

# REPORTING SCIENTIFICO ASSEGNO DI RICERCA

Periodo di attività: 01 Gennaio 2016 - 15 Settembre 2017

## **Titolo assegno di ricerca:**

Identificazione di miRNA e di proteine contenute negli esosomi rilasciati da cellule di sarcoma modificate per l'espressione di CD99.

## **Progetto di Riferimento:**

ID 15362 \_ AIRC 14049\_2013 responsabile scientifico dr.ssa Katia Scotlandi

**Presentato da:** Dott.ssa SELENA VENTURA

**Tutor:** Prof. GUIDO BIASCO

## **Background:**

Gli esosomi sono delle nanovesicole di 30-100 nm di diametro che trasportano al loro interno materiale biologico funzionalmente attivo come proteine, mRNA e miRNA e sono quindi in grado di trasmettere specifici segnali da una cellula parentale di origine alle cellule circostanti nel microambiente e a organi a distanza, attraverso il torrente circolatorio e linfatico. Sempre più interesse è volto allo studio del ruolo degli esosomi in condizioni fisiologiche e patologiche, il loro potenziale utilizzo in diagnosi e in terapia. Gli esosomi sono di origine endosomiale e sono descritti come vescicole intraluminali (ILV) di corpi multivescicolati (MVB) derivati dall'internalizzazione di porzioni della membrana di endosomi tardivi. Durante questo processo di biogenesi sono coinvolti il complesso ESCRT (Endosomal Sorting Complex Responsible for Transport), lipidi come la ceramide e le tetraspanine (CD63, CD9, CD81). Infine, gli esosomi sono rilasciati nello spazio extracellulare attraverso la fusione di questi MVB con la membrana plasmatica.

Gli esosomi giocano un ruolo importante nello scambio di informazioni tra cellule attraverso il trasporto di lipidi, proteine e acidi nucleici. In generale ci sono tre meccanismi con cui questo avviene: 1. Diretto contatto tra le proteine transmembrana degli esosomi e i recettori delle cellule target; 2. Fusione dell'esosoma con la membrana plasmatica della cellula ricevente e conseguente rilascio del cargo nel citosol; 3. Internalizzazione degli esosomi nella cellula ricevente e conseguente riciclo del materiale contenuto o possibile degradazione attraverso i lisosomi. Molteplici lavori hanno dimostrato il ruolo degli esosomi nella risposta immunitaria, tumorigenesi e progressione tumorale, nella chemioresistenza e nei disordini neurodegenerativi. Il costante incremento di conoscenze in questo campo ha indotto numerosi gruppi e aziende a investire in questa linea di ricerca. Di grande interesse è l'utilizzo di esosomi come biomarker in pazienti oncologici al fine di monitorare la malattia o la risposta alle terapie (Ref. 1-3) o la manipolazione di esosomi per trasportare in modo selettivo miRNA, siRNA o chemioterapici (Ref. 4-6).

### **Dati pregressi:**

Contestualmente al lavoro Ventura et al. Oncogene 2016 (Ref. 7) riguardante i meccanismi molecolari alla base del differenziamento neurale indotto dal silenziamento del CD99 nel sarcoma di Ewing (EWS), abbiamo ampliato le nostre evidenze circa il ruolo di esosomi esprimenti o meno la molecola CD99. Gli esosomi CD99-shRNA sono in grado di indurre nella cellula ricevente dei cambiamenti morfologici che ricordano quelli osservati dopo il silenziamento stabile della molecola CD99 attraverso RNA *interference*. Confrontando il fenotipo della linea parentale con quello indotto dalla fusione con esosomi CD99-shRNA, si osservano una reversione del fenotipo maligno e una induzione di differenziamento neurale.

### **Risultati ottenuti:**

Gli studi sono stati compiuti presso il CRS Sviluppo di Terapie Biomolecolari, Laboratorio di Oncologia Sperimentale, Istituti Ortopedici Rizzoli e hanno visto la partecipazione di collaboratori di altri Centri di Ricerca (Istituto Superiore di Sanità, Università di Ferrara, Università di Bologna, Centro Interdipartimentale di Ricerca sul Cancro "G. Prodi"). Globalmente in questi due anni di ricerca, abbiamo dimostrato che:

