema immunitario innato e quindi il comportamento può essere differente rispetto a quello del TCR "classico". Ciò nonostante l'affiancamento dei due recettori (CAR e TCR "classico") ha comunque un'efficienza superiore a rapporti medio/bassi rispetto alla singola attivazione via TCR "classico", e subisce meno bruschi cali di citotossicità in confronto all'attivazione soltanto via CAR. Confrontando i quattro grafici di questo saggio è difficile dire quale sia il *linker* più efficiente/migliore ad alti rapporti potrebbe essere N3 a medi rapporti sembra essere migliore N2.1. A bassi rapporti i risultati tendono ad essere più "vicini" tra loro (si possono trovare meno differenze di percentuale di cellule uccise per tipo [convergenza]), escluso il caso con RMA-S-CD1d e linker N3.5, dove la percentuale di cellule è abbastanza inferiore rispetto agli altri casi (rapporto alto, tenere d'occhio la barra di incertezza molto estesa!). Un altro aspetto positivo delle cellule trasdotte è che in nessuno dei casi si è assistito ad un aumento del numero di cellule *target* rispetto alle 1'000 unità iniziali, si è sempre trovato una capacità citotossica anche se minima in grado di diminuire il numero delle cellule target iniziale; invece nelle cellule non trasdotte RMA-S-CD1d±α-GalCer, e persino con RMA-S-CD1d + OVA (rapporto 1:1), le cellule bersaglio sono riuscite ad aumentare rispetto alla quantità iniziale. Solo la doppia presenza α-GalCer e OVA ha evitato questo avvenimento. Come era prevedibile il maggior potere citotossico nelle cellule non trasdotte lo trovo verso le cellule che esprimono OVA e ad alti rapporti, oltre a ciò la presenza anche di CD1d+α-GalCer aumenta leggermente la capacità citotossica delle cellule non trasdotte, il motivo è ancora di difficile lettura.

Per concludere si può comunque dichiarare che, in generale, la trasduzione abbia aumentato reattività contro le cellule bersaglio delle cellule $CD8^+$ citotossiche e che sia difficile trovare una »regola generale« che spieghi ogni cambiamento.

Con l'allegato 5 la prima questione che salta all'occhio riguarda l'aumento generale della capacità citotossica delle cellule quando i *targets* esprimo uno dei due o entrambi i complessi (CD1d+α-GalCer e/o OVA), l'unica eccezione è costituita per le cellule non trasdotte con il *target* RMA-S-CD1d+α-GalCer, dove questo salto in positivo non avviene. Interessante notare come nel caso di cellule T $CD8^+$ OT-1 che utilizzano il *linker* N2.1 si trovi comunque un'attività citotossica nel caso RMA-S-CD1d. Questo ci porterebbe a discutere se N2.1 sia il *linker* migliore per il nostro CAR. Il *linker* N3 aumenta le sue potenzialità invece a rapporti più bassi con le cellule RMA-S-CD1d; le cellule T $CD8^+$ OT-1 non trasdotte e quelle che utilizzano N3.5 hanno un'azione tendenzialmente neutra verso questi ultimi *target*s. Già aggiungendo solo CD1d+α-GalCer alle nostre cellule *target* la capacità citotossica delle cellule trasdotte diventa maggiore verso le cellule bersaglio e i vari *linkers* diventano più equiparabili tra loro, con una diminuzione verso i rapporti più bassi (1:1); tuttavia si trova ancora una marcata diminuzione tra 30:1 e 10:1 per tutte e tre le cellule T $CD8^+$ OT-1 trasdotte, come prevedibile CD1d+α-GalCer non stimola le

cellule non trasdotte. Con RMA-S-CD1d + OVA si ritrova un aumento in positivo generale per tutte quattro le cellule, ciò nonostante l'aumento è la metà (alti e medi rapporti) rispetto a quello che utilizza soltanto l'interazione col CAR. Interessante notare come a bassi rapporti le cellule trasdotte riescano a mantenere una citotossicità maggiore (3:1 e 1:1), quasi come se la trasduzione di per sé riesca a trattenere le cellule ad un livello di citotossicità più alto; le cellule non trasdotte subiscono invece un tracollo e col rapporto 1:1 la loro capacità citotossica è nulla. In questo caso il *linker* più stabile nella tenuta della citotossicità sembra essere N3.5. Nel caso in cui si utilizza invece RMA-S-CD1d+α-GalCer + OVA come *target* sembra che si giunga a un compromesso tra il caso con RMA-S-CD1d+α-GalCer e RMA-S-CD1d + OVA.

In conclusione non si può che ribadire l'effetto benefico della trasduzione nella capacità citotossica delle cellule T $CD8^+$ OT-1 e la buona sinergia che potrebbe nascere da una combinazione delle attivazioni che utilizza entrambi i recettori (CAR e TCR »classico«).

DISCUSSIONE

In linea di massima i primi risultati sperimentali sono positivi e promettenti; infatti in generale sembra che la trasduzione aumenti la capacità citotossica delle cellule T $CD8^+$ OT-1. Uno dei primi aspetti positivi da rilevare è la funzionalità del recettore CAR: l'allegato 1 ci conferma che la trasduzione è avvenuta con successo con un cospicuo numero di cellule e che la maggior parte di queste cellule sono capaci di utilizzare il recettore CAR per la propria attivazione. I *killing assays* confermano in modo diretto il maggior potere distruttivo delle cellule trasdotte rispetto a quelle non trasdotte. Da questi risultati possiamo osservare anche come in generale la »doppia attivazione« sia quella che sortisce gli effetti più positivi sulle cellule T $CD8^+$ OT-1. Interessante notare come l'attivazione soltanto via CAR aumenti la capacità citotossica delle cellule automaticamente; invece l'attivazione via OVA non sempre sortisce un effetto in positivo nelle cellule trasdotte, quasi come se l'interazione con CAR diventasse necessaria per poter ottenere un'attività efficace delle cellule T $CD8^+$ OT-1 e non negativa.

