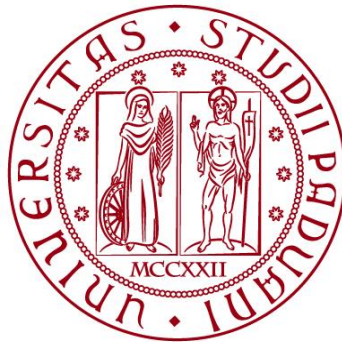


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

Caratterizzazione mediante *digital pathology* di biomarcatori metabolici in modelli di tumore ovarico

Relatore: Prof. Stefano Indraccolo

Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche

Correlatore: Dott.ssa Federica Ferrarini

Istituto Oncologico Veneto (IOV)- IRCCS

Laureanda: Sonia Del Colle

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

ABSTRACT.....	pag 3
1. INTRODUZIONE.....	pag 4
1.1 Il carcinoma ovarico.....	pag 4
1.2 Epidemiologia.....	pag 4
1.3 Fattori di rischio.....	pag 5
1.4 Diagnosi e stadiazione.....	pag 6
1.5 Terapia.....	pag 7
1.6 Metabolismo del cancro.....	pag 8
1.6.1 Metabolismo del glucosio nel cancro.....	pag 10
1.6.2 Metabolismo della glutammina nel cancro.....	pag 12
1.6.3 Ciclo di Krebs nel cancro.....	pag 14
1.6.4 Metabolismo degli acidi grassi nel cancro.....	pag 16
1.7 Metabolismo del cancro come target nella terapia dei tumori.....	pag 18
1.7.1 Target del metabolismo del glucosio.....	pag 18
1.7.2 Target del metabolismo della glutammina.....	pag 19
1.7.3 Target del metabolismo degli acidi grassi.....	pag 19
1.8 Profilazione metabolica.....	pag 20
2. SCOPO DELLA TESI.....	pag 21
3. MATERIALI E METODI.....	pag 22
3.1 Colture cellulari e condizioni di coltura.....	pag 22
3.1.1 I modelli xenotrapiantati derivati da pazienti (PDX).....	pag 23
3.2 Trasfezione mediante <i>short interfering RNA</i>	pag 23
3.3 Estrazione, quantificazione e retrotrascrizione RNA.....	pag 25
3.4 <i>Real time-PCR</i>	pag 26
3.5 Allestimento di <i>cell block</i> citoinclusi.....	pag 26
3.6 Immunoistochimica.....	pag 27
3.7 Digitalizzazione dei vetrini di immunoistochimica.....	pag 30
3.8 <i>Digital pathology</i>	pag 31
3.8.1 <i>Software</i> ImageScope: Algoritmo <i>membran v9</i>	pag 31
3.8.2 QuPath.....	pag 32
3.9 Immunofluorescenza multipla (Mantra).....	pag 33
4. RISULTATI.....	pag 37
4.1 Produzione dei controlli positivi e negativi tramite silenziamento genico in linee cellulari ovariche.....	pag 37
4.2 Valutazione quantitativa mediante <i>digital pathology</i> dell'espressione di MCT4, MCT1, GLS, CPT1A, ACC e SLC7A5.....	pag 42
4.2.1 MCT4.....	pag 42
4.2.2 MCT1.....	pag 43
4.2.3 GLS.....	pag 44
4.2.4 CPT1A.....	pag 46
4.2.5 ACC.....	pag 47
4.2.6 SLC7A5.....	pag 48
4.3 Confronto tra i dati di espressione IHC e dati di trascrittomici.....	pag 49
4.3.1 Confronto tra immunoistochimica e trascrittomici.....	pag 49

4.4 Il protocollo Opal.....	pag 53
4.4.1 Messa appunto di un protocollo di immunofluorescenza multiplex mediante protocollo Opal (Akoya) e <i>staining</i> in coloratore automatico.....	pag 53
4.4.2 Confronto tra i livelli di espressione di MCT4, GLS e CPT1A ottenuti mediante immunoistochimica ed immunofluorescenza.....	pag 57
4.4.3 Analisi della colocalizzazione di GLS, MCT4 e CPT1A nei <i>cell block</i> di PDX ovarici.....	pag 58
5. DISCUSSIONE e PROSPETTIVE FUTURE.....	pag 60
6. BIBLIOGRAFIA.....	pag 63

ABSTRACT

Il metabolismo tumorale rappresenta uno degli ambiti di studio più dinamici e cruciali nell'oncologia moderna. La comprensione delle specificità metaboliche delle cellule tumorali ha aperto nuove prospettive per la diagnosi, il monitoraggio e il trattamento del cancro. Le cellule tumorali, rispetto alle cellule normali, mostrano un'alterata regolazione dei processi metabolici e, similmente all'eterogeneità genetica, i fenotipi metabolici dei tumori sono altamente eterogenei. Questa eterogeneità deriva da diversi segnali provenienti dal microambiente tumorale e da mutazioni genetiche. La complessità e l'adattabilità dei *pathway* metabolici ostacolano l'efficacia delle terapie metaboliche; tuttavia, grazie all'integrazione di tecnologie multi-omiche, monocellulari e spaziali, nonché alla capacità di tracciare l'adattamento metabolico in modo più preciso e dinamico, le terapie metaboliche si possono personalizzare per un trattamento del cancro migliore. In questo studio, è stato allestito un pannello immunohistochimico di 6 marcatori e testato in cellule provenienti da 18 pazienti con tumore ovarico, per ottenere una indicazione sulle vie metaboliche alterate (MCT1, MCT4, GLS, SLC7A5, ACC, CPT1A). La quantificazione dell'espressione dei marcatori è stata calcolata con algoritmi di *digital pathology* e confrontata con i dati di trascrittomica. Infine, per valutare la co-espressione di 3 marcatori (MCT4, CPT1A e GLS) abbiamo implementato un protocollo di immunofluorescenza e l'abbiamo testato in un sottogruppo di pazienti.

1. INTRODUZIONE

1.1 IL CARCINOMA OVARICO

Il carcinoma ovarico è un tumore maligno che si sviluppa nelle ovaie, due organi facenti parte dell'apparato genitale femminile. Questi organi sono formati da diverse tipologie di tessuti e pertanto i tumori ovarici si suddividono in diversi sottotipi istologici sulla base del tessuto in cui ha luogo la trasformazione cellulare, permettendo la suddivisione in: tumori ovarici epiteliali, che rappresentano quasi il 90% dei casi, tumore a cellule germinali (3%) e stromali (2%). I tumori epiteliali comprendono carcinomi sierosi, endometrioidi, a cellule chiare e tumori mucinosi (figura 1). Tra queste tipologie, il carcinoma sieroso di alto grado (HGSC) è quello più comunemente diagnosticato. (De Leo et al. 2021)

Ciascun sottotipo presenta fattori di rischio, patogenesi, modelli di diffusione, profili molecolari, decorso clinico, risposta alla chemioterapia ed esiti ben distinti.

	Carcinoma sieroso di alto grado	Carcinoma sieroso di basso grado	Carcinoma endometriode	Carcinoma a cellule chiare	Carcinoma mucinoso
Percentuale di tutti i carcinomi ovarici	70%	<5%	10%	6–10%	3–4%
Sito di origine	Tube di Falloppio	Endosalpingiosi/ tuba di Falloppio	Endometriosi	Endometriosi	Teratoma/ Sconosciuto
Lesione precursore	Carcinoma intraepiteliale tubarico sieroso (STIC)	Tumore sieroso borderline	Endometriosi atipica; tumore endometriode borderline	Endometriosi atipica; tumore borderline a cellule chiare	Tumore borderline mucinoso
Sindrome ereditaria del cancro	Sindrome ereditaria del cancro al seno e alle ovaie associata a BRCA1/2 (HBOC)	-	Sindrome di Lynch	Sindrome di Lynch	-
Alterazioni molecolari	<i>TP53</i> <i>BRCA1/2</i> HRD Instabilità cromosomica Alterazioni del numero di copie	<i>KRAS</i> <i>NRAS</i> <i>BRAF</i> <i>HER2</i>	<i>CTNNB1</i> <i>PIK3CA</i> <i>PTEN</i> <i>KRAS</i> <i>ARID1A</i> <i>MSI</i> <i>POLE</i> <i>TP53</i>	<i>ARID1A</i> <i>PIK3CA</i> <i>PTEN</i> <i>MSI</i>	Perdita del numero di copie <i>CDKN2A</i> Amplificazione <i>KRAS</i> <i>HER2</i> <i>TP53</i>

FIGURA 1: classificazione molecolare e patologica dei carcinomi ovarici (fonte: <https://doi.org/10.3390/diagnostics11040697>)

1.2 EPIDEMIOLOGIA

I dati del Global Cancer Observatory (GloboCan), una piattaforma curata dall'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) e dall'International Agency for Research on Cancer (IARC), mostrano che a livello globale il tumore ovarico si colloca all'ottavo posto tra i tumori che colpiscono le donne. L'incidenza varia a livello internazionale, con tassi più alti in Nord America e in Nord Europa e tassi più bassi in Giappone e nei paesi del Sud del mondo. I tassi di incidenza età-specifici mostrano un incremento dopo i 40 anni e valori massimi tra 50 e 69 anni.

In Italia il tumore dell'ovaio colpisce circa 6.000 donne ogni anno (le stime sono relative al 2022), secondo i dati riportati nel rapporto "I numeri del cancro in Italia 2023" a cura, tra gli altri, dell'Associazione italiana registri tumori (AIRTUM) e dell'Associazione italiana di oncologia medica (AIOM) Il tumore dell'ovaio è, pertanto, tra le prime 10 forme tumorali più diffuse tra le donne e costituisce il 3 per cento circa delle diagnosi di tumore. La

percentuale di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è attorno al 43 per cento, dato legato principalmente alla diagnosi tardiva della malattia. Secondo la medesima fonte, i tassi di mortalità sono in diminuzione negli ultimi anni, grazie anche all'introduzione di nuove ed efficaci strategie di trattamento.

1.3 FATTORI DI RISCHIO CARCINOMA OVARICO

Diversi fattori possono aumentare il rischio di sviluppare il cancro ovarico, tra cui fattori genetici, età, uso di terapie ormonali post-menopausa, infertilità.

GENETICA

Le mutazioni germinali *BRCA1* e *BRCA2* sono i fattori di rischio genetici conosciuti più significativi per il cancro ovarico e entrambe le mutazioni vengono riscontrate fino al 17% delle pazienti. La localizzazione della mutazione *BRCA* all'interno del gene, il tipo di mutazione, la posizione nucleotidica e le conseguenze funzionali della mutazione possono influenzare il rischio di sviluppare il cancro ovarico e l'età media alla diagnosi. Inoltre, sono note altre mutazioni ereditarie in altri geni coinvolti nella riparazione del DNA che possono aumentare il rischio di cancro ovarico, tra i quali: *CHEK2*, *MRE11A*, *RAD50*, *ATM* e *TP53*. (Mavaddat et al. 2013)

TERAPIE ORMONALI

È stato dimostrato che la terapia ormonale sostitutiva aumenta il rischio di sviluppare il cancro ovarico nelle donne in post-menopausa. Inoltre, è stato dimostrato che la terapia a base di soli estrogeni ha aumentato il rischio del 22% mentre la terapia combinata con estrogeni e progesterone ha aumentato il rischio del 10%. Viceversa, l'uso di contraccettivi orali riduce il rischio di sviluppare il cancro ovarico nei soggetti con una mutazione germinale *BRCA1*, nonché in quelli senza predisposizione genetica (De Leo et al. 2021).

FATTORI RIPRODUTTIVI

Le donne che hanno partorito hanno un rischio ridotto di tutti i sottotipi di cancro ovarico rispetto alle donne che non hanno partorito, con la riduzione del rischio più significativo per i carcinomi a cellule chiare. L'ovariectomia unilaterale è associata a una riduzione del 30% del rischio di cancro ovarico, che non è specifico per il sottotipo istologico. L'ovariectomia bilaterale è efficace anche nel ridurre il rischio di cancro ovarico nelle donne con predisposizione genetica (De Leo et al. 2021).

ALTRI FATTORI

Età avanzata, storia familiare di cancro ovarico di parente di primo grado, endometriosi, ovaio policistico, dieta occidentale, obesità, fumo, aver avuto il ciclo in giovane età o ingresso tardivo in menopausa—sono tutti fattori che sono associati a un aumento di probabilità di sviluppare cancro ovarico, a differenza dell'allattamento post-gravidanza e la multiparità che invece possono ridurre il rischio (Desai 2014).

1.4 DIAGNOSI E STADIAZIONE

L'iter diagnostico del carcinoma ovarico inizia con la raccolta di un'accurata anamnesi personale e familiare e successiva visita ginecologica della paziente che consiste nell'esplorazione vaginale e rettale della pelvi associata alla palpazione addominale.

L'ecografia transvaginale e addominale rappresenta l'esame diagnostico più utilizzato per la diagnosi e/o la conferma di sospetto clinico di massa pelvica. Inoltre, è importante il dosaggio dei marcatori sierici, quali CA125 e HE4.

Se il sospetto clinico è confermato, la paziente deve essere sottoposta ad esami aggiuntivi utili per la stadiazione del tumore (figura 2), per verificare la diffusione del tumore e la presenza di eventuali metastasi: RX torace o TC torace; TC addome-pelvi con e senza mezzo di contrasto; RMN pelvico con e senza mezzo di contrasto; PET *total body*.

La diagnosi definitiva di carcinoma ovarico viene effettuata dall'esame istologico dopo chirurgia. (AIOM ed.2021)

STAGE I: Tumor confined to ovaries			
OLD		NEW	
IA	Tumor limited to 1 ovary, capsule intact, no tumor on surface, negative washings/ascites.	IA	Tumor limited to 1 ovary, capsule intact, no tumor on surface, negative washings.
IB	Tumor involves both ovaries otherwise like IA.	IB	Tumor involves both ovaries otherwise like IA.
IC	Tumor involves 1 or both ovaries with any of the following: capsule rupture, tumor on surface, positive washings/ascites.	IC	Tumor limited to 1 or both ovaries
		IC1	Surgical spill
		IC2	Capsule rupture before surgery or tumor on ovarian surface.
		IC3	Malignant cells in the ascites or peritoneal washings.

STAGE II: Tumor involves 1 or both ovaries with pelvic extension (below the pelvic brim) or primary peritoneal cancer			
OLD		NEW	
IIA	Extension and/or implant on uterus and/or Fallopian tubes	IIA	Extension and/or implant on uterus and/or Fallopian tubes
IIB	Extension to other pelvic intraperitoneal tissues	IIB	Extension to other pelvic intraperitoneal tissues
IIC	IIA or IIB with positive washings/ascites.		

****Old stage IIC has been eliminated****

STAGE III: Tumor involves 1 or both ovaries with cytologically or histologically confirmed spread to the peritoneum outside the pelvis and/or metastasis to the retroperitoneal lymph nodes			
OLD		NEW	
IIIA	Microscopic metastasis beyond the pelvis.	IIIA (Positive retroperitoneal lymph nodes and /or microscopic metastasis beyond the pelvis)	
		IIIA1	Positive retroperitoneal lymph nodes only
		IIIA1(i)	Metastasis ≤ 10 mm
		IIIA1(ii)	Metastasis > 10 mm
		IIIA2	Microscopic, extrapelvic (above the brim) peritoneal involvement ± positive retroperitoneal lymph nodes
IIIB	Macroscopic, extrapelvic, peritoneal metastasis ≤ 2 cm in greatest dimension.	IIIB	Macroscopic, extrapelvic, peritoneal metastasis ≤ 2 cm ± positive retroperitoneal lymph nodes. Includes extension to capsule of liver/spleen.
IIIC	Macroscopic, extrapelvic, peritoneal metastasis > 2 cm in greatest dimension and/or regional lymph node metastasis.	IIIC	Macroscopic, extrapelvic, peritoneal metastasis > 2 cm ± positive retroperitoneal lymph nodes. Includes extension to capsule of liver/spleen.

STAGE IV: Distant metastasis excluding peritoneal metastasis			
OLD		NEW	
IV	Distant metastasis excluding peritoneal metastasis. Includes hepatic parenchymal metastasis.	IVA	Pleural effusion with positive cytology
		IVB	Hepatic and/or splenic parenchymal metastasis, metastasis to extra-abdominal organs (including inguinal lymph nodes and lymph nodes outside of the abdominal cavity)

FIGURA 2: Vecchia e nuova classificazione degli stadi del tumore ovarico (fonte: <https://www.sgo.org/>)

1.5 TERAPIA

L'obiettivo primario del trattamento è massimizzare il controllo del cancro e attenuare i sintomi della malattia il più a lungo possibile. L'entità dell'intervento chirurgico e la scelta del regime chemioterapico sono quindi determinate dallo stadio del cancro ovarico e da vari fattori legati al paziente. La chirurgia costituisce il trattamento primario per il cancro ovarico. Viene utilizzata per la stadiazione e la citoreduzione (*debulking*), inoltre, se la malattia è confinata alle ovaie, è una procedura potenzialmente curativa.

Molte pazienti con cancro di grado I, non vengono trattate con chemioterapia post-operatoria, ma quelle con gradi più alti (grado II o superiore) e/o istologie specifiche (come HGSC e carcinoma a cellule chiare) vengono sottoposte a chemioterapia sistemica adiuvante a base di platino (Pillay, Hadebe, e Vorster 2022).

1.6 METABOLISMO DEL CANCRO

Nonostante la pluralità degli eventi genetici che concorrono all'oncogenesi, un gruppo di sei segni distintivi, a cui spesso ci si riferisce con il termine inglese "*hallmarks*", accomuna le cellule tumorali nello sviluppo del fenotipo tumorale definito come maligno: la presenza di elevati segnali di proliferazione, l'evasione dai controlli negativi della crescita, la resistenza all'apoptosi, l'elusione dei meccanismi di senescenza, l'induzione di neoangiogenesi e l'attivazione dei processi di invasione e metastasi (figura 3). L'acquisizione di queste caratteristiche è contrassegnata da una causa comune ovvero l'instabilità del genoma cellulare, la quale, a sua volta, porta ad una eterogeneità genica (DeBerardinis et al. 2008). Diversi studi hanno suggerito che le cellule tumorali riprogrammano il loro metabolismo per sostenere efficientemente la crescita e la proliferazione. Conseguentemente, la definizione di cellula tumorale basata sui sei *hallmarks* sopracitati è stata ampliata con l'aggiunta della riprogrammazione del metabolismo cellulare. Infatti, la proliferazione incontrollata e cronica che distingue le cellule cancerose non solo richiede una deregolazione del ciclo cellulare, ma necessita anche una rimodulazione del metabolismo energetico allo scopo di sostenere la crescita e la progressione tumorale. (DeBerardinis et al. 2008)

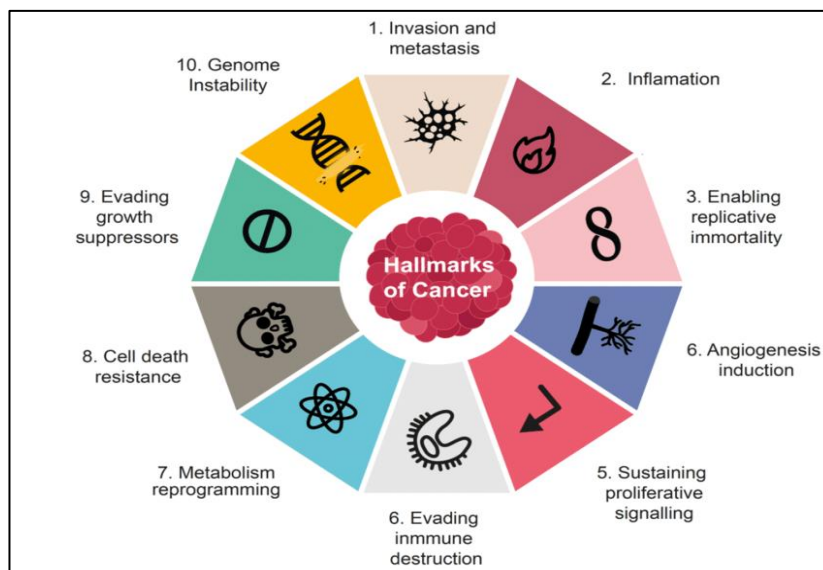


FIGURA 3: *Hallmarks of cancer* (Fonte: Vaupel, Schmidberger, e Mayer 2019)

In condizioni fisiologiche il metabolismo energetico della cellula passa attraverso la glicolisi, processo tramite cui il glucosio viene ossidato a piruvato nel citoplasma. Successivamente, nei mitocondri, le centrali energetiche della cellula, il piruvato viene ossidato ad anidride carbonica tramite il processo di fosforilazione ossidativa (OXPHOS). Diversamente, le cellule tumorali prediligono la glicolisi anche in presenza di ossigeno, realizzando la cosiddetta glicolisi aerobica o effetto Warburg, dal nome del suo scopritore (figura4) (Koppenol, Bounds, e Dang 2011). La glicolisi aerobica è più veloce dell'OXPHOS e produce meno ATP per unità di glucosio consumato. Per compensare la scarsa generazione di energia per unità di glucosio consumato, le cellule tumorali assorbono glucosio e glutammato 200 volte più velocemente delle cellule normali. Oltre al glucosio e al glutammato, molti nutrienti e percorsi metabolici aiutano il metabolismo energetico alterato delle cellule cancerose. Ad esempio, le cellule tumorali possono utilizzare diversi combustibili metabolici come acetato, lattato, acidi grassi, serina, glicina e aminoacidi a catena ramificata (Siddika et al. 2023).

