



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO
E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE**

CICLO XX

**CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E MOLECOLARE DI
TUMORI STROMALI GASTROINTESTINALI (GIST) SINCRONI IN
POPOLAZIONE ADULTA NON SINDROMICA**

Coordinatore: Ch. mo Prof. GIUSEPPE BASSO
Supervisore: Ch. mo Dott. ANGELO PAOLO DEI TOS

Dottorando: GIOVANNA GALLINA

31 Gennaio 2008

INDICE

1	CAPITOLO PRIMO – PROPRIETA’ INIBITORIE SUI LINFOCITI T CITOTOSSICI DI UNA SOTTOPOPOLAZIONE DI MONOCITI INFIAMMATORI INDOTTA DAL TUMORE.....	6
1.1	INTRODUZIONE	9
1.1.1	CELLULE MIELOIDI SOPPRESSORIE E LORO FUNZIONE	9
1.1.2	CITOCHINE COINVOLTE NEL RECLUTAMENTO MSC	10
1.1.3	METABOLISMO DELL’AMINOACIDO L-ARGINIA NEL MECCANISMO SOPPRESSORIO MEDIATO DALLE MSC	11
1.2	MATERIALI E METODI	16
1.2.1	TOPI	16
1.2.2	TERRENI DI COLTURA.....	16
1.2.3	LINEE CELLULARI	17
1.2.4	ANALISI CITOFLUORIMETRICA	17
1.2.5	CITOCHINE E INIBITORI	18
1.2.6	LISI IPOTONICA DEI GLOBULI ROSSI.....	19
1.2.7	ISOLAMENTO DI CELLULE SOPPRESSORIE DA MILZE DI TOPI MEDIANTE SORTING IMMUNOMAGNETICO	19
1.2.8	ALLESTIMENTO DI COLTURE LEUCOCITARIE MISTE (MLC)	20
1.2.9	VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA CITOTOSSICA MEDIANTE SAGGIO DI RILASCIO DI ⁵¹ CR	20
1.2.10	ANALISI MORFOLOGICA DI CELLULE CD11B+/IL-4R α + E CD11B+/IL-4R α -	21
1.2.11	ESTRAZIONE DELL’RNA TOTALE	21
1.2.12	RETROTRASCRIZIONE.....	22
1.2.13	REAL-TIME PCR	22
1.2.14	WESTERN BLOT	23
1.3	RISULTATI.....	24
1.3.1	PROFILO DI ESPRESSIONE GENETICA IN SPLENOCITI CD11B+	24
1.3.2	PRODUZIONE CITOCHINE COINVOLTE NELLA SOPPRESSIONE LINFOCITARIA	26
1.3.3	RUOLO DELLE CITOCHINE RILASCIATE DAI LINFOCITI T NELLA SOPPRESSIONE MSC- DIPENDENTE	28
1.3.4	ESPRESSIONE CATENA α DEL RECETTORE IL-4 SULLE MSC E RUOLO NEL MECCANISMO SOPPRESSORIO	29
1.3.5	GLI SPLENOCITI CD11B ⁺ IL-4R α ⁺ SONO IN GRADO DI PRODURRE IFN- Γ E IL-13	31
1.3.6	AZIONE DI IL-13 E IFN- Γ SU IL-4R α	32
1.3.7	AZIONE DI IL-13 E IFN- γ SUL METABOLISMO DELL’ARGININA NELLE MSC	33
1.3.8	LE MSC SONO MONOCITI INFIAMMATORI	35
1.4	DISCUSSIONE.....	36
1.5	BIBLIOGRAFIA.....	39

2	CAPITOLO SECONDO - CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E MOLECOLARE DI TUMORI STROMALI GASTROINTESTINALI (GIST) SINCRONI IN POPOLAZIONE ADULTA NON SINDROMICA	42
2.1	INTRODUZIONE	45
2.1.1	TUMORI STROMALI GASTROINTESTINALI.....	45
2.1.2	CARATTERISTICHE CLINICHE E PATOLOGICHE	45
2.1.3	PATOGENESI GIST: MUTAZIONI DI KIT E PDGFRA.....	50
2.1.4	GIST SINCRONI E MULTIPLI	54
2.1.5	STRATEGIE TERAPEUTICHE	55
2.2	MATERIALI E METODI	58
2.2.1	POPOLAZIONE.....	58
2.2.2	DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA E IMMUNOISTOCHEMICA	58
2.2.3	ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DNA	59
2.2.4	AMPLIFICAZIONE DNA	60
2.2.5	SEQUENZIAMENTO	61
2.2.6	ANALISI DEI MICROSATELLITI.....	61
2.2.7	SOFTWARE APPLICATI.....	62
2.3	RISULTATI	63
2.3.1	RISULTATI CLINICOPATOLOGICI.....	63
2.3.2	ANALISI MUTAZIONALE C-KIT E PDGFRA	65
2.3.3	ANALISI DEI MICROSATELLITI.....	66
2.4	DISCUSSIONE.....	68
2.5	BIBLIOGRAFIA.....	72

PREFAZIONE

Viene qui presentato il lavoro di tesi relativo alla Scuola di Dottorato in Medicina dello Sviluppo e della Programmazione – Ciclo XX.

Nei primi due anni l'attività di ricerca è stata svolta presso il Laboratorio di Immunologia dei Tumori nel Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche dell'Università degli Studi di Padova con la Direzione Scientifica del Dott. Bronte ed è stata finalizzata all'analisi del profilo di espressione genica in cellule mieloidi per l'identificazione di marcatori molecolari e meccanismi metabolici coinvolti nella soppressione della risposta immunitaria.

Il terzo anno di dottorato è stato completato presso il Laboratorio di Patologia Molecolare del Reparto di Anatomia Patologica dell'Ospedale U.L.S.S. 9 di Treviso con la Direzione Scientifica del Dott. Dei Tos, Primario del Reparto, ed è stato finalizzato alla caratterizzazione fenotipica e genotipica dei GIST primitivi e metastatici.

Nell'ambito del progetto di ricerca presso l'Università di Padova, presentato nel Capitolo Primo, l'attenzione è stata focalizzata su una sottopopolazione di cellule (cellule mieloidi soppressorie - MSC) responsabile delle disfunzioni delle cellule T osservata in diversi modelli tumorali.

Il ruolo del sistema immunitario nell'ambito delle patologie neoplastiche è tuttora oggetto di discussione e, pur essendo note le potenzialità antitumorali sia della risposta innata che di quella acquisita, in letteratura sono stati ampiamente descritti fenomeni di evasione di vigilanza immunitaria attuata da vari tipi tumorali. La soppressione delle risposte mediate dai linfociti T tumore-specifiche può limitare l'immunosorveglianza e l'efficacia dell'immunoterapia antitumorale. Queste cellule, positive per i marcatori CD11b, vengono reclutate dal tumore mediante il rilascio di fattori solubili (quali le citochine GM-CSF, G-CSF, e IL-3) e sono coinvolte nelle disfunzioni del sistema immune associate alla crescita del tumore stesso. La vera natura di queste cellule soppressorie ed i meccanismi biochimici finché ne regolano l'attività rimangono elusivi. Considerata l'eterogeneità della popolazione mieloide soppressoria, ed al fine di scomporre i meccanismi molecolari alla base dell'attività soppressoria stessa, è stato condotto uno studio di genomica funzionale utilizzando la tecnologia Affymetrix®. Il lavoro qui presentato si è concluso con la pubblicazione dei dati (Appendice).

Nell'ambito del progetto di ricerca presso l'Ospedale di Treviso, presentato nel Capitolo Secondo, l'impegno è stato concentrato sulla caratterizzazione morfologica e molecolare di tumori stromali gastrointestinali (GIST) sincroni in popolazione adulta non sindromica. I tumori stromali gastrointestinali (GIST) costituiscono le più frequenti neoplasie di natura mesenchimale del tratto gastroenterico. L'inquadramento anatomoclinico di tali neoplasie è stato per diversi anni confuso e limitato. Tuttavia nell'arco di breve tempo si è riusciti non solo ad elucidare il principale meccanismo oncogenetico identificando il ruolo di mutazioni dei geni KIT e PDGFR α ma altresì a sviluppare una terapia molecolare mirata (farmaco Imatinib) verso i domini catalitici delle proteine codificate dai geni caratterizzanti la neoplasia. Il dipartimento in cui svolgo l'attività di dottorato è un centro di riferimento per lo studio dei tumori stromali gastrointestinali. Tra le finalità del progetto rientra la caratterizzazione molecolare dei geni KIT e PDGFR α in pazienti riconducibili a diagnosi di GIST e di particolare interesse risulta l'analisi dei GIST che presentavano all'esordio lesioni multiple. L'insorgenza di tumori gastrointestinali multipli è ben nota nell'ambito dei GIST familiari. Tuttavia, nell'ambito dei GIST sporadici, è descritta esclusivamente nei GIST pediatrici e nei pazienti affetti da neurofibromatosi di tipo 1 e da sindrome di Carney. La diagnosi differenziale tra GIST metastatici all'esordio e GIST multipli ha delle importanti ripercussioni sul management clinico del paziente. In questa ottica, l'analisi molecolare del gene del KIT, come marker di clonalità, potrebbe rappresentare un importante strumento per discriminare tra queste due possibilità, permettendo di conseguenza una corretta strategia terapeutica. I dati ottenuti sono in fase di pubblicazione, tuttavia un Abstract è già stato pubblicato sulla rivista Journal of Clinical Oncology (Appendice).

**1 CAPITOLO PRIMO – PROPRIETA' INIBITORIE SUI LINFOCITI T
CITOTOSSICI DI UNA SOTTOPOPOLAZIONE DI MONOCITI
INFIAMMATORI INDOTTA DAL TUMORE**

ABSTRACT

Active suppression of tumor-specific T lymphocytes can limit the efficacy of immune surveillance and immunotherapy. While tumor-recruited CD11b⁺ myeloid cells are known mediators of tumor-associated immune dysfunction, the true nature of these suppressive cells and the fine biochemical pathways governing their immunosuppressive activity remain elusive. Here we describe a population of circulating CD11b⁺IL-4 receptor α^+ (CD11b⁺IL-4R α^+), inflammatory-type monocytes that is elicited by growing tumors and activated by IFN- γ released from T lymphocytes. CD11b⁺IL-4R α^+ cells produced IL-13 and IFN- γ and integrated the downstream signals of these cytokines to trigger the molecular pathways suppressing antigen-activated CD8⁺ T lymphocytes. These suppressor cells challenge the current idea that tumor-conditioned immunosuppressive monocytes/macrophages are alternatively activated.

RIASSUNTO

La soppressione delle risposte mediate dai linfociti T tumore-specifiche può limitare l'immunosorveglianza e l'efficacia dell'immunoterapia antitumorale.

Le cellule mieloidi CD11b⁺ reclutate dal tumore mediante il rilascio di fattori solubili sono coinvolte nelle disfunzioni del sistema immune associate alla crescita del tumore stesso, ma la vera natura di queste cellule soppressorie e i meccanismi biochimici fini che ne regolano l'attività rimangono elusivi. In questo lavoro, è stata descritta una popolazione cellulare CD11b⁺/IL-4R α ⁺, di tipo monocitica infiammatoria, reclutata dal tumore e attivata dall'IFN- γ rilasciato dai linfociti T.

Le cellule CD11b⁺/IL-4R α ⁺ sono in grado di bloccare l'attivazione dei linfociti T attraverso l'utilizzo delle citochine IL-13 e IFN- γ da loro stesse prodotte.

Le cellule mieloidi soppressorie, quindi, non si adattano perfettamente al modello di stretta separazione tra attivazione macrofagica classica e alternativa; sfidando quindi l'idea corrente che i monociti/macrofagi soppressori indotti dal tumore siano alternativamente attivati.

1.1 INTRODUZIONE

1.1.1 CELLULE MIELOIDI SOPPRESSORIE E LORO FUNZIONE

Esistono ormai evidenze che nell'uomo, così come nei più diffusi modelli sperimentali murini, siano presenti fenomeni di controllo della risposta immunitaria sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Uno stato di immunosoppressione tumore-dipendente è stata associato a diversi tipi di cancro come il linfoma, il cancro della pelle, il cancro della cervice uterina, il carcinoma della testa e del collo, mentre un'aumentata risposta immunitaria è stata associata a un fenomeno di regressione spontanea osservata in altri tipi di tumore quali i melanomi (1). Se da un lato il sistema immunitario cerca di distruggere o per lo meno di controllare lo sviluppo neoplastico, dall'altro il tumore cerca di sfuggire a tale controllo, utilizzando meccanismi sviluppati durante l'evoluzione per prevenire le malattie autoimmunitarie. E' ipotizzabile che un tumore capace di generare una situazione di immunosoppressione abbia un vantaggio evolutivo, poiché si svincola dall'immunosorveglianza.

Lo sviluppo del tumore è spesso accompagnato dall'alterazione ematopoietica che porta ad un progressivo accumulo di cellule mieloidi nel midollo osseo, sangue, milza e tumore (2,3,4,5). Queste cellule, positive per i marcatori CD11b e GR-1 (Ly6C/G), inducono i linfociti T a non rispondere alla stimolazione antigenica sia *in vitro* e *in vivo*.

Un'evidenza iniziale della natura mioelide delle cellule soppressorie è stata ottenuta in topi vaccinati con virus vaccini ricombinanti in cui era stato introdotto un antigene modello. Lo scopo di questi studi era quello di ottenere una risposta specifica, *in vivo*, mediata da linfociti T CD8⁺ verso l'antigene utilizzato (2). Contrariamente a quanto atteso, gli animali immunizzati presentarono una temporanea incapacità di montare una risposta immune specifica verso l'antigene; inoltre, nella loro milza si osservò un accumulo di cellule esprimenti marcatori sia dei granulociti (Gr-1/Ly-6G) che dei monociti (CD11b/Mac-1). La comparsa di questa popolazione fu associata alla depressione della risposta effettrice antigene-specifica; infatti, gli splenociti dei topi immunizzati, stimolati con l'antigene, non erano in grado di proliferare e andavano incontro a morte per apoptosi, mentre la deplezione con anticorpi monoclonali (mAb) della popolazione CD11b/Gr-1, permetteva il ripristino della funzionalità e la vitalità dei linfociti T (2).

Le cellule CD11b⁺/Gr1⁺ isolate da topi immunosoppressi comprendono, in realtà, una popolazione eterogenea che comprende granulociti e monociti maturi insieme ad una serie di cellule immature della linea mielo-monocitaria, identificate dai marker dei precursori mieloidi CD31, ER-MP54, Ly-6C e ER-MP58 (2,3,6,7,8). Proprio a causa della loro eterogeneità e della difficoltà nel definire in maniera

specifica quale sia il sottotipo cellulare direttamente coinvolto nelle disfunzioni linfocitarie, queste cellule sono state denominate MSC, al posto dell'acronimo iMC (cellule mieloidi immature) precedentemente usato (9). Inoltre, si è visto che la frazione immatura è in grado di generare distinte popolazioni cellulari capaci di attivare o sopprimere le funzioni delle cellule T CD8⁺.

1.1.2 CITOCHINE COINVOLTE NEL RECLUTAMENTO MSC

Topi con tumori trapiantabili o indotti da carcinogeni chimici subiscono un progressivo accumulo, proporzionale all'estensione della massa tumorale, di MSC nella milza e nel sangue, dove sopprimono la risposta immune verso vari antigeni, compresi quelli associati al tumore. I tumori sono in grado di secernere diverse citochine che agiscono su precursori midollari (9), quali GM-CSF, IL-3, G-CSF, e che, verosimilmente, sono responsabili della mobilizzazione delle MSC e altri fattori solubili quali IL-6 e VEGF che ne modulano il differenziamento a cellule dendritiche attraverso l'attivazione di STAT3 (10,11).

Numerose evidenze, infatti, indicano che il reclutamento e la maturazione in senso soppressorio delle MSC sono promossi da fattori derivanti dal tumore: la resezione del tumore primario, in modelli murini e in pazienti umani, porta ad una diminuzione nel numero di queste cellule, e la coltura di cellule del midollo osseo con surnatanti derivanti da linee tumorali dà origine ad elementi soppressori (12,13).

La citochina che sembra principalmente coinvolta nel reclutamento delle MSC è il GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Questa citochina è stata utilizzata per diversi anni con l'intento di aumentare l'efficacia dei vaccini antitumorali in diversi protocolli preclinici (14,15,16). Tumori sperimentali γ -irradiati e ingegnerizzati a rilasciare GM-CSF, erano in grado di reclutare APC professionali che, presentando antigeni rilasciati da cellule tumorali apoptotiche ai linfociti infiltranti il tumore, inducevano una risposta immunitaria specifica. Il melanoma murino B16, per esempio, è poco immunogenico; tuttavia, se ingegnerizzato a produrre GM-CSF può essere utilizzato come vaccino, conferendo protezione verso un successivo inoculo di cellule del tumore parentale (17). Ciò nondimeno, la sola ingegnerizzazione del tumore non è in grado di modificare la progressione o l'esito letale della neoplasia (3). Infatti, se le cellule di melanoma B16 non vengono γ -irradiate, il tumore secernente GM-CSF cresce regolarmente nell'animale ed è in grado di reclutare ed espandere la popolazione di MSC, causando immunosoppressione generalizzata che non si osserva con il tumore parentale.

La natura dicotomica del GM-CSF è stata studiata anche nell'uomo, dove si è osservata una relazione dose-effetto. Questa citochina ad alte dosi induce i macrofagi ed altre cellule mieloidi a rilasciare

fattori immunosoppressivi, mentre a basse dosi sembra agire da adiuvante per la presentazione antigenica (18). Pazienti che hanno ricevuto il GM-CSF per aumentare il numero di cellule staminali nel sangue periferico prima del trapianto autologo, mostrano un aumento di monociti CD14⁺ in grado di sopprimere *in vitro* la reattività dei linfociti T e delle NK (18).

Probabilmente il reclutamento e l'azione delle MSC è in relazione non solo al tipo di citochine presenti a livello sistemico e locale ma anche al loro dosaggio e alla loro durata di espressione.

1.1.3 METABOLISMO DELL'AMINOACIDO L-ARGINIA NEL MECCANISMO SOPPRESSORIO MEDIATO DALLE MSC

Nonostante la vera natura di queste cellule soppressorie e i meccanismi biochimici finché ne regolano l'attività rimangono elusivi, recenti scoperte attribuiscono al metabolismo dell'L-arginina la responsabilità dell'attività soppressoria (19). Un ruolo fondamentale nella soppressione linfocitaria è giocato, infatti, dai principali enzimi del metabolismo della L-arginina, arginasi 1 (ARG1) e ossido nitrico sintetasi inducibile (NOS2) che competono per il substrato (Figura 1).

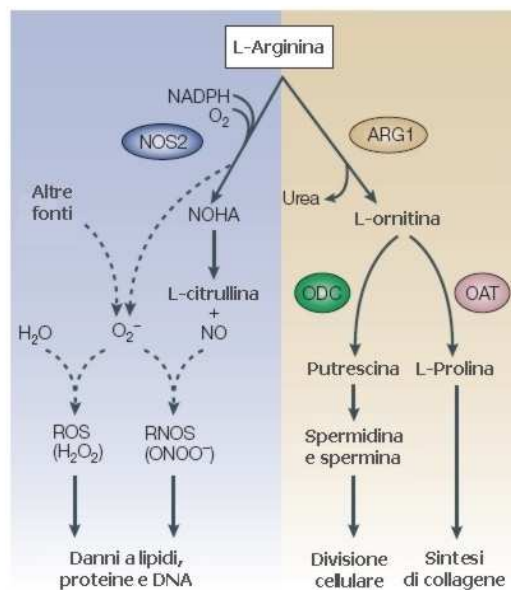


Figura 1

Rappresentazione schematica delle vie metaboliche dipendenti da arginasi 1 e ossido nitrico sintetasi 2.

La figura illustra le attività degli enzimi arginasi 1 (ARG1) e ossido nitrico sintetasi 2 (NOS2). Le linee continue indicano l'attività enzimatica principale, mentre le linee tratteggiate indicano vie metaboliche alternative. In particolare, quando le concentrazioni di L-arginina sono limitanti, gli elettroni vengono trasferiti dalle subunità di NOS2 al co-substrato ossigeno (O₂), che genera anione superossido (O₂⁻). L'O₂⁻ (proveniente da questa reazione o da altre fonti) può combinarsi con l'ossido nitrico (NO) per generare perossinitriti (ONOO⁻) o con l'acqua (H₂O) per produrre perossido di idrogeno (H₂O₂).

Figura tratta e modificata da: Bronte V, Zanovello P. (2005) "Regulation of immune responses by L-arginine metabolism." Nat Rev Immunol. 5(8):641-54.

L'L-arginina è un aminoacido "essenziale condizionato" nei mammiferi adulti, infatti in alcune condizioni, fisiologiche (gravidanza) o patologiche (trauma, sepsi), in cui la richiesta eccede la capacità di produzione, deve essere fornito con la dieta. Questo aminoacido è usato per la biosintesi di proteine quali la creatinina e agmatina.

L'enzima arginasi idrolizza L-arginina a L-ornitina e urea. Nei mammiferi esistono due isoforme dell'enzima, dette arginasi 1 (ARG1) e arginasi 2 (ARG2), codificate da due differenti geni.

L'arginasi 1 (nota anche come arginasi epatica) è un enzima citosolico, espresso soprattutto negli epatociti e coinvolto nel ciclo dell'urea. La sua espressione può anche essere indotta in cellule mieloidi murine da citochine di tipo Th2, quali IL-4 e IL-13, da TGF- β e GM-CSF; esistono però differenze di espressione specie-specifiche, in quanto nell'uomo ARG1 è costitutivamente espressa nei granulociti e non sembra essere indotta dagli stimoli che influenzano l'analogo murino. L'arginasi 2 (nota anche come arginasi di tipo renale) è invece un enzima mitocondriale, costitutivamente espresso in cellule renali, in neuroni, macrofagi ed enterociti. Il principale fattore di trascrizione per l'espressione di ARG1 è STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6), anche se esistono altre vie indipendenti da STAT6, tra cui un'ipotetica via dipendente da STAT1 (7), che potrebbe essere richiesto per l'induzione sia di ARG1 che di NOS2 (**Figura 2**).

L'aminoacido L-arginina è substrato anche di un'altra famiglia di enzimi, noti come ossido nitrico sintetasi (NOS). Questi enzimi sono dimeri che necessitano per la piena attività di calmodulina e cofattori quali (6R)-5,6,7,8-tetraidrobiopterina (BH4), Fe-protoporfirina IX (eme), flavina-adenin dinucleotide (FAD) e flavina mononucleotide (FMN). Esistono tre diverse isoforme di NOS, codificate da geni distinti, con circa il 50% di identità ma con differenti localizzazione, regolazione e proprietà catalitiche: NOS1 (detta anche nNOS), prevalentemente espressa in tessuto neuronale; NOS2 (detta anche iNOS), isoforma inducibile, presente in molte cellule del sistema immunitario, comprese diverse cellule mieloidi; NOS3 (detta anche eNOS), espressa in cellule endoteliali. Ogni isoforma è costituita da due domini: un dominio reduttasico C-terminale, che riceve elettroni provenienti dalla conversione di NADPH a NADP, e li trasferisce ad un dominio ossigenasico N-terminale, che grazie ai cofattori BH4 ed eme, catalizza la reazione tra ossigeno (O₂) e L-arginina, che genera L-citrullina e NO. L'espressione di NOS2 e la produzione di NO è stata descritta in macrofagi, neutrofili, eosinofili, cellule dendritiche e cellule NK murine. L'enzima viene indotto soprattutto dalla citochina Th1 IFN- γ , in particolare in combinazione con LPS, ma anche dalle citochine infiammatorie IL-1, TNF, IFN- α o IFN- β . Queste citochine regolano diversi fattori di trascrizione, quali NF-kB, IFN-regulatory factor 1 e STAT1.

Nelle cellule mieloidi murine, quindi, ARG e NOS sono regolati antiteticamente da citochine Th1 e Th2 e da vie biochimiche complesse, che comprendono sistemi a feedback negativo e competizione per lo stesso substrato. Tuttavia questi due enzimi, separatamente o in combinazione, a seconda dei segnali dettati da citochine o da molecole di membrana sono in grado di inibire la risposta dei linfociti T ad antigeni.