Anche il livello di produzione delle citochine generalmente aumenta in seguito alla trasduzione confermando nuovamente l'ipotesi che le cellule dopo la trasfezione diventino più reattive nei confronti delle proprie cellule bersaglio.

Il motivo di alcuni andamenti anomali nei *killing assays* al cambiamento di rapporto tra cellule bersaglio e cellule T citotossiche richiede uno studio ulteriore per poter essere chiarito.

Un'altra questione che richiede uno studio più approfondito è la scelta del *linker* più efficiente per il recettore CAR. I risultati divergono per quanto riguarda questo punto: in alcuni sembra che il *linker* N2.1 sia il migliore, in altri N3 e N3.5 invece supera i valori di N2.1.

L'alto tasso di trasduzione ci permette anche di avere delle buone prospettive future per lo sviluppo di terapie che utilizzano queste cellule dato che le risorse necessarie possono essere minime e i costi inferiori rispetto al caso in cui la trasduzione fosse poco efficiente.

Sarebbe interessante sviluppare uno studio che utilizza sia le cellule T citotossiche specifiche verso gli antigeni tumorali (per esempio: Melan-A, NY-ESO-1, ecc.) sia le cellule *i*NKT per delle applicazioni terapeutiche contro i melanomi. Le cellule *i*NKT vengono ultimamente studiate intensamente e forse in futuro si troverà un modo per risolvere i problemi di replicazione *in vitro* che attualmente diminuiscono marcatamente il potenziale medico-terapeutico di queste cellule.

Il vantaggio dello sviluppo di tecniche terapeutiche che utilizzano delle cellule trasdotte è che si potrebbe anche creare un'immunità protettiva nei confronti di un determinato patogeno dato che dopo la prima immunizzazione, sotto determinate condizioni, si potrebbero sviluppare cellule T citotossiche della memoria specifiche.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Osservando e confrontando i diversi dati sembra che l'aggiunta del recettore CAR al repertorio di recettori della cellula T $CD8^+$ citotossica, abbia un effetto positivo nella loro capacità distruttiva e che questa tecnica possa avere dei buoni sviluppi futuri.

Sono necessari comunque degli studi ulteriori per comprendere a fondo i meccanismi che soggiacciono a questa modifica della citotossicità delle cellule T $CD8^+$ dovuta alla trasduzione; infatti in questi saggi si è trovato che l'aggiunta di CAR porta degli effetti positivi alla capacità citotossica della cellula ma anche allo stesso tempo sono stati sollevati dei quesiti "spinosi" (*linker* migliore, andamento di alcune linee di tendenza al cambiamento di rapporto tra *targets* e cellule T $CD8^+$ OT-1, relazione tra le due interazioni, ecc.) che creano altri problemi che necessitano uno studio più approfondito e specifico per essere risolti e chiariti.

Una combinazione che terapeuticamente potrebbe essere interessante è la combinazione di cellule T $CD8^+$ trasdotte con *i*NKT *cells*, dove forse sarebbe possibile aumentare ancora maggiormente il potenziale medico-terapeutico delle cellule T $CD8^+$ trasdotte verso i melanomi. Oltre a ciò la combinazione di questi due tipi di linfociti »alleggerirebbe« i problemi di costo e renderebbe meno gravosi i problemi di coltivazione delle *i*NKT *cells*. Si potrebbe anche compiere una trasduzione (aggiunta di un particolare CAR verso HER2, presente sui tumori) nelle *i*NKT *cells* per cercare di aumentare ancora di più le potenzialità medico-terapeutiche di questa combinazione di linfociti. Tuttavia le *i*NKT *cells* presentano ancora molti problemi dal punto di vista propriamente tecnico-laboratorista (difficile coltivazione e difficili da tenere in vita per lungo tempo), sono una popolazione minoritaria di cellule T (difficile individuazione iniziale) e sono molto sensibili alla trasduzione. Il grande vantaggio delle *i*NKT *cells*, oltre alla loro capacità citotossica, è che sono in grado di interagire con molti protagonisti dell'immunità innata e, indirettamente, quindi con quelli dell'acquisita (NK *cells*, DC → TC, …). Queste conferisce loro un forte potere attivante. Queste cellule presentano una specificità molto limitata e quest'ultimo fattore potrebbe essere un problema dato che si potrebbe rischiare anche una risposta immunitaria spropositata, al peggio un'autoimmunità; invece le cellule T $CD8^+$ tendono ad essere più "sicure" dato che presentano una specificità intrinseca naturale (TCR) e quindi il rischio di autoimmunità è drasticamente ridotto.

Un'altra questione problematica per gli esperimenti *in vivo* sono i macrofagi M2, i quali possono fungere da APC, ma che sono immunodepressivi e attivano le T_{reg}, quindi questi potrebbero annullare gli effetti citotossici delle cellule T $CD8^+$ OT-1 trasdotte inducendo anergia o apoptosi e diminuire la capacità di un'attivazione ulteriore a causa dell'attività regolatrice delle T_{reg}.

GLOSSARIO

APC: *Antigen Presenting Cell*

CAR: *Chimeric Antigen Receptor*

CD: *Cluster of Differentiation*

DC: *Dendritic Cell*

IFN: *Interferon*

IL: *Interleukin*

LT: *LymphoToxin*

MHC*: Major Histocompatibility Complex*

OVA: *Ovalbumin*[4]

[4] Il peptide riconosciuto dalle cellule T $CD8^+$ OT-1 è un segmento dell'antigene OVA chiamato SINFEKEL.

