

PLEURAL MESOTHELIOMA: RESEARCH OF MECHANISMS INVOLVED IN CARCINOGENESIS. ROLE OF CD10

MESOTELIOMA PLEURICO: RICERCA DI MECCANISMI COINVOLTI NELLA CANCEROGENESI. IL RUOLO DEL CD10

Authors

Nano Ennio¹, Erra Stefania², Martinotti Simona¹, Ranzato Elia¹

¹ Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Alessandria, Italy

² Dipartimento di Anatomia Patologica, Ospedale "S. Spirito" ASLAL, Casale Monferrato, Italy

Original article

Key words: Pleural Mesothelioma, CD10, Epithelial-To-Mesenchymal Transition (EMT), Immunohistochemistry, qRT-PCR, Haddock 2.4

ABSTRACT

Objectives: Present study was conducted at Surgical Pathology Department of "Santo Spirito" hospital in Casale Monferrato (AL) and in collaboration with the Cellular Biology and Physiology laboratory located in the institution of DiSIT-Università del Piemonte Orientale. In the pathology facility a retrospective analysis on the immunohistochemical expression of CD10 marker in malignant pleural mesothelioma was delineated. For this purpose it was collected a sample of 63 pleural biopsies with a diagnosis of pleural mesothelioma come in the period of Januar 2015 and November 2020. In this cohort CD10 expression was assess from a prognostic perspective and in relation to morphologic aspects of the neoplasm. Results from previous analysis built the basis of the experiment conducted in the DiSIT facility. Two pleural mesothelioma cell lines, REN and MM98, got incubated with the cytokine TGF- β aiming to analyze the potential relationship between epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and CD10 cell expression pattern. Bioinformatic server Haddock 2.4 helped to predict and model potential cross-talk between EMT underlying pathways and CD10 signalling.

OBJECTIVES

Present study aimed to assess prognostic role of CD10 immunohistochemical expression in a cohort of patients affected by pleuar mesothelioma. Second goal was to analyze the relationship between CD10 biopsy expression, phenotypical and imunophenotypical features (referring in particular to PDL-1 expression) of the neoplasm. Results from these retrospectal analysis established next aim of the study: induction of EMT in two mesothelioma cell lines, REN and MM98, and analysis of change in CD10 cellular pattern. Final goal was to predict a potential cross-talk between EMT related pathways and CD10 activity based on bioinformatic server Haddock 2.4.

METHODS

Immunohistochemical analysis of biopsies and cell cultures were processed on Ventana Benchmark immunostainer. Tools adopted in qRT-PCR of cell cultures were: Power Sybr Green Mastermix probes (Ambion Austin, TX, USA) and KiCqStart®SYBR®Green primers (Sigma-Aldrich); Real-Time PCR CFX384 detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Gene expression was measured with $\Delta\Delta C_t$ method. Parametrization of CD10 immunohistochemical expression was accomplished with cell imaging software CellProfiler 3.1.9. Stastical analysis were ran with R software version 3.6.2.

RESULTS

CD10 showed to be a negative prognostic factor, positively associated to neoplastic grade, in the cohort of patients analyzed. Induction of EMT in REN and MM98 TGF- β treated cultures, augmented CD10 cytosolic expression against non-treated cultures. Specifically, a change in CD10 immunoexpression pattern, from membranous to cytosolic, was observed for EMT+ REN cell culture. This data agrees with prevalent CD10 cytosolic expression observed in mesothelioma with low differentiation, where differentiation represents a function of EMT. Furthermore, Haddock data highlighted a potential promotion of EMT by CD10 via a NF- κ B interaction. CD10 could establish a positive feedback loop with EMT.

CONCLUSION

CD10 represents a positive marker of neoplastic progression in pleural mesothelioma that, based on its expression level, can stratify survival. Experimental data showed that CD10 could be upregulated by EMT pathways. Bioinformatic analysis also suggest that CD10 could interact with EMT establishing a positive feedback loop. Clarifying tumorigenicity of CD10 in mesothelioma is fundamental to define its possible therapeutic role.

ABSTRACT

Il suddetto studio è stato condotto presso il servizio di Anatomia Patologica dell'Ospedale "Santo Spirito" di Casale Monferrato (AL) ed in collaborazione con il laboratorio di Fisiologia e Biologia Cellulare del DiSIT-Università del Piemonte Orientale. Presso l'Anatomia Patologica si è svolta un'analisi retrospettiva dell'espressione immunoistochimica del marcatore CD10 in un campione di 63 reperti biotipici di mesotelioma pleurico, diagnosticati nel periodo Gennaio 2015 - Novembre 2020. In tale coorte di pazienti l'espressione del CD10 è stata inquadrata dal punto di vista prognostico e dei caratteri istologici della neoplasia. I risultati della precedente analisi hanno costituito i presupposti dello studio sperimentale svolto presso il laboratorio di Fisiologia e Biologia Cellulare. Due linee cellulari di mesotelioma pleurico, rispettivamente REN e MM98, sono state incubate con la citochina TGF- β ai fini di indagare la relazione tra il processo di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) ed il pattern di espressione del CD10. Il server bioinformatico Haddock 2.4 ha permesso di predire l'interazione alla base della modulazione della EMT da parte del CD10. Lo scopo dello studio è stato quello di vagliare il ruolo prognostico dell'espressione immunoistochimica del CD10 in una coorte di pazienti affetti da mesotelioma pleurico. Lo studio ha proceduto quindi con l'analisi della relazione tra espressione del CD10 e caratteri fenotipici ed immunofenotipici (con particolare riferimento all'espressione del marcatore PDL-1) della neoplasia. I risultati delle precedenti analisi hanno delineato il secondo obiettivo dello studio, ovvero analizzare la modulazione del pattern di espressione del CD10 in funzione dell'induzione di un modello di EMT nelle linee cellulari di mesotelioma REN e MM98. Il terzo obiettivo di studio ha riguardato la predizione del segnale modulato dal CD10 e contestuale alla promozione del processo di EMT mediante server Haddock 2.4.