1. Dopo somministrazione di esosomi CD99-shRNA, le cellule di sarcoma di Ewing mostrano reversione del fenotipo maligno, in particolare: induzione del differenziamento neurale; minore proliferazione cellulare; minore attività trascrizionale di NF-kB e inibizione delle capacità migratorie.
2. Abbiamo valutato mediante tecnologia microarray Affymetrix. il profilo genico di cellule di sarcoma di Ewing dopo trattamento con esosomi CD99-shRNA.
3. Abbiamo analizzato l'espressione dei miRNA negli esosomi derivanti da cellule di sarcoma di Ewing silenziate o meno per CD99. In collaborazione con il laboratorio LTTA di Ferrara si è ibridato l'RNA su vetri Agilent, utilizzando la tecnica a un colore. Dal confronto fra i campioni CD99-shRNA con i campioni +CD99 si sono evidenziati 56 miRNA differenzialmente espressi, di cui 10 up-regolati e 46 down-regolati a seguito di silenziamento di CD99. Sono in corso studi di validazione di alcuni miRNA nei modelli sperimentali disponibili. Studi pregressi avevano già evidenziato per alcuni di questi miRNA un'associazione con la prognosi in una serie di pazienti di sarcoma di Ewing (Nakatani T, J Pathol, 2012).
4. Abbiamo dimostrato che il trattamento con esosomi CD99-shRNA su una linea di cellule mesenchimali umane non influenza le sue normali capacità differenzianti.
5. Inoltre abbiamo valutato la presenza del trascritto di fusione EWS-FLI1 negli esosomi rilasciati dalle cellule di sarcoma di Ewing con espressione modificata per CD99 e dopo fusione di esosomi CD99-shRNA in cellule mesenchimali. Dopo la fusione, non è osservabile alcuna presenza della proteina o dell'RNA messaggero di EWS-FLI1. Ci siamo perciò interrogati se l'assenza di EWS-FLI1 nelle cellule

riceventi fosse dovuta a un limite di sensibilità della Real-Time PCR o a una reale assenza del trascritto di fusione. Per stiamo valutando l'applicazione di una tecnica molto più sensibile e precisa quale la Digital-PCR: sono in corso le analisi per la definizione di una procedura standard volta a valutare espressione di EWS-FLI negli esosomi

6. Sono state infine avviate le procedure tecniche per studiare il cargo proteico degli esosomi derivanti da cellule modificate per l'espressione di CD99. Questo aspetto viene studiato in collaborazione con il gruppo di A. Carè presso ISS, Roma.

Nello specifico:

#### **1a. Esosomi CD99-shRNA inducono differenziamento neurale.**

Gli effetti in precedenza osservati solo su due modelli sperimentali (TC-71 e IOR/CAR) sono stati condotti su un più ampio pannello di linee cellulari rappresentativo di tutti i tumori appartenenti alla famiglia del sarcoma di Ewing. Esosomi isolati da cellule di EWS silenziate stabilmente per CD99 sono in grado di indurre differenziamento neurale in un pannello di sei linee cellulari di sarcoma di Ewing. Inoltre, esosomi ricchi di CD99, prodotti da cellule maligne, reversione il fenotipo differenziato di cellule knockdown (KO) per CD99.

#### **1b. Esosomi CD99-shRNA inducono un blocco della proliferazione cellulare.**

Quando cellule di EWS sono trattate con esosomi CD99-shRNA si osserva una significativa riduzione della capacità proliferativa, valutata come espressione del marcatore Ki-67, proteina nucleare presente quando la cellula è allo stadio d'interfase, e perciò strettamente connessa alle capacità di crescita. Il blocco della proliferazione cellulare non è accompagnato da induzione di morte cellulare in seguito a processi apoptotici. Nelle cellule riceventi è stata valutata sia l'incorporazione dello ioduro di propidio, (3,8-diammino-5-dietilmetilamminopropil-6-fenilfenantridin diioduro) (PI), un colorante sintetico caratterizzato da una bassa fluorescenza (rosso-arancio), in grado di legarsi stechiometricamente agli acidi nucleici ed emettere fluorescenza nel rosso nel caso in cui la membrana cellulare non sia integra (cellule morte), sia la positività all'annessina fluorescinata. In questo saggio si sfrutta la capacità dell'Annessina, proteina Calcio dipendente con forti proprietà anticoagulanti, di legarsi alla fosfatidilserina, un fosfolipide che normalmente si trova nel lato interno della membrana cellulare e che viene esposto all'esterno della cellula durante l'apoptosi. Gli esperimenti condotti hanno evidenziato che non ci siano differenze significative di mortalità tra le cellule controllo e le cellule che hanno ricevuto gli esosomi CD99-shRNA.

#### **1c. Esosomi CD99-shRNA riducono l'attività trascrizionale di NF-kB.**

Parallelamente al fenotipo differenziato, gli esosomi CD99-shRNA sono in grado di indurre nelle cellule riceventi gli stessi meccanismi molecolari precedentemente osservati dopo il silenziamento stabile di CD99, tra cui la ridotta attività del fattore trascrizionale NF-kB. Questo risultato supporta ulteriormente come la somministrazione degli esosomi sia in grado di mimare quanto osservato con modifiche dell'assetto genico della cellula attraverso pratiche non usabili in terapia oncologica, come la trasfezione con vettori di espressione. La

fusione con esosomi CD99-shRNA provoca una riduzione dell'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B nelle cellule riceventi.