TC: *T Cell*

TCR: *T Cell Receptor*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

α-GalCer: *α-galactosylceramide*

RINGRAZIAMENTI

Ai docenti responsabili, Luigi Croci e Federico Imbesi, per la loro collaborazione e disposizione nella comprensione delle basi teoriche che soggiacciono a questo articolo; con una particolare menzione per Luigi Croci, il quale mi ha offerto un aiuto cruciale, specialmente nelle fasi iniziale del lavoro.

Alla SCNAT che ha permesso il contatto con il gruppo di ricerca a Losanna.

Al *Ludwig Cancer Research Center* che mi ha permesso di seguire un proprio gruppo di ricerca a Losanna, capitanato dal Prof. Pedro Romero.

Alla Dr. Alena Donda e al Prof. Pedro Romero che mi hanno concesso di visitare i propri laboratori e di seguire i propri progetti attuali e mi hanno permesso di conoscere il mondo della ricerca.

A tutto il gruppo di ricerca per la loro disponibilità nella presentazione dei propri progetti.

A Nina Dumauthioz, Gwennaëlle Monnot e Benjamin Tschumi che mi hanno seguito più direttamente nei laboratori a Losanna.

Alla Dr. Alena Donda per la precisa revisione dell'Abstract.

A Camilla Jandus per l'attenta e meticolosa correzione dell'articolo.

Una speciale menzione va a Nina Dumauthioz, la quale mi ha permesso di utilizzare il proprio progetto di Master per sviluppare il mio lavoro di maturità e mi ha seguito durante il suo sviluppo fornendo sempre dei consigli utili e delle spiegazioni chiare e precise, pur trovandosi in un momento di particolare carico lavorativo.

A Valeria Mombelli per l'aiuto offertomi con la citometria a flusso.

Ai miei genitori per avermi permesso e sostenuto economicamente il soggiorno a Losanna.

Bibliografia e Sitografia

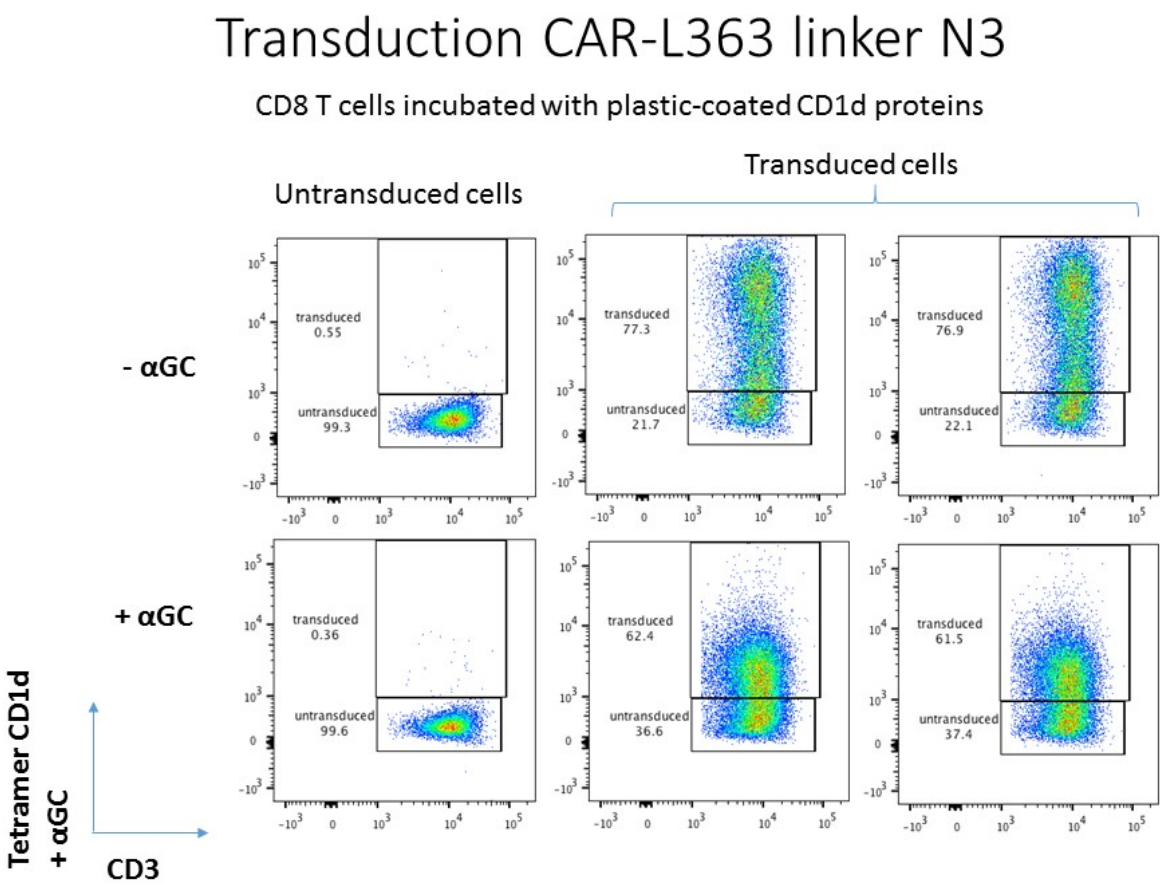
Murphy, Kenneth. Travers, Paul. Walport, Mark. *Janeway's Immunobiologia.* 7ª edizione. Padova: Piccin, 2010.