METODOLOGIA

Le analisi immunoistochimiche su reperti biotipici e colture cellulari sono avvenute mediante immunocolore Ventana Benchmark. La qRT-PCR su colture è stata effettuata usando la Power Sybr Green Mastermix (Ambion Austin, TX, USA) e i primers KiCqStart®SYBR®Green (Sigma-Aldrich) in un sistema di rilevazione Real-Time PCR CFX384 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). L'espressione genica è stata misurata

con il metodo $\Delta\Delta Ct$. La parametrizzazione dell'espressione del marcatore CD10 è avvenuta mediante software CellProfiler 3.1.9. Le analisi statistiche del caso sono state condotte mediante software R 3.6.2.

RISULTATI

Nella coorte analizzata il CD10 è risultato fattore di prognosi negativo ed associato al dedifferenziamento neoplastico. L'induzione sperimentale della EMT ha determinato un incremento dell'espressione citosolica del CD10 nelle colture REN e MM98 in confronto, rispettivamente, ai controlli non trattati con TGF- β delle stesse. Si è apprezzato in particolare una modifica del pattern di espressione di CD10, da prevalentemente plasmalemmatico a citosolico, per la linea REN in EMT. Il dato si accorda con un'espressione citosolica del CD10 prevalente nei reperti biotipici a scarsa differenziazione, sinonimo di EMT. Secondo i dati bioinformatici di Haddock, inoltre, il CD10 potrebbe promuovere il fenomeno di EMT tramite l'attivazione del complesso NF-kB. Sussisterebbe quindi un rapporto bidirezionale tra CD10 e EMT.

CONCLUSIONI

Il CD10 è un marcatore di progressione neoplastica nel mesotelioma pleurico ed in grado di stratificarne la prognosi sulla base della relativa espressione. Il CD10 risulta essere sovraregolato dal processo di EMT e contestualmente a quest'ultimo potrebbe determinarne un'amplificazione nel mesotelioma pleurico. Chiarire il ruolo tumorigenico del CD10 nel mesotelioma è la base per inquadrarlo come un nuovo possibile target terapeutico.

INTRODUZIONE

CD10

Il CD10 è una metalloproteasi, del peso di 100 kDa, appartenente alla famiglia delle peptidasi M13. Tale peptidasi è localizzata a livello della membrana plasmatica e classificata come proteina transmembrana di tipo II (Pesando JM et al, 1979). L'espressione del CD10 è ubiquitaria nell'organismo; la proteina si localizza: nel duodeno, nel polmone, nella prostata, nel rene, nelle ghiandole surrenaliche e nel sistema nervoso. Il CD10 risulta altresì espresso in differenti nicchie staminali tissutali ove, pertanto, la proteina costituisce un marcatore di staminalità cellulare. A tal riguardo l'espressione del CD10 si identifica nella nicchia staminale duodenale e nella nicchia emopoietica (in particolare nella linea maturativa dei linfociti B). L'ubiquitarità del CD10 ne riflette l'eterogeneità di funzioni biologiche regolate. Tali regolazioni si delineano nell'attività di clivaggio ed inattivazione di differenti peptidi substrato di CD10. Il dominio catalitico di CD10, C-terminale, si caratterizza di una tasca di legame di 20 Å, in grado di accogliere peptidi di circa 20-30 amminoacidi. Il sito attivo del CD10 si compone di un residuo di glutammato, affiancato da due residui istidinici coordinati con il cofattore Zn²⁺. Il CD10 opera un clivaggio in corrispondenza di due residui idrofobici. Tra i substrati di CD10 si annoverano: endotelina-1; bradichinina; tachichinina; ANP; differenti interleuchine (Deepshikha M et al, 2011). L'espressione del CD10 è stata identificata in diverse tipologie di tumore, sia di natura solidi che liquida, ove ha mostrato un significato clinico e biologico non univoco (Maguer-Satta V et al, 2016).

EMT: TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è un processo mediante il quale una cellula dal fenotipo epiteliale acquista caratteri morfologici propri della cellula mesenchimale. L'EMT si suddivide in tre tipologie in base al contesto nella quale si esplica. (Thiery JP et al, 2009) Si distinguono: un'EMT di tipo I, contestuale all'embriogenesi; un'EMT di tipo II, coinvolta nella rigenerazione tissutale; un'EMT di tipo III, descritta nei tumori. (Thiery JP et al, 2006) L'EMT di tipo III, nei tumori maligni, è alla base della progressione neoplastica. Di specifico l'EMT di tipo III manifesta caratteri di invasività, migrazione cellulare e di staminalità neoplastica propri di cloni tumorali con competenza metastatica (Thiery JP et al, 2009). Da un punto di vista molecolare l'EMT di tipo III è orchestrata da differenti vie di trasduzione: la via di TGF- β ; la via di Ras/MAPK; la via di Wnt e Notch; la via di HIF-1 α . (Micalizzi DS et al 2010) Le suddette vie di trasduzione sovraregolano l'espressione delle proteine mesenchimali N-caderina, fibronectina e vimentina mentre sottoregolano l'espressione delle proteine epiteliali occludine, claudine ed E-caderina (De Craene B et al, 2013). L'EMT si esplica secondo uno spettro di azione continuo, per il quale, il grado di EMT una cellula neoplastica dipende: dalla tipologia di molecole segnale coinvolte, dalla loro concentrazione e tempo di azione; fattori epigenetici e mutazionali interessanti la cellula neoplastica in EMT.

METODI

Presso il servizio di Anatomia Patologica dell'Ospedale S. Spirito di Casale M.to sono stati raccolti 63 reperti biotipici di mesotelioma pleurico diagnosticati tra Gennaio 2015 e Novembre 2020.