#### **1d. Esosomi CD99-shRNA inibiscono la capacità migratoria.**

Il trattamento con esosomi CD99-shRNA è inoltre in grado di modulare i meccanismi associati all'aggressività tumorale quali la migrazione cellulare. La capacità migratoria delle cellule che hanno ricevuto gli esosomi CD99-shRNA risulta drasticamente inibita e rallentata. Al contrario, il trattamento con esosomi ricchi di CD99 promuove la migrazione di cellule differenziate.**2. Valutazione dell'espressione genica dopo trattamento con esosomi CD99-shRNA**

Al fine di valutare l'effetto degli esosomi privi di CD99 sull'espressione genica delle cellule riceventi, abbiamo indotto cellule di TC-71 a differenziamento neurale, nelle consuete modalità, dopo fusione con esosomi CD99-shRNA, abbiamo successivamente estratto l'RNA e abbiamo valutato l'espressione genica con tecnologia microarray Affymetrix. Le analisi di clustering hanno evidenziato diversi geni differenzialmente espressi nelle cellule di EWS trattate con esosomi CD99-shRNA sia rispetto alle cellule parentali TC-71, sia verso le cellule TC-CD99-shRNA. Molti di questi geni non hanno funzione nota, si è però proceduto ugualmente con l'analisi di enrichment con la piattaforma GeneGo MetaCore, che ci ha permesso di identificare i pathway e processi differenzialmente coinvolti nei campioni in esame. Queste analisi hanno evidenziato la regolazione di vie di segnalazione associate al differenziamento cellulare e alla regolazione dei miRNA. Dai dati ottenuti possiamo asserire che il trattamento con esosomi CD99-shRNA porta a modificazioni cellulari a carico del differenziamento e che il processo passa attraverso una regolazione dell'espressione genica.

#### **3. Identificazione dei miRNA contenuti in esosomi +/-CD99 con miRNA-Microarray Agilent.**

Con l'obiettivo di identificare il cargo di esosomi esprimenti o meno la molecola CD99, abbiamo estratto l'RNA degli esosomi derivati da TC-71 e cellule TC-CD99-shRNA. In collaborazione con il laboratorio LTITA di Ferrara si è ibridato l'RNA su vetri Agilent, utilizzando la tecnica a un colore. Importante ai fini di una corretta analisi dei dati sono i parametri di background e flag; il primo indica il segnale di fondo dello spot che deve essere sottratto, mentre il flag indica l'intensità del segnale e la sua affidabilità. Sono ambedue valori che forniscono informazioni sulla qualità del segnale rilevato e devono essere normalizzati per permettere il confronto fra esperimenti differenti senza incorrere in errori procedurali o dovuti alle diverse condizioni sperimentali. I dati ottenuti sono stati normalizzati con normalizzazione quantilica e trasformati in base logaritmica utilizzando il software GeneSpring GX 11 (Agilent Technologies). Le sonde di scarsa qualità (flag nullo o marginale) sono state escluse dalle analisi successive.

Confrontando i campioni CD99-shRNA con i campioni +CD99 si sono evidenziati 56 miRNA differenzialmente espressi, di cui 10 up-regolati e 46 down-regolati negli esosomi prodotti da TC-CD99-shRNA rispetto agli esosomi prodotti da TC-71. Abbiamo in seguito validato un sottogruppo di questi miRNA anche in un secondo

modello sperimentale silenziato per CD99 (IOR/CAR-CD99-shRNA model). L'analisi di functional annotation ha mostrato che questi miRNA differenzialmente espressi sono implicati in processi chiave nella patogenesi del sarcoma di Ewing come: CYTOSKELETON AND MEMBRANE ORGANIZATION, REGULATION OF VESICULAR TRANSPORT, NEURON DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION e la più generica CANCER MODULATION.

Ci siamo poi concentrati su due microRNA, che da letteratura sappiamo essere correlati a processi di metastatizzazione e malignità. Ai fini di eseguire studi funzionali abbiamo poi over-espresso a diversi tempi questi due miRNA in cellule tumorali di EWS. Sono al momento in corso esperimenti volti a studiare il ruolo di questi due miRNA nel sarcoma di Ewing nei processi di differenziamento neurale, migrazione e rispetto all'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B.

Inoltre, abbiamo valutato l'espressione dei due microRNA in una casistica di 45 campioni derivati da pazienti con sarcoma di Ewing trattati presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli, di cui 35 campioni primitivi e 10 campioni di metastasi. Dalle analisi si è osservato che questi microRNA sono espressi in modo significativamente minore nei campioni di metastasi rispetto ai campioni di tumore primitivo localizzato, andando a rafforzare l'ipotesi che questi microRNA abbiano un ruolo oncosoppressivo nel sarcoma di Ewing.