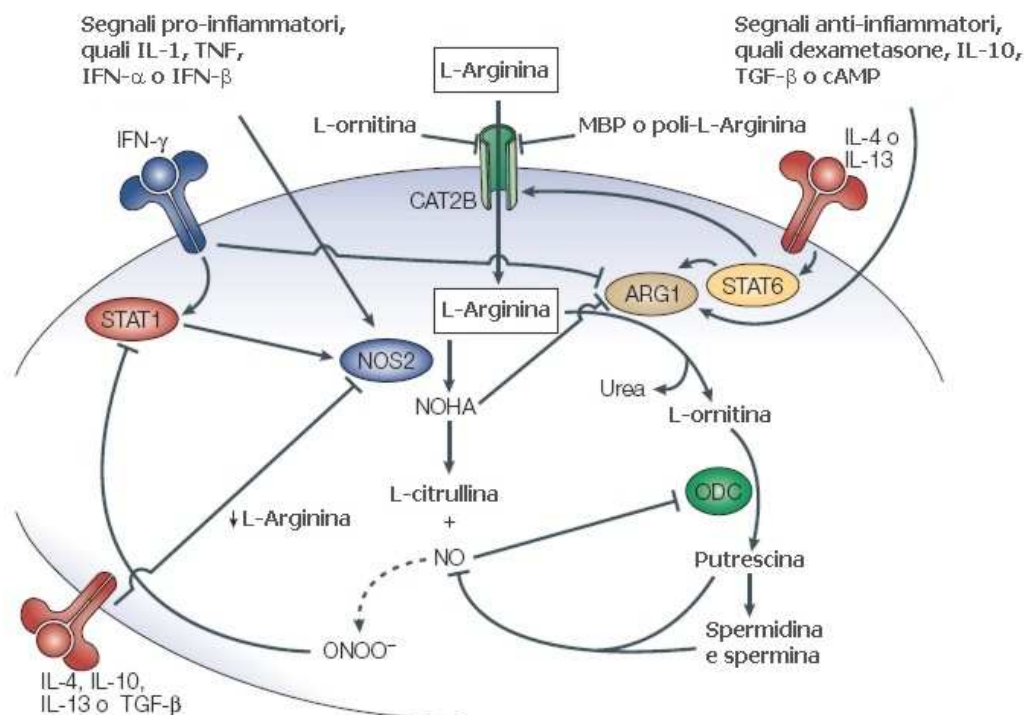


Figura 2

Rappresentazione schematica dei circuiti metabolici degli enzimi inducibili arginasi 1 e ossido nitrico sintetasi 2, e citochine coinvolte.

L'ossido nitrico sintetasi (NOS2) e di arginasi 1 (ARG1), sono indotte rispettivamente dalle citochine Th1 (IFN- γ) e le citochine Th2 (IL-4 e IL-13).

Segnali pro-infiammatori, quali IL-1, tumor necrosis factor (TNF), IFN- α e IFN- β , e segnali anti-infiammatori quali IL-10, TGF- β , cAMP e dexametasone, possono contribuire a regolare l'equilibrio finale tra l'attività di NOS2 e ARG1. Inoltre, ARG1 e NOS2 attivano direttamente diversi circuiti biochimici che si regolano negativamente a vicenda. Una bassa concentrazione extracellulare di L-arginina, la sovraespressione di ARG1 o la riduzione nell'internalizzazione di L-arginina, possono tutti diminuire i livelli intracellulari di L-arginina e bloccare la traduzione dell'mRNA codificante per NOS2, riducendo così l'attività di NOS2. Le molecole e i prodotti del metabolismo della L-arginina agiscono nel citoplasma, ma possono anche essere rilasciati extracellularmente. L'ossido nitrico (NO), la N_G-idrossi-L-arginina (NOHA), la L-ornitina e le poliammine (incluse putrescina, spermidina e spermina), N_G-monometil-L-arginina monoacetato e ARG1 stessa si possono trovare nello spazio extracellulare. NOHA può essere rilasciata dai macrofagi durante un'intensa attività di NOS2, può poi inibire ARG1 e stimolare l'ulteriore rilascio di NO da parte di NOS2 in cellule vicine durante la reazione infiammatoria. Il NO causa la S-nitrosilazione di residui di cisteina presenti nel sito attivo della ornitina decarbossilasi (ODC), provocandone l'inibizione enzimatica e, in seguito, il blocco della produzione di poliammine e della proliferazione cellulare. Al contrario, le poliammine prodotte da ODC sono noti inibitori di NOS2. Inoltre, la L-ornitina e le proteine cationiche derivate dagli eosinofili (come la proteina maggiore basica, MBP, e il suo analogo poli-L-arginina) possono impedire il trasporto di L-arginina dipendente da CAT2B (trasportatore aminoacidico 2B). ONOO⁻, perossinitriti; STAT, signal transducer and activator of transcription.

Figura tratta e modificata da: Bronte V, Zanovello P. (2005) "Regulation of immune responses by L-arginine metabolism." *Nat Rev Immunol.* 5(8):641-54.

L'enzima ARG1 e l'importanza della L-arginina nella risposta immune è nota da anni. Infatti, in roditori e pazienti dopo trapianto o trauma, si è osservato una riduzione nei livelli sierici di L-Arg associata e una ridotta funzionalità dei linfociti T. Tale funzionalità veniva ripristinata dalla somministrazione enterale o parenterale di L-Arg (20).

I livelli di L-arginina sono stati correlati all'espressione della catena CD3 ζ che media il segnale di traduzione nel TCR. Livelli bassi di questo amminoacido comportano una riduzione nell'emivita dell'mRNA per la catena CD3 ζ , con conseguente diminuzione nella proliferazione dei linfociti T (21). La perdita di CD3 ζ è l'unico meccanismo innescato da ARG descritto finora che abbia una provata rilevanza diretta sulla funzione dei linfociti T. Come questo avvenga non è ancora stato completamente chiarito. ARG1, inoltre, metabolizzando arginina produce L-ornitina, un precursore della sintesi di poliammine operata dall'enzima ornitina decarbossilasi (ODC). Le poliammine (putrescina, spermidina e spermina), sono coinvolte nella crescita e nel differenziamento cellulare e possono favorire la proliferazione tumorale, come dimostrato in macrofagi che sovraesprimono ARG1 (22), e possono svolgere un ruolo anti-infiammatorio, riducendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie da monociti (23). L'induzione dell'espressione di ARG in macrofagi sembra anche favorire l'angiogenesi tumorale mediante la sintesi di poliammine (24).

Il ruolo immunoregolatorio dell'ossido nitrico (NO) rilasciato dalle MSC è stato stabilito dalla reversione dell'immunosoppressione, sia *in vitro* che *in vivo*, mediante inibitori di NOS. Inoltre topi knock out per NOS2 portatori di tumore mancano di proprietà immunosoppressive (25). L'ossido nitrico può regolare negativamente le proteine coinvolte nella segnalazione intracellulare sia direttamente, tramite S-nitrosilazione di residui cisteinici cruciali, sia indirettamente, attivando la guanilato ciclasi solubile e la protein chinasi dipendente da cGMP. Nei linfociti T il NO agisce bloccando la fosforilazione, e quindi l'attivazione, di proteine coinvolte nelle tre principali vie di segnalazione del recettore per l'IL-2 (JAK/STAT, Ras/MAPK, fosfoinositolo 3-chinasi/Akt), quali JAK1, JAK3, STAT5, ERK e AKT (25).

Studi su cellule T umane hanno anche evidenziato come il NO influenzi la stabilità dell'mRNA codificante per l'IL-2 e il rilascio di IL-2 da linfociti T attivati. In topi con carcinoma mammario e individui portatori di HIV è stato notato poi che un rilascio persistente di NO da parte delle MSC è associato ad una perdita trascrizionale di STAT5A e STAT5B in linfociti T e B (26).

Infine, su cellule T esposte ad alte concentrazioni di NO è stato osservato un effetto proapoptotico diretto, che potrebbe essere causato dall'accumulo di p53, dall'interazione mediata da Fas o da membri della famiglia del recettore per TNF, o da segnalazioni attraverso vie indipendenti dalle caspasi (27).

È difficile immaginare una cooperazione tra ARG1 e iNOS nelle MSC dato che alcuni lavori indicano che l'attivazione di arginasi limita la disponibilità di L-arginina come substrato per NOS, regolandone quindi negativamente l'attività enzimatica (28).

Nelle cellule MSC, quando entrambi gli enzimi sono attivati, oltre alle vie precedentemente descritte, viene innescata la produzione di altre specie reattive dell'ossigeno e specie reattive del nitrossido – anione superossido (O_2^-), perossinitriti ($ONOO^-$) e perossido di idrogeno (H_2O_2). L'apoptosi dei linfociti T viene indotta mediante nitratura di residui di tirosina (Tyr) sulle proteine coinvolte nella segnalazione o mediante il controllo dell'espressione di B-cell lymphoma 2 (BCL-2) e CD95 ligando (CD95L).

Nonostante i notevoli progressi fatti nell'ambito della comprensione delle MSC, molti sono gli aspetti ancora da indagare. In particolare, non è chiaro come in queste cellule possano essere attivi contemporaneamente gli enzimi ARG1 e NOS2, dal momento che sono regolati antiteticamente da citochine Th1 e Th2. Il metabolismo dell'arginina nei macrofagi è stato usato come importante parametro per discriminare tra attivazione classica o alternativa di queste cellule (29). La citochina Th1 IFN- γ , infatti, determinando l'attivazione classica dei macrofagi, stimola il rilascio di NO mediante l'attività di NOS2 e inibisce l'attività di ARG1 indotta da IL-4, IL-10 o IL-13. L'attivazione alternativa è regolata da citochine Th2, come IL-4, IL-10 e IL-13, che inibiscono l'attività di NOS2 e inducono la sintesi di ARG1. L'espressione dell'isoforma ARG2 non è modulata in modo significativo da citochine Th1 o Th2.

Tuttavia, questa stretta separazione tra macrofagi classicamente e alternativamente attivati in base all'equilibrio tra NOS e ARG potrebbe costituire una visione eccessivamente semplificata. L'utilizzo da parte delle MSC murine di entrambi gli enzimi per sopprimere le funzioni dei linfociti T in animali portatori di tumore, e la coespressione di altri marker macrofagici di attivazione classica e alternativa in profili di espressione genetica sulle stesse cellule, indicano che le MSC non si adattano perfettamente alla corrente visione dicotomica dei macrofagi (30).

1.2 MATERIALI E METODI

1.2.1 TOPI

- **BALB/c** femmina, 8 e le 12 settimane (aplotipo H-2^d) (Harlan, San Pietro al Natisone, Udine, Italia).
- **C57BL/6** femmina, 8 e le 12 settimane (aplotipo H-2^d) (Harlan, San Pietro al Natisone, Udine, Italia).
- **BALB/c IFN- γ ^{-/-}** (*ifn^{tm1TS}*) (Jackson Laboratori, Ben Harbor, ME).
- **BALB/c IL-4^{-/-}** (*Il4^{tm2Nnt}*) (Jackson Laboratori, Ben Harbor, ME).
- **BALB/c CD1^{-/-}** sono stati gentilmente forniti da Luc Van Kaer (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA).
- **BALB/c IL-4R α ^{-/-}** (*Il4r α ^{tm1Sz}*) (Taconic, New York, NY).
- **BALB/c doppi knock out RAG2^{-/-} γ _c^{-/-}** sono stati forniti dal Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Japan.

Gli animali sono stati mantenuti in gabbie di plastica, a temperatura costante e dieta bilanciata nello stabulario del Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche, sezione di Oncologia, dell'Università di Padova.

Le cellule tumorali sono state inoculate sottocute (s.c.) sul fianco sinistro degli animali e la crescita dei tumori è stata monitorata ogni 2 giorni.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti almeno una settimana dopo l'arrivo degli animali, nel rispetto delle linee guida indicate dalle direttive nazionali ed internazionali.

1.2.2 TERRENI DI COLTURA

- **DMEM 10%:** DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 mM di L-glutamina, 10 mM di HEPES, 150 U/ml di streptomicina, 200 U/ml di penicillina, 20 μ M di 2- β -mercaptoetanolo (2 β -Me) (Sigma-Aldrich, St.Louis,MO) e 10% di siero bovino fetale (FBS, Invitrogen) inattivato a 56°C per 30'.
- **RPMI 10%:** RPMI 1640 (Euroclone, Wetherby, UK), 2 mM di L-glutamina, 1 mM di sodio piruvato, 150 U/ml di streptomicina, 200 U/ml di penicillina e 10% di siero fetale bovino (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) inattivato a 56°C per 30'.

- **RMPI 10% con 2β-Me:** RPMI 1640 (Euroclone), 2 mM di L-glutamina, 1 mM di sodio piruvato, 150 U/ml di streptomina, 200 U/ml di penicillina, 20 μM di 2β-Me e 10% di siero fetale bovino (BioWhittaker) inattivato al calore.

1.2.3 LINEE CELLULARI

- **C26-GM** (aplotipo H-2^d): linea cellulare ottenuta da colon-carcinoma murino C26, geneticamente modificato per rilasciare GM-CSF, a livelli di 10-15 ng/ml per 10⁶ cellule in 48 ore. Tale linea è stata mantenuta in coltura con DMEM 10% e 0.8 mg/ml dell'antibiotico di selezione genetica (G418).
- **MBL-2** (aplotipo H-2^b): linea cellulare ottenuta da linfoma indotto da Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV), mantenuta in coltura con terreno DMEM 10%.
- **CT26** (aplotipo H-2^d): linea cellulare di colon-carcinoma indifferenziato, indotto da carcinogenesi chimica, mantenuta in coltura con terreno DMEM 10%.

1.2.4 ANALISI CITOFLUORIMETRICA

1.2.4.1 MARCATURA CON ANTICORPI PER MOLECOLE DI SUPERFICIE

Le cellule CD11b⁺ (0.5x10⁶ cellule per campione) sono state centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti e risospese in 50 μl di FACS buffer (soluzione allo 0.9% di NaCl contenente 2% di BSA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)). È seguita un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente con ascite di ratto 2.4G2 (ATCC, clone HB-197) anti-recettore Fc-γ di topo, che riconosce il dominio extracellulare di Fc-γ-RIII e RII murino. I campioni sono stati lavati e risospesi in 50 μl di FACS buffer e marcati con gli anticorpi adeguati. La marcatura, di 30 minuti, è stata eseguita al buio a 4°C. Infine le cellule, dopo un lavaggio con FACS buffer sono state risospese in 200 μl di FACS buffer e lette al citofluorimetro. Gli anticorpi utilizzati sono i seguenti:

- rat anti-mouse CD124-PE (IL-4Rα) e il controllo rat IgG_{2a}-PE (entrambi BD Biosciences Pharmingen), alla concentrazione di 0.25 μg/10⁶ cellule;
- rat anti-mouse CD11b-PE e il controllo rat IgG_{2a}-PE (entrambi Caltag, Burlingame, CA), alla concentrazione di 0.25 μg/10⁶ cellule;
- rat anti-mouse Gr-1-FITC (Immunokontakt, Abingdon, United Kingdom) e il controllo isotipico rat IgG_{2b}-FITC (Caltag), alla concentrazione di 0.25 μg/10⁶ cellule;

- anti-mouse CX₃CR1-Fc (regalo della Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, MA), usato a 0.14 µg/10⁶ cellule, con anticorpo secondario goat anti-human IgG-Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratory) a 7.5 ng/µl;
- goat anti-mouse CCR2 (CKR-2B) policlonale (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a concentrazione di 1 µg/10⁶ cellule, con anticorpo secondario anti-goat IgG biotinilato a 2 µg/10⁶ cellule e streptavidina-FITC (Dako) a 0.1 µg/ µl;
- rat anti-mouse IFN-γ-FITC e controllo isotipico rat IgG₁, usati a 0.5 µg/10⁶ cellule (entrambi BD Pharmingen) e rat anti-mouse IL-13 biotinilato con controllo isotipico rat IgG₁, usati a 0.5 µg/10⁶ cellule (Biosource).

Dopo un lavaggio le cellule sono state risospese in 200 µl di FACS buffer e analizzate.

1.2.4.2 MARCATURA INTRACELLULARE (INTRACELLULAR STAINING)

Per l'analisi citofluorimetrica intracitoplasmatica, in piastre da 96 pozzetti con fondo piatto (Falcon), sono state piastrate 0.1x10⁶ cellule CD11b⁺. Le cellule sono state poi incubate, a 37°C, con 1 µg/ml di Brefeldina A (Sigma) per 10 ore. La piastra è stata centrifugata a 1200 rpm per 5 minuti (Heraeus Minifuge RF) e lavata con PBS. Le cellule sono state fissate e permeabilizzate per 20 minuti a 4°C mediante Cytofix/Cytoperm Kit (BD Pharmingen). Dopo centrifugazione è stato fatto un lavaggio con PBS contenente BSA allo 0.5% (Sigma) e saponina allo 0.1% (Sigma).

Le cellule sono state marcate con gli anticorpi monoclonali rat anti-mouse IFN-γ-FITC (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ), a concentrazione di 0.5 µg/10⁶ cellule, o rat anti-mouse IL-13 biotinilato (Biosource, Camarillo, CA), a 0.5 µg/10⁶ cellule, per 30 minuti a 4°C. La marcatura è stata eseguita anche coi relativi controlli negativi, alle stesse concentrazioni e nelle stesse condizioni.

In seguito ad un lavaggio i campioni marcati con anti-IFN-γ sono stati risospesi in PBS, mentre quelli marcati con anti-IL-13 sono stati marcati per 30 minuti, a 4°C, con streptavidina-FITC (Dako) a concentrazione di 0.1 µg/µl, lavati in soluzione di lavaggio e risospesi in PBS.

I campioni sono stati analizzati con citofluorimetro FACS-CALIBUR (Beckton Dickinson, San Josè, CA), utilizzando il software fornito dalla ditta.

1.2.5 CITOCHINE E INIBITORI

Sono state usate le seguenti citochine: IL-13 (usata a concentrazione finale di 33 ng/ml) e IFN-γ (concentrazione finale di 25 ng/ml) murini, acquistati dalla Peprotech Inc. (Rochy Hill, NJ).

Come anticorpi neutralizzanti: goat anti-mouse IL-13 a 30 µg/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN) e il controllo isotipico goat IgG a 30 µg/ml (R&D Systems).

1.2.6 LISI IPOTONICA DEI GLOBULI ROSSI

Gli esperimenti prevedono una lisi iniziale degli eritrociti, in quanto la presenza dei globuli rossi potrebbe interferire nelle successive analisi.

La lisi dei globuli rossi è stata effettuata aggiungendo al pellet di splenociti 4 ml di soluzione lisante ACK (BioWhittaker) per 4 minuti a cui ha fatto seguito un lavaggio con 4 volumi di terreno DMEM al 3% di FBS al fine di eliminare le cellule morte e tamponare l'ipotonicità del buffer di lisi.

1.2.7 ISOLAMENTO DI CELLULE SOPPRESSORIE DA MILZE DI TOPI MEDIANTE SORTING IMMUNOMAGNETICO

Per ottenere una popolazione pura di MSC *ex-vivo* dalle milze di topi inoculati con cellule C26-GM si è fatto ricorso all'arricchimento immunomagnetico. Questa tecnica consiste nella separazione magnetica di cellule legate a biglie coniugate con un mAb anti-CD11b⁺ (rat anti-mouse/human CD11b (Mac-1α) (antibodies, Auburn, CA, USA) fatte passare attraverso una colonna di separazione MACS (MACS separation columns, Milteny Biotec GmbH, Germany). Una sospensione cellulare di 10⁷ splenociti, dopo opportuna lisi dei globuli rossi e lavaggio è stata risospesa in 90 µl di buffer (PBS 0.5% BSA, 2mM EDTA). La sospensione cellulare dopo aggiunta di 10 µl di microbigliette MACS-CD11⁺, è stata incubata per 15 minuti a 4°C, agitando ogni 10 minuti. Al termine dell'incubazione, si è proceduto al lavaggio con con sorting buffer e il pellet è stato poi risospeso in 500 µl di sorting buffer. Si è proceduto a questo punto alla separazione. La colonna, lavata con 500 µl di tampone de-gasato, è stata caricata con la sospensione cellulare lasciando eluire la frazione cellulare negativa. Le cellule con adese le bigliette magnetiche rimangono legate alla colonna. Staccando la colonna dal magnete e caricandola con 1 ml di buffer de-gasato si fluisce la frazione positiva contenente le cellule di nostro interesse. Questa frazione è stata risospesa in terreno C.

Una parte delle cellule così ottenuta è stata analizzata al citofluorimetro per valutarne l'arricchimento, una quota utilizzata per l'estrazione dell'RNA, per saggi funzionali e enzimatici e infine una parte mantenuta in coltura con il terreno RPMI 10%.

1.2.8 ALLESTIMENTO DI COLTURE LEUCOCITARIE MISTE (MLC)

Milze di topi BALB/c, IFN- γ ^{-/-} o IL-4^{-/-} (aplotipo H-2^b) e C57BL/6 (aplotipo H-2^b) sono state prelevate sterilmente e disgregate meccanicamente. La sospensione cellulare così ottenuta è stata sottoposta a lisi ipotonica dei globuli rossi e delicatamente passata attraverso una garza di nylon per eliminare gli aggregati cellulari. Le sospensioni cellulari sono state utilizzate per allestire le MLC. In piastre da 24 pozzetti (Costar, Cambridge, MN, USA) sono stati coltivati 3×10^6 splenociti BALB/c e un egual numero di splenociti C57BL/6 γ -irradiati (2500 rads) in un volume finale di 1 ml di terreno di coltura RPMI 10% con 2 β -Me per pozzetto. Alle colture sono state aggiunte, come terza parte, splenociti CD11b⁺, sortati da topi wild type o knock out, ad una concentrazione del 3% sul totale delle cellule. Le colture sono state quindi incubate a 37°C in atmosfera satura di vapore acqueo e contenente il 5% di CO₂. Dopo cinque giorni di incubazione è stata valutata l'attività citotossica delle cellule recuperate dalle MLC mediante un saggio di rilascio di ⁵¹Cr.

1.2.9 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA CITOTOSSICA MEDIANTE SAGGIO DI RILASCIO DI ⁵¹CR

L'attività citotossica delle MLC è stata valutata mediante un saggio di citotossicità a 5 ore, utilizzando come cellule bersaglio le linee tumorali MBL-2 (aplotipo H-2^b) e CT26 (aplotipo H-2^d), marcate in pellet con 100 μ Ci Na₂⁵¹CrO₄ (DuPont, Boston, MA, USA) per 1 ora a 37°C. Al termine della marcatura, le cellule sono state opportunamente lavate e quindi risospese in terreno RPMI 5% con 2 β -Me, alla concentrazione di 2×10^4 /ml. 100 μ l di tale sospensione sono state depositate per ogni pozzetto di una micropiastre da 96 pozzetti con fondo a U (Falcon), in presenza di diluizioni scalari di cellule effettrici, distribuite in triplicato in un volume di 100 μ l.

La concentrazione massima di cellule effettrici considerata è stata di 400 000 cell/pozzetto, pari ad un rapporto effetto:target di 200:1.

Le piastre sono state centrifugate per 5 minuti a 200 rcf e incubate a 37°C per 5 ore.

Da ogni pozzetto sono stati prelevati 30 μ l di surnatante, poi trasferiti in micropiastre contenenti uno scintillante solido (Packard Instruments Co., Meriden, CT, USA).

Dopo aver lasciato asciugare le piastre, la radioattività emessa è stata misurata con un contatore di scintillazione- γ per piastre (Top Count, Packard Instruments Co.).

La percentuale di lisi specifica è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\% \text{ rilascio specifico} = 100 \cdot \frac{(R_{sper} - R_{spont})}{(R_{msx} - R_{spont})}$$

con:

R_{spont} (cpm) rilascio spontaneo di isotopo radioattivo, rilasciato da cellule target incubate in assenza di effettori

R_{max} (cpm) rilascio massimo di isotopo radioattivo, ottenuto in seguito a ripetute operazioni di congelamento e scongelamento delle cellule radiomarcate che causano la rottura della membrana plasmatica

R_{sper} (cpm) rilascio sperimentale di isotopo radioattivo, misurato per ciascun rapporto effettore/bersaglio

Per descrivere l'attività citolitica delle cellule in coltura è stata eseguita la stima delle unità litiche (L.U.); questo modo di elaborare i risultati rende più immediata l'interpretazione di un aumento o diminuzione dell'attività citotossica rispetto all'analisi dei singoli rapporti effettore:bersaglio.