46 mesoteliomi afferivano all'istotipo epitelioido, 13 al bifasico e 4 al sarcomatoso. I suddetti reperti sono stati testati per l'analisi immunohistochimica, condotta con immunocoloratore Ventana Benchmar, per i marcatori CD10 (mAb SP179) e PDL-1 (mAb SP263). 61 reperti su 63 sono risultati positivi per l'espressione di CD10 mentre 45 su 63 sono risultati positivi per l'espressione di PDL-1. 2/3 campi ottici per caso testato con CD10 sono stati acquisiti mediante lo slide scanner Roche Ventana DP 200. L'espressione del CD10, data la relativa eterogeneità nel campione analizzato, è stata parametrizzata in unità di densità ottiche (OD), in un intervallo 0-1, mediante l'ausilio del software di imaging CellProfiler 3.1.9. Le peculiari funzioni del software "Rescale Intensity", "Identify Primary Objects", "Identify Secondary Objects" e "Measure image Intensity", raccolte in una pipeline, hanno permesso, rispettivamente: il confronto intercasistica dei campi ottici; la discriminazione delle strutture neoplastiche rispetto allo stroma; il calcolo dell'intensità media di ogni campo ottico (Lamprecht MR et al, 2007). L'espressione di PDL-1 è stata invece parametrizzata mediante una metodica di scoring tradizionale basata sulla percentuale di tessuto neoplastico positivo. Il parametro calcolato per CD10 quindi è stato inquadrato clinicamente secondo l'analisi di curve di sopravvivenza Cox uni/multi-variate. Si è perciò analizzata la correlazione tra parametro CD10 e PDL-1 mediante test di Spearman. Si è infine confrontata l'espressione di CD10 e PDL-1, mediante test di Welch e di Wilcoxon, a partire dal gruppo di mesotelioma epitelioidi ed il gruppo a componente sarcomatoso. Le analisi statistiche sono state condotte con software R 3.6.2. (R Core Team, 2019) I risultati del suddetto studio clinico hanno costituito la base del disegno sperimentale condotto presso il laboratorio di Fisiologia e Biologia cellulare del DiSIT.

Le cellule di mesotelioma (linee REN e MM98) sono state incubate a 37 °C, al 5% di CO₂ in terreno di coltura DMEM (ad alto contenuto di glucosio, 4,5 g/L), con aggiunta del 10% di FBS, 200 mM L-glutamina, 100 U/mL di penicillina e 100 mg/mL di streptomina. Al momento dell'utilizzo, le cellule sono state staccate dalle piastre mediante lavaggio con PBS-EDTA (5 minuti) e successivamente incubate a 37 °C con 2 mL di tripsina diluita 1:10 dalla soluzione madre commerciale (tripsina 5.0 g/L e EDTA-4 Na 2.0 g/L in NaCl 0.9%, soluzione 10X). La tripsina è stata quindi inattivata con aggiunta di 5 mL di terreno DMEM. In seguito, le cellule in sospensione sono state centrifugate a 1100 rpm per 5 minuti e il pellet così ottenuto è stato risospeso in circa 2 mL di terreno. La tripsina è stata quindi inattivata con aggiunta di 5 mL di terreno DMEM.

La densità cellulare nelle colture è stata stimata mediante conteggio al microscopio invertito (Leica Microsystems) utilizzando la camera contaglobuli di Neubauer. (Ranzato E et al, 2011)

Si sono allestiti in particolare 10 campioni colturali: 5 per la linea di mesotelioma epitelioido REN e altrettante per la linea di mesotelioma sarcomatoso MM98. Per ogni linea cellulare due campioni sono stati incubati con una concentrazione di 10 ng/μl di citochina TGF-β, altri due con una concentrazione di 44 ng/μl, mentre il quinto campione ha costituito il controllo. Il rapporto tra concentrazione di TGF-β e n° di cellule piastrate era equivalente per le due tipologie colturali di trattamento. Per ogni coppia di trattamento si è provveduto quindi a incubare il TGF-β rispettivamente per 24 e 72 ore. Le coppie di campioni trattate con 10 ng/μl di citochina sono state analizzate in qRT-PCR. La qRT-PCR è stata effettuata usando la Power Sybr Green Mastermix (Ambion Austin, TX, USA) e i primers KiCqStart®SYBR®Green (Sigma-Aldrich) in un sistema di rilevazione Real-Time PCR CFX384 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). È stata misurata, con il metodo ΔΔCt, l'espressione genica dei marcatori epiteliali *CDH1*, *OCLN1* e mesenchimali *MMP3*, *MMP9* e *VIM*.

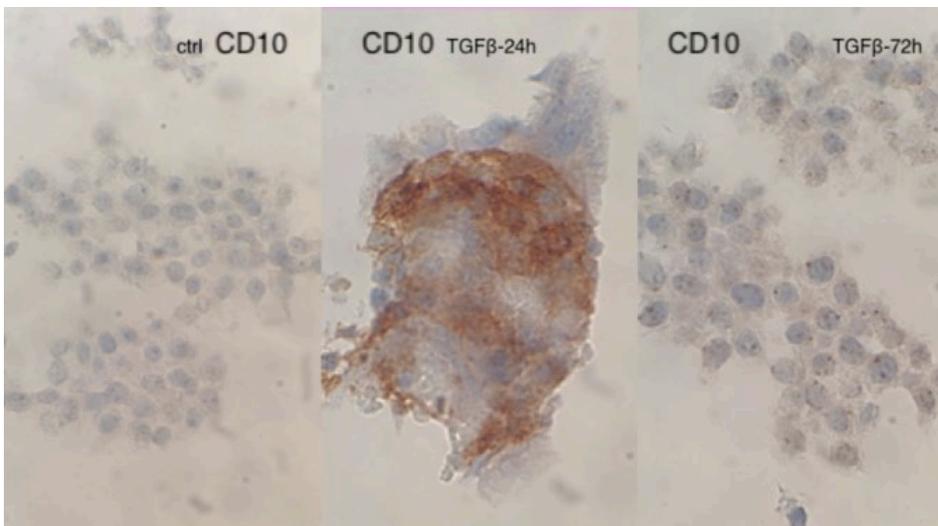
L'analisi immunohistochimica dei marcatori α-SMA (mAb SP171), E-caderina (mAb SP64), calretinina (mAb SP13) e podoplanina (mAb D2-40) è stata condotta sulle coppie di campioni incubate con una concentrazione di TGF-β pari a 44 ng/μl. L'analisi immunohistochimica di CD10, PDL-1 e CD44 (mAb SP37) è stata condotta per valutare la relazione tra: pattern di espressione del CD10, EMT e staminalità neoplastica. La predizione del complesso di interazione in silico CD10/NF-κB è stata condotta mediante il server bioinformatico Haddock 2.4.