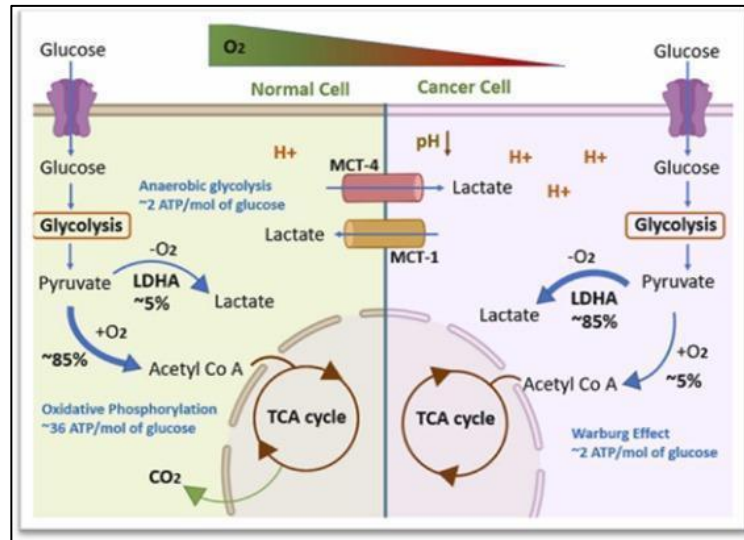


FIGURA 4. Nelle cellule tumorali, il tasso aumentato di glicolisi tumorale è controllato da trasportatori sovraespressi ed enzimi, tra cui LDH, enzima che catalizza la riduzione di piruvato a lattato, tale metabolita viene secreto nel microambiente tramite trasportatori monocarbossilati (MCT) che portano a una diminuzione del pH nell'ambiente extracellulare. Questo fenomeno biochimico svolge un ruolo importante nell'oncogenesi migliorando l'attività dei fattori pro-invasione e inducendo invasione, immunosoppressione, angiogenesi e metastasi. (Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.11.007>)

La dimostrazione di Otto Warburg sottolineò come le cellule tumorali utilizzano rapidamente il glucosio e ne convertono la maggior parte in lattato, ed è ormai accertato che un alto tasso di metabolismo del glucosio sia un segno metabolico distintivo delle cellule in rapida divisione. La glicolisi aerobica è solo una componente della trasformazione metabolica. Infatti, per impegnarsi nella divisione replicativa, una cellula deve duplicare il suo genoma, le sue proteine e i suoi lipidi e assemblare i componenti in cellule figlie: queste attività richiedono che le cellule assorbano nutrienti extracellulari come glucosio e glutammina (figura 5) e li assegnino a percorsi metabolici che li convertono in precursori biosintetici. Le cellule tumorali possono raggiungere questo fenotipo attraverso cambiamenti nell'espressione di enzimi e trasportatori di nutrienti. (DeBerardinis et al. 2008)

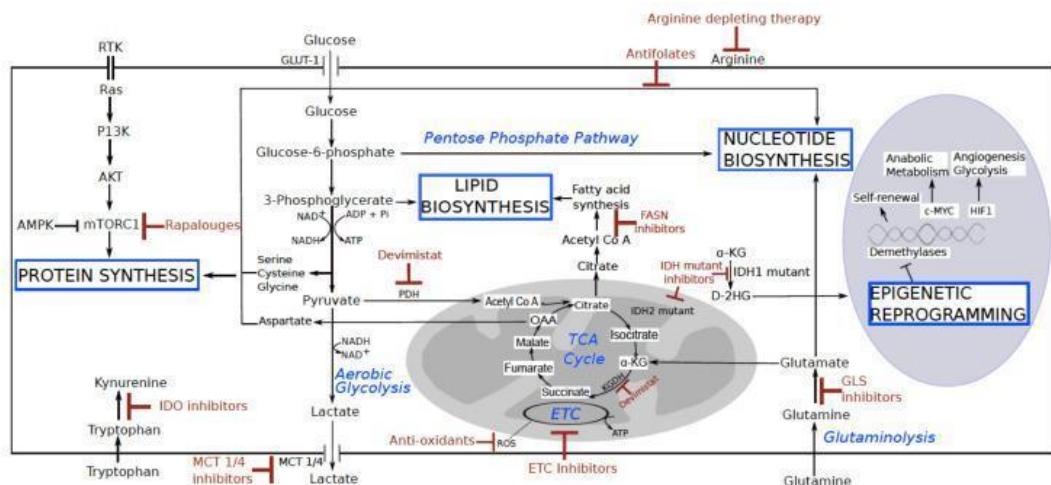


FIGURA 5: Glucosio e glutammina, i due nutrienti extracellulari più abbondanti, forniscono carbonio per la sintesi delle tre principali classi di macromolecole (acidi nucleici, lipidi e proteine) nelle cellule tumorali in proliferazione. In alcuni tumori, l'accumulo atipico di oncometaboliti, come D-2HG, può promuovere il rimodellamento epigenetico. (Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8582418/>)

1.6.1 METABOLISMO DEL GLUCOSIO NEL CANCRO

Potrebbe sembrare un controsenso che le cellule tumorali con accesso all'ossigeno si privino della maggior parte dell'ATP che può essere prodotto dal metabolismo del glucosio convertendo invece il piruvato in lattato. Tuttavia, tre punti dovrebbero essere sottolineati riguardo al ruolo dell'effetto Warburg nel metabolismo delle cellule tumorali.

In primo luogo, dato che l'effetto Warburg è osservato anche durante la rapida proliferazione delle cellule normali, è più considerato come una caratteristica generale della proliferazione cellulare (Bose e Le 2018).

In secondo luogo, il rapido metabolismo del glucosio fornisce anche intermedi per i percorsi biosintetici che derivano dalla glicolisi prossimale al piruvato, tra cui ribosio-5-fosfato e glicina per la biosintesi dei nucleotidi e glicerolo per la sintesi dei lipidi (Newsholme, Crabtree, e Ardawi 1985).

In terzo luogo, le cellule impegnate nella glicolisi aerobica non convertono il 100% del loro piruvato in lattato. Piuttosto, una frazione misurabile del piruvato viene metabolizzata nel ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA), fornendo energia e precursori per i percorsi biosintetici che consumano intermedi del ciclo TCA. Pertanto, l'effetto Warburg svolge sia un ruolo bioenergetico che biosintetico nelle cellule in attiva proliferazione.

Rispetto alle cellule normali (figura 6, pannello di sinistra), il flusso del metabolismo del glucosio e della glicolisi è accelerato nelle cellule tumorali (figura 6, pannello di destra) dall'espressione preferenziale di trasportatori e isoforme enzimatiche che spingono in avanti il flusso del glucosio e si adattano alle richieste anaboliche delle cellule tumorali.

I monocarbossilati come il lattato e il piruvato svolgono quindi un ruolo centrale nel metabolismo cellulare e nella comunicazione metabolica tra i tessuti. Essenziale per questi ruoli è il loro rapido trasporto attraverso la membrana plasmatica, che è catalizzata da una famiglia recentemente identificata di trasportatori di monocarbossilati (MCT). La famiglia MCT ha 14 membri, 6 dei quali sono stati caratterizzati funzionalmente. Di questi, solo

MCT1 ed MCT4 catalizzano il trasporto di lattato accoppiato ai protoni. MCT1 è espresso nella maggior parte delle cellule, mentre MCT4 è espresso fortemente solo nei tessuti glicolitici (ad esempio il muscolo bianco) che devono esportare grandi quantità di acido lattico (Ullah, Davies, e Halestrap 2006).

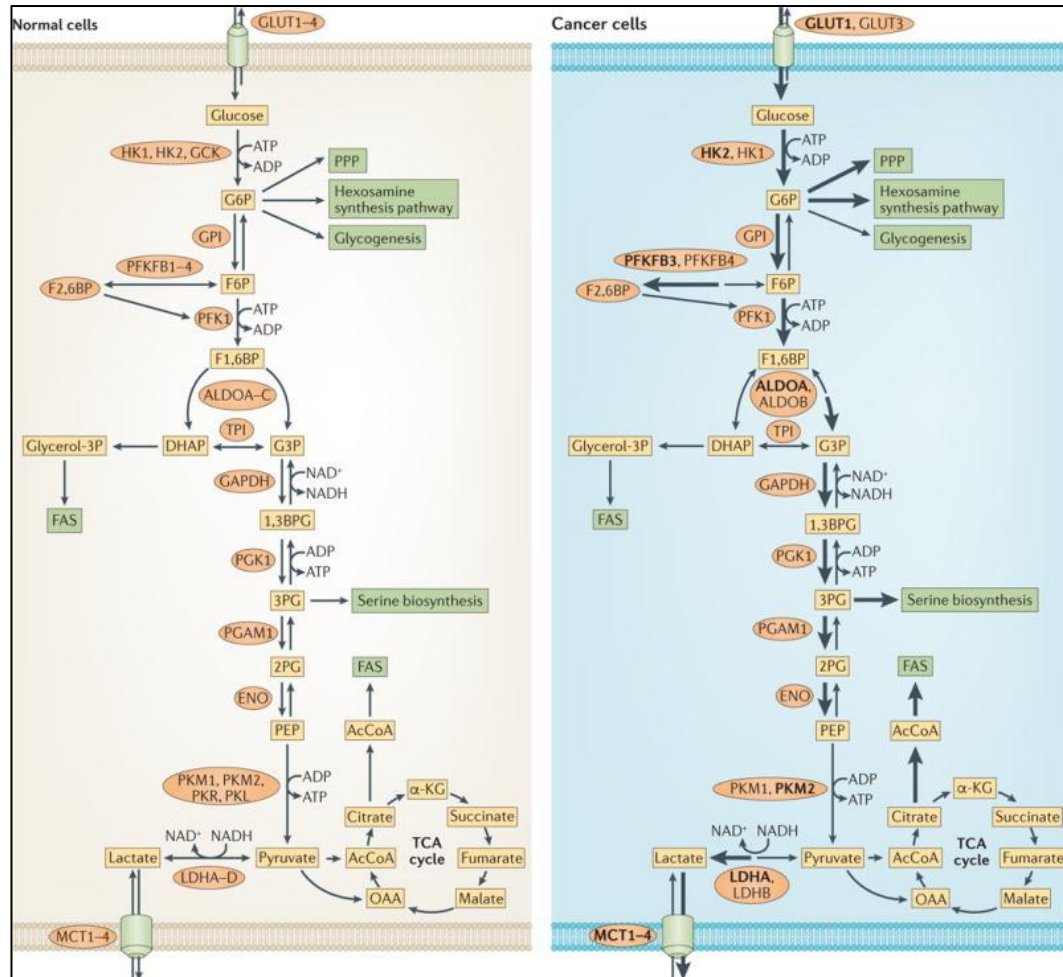


FIGURA 6: Cambiamenti che si verificano nel metabolismo del glucosio delle cellule tumorali. Gli enzimi che catalizzano le reazioni metaboliche sono mostrati in ovali. Gli enzimi che sono predominanti nelle cellule tumorali sono mostrati in grassetto (fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5516800/figure/F1/>)

Non si conoscono meccanismi universali utilizzati da tutti i tipi di cellule tumorali per riprogrammare il metabolismo del glucosio, ma ci sono diversi meccanismi comuni con cui le cellule tumorali modulano e dirottano i passaggi impegnati nella glicolisi, così come l'assorbimento del glucosio, per soddisfare le loro richieste anaboliche. Singole oncoproteine e oncosoppressori possono influenzare il metabolismo del glucosio nelle cellule tumorali attraverso molteplici meccanismi. Alcuni di questi meccanismi si sovrappongono ai meccanismi mediati dall'ipossia e dal fattore di trascrizione indotto dall'ipossia HIF1. Per accelerare il metabolismo del glucosio, HIF1 aumenta l'espressione del trasportatore del glucosio GLUT1 (noto anche come SLC2A1) e dell'esochinasi 2 (HK2) per aumentare rispettivamente l'assorbimento del

glucosio e la fosforilazione del glucosio. Allo stesso modo, Kirsten rat sarcoma virus (*KRAS*) oncogenico, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (*BRAF*) oncogenico e RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (AKT) attivato aumentano l'espressione e la traslocazione sulla membrana plasmatica di GLUT1 e di altri trasportatori del glucosio. L'espressione di HK2 è marcatamente indotta nelle cellule tumorali da molteplici meccanismi e fattori oncogeni ed è sovraregolata a livello trascrizionale da MYC. Infine, AKT, che fa parte della via di segnale PI3K/AKT/mTOR che nelle cellule tumorali risulta iperattivata, promuove l'associazione di HK1 e HK2 con i mitocondri e la fosforilazione di HK2, aumentando l'associazione di HK2 con i mitocondri e la sua attività intracellulare. Allo stesso modo, la perdita di oncosoppressori come *TP53* può favorire la glicolisi (Hay 2016).

1.6.2 METABOLISMO DELLA GLUTAMMINA NEL CANCRO

La glutammina è l'amminoacido più abbondante nel sangue e nei muscoli. Oltre a essere fondamentali per l'assemblaggio delle proteine, gli amminoacidi sono coinvolti in molteplici percorsi metabolici che sono essenziali per la sopravvivenza cellulare.

In primo luogo, la glutammina fornisce fonti di carbonio e azoto per le cellule, dona azoti ammidici e amminici per la sintesi di purine, amminoacidi non essenziali e glucosammina (Li, Copeland, e Le 2021).

Inoltre, per mitigare la tossicità dell'elevato stress ossidativo diversi antiossidanti vengono attivati dal NADPH, generato principalmente tramite tre vie metaboliche, delle quali una coinvolge una reazione di carbossilazione riduttiva della glutammina guidata dall'isocitrato deidrogenasi 1 (IDH1).

Infine, per mantenere la funzione mitocondriale in condizioni di limitata disponibilità di piruvato dovuta alla glicolisi aerobica, le cellule tumorali ripristinano i metaboliti del ciclo TCA tramite un processo noto come anaplerosi. Ci sono alcune linee cellulari che diventano dipendenti dalla glutammina, che consumano preferibilmente. Un elevato consumo di glutammina è stato osservato in molti tumori, tra cui il cancro al pancreas, alle ovaie e al seno. La glutamminolisi è il processo mediante il quale le cellule convertono la glutammina in metaboliti del ciclo TCA attraverso l'attività di più enzimi. (Figura 7). La glutammina viene prima convertita in glutammato tramite la glutaminasi (GLS/GLS2). Il glutammato viene quindi convertito in α -chetoglutarato tramite due percorsi divergenti. Il primo è tramite l'attività del glutammato deidrogenasi (GLUD), mentre il secondo è tramite l'attività di un gruppo di transaminasi. L' α -chetoglutarato così generato può fungere da substrato anaplerotico nel ciclo TCA, inoltre l' α -chetoglutarato può anche essere esportato nel citosol per essere carbossilato in citrato, molecola che collega il metabolismo mitocondriale alla lipogenesi de novo tramite ATP-citrato liasi (ACLY) e sintetasi degli acidi grassi (FASN). I metaboliti del ciclo TCA derivati dai carboni della glutammina possono anche essere rilasciati nel citoplasma tramite navette e trasportatori mitocondriali, ad esempio, il malato può essere esportato fuori dal citoplasma per generare NADPH e piruvato tramite l'attività dell'enzima malico. (Yang, Venneti, e Nagrath 2017).

Il ruolo della glutammina nella regolazione del metabolismo nelle cellule tumorali non si limita a quanto detto ma promuove anche la crescita tumorale,

mediante l'esportazione fuori dal citoplasma da parte di SLC7A5 per consentire l'assorbimento della leucina, che attiva la proteina chinasi mTORC1, la quale lavora insieme ad altri stimoli per regolare la sintesi proteica, la biogenesi ribosomiale e l'autofagia.

La glutammina può anche ostacolare l'apoptosi cellulare per indurre la resistenza ai farmaci. Infine, la deprivazione acuta di glutammina nelle cellule provoca apoptosi e restringimento cellulare innescati dalla cascata di caspasi mediata da CD95 (Sadras et al. 2021).

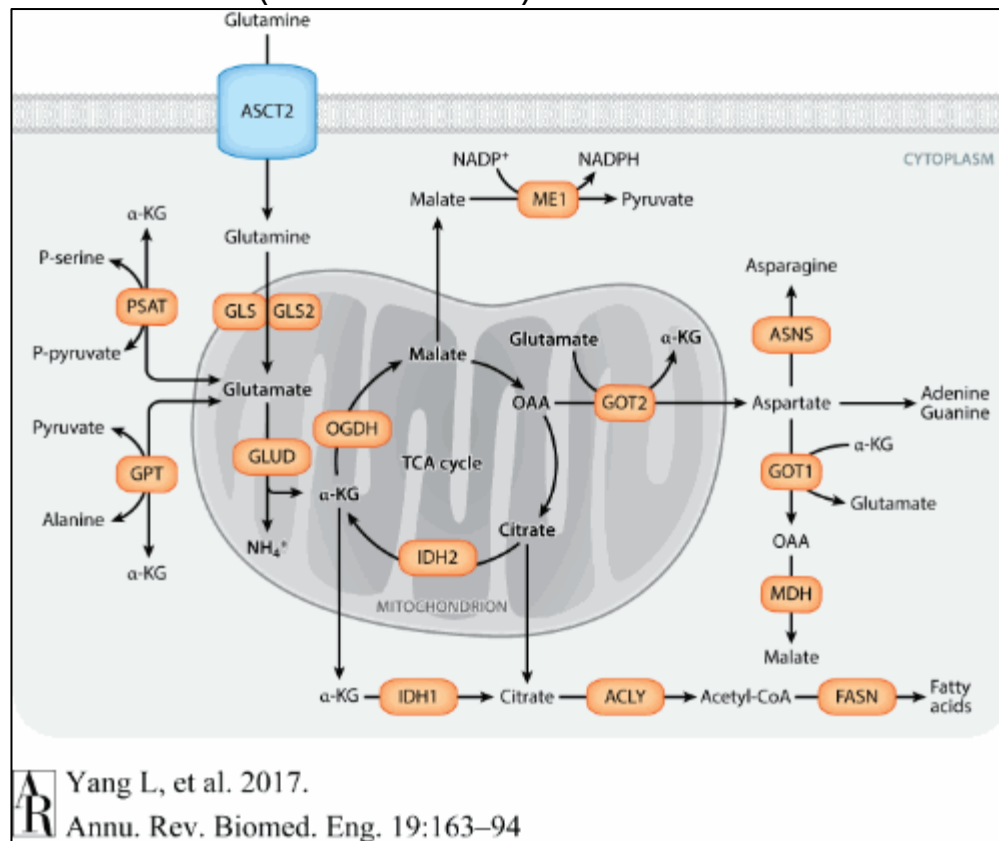


FIGURA 7: L'anaplerosi della glutammina guida il ciclo dell'acido tricarbossilico (fonte: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-pathol-061020-050135>)

Diversi studi hanno fornito prove che le alterazioni oncogeniche, soppressione tumorale e microambiente tumorale riprogrammano il metabolismo della glutammina. (Son et al. 2013)

Il protooncogene *c-MYC* si lega trascrizionalmente alle regioni promotrici degli importatori di glutammina ad alta affinità, tra cui SLC1A5. Inoltre, la sovraespressione di *c-MYC* promuove l'espressione di GLS mitocondriale attraverso la repressione trascrizionale di miR-23a e miR-23b. *KRAS oncogenico* riduce l'espressione di GLUD e aumenta l'espressione di GOT per rilasciare aspartato nel citoplasma per la generazione di NADPH tramite ME1 (Gao et al. 2009).