Murphy, Kenneth. Travers, Paul. Walport, Mark. *Janeway's Immunobioology.* 8th edition. New York: Garland Science Taylor & Francis Group, 2012.

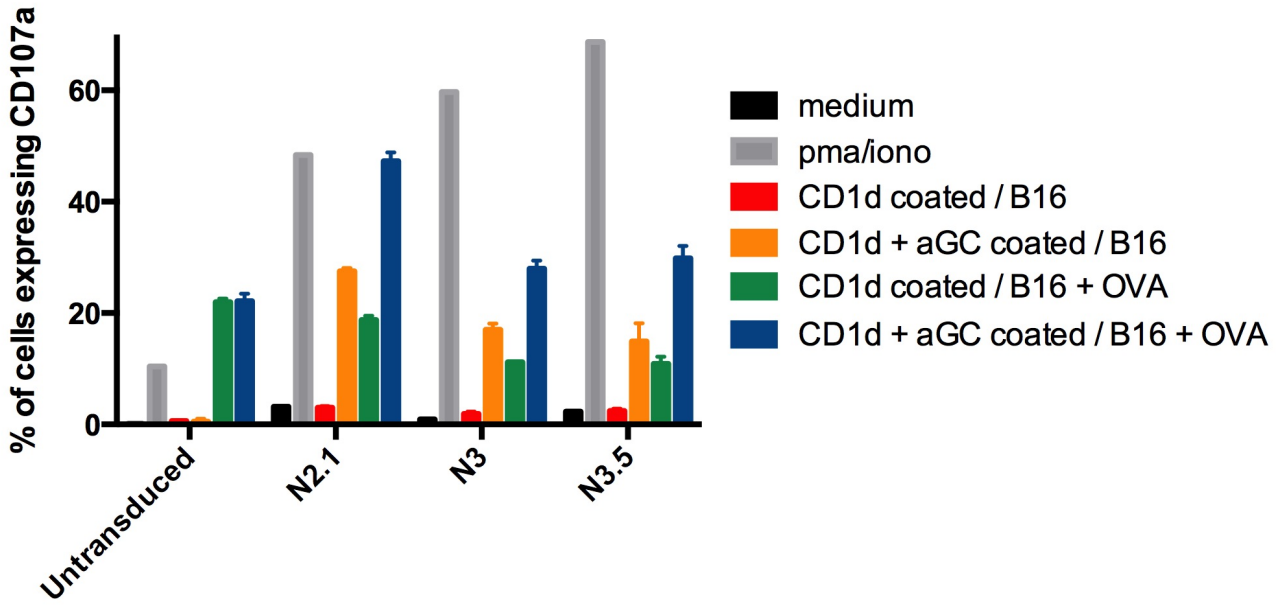
Ramos, Carlos A. and Dotti, Gianpietro. "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Engineered Lymphocytes for Cancer Therapy." *Taylor & Francis Group*, 2011: 855-873.

APCs' signals to T cells, cell.com, http://www.cell.com/cms/attachment/2017518473/2037789590/ gr1b2.jpg, file JPG (22.DIC.2015 20.11)