RISULTATI

Secondo l'analisi della regressione Cox il CD10 costituisce un marcatore di prognosi negativa nel mesotelioma, caratterizzato da un incremento del rischio relativo di 14 volte di decesso per aumento unitario del parametro OD di CD10 stesso. Il dato qui riportato è corroborato da significatività statistica con $p=0.0182$. Il CD10 ha costituito inoltre un marcatore prognostico indipendente nel mesotelioma come evinto da un'analisi Cox multivariata condotta considerando i parametri di età, istotipo e sesso. L'evidenza è corroborata da una maggior significatività statistica rispetto all'analisi multivariata con $p=0.00798$.

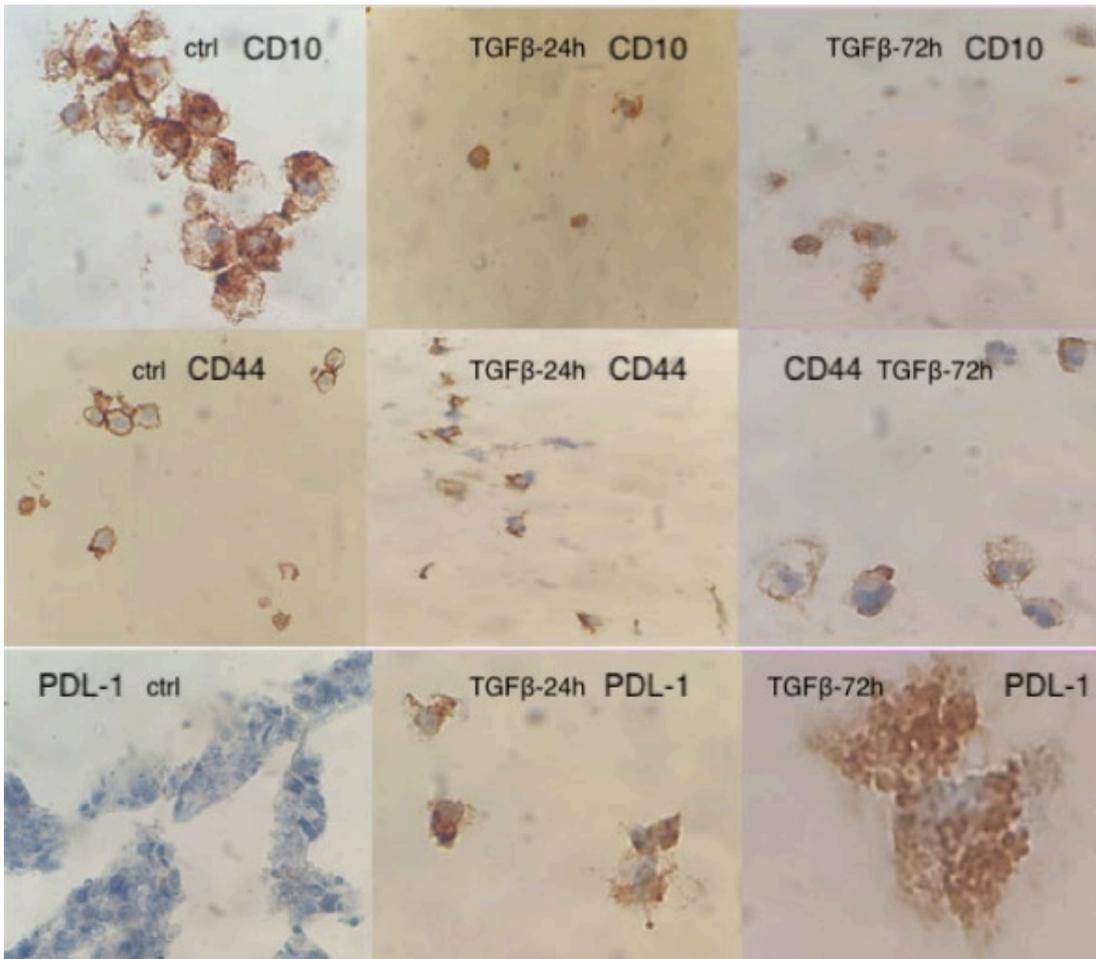
L'analisi di correlazione condotta per le variabili CD10 e PDL-1 con metodo Spearman ha riportato un indice di correlazione moderato $\rho=0.47$, supportato da un'importante significatività statistica con $p=9.727 \times 10^{-5}$. Il limite di tale indagine riguarda l'impossibilità di stabilire un rapporto di causa-conseguenza tra le due variabili. L'analisi bibliografica di vie di trasduzione del segnale inoltre non ha evidenziato in apparenza influenze dirette e reciproche tra CD10 e PDL-