Inoltre, il pathway fosfatidilinositolo 3-chinasi/AKT/bersaglio meccanicistico della rapamicina (PI3K/AKT/mTOR) è alterato in diversi tumori e può influenzare il metabolismo della glutammina.

Il metabolismo della glutammina può anche essere regolato da soppressori tumorali. Ad esempio, il soppressore tumorale p53 attiva l'espressione di GLS2 e rimuove le specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari per

proteggere le cellule dai danni genomici. Altri soppressori tumorali, come la proteina del retinoblastoma (Rb) e la chinasi epatica B1 (LKB1), alterano l'assorbimento della glutammina reprimendo l'espressione di SLC1A5 da parte del fattore di trascrizione E2F3 (Csibi et al. 2013).

Infine il metabolismo della glutammina è anche profondamente influenzato dal microambiente tumorale extracellulare: l'interleuchina-4 (IL-4), che è secreta dalle cellule immunitarie, può aumentare il livello di espressione del trasportatore della glutammina ASCT2 nelle cellule del cancro ed i fattori di crescita presenti nel microambiente tissutale come l'IL-3 possono legarsi all'IL-3R α sensibile al glucosio e promuovere l'assorbimento della glutammina regolando positivamente l'espressione di ASCT2.

Gli ambienti ipossici tumorali aumentano anche l'accumulo di lattato: questo non solo determina un gradiente di pH "invertito" che consente la progressione del tumore, ma attiva anche c-MYC, che influenza direttamente la glutamminolisi (Pérez-Escuredo et al. 2016).

1.6.3 CICLO DI KREBS NEL CANCRO

I mitocondri sono la centrale elettrica della cellula. Producono la maggior parte dell'energia cellulare e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), oltre a regolare l'apoptosi modulando il rilascio del citocromo C attraverso i complessi dei pori della membrana permeabile.

I mitocondri possono esercitare molte funzioni chiave come regolatori dinamici di tutti i processi cellulari anche nelle cellule tumorali (figura 8).

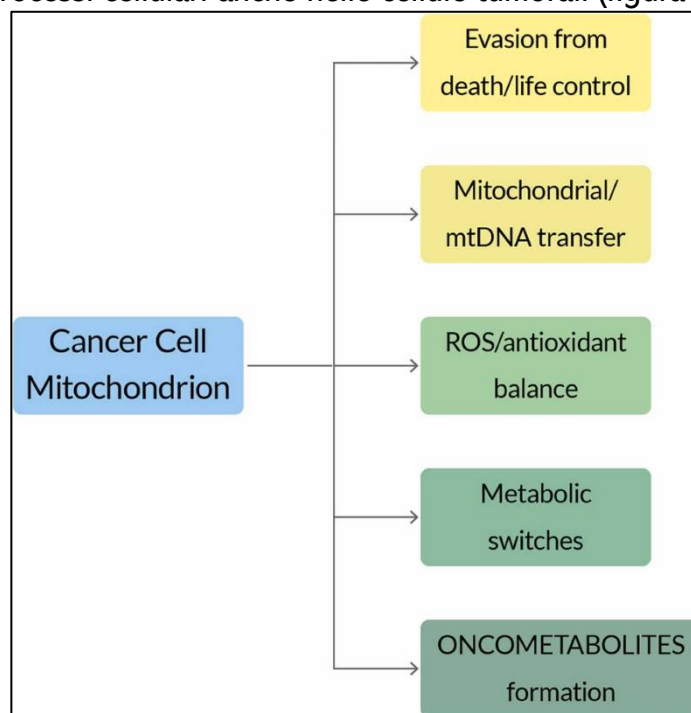


FIGURA 8: Cancro e mitocondri. Diagramma schematico che evidenzia i meccanismi attraverso cui i mitocondri possono influenzare la crescita e la sopravvivenza del cancro (Fonte: Di Gregorio et al. 2022)

Il ruolo dei mitocondri nella formazione del cancro sembra derivare da mutazioni in enzimi come l'isocitrato deidrogenasi, la succinato deidrogenasi

e la fumarato deidrogenasi (figura 9), tutti enzimi significativi del ciclo TCA. Le mutazioni dei geni che codificano questi enzimi portano ad un accumulo anomalo di oncometaboliti del ciclo TCA (figura 9), che a sua volta stimola la formazione e la progressione del cancro (Menendez, Alarcón, e Joven 2014).

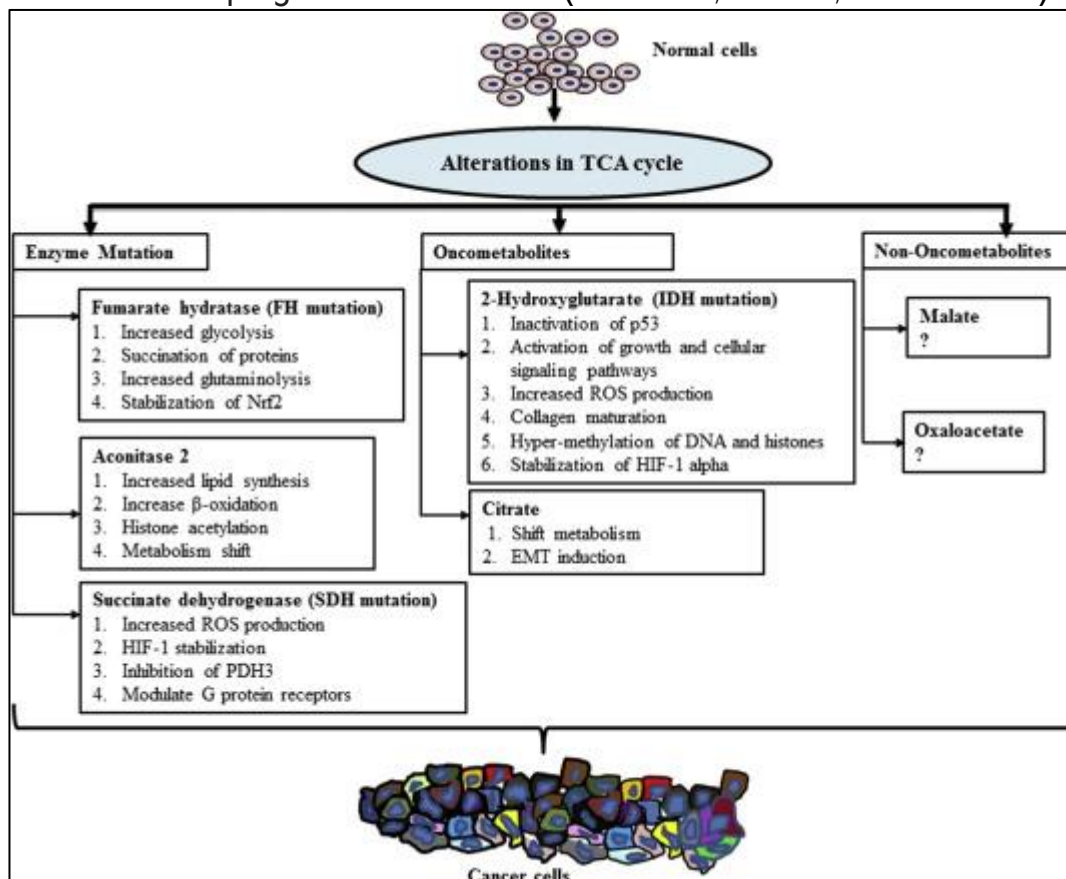


FIGURA 9: Rappresentazione schematica degli impatti delle anomalie del ciclo TCA nel cancro: la compromissione degli enzimi, dei metaboliti e degli oncometaboliti del ciclo di Krebs (fonte: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908416303480?via%3Dihub#fig2>)

Esistono numerose alterazioni acquisite o ereditarie degli enzimi e dei metaboliti del ciclo TCA coinvolti nella patogenesi di diversi tipi di cancro. I cambiamenti si verificano principalmente nelle citrato sintasi (CS), aconitasi (ACO 2), succinato deidrogenasi (SDH), fumarato idratasi (FH) e isocitrato deidrogenasi (IDH).

Mutazioni dei geni coinvolti nel metabolismo causano un accumulo di oncometaboliti del ciclo TCA. Gli oncometaboliti sono piccole biomolecole (o enantiomeri) del metabolismo normale, il cui accumulo eccessivo di essi causa disregolazione metabolica. Gli oncometaboliti possono essere divisi in due categorie: (I) oncometaboliti nativi che potrebbero essere accumulati a causa di mutazioni (perdita di funzione) dei geni che codificano gli enzimi e (II) oncometaboliti promiscui che potrebbero essere accumulati a causa di mutazioni con guadagno di funzione negli enzimi metabolici.

Uno dei principali oncometaboliti coinvolti nella patogenesi del cancro è il citrato. L'accumulo di citrato in ambienti cancerosi darà origine a modifiche epigenetiche e non epigenetiche che potrebbero promuovere lo sviluppo e la progressione del cancro.

L'eccesso di citrato riduce l'attività dell'isoforma mitocondriale del piruvato deidrogenasi e determina uno spostamento ulteriore del metabolismo cellulare verso la glicolisi. (Icard, Poulain, e Lincet 2012). L'accumulo aumentato di citrato attiva l'enzima acetil CoA carbossilasi (ACC), che a sua volta aumenta la produzione di acetil CoA e malonil CoA. Questo aumento di acetil CoA e malonil CoA viene quindi diretto verso una maggiore sintesi di lipidi/steroli. Il metabolismo lipidico trasformato osservato nelle cellule cancerose modifica il destino metabolico della sintesi lipidica della membrana cellulare e modifica il potenziale redox delle cellule.

1.6.4 METABOLISMO DEGLI ACIDI GRASSI NEL CANCRO

L'acido grasso (*Fatty Acid*, FA) è composto da un gruppo terminale carbossilico con lunghe catene di idrocarburi che possono essere saturi o insaturi. Sia la sintesi degli acidi grassi che l'ossidazione degli acidi grassi sono componenti importanti nel metabolismo degli acidi grassi. A seconda dei tipi di cellule o delle condizioni, la sintesi degli acidi grassi può favorire la sintesi esogena o la sintesi de novo.

La sintesi de novo degli acidi grassi si basa principalmente su due enzimi limitanti la velocità chiave, l'acetil-CoA carbossilasi (ACC) e la sintasi degli acidi grassi (FASN). L'ACC può carbossilare l'acetil-CoA in malonil-CoA, mentre la FASN converte l'acetil-CoA e il malonil-CoA in acidi grassi a catena lunga. La β -ossidazione degli acidi grassi consiste in una serie ciclica di reazioni nei mitocondri attraverso l'accorciamento delle catene degli acidi grassi per generare NADH, FADH 2 e acetil-CoA, l'enzima limitante la velocità carnitina palmitoiltransferasi I (CPT1) catalizza la reazione di acil-CoA e carnitina per formare acil-carnitina e trasporta il prodotto dal citosol alla matrice mitocondriale. (Currie et al. 2013)

Le cellule tumorali in attiva proliferazione richiedono un apporto costante di lipidi per la biogenesi della membrana e la modifica delle proteine; quest'ultime ottengono acidi grassi dalla lipogenesi de novo e dall'assorbimento esogeno. L'assorbimento esogeno di FA dal microambiente circostante è facilitato da trasportatori specializzati, tra cui CD36 e FATP. In termini di fonti di carbonio per la lipogenesi de novo, le cellule tumorali si affidano a glucosio, glutammina e acetato.

La sovraregolazione della sintesi di FA è un'alterazione metabolica classicamente descritta nel cancro, questo fenomeno è ottenuto dalla alterazione di vari enzimi lipogenici, a loro volta ottenuta dalla sovraregolazione di vie di trasduzione oncogeniche. Ad esempio, la via di segnalazione più frequentemente disregolata nei tumori umani è il *pathway* PI3K–AKT (figura 10), che può essere attivato attraverso la stimolazione di recettori tirosin-chinasici da parte di fattori di crescita o ormoni tiroidei; questa via attiva la proteina legante l'elemento regolatore dello sterolo 1c (SREBP-1c), che promuove ulteriormente la sovraregolazione traduzionale di FASN e ACC. Inoltre, l'attivazione di AKT contribuisce a due processi essenziali per la sintesi de novo dei lipidi: il trasporto di intermedi metabolici per fornire fonti di carbonio per l'anabolismo e la sintesi di equivalenti riducenti sotto forma di NADPH per alimentare la lipogenesi, infine AKT può fosforilare e attivare

direttamente l'ATP- citratoliasi (ACLY), aumentando così la sintesi di acetil-CoA (figura 10).

Intimamente collegata all'attivazione di PI3K è la segnalazione attraverso i complessi di mTOR. Diversi processi metabolici sono attivati da mTORC1, tra cui la fosforilazione ossidativa promuovendo la biosintesi mitocondriale, sostenendo la sintesi de novo dei nucleotidi e la lipogenesi. (Saxton e Sabatini 2017).

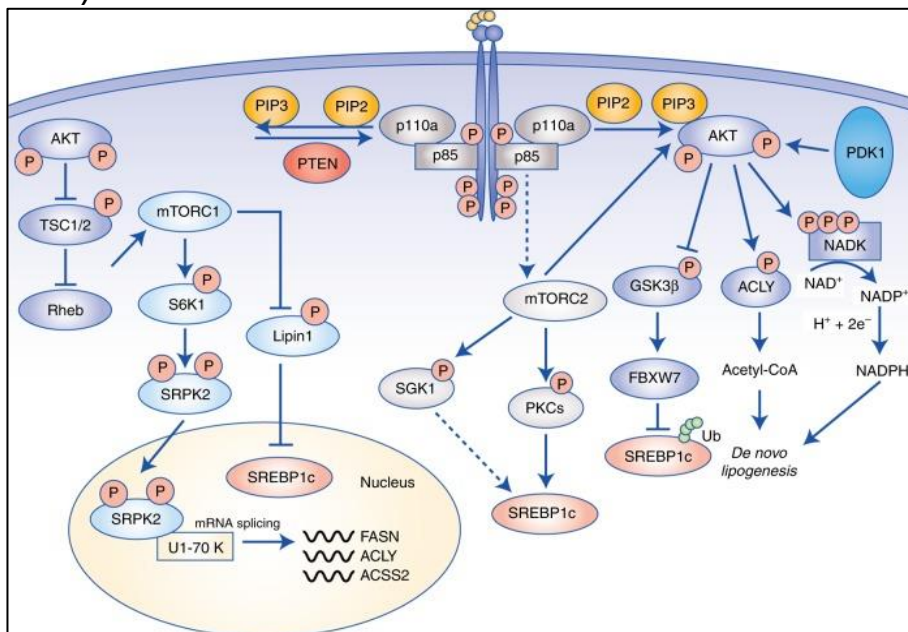


FIGURA 10: Regolazione del metabolismo lipidico tramite segnalazione PI3K-mTOR. La segnalazione PI3K è il pathway più frequentemente disregolato nel cancro e stimola crescita, proliferazione e sopravvivenza. (fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6964678/>)

Studi attuali hanno iniziato a mettere in luce la funzione della FAO (ossidazione degli acidi grassi) nelle cellule tumorali, in condizioni di stress metabolico, l'ossidazione degli acidi grassi può mantenere livelli intracellulari sostenuti di ATP e NADPH. Superare lo stress metabolico è un passaggio fondamentale per la crescita del tumore solido. La carnitina palmitoiltransferasi 1 (CPT1), che catalizza il passaggio limitante della FAO, è sovraespresso in numerosi tumori, interagisce funzionalmente anche con altri percorsi e fattori chiave nella regolazione dell'espressione genica e dell'apoptosi delle cellule tumorali, ed ha un ruolo anche nella neovascolarizzazione tumorale (Koundouros e Poulogiannis 2020).

1.7 METABOLISMO DEL CANCRO COME *TARGET* NELLA TERAPIA DEI TUMORI

La consapevolezza che il fenotipo metabolico delle cellule all'interno dei tumori è eterogeneo e distinto da quello delle loro controparti normali ha suscitato negli anni sempre maggiore interesse ed il *targeting* di molecole coinvolte nel metabolismo sembra promettente come nuova strategia antitumorale. Gli approcci metabolici funzionano in modo sistemico, al contrario delle terapie mirate, che richiedono un *targeting* specifico verso la genetica del cancro di un individuo. Le combinazioni terapeutiche che colpiscono il cancro attraverso molteplici vie metaboliche possono prevenire la progressione del cancro, incoraggiando l'inversione e la remissione.

Allo stato attuale, sono noti diversi agenti antitumorali in uso o in fase di sperimentazione che agiscono sui percorsi metabolici (Martinez-Outschoorn et al. 2017).

1.7.1 TARGET DEL METABOLISMO DEL GLUCOSIO

Il glucosio è il nutriente più abbondante nel sangue ed è un substrato metabolico comunemente utilizzato dalle cellule tumorali. Pertanto, un certo numero di farmaci che interferiscono con la glicolisi e l'OXPPOS sono oggetto di studio come agenti antitumorali (tabelle 1 e 2). I farmaci che hanno come bersaglio gli enzimi ed i trasportatori di prodotti, sono stati studiati in numerosi studi preclinici, inoltre, alcuni di questi sono coinvolti in studi clinici (Zhang et al. 2022).