Il calcolo delle L.U.₃₀ (Unità litiche 30%) per 10^6 cellule effettrici si ottiene dividendo 10^6 per il numero di effettori che danno il 30% di lisi specifica di 2×10^3 bersaglio. I valori di L.U./ 10^6 cellule ottenuti sono stati usati per calcolare l'L.U.₃₀ della coltura (L.U.₃₀) a partire dal numero di cellule vitali presenti in coltura al momento dell'allestimento del test di citotossicità. Il rapporto L.U.₃₀ è stato calcolato usando la seguente formula:

Rapporto L.U.₃₀ = L.U.₃₀ del gruppo sperimentale / L.U.₃₀ del gruppo di controllo

1.2.10 ANALISI MORFOLOGICA DI CELLULE CD11B+/IL-4R α + E CD11B+/IL-4R α -

50000 splenociti CD11b⁺/IL-4R α ⁺ e CD11b⁺/IL-4R α ⁻, isolati da fresco, sono stati fissati su vetrino a 10000 rpm per 10 minuti mediante Cytospin 3 (Shandon).

Le cellule sono state lasciate asciugare all'aria e poi fissate in etanolo 95% per 20 minuti. Successivamente sono state colorate con May-Grünwald-Giemsa per 3 minuti e a seguir con ematossilina-eosina per 2 minuti.

Le fotografie sono state scattate utilizzando un ingrandimento 40X.

1.2.11 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

L'RNA totale è stato estratto mediante il reagente TRIzol (Invitrogen) seguendo il protocollo della casa produttrice con poche modifiche.

Le cellule, nell'ordine di 1×10^6 per campione, sono state staccate (quando piastrate) con PBS, EDTA 2mM, lavate in PBS 1%, centrifugate a 1500 rcf per 5 minuti a 4°C e successivamente lisate in 1 ml di Trizol per campione.

I campioni sono stati emulsionati con 0,2 vol. di cloroformio e centrifugati a 12000 x g, 15' a 4°C, per allontanare la frazione proteica, carboidratica e lipidica. L'RNA totale, contenuto nella frazione acquosa dell'emulsione è stato precipitato per aggiunta di 0,5 vol. di isopropanolo e 1 µl di linear-acrilammide e centrifugato immediatamente a 12000 x g. Gli acidi ribonucleici, che si presentano come un precipitato lattescente, sono stati lavati con etanolo 75% e risospesi in un appropriato volume di acqua, trattata con DEPC. L' RNA è stato successivamente ripurificato per mezzo del kit RNeasy (Quiagen) e risospeso in 30 µl.

La qualità e la quantità dell'RNA estratto sono state valutate mediante gel elettroforesi capillare Agilent RNA 6000 Nano Chip Technology (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

1.2.12 RETROTRASCRIZIONE

Il cDNA è stato prodotto dall'RNA totale mediante reazione di retrotrascrizione in 20 µl, utilizzando la retrotrascrittasi di Moloney Murine Leukemia Virus M-MLV RT (Invitrogen) secondo il protocollo della casa produttrice.

In ogni reazione sono stati usati 250 ng di RNA totale disciolto in H₂O DEPC, incubato insieme a 500 µg/ml di oligo-dT e a 10 mM dNTPs mix, per 5 minuti a 65°C, utilizzando un termociclatore (Thermo Electron Corporation). In ghiaccio sono stati poi aggiunti, ad ogni reazione, First-Strand Buffer, DTT 0.1 M e 40 unità di RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (tutti reagenti Invitrogen).

La soluzione è stata tenuta in incubazione a 37°C per 2 minuti. Successivamente sono state aggiunte 200 unità di M-MLV RT (o 1 µl di H₂O DEPC per i controlli negativi) ad ogni campione ed è stata effettuata un'incubazione di 1 ora a 37°C. La reazione è stata inattivata riscaldando i campioni per 15 minuti a 70°C.

1.2.13 REAL-TIME PCR

Le reazioni di PCR Real-Time TaqMan[®] sono state effettuate in 20 µl, utilizzando 20 ng di cDNA templato. La reazione (2 minuti a 50°C, 10 minuti a 95°C e, per 45 cicli, 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C) è stata eseguita su ABI prism 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Sono stati utilizzati primer e sonde specifici per rilevare l'espressione dei seguenti geni: arginasi 1 epatica (*Arg1*), sintetasi dell'ossido nitrico inducibile (*Nos2*) e gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (*Gapdh*) (Applied Biosystems, Norwalk, CT).

Per ogni gene da analizzare è stata preparata una mix di reazione con 10 µl di TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems) e 1 µl di primer e sonda specifici, a cui sono stati aggiunti 9 µl di cDNA (o acqua-DEPC per i controlli negativi). Le reazioni sono state allestite in piastre da 96 pozzetti (Applied Biosystems).

Il C_t (threshold cycle) è stato determinato manualmente e il fold change di espressione è stato calcolato come descritto dallo User Bulletin # 2 della Applied Biosystems.

1.2.14 WESTERN BLOT

5×10^5 di splenociti CD11b⁺ sono stati recuperati dalle colture o da fresco e lavati per due volte in PBS freddo. Le cellule, in pellet, sono state lisate per 15 minuti in buffer di lisi (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM, NaO₄ 1 mM, Triton 0.5%, Pepstaina 0.1 µg/µl, Antipaina 0.1 µg/µl, Aprotinina 0.1 µg/µl, PMSF 2mM) in ghiaccio. I lisati sono stati centrifugati a 3000 rcf per 10 minuti a 4°C e ai surnatanti recuperati è stato aggiunto un volume di loading buffer (100 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 0.2 % bromofenolo blu, 20 % glicerolo e DTT 200 mM), incubando per 5 minuti a 100°C.

Le proteine sono state separate su gel denaturante SDS-PAGE al 10%. Le proteine sono state trasferite overnight a 4°C a 250 mA su membrana di PVDF (Millipore).

La membrana è stata saturata per un'ora a temperatura ambiente con soluzione di blocking costituita da PBS-Tween20 0.05% (PBS-T), contenente diverse concentrazioni di non-fat dried milk (Sigma): 5% per anti-ARG1, 3% per anti-NOS2, 1% per anti-actina.

Le ibridazioni con gli anticorpi primari sono state eseguite come segue: mAb murino anti-ARG1-murina (fornito da Augusto C. Ochoa, Louisiana State University, New Orleans, LA), diluito 1:200, in soluzione di blocking per 1 ora a temperatura ambiente; anticorpo policlonale di coniglio anti-NOS2-murina (Santa Cruz Biotechnology Inc.), diluito 1:1000, in PBS-T BSA 3% per un'ora a temperatura ambiente; anticorpo policlonale di coniglio anti-actina (Sigma), diluito 1:500, in PBS-T BSA 3% per un'ora a temperatura ambiente.

La membrana è stata lavata tre volte in PBS-T e incubata per un'ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari: rabbit anti-mouse IgG coniugato a HRP (horseradish peroxidase) (Sigma), diluito 1:10000 e incubato in PBS-T, o anticorpo donkey anti-rabbit IgG coniugato a HRP (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK), diluito 1:5000 e incubato in soluzione di blocking.

Le proteine sono state rilevate mediante kit Supersignal West Picochemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL), su lastre Hyperfilm (Amersham).

1.3 RISULTATI

1.3.1 PROFILO DI ESPRESSIONE GENETICA IN SPLENOCITI CD11B+

Considerata l'eterogeneità della popolazione mieloide soppressoria, ed al fine di scomporre i meccanismi molecolari alla base dell'attività soppressoria stessa, è stato condotto uno studio di genomica funzionale utilizzando la tecnologia Affymetrix® GeneChips. L'analisi genomica è stata condotta su CD11b⁺ di milza arricchite mediante sorting magnetico a 0 ore e dopo coltura per 24 ore con solo terreno senza aggiunta di citochine. Questo perché studi *in vitro* su linee cellulari di cellule mieloidi hanno evidenziato un aumento dell'attività soppressoria durante l'incubazione. Come controparte normale, sono state isolate cellule CD11b⁺ da milze di topi BALB/c privi di tumore.

Per ogni condizione sono state eseguite 3 repliche. I dati ottenuti dall'analisi e le liste complete dei geni che caratterizzano le diverse popolazioni prese in esame sono disponibili nel database Gene Expression Omnibus [GEO] al seguente indirizzo <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (numero di accesso: GSE5455).

I geni espressi nelle CD11b⁺ isolate a fresco da topo con tumore clusterizzano in due gruppi, uno identifica gli enzimi che caratterizzano le cellule polimorfonucleate o che codificano per molecole coinvolte nella risposta infiammatoria acuta (Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.). L'altro gruppo di geni è rappresentato citochine, molecole di membrana e marker associati ai macrofagi alternativamente attivati e comprendono la chitinasi 3-like 3 (conosciuta come Ym-1), componente del complemento 4, IL-6, IL-10, IL-1 α , recettore II dell'IL-1, recettore mannosio di tipo C. Dal confronto tra geni espressi nelle CD11b b⁺ a fresco e incubate per 24 h emerge un profilo di espressione che conferma la complessità di queste cellule. Troviamo infatti espresso il gene *arg1*, codificante per l'enzima ARG1, noto come marker nelle cellule macrofagiche attivate ma in particolare, sembra che nelle MSC vengano attivate due vie metaboliche, regolate da citochine con azione normalmente antagonista, ovvero citochine di tipo Th1 (IFN- γ) e di tipo Th2 (IL-4 e IL-13).

Il fatto che queste vie si attivino in colture in cui sono presenti solo splenociti CD11b⁺ ha permesso di ipotizzare che le citochine citate possano essere autonomamente secrete dalle MSC; le cellule soppressorie verrebbero così promosse da entità passive influenzate dall'ambiente citochinico circostante a cellule attivamente coinvolte nella regolazione del microambiente e del proprio differenziamento.

Nome del gene	Abbreviazione	Accession number ^a	Fold Change ^b
A. Splenociti CD11b⁺ isolati immediatamente (0 h)			
Risposta infiammatoria-granulocitaria			
Regenerating islet-derived 3 alpha	<i>Reg3a</i>	19694	147.70
Regenerating islet-derived 2	<i>Reg2</i>	19693	141.25
Amylase 1, salivary	<i>Amy1</i>	11722	124.54
Ribonuclease, Rnase A family, 1 (pancreatic)	<i>Rnase1</i>	19752	100.93
Pancreatitis-associated protein	<i>Pap</i>	18489	73.81
Amylase 2, pancreatic	<i>Amy2</i>	11723	72.65
Regenerating islet-derived 3 gamma	<i>Reg3g</i>	19695	47.64
Pancreatic lipase related protein 1	<i>Pnliprp 1</i>	18946	40.48
Protease, serine, 2	<i>Prss2</i>	22072	39.62
Trypsin 4	<i>Try4</i>	22074	23.74
Kallikrein 5	<i>Klk5</i>	16622	19.91
Myeloperoxidase	<i>Mpo</i>	17523	19.81
Regenerating islet-derived 1	<i>Reg1</i>	19692	19.71
Chymotrypsinogen B1	<i>Ctrb1</i>	66473	16.28
Chymotrypsin-like	<i>Ctr1</i>	109660	14.3
Colipase, pancreatic	<i>Ctps</i>	109791	14.04
Kallikrein 6	<i>Klk6</i>	16612	12.13
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	<i>Cxcl1</i>	14825	11.29
Eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 2	<i>Ear2</i>	13587	7.84
Tnf receptor-associated factor 1	<i>Traf1</i>	22029	7.81
Proteinase 3	<i>Prtn3</i>	19152	6.7
Fas (TNF receptor superfamily member)	<i>Fas</i>	14102	6.56
Kallikrein 22	<i>Klk22</i>	13646	6.25
Kallikrein 1	<i>Klk1</i>	16623	6.10
Eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 1	<i>Ear1</i>	13586	5.23
Formyl peptide receptor 1	<i>Fpr1</i>	14293	4.12
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	<i>Cxcl2</i>	20310	3.78
Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	<i>Csf3</i>	12985	3.5
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	<i>Ccl3</i>	20302	3.15
Matrix metalloproteinase 8	<i>Mmp8</i>	17394	2.62
Elastase 2	<i>Ela2</i>	13706	2.46
Signature di attivazione alternativa dei macrofagi			
Interleukin 1 receptor, type II	<i>Il1r2</i>	16178	12.17
Interleukin 10	<i>Il10</i>	16153	6.66
Mannose Receptor, C type 1	<i>Mrc1</i>	17533	6.66
Interleukin 1 alpha	<i>Il1a</i>	16175	5.01
Chitinase 3-like 3	<i>Chi3l3</i>	12655	4.57
Interleukin 6	<i>Il6</i>	16193	3.63
Transforming growth factor beta induced transcript 4	<i>Tgfb 14</i>	21807	3.37
Adenosine A2b receptor	<i>Adora2b</i>	11541	3.26
Complement component 4	<i>C4</i>	12268	2.96
B. Splenociti CD11b⁺ coltivati per 24 ore			
Signature di IL-4/IL13			
Arginase 1, liver	<i>Arg</i>	11846	142.18
Interleukin 4 induced 1	<i>Il4il</i>	14204	26.24
Matrix metalloproteinase 12	<i>Mmp12</i>	17381	9.01
Annexin A4	<i>Anxa4</i>	11746	3.43
Serum/glucocorticoid regulated kinase	<i>Sgk</i>	20393	3.55
Lectin, galactoside-binding, soluble, 3binding protein	<i>Lgals3pb</i>	19039	4.29
Signature di IFN			
Interleukin 12a	<i>Il12a</i>	16159	29.65
Signal trasucer and activator of transcription 1	<i>Stat1</i>	20846	13.75
Interferon regulatory factor 7	<i>Irf7</i>	54123	7.41
Interferon activated gene 202B	<i>Ifi202b</i>	26388	6.3
Histocompatibility 2, T region locus 10	<i>H2-T10</i>	15024	5.77
Interferon regulatory factor 1	<i>Irf1</i>	16362	5.74
Transporter 1, ATP-binding cassette, sub family B (MDR/TAP)	<i>Tap1</i>	21354	5
Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha	<i>Psme1</i>	19186	4.17
Interferon (alpha and beta) receptor 2	<i>Ifnar2</i>	15976	3.78
Nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage	<i>Nos2</i>	18126	3.67
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	<i>Abca1</i>	11303	3.34
Histocompatibility 2, D region locus 1	<i>H2-D1</i>	14964	3.02
Proteasome subunit, beta type 5	<i>Psmb5</i>	19173	2.69
Proteasome subunit, alpha 1	<i>Psm1</i>	26440	2.28

^a Accession number Locustlink. ^b Il fold change medio è stato ottenuto mediante il confronto tra splenociti CD11b⁺ da topi con tumore isolati immediatamente o coltivati per 24 ore e splenociti CD11b⁺ di controllo ottenuti da topi senza tumore.

Tabella 1

Trascritti sovraespressi in cellule CD11b⁺ isolate dalla milza di topi con tumore

1.3.2 PRODUZIONE CITOCINE COINVOLTE NELLA SOPPRESSIONE LINFOCITARIA

Alla luce dei dati di espressione genica è stato indagato, mediante test E.L.I.S.A, il rilascio autocrino delle citochine IFN- γ , IL-4 e IL-13 da parte delle CD11b⁺ isolate da topi con C26-GM. Tuttavia con questa metodica, la produzione di queste citochine non è mai stata rilevabile. Abbiamo ipotizzato che una possibile causa fosse il consumo rapido delle citochine da parte delle cellule in coltura. Per ovviare a questa carenza del saggio è stata quindi eseguita una marcatura intracellulare su cellule CD11b⁺ per indagare la produzione citoplasmatica delle citochine (Figura 3).

Dai risultati è emerso che parte degli splenociti CD11b⁺ di topi portatori di tumore, produce IFN- γ e IL-13.

Lo stesso tipo di ingadine è stata eseguita anche su splenociti CD11b⁺ da topi "knock out" (K.O.) per IFN- γ portatori di tumore C26-GM questo per dimostrare che l'espressione delle due citochine è indipendente (Figura 3).

La presenza di IL-4 non è stata rilevata né mediante test E.L.I.S.A. né mediante marcatura intracellulare. Tuttavia, per poter escludere completamente il coinvolgimento di quantità minime di IL-4 parte degli esperimenti sono stati condotti utilizzando topi knock out" (K.O.) per questa citochina. Inoltre, al fine di escludere contaminazione di cellule NK e NKT, principali fonti *in vivo* rispettivamente di IFN- γ e IL-13 e all'interno delle popolazioni separate immunomagneticamente sono stati utilizzati topi knock out per CD1 (molecola MHC I-simile, necessaria per la selezione di cellule NKT nel timo), che mancano di cellule NKT, e doppi K.O. sia per RAG2 (enzima coinvolto nel riarrangiamento dei recettori linfocitari) che per la catena γ_c (comune al recettore di diverse citochine come IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15), che mancano di linfociti T, B e cellule NK.

Gli splenociti CD11b⁺ sono stati isolati da topi CD1^{-/-} e RAG2^{-/-} γ_c ^{-/-} portatori di tumore C26-GM e sottoposti a marcatura intracellulare per verificare la capacità di tali cellule di produrre IFN- γ e IL-13. Come si vede in Figura 3, le cellule analizzate producono, in entrambi i ceppi, le due citochine, dimostrando che gli splenociti CD11b⁺ possono rilasciare IL-13 e IFN- γ senza l'ausilio di altri tipi cellulari.

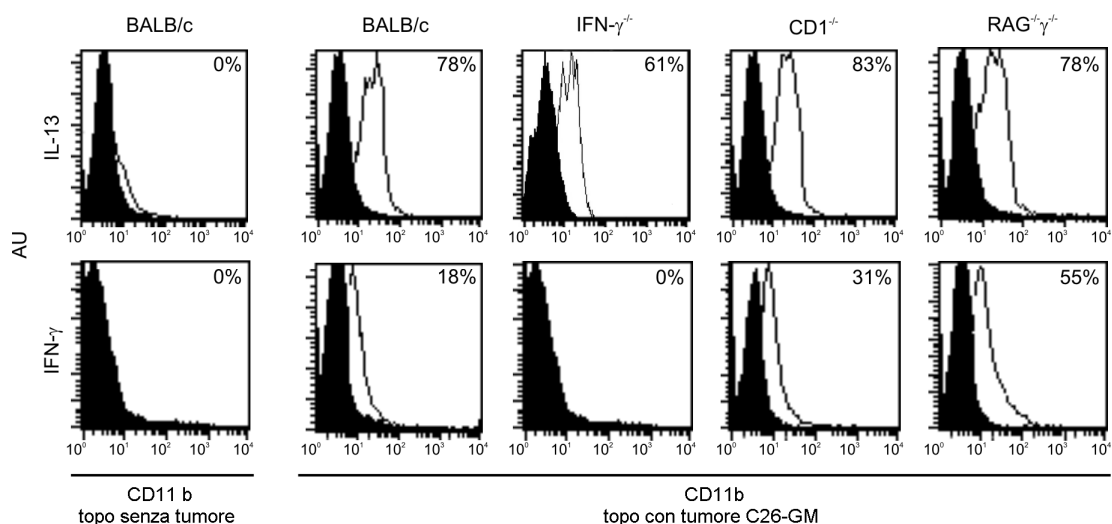


Figura 3

Produzione IFN-γ e IL-13 da parte di CD11b⁺

Cellule CD11b⁺ sortate da splenociti di topi sani BALB/c e da topi portatori di tumore C26-GM, con background BALB/c normale o K.O. per IFN-γ, background deficitario per CD1 e per RAG2/γ_c sono state analizzate mediante citofluorimetria a flusso per la presenza intracellulare di IL-13 (riquadri superiori) e di IFN-γ (riquadri inferiori). Le aree vuote rappresentano il segnale di marcatura degli anticorpi per le due citochine, mentre le aree piene il segnale di marcatura degli anticorpi di controllo isotipico. I dati sono rappresentativi di almeno tre rilevazioni in esperimenti separati. U.A.= unità arbitrarie.

Per investigare il ruolo delle citochine Th1 e Th2 nella regolazione della funzione delle cellule mieloidi soppressorie, è stata analizzata la generazione *in vitro* di linfociti T alloreattivi in presenza di splenociti CD11b⁺ isolati da topi portatori di tumore; queste cellule sono state prelevate da topi BALB/c parentali o deficitari per la produzione delle citochine di interesse IFN-γ, IL-4 e topi deficitari per CD1 e per RAG2γ_c.

I linfociti alloreattivi sono stati generati stimolando splenociti di topi BALB/c parentali con un ugual numero di splenociti allogenici γ-irradiati da topi C57BL/6. Alle colture sono stati aggiunti, alla concentrazione finale del 3%, splenociti CD11b⁺ sortati immunomagneticamente da topi BALB/c parentali o knock out per IFN-γ, IL-4, CD1 e RAG2γ_c inoculati con tumore C26-GM. Come controllo sono state allestite colture prive di CD11b⁺.

Dopo 5 giorni è stata testata l'attività citotossica degli effettori in un saggio di rilascio di ⁵¹Cr a 5 ore, utilizzando target allogenici (cellule MBL-2) e singenici di controllo (cellule CT26).

La generazione di linfociti alloreattivi risulta inibita dalla presenza di splenociti CD11b⁺ provenienti da topi BALB/c parentali e da quelli IL-4^{-/-}, mentre viene addirittura aumentata, rispetto alle colture di controllo, dalle cellule CD11b⁺ provenienti dai topi K.O. per IFN-γ (**Figura 4A**). Questo indica che il rilascio di IFN-γ, ma non di IL-4, da parte delle stesse MSC è importante per la soppressione di linfociti alloreattivi.

Le cellule provenienti dai topi knock out CD1 e RAG2 γ_c con effettori BALB/c wild type, come mostrato in **(Figura 4A)**, mantengono intatte le loro capacità soppressorie sui linfociti alloreattivi.

Questi risultati suggeriscono che l'attività soppressoria possa essere mediata direttamente dalle cellule mieloidi CD11b⁺, senza il contributo da parte di altre cellule del sistema immunitario, quali cellule NK e NKT. Sembra, inoltre, che anche il recettore per l'IL-4 di tipo I, assente nei topi RAG2^{-/-} γ_c ^{-/-} (deficitari per la catena comune γ_c), non sia coinvolto nella soppressione mediata dalle MSC, visto che le cellule CD11b⁺ provenienti da questo ceppo mantengono intatte le loro proprietà. Questo confermerebbe i risultati degli esperimenti precedenti che suggerivano come l'IL-4 potrebbe non ricoprire un ruolo rilevante nel fenomeno soppressorio da noi studiato.

1.3.3 RUOLO DELLE CITOCINE RILASCIATE DAI LINFOCITI T NELLA SOPPRESSIONE MSC-DIPENDENTE

Ai fini di capire il ruolo delle citochine coinvolte nella soppressione operata dalle MSC, rilasciate da parte dei linfociti T attivati sono state allestite delle colture allogeniche con le stesse modalità dell'esperimento precedente, utilizzando però come effettori degli splenociti provenienti da topi K.O. per IFN- γ o per IL-4. Alle colture sono stati aggiunti, anche in questo caso, splenociti CD11b⁺ sortati da topi con tumore C26-GM, appartenenti ai diversi ceppi parentali e KO. Utilizzando effettori IFN- γ ^{-/-}, incapaci di rilasciare IFN- γ , la generazione di linfociti alloreattivi non è risultata inibita dalla presenza di splenociti CD11b⁺, ma ne è sembrata anzi stimolata, qualunque fosse il ceppo di provenienza delle cellule mieloidi **(Figura 4B)**. Il rilascio di IFN- γ da parte dei linfociti T attivati sembra, quindi, essenziale per indurre l'attività soppressoria delle cellule mieloidi.