#### **4. Valutazione del differenziamento neurale e osteoblastico in cellule mesenchimali staminali dopo fusione con esosomi CD99-shRNA.**

Al fine di valutare la specificità del trattamento con esosomi CD99-shRNA, sono stati valutati gli eventuali effetti tossici, o di modulazione del differenziamento dopo la fusione. Per fare ciò sono state utilizzate cellule mesenchimali staminali umane (hMSC), cellule totipotenti in grado di differenziare in diversi lineage. Abbiamo perciò indotto il differenziamento neurale e osteoblastico su cellule mesenchimali staminali umane dopo esposizione con esosomi privi di CD99. A diversi time-point dall'inizio del trattamento con terreno differenziante sono state fissate le cellule per le successive valutazioni di differenziamento neurale con IF di  $\beta$ -III tubulin e valutazioni del differenziamento osteoblastico con colorazioni in grado di identificare la presenza di mineralizzazione ossea (ALP e ARS staining). I risultati ottenuti hanno dimostrato una capacità differenziante delle cellule mesenchimali, senza però alcuna differenza tra i controlli e le cellule che hanno ricevuto gli esosomi. Il trattamento con esosomi CD99-shRNA non ha evidenziato alcun effetto tossico sulle cellule normali, né sono stati evidenziati effetti sulle normali capacità proliferative e differenziative delle cellule.

#### **5. Valutazione della presenza del trascritto di fusione EWS-FLI1 in cellule mesenchimali dopo trattamento con esosomi CD99-shRNA.**

In seguito alla caratterizzazione del cargo degli esosomi prodotti da cellule TC-CD99-shRNA si è riscontrato al loro interno il prodotto di fusione genica derivante dalla traslocazione cromosomica specifica (EWS-FLI1), che è

l'evento oncogenico primario del sarcoma di Ewing. Ci siamo dunque chiesti se dopo la fusione con esosomi CD99-shRNA, EWS-FLI1 fosse rilasciato all'interno delle cellule riceventi e fosse quindi rilevabile. Abbiamo trattato cellule mesenchimali staminali con esosomi CD99-shRNA e abbiamo valutato l'espressione di EWS-FLI1 come RNA messaggero e come proteina. Dopo la fusione, non è osservabile alcuna presenza della proteina o dell'RNA messaggero di EWS-FLI1. Ci siamo perciò interrogati se l'assenza di EWS-FLI1 nelle cellule riceventi fosse dovuta a un limite di sensibilità della Real-Time PCR o a una reale assenza del trascritto di fusione. Per questo ci siamo approcciati a una tecnica molto più sensibile e precisa quale la Digital-PCR e sono tuttora in corso le analisi volte a chiarire questo aspetto. **Prospettive future**

In conclusione, gli esosomi che derivano da cellule di sarcoma di Ewing privi della molecola CD99 sono in grado di indurre nelle cellule tumorali riceventi dello stesso tumore e di tumori diversi modificazioni significative del fenotipo tumorale. Studi preliminari hanno indicato un'azione differenziale fra le cellule tumorali di sarcoma di Ewing e cellule normali. Questi studi richiedono però per arrivare a conclusioni certa un'estensione delle osservazioni su altre tipologie di cellule normali in vitro e soprattutto necessitano di un'estensione in modelli animali nei quali sia quindi possibile stabilire l'effettiva assenza di tossicità e il reale potenziale terapeutico delle osservazioni fin qui ottenute.

#### **Reference:**

1. Fesler A, Jiang J, Zhai H, Ju J: Circulating microRNA testing for the early diagnosis and follow-up of colorectal cancer patients. *Mol Diagn Ther* 2014, 18:303-308.
2. Hessvik NP, Phuyal S, Brech A, Sandvig K, Llorente A: Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1819:1154-1163.
3. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JW, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, Kuslich C, Visakorpi T, Hamdy FC: Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer* 2012, 106:768-774.
4. Zhao L, Liu W, Xiao J, Cao B: The role of exosomes and "exosomal shuttle microRNA" in tumorigenesis and drug resistance. *Cancer Lett* 2015, 356:339-346.
5. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhani S, Wood MJ: Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 2011, 29:341-345.
6. Zocco D, Ferruzzi P, Cappello F, Kuo WP, Fais S: Extracellular vesicles as shuttles of tumor biomarkers and anti-tumor drugs. *Front Oncol* 2014, 4:267.
7. Ventura S, Aryee DN, Felicetti F, De Feo A, Mancarella C, Manara MC, Picci P, Colombo MP, Kovar H, Carè A, Scotlandi K. CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-

Notch-mediated control of NF- $\kappa$ B signaling. *Oncogene*. 2016 Jul 28;35(30):3944-54. doi: 10.1038/onc.2015.463. Epub 2015 Nov 30.