BERSAGLIO	FARMACO	FASE DI SVILUPPO E OSSERVAZIONI
GLUT1	WZB117, silibinina e RNAi	-studi preclinici -attività antitumorale in vivo e in vitro
Esochinasi	2-desossiglucosio, lonidamina, acido 3-bromopiruvico e metil jasmonato	-studi preclinici e clinici -attività antitumorale in vivo e in vitro
Piruvato chinasi isoforma M2	TLN-232 e RNAi	-studi preclinici e clinici di fase II -attività antitumorale <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> e negli studi clinici di fase II
Lattato deidrogenasi A	GNE-140, FX11, galloflavina e RNAi	-studi preclinici e clinici -attività antitumorale in vivo e in vitro

TABELLA 1: Strategie terapeutiche per colpire il metabolismo glicolitico nel cancro. (ispirata alla fonte: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2016.60/tables/1>)

BERSAGLIO	AGENTE	FASE DI SVILUPPO E OSSERVAZIONI
Complesso mitocondriale I	Metformina, fenformina	-studi clinici di fase 3 -Attività antitumorale <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> e negli studi clinici di fase II -la metformina è approvata per il trattamento del diabete di tipo 2
Complesso mitocondriale II	Triossido di arsenico	-studi clinici e preclinici -approvato dalla FDA per la leucemia promielocitica acuta

TABELLA 2: Strategie terapeutiche per colpire la fosforilazione ossidativa nel cancro. (ispirata a fonte: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2016.60/tables/1>)

1.7.2 TARGET DEL METABOLISMO DELLA GLUTAMMINA

La glutammina è un nutriente fondamentale per la proliferazione cellulare poiché il suo azoto ammidico è un substrato obbligato per l'esosamina (uno zucchero amminico coinvolto nella sintesi di molecole glicosilate) e la biosintesi dei nucleotidi, inoltre questo composto può anche essere metabolizzato tramite il ciclo TCA per produrre energia, oppure essere convertita anche in glutammato, un precursore dell' α -chetoglutarato che può essere utilizzato per l'anaplerosi, la produzione di acidi grassi o la sintesi del glutatione. Quest'ultimo è un precursore critico per la maggior parte degli amminoacidi non essenziali, tra cui aspartato, alanina, arginina e prolina. Nel cancro si osserva un'attività aumentata degli enzimi coinvolti nella generazione di questi amminoacidi dal glutammato: la glutaminasi è l'enzima che catalizza la conversione della glutammina in glutammato ed il bis-2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il) etil solfuro (BPTES), un inibitore della glutaminasi, ha mostrato attività antitumorale in diversi modelli tumorali con elevata attività della glutaminasi. Un altro inibitore della glutaminasi, CB-839, non ha mostrato effetti collaterali significativi negli studi preclinici ed è attualmente sottoposto a studi clinici completi in pazienti con neoplasie solide ed ematologiche (Jin et al. 2023)

1.7.3 Target del metabolismo degli acidi grassi

Le cellule tumorali usano frequentemente gli acidi grassi come substrati catabolici, ed in tali condizioni il NADH e/o NADPH generati supportano la produzione di ATP, l'omeostasi redox e le reazioni di biosintesi, che a loro volta assicurano la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. La FAO produce 2,5 volte più ATP per mole rispetto all'ossidazione del glucosio e alcune cellule tumorali usano preferibilmente la FAO per alimentare la crescita per cui molti tumori potrebbero essere vulnerabili ai farmaci che modulano il metabolismo degli acidi grassi. Un esempio di questa strategia è l'inibizione dell'enzima che catalizza il passaggio limitante la velocità nella FAO; questo approccio ha dimostrato effetti antitumorali *in vitro* ed *in vivo*. L'etomoxir, un inibitore di CPT1, non è più in fase di sviluppo clinico, a causa dell'epatotossicità osservata nei pazienti con insufficienza cardiaca congestizia; tuttavia, il potenziale antitumorale di altri inibitori di CPT1, come perexilina e oxfenicina, che sono già approvati come trattamenti antiangiogenici in diversi paesi è stato

determinato. La peresilina aumenta l'efficienza del consumo di ossigeno bloccando la FAO e commutando il metabolismo energetico da lipidi a carboidrati; tuttavia, è stata segnalata la neurotossicità ed epatotossicità della peresilina per un uso prolungato (Liang 2023).

1.8 PROFILAZIONE METABOLICA

Le cellule tumorali possono adattarsi a un ambiente ostile, come l'ipossia, la carenza di nutrienti e l'eccessiva produzione di ROS, alterando i loro profili metabolici e i loro percorsi attraverso alterazioni genetiche ed epigenetiche di vari enzimi correlati al metabolismo (plasticità metabolica). Finora, le strategie di genomica funzionale si sono basate in gran parte su studi di espressione genica (trascrittomica) o profili proteici (proteomica) e questi approcci hanno portato a diversi successi nel campo della biologia del cancro, come l'identificazione di nuovi sottotipi di tumore, nonché biomarcatori trascrizionali e proteici per determinati tipi di cancro. Il carcinoma ovarico, ad esempio, è caratterizzato da eterogeneità intertumorale (sottotipizzazione istologica e molecolare) ed intratumorale (all'interno del microambiente tumorale). Partendo dal presupposto che il tumore ovarico contiene una piccola sottofrazione di cellule con caratteristiche di staminalità, i cambiamenti intratumorali nel profilo metabolico delle cellule del cancro ovarico sono differenti per le cellule staminali tumorali (CSC) e le cellule tumorali non staminali, in quanto le CSC sono più dipendenti dall'OXPPOS mitocondriale mentre le cellule non staminali ovariche si basano prevalentemente sul fenotipo glicolitico (Pastò et al. 2014). Inoltre, le cellule tumorali spesso possono mostrare un fenotipo ibrido glicolisi/OXPPOS. L'influenza dell'eterogeneità metabolica dovrebbe essere presa in considerazione prima del trattamento del cancro, ed allo stesso modo l'identificazione rapida e accurata delle alterazioni metaboliche e dello stato di riprogrammazione metabolica mediante lo sviluppo di tecniche non invasive potrebbe facilitare il trattamento ottimale del cancro.

2. SCOPO DELLA TESI

Le proteine, i geni o altri marcatori cellulari come i metaboliti forniscono un approccio alternativo e promettente per la diagnosi e la terapia del cancro. È noto che il metabolismo del cancro è alterato per consentire alla malattia di crescere rapidamente e proliferare.

La profilazione metabolica promette nuove strade per la diagnosi precoce delle malattie, una migliore comprensione dei processi patologici nonché informazioni su potenziali bersagli farmacologici attraverso l'identificazione di enzimi associati, fattori di trascrizione e trasportatori che sono anche alterati nel cancro.

In questo studio, il profilo metabolico di 18 *patient derived xenografts* (PDX) di tumore ovarico è stato analizzato mediante colorazione immunoistochimica con coloratore automatico e successiva analisi quantitativa con *digital pathology*. In particolare, è stata valutata l'espressione di 6 biomarcatori (2 per la via glicolitica, 2 per la via degli acidi grassi e 2 per il *pathway* della glutammina), ed i risultati della colorazione sono stati confrontati con dati di trascrittomici dei medesimi biomarcatori già presenti nel nostro laboratorio, il tutto per ottenere una classificazione metabolica di ciascun campione ed una valutazione della correlabilità dei risultati ottenuti con le due tecniche.

Ulteriore aspetto innovativo di questo lavoro è l'analisi di 3 biomarcatori metabolici in un sottogruppo di pazienti mediante la messa a punto di un saggio di immunofluorescenza multiplex con metodica Opal, al fine di valutare la co-localizzazione dei marcatori nel medesimo campione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE CELLULARI E CONDIZIONI DI COLTURA

In questo progetto di tesi sono state utilizzate linee cellulari di carcinoma ovarico, delle linee cellulari SK-OV-3 e OV-CAR-3 già presenti in laboratorio. Entrambe le linee cellulari hanno morfologia epiteliale, sono state isolate dall'ovaio di donne di razza caucasica con adenocarcinoma ovarico (figura 11 e sono disponibili tramite ATCC).

- SKOV3: è una linea cellulare di cancro ovarico umano con morfologia epiteliale. Queste cellule sono resistenti al fattore di necrosi tumorale e ad altri farmaci citotossici come la tossina difterica, il cisplatino e l'adriamicina. Questa linea cellulare è stata costituita nel 1973 dall'ascite di una donna caucasica di 64 anni affetta da adenocarcinoma dell'ovaio.
- OVCAR3: è una linea cellulare di adenocarcinoma ovarico sieroso di alto grado, la linea cellulare è sensibile a una varietà di farmaci chemioterapici. Le cellule OVCAR-3 dimostrano un aumento del contenuto di glutazione ed esprimono il prodotto del gene WT1, un marcatore di carcinoma ovarico sieroso avanzato. Questa linea cellulare è stata ottenuta dal liquido ascitico di una paziente di 60 anni con cancro ovarico refrattario al trattamento con cisplatino.

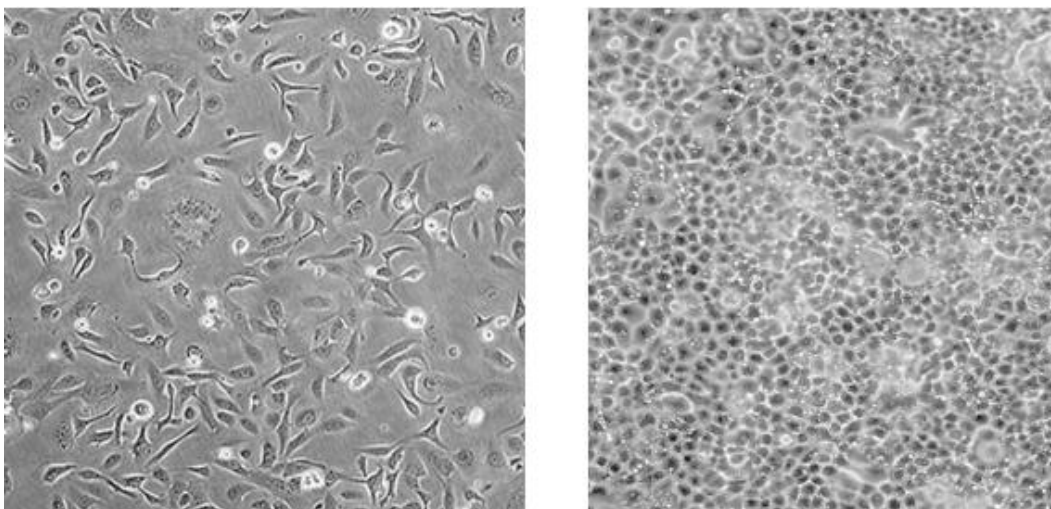


FIGURA 11: Morfologia SKOV3 (sinistra) e OV-CAR-3 (destra) ad alta densità. (fonte: www.atcc.org).

Le cellule sono state coltivate in RPMI 1640 (Euroclone Life Sciences Division, Pero (MI), Italy), addizionato con 10% di siero fetale bovino per le SKOV3 e 20% per le OVCAR3 (FBS, Life Technologies, Gaithersburg, MD), 1% di Sodio Piruvato 100 mM, 1% di HEPES (Buffer solution 1M pH 7,3), 1% di Ultraglutammmina 200 mM e 1% di un mix di antibiotici e antimicotici (penicillina-streptomina 100X, GIBCO, Life Technologies, Gaithersburg, MD) e fatte crescere in incubatore che fornisce le condizioni corrette di crescita, temperatura, CO₂ e grado di umidità costanti e stabili.

3.1.1 I MODELLI XENOTRAPIANTATI DERIVATI DA PAZIENTI (PDX)

I PDX vengono ottenuti tramite il trasferimento diretto di cellule di tumori umani in topi altamente immunodeficienti e poi mantenuti tramite il passaggio da topo a topo. I campioni tumorali ottenuti dai pazienti mediante resezione chirurgica o biopsia devono essere mantenuti in condizioni sterili per prevenire la contaminazione batterica. Prima dell'impianto, i tumori vengono tagliati in piccoli pezzi e/o digeriti in singole cellule. I tessuti o le cellule possono essere impiantati eterotopicamente (nella maggior parte dei casi sottocutaneamente) o ortotopicamente in topi immunodeficienti. Vengono utilizzati principalmente per valutare l'efficacia dei farmaci antitumorali o per chiarire le caratteristiche delle cellule cancerose e del loro microambiente, poiché i modelli assomigliano molto ai tumori originali dei pazienti. I modelli PDX sono stati stabiliti per molti tipi di tumori, tra cui il cancro al seno, il cancro del colon-retto, il cancro al pancreas, il linfoma a cellule B, il cancro ai polmoni e il cancro ovarico, questi essendo ad elevata mortalità spesso non forniscono un modello preclinico ottimale per lo studio delle terapie, un modo per superare questo ostacolo è la disponibilità dei modelli PDX. In questo studio sono stati utilizzati PDX precedentemente derivati da cellule di ascite di 18 pazienti dell'Istituto Oncologico Veneto con carcinoma ovarico epiteliale.

3.2 TRASFEZIONE MEDIANTE *short interfering RNA* (siRNA)

Lo scopo della trasfezione era di silenziare geni bersaglio nelle linee cellulari SKOV3 (*SLC7A5* e *ACACA*) e OVCAR3 (*CPT1A*) per l'ottenimento di un controllo positivo (le cellule non trattate o trattate con controllo negativo di silenziamento) e negativo (le cellule silenziate) da utilizzare durante le colorazioni immunoistochimiche (IHC). Per gli esperimenti presentati in questa tesi è stata scelta una trasfezione mediata da lipidi (lipofectamina).

La trasfezione cationica mediata dai lipidi è uno dei metodi più diffusi per introdurre materiale genetico estraneo nelle cellule: questi reagenti a base di lipidi cationici formano spontaneamente nuclei condensati lipidici acidocationici attraverso interazioni elettrostatiche tra l'acido nucleico caricato negativamente e il gruppo di testa caricato positivamente del reagente lipidico sintetico. Si ritiene che questi complessi vengano assorbiti dalla cellula attraverso l'endocitosi e quindi rilasciati nel citoplasma. Una volta nella cellula, gli RNA trasfettati vengono riconosciuti da Dicer, un enzima che riconosce e si lega a molecole di RNA a doppio filamento. Dicer taglia il dsRNA in frammenti più piccoli di RNA a doppio filamento di circa 21-25 nucleotidi di lunghezza. Questi frammenti vengono chiamati small interfering RNA (siRNA). Ogni siRNA prodotto da Dicer ha due filamenti: uno sarà il filamento guida (che è complementare all'mRNA bersaglio) e l'altro è il filamento passeggero (che sarà eliminato). I siRNA sono quindi incorporati nel RNA-Induced Silencing Complex (RISC) e qui viene eliminato il filamento passeggero. Il filamento guida del siRNA all'interno del RISC riconosce e si lega a una sequenza complementare presente in un RNA messaggero (mRNA) bersaglio. Il RISC, spesso mediato dalla proteina Ago2 (Argonate 2) che fa parte di questo complesso proteico, taglia l'mRNA nel punto di legame. Questo taglio provoca la degradazione dell'mRNA e impedisce la traduzione della proteina corrispondente (figura 12).

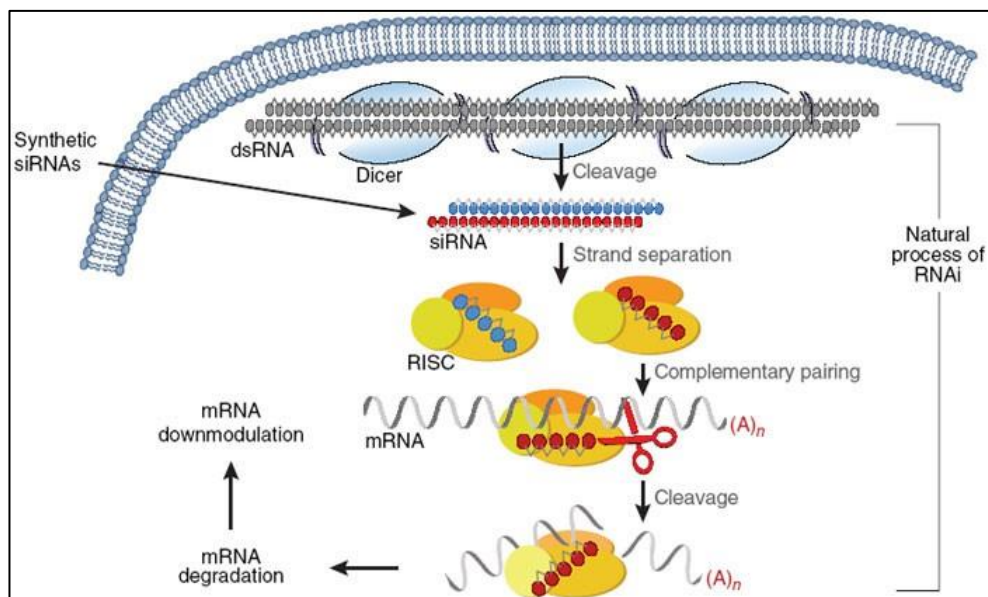


FIGURA 12: Il meccanismo cellulare dell'interferenza dell'RNA.

Per il silenziamento le cellule sono state piastrate in piastre *multiwell* da 6 pozzetti con una densità di $1,5 \times 10^5$ cellule/pozzetto e per ogni esperimento sono state previste le seguenti condizioni: cellule non trattate (MOCK), cellule trattate con siRNA di controllo *scramble* (Life technologies) e cellule trattate con i diversi siRNA aventi come bersaglio i geni di interesse (*ACACA*, *CPT1A*, *SLC7A5*). Lo *scramble* è un controllo negativo formato da sequenze aspecifiche che non dovrebbero riconoscere nessun gene. Le cellule sono trattate con il controllo negativo per escludere che la sola tecnica di introduzione delle sonde non causi modulazioni e gli eventi biologici che voglio studiare, indipendentemente dal silenziamento del gene bersaglio. I siRNA che sono stati utilizzati sono:

GENE SILENZIATO	NOME SONDA	MARCA	LINEA CELLULARE
<i>ACACA</i>	s883	Ambion (Thermo Fisher)	SKOV3
<i>CPT1A</i>	s3467	Ambion (Thermo Fisher)	OVCAR3
<i>SLC7A5</i>	5762188	Invitrogen (Thermo Fisher)	SKOV3

Tabella 3: I siRNA che sono stati utilizzati per il silenziamento genico.

Dopo 12 ore dalla semina delle cellule, è stato eliminato il terreno di coltura e si è aggiunto ad ogni pozzetto OPTIMEM con GlutaMAX (Gibco, Thermo Fisher). Il terreno Opti-MEM è un terreno minimo (un terreno privo di lipidi, proteine e fattori di crescita) che facilita la trasfezione. Il supplemento di medium GlutaMAX favorisce la crescita e la sopravvivenza cellulare in coltura. Inoltre, per ogni pozzetto (fatta eccezione del MOCK) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione costituita da:

MIX 1: 250 μ L di OPTIMEM+LIPOFECTAMINE (Lipofectamine® RNAiMAX, Thermo Fisher)

MIX 2: 250 μ L di OPTIMEM + siRNA/ *SCRAMBLE*.

Dopo 6 ore l'OPTIMEM è stato sostituito con RPMI completo. Dopo 48 ore dalla trasfezione sono stati raccolti i *pellet* di cellule e per la successiva estrazione dell'RNA e prodotti i cell block con le restanti cellule.

3.3 ESTRAZIONE, QUANTIFICAZIONE E RETROTRASCRIZIONE RNA

Dai pellet cellulari è stato isolato e purificato l'RNA. Da protocollo fornito dalla ditta produttrice, il *pellet* è stato risospeso in 500 μ L di Trizol® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), che serve per la dissociazione dei complessi nucleoproteici, successivamente sono stati aggiunti 200 μ L di cloroformio, si è incubato per 3 minuti a temperatura ambiente e poi si è centrifugato a 1200g per 15 minuti. Dopo la centrifugazione, la soluzione si separa in fasi distinte: una fase inferiore, rossa, fenolo-cloroformio, un'interfase e la fase acquosa superiore, incolore (figura 13).

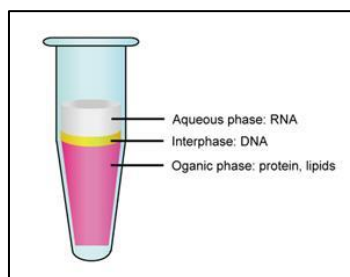


Figura 13: Separazione delle fasi della soluzione. (fonte <https://www.creative-diagnostics.com/total-protein-extraction-by-trizol.htm>)

L'RNA rimane esclusivamente nella fase acquosa per cui questa è stata trasferita in una nuova eppendorf, successivamente sono stati aggiunti 1.5 μ L di glicogeno che servono a vedere meglio l'RNA, sono stati aggiunti poi isopropanolo e etanolo al 75%; le due aggiunte sono intervallate da una centrifuga e dopo ogni centrifuga il surnatante è stato rimosso, alla fine il pellet è stato risospeso in acqua DEPC.