1. Si è optato quindi per identificare un terzo parametro, correlato con CD10 e PDL-1 ed in grado di influenzare l'associazione di queste ultime. Il fenotipo neoplastico ha rappresentato un candidato ideale per spiegare la correlazione tra CD10 e PDL-1. Tale ipotesi è stata inquadrata mediante un test di confronto dell'espressione di CD10 e PDL-1 tra gruppi ad istotipo epitelioido ed a componente sarcomatosa. Per entrambi i parametri si è osservata un'espressione maggiore a carico del gruppo di mesoteliomi a componente sarcomatosa, supportata da significatività statistica: $p=0.0318$ per CD10 e $p=0.01079$ per PDL-1. Il dedifferenziamento neoplastico risulta quindi alla base della parziale correlazione tra CD10 e PDL-1. Secondo uno studio di Fassina et al. il dedifferenziamento/fenotipo neoplastico è funzione del fenomeno di transizione epitelio-mesenchimale. In tale studio è infatti evidenziabile come al dedifferenziamento dell'istotipo di mesotelioma considerato corrisponda una crescente espressione dei fattori di regolazione dell'EMT ZEB1/2, SNAI1/2 e TWIST1. (Ambrogio Fassina et al, 2011). La co-sovraregolazione di CD10 e PDL-1 nel mesotelioma potrebbe quindi manifestarsi contestualmente all'attivazione di vie di trasduzione connesse all'EMT. I risultati del disegno sperimentale, condotto sulle linee REN e MM98, sembrano supportare l'ipotesi di cui sopra. L'analisi immunohistochimica della proteina CD10, su linea MM98, ne evidenzia un incremento dell'espressione citosolica, per la coltura trattata con TGF- β per 24h, rispetto al controllo per il quale non è apprezzabile l'espressione del CD10. Si riportano, in serie, le micrografie di immunohistochimica del CD10 su linea MM98 per: coltura di controllo (a sinistra); coltura trattata a 24h con TGF- β (centrale); coltura trattata a 72h con TGF- β (a destra).



Per la linea MM98, tuttavia, il trattamento con TGF- β non ha determinato un incremento dell'espressione dei marcatori PDL-1 e CD44, inespressi a partire dalla coltura di controllo.

Nella linea REN la coltura di controllo ha mostrato l'espressione immunohistochimica di CD10 (in prevalenza a livello del plasmalemma) e CD44. Il trattamento con citochina TGF- β (per le due colture di trattamento) ha determinato su linea REN una variazione nel pattern di espressione immunohistochimico del CD10, da plasmalemmatico a citosolico, ed un incremento dell'espressione del PDL-1, inespresso nel controllo. Il CD44 non ha mostrato invece variazione di espressione nelle colture di trattamento della linea REN. Si riportano di seguito le micrografie immunohistochimiche di linea REN per i marcatori CD10, CD44 e PDL-1 su: coltura di controllo (a sinistra); coltura di trattamento a 24h (centrale); coltura di trattamento a 72h (a destra).