Nel caso di effettori IL-4^{-/-}, invece, le cellule CD11b⁺ da topi BALB/c parentali o IL-4^{-/-} hanno mostrato soppressione della risposta allo genica, a differenza di quelle provenienti da topi IFN- γ ^{-/-} **(Figura 4C)**. Il rilascio di IL-4 da parte dei linfociti T attivati non è importante ai fini della soppressione mediata dalle MSC.

In sintesi, da questi risultati emerge che la soppressione della risposta alloreattiva mediata dalle MSC richiede la produzione di IFN- γ sia da parte dei linfociti T attivati che da parte delle stesse CD11b⁺, escludendo completamente il contributo dell'IL-4 in questo fenomeno.

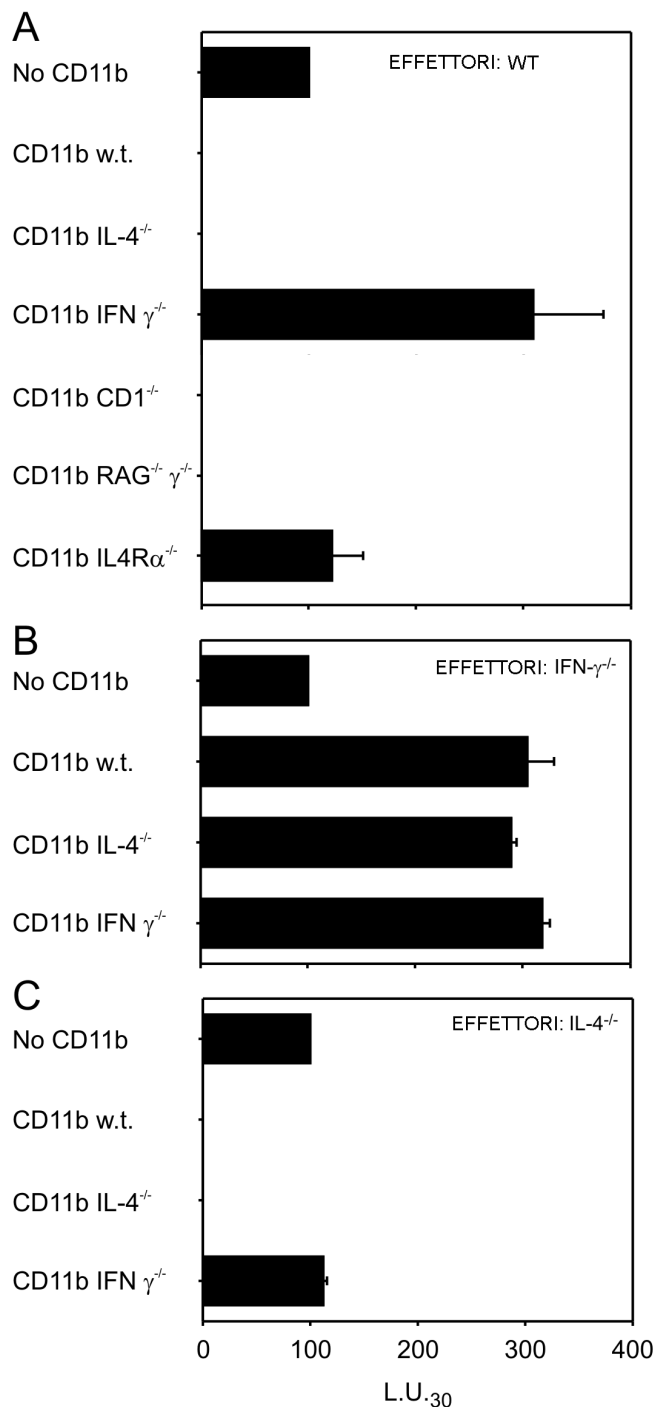


Figura 4

Ruolo delle citochine rilasciate da splenociti CD11b⁺ indotti da tumore nella soppressione di linfociti T alloreattivi mediata dalle MSC.

(A) L'attività citolitica di linfociti T effettori da topi BALB/c parentali (wild type, w.t.) contro cellule bersaglio allogeniche, in presenza del 3% di splenociti CD11b⁺ isolati da topi BALB/c wild type, IL-4^{-/-}, IFN-γ^{-/-}, CD1^{-/-}, RAG2^{-/-} γ^{-/-} e IL-4Rα^{-/-} inoculati con C26-GM e l'attività citolitica di linfociti T effettori da topi BALB/c IFN-γ^{-/-} (B) o IL-4^{-/-} (C) contro target allogenici, in presenza del 3% di splenociti CD11b⁺ isolati da topi BALB/c wild type, IL-4^{-/-}, IFN-γ^{-/-} da topi con tumore è stata valutata in saggio di rilascio di ⁵¹Cr a 5 ore. Le L.U.₃₀ (numero di linfociti necessari per ottenere la lisi specifica del 30% di 2 x 10³ cellule bersaglio) sono state calcolate sul numero totale di cellule vitali recuperate dalle colture. I dati sono espressi come rapporto tra le L.U.₃₀ misurate nelle colture contenenti le MSC come terza parte e quelle delle colture di controllo, prive di MSC. I dati sono rappresentativi di media ± errore standard di tre esperimenti.

1.3.4 ESPRESSIONE CATENA α DEL RECETTORE IL-4 SULLE MSC E RUOLO NEL MECCANISMO SOPPRESSORIO

Come abbiamo visto l' IL-4 non è determinate nel meccanismo soppressorio. Per tanto abbiamo focalizzato l'attenzione sull'IL-13 in quanto coinvolta nell'attivazione alternativa dei macrofagi e nell'induzione di ARG1. A questo scopo, non disponendo di un topo knock out per IL-13, abbiamo

utilizzare un topo deficiente per la catena α del recettore per l'IL-4 di tipo II, che lega anche IL-13. Esistono infatti due tipi di recettore: recettore IL-4R di tipo I costituito dalla catena IL-4R α e dalla catena γ (comune ai recettori di diverse citochine, tra cui IL-2, IL-7, IL-9 e IL-15) in grado di legare solo IL-4 e il recettore di tipo II, composto dalle catene IL-4R α e IL-13R α 1, in grado di legare sia IL-4 che IL-13. L'IL-13 è in grado di legarsi anche ad un altro recettore, IL-13R α 2.

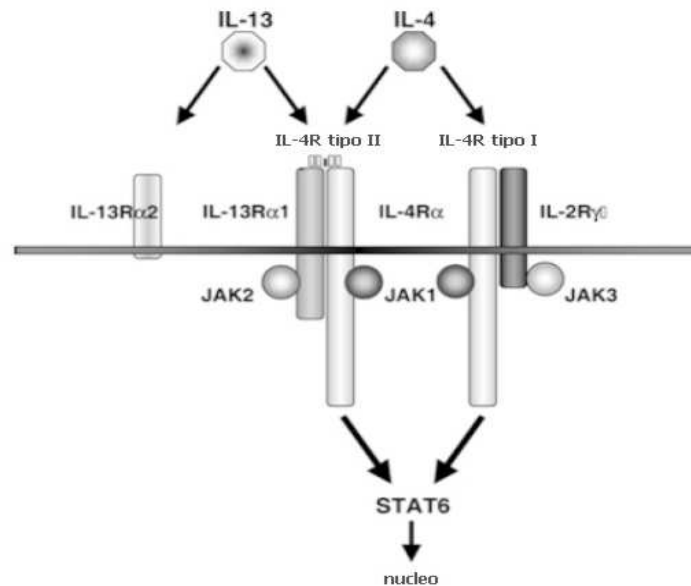


Figura 5: Recettori per IL-13 e IL-4

L'IL-4 e l'IL-13 condividono il recettore IL-4R di tipo II. IL-13 è in grado di legare il recettore II mediante la catena IL-13R α 1, mentre IL-4 mediante la catena IL-4R α . Sia il recettore IL-4R di tipo I che quello di tipo II utilizzano JAK1 e STAT6 per la trasduzione del segnale, ma differiscono per il reclutamento di JAK3 e JAK2, rispettivamente. I due recettori hanno anche diversa distribuzione cellulare e tissutale.

Figura tratta e modificata da: Terabe M, Park JM, Berzofsky JA. (2004) "Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth." *Cancer Immunol Immunother.* 53(2):79-85.

L'espressione di IL-4R α è stata valutata mediante citofluorimetria sulle cellule CD11b⁺ di splenociti isolati da topi con tumore e sani. Gli splenociti provenienti da topo con tumore presentano un'espressione di IL-4R α maggiore rispetto ai controlli (60% di cellule positive per IL-4R α) (**Figura 6**). In questa analisi sono anche state analizzate le cellule CD11b⁺ isolate immunomagneticamente dall'infiltrato tumorale; in maniera simile agli splenociti una percentuale elevata (65%) di queste cellule risulta positiva per IL-4R α .

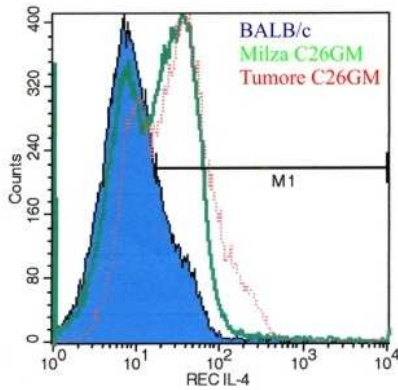


Figura 6

Espressione di IL-4R α su cellule CD11b $^+$.

Cellule CD11b $^+$ isolate dalla milza o dal tumore di topi BALB/c portatori di tumore C26-GM sono state analizzate mediante citofluorimetria a flusso per l'espressione di IL-4R α . Le aree rappresentano il segnale di marcatura di IL-4R α in cellule CD11b $^+$ isolate dalla milza (linea verde) o dal tumore (linea rossa) del topo con tumore, mentre l'area piena rappresenta il segnale di marcatura in splenociti CD11b $^+$ di topo senza tumore. U.A.= unità arbitrarie.

Per valutare il ruolo di questa molecola nella soppressione, splenociti CD11b $^+$ isolati da topi K.O. per IL-4R α sono stati aggiunti, come terza parte, a colture allogene con effettori provenienti da topi BALB/c, allestite come precedentemente riportato, utilizzando come controllo colture allogene prive di CD11b $^+$.

Come si vede in **Figura 4A** l'attività citotossica degli effettori non viene inibita da queste cellule deficitarie di IL-4R α , suggerendo che la presenza della catena IL-4R α sulle CD11b $^+$ sia critica per le loro proprietà soppressive. Avendo escluso il coinvolgimento dell'IL-4, si è quindi ipotizzato che in questo contesto il recettore per IL-4 possa essere attivato da IL-13.

1.3.5 GLI SPLENOCITI CD11b $^+$ IL-4R α $^+$ SONO IN GRADO DI PRODURRE IFN- γ E IL-13

Considerato il ruolo della catena IL-4R α nella soppressione della risposta T alloreattiva mediata dalle MSC, sono state prese in esame le caratteristiche fenotipiche e funzionali degli splenociti CD11b $^+$ IL-4R α $^+$. A questo scopo, dopo sorting immunomagnetico per arricchire la popolazione in CD11b $^+$, mediante tecnica FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) sono state sortate due sottopopolazioni, una positiva (CD11b $^+$ IL-4R α $^+$) e una negativa (CD11b $^+$ IL-4R α $^-$) per IL-4R α .

Le due frazioni sono state sottoposte a due colorazioni (ematossilina-eosina e May-Grünwald-Giemsa). L'analisi citologica mostra una chiara differenza di morfologia nei due sottotipi cellulari: le cellule CD11b $^+$ IL-4R α $^+$ mostrano morfologia monocitaria, mentre le CD11b $^+$ IL-4R α $^-$ sono costituite da granulociti a diversi stadi differenziativi (**Figura 7A**).

Sembra quindi possibile utilizzare un unico marker di superficie per distinguere le due popolazioni, monocitaria e granulocitaria, già evidenziate dallo studio di espressione genica mediante genechip.

Per capire se le differenze morfologiche fossero accompagnate da differenze funzionali mediante marcatura intracellulare è stata analizzata la produzione di IFN- γ e IL-13. Come si nota in **Figura 7B**, solo la frazione CD11b $^+$ IL-4R α $^+$ è in grado di produrre entrambe le citochine.

A confermare il ruolo del recettore le due frazioni $CD11b^+IL-4R\alpha^+$ e $CD11b^+IL-4R\alpha^-$ sono state aggiunte come terza parte in un test MLC e solo la frazione positiva per il recettore era in grado di sopprimere l'attività citotossica dei linfociti T (Figura 7C).

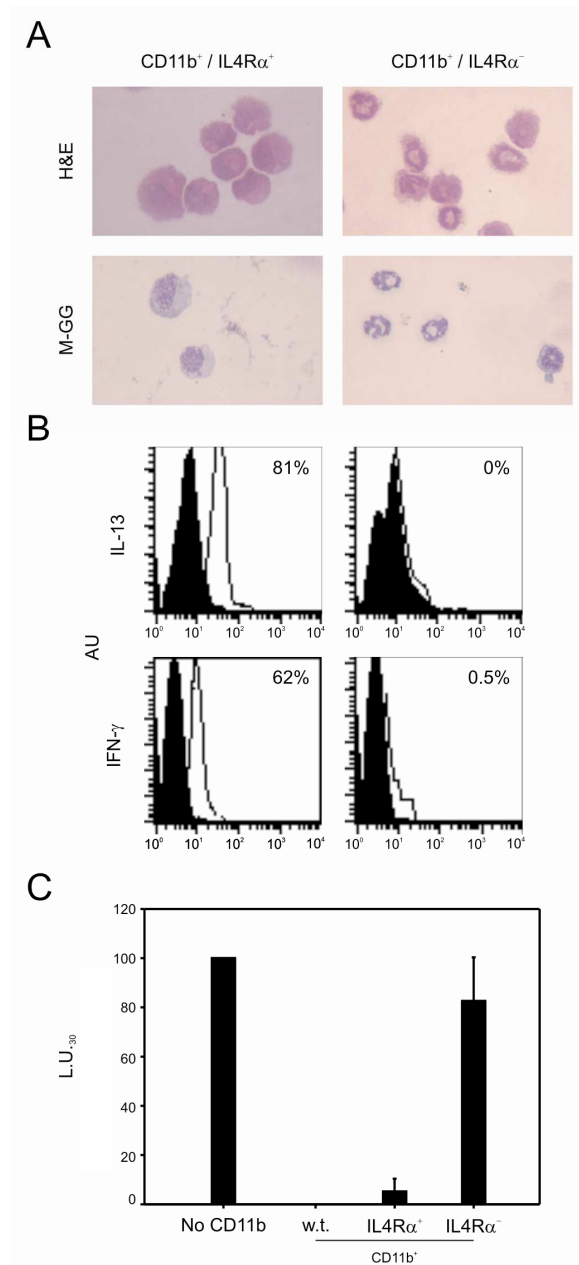


Figura 7
Caratterizzazione morfologica e funzionale di splenociti $CD11b^+IL-4R\alpha^+$ e $CD11b^+IL-4R\alpha^-$ indotti da tumore.

(A) Il doppio sorting per CD11b e successivamente per IL-4R α ha permesso di isolare la popolazione, $CD11b^+IL-4R\alpha^+$ (riquadri di sinistra) e $CD11b^+IL-4R\alpha^-$ (riquadri di destra). Le cellule sono colorate con ematossilina-eosina (H&E, riquadri superiori) e May-Grünwald-Giemsa (M-GG, riquadri inferiori) e fotografate con ingrandimento 40X. (B) Entrambe le popolazioni sono state analizzate per la produzione di IL-13 (riquadri superiori) e IFN- γ

1.3.6 AZIONE DI IL-13 E IFN- γ SU IL-4R α

IL-13 e IFN- γ , sono citochine considerate normalmente antagoniste. Tuttavia sembrano giocare un ruolo importante nel meccanismo soppressorio mediato dalle MSC. Per tanto si è cercato di capire gli effetti di queste molecole sulla soppressione linfocitaria e l'eventuale relazione con la catena IL-4R α , altra molecola che si è dimostrata importante per l'azione delle MSC.

E' stata valutata l'espressione di IL-4R α in splenociti CD11b⁺ indotti da tumore e coltivati *in vitro* per 3 giorni. Durante l'incubazione si è osservata una progressiva riduzione di questo marcatore. La catena del recettore non era rilevabile su cellule CD11b⁺ provenienti da milza di topo sano (Figura 8A).

Abbiamo ipotizzato che la perdita progressiva di IL-4R α fosse la conseguenza del legame IL-13, rilasciata dalle MSC stesse, al proprio recettore. Per questo motivo è stato utilizzato un anticorpo neutralizzante IL-13.

Inoltre, si è deciso di aggiungere IFN- γ alle colture partendo dall'osservazione di Yamamoto e colleghi che questa citochina aumenterebbe la trascrizione dell'mRNA e la sintesi proteica di IL-4R α . Agli splenociti CD11b⁺ in coltura sono stati, quindi, aggiunti sia un anticorpo anti-IL-13, sia IFN- γ , sia la combinazione delle due molecole, valutando l'espressione di IL-4R α ogni 24 ore per tre giorni consecutivi.

I dati sembrano confermare l'ipotesi che il recettore sia downregolato dal legame di IL-13 autocrinamente rilasciata, infatti l'aggiunta dell'anticorpo neutralizzante per IL-13 ha permesso di bloccare il calo di espressione di IL-4R α nei primi due giorni (Figura 8A).

L'aggiunta di IFN- γ ha avuto un effetto analogo all'anticorpo anti-IL-13, mentre l'aggiunta della citochina agli splenociti CD11b⁺ da topo sano non ha modificato la bassa espressione di IL-4R α .

La combinazione di IFN- γ ed anticorpo anti-IL-13 ha evidenziato una stabilizzazione e addirittura un aumento nell'espressione della catena IL-4R α sulle cellule CD11b⁺ indotte da tumore (Figura 8A) indicando che IFN- γ non agisce in maniera indiretta attraverso la soppressione del rilascio di IL-13 da parte delle MSC e, dall'altro, suggerisce che IL-13 possa ostacolare l'attività di promozione dell'espressione di IL-4R α da parte di IFN- γ .

1.3.7 AZIONE DI IL-13 E IFN- γ SUL METABOLISMO DELL'ARGININA NELLE MSC

Si è poi deciso di indagare l'effetto dell'aggiunta delle citochine IL-13 e IFN- γ , da sole o in diverse combinazioni, sull'espressione degli enzimi chiave della soppressione delle MSC, arginasi 1 (ARG1) e ossido nitrico sintetasi inducibile (NOS2). Gli splenociti CD11b⁺ indotti da tumore C26-GM sono stati analizzati a fresco e dopo coltura di 48 ore in terreno completo, con o senza le citochine. Come controllo, sono state analizzate anche cellule CD11b⁺ isolate da milza di topi sani. L'espressione dei due enzimi è stata studiata sia a livello trascrizionale, mediante real-time PCR, che a livello traduzionale, mediante immunoblot.

Gli splenociti CD11b⁺ isolati da topi privi di tumore e quelli isolati da topi con tumore, sia da fresco che dopo coltura di 48 ore senza citochine, non mostrano una significativa espressione di *Arg1* mentre i livelli di *Nos2* erano variabili (Figura 8B).

L'aggiunta della sola citochina IFN- γ provoca la sovraespressione di NOS2, sia a livello di mRNA che di proteina. L'aggiunta della sola IL-13, invece, induce l'espressione preferenziale di ARG1. Quando le due citochine vengono aggiunte in contemporanea o nella sequenza IL-13 seguita 24 ore dopo da IFN- γ , sia i trascritti che le proteine di entrambi gli enzimi risultano sovraespressi (Figura 8C) suggerendo che i segnali indotti da queste citochine, normalmente antagoniste, si integrano in questo particolare tipo cellulare.

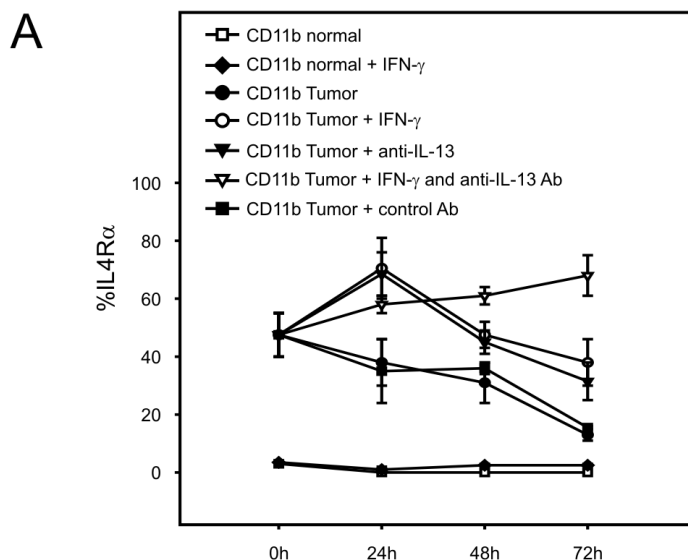
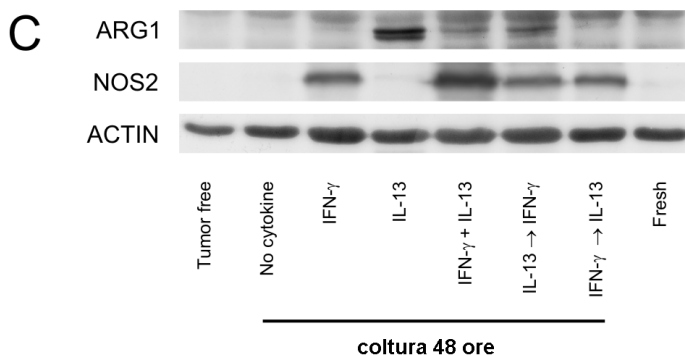
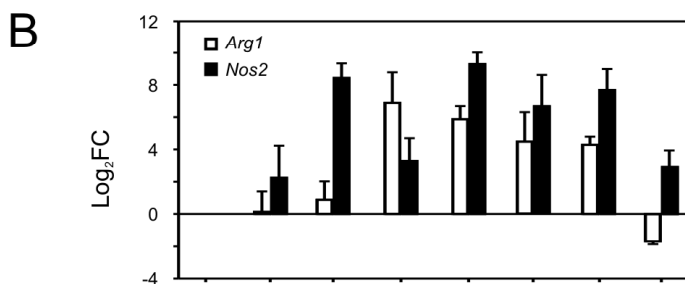


Figura 8
Azione di IL-13 e IFN- γ sul metabolismo dell'arginina nelle MSC.

(A) Cinetica di espressione di IL-4R α sulla superficie di splenociti CD11b⁺ indotti da tumore. Splenociti CD11b⁺ da topi privi di tumore o inoculati con C26-GM sono stati incubati per 72 ore con terreno



1.3.8 LE MSC SONO MONOCITI INFIAMMATORI

Geissmann et al. descrive due sottogruppi di monociti circolanti: quello dei monociti reclutati nei tessuti normali, che differenziano in macrofagi residenti, caratterizzati da fenotipo $CD11b^+/Gr-1^-/CCR2^-/CX3CR1^{hi}$, e quello dei monociti richiamati nei siti infiammatori, che differenziano in cellule dendritiche e macrofagi, caratterizzati invece da fenotipo $CD11b^+/Gr-1^+/CCR2^+/CX3CR1^{lo}$.

Per capire a quale di queste sottopopolazione potesse appartenere la popolazione oggetto di studio abbiamo valutato l'espressione di questi marker sugli splenociti $CD11b^+IL-4R\alpha^+$.

La marcatura ha rivelato che queste cellule sono simili ai monociti "infiammatori", in quanto esprimono in larga parte Gr-1 e CCR2 e solo bassi livelli di CX_3CR1 (Figura 8).