La quantificazione è stata effettuata tramite lo spettrofotometro NanoDrop One (Thermo Scientific) misurando l'assorbanza a 260 nm. Il Nano Drop inoltre fornisce due valori indicanti la purezza del campione, il rapporto 260/280 (indicante contaminazioni dovute alla presenza di proteine) ed il rapporto 260/230 (indicante la contaminazione da solventi e composti organici). Tutti i campioni misurati rientravano nei parametri stabiliti indicanti campioni non contaminati, presentando valori intorno ad 1,8 per il rapporto 260/280 e intorno al 2 per il rapporto 260/230.

Infine, 500 ng di RNA sono stati retrotrascritti utilizzando il kit PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa, Kanagawa, Japan), secondo le istruzioni dei fornitori. La reazione è stata condotta nel termociclatore Applied Biosystem 2720 (Thermo Fiscer Scientific) con il programma riportato nella seguente tabella:

Temperatura	Tempo
25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min

Tabella 4: temperatura e tempi del protocollo di retrotrascrizione

3.4 Real time-PCR (RT-PCR)

La RT-PCR è stata eseguita usando un termociclatore (QuantStudio 7 Pro-Thermo Fisher Scientific) dove sono state eseguite le condizioni riportate in tabella 4, seguendo il protocollo SYBR GREEN PCR kit (Meridian-BioScience). I primer usati sono descritti di seguito:

GENE	SEQUENZA PRIMER FORWARD	SEQUENZA PRIMER REVERSE
<i>ACACA</i>	5'-CACAGTCCCAGCACTCACAT-3'	5'-ACAACGCAGGCATCAGAAGA-3'
<i>CPT1A</i>	5'-TCGTCACCTCTTCTGCCTTT-3'	5'-GGGGTCTGGCTTGTGATTA-3'
<i>SLC7A5</i>	5'-GAAGGCACCAAACCTGGATGT-3'	5'-GAAGTAGGCCAGGTTGGTCA-3'

Tabella 5: Le sequenze dei primer utilizzati per la RT-PCR

Allo scopo di ridurre l'errore tecnico, ogni campione è stato testato in duplicato in modo da poter calcolare la media dei due relativi Ct. È stato poi calcolato il ΔCt sottraendo la media dei Ct relativi al gene *housekeeping* (LMNA) alla media dei Ct relativi ai campioni. I valori così ottenuti sono stati utilizzati nella fase successiva di elaborazione dei dati in cui, attraverso il calcolo del *fold change*, è stata valutata la diversa espressione del gene d'interesse tra gruppi di campioni mediante la seguente equazione: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.5 ALLESTIMENTO *CELL BLOCK* CITOINCLUSI

La metodica di allestimento dei *cell block* permette di ottenere un preparato cellulare fissato in formalina ed incluso in paraffina per indagini di tipo immunoistochimico. Il *cell block* si può conservare a lungo per poterne disporre anche in tempi successivi. I citoinclusi sono stati eseguiti per cellule non trattate (MOCK), cellule trasfettate con il controllo negativo (*SCRAMBLE*) e cellule in cui sono stati silenziati i geni dei nostri marcatori di interesse. Per l'allestimento si prelevano minimo 5000000 di cellule e si risospendono in 200 μ l di RPMI semplice. Si prepara l'agarosio 2 %, che verrà aggiunto alla sospensione preparata in precedenza e si lascia solidificare, successivamente il *cell block*, si mette in formalina per la fissazione. L'inclusione in paraffina viene fatta nella sezione di Anatomia patologica dell'Istituto Oncologico Veneto. I blocchetti ottenuti sono stati tagliati al microtomo (modello Leica

SM2010R) e le sezioni (4 µm) montate su vetrini polarizzati e lasciate asciugare tutta la notte a temperatura ambiente.

3.6 IMMUNOISTOCHEMICA

L'immunoistochimica (IHC) consente la visualizzazione delle proteine nei tessuti fornendo sia il livello che il dato spaziale di espressione. Durante una colorazione IHC, la proteina di interesse viene rilevata mediante il legame di un anticorpo primario. Questa interazione anticorpo-antigene viene quindi visualizzata tramite rilevamento cromogenico o fluorescente utilizzando un anticorpo secondario.

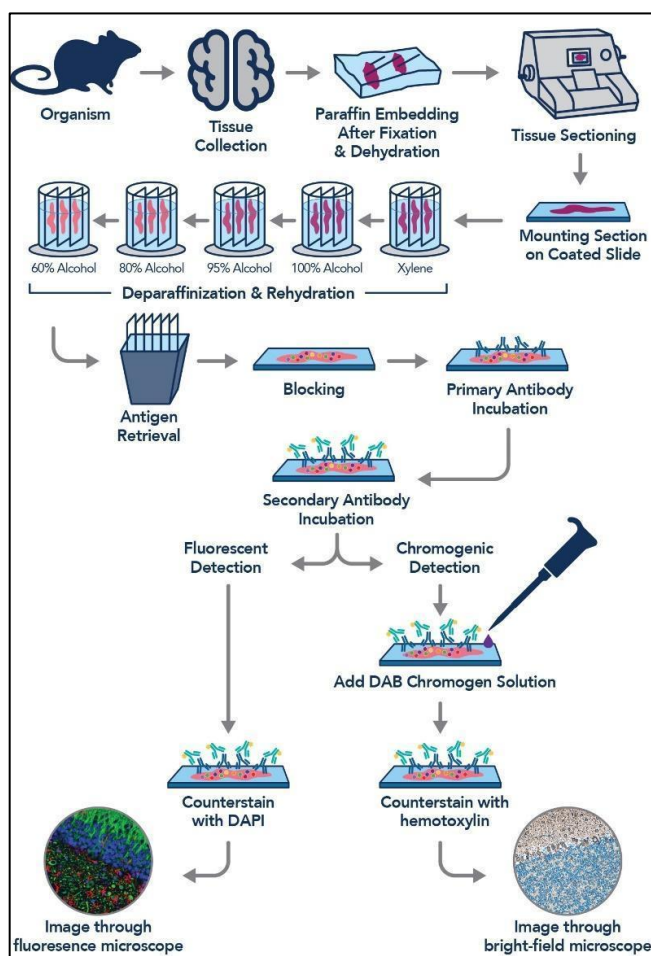


FIGURA 14: Panoramica flusso di lavoro IHC

Nel nostro laboratorio è presente un sistema automatico di colorazione, il BOND RX (Leica biosystem, Wetzlar, Germany figura 15) che esegue tutti i passaggi previsti nel protocollo IHC (figura 14): la deparaffinizzazione/reidratazione viene fatta usando una miscela pronta all'uso (Dewax solution, Leica Biosystems Italia) formata da alcol e acqua. Successivamente avviene il recupero dell'antigene, una fase cruciale del protocollo, che si effettua prima dell'ibridazione con l'anticorpo primario e consiste nella rottura dei legami crociati che possono formare le proteine

durante la fissazione, rendendo così accessibili i siti antigenici, Nei protocolli usati in questo lavoro di tesi il recupero viene favorito dal calore e da un tampone fornito dalla ditta a base di Tris-EDTA (pH 9).Dopo la preparazione del tessuto e il pretrattamento per il recupero dell'antigene, la visualizzazione dell'interazione anticorpo-antigene può essere eseguita in diversi modi: il metodo utilizzato in questo sistema e prevede l'uso di un anticorpo primario (tabella 6) e di un anticorpo secondario coniugato alla perossidasi di rafano che catalizza una reazione di ossidoriduzione tra il 3,3'-diaminobenzidina (DAB), che si ossida e forma un precipitato marrone insolubile, ed il perossido di idrogeno che viene ridotto ad acqua. Il DAB è insolubile, estremamente stabile e resistente al calore. Dopo la colorazione automatizzata, i vetrini sono stati messi a disidratare 3 minuti rispettivamente in acqua, etanolo 95%, etanolo 100%, xilene ed infine è stato aggiunto il balsamo (Entellan®, Merck Millipore) per il fissaggio del vetrino coprioggetto.

MARCATORE	ANTICORPO, SPECIE, DILUIZIONE	PRODUTTORE
ACC	anti-ACC mAB, coniglio, 1:100	Cell Signaling Technology
CPT1A	anti-CPT1A mAB, coniglio 1:150	Cell Signaling Technology
SLC7A5	anti-SLC7A5 mAB, coniglio 1:300	Cell Signaling Technology
MCT1	anti-MCT1, mAB coniglio 1:1500	Abcam
MCT4	anti-MCT4, mAB topo 1:200	Santa Cruz Biotechnology
GLS	anti-GLS, mAB coniglio 1:200	Abcam

TABELLA 6: anticorpi I utilizzati per l'IHC.



FIGURA 15: BOND RX Automated IHC (Leica biosystem, Wetzlar, Germany) con le taniche contenenti i solventi (*epitope retrieval 1 e 2, dewax solution, DI water, wash buffer, Alcohol*) ed i rifiuti (*bulk waste e hazardous waste*).

I risultati dell'espressione delle proteine valutate con IHC sono stati espressi utilizzando l'*H-score*. L'*H-score* è un sistema di punteggio che va da 0 a 300, utilizzato per quantificare l'espressione di proteine in campioni di tessuto, generalmente in contesto di immunohistochimica. È comunemente impiegato in ambito medico e di ricerca per valutare l'intensità e la distribuzione dell'immunoreattività nei campioni tissutali, soprattutto nel campo dell'oncologia. Il calcolo dell'*H-score* si basa sulla somma dei prodotti delle percentuali di cellule positive per una certa intensità di colorazione e la corrispondente intensità.

L' *H-score* fornisce una misura semiquantitativa che può essere utilizzata per confrontare l'espressione proteica tra diversi campioni o per correlare l'espressione proteica con parametri clinici o patologici.

3.7 DIGITALIZZAZIONE VETRINI

È stata fatta tramite lo scanner Aperio CS2, il cui *software* permette di creare rapidamente e agevolmente vetrini digitali (eSlide) di qualità e risoluzione elevate (fino a 200x). La scansione si effettua selezionando l'area di interesse dell'utente e inserendo diversi punti di fuoco.

3.8 DIGITAL PATHOLOGY

L'analisi computerizzata delle immagini offre la possibilità di utilizzare i dati qualitativi inerenti a un'immagine digitale per estrarre dati numerici sulla densità e sulla distribuzione dell'espressione di un biomarcatore all'interno di un campione di tessuto. In questo studio sono stati utilizzati come *software* di *Digital Pathology*, Aperio Image Scope® (versione 12.4.0.708, Leica Biosystems) per i marcatori di membrana, QuPath (versione 0.5.0) per i marcatori citoplasmatici ed InForm® (versione 2.6.7900.18857, Akoya Biosciences) per le immagini di immunofluorescenza. Tipicamente, le immagini dell'intera *slide* contengono una grande quantità di informazioni che può essere difficile da un punto di vista computazionale elaborare nella loro interezza, inoltre, non tutte le regioni dell'immagine dell'intera diapositiva sono necessariamente informative, per cui prima di iniziare l'analisi è opportuno selezionare la regione d'interesse. La maggior parte delle immagini di diapositive digitali vengono archiviate come formato di immagine piastrellato e multi-risoluzione in cui le risoluzioni incrementali delle immagini vengono archiviate come parte di una struttura piramidale. Qui, la rappresentazione con la risoluzione più bassa è al vertice della piramide (figura 16).

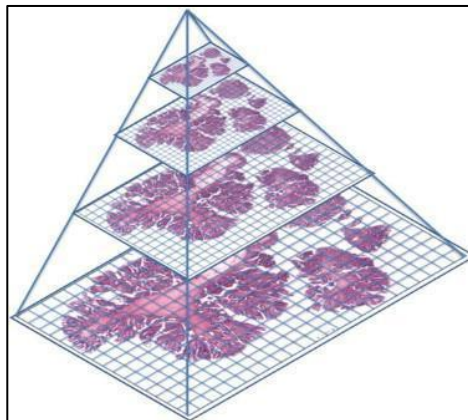


FIGURA 16: Le immagini delle diapositive digitali sono rappresentate come una struttura piramidale piastrellata per consentire la visualizzazione di immagini in posizioni specifiche e risoluzioni diverse.

A differenza di ImageScope® e QuPath, InForm® non lavora su immagini piramidali ma su singole ROI scelte arbitrariamente dall'operatore e salvate in formato .tiff.

In generale, nei tre *software* utilizzati per la quantificazione delle immagini sono presenti numerosi algoritmi computazionali che permettono la modifica di una varietà di parametri di analisi, eseguendo l'effettiva elaborazione e segmentazione dell'immagine. L'algoritmo di ImageScope® usato è il MEMBRANE V9 per i marcatori di membrana (MCT4, MCT1, SLC7A5). In figura

17 è riportata una schermata esplicativa della pagina di settaggio dell'algorithm del software ImageScope.

Membrane Identification		
Membrane Detection Threshold	240	
Include Cells	All	
Max Cell Radius (um)	5	
Min Cell Size (um ²)	30	
Max Cell Size (um ²)	2000	
Cell Roundness	0	
Cell Compactness	0	
Cell Elongation	0	

Nuclei Identification		
Method	Automatic	
-- Threshold Lower Limit	0	
-- Threshold Upper Limit	48	
Smoothing (um)	2	
Merging	1	

Nuclei Exclusion		

Membrane Identification		

Scoring Criteria		

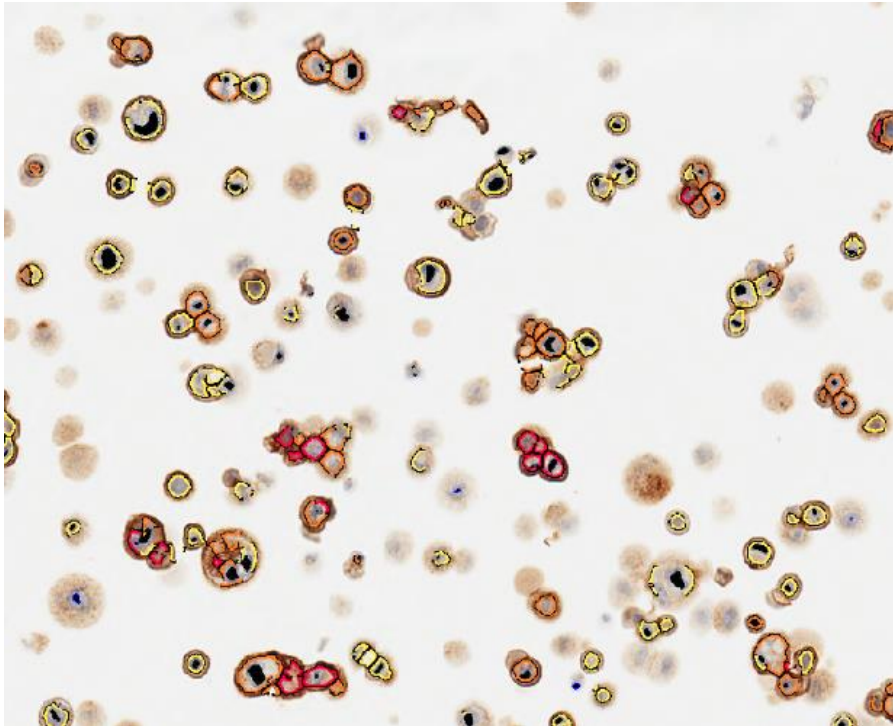
Plots		

FIGURA 17: Alcuni parametri ottimizzati per l'algorithm MEMBRANE V9.

3.8.1 ALGORITMO MEMBRAN V9

L'algorithm IHC Membrane Image Analysis rileva la colorazione della membrana per le singole cellule tumorali nelle regioni selezionate e quantifica l'intensità e la completezza della colorazione della membrana.

Le cellule tumorali sono classificate individualmente, in base all'intensità della colorazione di membrana come 0 (nessuna colorazione), 1+ (giallo), 2+ (arancione) e 3+ (rosso). Per la progettazione l'algorithm sono stati ottimizzati diversi parametri (figura 17), tra i quali gli "Scoring Criteria" che va con un numero che va da 0 a 225; l'ottimizzazione di questo parametro è importante per definire le classi di colorazione della membrana (0,1+,2+,3+), corrispondenti ai poi ai livelli di espressione dei marcatori. Altri parametri fondamentali riguardano l'identificazione delle membrane (comprendenti nucleità, rotondità, compattezza e dimensione delle cellule), l'identificazione dei nuclei, ed i criteri di esclusione dei nuclei.



(3+) Cells	11314
(2+) Cells	30436
(1+) Cells	96999
(0+) Cells	8978

FIGURA 18: Esempio di classificazione dell'espressione di biomarcatori di membrana (MCT4) in base all'intensità di colorazione (ingrandimento 200X).

3.8.2 QuPath

Il secondo software di analisi di immagini bioanalitiche utilizzato in questo studio è QuPath.

QuPath, abbreviazione di Quantitative Pathology, è un software open source, è stato progettato da ricercatori dell'università di Edimburgo con un'interfaccia facile da usare che fornisce a ricercatori e diagnostici la possibilità di navigare facilmente in attività complesse, come il rilevamento automatico di molte migliaia di oggetti, la loro classificazione e il loro conteggio su immagini di grandi dimensioni, il tutto offrendo flessibilità e capacità di elaborazione automatizzata ad alta produttività.

QuPath è stato utilizzato per l'analisi quantitativa di marcatori mitocondriali come GLS, CPT1A e ACC. Per GLS e CPT1A, la cui colorazione in immunohistochimica fornisce un risultato "puntinato" è stata scelta una classificazione a 2 classi: 0+ (negativo) e 1+ (positivo) (figura 19). Per ACC è stata usata una classificazione a 4 classi analoga a quella usata dal software ImageScope.

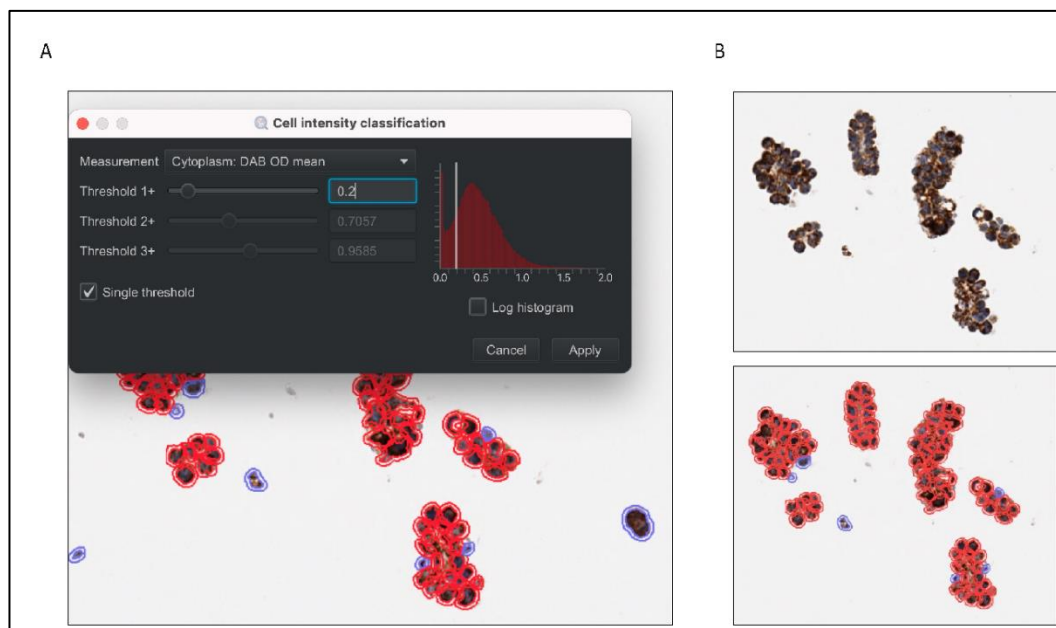


Figura 19: nel pannello A c'è la maschera per il settaggio dell'algoritmo che valuta l'intensità, mentre nel pannello B c'è un esempio di risultato dell'espressione di un biomarcatore citoplasmatico (GLS). L'ingrandimento è 200x.