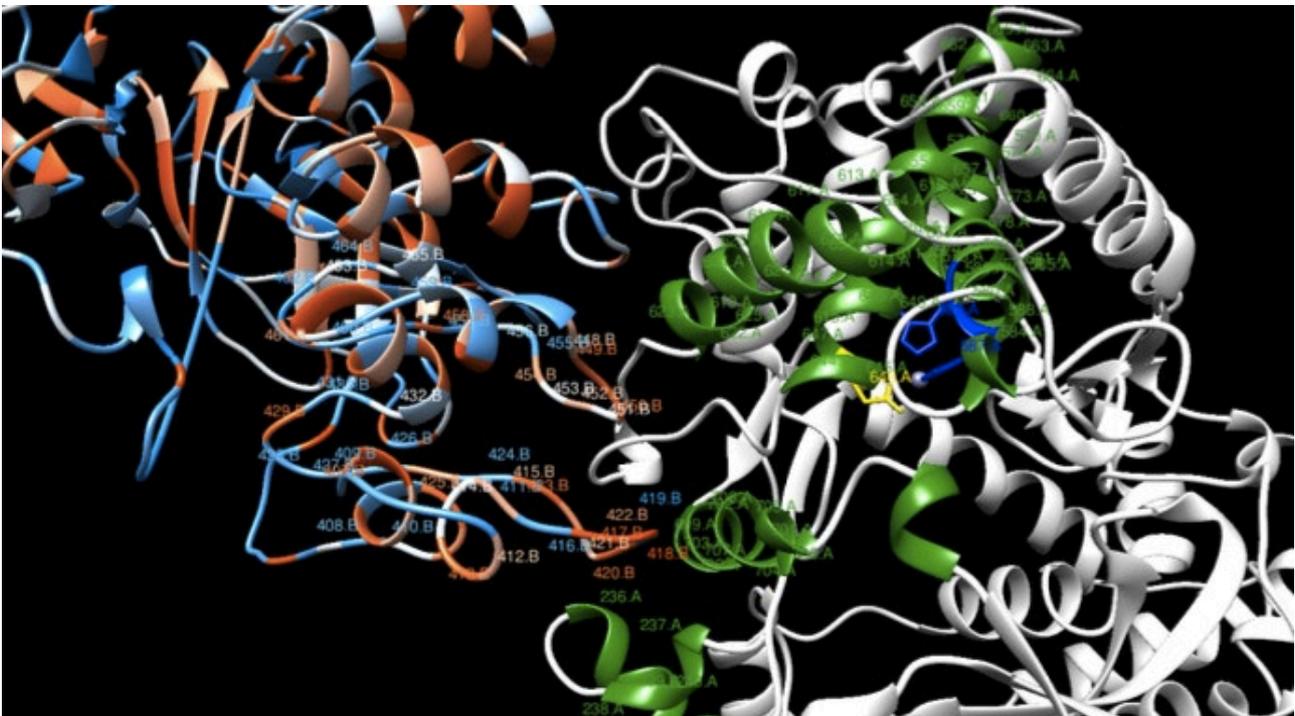


L'incremento dell'espressione citosolica del CD10, su linea REN e su linea MM98, costituisce potenzialmente lo "switch" dell'attività biologica del CD10 da anti-tumorigenica a pro-tumorigenica ed in particolare pro-EMT. Questa ipotesi è corroborata dallo studio condotto da Lee KW et al. su linea colturale di carcinoma esofageo. Il team ha infatti evidenziato un'accentuata espressione di caratteri propri dell'EMT quali: invasione, migrazione cellulare e staminalità neoplastica nei cloni CD10+ rispetto ai cloni CD10-. Nei cloni CD10+ si è potuto inoltre apprezzare un'espressione del CD10 in compartimenti endosomiali citosolici mediante immunofluorescenza. Il silenziamento post-trascrizionale di CD10 e l'inibizione farmacologica del relativo dominio catalitico su coltura hanno attenuato i precedenti caratteri di EMT confermando il ruolo pro-tumorigenico del CD10 stesso (Lee KW et al, 2015). Questi ultimi dati hanno rappresentato i presupposti dell'analisi di "docking", condotta mediante server Haddock 2.4, al fine di predire i domini di interfaccia del complesso CD10/NF-kB. La scelta di NF-kB quale target di CD10 è dipesa dalla considerazione che, secondo i dati di Lee KW et al., CD10 promuove l'EMT clivando una proteina potenzialmente inibitoria di un pathway di trasduzione. La scelta è stata anche effettuata in rapporto al ruolo appurato di NF-kB quale bersaglio di regolazione di TGF- β e in ragione del fatto che NF-kB promuove l'espressione di PDL-1 ed indirettamente di CD10 inducendo TWIST1 (BioSite, 2017). I suddetti dati spiegherebbero quindi la relazione tra CD10, PDL-1 ed EMT ipotizzata sulla casistica clinica. Segue la statistica dei parametri energetici di interazione predette per il complesso CD10/NF-kB; la predizione è stata condotta sui file .pdb estratti dal database PDB per CD10 e NF-kB.

Cluster 5

HADDOCK score	79.5 +/- 22.5
Cluster size	9
RMSD from the overall lowest-energy structure	32.0 +/- 0.8
Van der Waals energy	-68.5 +/- 7.7
Electrostatic energy	-230.8 +/- 48.0
Desolvation energy	-17.8 +/- 5.5
Restraints violation energy	2119.0 +/- 93.8
Buried Surface Area	2315.5 +/- 175.0
Z-Score	-2.1

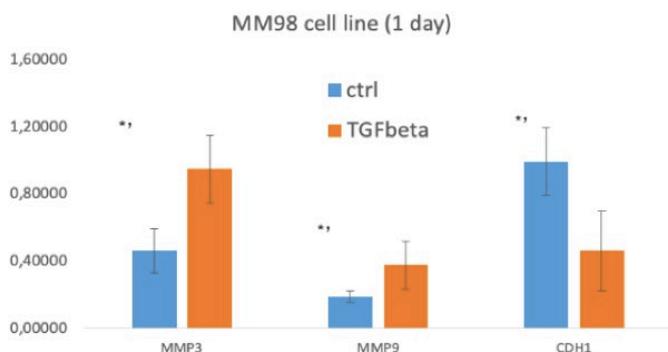
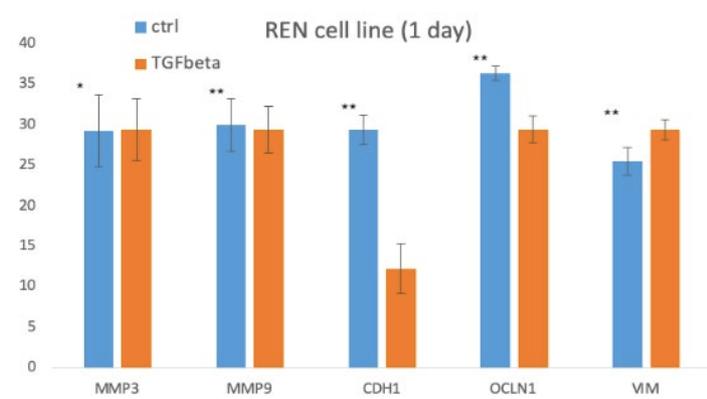
Segue la visualizzazione del modello di interazione CD10/NF- κ B (file in estensione .pdb) su software UCSF Chimera. Il complesso NF- κ B, a sinistra, è marcato con una colorazione a gradiente di idrofobicità, la quale visualizza gli aminoacidi polari in azzurro, i neutri in bianco/arancio sfumato e gli aminoacidi apolari in rosso. Sono altresì numerate, nel complesso NF- κ B, le due anse terminali di connessione dei domini α -elica della subunità inibitoria IKB α . La struttura di CD10, a destra, è marcata in verde per i 5 domini α -elica costituenti la superficie della tasca di legame. I due residui istidinici ed il residuo di glutammato del dominio catalitico sono identificati rispettivamente mediante colorazione blu e gialla.