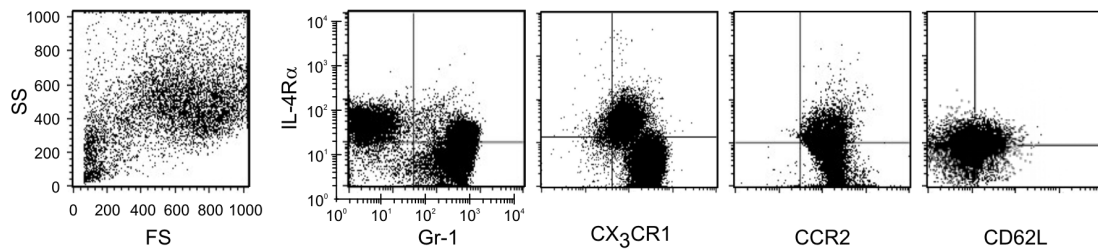


Figura 9

Cellule $CD11b^+$ sortate da splenociti di topi portatori di tumore C26-GM e arricchite mediante sorting magnetico sono state marcate con gli anticorpi indicati. FS= forward

1.4 DISCUSSIONE

Il ruolo delle MSC nell'inibire la risposta immunitaria durante la progressione tumorale, le infezioni croniche ed in risposta a stress immunologici è stato ben documentato (5). Tuttavia, poco si conosce sulla natura di queste cellule e sui meccanismi molecolari impiegati per espletare l'azione soppressoria. Il modello tumorale da noi utilizzato recluta, una popolazione di monociti infiammatori, le MSC, che giocano un ruolo attivo nel favorire la crescita del tumore stesso, confermando così le evidenze che vanno accumulandosi da anni sull'esistenza di un'interazione tra infiammazione e tumore. Infatti, è noto, che patologie infiammatorie croniche sono associate ad una maggiore incidenza di alcuni tumori, e sembra che più del 15% delle neoplasie possa essere attribuito ad infezioni (31).

In questo lavoro l'analisi di espressione genica delle cellule MSC ha indicato l'attivazione di due vie metaboliche, regolate da citochine con azione normalmente antagonista, ovvero citochine di tipo Th1 (IFN- γ) e di tipo Th2 (IL-4 e IL-13). È stata indagata la produzione autocrina di queste citochine, il ruolo che hanno funzionalmente nel regolare l'attività soppressoria delle MSC e le vie molecolari mediante cui possono cooperare.

Dagli esperimenti condotti in questo progetto è emerso che le cellule mieloidi soppressive necessitano di IFN- γ e IL-13, ma non di IL-4. Il primo, prodotto dai linfociti T attivi e dalle cellule stesse, è necessario per stabilizzare la catena del recettore IL-4R α che risulta essere fondamentale per l'attività soppressoria delle cellule CD11b⁺. Il secondo, anch'esso prodotto dalla cellule mieloidi soppressive, agisce cooperativamente con l'IFN- γ inducendo l'espressione concomitante dei principali enzimi coinvolti nel metabolismo della L-arginina, ARG1 e NOS2, che mediano l'inibizione dei linfociti T.

Inoltre è stato possibile individuare un marker funzionale nelle cellule MSCs ovvero la catena α del recettore IL-4R (IL-4R α) di tipo II, comune a IL-4 e IL-13, critico per le proprietà soppressive.

Con questo lavoro proponiamo quindi un modello del meccanismo di soppressione dipendente dalle MSC nel quale nella fase iniziale i linfociti T attivati dall'esposizione all'antigene rilasciano IFN- γ , che con l'ausilio di un non ancora identificato segnale di membrana, attiva i precursori monocitari. Mentre nelle condizioni normali, in assenza di tumore, questo porterebbe all'induzione di macrofagi attivati in maniera classica, i monociti condizionati dai tumori mostrano un diverso programma genetico up-regolando l'espressione di IL-4R α e assumendo la capacità di secernere sia IL-13 e IFN- γ . La produzione di IFN- γ sostenuta inizialmente dai linfociti T attivati viene successivamente amplificata dalle citochine rilasciate dai monociti attivati. L'IFN- γ permette la prolungata espressione

e segnalazione di IL-4R α che successivamente lega IL-13 rilasciata mediante un circuito autocrino. Durante la fase di amplificazione, le citochine sono così in grado di mantenere una attivazione prolungata degli enzimi NOS e ARG, i quali alla fine generano i mediatori immunosoppressivi che agiscono sui linfociti T CD8⁺.

L'IL-4R α permette non solo una distinzione funzionale, ma anche fenotipica in quanto sembra essere prevalentemente espressa da monociti.

Ulteriori indagini su un pannello di marcatori di superficie hanno permesso di includere le MSC nella sottopopolazione dei cosiddetti monociti "infiammatori" circolanti, recentemente descritti nel sangue di topi normali. Inoltre, queste cellule richiedono, per l'attività soppressoria, entrambe le citochine Th1 e Th2, suggerendo un comportamento diverso da quello associato fin'ora ai monociti/macrofagi soppressori indotti dal tumore attivati con la via alternativa.

Il GM-CSF, rilasciato dal modello tumorale utilizzato in questo lavoro, sembra essere uno dei principali mediatori del reclutamento/attivazione delle MSC (43). GM-CSF, analogamente ad altre citochine, possiede una duplice natura come modulatore immunitario. La produzione di GM-CSF da parte di molte linee tumorali umane e murine supporta il suo ruolo come citochina immunosoppressiva (3). Tuttavia, dati sperimentali hanno dimostrato l'efficacia di questa citochina come vaccino contro il cancro (32). Studi recenti indicano che sia la dose, sia la tempistica nella produzione sono critici per regolare il bilanciamento tra attività adiuvante e soppressione immunitaria. Alte dosi di GM-CSF alterano lo sviluppo di una efficace risposta immunitaria anti-tumorale attraverso l'induzione di cellule CD11b⁺ (33).

Il numero di cellule CD11b⁺/IL-4R α ⁺ nel topo normale non portatore di tumore è normalmente basso. Queste cellule possono rispondere a stimolo esogeno di IL-13 ed acquisire attività soppressoria senza per questo espandere il loro pool cellulare. Le MSC potrebbero rientrare in un circuito che influenza negativamente l'immunità anti-tumorale e che potrebbe coinvolgere le cellule NKT. In un modello di fibrosarcoma che cresce spontaneamente, regredisce e poi ricorre, Berzofsky e i suoi collaboratori hanno dimostrato che le cellule NKT, attivate dal tumore, rilasciando IL-13 inducono, tramite la via di traduzione del segnale IL-4R α -STAT6, le cellule CD11b⁺/Gr-1⁺ a rilasciare TGF- β e sopprimere così i CTL tumore specifici (34). In questo modello, la ricorrenza tumorale è prevenuta dalla deplezione di cellule NKT CD4⁺ e dalla somministrazione in vivo un anticorpo anti-Gr-1⁺. Questa via è attivata molto precocemente dopo l'impianto del tumore nei topi normali e suggerisce che le poche cellule IL-4R α ⁺ presenti nello stato inattivo per essere attivate richiedono IL-13 esogena. Al momento, non è chiaro, se altri fattori rilasciati dal tumore possano indurre queste cellule e renderle più responsive all'IL-13.

Il lavoro qui presentato, conferma il ruolo dell'IL-13 nella regolazione negativa dell'immunosorveglianza aprendo nuovi scenari in ambito terapeutico. In presenza di malattia

avanzata e/o in differenti tipi di tumore l'interferenza con la via di segnalazione dell'IL-13 potrebbe però non essere sufficientemente. L'inibizione combinata delle due citochine IFN- γ e IL-13. Il blocco di entrambe potrebbe avere un effetto additivo/sinergico che merita di essere esplorato terapeuticamente. La validità di una inibizione combinata è inoltre ulteriormente rafforzata dalle recenti dimostrazioni che solamente i farmaci che influenzino sia ARG e NOS in vivo potrebbero aumentare l'attività antitumorale di vaccini ricombinanti contro il cancro nei modelli tumorali murini e recuperare le disfunzioni dei linfociti T infiltranti il tumore nel cancro prostatico umano (dati non pubblicati).

Il danno tissutale ripetuto e la rigenerazione, eventi tipici dell'infiammazione cronica, comportano quindi una proliferazione cellulare intensa in un microambiente ricco di cellule infiammatorie, fattori di crescita, stroma attivato e agenti che promuovono danni al DNA. La presenza di fattori che favoriscono sia "l'iniziazione", cioè l'alterazione genetica irreversibile delle cellule, che la "promozione", ovvero la proliferazione cellulare, aumenta sicuramente il rischio di sviluppo tumorale. Cellule mieloidi infiltranti il tumore possono anche creare un ambiente favorevole sostenendo il processo di angiogenesi e, quindi, le capacità invasive e la metastatizzazione delle cellule neoplastiche. Per tanto la possibilità di modulare l'azione inibitoria di queste cellule è importante nei casi dove sia cruciale l'induzione di una risposta immunitaria efficiente come, ad esempio, nella vaccinazione antitumorale.

1.5 BIBLIOGRAFIA

1. Challis GB and Stam HJ. The spontaneous regression of cancer. A review of cases from 1900 to 1987. *Acta Oncol* 1990, 29:545-550
2. Bronte V, Wang M, Overwijk WW, Surman DR, Pericle F, Rosenberg SA, Restifo NP. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J. Immunol.* 1998;161:5313–5320
3. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, Restifo NP. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J. Immunol.* 1999;162:5728–5737
4. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J. Immunol.* 2004;172:989–999
5. Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, Zanovello P. Identification of a CD11b+/Gr-1+/CD31+ myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8+ T cells. *Blood.* 2000;96:3838–3846
6. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian LM, Carbone DP, Lin PC. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 2004;6:409–421
7. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J. Immunol.* 2005;174:4880–4891
8. Young MR, Wright MA, Matthews JP, Malik I, Prechel M. Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide. *J. Immunol.* 1996;156:1916–1922
9. Serafini P, De Santo C, Marigo I, Cingarlini S, Dolcetti L, Gallina G, Zanovello P, Bronte V. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2003;53:64–72
10. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4:941–952
11. Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, Jove R, Gabrilovich D. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J. Immunol.* 2004;172:464–474

12. Salvadori S, Martinelli G, Zier K. Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity. *J. Immunol.* 2000;164:2214–2220
13. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J. Immunol.* 2005;174:636–645
14. Takeda K, Hatakeyama K, Tsuchiya Y, Rikiishi H, Kumagai K. A correlation between GM-CSF gene expression and metastases in murine tumors. *Int. J. Cancer.* 1991;47:413–420
15. Young MR, Garrity T, Pandit R, Wright MA, Benefield J, Keni S. Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells. *Int. J. Cancer.* 1997;74:69–74
16. Pak AS, Wright MA, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34+ cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin. Cancer Res.* 1995;1:95–103
17. Mach N and Dranoff G. Cytokine-secreting tumor cell vaccines *Curr Opin Immunol* 2000;12:571-575.
18. Ageitos AG, Ino K, Ozerol I, Tarantolo S, Heimann DG and Talmadge JE. Restoration of T and NK cell function in GM-CSF mobilized stem cell products from breast cancer patients by monocyte depletion. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20:117-123
19. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:641–654.
20. Barbul. Arginine and immune function. *Nutrition* 2000; 6(1): 53-8; discussion 59-62
21. Rodriguez Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor EM, Antonia S, Ochoa JB, Ochoa AC. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 2004;64(16): 5839-49
22. Chang C, Liao JC, Kuo L. Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res* 2001;61(3): 1100-6
23. Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, Bianchi M, Ulrich P, Cerami A, Sherry B, Tracey KJ. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* 1997;185(10): 1759-68

24. Davel LE, Jasnis MA, de la Torre E, Gotoh T, Diamant M, Magenta G, Sacerdote de Lustig E, Sales ME. Arginine metabolic pathways involved in the modulation of tumor-induced angiogenesis by macrophages. *FEBS Lett* 2002;532(1-2): 216-20
25. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, Zanovello P, Segal DM. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2002;168:689–695
26. Pericle F, Kirken RA. Immunocompromised tumor-bearing mice show a selective loss of STAT5a/b expression in T and B lymphocytes. *J Immunol* 1997;159(6): 2580-5
27. Mannick J, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS. Fas-induced caspase denitrosylation." *Science* 1999;284(5414):651-4
28. Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells." *J Immunol* 1999;163(7): 3771-7
29. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:23–35
30. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23:549–555
31. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005;7:211–21
32. Mach N, Dranoff G. Cytokine-secreting tumor cell vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 2000;12:571–575
33. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 2004;64:6337–6343
34. Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE, Berzofsky JA. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 2003;198(11): 1741-52

**2 CAPITOLO SECONDO - CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E
MOLECOLARE DI TUMORI STROMALI GASTROINTESTINALI (GIST)
SINCRONI IN POPOLAZIONE ADULTA NON SINDROMICA**

ABSTRACT

Purpose Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are commonly regarded as solitary tumors, and the occurrence of multiple lesions is considered an extraordinary event restricted to pediatric GISTs and rare hereditary conditions. Beyond these well-defined situations, the presentation of multiple synchronous lesions is commonly viewed as the result of the metastatic spreading of a single primitive GIST. Based on this axiom, patients with multifocal disease are by default classified as advanced stage and treated as such. Whether, indeed, the detection of several lesions in sporadic adult GIST patients may be suggestive of phenomena of tumor multiplicity still needs to be clarified.

Experimental design From a multicentric series of 442 consecutive cases, 79 of which diagnosed with advanced disease, we selected 5 patients who presented up to 4 distinct GIST nodules. Five additional cases with similar characteristics were retrieved by collaborators. Clonal relationships of the synchronous lesions was assessed by comparing c-KIT/PDGFR α mutation and microsatellite pattern.

Results An independent origin of the synchronous lesions was assessed in 6 out of the 10 cases analyzed. Interestingly, in one patient one of the lesions stemmed from the peritoneum, ordinarily regarded as a site of metastasis.

Conclusions Our data indicate that a significant fraction of GIST patients with multifocal manifestations are actually affected by multiple primary GISTs, suggesting that mesenchymal cells of these subjects are somehow primed to transformation. Thus, in the presence of multifocal GIST manifestations, an accurate characterization of the different tumor localizations should be taken into account for a proper patient staging and planning of the therapy.

RIASSUNTO

Obiettivo Il riscontro di GIST multipli è un fenomeno raro e limitato a determinate forme sindromiche. Al di là di queste entità clinicamente diagnosticabili, l'evidenza di diverse noduli neoplastici è tradizionalmente interpretata come indicativa di diffusione metastatica di una lesione primaria. I pazienti pertanto che presentano una malattia multifocale vengono classificati come fase avanzata e trattati come tali.

Disegno Sperimentale Da una serie consecutiva di 442 casi, 79 pazienti presentavano alla diagnosi una patologia multifocale. Di questi sono stati selezionati i pazienti che presentavano da 2 a 4 lesioni. Ulteriori cinque casi, che rispondevano a questi criteri, sono stati inviati all'ospedale di Treviso da due istituti stranieri. È stata eseguita l'analisi molecolare dei geni KIT e PDGFRA e l'analisi dei microsatelliti.

Risultati 6 casi su 10 hanno evidenziato un pattern molecolare e microsatellitare differente riconducibile ad una origine clonale indipendente.

Conclusioni I nostri dati indicano che una parte significativa di pazienti che manifestano una patologia GIST multifocale in realtà sono affetti da GIST multipli. Pertanto, al fine di una corretta stadiazione e terapia, in presenza di malattia multifocale si rende necessaria la caratterizzazione molecolare per ciascuna delle lesioni.

2.1 INTRODUZIONE

2.1.1 TUMORI STROMALI GASTROINTESTINALI

I tumori stromali gastrointestinali (GIST) costituiscono le più frequenti neoplasie di natura mesenchimale del tratto gastroenterico (1). L'inquadramento anatomoclinico di tali neoplasie è stato per diversi anni confuso e limitato. In passato si pensava che la maggior parte delle neoplasie mesenchimali del tratto digerente avesse origine dalle cellule muscolari lisce (2). Successivamente risultò che solo una minima parte di questi tumori gastrointestinali presentavano caratteristiche strutturali e citologiche riconducibili alle cellule della muscolatura liscia.

Stout e collaboratori (1941) furono i primi a descrivere accuratamente le neoplasie mesenchimali nel tratto gastrointestinale. In base alle loro osservazioni e nella convinzione che la neoplasia derivasse da un precursore delle cellule muscolari lisce, fu introdotto il termine di "leiomioblastomi"(3). Questa definizione però, poco indicativa circa il comportamento biologico di questi tumori, fu modificata in "leiomiomi epitelioidi" e "leiomiosarcomi epitelioidi" (4). Per circa due decenni sono stati considerati come tumori aventi origine dal tessuto muscolare, fino a quando nel 1983 Mazur e Clark, grazie a studi di microscopia elettronica e immunistochemica, dimostrarono l'assenza di marcatori muscolari e postularono una linea differenziativa delle cellule mesenchimali immature (5). Per descrivere l'origine di queste neoplasie fu introdotto il termine "tumore stromale" che successivamente fu ulteriormente modificato in "tumore stromale gastrointestinale" (GIST) per distinguerle da tumori stromali con insorgenza in altre sedi anatomiche, come l'utero e mammella.

La mancanza di informazioni relative all'origine e alla differenziazione e la resistenza alla chemioterapia convenzionale ha limitato nel tempo i progressi in campo terapeutico. Solo recentemente si è riusciti a definire una possibile linea differenziativa, ad individuare un marker fenotipico, nonché a delucidare il principale meccanismo oncogenetico identificando il ruolo di mutazioni caratterizzanti la neoplasia (6).

2.1.2 CARATTERISTICHE CLINICHE E PATOLOGICHE

Benché i GIST siano inclusi tra i tumori cosiddetti rari, la loro incidenza è forse superiore a quanto si pensasse e potrebbe arrivare a un nuovo caso ogni 100.000 adulti per anno: un tasso simile a quella della leucemia mieloide cronica (7).

I tumori stromali gastrointestinali insorgono con frequenza simile in pazienti di sesso maschile e femminile con una vasta distribuzione di età, tuttavia circa il 75% dei casi vengono diagnosticati in adulti con un'età compresa tra i 50 e 60 anni (9).

I GIST possono insorgere in varie porzioni del tratto gastroenterico, più frequentemente nello stomaco (50%) e nel piccolo intestino (25%) (10,11,12). Un 10% può manifestarsi nel colon e nel retto, mentre un altro 10% può svilupparsi nel mesentere, omento, retroperitoneo e pelvi. Solo un 5% è stato associato all'esofago (13,14).

A causa della storia naturale di questi tumori, che tendono a formare voluminose masse addominali, spesso asintomatiche, nella parete del tratto gastroenterico con sviluppo estrinseco e interessamento delle sierose e delle strutture contigue (**Figura 10** e **Figura 11**), la diagnosi di GIST raramente viene posta in uno stadio precoce di malattia.

La diagnosi di molti GIST avviene infatti perché si riscontra, alla vista o alla palpazione, una massa addominale anomala, che può essere anche rilevata da esami diagnostici eseguiti per altri motivi. Se la massa addominale è voluminosa, può dare luogo a sintomi addominali, quali sazietà precoce, distensione addominale o dolori, a volte vaghi, altre volte collegati alla compressione degli organi vicini. In alcuni casi i GIST vengono diagnosticati in maniera del tutto imprevista in seguito alla comparsa di sintomi aspecifici come dolori addominali, sanguinamento gastrointestinale e astenia legata all'anemia o per sanguinamento dalla bocca, dal retto o dal peritoneo. In questi casi, si può sviluppare un quadro acuto che richiede un intervento di urgenza (15).

La neoplasia primitiva si presenta generalmente come un unico nodulo carnoso di consistenza solida con possibile degenerazione cistica centrale (**Figura 12**). Le dimensioni possono variare notevolmente, dai 10 mm, nei casi riscontrati durante accertamenti per altre patologie, fino a masse con diametro di 350 mm (15).

Come strumenti per la diagnosi l'endoscopia può rivelarsi inutile o di valore limitato in quanto nei GIST gastrici e in quelli più rari, esofagei e colon rettali, la neoplasia può manifestarsi come una lesione parietale superficiale. Le masse addominali nel tubo gastroenterico possono essere evidenziate con la tomografia assiale computerizzata (TC), la risonanza magnetica nucleare (RMN) e con la tomografia ad emissione di positroni (PET). La TC e la RMN possono inoltre valutare l'eventuale estensione della malattia al peritoneo e/o al fegato, sedi principali di diffusione nello stadio avanzato (15).

I tumori stromali gastrointestinali presentano un immunofenotipo simile a quello delle cellule interstiziali di Cajal (ICC) che fungono da cellule pacemaker intestinali (16). Di fatto, il sistema delle cellule interstiziali di Cajal è interposto tra la muscolatura liscia e le strutture nervose del sistema autonomo (plessi mioenterici di Auerbach) ed è coinvolto nella regolazione della motilità gastrointestinale.

Recentemente è stato ipotizzato che i GIST derivino dalla differenziazione delle cellule interstiziali di Cajal o da cellule con le quali condividono un precursore (17, 18).

Le cellule neoplastiche possono presentare morfologia epitelioide, a cellule fusate o di tipo misto. Le cellule fusate di solito si dispongono in corti fasci o spirali, mentre le lesioni epitelioidi mostrano spesso una architettura a nidi. Alcune lesioni sono associate ad un prominente stroma mixoide, deposizione di collagene, e/o emorragie interstiziali. I nuclei sono uniformi, ovoidali o rotondi, con cromatina vescicolare. Una minoranza dei tumori presenta invece un considerevole pleomorfismo cellulare (19).

Il quadro istologico è sostanzialmente vario e necessita di una diagnosi differenziale con tecniche di immunistochemica. La positività per KIT, proteina codificata da gene KIT, è tipica dei tumori GIST (95%) e sebbene non sia un marcatore specifico risulta essere comunque altamente sensibile (20). Queste neoplasie possono essere inoltre positive per CD34 (60-70%), ACAT2 (astina della muscolatura liscia 30-40%), S100 (5%), DES (desmina, 1-2%) e cheratina (1-2%).

Recentemente, è stato proposto il marcatore DOG1. Questa proteina, la cui funzione è sconosciuta, sembra essere fortemente espressa sulle superficie delle cellule di GIST e raramente espresso in altri tumori dei tessuti molli. La positività a DOG1 può essere di aiuto nella diagnosi di GIST qualora KIT non sia espresso (20). E' attualmente in corso presso il nostro dipartimento uno studio retrospettivo multicentrico di validazione di un anticorpo monoclonale anti-DOG1.

Il 5% dei tumori diagnosticati come GIST risultano negativi per il marcatore KIT, tuttavia l'analisi molecolare mediante sequenziamento diretto può portare alla luce la mutazione nel gene KIT o PDGFRA.

Il numero di mitosi e dimensioni della neoplasia sono stati utilizzati per molto tempo come fattori di prognosi (18). Tuttavia il sistema di valutazione di rischio è stato recentemente rivisto e comprende il sito anatomico d'insorgenza. Tumori stromali gastrointestinali a livello del piccolo intestino con dimensioni e attività mitotica simile a tumori stromali gastrici presentano un rischio più alto nella progressione della neoplasia (21). In Tabella 2 sono riportati i criteri attualmente utilizzati.

Tabella 2: Rischio progressione malattia nei tumori stromali gastrointestinali.

	<i>Dimensioni (cm)</i>	Rischio progressione malattia¹			
		<i>Stomaco</i>	<i>Duodeno</i>	<i>Ileo</i>	<i>Retto</i>
Indice mitotico ≤5/50hpf ²	≤2	0%	0%	0%	0%
	2-5	1.9%	4.3%	8.3%	8.5%
	5-10	3.6%	24%	-	-
	>10	10%	52%	34%	57%
Indice mitotico >5/50hpf	≤2	-	-	-	54%
	2-5	16%	73%	50%	52%
	5-10	55%	85%	-	-
	>10	86%	90%	86%	71%

¹ definito come metastasi o morte dovuta al tumore. Dati raccolti in uno studio di follow-up di 1055 pazienti con GIST gastrico, 629 del piccolo intestino, 144 del duodeno e 111 con tumore al retto. I dati relativi ai tumori GIST esofagei e in sedi extragastrointestinali erano limitati pertanto non sono stati riportati in tabella. ²hpf=high-power field. (Rubin B.P, Heinrich M.C., Corless C. L. Gastrointestinal stromal tumour (2007) The Lancet 369:1731-1741)



Figura 10
Esempio di GIST del piccolo intestino del diametro di 5 cm, a prevalente crescita esofitica estraparietale.