3.9 L'OPAL® MULTIPLEX FLUORESCENT IHC (mIF)

Il multiplexing può essere definito come la rilevazione simultanea di almeno 2 marcatori sulla stessa sezione di tessuto. L'analisi dell'espressione multiplex, in particolare la mIF, è diventata un test utile nelle indagini di ricerca sul microambiente tumorale (TME) e altre popolazioni immunitarie o anche per studiare l'eterogeneità spaziale dei biomarcatori, come il recettore degli estrogeni (ER) e il recettore del progesterone nel carcinoma mammario.

I protocolli della mIF hanno stretta somiglianza con i protocolli per l'IHC convenzionale, consentendo la colorazione manuale o la colorazione automatizzata utilizzando i normali coloratori automatici che buona parte dei laboratori clinici ha già a disposizione. Questo metodo può essere applicato sia ai tessuti freschi/congelati che a quelli FFPE (biopsie tissutali incluse in paraffina).

Nel nostro laboratorio, la colorazione viene fatta automatizzata dal coloratore automatico Leica BOND RX descritto nel paragrafo 3.6 e il protocollo di colorazione è descritto nella figura 20.

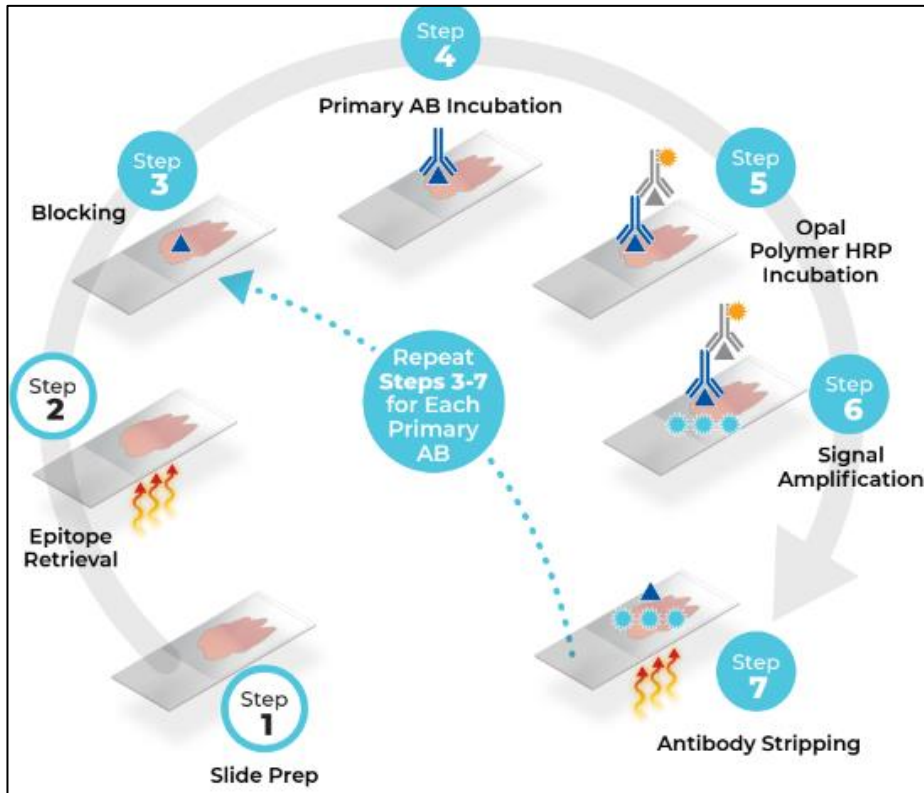


FIGURA 20: Diagramma di colorazione iterativa per i test IHC *Opal Multiplex* con Leica Bond RX.

In particolare, l'epitope retrieval su consiglio della ditta produttrice, è stato fatto in doppio, prima con buffer EDTA e poi con buffer citrato che viene usato nei protocolli IHC.

Nella mIF sono stati utilizzati i fluorofori come reporter, ci sono due modi di base per farlo: tramite etichettatura diretta o indiretta, il nostro protocollo ha previsto una mIF indiretta, il fluoroforo è coniugato a un anticorpo secondario, che è specifico per l'anticorpo primario. I singoli fluorofori hanno la capacità di essere eccitati da una lunghezza d'onda ed emettere a una lunghezza d'onda con diversi picchi spettrali su uno sfondo scuro. La mIF indiretta può sfruttare strategie di amplificazione. Akoya Biosciences mette a disposizione i fluorofori *Opal-TSA*. La *TSA*, o *Tyramide Signal Amplification* migliora il rilevamento dell'immunofluorescenza (IF) utilizzando la perossidasi di rafano (HRP) per convertire le molecole *TSA* in radicali liberi che si legano covalentemente ai residui di tirosina vicino all'epitopo proteico bersaglio (figura 21).

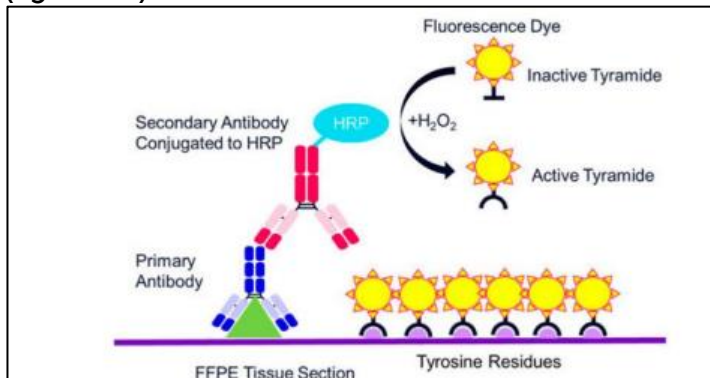


Figura 21: Meccanismo di amplificazione del segnale della tiramide.

Sono disponibili diversi kit di fluorofori Opal™, questi vengono forniti completi di tutti gli anticorpi secondari e i reagenti di rilevamento necessari da utilizzare con il sistema Leica® BOND RX™. I fluorofori selezionati per il rilevamento *Opal* supportano fino a 8-plex staining (9 colori inclusa la controcolorazione DAPI) e sono stati attentamente selezionati per fornire una separazione spettrale ottimale nell'intervallo di lunghezze d'onda visibili. Quello da noi utilizzato è un *Opal 7-plex* kit con 6 *Opals* + DAPI, da cui abbiamo selezionato 3 fluorofori con spettro di emissione distante. Nella tabella 7 sono descritti i fluorofori e gli anticorpi 1 utilizzati, *Opal* consente l'uso di qualsiasi anticorpo primario standard non etichettato, nel nostro protocollo sono stati utilizzati gli stessi anticorpi utilizzati nell'IHC, l'abbinamento ha tenuto conto di spettri di emissione dei fluorofori e co-localizzazione degli antigeni target.

	ANTICORPO 1	OPAL
GLS	mAB coniglio	Opal 520
CPT1A	mAB coniglio	Opal 650
MTC4	mAB topo	Opal 570

Tabella 7: fluorofori e anticorpi selezionati per il rilevamento *Opal*.

Una volta colorati i vetrini, vengono scansionati dal sistema di imaging digitale multispettrale Mantra™ (Akoya Biosciences) (figura 21).



Figura 22: Il sistema di imaging digitale multispettrale Mantra (Akoya biosciences) e il software InForm per l'acquisizione e l'analisi delle immagini digitali.

Dopo l'acquisizione dell'immagine dell'intero vetrino, le immagini sono state analizzate con il software di analisi delle immagini inForm (Akoya Biosciences) per quantificare le caratteristiche biologiche a livello cellulare, a differenza dell'IHC in cui si fa un'analisi su tutto il vetrino qui si lavora su regioni di interesse (ROI) scelte dall'operatore. Il programma software inForm (versione 2.6.7900.18857, Akoya Biosciences) (figura 23) è stato sviluppato per integrare le capacità multispettrali con l'analisi delle immagini per (1) *unmixing* e isolare spettralmente più segnali Opal e autofluorescenza di fondo; (2) rilevare diverse architetture tissutali (ad esempio, tumore, stroma, vasi e

necrosi) utilizzando una funzione di riconoscimento di pattern di rete neurale basata sull'apprendimento automatico; (3) segmentare singole cellule a partire dai nuclei, in base a DAPI, e utilizzando altri marcatori per rilevare regioni membranose e citoplasmatiche delle cellule; (4) identificare i tipi di cellule di interesse in base ai livelli del segnale del marcatore e al pattern di colorazione cellulare utilizzando algoritmi di regressione logistica multinomiale addestrati dall'utente (5) quantificazione delle intensità di segnale dei diversi marcatori e analisi quantitativa dei segnali co-espressi dalla stessa cellula

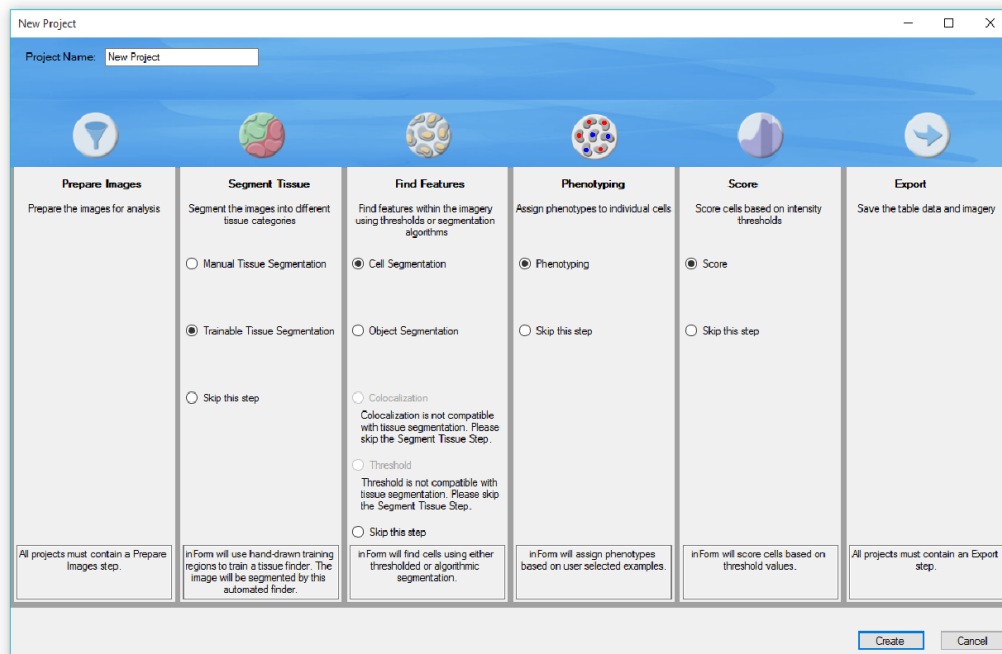


Figura 23: la tipica schermata di apertura del programma software InForm che consente la scelta tra i vari algoritmi.

4 RISULTATI

4.1 PRODUZIONE DEI CONTROLLI POSITIVI E NEGATIVI TRAMITE SILENZIAMENTO GENICO DI CELLULE OVARICHE

La presenza di controlli positivi e negativi in ogni esperimento di immunohistochimica serve a garantire che l'anticorpo primario utilizzato vada a riconoscere in maniera specifica il marcatore di interesse ed è pertanto un elemento fondamentale di ogni colorazione.

Per l'allestimento di controlli positivi e negativi da usare nelle successive immunohistochimiche (IHC), le linee cellulari SKOV-3 e OVCAR-3 sono state trasfettate con siRNA, con *SCRAMBLE* (controllo negativo) o non trasfettate (MOCK). L'avvenuto silenziamento è stato confermato con RT-PCR ed IHC. I controlli artificiali sono stati allestiti per i marcatori ACC, SLC7A5 e CPT1A mentre per i marcatori MCT1, MCT4 e GLS erano già disponibili in laboratori (figure 28,29,30).

Dopo 48 ore dal trattamento con siRNA è stato estratto l'RNA e quantificato per procedere con la retrotrascrizione a cDNA e valutare l'efficienza del silenziamento mediante RT-PCR.

I livelli di espressione di ciascun marcatore sono stati normalizzati con i livelli di espressione del gene *LMNA*. In figura 24, 25 e 26 vengono riportati gli istogrammi relativi al *fold change* dell'espressione di mRNA di ciascun controllo artificiale e le colorazioni IHC corrispondenti, rispettivamente ACC (FIGURA 24), SLC7A5 (FIGURA 25) e CPT1A (FIGURA 26).

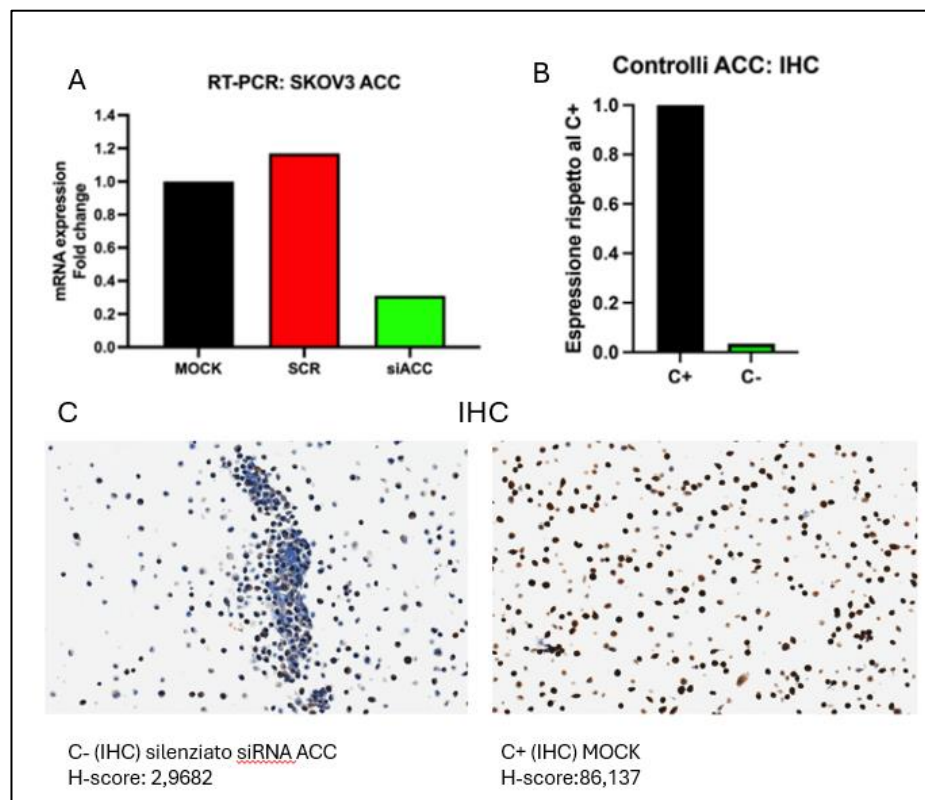


FIGURA 24: Valutazione mediante RT-PCR dell'mRNA di ACC (pannello A) e dell'espressione di proteina (pannello B), nel pannello C le colorazioni IHC rispettivamente del silenziato ACC (sinistra) e del MOCK (destra) della linea cellulare SKOV3, ad ingrandimento 100x.

Dai dati di RT-PCR possiamo apprezzare che, rispetto al siRNA SCRAMBLE e al MOCK si è ottenuta una riduzione del livello di espressione dell'mRNA di ACC superiore al 60% del siACC (figura 24, pannello A).

L'analisi immunostochimica dei medesimi campioni ha evidenziato una riduzione di ACC del silenziato (C-) rispetto al controllo non silenziato (C+) superiore al 90% (figura 24, pannello B), apprezzabile anche occhiometricamente (figura 24, pannello C).

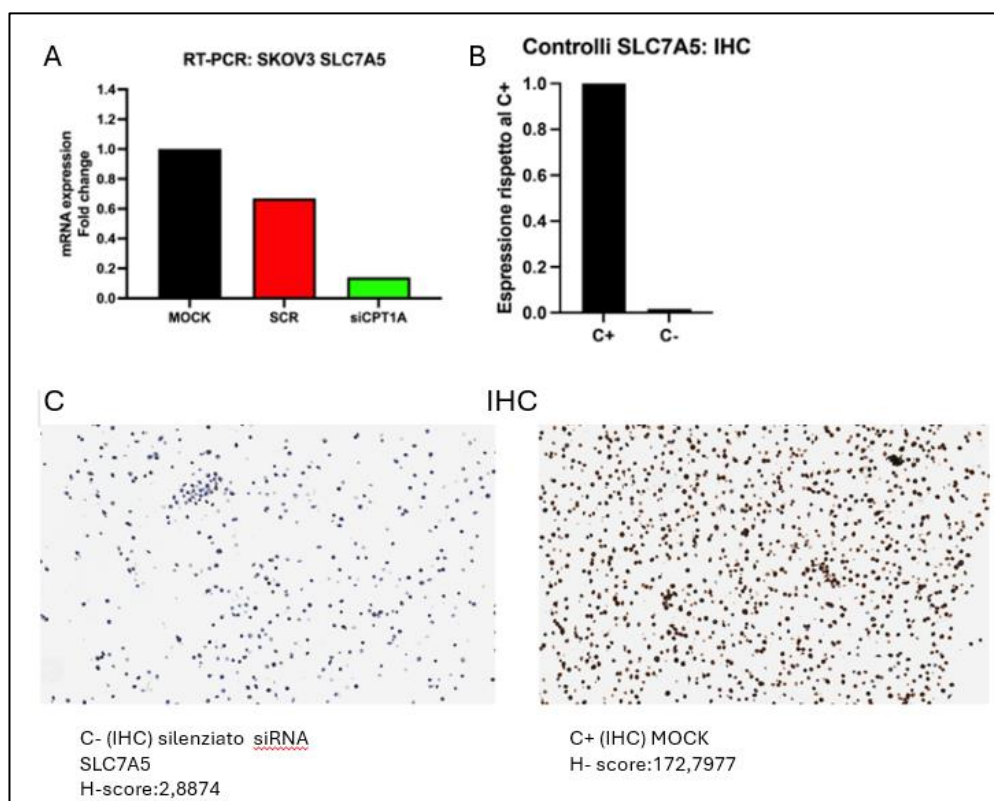


FIGURA 25: Valutazione mediante RT-PCR dell'mRNA di SLC7A5 (pannello A) e dell'espressione della proteina (pannello B), nel pannello C le colorazioni IHC rispettivamente del silenziato SLC7A5 (sinistra) e del MOCK (destra) della linea cellulare SKOV3, ad ingrandimento 100x.

Analogamente, abbiamo analizzato anche i controlli positivi e negativi di SLC7A5 e CPT1A (figura 25 e figura 26, rispettivamente).

Dall'analisi del livello di trascritto possiamo apprezzare che, rispetto al siRNA SCRAMBLE e al MOCK si è ottenuta una riduzione del livello di espressione di SLC7A5 superiore al 90% (figura 25, pannello A). Questa riduzione è stata confermata anche a livello proteico (figura 25, pannello B) e può essere apprezzata anche occhiometricamente.

Per la produzione dei controlli di CPT1A abbiamo silenziato sia le cellule SKOV-3 che le OVCAR-3, entrambe esprimenti buoni livelli della proteina secondo la letteratura. Malgrado la riduzione dei livelli di espressione dei trascritti in entrambe le linee superiore all'80% (figura 26 e figura 27 pannello A), solo la linea OVCAR-3 ha mostrato una riduzione del 60% (figura 26, pannello B), facendoci scegliere quest'ultimi come controlli per le successive colorazioni.