ALLEGATI

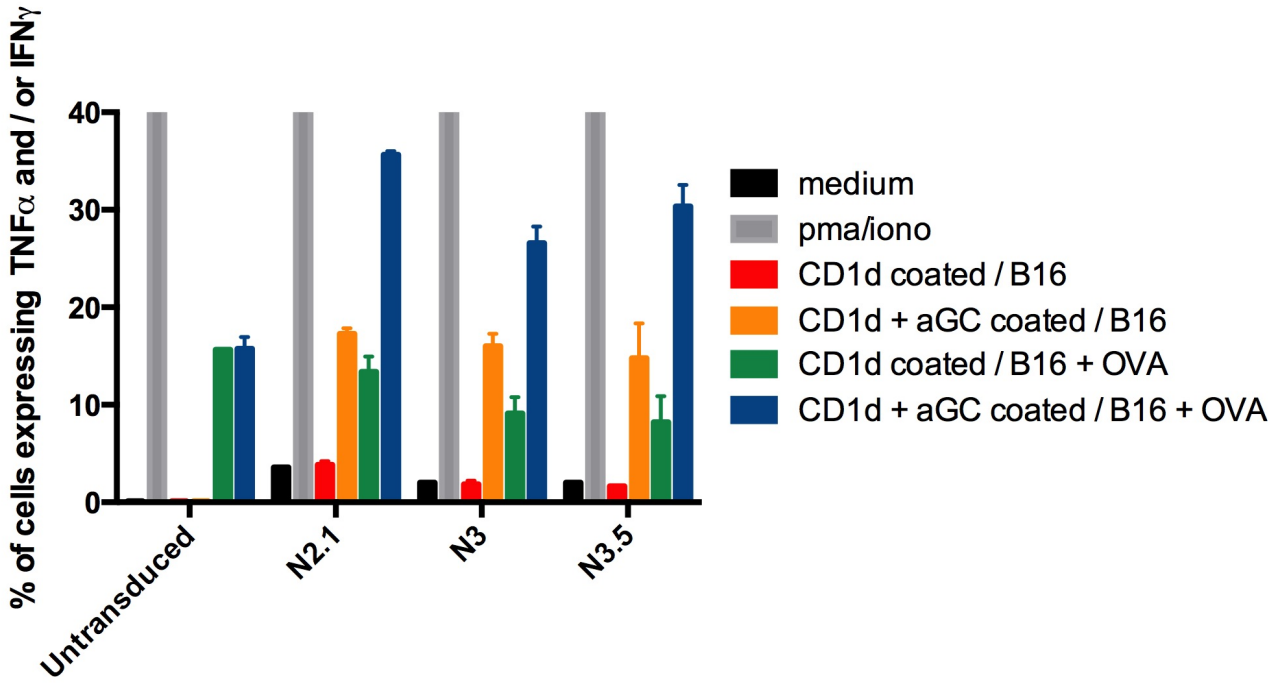


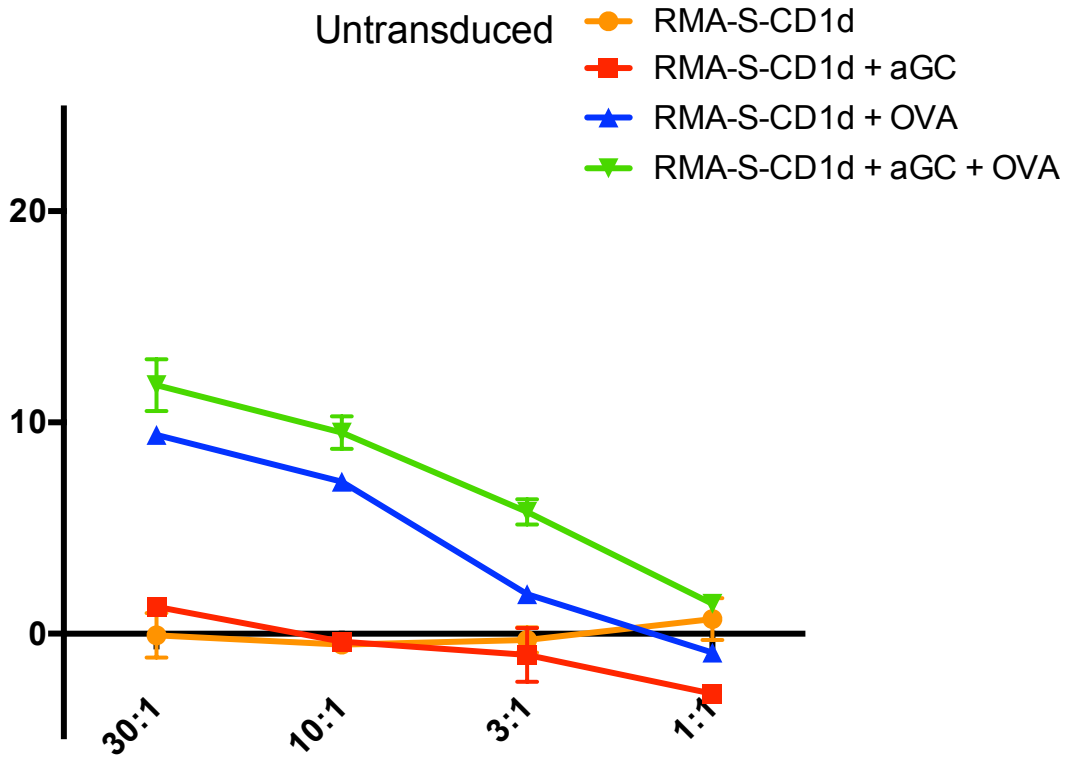
Allegato 1: Efficienza di trasduzione del CAR-L363 col linker N3