Figura 11
Esempio di GIST della parete del piccolo intestino con pattern di crescita a clessidra che si estende alle tonache sottomucosa, muscolare e sottosierosa.

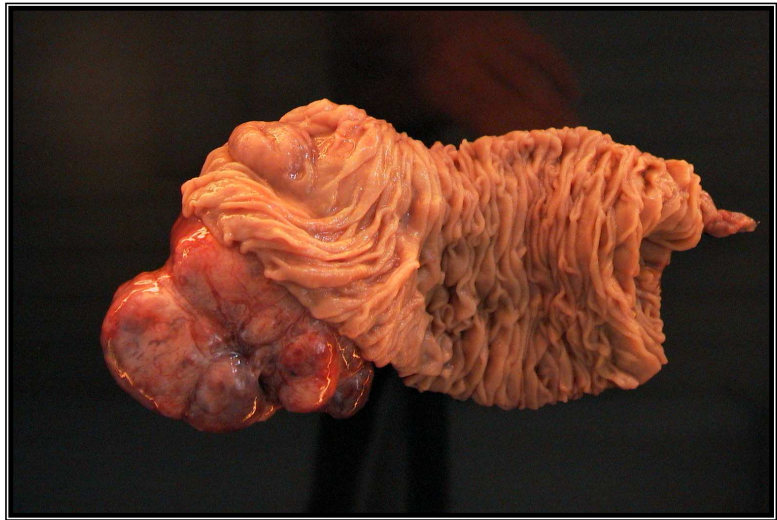


Figura 12
Superficie di sezione del GIST rappresentato in Figura A con aspetto carnoso e presenza di aree cistico-emorragiche.

2.1.3 PATOGENESI GIST: MUTAZIONI DI KIT E PDGFRA

KIT, denominato anche CD117, è un recettore proteico transmembrana appartenente alla famiglia delle tirosinchinasi di tipo III ed è coinvolto nello sviluppo e mantenimento di eritrociti, mast cellule, melanociti, cellule della linea germinale e nella differenziazione delle cellule interstiziali di Cajal (22,23,24). KIT è una proteina transmembrana costituita da due domini: un dominio extracellulare dedicato al legame con il ligando e un dominio intracellulare con attività chinasi. Il ligando specifico per questo recettore è conosciuto con il nome di Stem-cell-factor (SCF) (25).

Un altro gene strutturalmente e funzionalmente simile a KIT è il PDGFRA (plated-derived-growthfactor α). Entrambi i geni sono localizzati nel cromosoma 4 a livello del braccio q12 e sembrano derivare dalla duplicazione di un gene ancestrale (26). I prodotti proteici codificati hanno un alto grado di omologia tra loro e rientrano nella famiglia dei recettori tirosinchinasi di tipo III (27).

In condizioni normali il legame con il ligando provoca la dimerizzazione del recettore con conseguente autofosforilazione dei domini catalitici. In questa fase si ha il trasferimento di un gruppo fosfato da una molecola di ATP al gruppo ossidrilico laterale di un residuo di tirosina nella porzione carbossi-terminale del recettore, con conseguente attivazione della cascata di segnale e fosforilazione di altre chinasi coinvolte nella proliferazione e apoptosi (28).

Studi condotti su estratti di tumori GIST con mutazioni nei geni KIT e PDGFRA hanno evidenziato un'intensa attività di fosforilazione delle chinasi MAPK3/1, AKT, RPS6KB1 (chinasi p70 S6) e molecole STAT1 e STAT3 (**Figura 13**) (29).

Per contro le chinasi di stress MAP2K4 e STAT5, la cui funzione è quella di inibire l'attività di KIT sembrano non essere attive. Studi con inibitori specifici delle proteine a valle di KIT quali, MAP2K1 (MEK1), MAP2K2 (MEK2), chinasi PI3 e FRAP1 (mTOR) hanno evidenziato come PI3 e FRAP1 siano importanti nella tumorigenesi mediata da KIT nei tumori stromali gastrointestinali (30). Trials clinici sono tutt'ora in corso al fine di utilizzare inibitori di FRAP1 nel trattamento di GIST resistenti al trattamento farmacologico con Imatinib (30).

Tumori con mutazioni di KIT nell'esone 9 mostrano una fosforilazione di AKT sostanzialmente differente da tumori con alterazioni nell'esone 11, confermando la differenza biologica tra sottotipi di tumore. Esperimenti hanno dimostrato che isoforme mutate di KIT sono instabili e per evitare la rapida degradazione si associano con proteine dello shock termico (HSP90). Inibitori della proteina HSP90 (IPI-504) sono in fase di studio in trial di fase 1 (31).

Mutazioni a carico del gene KIT o PDGFRA sono state individuate in più dell'80% dei casi di GIST e giocano un ruolo centrale nella patogenesi di questi tumori. Nei GIST sporadici le mutazioni sono somatiche e presenti esclusivamente nel tessuto tumorale.

Le mutazioni nel gene KIT o PDGFRA sono eventi precoci nella patogenesi dei GIST comportano in genere l'attivazione costitutiva ligando-indipendente del recettore tirosinico con conseguente aumento della proliferazione cellulare e diminuzione dell'apoptosi (32, 33).

L'analisi citogenetica di queste neoplasie ha evidenziato alterazioni cromosomiche che si verificano con la progressione tumorale. La perdita del braccio lungo q del cromosoma 14, seguita dal 22q, 1p, 9p o 11p sono le più comuni alterazioni citogenetiche osservate (29, 35, 36, 36). Studi sulla perdita di eterozigotà indicano che ci sono almeno due regioni sul cromosoma 14 (14q11.2-q12 e 14q22-24) e almeno tre regioni sul braccio lungo del cromosoma 22 (22q11.21-22, e 22q12.3 22q13) che vengono perse.

La perdita della porzione 9p è associata ad un comportamento aggressivo della neoplasia e appare correlato alla perdita del gene soppressore p16Ink4a che codifica per una proteina regolatrice del ciclo cellulare (36).

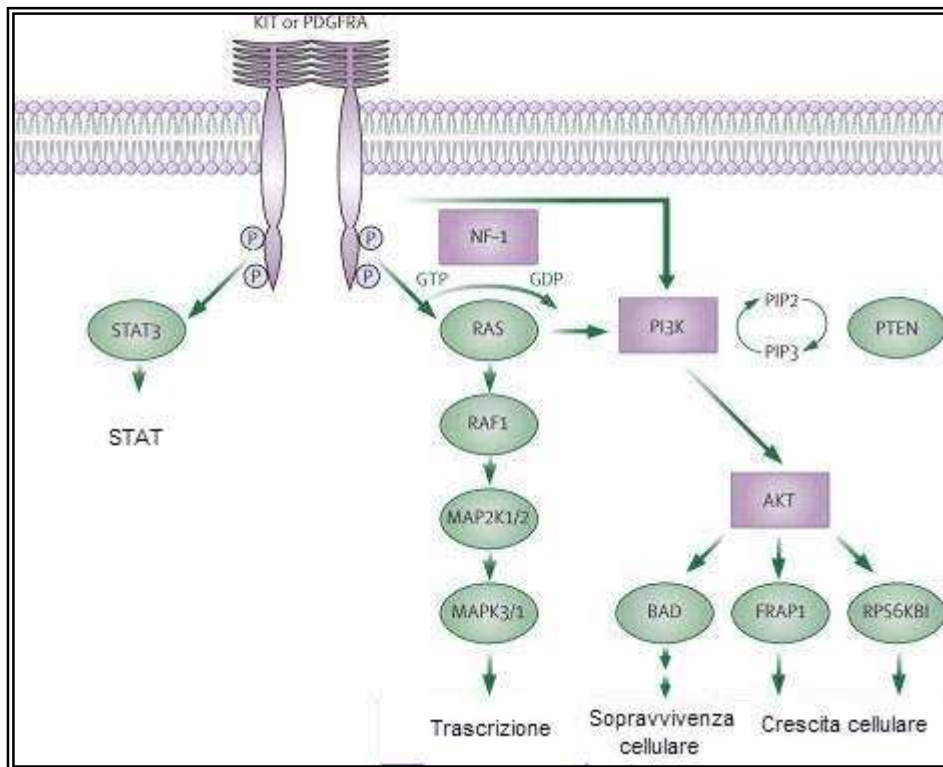


Figura 13: Via di segnale del recettore KIT e PDGFRA

In questo diagramma sono riportate le principali vie di segnale coinvolte nei tumori stromali gastrointestinali. Il segnale mediato dai recettori KIT e PDGFRA comporta inibizione dell'apoptosi e attivazione della proliferazione cellulare. PI3K e STAT3 sono considerati i principali target dell'attivazione di KIT e PDGFRA nella patogenesi dei GIST. AKT=v-akt murine thymoma viral oncogene homolog. BAD=BCL2 antagonist of cell death. FRAP1=FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 (mTOR). GDP=guanosine diphosphate. GTP= guanosine triphosphate. MAP2K1=mitogen.activated protein kinase 1(MEK1). MAP2K2= mitogen.activated protein kinase 2(MEK2). NF1=neurofibromin 1. PI3K phosphoinositide-3-kinase. PIP2=phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. PIP3= phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. PTEN= phosphatase and tensin homolog. NRAS=neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog. RAF1=v-RAF-1 murine leukaemia viral oncogene homolog. RPS6KB1=ribosomal protein S6 kinase, 70 kD. STAT3=signal transducer and activator of transcription 3. STAT5=signal transducer and activator of transcription 5.

Figura tratta e modificata da: Rubin B.P, Heinrich M.C., Corless C. L. Gastrointestinal stromal tumour (2007) The Lancet 369:1731-1741

2.1.3.1 MUTAZIONI KIT

L'80% dei tumori stromali gastrointestinali è caratterizzato da mutazioni di KIT. Questo gene è costituito da 21 esoni ma le mutazioni fin'ora riportate nei GIST sporadici coinvolgono, con frequenza diversa, i seguenti 4 esoni: 11, 9, 13 e 17 (7, 37, 38, 39).

La maggior parte delle mutazioni si osservano nell' esone 11 che codifica per il dominio intracellulare juxtamembrana la cui funzione è di inibire, in assenza di ligando, l'attività del recettore (40). Il 70% delle mutazioni descritte in questo esone consistono in delezioni in-frame di 1 o più codoni e

interessano principalmente la regione 5' dell'esone e la regione nucleotidica compresa tra i codoni codificanti gli aminoacidi Gln⁵⁵⁰ e Glu⁵⁶¹ (6, 33, 40, 41). Il restante 30% consiste in mutazioni puntiformi missenso e riguarda esclusivamente i codoni Trp⁵⁵⁷, Val⁵⁵⁹, e Val⁵⁶⁰ e Leu⁵⁷⁶ (7, 38). Infine, con una frequenza relativamente rara si possono verificare, nella parte distale dell'esone, duplicazioni in tandem da 1 fino a 20 aa. Mutazioni missenso sembrano correlate ad una prognosi migliore rispetto a delezioni.

L'esone 9 codifica per il dominio extracellulare transmembrana. Le mutazioni, seconde per frequenza, sono omogenee e consistono in una duplicazione di 6 nucleotidi codificanti gli aminoacidi Ala⁵⁰²-Tyr⁵⁰³ (43) e più raramente nella duplicazione di 9 nucleotidi codificanti gli aminoacidi Phe⁵⁰⁶-Ala⁵⁰⁷-Phe⁵⁰⁸ (42). E' interessante notare che mutazioni dell'esone 9 sono state riscontrate esclusivamente nel piccolo intestino e nella porzione destra del colon e sono associate generalmente a neoplasie ad alto rischio o ad alto grado di malignità (33,44,45,46). Gli esoni 13 e 17 codificanti rispettivamente il I e II dominio catalitico presentano mutazioni con una frequenza bassa (<1-2%). Le mutazioni fin'ora descritte comportano la sostituzione dell'acido glutammico in posizione 642 con l'amminoacido lisina (K642E) nell'esone 13 (37,42) e la sostituzione, con aminoacidi diversi, dell'acido aspartico in posizione 820 e dell'asparagina in posizione 822 nell'esone 17.

2.1.3.2 MUTAZIONI PDGFRA

Il 35% dei GIST negativi per mutazioni nel gene KIT presentano alterazioni nel gene PDGFRA. Le regioni maggiormente coinvolte, in ordine di frequenza, sono gli esoni 18, 12 e 14 (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**). GIST con mutazioni in questo gene prediligono la sede gastrica con morfologia epitelioide. La sostituzione D842V, che si verifica nell'esone 18, è la più comune mutazione nel gene PDGFRA ed è stata descritta esclusivamente in pazienti con GIST allo stomaco e omento. Questa mutazione, pur essendo stata associata a forme tumorali, meno aggressive comporta resistenza al trattamento farmacologico (47).

Mutazioni di PDGFRA sono state descritte anche in altre sedi, in particolare nel duodeno (34). La frequenza di alterazioni nell'esone 12 è molto bassa. E' stata descritta una sostituzione V561D come pure delezioni e inserzioni all'altezza dello stesso codone.

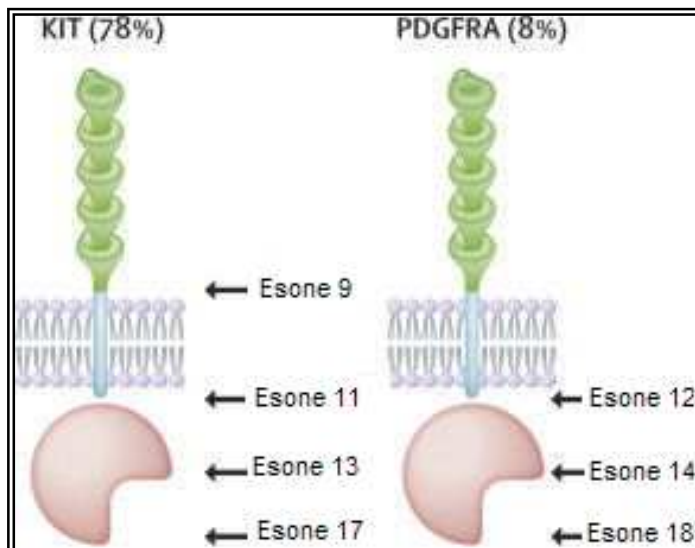


Figura 14
Localizzazione mutazioni geni KIT e PDGFRA
 Dati relativi ad uno studio di 1059 GIST sequenziati consecutivamente.

Figura tratta e modificata da: Rubin B.P, Heinrich M.C., Corless C. L. Gastrointestinal stromal tumour (2007) The Lancet 369:1731-1741

2.1.4 GIST SINCRONI E MULTIPLI

Circa l'80% dei pazienti con tumore GIST presentano alla diagnosi un' unica lesione localizzata. Nel restante 20% il tumore si presenta come una malattia diffusa con metastasi che possono localizzarsi nel fegato e/o nell'addome sottoforma di noduli. Meno frequente è l'interessamento linfonodale, polmonare e in sedi extra-addominali (15).

I GIST sono considerati neoplasie singole che in stadio avanzato possono metastatizzare. La presenza di lesioni sincrone è considerata un evento raro descritto esclusivamente in alcune forme di GIST pediatriche e sindromi ereditarie specifiche (48,49,50,51,52). Nelle forme di GIST familiari sono state individuate mutazioni germinali dell'esone 8, 11, 13 e 17 del gene KIT e esone 12 del gene PDGFRA. I pazienti con tali mutazioni sviluppano GIST multipli a livello dello stomaco e piccolo intestino. I casi finora riportati sono circa una dozzina in tutto il mondo. GIST multipli sono inoltre stati descritti in pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 (53,54) e da Triade di Carney (55). Tuttavia, queste patologie presentano peculiari caratteristiche clinico-patologiche che ne determinano una precisa diagnosi. Infatti GIST pediatriche multifocali presentano una localizzazione gastrica, mentre GIST in pazienti affetti da neurofibromatosi di tipo 1 sono accompagnati da sintomi specifici, quali neurofibromi cutanei, macchie caffelatte, disturbi neurologici e presenza di altre neoplasie nel sistema nervoso o tratto gastrointestinale. Nei GIST associati alla Triade di Carney i pazienti sviluppano paraganglioma o condrioma polmonare. Inoltre esclusi i GIST familiari mutazioni dei geni KIT e PDGFRA non sono state mai descritte in queste patologie.

Fatta eccezione dei casi visti sopra, la presenza di lesioni sincrone in pazienti adulti con GIST, a prescindere dal sito e dalle dimensioni dei noduli, è generalmente considerata come indice di

diffusione metastatica. Allo stesso modo, lo sviluppo di una lesione secondaria, dopo un apparente remissione è stata finora considerata indicativa di recidiva del tumore.

Questo paradigma è stato recentemente messo in discussione in seguito alla pubblicazione di due lavori distinti che riportavano alcuni casi di GIST sporadici con lesioni multiple che presentavano caratteristiche patologiche e molecolari differenti.

L'esistenza di lesioni di GIST multipli sincroni pone evidenti problemi nella diagnosi differenziale e conseguente trattamento dei pazienti.

2.1.5 STRATEGIE TERAPEUTICHE

In passato, la resezione chirurgica era l'unico trattamento disponibile nella cura dei tumori GIST, fossero essi localizzati o metastatici. Ad oggi la chirurgia rimane il trattamento principale nei casi di GIST a malattia localizzata mentre l'approccio alla malattia avanzata (inoperabile, disseminata o metastatica) è stato rivoluzionato dall'introduzione di un farmaco, l'imatinib mesilato (). Questo risultato è particolarmente importante in quanto, prima dell'introduzione di questo farmaco, i GIST non rispondevano alla chemioterapia standard e l'unico trattamento terapeutico consisteva appunto nell'intervento chirurgico (56).

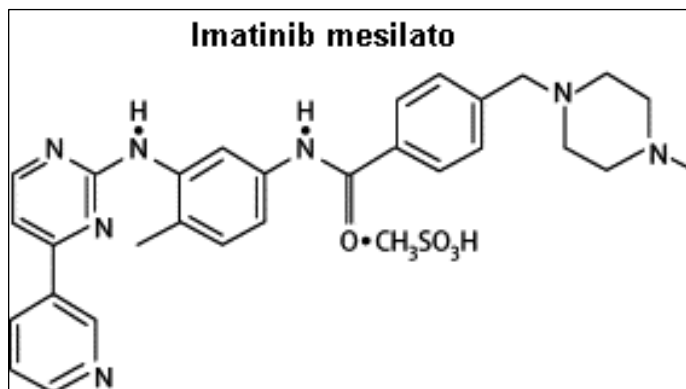
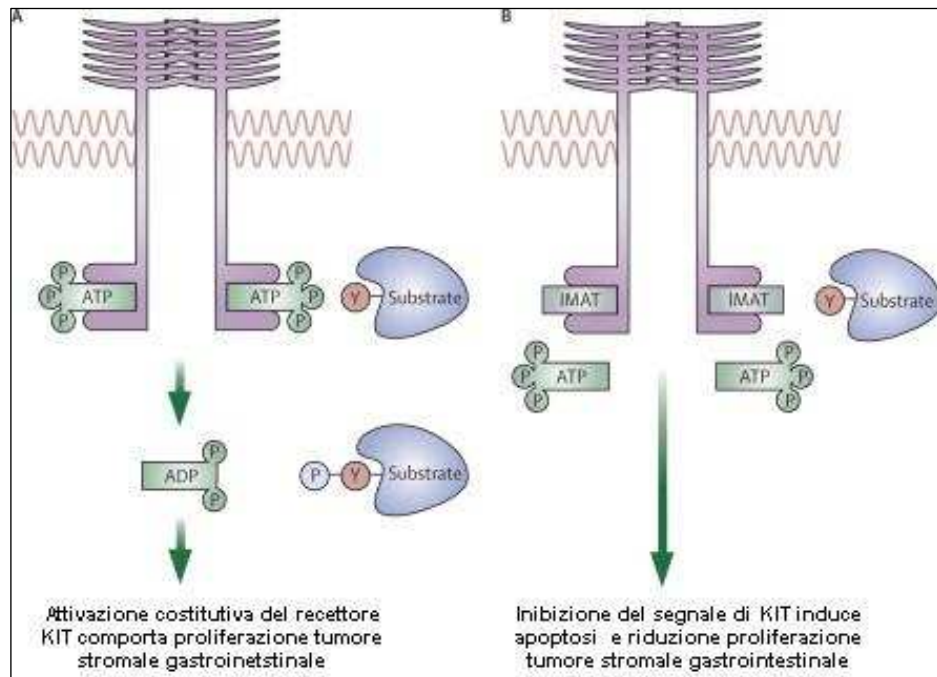


Figura 15
Struttura chimica Imatinib.

La caratterizzazione biologica dei tumori gastrointestinali ha permesso non solo di capire il ruolo del recettore KIT nella patogenesi dei tumori GIST ma anche di individuare in esso un possibile bersaglio terapeutico e sviluppare una terapia mirata.

Sviluppato inizialmente per il trattamento della leucemia mieloide cronica, Imatinib mesilato (57), anche noto come STI-571 o commercialmente come Gleevec[®] o Glivec[®] (Novartis, Basilea, Svizzera) è un analogo dell'ATP in grado di competere con esso per il sito di legame nel dominio chinasi inibendo l'attività del recettore tirosinchinasi (58). Imatinib è in grado di legarsi al recettore KIT, PDGFRA e PDGFRB.

Figura 16
Meccanismo di azione di Imatinib mesilato. (A) Normalmente, ATP si lega al sito attivo del recettore KIT o PDGFRA, con conseguente fosforilazione delle molecole a valle e attivazione delle vie di traduzione. (B) Imatinib è un analogo dell'ATP e compete per lo stesso sito di legame, impedendo così la fosforilazione delle molecole a valle e inibizione dei segnali mediati dai recettori KIT e PDGFRA.



Studi iniziali volti a determinare l'efficacia del trattamento di Imatinib nei tumori GIST ha evidenziato che il farmaco è clinicamente ben tollerato dai pazienti e mostra, nel 54% dei casi, una risposta parziale mentre nel 28% la malattia si arresta. (59)

Sulla base di questi risultati Imatinib è stato approvato dalla "US Food and Drug Administration" per il trattamento di GIST metastatici non operabili.

Considerata l'eterogeneità delle mutazioni che caratterizzano i tumori stromali gastrointestinali è stata studiata la relazione tra la risposta clinica al trattamento farmacologico e lo stato mutazionale dei geni coinvolti nella patogenesi tumorale (42).

Da questo lavoro è emerso come la risposta al farmaco fosse significativamente migliore nei pazienti con mutazioni nell'esone 11 rispetto a pazienti con mutazioni nell'esone 9, 13 e 17. Tuttavia in questo studio il numero di casi con mutazioni dell'esone 13 e 17 era particolarmente basso di conseguenza il dato non è significativo ai fini statistici.

Pazienti con mutazioni PDGFRA D842V non traggono beneficio dal trattamento farmacologico, mentre pazienti con alterazioni a livello degli esoni 12 e nell'esone 18 in codoni diversi dal 842 rispondono bene al trattamento (47).

Il farmaco Imatinib è stato proposto anche come terapia adiuvante dopo chirurgia nei casi di GIST primari localizzati, tuttavia il suo impiego è ancora oggetto di valutazione.

Nel corso degli anni sono stati riscontrati fenomeni di resistenza al farmaco. Esistono due tipi di resistenza: resistenza primaria in cui il paziente non risponde al trattamento e resistenza acquisita in cui i pazienti inizialmente sensibili al farmaco sviluppano resistenza al trattamento farmacologico in un secondo momento in un intervallo di tempo compreso tra i 2 ed 4 anni.

Mentre la resistenza primaria è correlata allo stato mutazionale dei geni KIT e PDGFRA, la resistenza acquisita è dovuta alla comparsa di una seconda mutazione puntiforme a livello dei domini catalitici dei geni coinvolti nella patogenesi tumorale che impediscono al farmaco imatinib di legarsi e bloccare così l'attività tirosinchinasica.

Le mutazioni secondarie fin'ora descritte coinvolgono l'esone 13 (V654A) e esone 17 (N822K, B820Y, Y823) di KIT. Non sono da escludere altre mutazioni, inoltre non è ancora stato dimostrato se tali mutazioni sono indotte dal farmaco o sono preesistenti al trattamento che quindi avrebbe il ruolo di selezionarle (60).