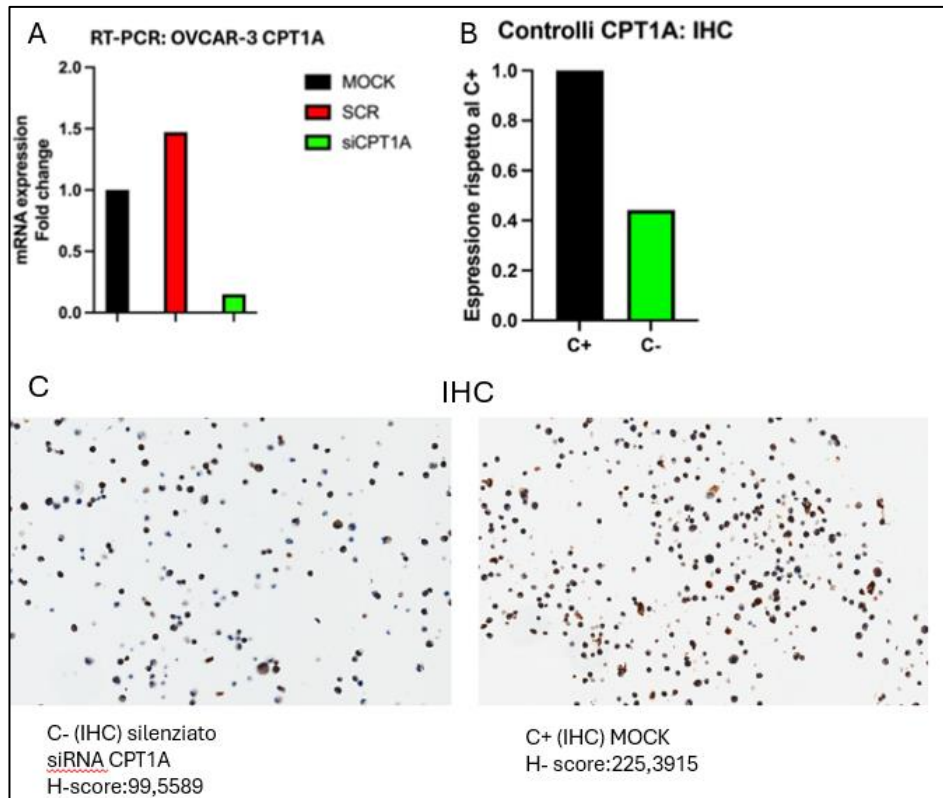


FIGURA 26: Valutazione mediante RT-PCR dell'mRNA di CPT1A (pannello A) e dell'espressione della proteina (pannello B), nel pannello C le colorazioni IHC rispettivamente del silenziato CPT1A (sinistra) e del MOCK (destra) della linea cellulare OVCAR3, ad ingrandimento 100x.

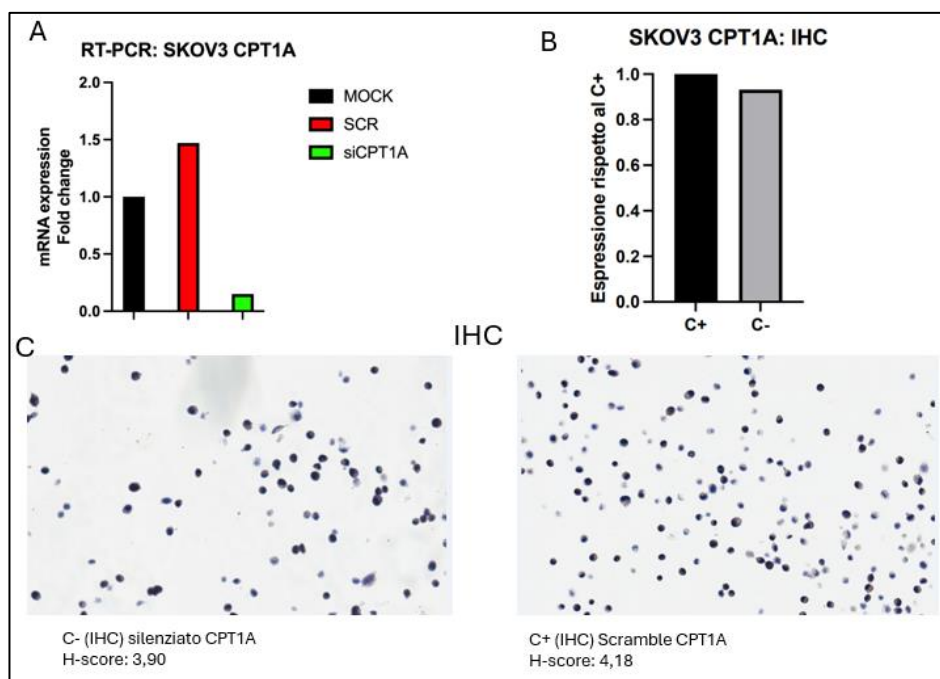


Figura 27: Valutazione mediante RT-PCR dell'mRNA di CPT1A (pannello A) e dell'espressione della proteina (pannello B), nel pannello C le colorazioni IHC rispettivamente del silenziato CPT1A (sinistra) e dello SCRAMBLE (destra) della linea cellulare SKOV3, ad ingrandimento 200x.

Per i marcatori MCT1, MCT4 e GLS erano già presenti in laboratorio blocchetti di cellule della linea SKOV-3 silenziati per gli antigeni di interesse (figure 28, 29 e 30). La valutazione immunohistochemica e la quantificazione mediante *digital pathology* ha mostrato una riduzione del 82 % nel silenziato MCT1 rispetto al controllo, del 56 % nel silenziato MCT4 rispetto al controllo e del 88% nel silenziato GLS, che risulta anche occhiometricamente meno evidente rispetto ai precedenti ma comunque apprezzabile.

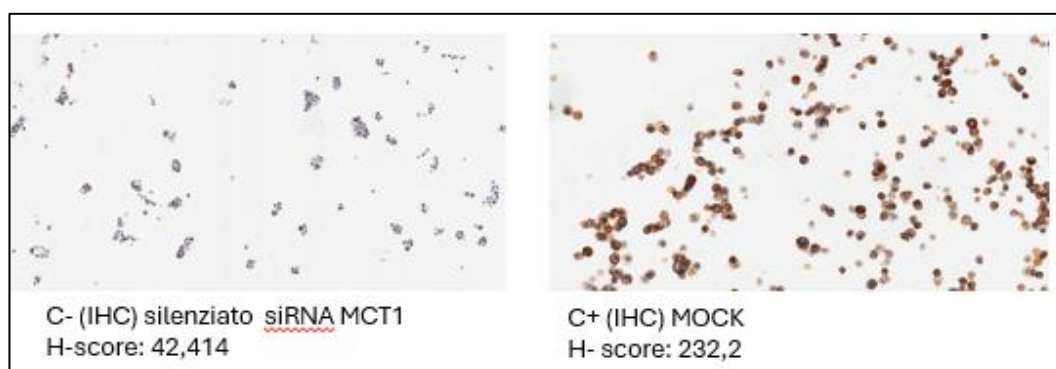


FIGURA 28: Colorazione IHC del controllo negativo (C-, pannello di sinistra) e positivo (C+, pannello di destra) di MCT1 a ingrandimento 100x. Sotto le immagini sono riportati i valori degli H-score ottenuti.

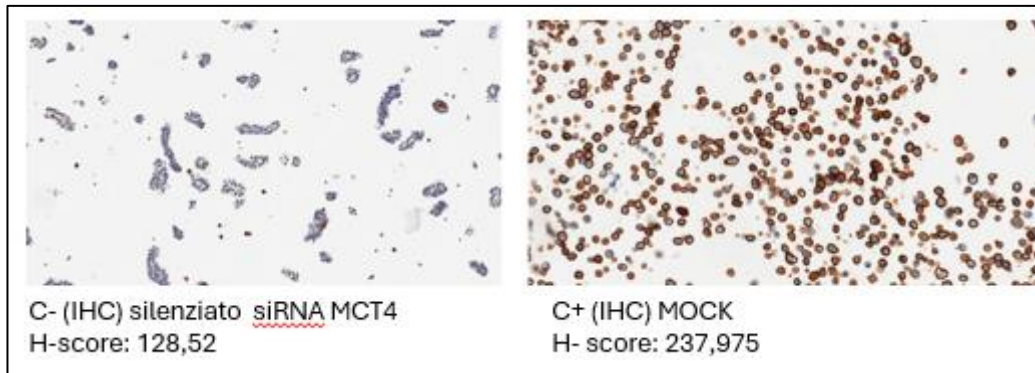


FIGURA 29: Colorazione IHC del controllo negativo (C-, pannello di sinistra) e positivo (C+, pannello di destra) di MCT4 a ingrandimento 100x. Sotto le immagini sono riportati i valori degli H-score ottenuti.

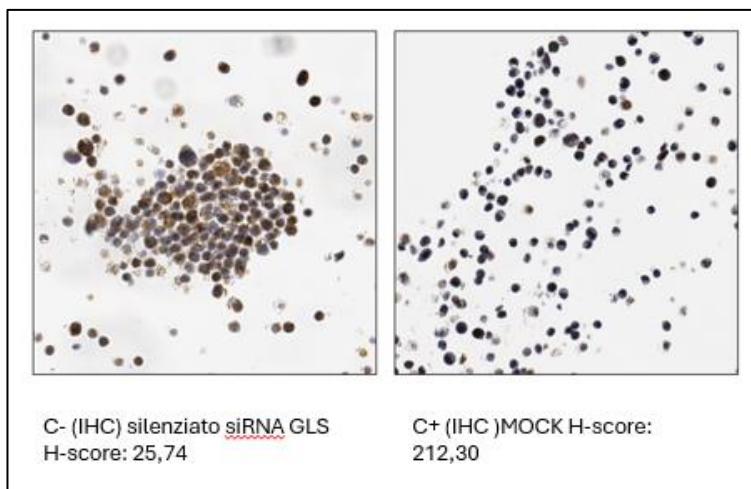


FIGURA 30: Colorazione IHC del controllo negativo (C-, pannello di sinistra) e positivo (C+, pannello di destra) di GLS a ingrandimento 200x. Sotto le immagini sono riportati i valori degli H-score ottenuti.

4.2 VALUTAZIONE QUANTITATIVA MEDIANTE *DIGITAL PATHOLOGY* DELL'ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DI MCT4, MCT1, GLS, CPT1A, ACC E SLC7A5

4.2.1 MCT4

I cell block di PDX ovarici (PDOVCA) analizzati per l'espressione del marcatore di membrana MCT4 mediante IHC sono 18, ed il software utilizzato per l'analisi è l'Aperio ImageScope (versione 12.4.0.708, Leica Biosystems) con algoritmo MEMBRANE V9 (tabella 8).

PDOVCA	0	1+	2+	3+	H-score
1	7,475	41,38	15,76	35,38	179,04
5	1,929	16,34	14,33	67,4	247,2
6	0,5756	18,76	11,04	69,62	249,7
9	34,76	63,57	1,152	0,5234	67,4442
14	2,65	30,67	22,64	44,05	208,1
15	67,31	30,05	0,6331	2,003	37,3252
17	26,93	50,02	11,01	12,04	108,16
24	1,34	25,69	9,78	63,18	234,79
49	7,158	30,03	2,745	60,07	215,73
52	0,7994	15,03	2,782	81,38	264,734
53	57,87	39,55	1,627	0,9516	45,6588
54	0,9417	14,49	3,865	80,7	264,32
62	1,172	17,74	3,18	77,9	257,8
69	31,67	45,14	4,913	18,27	109,776
126	13,92	60,23	13,28	12,58	124,53
128	1,54	19,32	1,698	77,44	255,036
145	2,85	24,43	25,58	47,14	217,01
146	6,394	37,11	22,54	33,96	184,07

TABELLA 8: Esempio dei risultati ottenuti per i PDX ovarici (PDOVCA) dalla colorazione immunoistochimica di MCT4 e dalla quantificazione con *digital pathology* mediante l'algoritmo di membrana Membrane v9 del software ImageScope opportunamente settato.

In tabella sono riportate le percentuali di cellule classificate come negative (0+), debolmente positive (1+), moderatamente positive (2+) e fortemente positive (3+). Nell'ultima colonna sono riportati anche i valori dell'H-score calcolato sommando i prodotti delle percentuali di ciascuna classe per l'intensità della classe. I valori di H-score ottenuti sono stati suddivisi in negativi (blu) e positivi (rossi) se inferiori o superiori al valore mediano (211,915).

La positività è stata espressa come H-score (vedi paragrafo METODI 3.6). Il PDOVCA che esprime meno MCT4 è il numero 15 con un valore di H-score di 37,33 (figura 31) mentre il PDOVCA che esprime più MCT4 è il 52 (figura 31) con un valore di H-score di 264,73. Il resto dei campioni ha un valore di H-score compreso tra i valori precedentemente descritti (tabella 8). Prendendo come *cut-off* la mediana 211,915. Risultano positivi per il marcatore MCT4 i PDX 5,6,24,49,52,54,62,128 e negativi i PDX 1,9,14,17,53,69,126 e 146.

La distribuzione delle cellule nelle varie classi di intensità per ciascun campione è eterogenea: nei PDX 17,49,69,145 e 146 le cellule si distribuiscono omogeneamente tra le varie classi, di fatto hanno un H-score vicino alla mediana mentre nei PDX 5,6, 24, 53,54, 62 e 128 le cellule mostrano principalmente intensità moderata o forte (2+/3+) e nei PDX 1,9, 14, 53 e 128 le cellule sono principalmente negative o debolmente esprimenti MCT4 (0/1+).

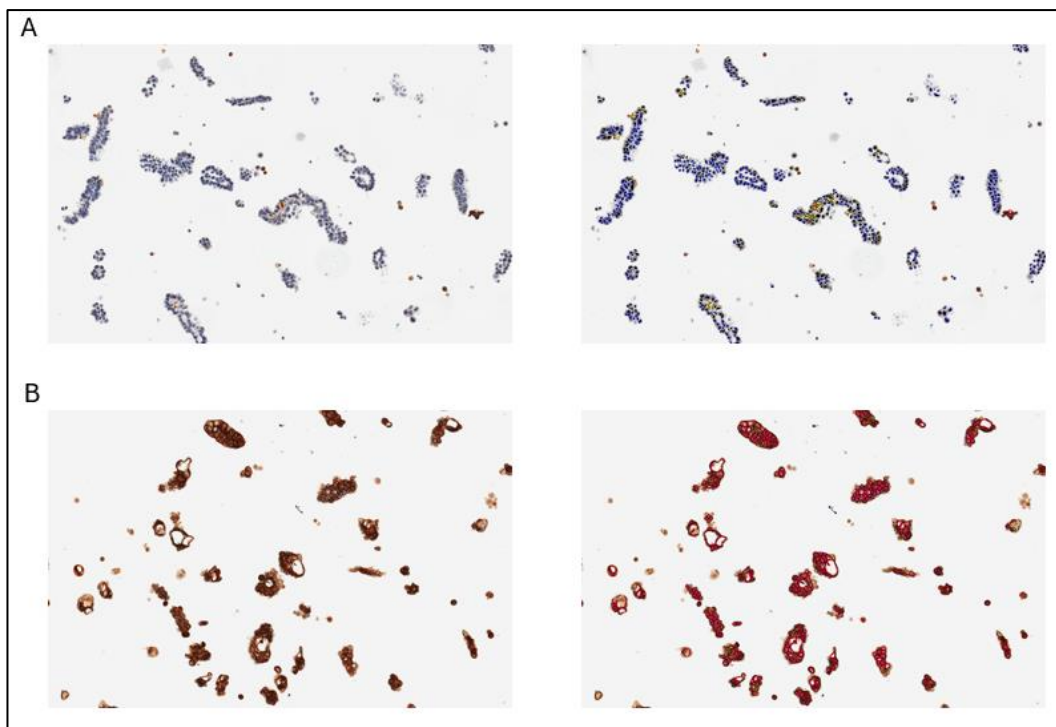


FIGURA 31: Colorazione IHC di MCT4 dei PDOVCA 15 (pannello A) e PDOVCA 52 (pannello B). Nella figura è mostrata la classificazione operata dall' algoritmo per i campioni 15 (negativo; pannello A di destra, H-score 37,3252) e 52 (positivo; pannello B di destra, H-score 264,734). Nelle immagini sono indicate come rosse le cellule classificate 3+, arancio le 2+, gialle le cellule 1+ e con contorno nero le cellule negative. Ingrandimento 200x.

4.2.2 MCT1

Analogamente a MCT4, anche per MCT1 i campioni analizzati sono 18, il software è Aperio ImageScope e l'algoritmo utilizzato è MEMBRANE V9. Il PDOVCA con valore minimo di H-score è il 146 con un punteggio di 62,25 (figura 32), mentre il PDOVCA con il valore massimo di H-score è il 69 con punteggio di 256,37 (figura 32). Il resto dei campioni ha un valore di H-score compreso tra i valori precedentemente descritti (tabella 10). Prendendo come *cut-off* la mediana 146,395, risultano positivi per il marcatore MCT1 i PDX 5,15,49,52,53,62,69,126 e 145 e negativi i PDX 1,6,9,14,17,24,54,128 e 146.

La distribuzione delle cellule nelle varie classi di intensità per ciascun campione è eterogenea: nei PDX 5,24,49 e 126 le cellule si distribuiscono omogeneamente tra le varie classi, di fatti hanno un H-score vicino alla mediana mentre nei PDX 15,52,53,62,69 e 145 le cellule mostrano principalmente intensità moderata o forte (2+/3+) e nei PDX 1,6,9,14,54,128 e 146 le cellule sono principalmente negative o debolmente esprimenti MCT1 (0/1+).

Rispetto a MCT4, MCT1 presenta dei valori di H-score più confinati attorno alla mediana, che occupa un range più ristretto (figura 37 pannello A).

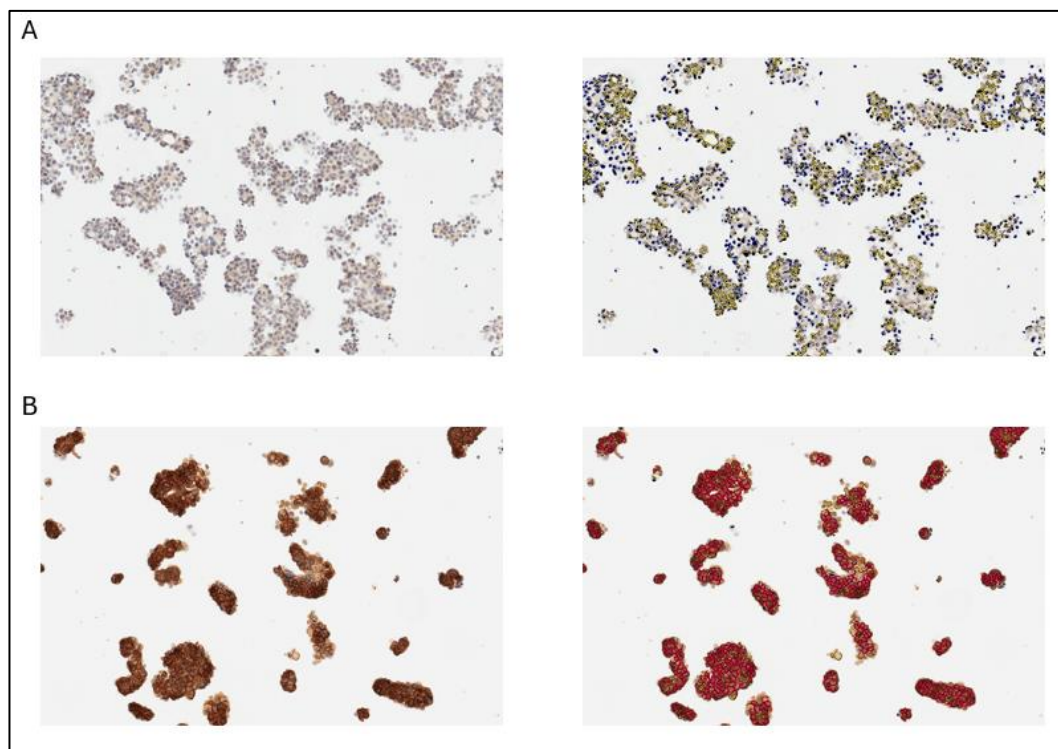


FIGURA 32: Colorazione IHC di MCT1 dei PDOVCA 146 (pannello A) e PDOVCA 69 (pannello B). Nella figura è mostrata la classificazione operata dall'algorithm per i campioni 146 (negativo; pannello A di destra, H-score 62,25) e 69 (positivo; pannello B di destra, Hscore 256,37). Nelle immagini sono indicate come rosse le cellule classificate 3+, arancio le 2+, gialle le cellule 1+ e con contorno nero le cellule negative. Ingrandimento 200x.