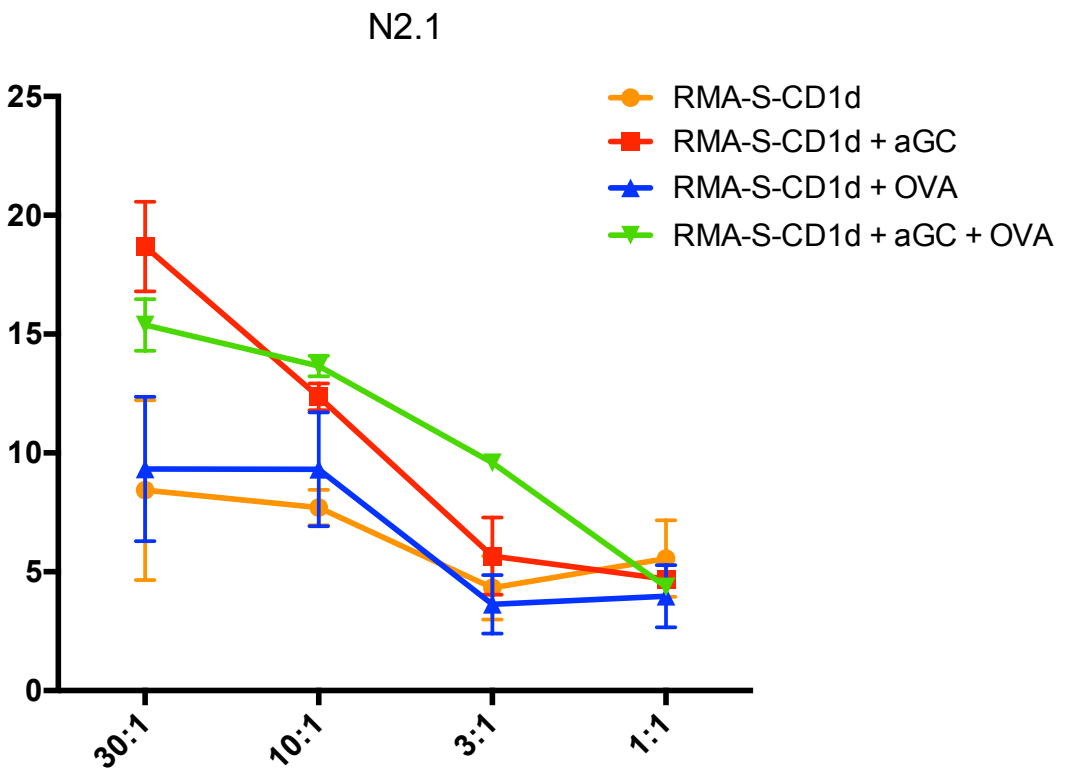


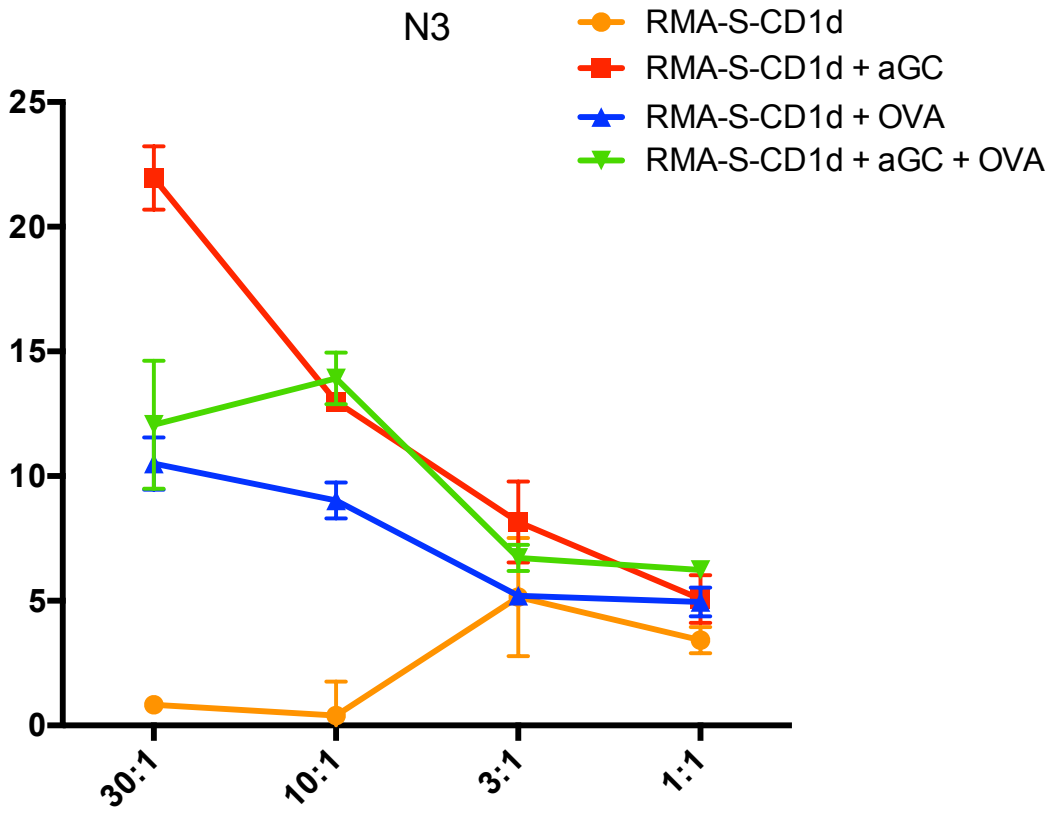
Allegato 2: Espressione di CD107a (asse x: "configurazioni" delle cellule T CD8$^+$ OT-1; asse y: percentuale di cellule che esprimono CD107a)

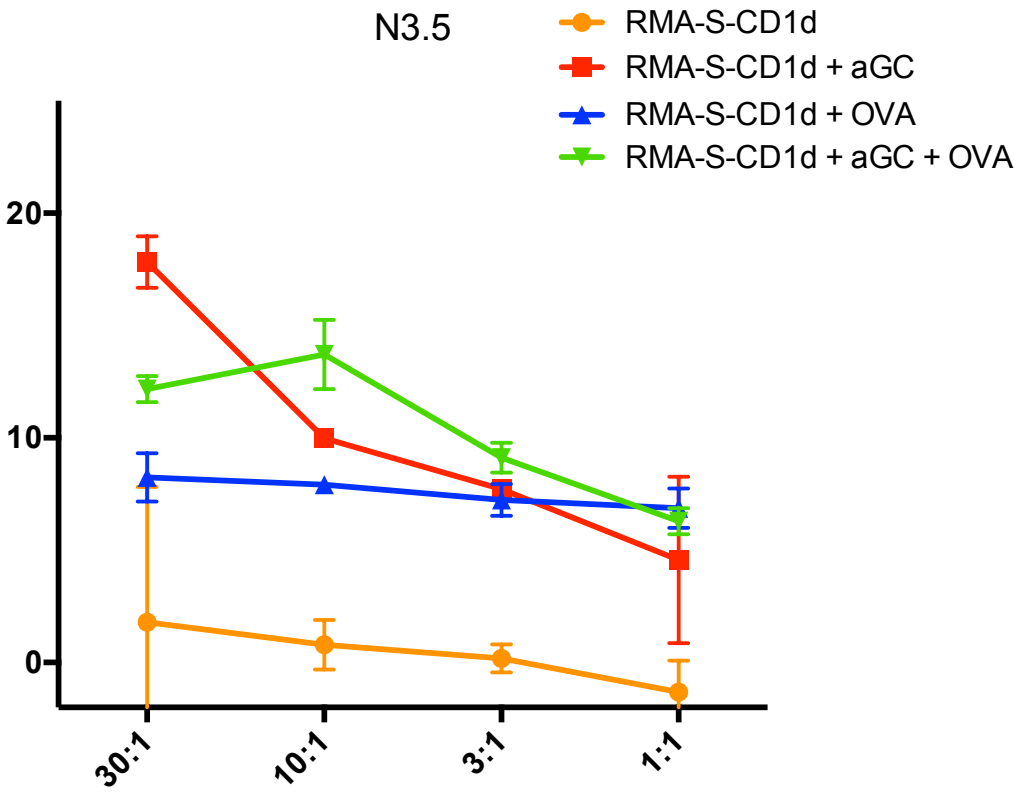
Allegato 3: Produzione di TNF-α e/o IFN-γ (asse x: "configurazioni" delle cellule T CD8$^+$ OT-1; asse y: percentuale di cellule che esprimono TNF-α e/o IFN-γ)