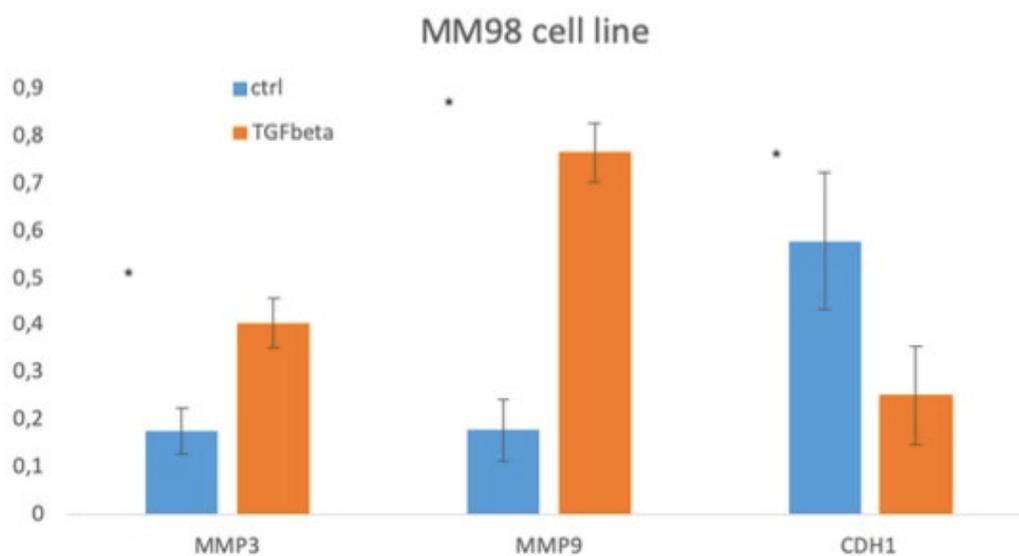
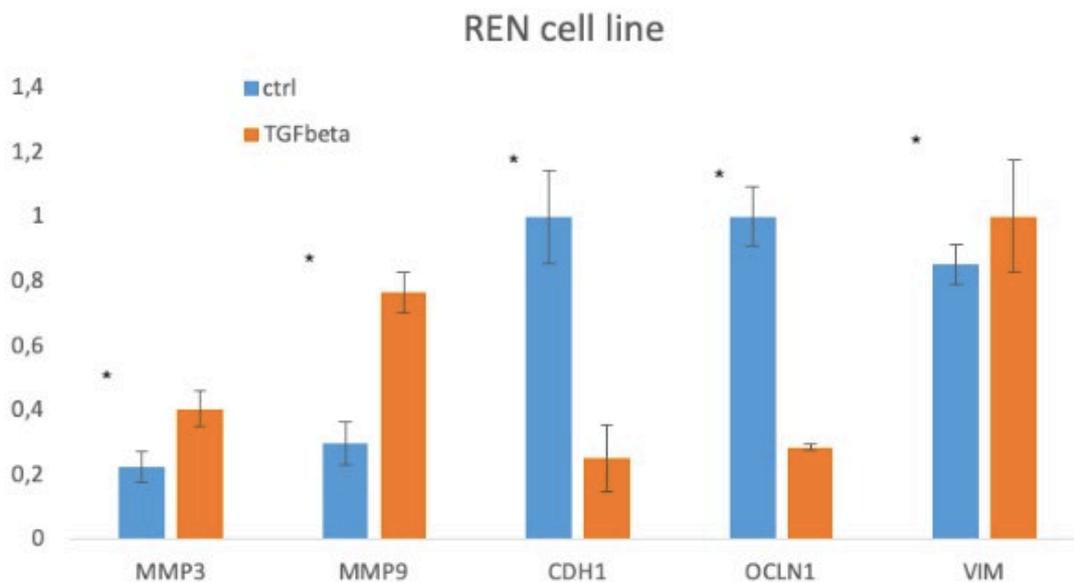
Il server bioninformatico ha predetto 67 complessi CD10/NF- κ B raggruppati in 8 cluster. Il cluster di interazione è stato selezionato sulla base dei parametri di bontà del modello: "Haddock score", parametro adimensionale di energia libera di interazione; Z-score misura della deviazione standard del valore di "Haddock score" di un cluster dal valore medio calcolato su tutti i cluster. Il cluster più statisticamente significativo è risultato il 5°, con un valore di "Haddock score" pari a 79,5 e di Z-score pari a -2,1 (Van Zundert GCP et al, 2016). Per tale modello è interessante osservare

che, le due anse terminali e di congiunzione dei domini a α -elica della subunità IKB α del complesso NF-kB, interagiscono con i domini a α -elica delimitanti la superficie della tasca catalitica del CD10. È inoltre apprezzabile la natura idrofobica delle anse di IKB α e le relative dimensioni di 30 aminoacidi. Tali caratteristiche accomoderebbero le anse di IKB α alla tasca di legame di CD10 favorendone il clivaggio e conseguentemente l'inattivazione. L'inattivazione della subunità inibitoria IKB α da ultimo comporterebbe l'attivazione delle subunità trascrizionali p50 e p65 di NF-kB. La verifica sperimentale di tale modello confermerebbe quindi la bidirezionalità del rapporto sussistente tra CD10 ed EMT. Il passo successivo dovrebbe indagare le vie di trasduzione cellulare connesse al blocco della N-miristoilazione della glicina-2 del CD10. La suddetta modifica co-traduzionale è alla base della localizzazione plasmalemmatica del CD10 (Zheng R et al, 2010).

La verifica dell'induzione del modello di EMT su linea REN e MM98 mediante citochina TGF- β è confermata dai risultati di qRT-PCR condotta sui trascritti di: *CDH1* e *OCLN1*, sottoregolati durante il processo di EMT; *MMP3*, *MMP9* e *VIM*, sovraregolati durante l'EMT. Seguono, in ordine, i grafici degli istogrammi di quantificazione dei trascritti, a confronto per colture di controllo e trattamento con TGF- β a 24h su linea REN e MM98. La statistica di confronto tra colture è stata eseguita mediante test t-Student con: * $p=4,7 \times 10^{-6}$; ** $p < 2,2 \times 10^{-16}$; * $p < 2,2 \times 10^{-16}$.



Seguono i grafici degli istogrammi di quantificazione dei trascritti confrontati tra colture di controllo e colture di trattamento a 72h con citochina TGF- β su linea REN e MM98. La statistica di confronto è stata eseguita mediante test t-Student con: * $p < 2,2 \times 10^{-16}$.