La resistenza al farmaco è un problema clinico importante, per questo motivo sono in corso di sviluppo terapie con farmaci rivolti verso regioni alternative dei recettori KIT e PDGFRA.

E' evidente come la determinazione dello stato mutazionale di KIT e PDGFRA ha, oltre un chiaro valore diagnostico, anche un valore predittivo nella risposta alla terapia.

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 POPOLAZIONE

Lo studio è stato condotto su una serie consecutiva di 442 casi di GIST, raccolti in tre differenti istituti italiani: Università delle Marche di Ancona, l'Istituto San Raffaele di Milano e l'Ospedale di Treviso. 79 (18%) pazienti presentavano alla diagnosi una patologia multifocale. Di questi sono stati selezionati i pazienti che presentavano da 2 a 4 lesioni (5 casi), indipendentemente dalle dimensioni e dalla sede (tubo gastroenterico, peritoneo) Ulteriori cinque casi, che rispondevano a questi criteri, sono stati inviati all'ospedale di Treviso da due istituti stranieri. Tutti i pazienti erano adulti, non affetti da Neurofibromatosi o da sindrome di Carney e non classificati come GIST familiari. I pazienti non avevano subito trattamenti radio o chemioterapici né trattamenti farmacologici prima dell'intervento.

2.2.2 DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA E IMMUNOISTOCHEMICA

La diagnosi di GIST è stata eseguita su tutti i casi, per ognuno dei quali avevamo a disposizione tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina, e si è basata sulle caratteristiche istologiche dei preparati e sulla positività di KIT alla colorazione immunohistochemica. Per ciascuna lesione sono state contate le mitosi in 50 campi consecutivi ad alto ingrandimento. I tumori sono stati classificati con un indice mitotico basso quando il numero di mitosi era inferiore o uguale a 5/50 HPF, intermedio quando compreso tra 5 e 10 e alto nel caso in cui le mitosi erano maggiori di 10/50HPF. Le dimensioni delle neoplasie come pure la localizzazione anatomica sono state ricavate dal referto istologico e dalla cartella clinica di ciascun paziente.

La colorazione immunohistochemica per valutare la positività a KIT è stata condotta su tutti i casi. Al fine di indagare le possibili differenze immunofenotipiche tra le lesioni appartenenti allo stesso paziente, le sezioni dei 5 casi italiani (G1-G5) sono state colorate per DOG1, CD34, Actina Muscolare liscia, S100 e Desmina tramite metodica immunohistochemica.

Per ogni blocchetto sono state tagliate con microtomo rotativo sezioni di 3µm. Le sezioni sono state raccolte su vetrini silanati ed asciugate in stufetta a 37°C overnight. Successivamente, nella fase di deparaffinatura sono state portate a 56°C per 30 minuti, immerse per due passaggi consecutivi in xilolo per 5', in alcool assoluto per 3', e per due passaggi consecutivi in alcool al 95% per 5' ciascuno. Infine le sezioni sono state immerse in acqua di fonte per la reidratazione. Una sezione per ogni

blocchetto è stata colorata con Ematossilina e Eosina. Per le colorazioni immunoistochimiche, il blocco della perossidasi endogena è stato effettuato con perossido di idrogeno 130 volumi al 3% con alcol metilico direttamente in un coloratore semiautomatico.

Le colorazioni immunistoichimiche sono state eseguite con coloratore automatico (Dako Autostainer, DakoCytomation, Glostrup, Demnark) utilizzando i seguenti anticorpi primari: Ab policlonale c-kit (1:100, senza smascheramento antigenico, DakoCytomation), Ab monoclonale CD34 (Clone QBEnd/10, 1:50, senza smascheramento antigenico, DakoCytomation), Ab monoclonale per l'actina muscolare liscia (clone 1A4, prediluito, senza smascheramento antigenico, Neo Marker), Ab policlonale S100 (1:8000, pronase, DakoCytomation), Ab policlonale DOG1 (1:1000, MW pH6, Neo Marker) e Ab monoclonale Desmina (clone D33, prediluito, MW pH6 Neo Marker). L'anticorpo DOG1 e Desmina sono stati trattati con tampone citrato 10mM pH6 in microonde a 750 W per 30'. Dopo l'incubazione di mezz'ora con l'anticorpo primario, sono stati applicati, come anticorpo secondario, il sistema di rivelazione Envision dualink mouse-rabbit per 30' e come cromogeno la 3,3 diamminobenzina (Dako Cytomation Chemate Envision Detection kit peroxidase/DAB, Rbbit-Mouse, Dako, Glostrup, Denmark). Al termine, le sezioni sono state contro colorate con ematossilina, quindi portate con passaggi successivi in alcool crescente da 50%, 80%, 90% e 100%, immerse in xilolo e montate con balsamo. Come controllo negativo è stato usato una soluzione di PBS (buffer fosfato salino) in sostituzione all'anticorpo primario.

2.2.3 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DNA

Il DNA genomico è stato estratto da tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina. Da ciascun blocchetto di paraffina sono state tagliate con microtomo rotativo 3 sezioni da 10µm. Le sezioni sono state raccolte in un' unica eppendorf sterile. Al fine di eliminare l'eccesso di paraffina, i campioni sono stati sottoposti al seguente trattamento: due passaggi con xilolo preriscaldato a 50°C e due passaggi in etanolo all'80%. Ogni passaggio prevedeva un tempo di incubazione di 15' in termoblocco con mixer attivo alla temperatura di 27°C seguito da una centrifugazione a 13000 rpm di velocità per cinque minuti e successiva eliminazione del surnatante. Completata la fase di sparaffinatura i campioni sono stati posti a 37°C per eliminare l'eccesso di etanolo e successivamente ad incubare overnight ad una temperatura di 56°C con 200µl di buffer AL e 20µl di proteinasi K.

Per la fase di estrazione è stato utilizzato il DNA mini Kit (Qiagen) ed è stato seguito il protocollo manuale consigliato dalla ditta.

Con l'obiettivo di aumentare i casi da studiare e ridurre i tempi di processazione la procedura di sparaffinatura è stata messa a punto in un sistema semiautomatico con robot QIACUBE. A questo

scopo il campione, aggiunto del buffer ATL fornito con il kit di estrazione è stato posto in termoblocco a 75°C per cinque minuti con mixer attivo, successivamente è stata abbassata la temperatura e raggiunti i 56°C sono stati aggiunti 10µl di proteinasi K per l'incubazione overnight. Per la fase di estrazione è stato utilizzato il DNA mini Kit seguendo il protocollo fornito con lo strumento QIACUBE. Il sistema semiautomatico non solo riduce i tempi di preparazione del campione ma ottimizza l'estrazione in termini di qualità e quantità del DNA.

IL DNA estratto è stato quantificato mediante spettrofotometro (biofotometro, Eppendorf)

2.2.4 AMPLIFICAZIONE DNA

Le sequenze codificanti per geni di interesse sono state amplificate utilizzando primers specifici selezionati per generare frammenti che coprissero l'intera lunghezza degli esoni non superando le 450 paia di basi (Tabella 3).

Tutti gli esoni sono stati amplificati in un volume finale di 20µl contenente 400pM di primer forward e reverse, 200 µM di dNTPs, 1.5mM di MgCl₂, 1.5 U di SuperTaq DNA polymerase (ABAnalitica) e almeno 100 ng di DNA genomico.

Dopo 5 minuti di denaturazione iniziale a 95°C, sono stati eseguiti 40 cicli di amplificazione (95°C 30'', 54°C 30'', 72°C 30'') seguiti da un'estensione finale a 72°C per 5 minuti. La reazione è stata condotta utilizzando il thermal cycler GeneAmp PCR system 9700, (Applied Biosystem). 10 µl della reazione sono stati esaminati mediante corsa su gel di agarosio al 3% in TBE1X.

Tabella 3: Sequenze primers.

<i>Esoni</i>	<i>Primer (5'-3')</i>	<i>bp</i>
KIT Esoni 9	F-TTTCCTAGAGTAAGCCAGGGC R-ACAGAGCCTAACATCCCCT	280
KIT Esoni 11	F-TCTCTCTCCAGAGTGCTCTAATGAC R-AAGGAAGCCACTGGAGTTCC	283
KIT Esoni 13	F-TGCATGCGCTTGACATCAGT R-AGGCAGCTTGGACACGGCTT	198
KIT Esoni 14	F-GTCTGATCCACTGAAGCTG R-ACCCCATGAACTGCCTGTC	319
KIT Esoni 17	F-TGGTTTTCTTTCTCCTCCAACC R-GCAGGACTGTCAAGCAGAC	184
PDGFRA Esoni 12	F-TCCAGTCACTGTGCTGCTTC R-GCAAGGGAAAAGGGAGTCTT	260
PDGFRA Esoni 14	F-GGTAGCTCAGCTGGACTGAT R-GGATGGAGAGTGGAGGATTT	244
PDGFRA Esoni 18	F-TCAGCTACAGATGGCTTGATC R-TGAAGGAGGATGAGCCTGACC	215

2.2.5 SEQUENZIAMENTO

I prodotti di PCR sono stati purificati con sistema ExoSap (GeHealthcare).

Ciasun esone è stato marcato per entrambe le direzioni con il kit BigDye Terminator v1.1 (Applied, Italia) secondo il seguente protocollo: in un volume finale di 10 µl, 1µl di Buffer Ready, 1µl di Ready reaction mix, 3,2 pmol di primer e 0.25 µl di template .

Dopo 1 minuto di denaturazione iniziale 96°C, sono stati eseguiti 25 cicli di amplificazione (95°C 10'', 50°C 5'', 60°C 4''). La reazione è stata condotta utilizzando il thermal cycler GeneAmp PCR system 2720, (Applied Biosystem).

Il prodotto marcato è stato purificato con sistema su colonnine sephadex DyeEx (Qiagen), trasferito nei pozzetti di una piastra da 96 e essiccato a 65° per circa 30 minuti. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 15 µl di formammide. La piastra è stata poi denaturata a 95°C per 5 minuti e successivamente caricata sul sequenziatore multicapillare ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer.

L'elettroforesi capillare delle sequenze è stata fatta con polimero POP7 (Applied) e il buffer di corsa Run Buffer (Applied). Nel sequenziamento l'intensità di segnale di fluorescenza emesso dai nucleotidi marcati in seguito ad eccitazione con laser viene raccolto dalla CCD camera e il segnale elettronico che ne deriva viene convertito da un software dedicato in elettroferogramma dove ciascun picco rappresenta una precisa base la cui altezza equivale all'intensità del segnale.

2.2.6 ANALISI DEI MICROSATELLITI

Tra i loci cromosomici che più frequentemente vengono persi nella tumorigenesi dei GIST troviamo i seguenti: 1p, 13q, 14q e 22q). A questo scopo sono stati utilizzati i markers di microsatelliti D1S435, D1S449, D11S153, D13S290, D13S171, D14S468, D22S1150 e D22S689). Le regioni polimorfiche sono state amplificate mediante PCR usando primers marcati con fluoroforo HEX e FAM.. Dopo 5 minuti di denaturazione iniziale, sono stati eseguiti 40 cicli di amplificazione (95°C 15'', 57°C 15'', 72°C 15'') seguiti da un'estensione finale a 72°C per 5 minuti. La reazione è stata condotta utilizzando il thermal cycler GeneAmp PCR system 2720, (Applied Biosystem). Le sequenze ottenute sono state diluite 1:20 e caricate su sequenziatore ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer.

2.2.7 SOFTWARE APPLICATI

Le sequenze del gene kit e pdgfra utilizzate sia per il disegno dei primers sia come DNA di riferimento nell'analisi di sequenza sono state ricavate dai database Human Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu/>) e "GenBank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

I primers utilizzati per amplificare gli esoni di interesse sono stati disegnati mediante il programma PRIMER 3 v 4.0 (<http://primer3.sourceforge.net>). Inserita la sequenza di interesse e settate le caratteristiche che i primers debbono avere, il programma elabora sequenze di oligonucleotidi che meglio rispondono alle condizioni richieste. Per l'amplificazione dei microsatelliti le sequenze utilizzate sono state ricavate dal database "GDB" Human Genome Database (<http://www.gdb.org>).

La qualità degli elettroferogrammi, in termini di risoluzione dei picchi e entità del background, sono stati valutati con il software Sequencing Analysis (Applied Biosystems). Con questo programma è possibile, per ciascuna corsa, verificare i parametri settati dall'utente, esaminare le condizioni dello strumento durante la corsa elettroforetica e risalire ai dati grezzi, convertendoli eventualmente in formati diversi in relazione al software che verranno impiegati per l'analisi.

L'analisi di sequenza, per la ricerca di mutazioni è stata fatta con il software SeqScape (Applied Biosystems) che permette l'allineamento delle sequenze forward e reverse di ciascun campione rispetto ad una sequenza di riferimento wild type. Il livello di informazioni che si possono ottenere con questo strumento sono molteplici.

Per ogni gene che si vuole studiare è possibile creare un Reference Data Group (RDG) nel quale è possibile importare direttamente da Gene Bank il file relativo alla sequenza di riferimento che si vuole utilizzare per l'allineamento. SeqScape è in grado di elaborare le informazioni di sequenza nucleotidica e amminoacidica contenute in questo file e utilizzarle al momento dell'analisi.

Per i nostri studi sono stati creati due RDG, uno relativo alla sequenza di KIT (sequenza di riferimento X06182) e uno relativo al gene PDGFRA (NM_006206).

Alcune sequenze sono state analizzate con il programma Clustalx che permette l'allineamento tra sequenze con un alto grado di omologia evidenziando le basi discordanti. Per l'analisi dei microsatelliti è stato usato il software Gene Mapper v3.7 (Applied Biosystems) che permette di valutare le dimensioni dei frammenti ottenuti con l'elettroforesi capillare, la qualità e il confronto tra campioni differenti.

2.3 RISULTATI

2.3.1 RISULTATI CLINICOPATOLOGICI

I casi studiati sono stati siglati con la lettera G seguita da un numero progressivo che identifica un determinato paziente. Per le singole lesioni appartenenti allo stesso paziente sono state utilizzate le lettere minuscole.

In Tabella 4 sono riportate le caratteristiche cliniche e patologiche delle neoplasie prese in esame. Tutti i pazienti presentavano due lesioni, solamente un caso presentava tre lesioni distinte (G7). Le lesioni, in 4 casi, erano localizzate nello stesso tratto del tubo gastroenterico (G2, G6, G7, G8), mentre in un caso (G1) erano localizzate in tratti diversi del tubo gastroenterico. Negli altri 5 casi (G3, G4, G5, G9 e G10) le due lesioni di ogni paziente erano situate una nel tratto gastroenterico e l'altra nel peritoneo.

Le dimensioni del tumore variavano da 0.6 cm ai 16 cm. In 3 casi (G1, G2, G9) i noduli neoplastici dello stesso paziente presentavano dimensioni simili, al contrario nei casi G3, G4, G5, G6, G8, G10 i pazienti presentavano una massa predominante rispetto all'altra. Il paziente con tre lesioni (G7) presentava una massa gastrica cospicua e due lesioni minori con dimensioni simili.

In 6 casi la morfologia era concordante (fusata/fusata; mista/mista) mentre nei rimanenti casi era discordante (fusata/mista; fusata/epitelioide). L'indice mitotico in 5 casi (G1, G2, G6, G7, G10) si presentava basso ed era concordante tra le lesioni. Diversamente, in tre casi (G3, G4, G5) l'indice mitotico era alto o intermedio e concordante tra i noduli neoplastici. Infine, nei casi G8 e G9, l'indice mitotico era discordante tra le coppie di tumore.

Tutti i campioni analizzati con metodica immunohistochimica sono risultati positivi per c-kit. In 4 casi non sono state osservate differenze immunofenotipiche rilevanti. L'espressione di DOG1 e CD34 si presentava più o meno diffusa con assenza di espressione della desmina, della proteina S100 e dell'actina muscolare liscia. Tuttavia nel caso G1 il quadro immunofenotipico variava tra le due lesioni. Infatti la neoplasia a livello gastrico presentava cellule a morfologia fusata ed era negativa per l'actina muscolare liscia e ampiamente positiva per CD34 (Figura ?A, B), mentre il nodulo nel piccolo intestino presentava cellule con morfologia mista, un'alta espressione dell'actina muscolare liscia e solo una focale espressione di CD34 (Figura C, D).

Tabella 4: Elenco pazienti e caratteristiche clinico patologiche.

<i>Caso</i>	<i>Età/sexo</i>	<i>Tumori</i>	<i>Localizzazione</i>	<i>Dimensioni (cm)</i>	<i>Morfologia</i>	<i>Mitosi/ 50HPF</i>
G1	85/M	G1-a	stomaco	6.2	fusata	2
		G1-b	intestino piccolo	6	mista	1
G2	71/M	G2-a	stomaco	3	fusata	1
		G2-b	stomaco	4	epitliode	1
G3	74/M	G3-a	intestino piccolo	8	fusata	35
		G3-b	peritoneo	2	fusata	33
G4	48/F	G4-a	intestino piccolo	10	fusata	20
		G4-b	peritoneo	1.5	fusata	17
G5	59/F	G10-a	stomaco	16	mista	6
		G10-b	omento	2	mista	7
G6	69/F	G6-a	intestino piccolo	1.9	fusata	1
		G6-b	intestino piccolo	4.7	fusata	1
G7	83/F	G7-a	stomaco	14	fusata	1
		G7-b	stomaco	0.7	fusata	0
		G7-c	stomaco	0.7	fusata	0
G8	53/F	G8-a	intestino piccolo	6	fusata	30
		G8-b	intestino piccolo	1.7	fusata	2
G9	81/M	G9-a	intestino piccolo	4.5	fusata	4
		G9-b	peritoneo	3.5	mista	7
G10	68/M	G10-a	stomaco	0.6	fusata	6
		G10-b	peritoneo	13	mista	7

NB: Casi G1-G5 selezionati da una serie di 442 casi consecutivi, G6-G9 inviati da centri esteri.

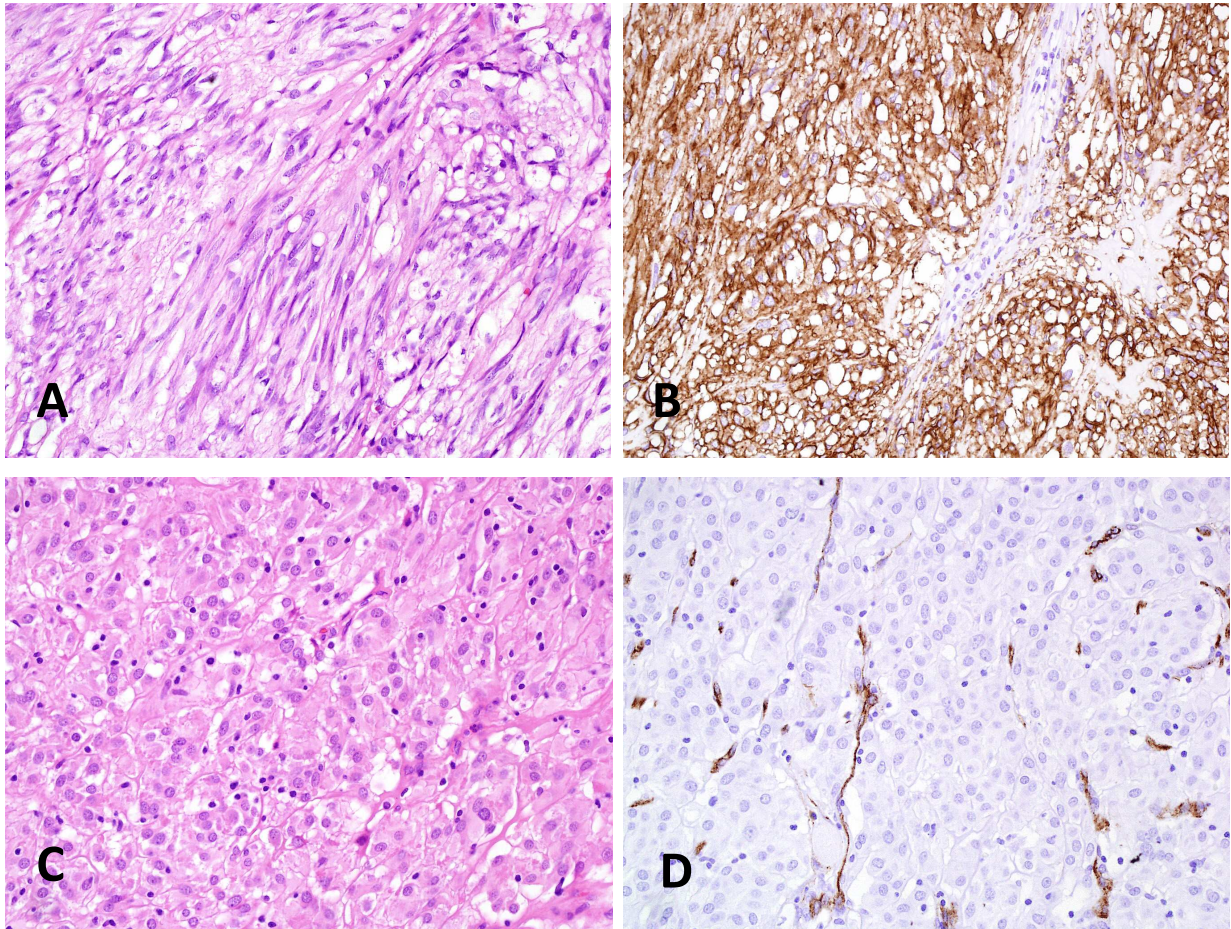


Figura 18: Colorazione immunoistochimica caso G1. Il tumore gastrico G1-a mostra una morfologia fusata (A) ed è negativa per l'actina muscolare liscia e ampiamente positiva per CD34 (B); piccolo intestino G1-b presenta cellule con morfologia mista, espressione dell'actina muscolare liscia e solo una focale espressione di CD34

2.3.2 ANALISI MUTAZIONALE C-KIT E PDGFRA

L'analisi di sequenza ha evidenziato mutazioni nel gene KIT in 8 casi su 10 e una mutazione nel gene PDGFRA (Tabella 5). Interessante notare come le mutazioni tra lesioni appartenenti allo stesso paziente risultano essere diverse in 6 casi su 10. Nei casi G3, G4, G5 una delle due neoplasie presentava dimensioni maggiori dell'altra, l'indice mitotico era o intermedio o alto ma sempre concordante, l'aspetto morfologico era simile e il pattern di mutazione è risultato essere uguale, confermando la natura metastatica delle lesioni.

Nei casi G1 e G4 sono state individuate doppie mutazioni di KIT in una delle due masse. Più precisamente nel tumore G1-a è stata individuata una mutazione puntiforme nell'esone 11 che comporta a livello proteico la sostituzione dell'amminoacido W in G in posizione 557 e una delezione di 29 nucleotidi nell'esone 9 che determina una proteina trunca a livello dell'amminoacido 480. Il tumore G1-b appartenente allo stesso paziente presenta una delezione di 48 nucleotidi che

determina la perdita di 16 aminoacidi a partire dall'amminoacido V in posizione 555 fino all'amminoacido I in posizione 571.

Nel caso G4 entrambe le lesioni presentano la medesima mutazione nell'esone 11 del gene KIT, tuttavia il nodulo di dimensioni maggiori denominato G4-a presenta una seconda mutazione con delezione di un nucleotide nell'esone 14 e conseguente arresto della proteina all'amminoacido 719.

Il paziente G10 non presentava mutazioni negli esoni considerati.

I casi G2, G6, G7, G8 e G9 presentavano mutazioni differenti tra le lesioni dello stesso pziente.

Tabella 5: Pattern mutazionale nel gene KIT e PDGFRA.