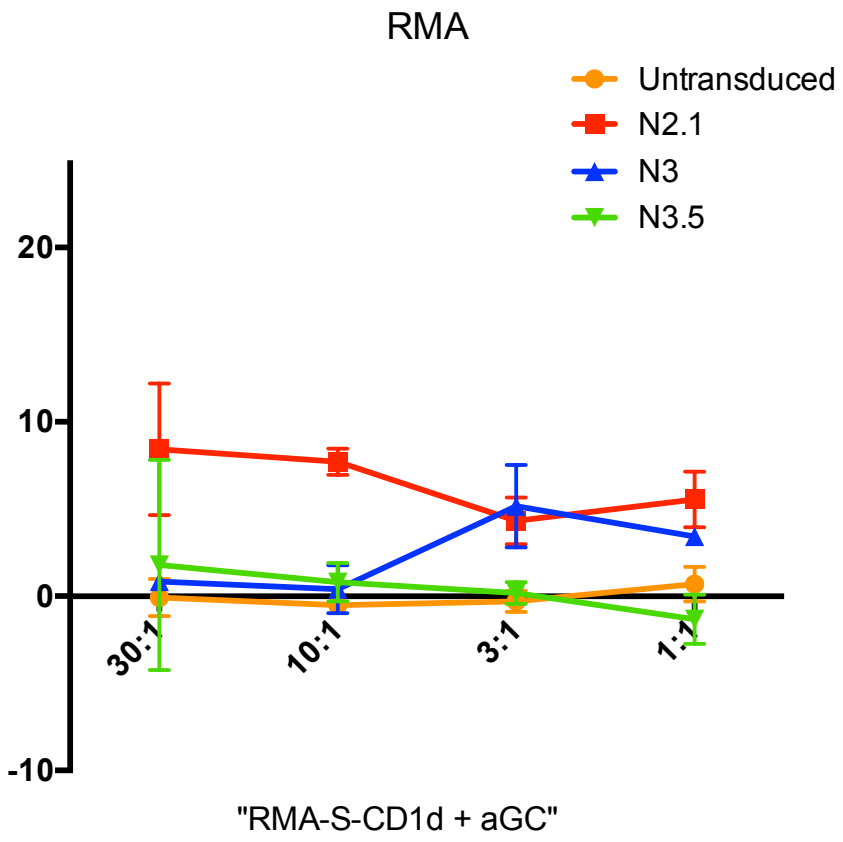

Untransduced
RMA-S-CD1d
RMA-S-CD1d + aGC
RMA-S-CD1d + OVA
RMA-S-CD1d + aGC + OVA
20
10
0
30:1
10:1
3:1
1:1