È apprezzabile come l'induzione dell'EMT risulti essere più marcata nelle colture trattate per 72h con la citochina TGF- β come conseguenza di una maggior sottoregolazione dei marcatori epiteliali e sovraregolazione dei marcatori mesenchimali rispetto alle colture trattate a 24h. Tali dati sono in accordo con la teoria per la quale l'EMT agisca secondo uno spettro continuo di azione non univoco nell'"outcome" in maniera dipendente: dalla tipologia del segnale coinvolto, dalla relativa concentrazione e dal relativo tempo di azione, nonché da fattori epigenetici e mutazionali che interessano il clone coinvolto in EMT. I dati immunostochimici corroborano i dati di biologia molecolare per quanto riguarda l'induzione dell'EMT in entrambe le linee analizzate. Sia linea REN sia MM98 hanno mostrato per entrambe le colture di trattamento un incremento dell'espressione di α -SMA. L'E-caderina, coerentemente al relativo gene *CDH1*, ha mostrato sottoregolazione su linea REN, mentre non è risultata espressa su linea MM98. La podoplanina, risultata inespressa in entrambi i controlli di linea REN e MM98, non ha subito variazione in seguito al trattamento con TGF- β . La calretinina, espressa solo sul controllo di linea REN, ha subito sotto-regolazione al trattamento con TGF- β in contrasto con il ruolo promotore di EMT. (Wörthmüller J et al, 2018).

CONCLUSIONI

Il CD10 rappresenta un fattore di prognosi negativa nel mesotelioma pleurico. La sperimentazione dovrà procedere identificando i meccanismi alla base dello "switch" da attività anti-tumorigenica a pro-tumorigenica del CD10. Dovranno essere indagati, in particolare, i pathway coinvolti nella rilocalizzazione sub-cellulare del CD10, nonché i pathway di EMT amplificati da CD10 stesso mediante il dominio catalitico. Confermare l'ipotizzato rapporto bidirezionale tra CD10 ed EMT è alla base della futura sperimentazione preclinica e clinica di alcune small molecules, le quali si sono dimostrate in grado di inibire la catalisi del CD10 e sopprimerne l'espressione (Martin-Kleiner et al, 2006). In particolare, doxorubicina e curcumina, le quali costituiranno, in tal contesto, le strutture di base per l'identificazione, in click chemistry, di molecole più specifiche nell'inibizione del CD10 (Deepshikha M et al, 2015). L'end-point di questo percorso sperimentale rappresenterà l'inibizione del processo di EMT e l'associata staminalità neoplastica alla base rispettivamente dei fenomeni metastatici e di resistenza alle chemioterapie tradizionali.

Bibliografia

1. BioSite, "Hypoxia, EMT, and Metastasis", 2017, <https://www.nordicbiosite.com/news/hypoxia-emt-and-metastasis>
2. De Craene B, Berx G, "Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression", *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13(2): 97-110
3. Deepshikha M, Vinay KS, Sunita S, Gopeshwar N, "Molecular modelling-docking cell surface receptor CD10 target for doxorubicin", *Online Journal of Bioinformatics*, 2015, 16(3): 286-292
4. Deepshikha M, Sunita S, Gopeshwar N, "Role of B Cell Development Marker CD10 in Cancer Progression and Prognosis" *Molecular Biology International*, 2016, 1-9
5. Fassina A, Cappellesso R, Guzzardo V, Dalla Via L, Piccolo S, Stefano P, Ventura L, Fassan M, "Epithelial-mesenchymal transition in malignant mesothelioma", *Modern Pathology*, 2011, 25: 86-99
6. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE, "CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis". *Biotechniques*, 2007, 42(1): 71-75
7. Kleiner M, Beusan S, Gabrilovac J, "PMA and Doxorubicin decrease viability, MTT, activity and expression of CD10 marker on NALM-1 leukemic cells" *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2006, 28: 411-420
8. Lee KW, Sung CO, Kim JH, Kang M, Yoo HY, Kim HH, Um SH, Kim SH, "CD10 expression is enhanced by Twist1 and associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma with facilitating tumorigenicity in vitro and in vivo", *Int. J. Cancer*, 2015, 136: 310-321
9. Maguer-Satta V, Besançon R, Bachelard-Cascales E, "Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer stem cells", *Stem Cells*, 2011; 29(3): 389-396
10. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL, "Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels between Normal Development and Tumor Progression", *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15(2): 117-134
11. Pesando JM, Ritz J, Lazarus H, Costello SB, Sallan S, Schlossman SF, "Leukemia-associated antigens in ALL", *Blood*, 1979, 54(6): 1240-1248
12. Ranzato E, Biffo S, Burlando B, "Selective ascorbate toxicity in malignant mesothelioma: a redox Trojan mechanism", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44(1):108-17
13. R Core Team "A Language and Environment for Statistical Computing", R Foundation for Statistical Computing (Vienna, Austria), 2019, <https://www.R-project.org/>.
14. Thiery JP, Sleeman JP, "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2006, 7(2): 131-42
15. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA, "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease", *Cell*, 2009, 139 (5): 871-90.
16. Van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, Melquiond ASJ, van Dijk M, de Vries SJ, Bonvin AMJJ, "The HADDOCK2.2 Web Server: User Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes", *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(4): 720-725
17. Wörthmüller J, Blum W, Pecze L, Salicio V, Schwaller B, "Calretinin promotes invasiveness and EMT in malignant mesothelioma cells involving the activation of the FAK signaling pathway", *Oncotarget*, 2018, 9(91): 36256-36272
18. Zheng R, Horiguchi A, Lida K, Lee J, Shen R, Goodman OB Jr, Nanus DM, "Neutral endopeptidase is a myristoylated protein" *Mol Cell Biochem.*, 2010, 335:173-180