<i>Caso</i>	<i>Tumore a</i>	<i>Tumore b</i>	<i>Tumore c</i>
G1	KIT Ex ¹ 9 I478fsX2	KIT Ex 11 V555_I571	
G2	KIT Ex 11 V560D	No	
G3	KIT Ex 9 A502_Y503dup	KIT Ex 9 A502_Y503dup	
G4	KIT Ex 11 W557G	KIT Ex 11 W557G	
G5	PDGFRA Ex18 V561D	PDGFRA Ex18 V561D	
G6	KIT Ex 11 V559del	KIT Ex 11 V559G	
G7	KIT Ex 11 I563_L576del	KIT Ex 11 V560D	No
G8	KIT Ex 11 L576P	KIT Ex 11 V559D	
G9	KIT Ex 11 V559D	KIT Ex 11 W557_V559delinsF	
G10	No mutazione	No mutazione	

NB: La dicitura utilizzata è in accordo con la nomenclatura internazionale (ref.70). ¹Ex= Esone

2.3.3 ANALISI DEI MICROSATELLITI

L'analisi di instabilità allelica microsatellitare permette di valutare la perdita cromosomica tumore specifica che può verificarsi con la progressione della neoplasia.

Per confermare l'origine clonale delle lesioni, alcuni casi sono stati analizzati per la perdita di eterozigotà (LOH) nei loci maggiormente coinvolti nella tumorigenesi dei GIST. La perdita dei cromosoma 14 o 22 è considerato un evento precoce (Handra-Luca Un Histopathology 2001) e si manifesta in almeno il 65% e 50% rispettivamente dei casi GIST.

Per questo studio abbiamo assunto che un pattern microsatellitare concordante tra le due lesioni appartenenti allo stesso paziente fosse indicativo di una origine clonale comune. Mentre l'evidenza di pattern discordanti, intesi come la perdita di alleli differenti tra i noduli neoplastici, è stata considerata come evidenza di un origine clonale indipendente.

L'analisi dei microsatelliti è stata condotta in 6 pazienti (G1-G6) e sono stati indagati almeno 3 marcatori microsatellitari. I pazienti con pattern mutazionale KIT/PDGFRA diverso tra i noduli (G1, G2, G6) presentano la perdita di alleli differenti in almeno un terzo dei marcatori utilizzati a sostegno di un origine indipendente dei due cloni (**Tabella 6**). In altri 3 casi, è emerso un quadro

microsatellitare o uguale o con perdite alleliche compatibili con la progressione tumorale. L'analisi mutazionale in questi casi aveva rivelato mutazioni uguali tra le neoplasie. Di particolare interesse è il caso G4 dove l'analisi mutazionale di kit ha evidenziato nel tumore a, oltre alla mutazione condivisa dal tumore b, un'altra mutazione. L'analisi microsatellitare ha evidenziato un pattern allelico simile ma con un ulteriore perdita allelica nella neoplasia G4-a supportando l'ipotesi di un ulteriore progressione maligna nel nodulo primario.

L'analisi mutazionale di KIT e PDGFRA associata all'analisi microsatellitare ha confermato la natura metastatica nei casi G3, G4 e G5. Viceversa, la presenza di mutazioni differenti tra le coppie di lesioni, supportata sempre dai dati di instabilità cromosomica, ha confermato la natura multifocale indipendente nei casi G1, G2, G6, G7, G8 e G9.

Tabella 6: Relazione clonale e pattern mutazionale e microsatellitare.

<i>Caso</i>	<i>Pattern Mutazioni KIT/PDGFR</i>	<i>Pattern microsatellitare</i>	<i>Relazione clonale</i>
G1	Differente	2/6	Differente
G2	Differente	1/3	Differente
G3	Uguale	0/4	Uguale
G4	Uguale+ 11 mutazione	0/6	Uguale
G5	Uguale	0/4	Uguale
G6	Differente	2/4	Differente
G7	Differente	ND	Differente
G8	Differente	ND	Differente
G9	Differente	ND	Differente
G10		ND	Non

Sono state confrontate le caratteristiche clinicopatologiche e immunofenotipiche tra questi due gruppi al fine di individuare dei parametri che possano distinguere la natura delle lesioni.

Nel gruppo con tumori di natura metastatica le due masse (G3-G5) avevano dimensioni notevolmente diverse, inoltre le lesioni presentavano morfologia e indice mitotico concorde, suggerendo che questi parametri potrebbero essere utilizzati per definire la natura metastatica della massa peritoneale. Tuttavia è necessario essere cauti in quanto anche nel gruppo con GIST multipli primari le neoplasie di alcuni casi presentavano dimensioni differenti. Inoltre come per i tumori metastatici, anche i MPG possono presentare morfologia e indice mitotico concorde (G6, G7, G8).

2.4 DISCUSSIONE

Il riscontro di GIST multipli è un fenomeno raro e limitato a determinate forme sindromiche. Infatti, tumori multipli possono essere riscontrati in pazienti in età pediatrica o in individui adulti affetti da forme di GIST familiari, Neurofibromatosi di tipo I (NF-1) o Triade di Carney. Al di là di queste entità clinicamente diagnosticabili, l'evidenza di diverse noduli neoplastici è tradizionalmente interpretata come indicativa di diffusione metastatica di una lesione primaria.

Recentemente, in contrasto con questa visione, sono stati pubblicati due lavori che riportano l'esistenza di tumori multipli in pazienti adulti con GIST sporadici (61,62).

La frequente e precoce insorgenza delle mutazioni che caratterizzano i tumori stromali gastrointestinali, associata alla notevole variabilità di alterazioni che si possono riscontrare in questi tumori, ha permesso a Kang e colleghi (2007) di utilizzare le mutazioni di KIT e PDGFRA come marcatori clonali in uno screening multicentrico di pazienti con GIST multifocale. Per questo studio sono stati reclutati 11 casi di pazienti con più di due lesioni nello stesso organo (stomaco o piccolo intestino) e distanti tra loro non più di 3 cm. Tra questi, 2 pazienti erano riconducibili a una forma ereditaria di GIST in quanto presentavano mutazioni di KIT nella linea germinale, 5 casi erano affetti da Neurofibromatosi di tipo 1 e 5 pazienti presentavano lesioni multiple di GIST non associabili ad altre sindromi. L'analisi molecolare di quest'ultimo gruppo di cinque pazienti non ha dimostrato trattarsi di patologia multifocale in 4 su 5 casi. Infatti, le mutazioni nei noduli neoplastici appartenenti allo stesso paziente risultavano le medesime, suggerendo al contrario una possibile natura metastatica delle lesioni. Tuttavia, in uno dei pazienti le mutazioni a carico del gene KIT erano diverse nelle due lesioni confermando la presenza di GIST indipendenti. Allo stesso modo, Haller e collaboratori (2007) hanno studiato 4 casi di GIST gastrici nei quali, durante l'intervento chirurgico finalizzato alla resezione del tumore di dimensioni maggiori e clinicamente evidente, sono state individuate incidentalmente da 1 a 3 lesioni minori.

Le dimensioni della lesione maggiore erano comprese tra i 4 e i 9 cm, mentre le lesioni minori variavano dai 0.2 ai 2.3 cm. In tutti i casi analizzati il pattern mutazionale era diverso indicando che questi pazienti avevano sviluppato GIST multipli indipendenti.

In entrambi i lavori i casi riportati riguardano GIST multifocali che interessano lo stesso organo (stomaco o piccolo intestino) escludendo dall'analisi tutti i casi con lesioni peritoneali. Tuttavia, sono stati riscontrati singoli casi di GIST primitivi epatici e peritoneali (63,64). In quest'ottica la patologia multifocale potrebbe interessare sedi diverse del tratto gastroenterico. Ciò nondimeno, l'esistenza di GIST multipli come pure la loro localizzazione non è stata sufficientemente chiarita.

Per questi motivi e con l'intento di contribuire a far luce sul fenomeno dei tumori multipli nel contesto dei GIST sporadici, sono stati esaminati 450 casi consecutivi raccolti in tre differenti istituti italiani. 79 presentavano alla diagnosi una patologia multifocale. In 5 di questi, in cui le lesioni erano da 2 a 4, è stata condotta l'analisi molecolare. Ulteriori cinque casi selezionati sono stati inviati all'ospedale di Treviso da due istituti stranieri.

Le lesioni appartenenti allo stesso paziente condividevano, in 4 casi, la sede anatomica mentre nei rimanenti 6 casi i noduli neoplastici erano lontani e coinvolgevano lo stomaco ed il piccolo intestino, lo stomaco e il peritoneo o il piccolo intestino e il peritoneo.

In tre casi l'analisi di sequenza ha evidenziato lo stesso pattern di mutazioni tra le lesioni a riprova di una possibile diffusione metastatica del tumore primario. In tutti questi casi la lesione secondaria era notevolmente più piccola rispetto alla lesione primaria. Al contrario in 6 casi le mutazioni osservate erano diverse in corrispondenza delle due neoplasie, a favore dell'ipotesi di un'origine indipendente di questi tumori. Questo dato è stato ulteriormente rafforzato dall'analisi dei microsatelliti che ha confermato la possibile multifocalità nella patologia dei GIST.

Nella maggior parte dei casi le due lesioni presentavano dimensioni simili (con un rapporto tra le due neoplasie compreso tra 1 e 3.5 volte) ad eccezione di un caso dove la massa era 20 volte maggiore rispetto ai noduli secondari. In 4 casi le lesioni interessavano lo stesso organo, in un altro caso i due tumori erano localizzati uno nello stomaco e l'altro nel piccolo intestino e infine un paziente presentava una lesione nell'intestino e l'altra nel peritoneo.

Questo ultimo caso è particolarmente interessante perché non solo conferma la presenza di GIST multipli sincroni ma pone un interrogativo circa la correttezza di considerare un GIST a localizzazioni peritoneale come una ovvia metastasi.

Un caso non era informativo in quanto non presentava mutazioni per gli esoni di KIT e PDGFRA indagati.

L'analisi dei microsatelliti associata all'analisi di sequenza di KIT e PDGFRA ha permesso di confermare la stessa origine clonale in 3 casi. Di fatto, queste neoplasie presentavano un pattern microsatellitare e mutazionale concorde tra le coppie di lesioni e quindi un quadro compatibile con la presenza di un tumore primario a cui fa seguito una diffusione metastatica.

Al contrario, in 6 casi, la presenza di mutazioni differenti associata all'instabilità microsatellitare discordante avvalorava l'ipotesi di un'origine clonale distinta tra le neoplasie dello stesso paziente confermando la presenza di GIST primari multipli.

I risultati ottenuti da questo studio confermerebbero le osservazioni fatte recentemente da Kang e Haller circa l'esistenza di GIST multipli primitivi in pazienti adulti, non familiari, non affetti da Neurofibromatosi tipo 1 o altre sindromi.

L'analisi molecolare su i 5 campioni del set di casi consecutivi permette di fare alcune considerazioni epidemiologiche. Come specificato nella sezione Materiali e Metodo (studio di popolazione), al fine di analizzare tutte le lesioni rilevate in un paziente, abbiamo deciso di limitare lo studio molecolare ai casi che presentavano un numero limitato di lesioni distinte (fino a 4), indipendentemente dalla loro dimensione e dalla sede (tubo gastroenterico, peritoneo). Cinque dei 79 pazienti con malattia avanzata rispondevano ai criteri di inclusione. In due, di questi 5 casi (40%), la diagnosi clinica di malattia metastatica è stata contraddetta dall'analisi molecolare che ha confermato l'origine clonale distinta sostenendo quindi una diagnosi di MPGs.

Essendo il numero di pazienti analizzati limitato non è possibile trarre conclusioni definitive sulla penetranza del fenomeno della molteplicità del tumore nel contesto dei GIST sporadici. Tuttavia, il fatto che 2 su 5 pazienti clinicamente diagnosticati come malattia avanzata fossero in realtà affetti da MPGs risulta importante. Inoltre, dal momento che abbiamo cercato di concentrare la nostra analisi sul GIST con un numero di noduli distinti limitato, non si può escludere che anche pazienti che si presentano con malattia ampiamente diffusa e pazienti in cui ci sia malattia recidiva, non siano affetti da MPGs.

Da un punto di vista biologico, il fenomeno dei tumori multipli nel contesto dei GIST sporadici si potrebbe spiegare con la persistente influenza dei fattori endogeni e esogeni sulle cellule mesenchimali (siano esse cellule Cajal o cellule pluripotenti), che hanno subito le prime trasformazioni preneoplastiche.

Il meccanismo ipotizzato per i GIST ricorda il cosiddetto "field cancerization" già conosciuto nell'ambito dei tumori delle vie respiratorie (29).

In accordo con questa visione, la frequenza di piccole neoplasie multiple asintomatiche di GIST è maggiore rispetto a GIST clinicamente conclamati (66,67).

Infatti, Agaimy e collaboratori hanno recentemente riportato che GIST di piccole dimensioni definiti "GIST tumorlets", inferiori ai 4mm, sono molto frequenti nello stomaco di individui adulti (20%). È interessante notare che il 14% di questi si presentano come multipli, sono positivi all'immunoistochimica e presentano mutazioni a livello dei geni KIT e PDGFRA.

Gli autori ipotizzano che questi "GIST tumorlets" possono evolvere in tumori conclamati oppure regredire.

Da un punto di vista clinico, una diagnosi differenziale tra diffusione di malattia e MPG avrebbe ripercussioni sulla gestione clinica della malattia. Di fatto, l'approccio terapeutico per i tumori primitivi è la resezione chirurgica mentre per i GIST metastatici il trattamento standard è l'utilizzo dell'Imatinib (Gleevec). (ESMO, 2007) (68). I pazienti con GIST metastatici trattati con l'inibitore della tirosinchinasi, Imatinib, mostrano un significativo miglioramento clinico. Questi risultati sono da correlare allo stato mutazionale dei geni kit e pdgfr. Tumori di GIST con mutazioni dell'esone 11 del

gene kit mostrano una percentuale di risposta più alta con una curva di sopravvivenza maggiore rispetto alle neoplasie con mutazioni dell'esone 9, che rispondono al trattamento con Imatinib solo a dosi elevate (69). Il successo al trattamento con Imatinib in tumori di GIST multipli sincroni è correlato pertanto alla specifica sensibilità delle mutazioni che caratterizzano le singole neoplasie. Pertanto in pazienti con GIST multipli la caratterizzazione clonale delle neoplasie potrebbe risultare utile nella scelta del farmaco e del dosaggio ottimale.

Lo studio multicentrico proposto in questo lavoro sottolinea come una parte di pazienti considerati affetti da GIST in fase avanzata siano invece diagnosticabili come MPG

2.5 BIBLIOGRAFIA

1. Rubin B.P. Gastrointestinal stromal tumors: an update. *Histopathol.* 2006; 48:83-96
2. Appelman HD, Hellwigh EB. Cellular leiomyomas of the stomach in 49 patients. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006;101:373-377
3. Golden T, Stout AP. Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract and retroperitoneal tissues. *Surg.Gynecol. Obstet.* 1941;73:784-810
4. Appelman HD Smooth muscle tumors of the gastrointestinal tract. What we know now that Stout didn't know. *Am. J. Surg. Pathol.* 1986;10 (Suppl.1):83-99
5. Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* 1983;7:507-519
6. Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279 (5350):557-580
7. Nilsson B, Bumming P, Meis-Kindblom JM, Oden A, Dortok A, Gustavsson B, Sablinska K, Kindblom LG. Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era-a population-based study in western Sweden. *Cancer* 2005;103 (4):821-829
8. DeMatteo RP, Lewis JJ, Leung D, Mudan SS, Woodruff JM, Brennan MF. Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. *Ann Surg* 2000;231:51-58
9. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas in the colon: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1339-1352
10. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005;29:52-68
11. Miettinen M, Kopczynski J, Makhlof HR. Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am J Surg Pathol* 2003;27:625-641

12. Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, Weiss SW. Extragastrointestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod Pathol* 2000;13:577-585
 13. Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M. Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1109-1118
 14. Demetri GD, Benjamin R, Blanke CD. NCCN task force report: optimal management of patient with gastrointestinal stromal tumor (GIST) expansion and update of NCCN clinical practice guidelines. *J Natl Comp Cancer Network* 2004;2 (suppl 1): S1-S26
 15. Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1996;111: 492-515
 16. Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998;152: 1259-1269
 17. Kluppel M, Huizinga JD, Malysz J, Bernstein A. Developmental origin and Kit-dependent development of the interstitial cells of cajal in the mammalian small intestine. *Dev Dyn* 1998;211: 60-71
 18. Fletcher CD, Berman JJ, Corless. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002;33:459-465
 19. Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998;11: 728-734
 20. West RB, Corless CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zhu S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, van de Rijn M. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol*. Jul 2004;165:107-13
 21. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006;23: 70-83
 22. Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995;373; 347– 349
 23. Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 1992;116:369–75
 24. Qiu FH, Ray P, Brown K. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family—oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J* 1998;7:1003–1011
-

25. Huang E, Nocka K, Beier DR. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990;63:225–233
26. Stenman G, Eriksson A, Claesson-Welsh L. Human PDGFA receptor maps to the same region on chromosome 4 as the KIT oncogene. *Genes Chromosomes Cancer* 1989;1:155–158
27. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* 2002;38 (suppl 5):S3–S10
28. Blume-Jensen P, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Zsebo KM, Westermark B, Heldin CH. Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *Embo J* 1991;10:4121-4128
29. Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ, Fletcher JA. (2002) Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol* 33:484-495
30. Duensing A, Medeiros F, McConarty B. Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* 2004;23:3999–4006
31. Bauer S, Yu LK, Demetri GD, Fletcher JA. Heat shock protein 90 inhibition in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Res* 2006;66:9153-9161
32. Kitamura Y, Hirota S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2924–2931
33. Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004;22:3813–3825
34. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003;299:708–710
35. Sreekantaiah C, Davis JR, Sandberg AA. Chromosomal abnormalities in leiomyosarcomas. *Am. J. Pathol.* 1993;142:293–30
36. O'Leary T, Ernst S, Przygodzki R. Loss of heterozygosity at 1p36 predicts poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab. Invest.* 1999;79:1461–1467
37. Rubin BP, Singer S, Tsao C. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 2001;61:8118–8121
38. Lux ML, Rubin BP, Biase TL. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Pathol.* 2000;156:791–795
39. Longley BJ, Reguera MJ, Ma Y. Classes of c-KIT activating mutations: proposed mechanisms of action and implications in disease classification and therapy. *Leuk Res* 2001;25:571–576

40. Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of c-kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol* 1999;54:53–60
41. Taniguchi M, Nishida T, Hirota S. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999;59:4297–4300
42. Heinrich MC, Corless CL, Demetri CG. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21:4342–4349
43. Lux ML, Rubin BP, Biase TL. et al. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;156:791–795
44. Antonescu CR, Sommer G, Sarran L. et al. Association of KIT exon 9 mutations with nongastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:3329–3337
45. Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M. et al. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors: a study of two hundred cases. *Am J Pathol* 2000;157:1091–1095
46. Lasota J, Kopczynski J, Sarlomo-Rikala M. et al. KIT 1530ins6 mutation defines a subset of predominantly malignant gastrointestinal stromal tumors of intestinal origin. *Hum Pathol* 2003;34:1306–1312
47. Corless CL, Schroeder A, Griffith D. et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 2005;23:5357–5364
48. Li FP, Fletcher JA, Heinrich MC, et al. Familial Gastrointestinal Stromal Tumor Syndrome: Phenotypic and Molecular Features in a Kindred. *J Clin Oncol* 2005; 23:2735-2743
49. Lasota J, Miettinen M. A new familial GIST identified. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:1342
50. Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, et al. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology* 2005; 129:1042-6
51. Kim HJ, Lim SJ, Park K, Yuh YJ, Jang SJ, Choi J. Multiple gastrointestinal stromal tumors with a germline c-kit mutation. *Pathol Int* 2005; 55:655-9
52. Carballo M, Roig I, Aguilar F, et al. Novel c-KIT germline mutation in a family with gastrointestinal stromal tumors and cutaneous hyperpigmentation. *Am J Med Genet* 2005; 132:361-4
53. Takazawa Y, Sakurai S, Sakuma Y, et al. Gastrointestinal stromal tumors of neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease). *Am J Surg Pathol* 2005; 29:755-63

54. Zöller ME, Rembeck B, Odén A, Samuelsson M, Angervall L. Malignant and benign tumors in patients with neurofibromatosis type 1 in a defined Swedish population. *Cancer* 1997; 79:2125-31
 55. Carney JA. Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma and extra-adrenal paraganglioma (Carney triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 543-52
 56. DeMatteo RP, Heinrich MC, El Rifai WM et al. Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571. *Hum. Pathol.* 2002;33; 466– 477
 57. Mauro MJ, Druker BJ. STI571: a gene product-targeted therapy for leukemia. *Curr. Oncol. Rep.* 2001; 3; 223– 227
 58. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ et al. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000; 96; 925– 932
 59. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347; 472– 480
 60. Antonescu CR, Besmer P, Guo T, Arkun K, Hom G, Koryotowski B, Leversha MA, Jeffrey PD, Desantis D, Singer S, Brennan MF, Maki RG, DeMatteo RP. Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res.* 2005;11(11):4182-90
 61. Kang DY, Park CK, Choi JS, et al. Multiple Gastrointestinal Stromal Tumors: Clinicopathologic and Genetic Analysis of 12 Patients. *Am J Surg Pathol* 2007; 31:224–32
 62. Haller F, Schulten HJ, Armbrust T, Langer C, Gunawan B, Füzesi L. Multicentric sporadic gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of the stomach with distinct clonal origin: differential diagnosis to familial and syndromal GIST variants and peritoneal metastasis. *Am J Surg Pathol* 2007; 31:933-7
 63. Hu X, Forster J, Damjanov I. Primary malignant gastrointestinal stromal tumor of the liver. *Arch Pathol Lab Med.* 2003; 127:1606-8
 64. Todoroki T, Sano T, Sakurai S, et al. Primary omental Gastrointestinal stromal tumor (GIST). *World J Surg Oncol* 2007; 5:66
 65. Ha PK, Califano JA. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14:363-9
 66. Agaimy A, Wunsch PH, Sobin LH, Lasota J, Miettinen M. Occurrence of other malignancies in patients with gastrointestinal stromal tumors. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23:120-9
 67. Abraham SC, Krasinskas AM, Hofstetter WL, Swisher SG, Wu TT. "Seedling" mesenchymal tumors (gastrointestinal stromal tumors and leiomyomas) are common incidental tumors of the esophagogastric junction. *Am J Surg Pathol* 2007; 31; 1629-35
-

68. ESMO Coordinating authors for the ESMO Guidelines Working Group: J.-Y. Blay, A. Le Cesne Gastrointestinal stromal tumors: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2007; 18: ii27-ii29
69. Debiec-Rychter M, Sciot R, Le Cesne A, et al. EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group; The Italian Sarcoma Group; Australasian GastroIntestinal Trials Group. KIT mutations and dose selection for imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Cancer* 2006; 42:1093-103
70. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001;109:121-4

APPENDICE

Dei Tos AP., Rossi S., Gasparotto D., Bearzi I., **Gallina G.**, Maestro R. KIT gene molecular analysis distinguishes multiple primary GIST from metastatic disease. Journal of Clinical Oncology (abstract) 2007;25, No18S.

Gallina G., Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P, Biciato S, Bronte V. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells

J Clin Invest. 2006;116:2777-90

Bronte V, Cingarlini S, Marigo I, De Santo C, **Gallina G.**, Dolcetti L, Ugel S, Peranzoni E, Mandruzzato S, Zanovello P. Leukocyte infiltration in cancer creates an unfavorable environment for antitumor immune responses: a novel target for therapeutic intervention.

Immunol. Invest. 2006;35:327-57.

P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, S. Cingarlini, L. Dolcetti, **G. Gallina**, P. Zanovello, V. Bronte. Derangement of immune response by myeloid suppressor cells. Cancer Immunol. Immunother. 2004:64-72

RINGRAZIAMENTI

Approfitto di queste poche righe per ringraziare le persone che mi hanno permesso di arrivare alla fine di questa esperienza. Grazie al Prof. Basso, per la disponibilità che ha dimostrato in questi tre anni di dottorato. Un sentito ringraziamento al Dott. Dei Tos, Primario del Reparto di Anatomia Patologica dell'U.L.S.S. 9 di Treviso, per avermi dato la possibilità di collaborare con la sua equipe e di lavorare nel laboratorio di Patologia Molecolare.

Grazie alla Dott.ssa Rossi per l'apporto scientifico nell'ambito del progetto GIST ed alla Dott.ssa Toffolatti, responsabile del laboratorio di Patologia Molecolare, per il supporto nella stesura di questo lavoro.