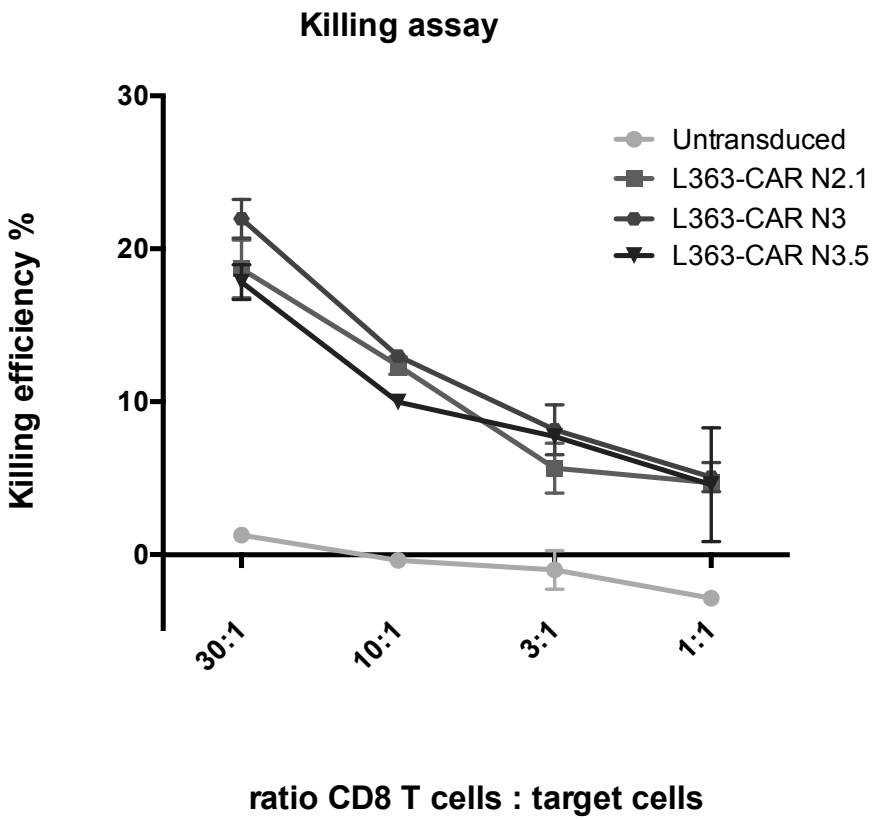

N2.1
RMA-S-CD1d
RMA-S-CD1d + aGC
RMA-S-CD1d + OVA
RMA-S-CD1d + aGC + OVA
25
20
15
10
5
0
30:1
10:1
3:1
1:1

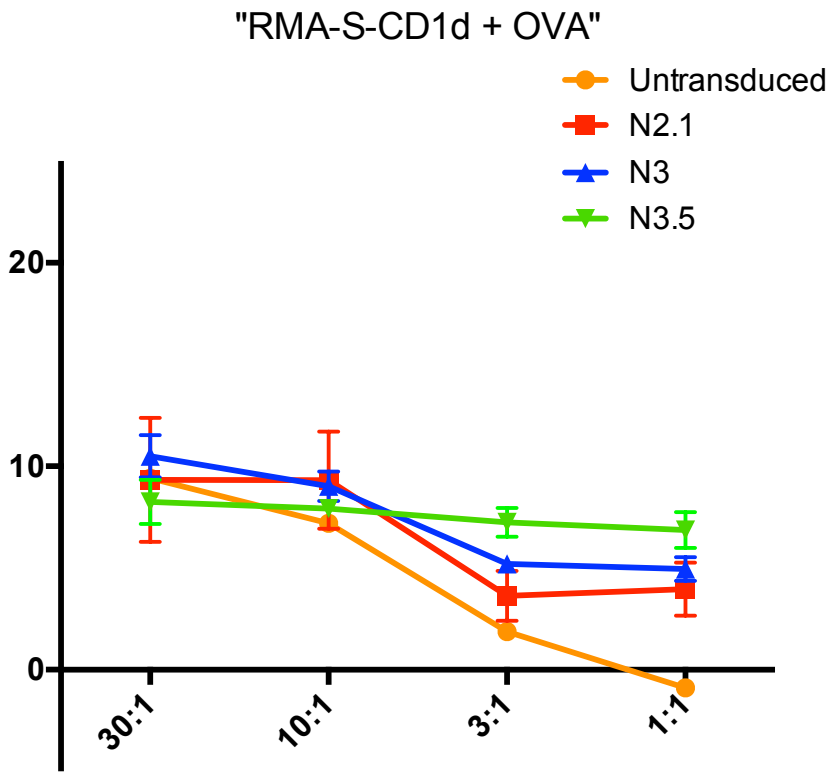


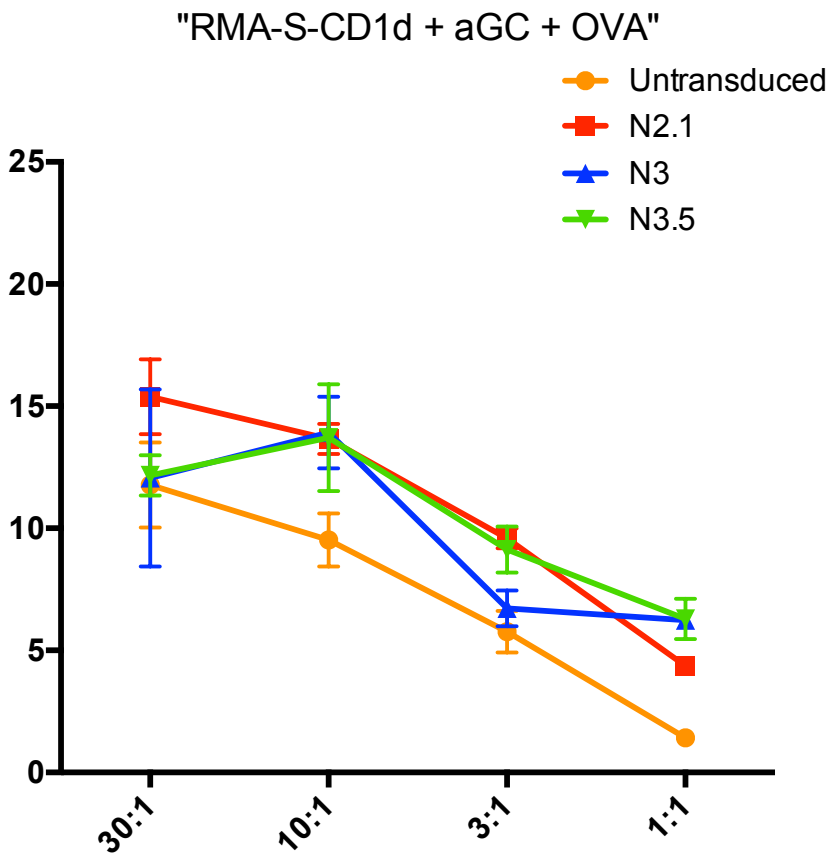


Allegato 4: ***Killing assay*** **risultati I (asse x: rapporto tra le cellule T CD8$^+$ OT-1 e le cellule** ***target*****; asse y: percentuale di cellule** ***target*** **che vanno in apoptosi)**


RMA
Untransduced
N2.1
N3
N3.5
20
10
0
-10
30:1
10:1
3:1
1:1
"RMA-S-CD1d + aGC"


Killing assay
Killing efficiency %
30
20
10
0
Untransduced
L363-CAR N2.1
L363-CAR N3
L363-CAR N3.5
30:1
10:1
3:1
1:1
ratio CD8 T cells : target cells





Allegato 5: ***Killing assay*** **risultati II (asse x: rapporto tra le cellule T CD8$^+$ OT-1 e le cellule** ***target*****; asse y: percentuale di cellule** ***target*** **che vanno in apoptosi)**