4.2.3 GLS

PDOVCA	Num Cell. 0	Num Cell 1+	Cell. Tot	% cell 1+	H-score
1	9719	41485	51204	81,01906	243,0571
5	12012	43429	55441	78,33372	235,0011
6	37464	206626	244090	84,65156	253,9546
9	23963	168	24131	0,6962	2,088599
14	21706	36116	57822	62,46066	187,3819
15	17693	110123	127816	86,15745	258,4723
17	10273	24489	34762	70,44762	211,3428
24	25991	129262	155253	83,25894	249,7768
49	7752	12164	19916	61,07652	183,2295
52	17704	123458	141162	87,45838	262,3751
53	20955	44977	65932	68,21725	204,6517
54	56150	41086	97236	42,2539	126,7616
62	29152	26409	55561	47,53154	142,5946
69	6209	110634	116843	94,68603	284,058
126	39009	4229	43238	9,780748	29,34224
128	28417	28788	57205	50,3243	150,9729
145	13873	70293	84166	83,5171	250,5512
146	57484	92398	149882	61,64716	184,9414

TABELLA 9: Esempio dei risultati ottenuti per i PDX ovarici (PDOVCA) dalla colorazione immunoistochimica di GLS e dalla quantificazione con *digital pathology* mediante software QuPath opportunamente settato.

Mentre il software ImageScope fornisce già le percentuali delle singole classi, QuPath fornisce i numeri delle cellule negative ("Num cell 0"), positive ("Num cell 1+") e totali ("Cell Tot."). In tabella è riportata anche la percentuale di cellule positive (1+) ottenuta dai dati grezzi ed il valore di H-score, calcolato facendo una proporzione (poiché l'H-score è un sistema di espressione della positività che va da 0 a 300). I valori di H-score ottenuti sono stati suddivisi in negativi (blu) e positivi (rossi) se inferiori o superiori al valore mediano (207,997).

I cell block di PDX ovarici (PDOVCA) analizzati per l'espressione del marcatore citoplasmatico GLS mediante IHC sono 18, ed il software utilizzato per l'analisi è QuPath (versione 0.5.0). Per la tipologia di colorazione si è scelta una classificazione a 2 classi: 0 (negativo) e 1+ (positivo) e per esprimere la positività è stato usato H-score (vedi paragrafo METODI 3.6). Il PDOVCA che esprime meno GLS è il numero 9 con un punteggio di 2,088 (figura 33) mentre il PDOVCA che esprime più GLS è il 69 con un valore di H-score di 284,06 (figura 33). Il resto dei campioni ha un valore di H-score compreso tra i valori precedentemente descritti (tabella 9). Prendendo come *cut-off* la mediana di 207,997. Risultano positivi per il marcatore GLS i PDX 1,5,6,15,17,24,52,69 e 145 e negativi i PDX 9,14,49,53,54,62,126,128 e 146.

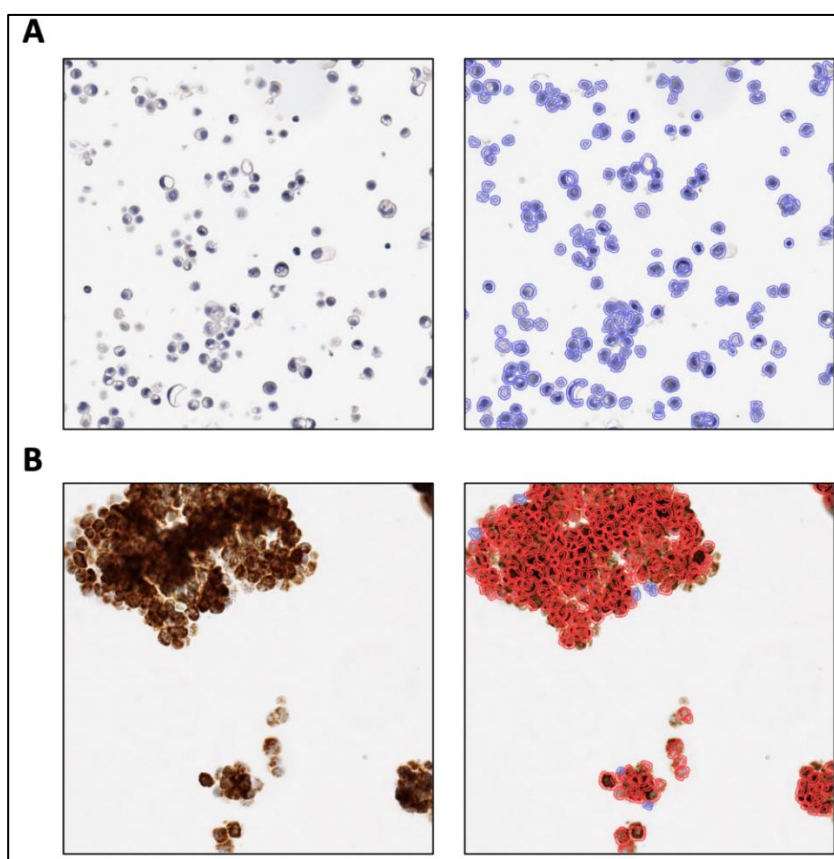


FIGURA 33: Esempio di colorazione IHC di GLS dei PDOVCA 9 (pannello A) e PDOVCA 69 (pannello B). Nella figura è mostrata la classificazione operata dal *software* QuPath per i campioni 9 (negativo; pannello A a destra, H-score 2,09) e 69 (positivo; pannello B a destra, H-score 284,6). Nelle immagini sono indicate come rosse le cellule classificate positive e blu quelle classificate come negative. Ingrandimento 200x.

4.2.4 CPT1A

Analogamente al GLS, i cell block di PDX ovarici (PDOVCA) analizzati per l'espressione del marcatore citoplasmatico CPT1A mediante IHC sono 18, ed il software utilizzato per l'analisi è QuPath (versione 0.5.0). Essendo un marcatore citoplasmatico sono stati valutati due tipi di segnale 0+ e 1+. Il PDOVCA che esprime meno CPT1A è il numero 9 con un punteggio di 66,1236 (figura 34) mentre il PDOVCA che esprime più CPT1A è l'1 con un valore di H-score di 292,3617. Il resto dei campioni ha un valore di H-score compreso tra i valori precedentemente descritti (tabella 10). Prendendo come *cut-off* la mediana di 259,98975, risultano positivi per il marcatore CPT1A i PDX 1,5,6, 24, 49,52, 53, 145 e 146 e negativi i PDX 9,14,15,17,54,62,69,126 e 128. Osservando il grafico a dispersione (figura 37) si può dedurre che quasi tutti i campioni hanno valori di H-score abbastanza/molto alti, eccetto un campione che si vede delocalizzato.

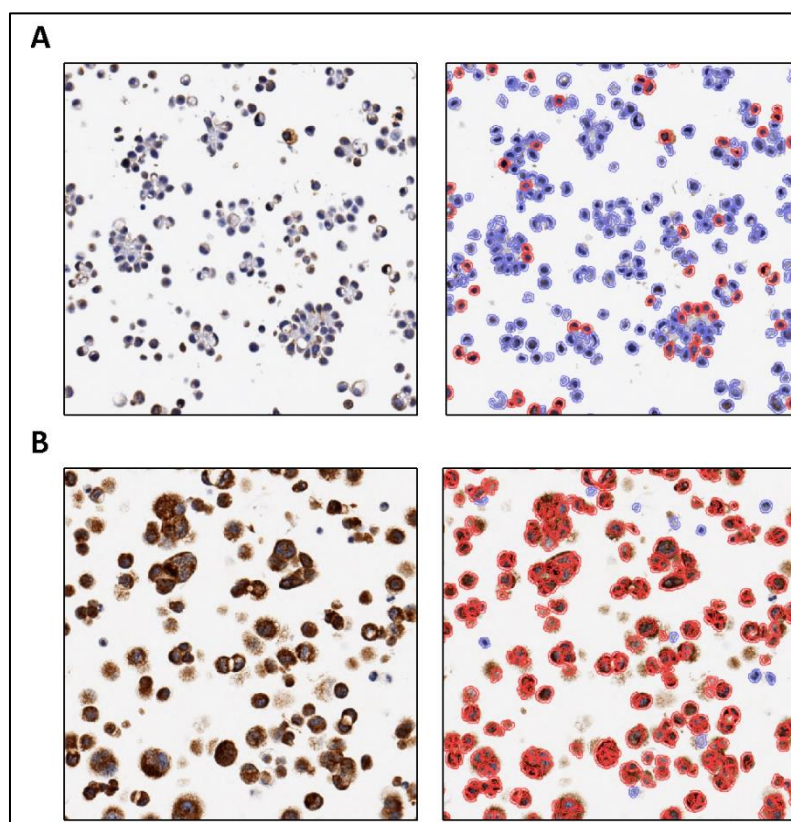


FIGURA 34: Esempio di colorazione IHC di CPT1A dei PDOVCA 9 (pannello A) e PDOVCA 6 (pannello B). Nella figura è mostrata la classificazione operata dal *software* QuPath per i campioni 9 (negativo; pannello A a destra, H-score 66,12) e 6 (positivo; pannello B a destra, H-score 277,07). Nelle immagini sono indicate come rosse le cellule classificate positive e blu quelle classificate come negative. Ingrandimento 200x.

4.2.5 ACC

I campioni analizzati sono 17 e il software utilizzato è QuPath. A differenza di GLS e CPT1 la cui colorazione in immunocistochimica fornisce un risultato "puntinato", la colorazione di ACC ha un aspetto omogeneo, per cui è stata scelta una classificazione a 4 classi.

Il PDOVCA che esprime meno ACC è il numero 9 con un valore di H-score di 48,28 (figura 35) mentre il PDOVCA che esprime più ACC è il 49 (figura 35) con un valore di H-score di 221. Il resto dei campioni ha un valore di H-score compreso tra i valori precedentemente descritti (tabella 10). Prendendo come *cut-off* la mediana 95,81. Risultano positivi per il marcatore ACC i PDX 1,5,6,15,49,52,54,126 e 145, risultano negativi i PDX 9,14,17,24,53,62,128 e 146

La distribuzione delle cellule nelle varie classi di intensità per ciascun campione è eterogenea: nei PDX 17 e 52 le cellule si distribuiscono omogeneamente tra le varie classi, di fatti hanno un H-score vicino alla mediana mentre nei PDX 1,5,6,15,49,54,126 e 145 le cellule mostrano principalmente intensità moderata o forte (2+/3+) e nei PDX 9,14,24,53,62,128 e 146 le cellule sono principalmente negative o debolmente esponenti MCT4 (0/1+).

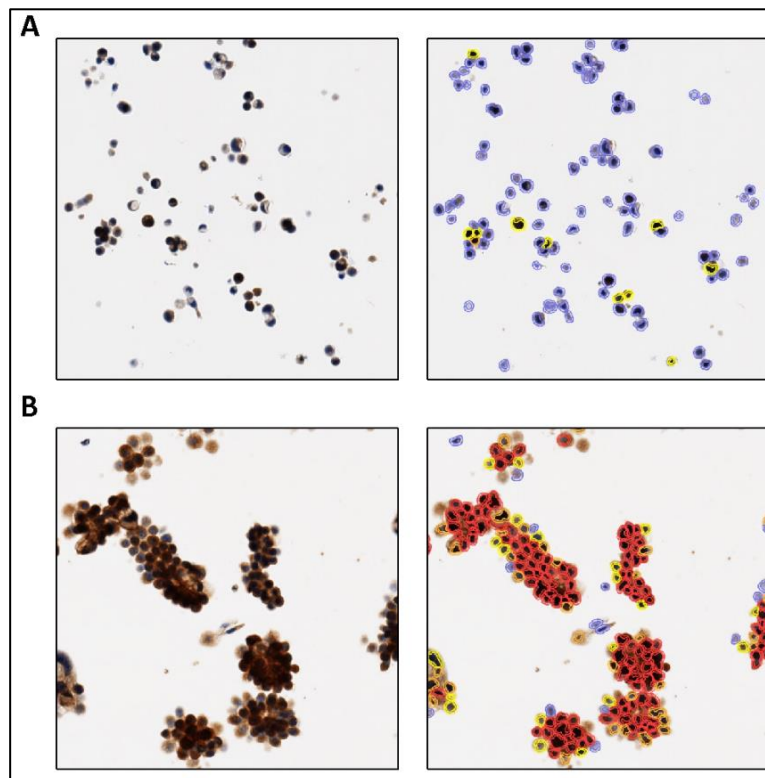


FIGURA 35: Colorazione IHC di ACC dei PDOVCA 9 e 49. Nella figura è mostrata la classificazione operata dall'algorithm per i campioni 9 (negativo; pannello A di destra, H-score 48,28) e 49 (positivo; pannello B di destra, H-score 221). Nelle immagini sono indicate come rosse le cellule classificate 3+, arancio le 2+, gialle le cellule 1+ ed in azzurro le cellule negative. Ingrandimento 200x.

4.2.6 SLC7A5

I campioni analizzati sono 17 e il software utilizzato è QuPath. E' stata utilizzata una classificazione a 4 classi, essendo un marcatore di membrana. Il PDOVCA con valore minimo di H-score è il 24 con un punteggio di 0,16, mentre il PDOVCA con il valore massimo di H-score è il 52 con punteggio di 72,08. Il resto dei campioni ha un valore di H-score compreso tra i valori precedentemente descritti (tabella 10). Prendendo come *cut-off* la mediana 2,63, risultano positivi per il marcatore SLC7A5 i PDX 1,5,6,14,17,52 54,145 e 146 e risultano negativi i PDX 9,15,24,49,53,62, 126 e 128.

La distribuzione delle cellule nelle varie classi di intensità per ciascun campione è eterogenea: nei PDX 17,49,54,62 e 146 le cellule si distribuiscono omogeneamente tra le varie classi, di fatti hanno un H-score vicino alla mediana mentre nei PDX 1,5,6,14,52 e 145 le cellule mostrano principalmente intensità moderata o forte (2+/3+) e nei PDX 9,15,24,53,126 e 128 le cellule sono principalmente negative o debolmente esprimenti MCT1 (0/1+).

È il marcatore con il valore di mediana più basso. Rispetto ad altri marcatori presenta dei valori di H-score più bassi e che occupano un range più ristretto (figura 37 pannello A), è quindi poco espresso.

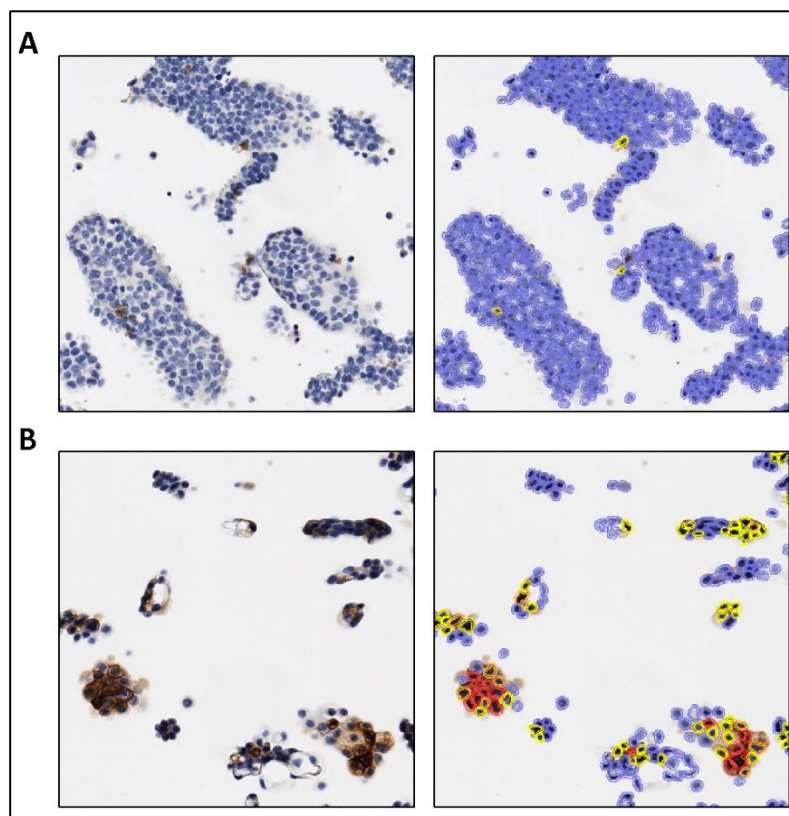


FIGURA 36: Colorazione IHC di SLC7A5 dei PDOVCA 24 e 52. Nella figura è mostrata la classificazione operata dall' algoritmo per i campioni 24 (negativo; pannello A di destra, H-score 0,16) e 52 (positivo; pannello B di destra, H-score 72,08). Nelle immagini sono indicate come rosse le cellule classificate 3+, arancio le 2+, gialle le cellule 1+ ed in azzurro le cellule negative. Ingrandimento 200x.

PDOVCA	H-Score MCT4	H-score MCT1	H-score GLS	H-score SLC7A5	H-score ACC	H-score CPT1A
1	179,04	106,91	243,057183	3,2099	138,6975	292,3617
5	247,2	171,95	235,0011724	9,9838	155,7481	267,2283
6	249,7	129,84	253,9546888	42,8441	120,1817	277,0701
9	67,4442	123,03	2,088599726	1,0622	48,2827	66,1236
14	208,1	124,37	187,3819653	26,0956	68,2129	252,6951
15	37,3252	198,71	258,4723352	1,4213	131,2848	257,5878
17	108,16	66,15	211,3428456	2,7115	84,0387	245,0124
24	234,79	140,87	249,7768159	0,1557	73,3453	275,769
49	215,73	151,92	183,2295642	2,471	221,0018	282,5184
52	264,734	212,27	262,3751435	72,0794	95,8082	262,3917
53	45,6588	186,82	204,6517624	0,7531	54,4101	276,2748
54	264,32	99,71	126,7616932	2,6282	131,1395	229,9725
62	257,8	211,92	142,5946257	2,1109	51,7622	232,2738
69	109,776	256,37	284,0580951	NV	NV	175,4619
126	124,53	175,28	29,34224525	1,9426	82,2506	170,9421
128	255,036	122,91	150,9729	0,9437	63,7292	234,6018
145	217,01	215,21	250,5512915	41,6422	152,5649	280,2147
146	184,07	62,25	184,9414873	3,2403	73,0496	273,5979

Tabella 10: H-score di ogni marcatore per ogni PDX, in rosso i marcatori con H-score superiore alla rispettiva mediana e quindi considerati positivi, in blu i marcatori considerati negativi.

Consultando la tabella 10 e basandoci sulla classificazione usata nel precedente lavoro (Ferrarini et al. 2023), possiamo definire “ipermetabolitici” i PDX 5, 52 e 145 che mostrano tutti e 3 i pathway metabolici attivi ed esprimono quindi tutti e sei i marcatori e “ipometabolico” il PDX 9 che ha una bassa espressione di tutti e sei i marcatori; il PDX 6 invece ha una buona espressione di 5/6 e l'unico marcatore che esprime poco è MCT1 viceversa il PDX 14 ha una bassa espressione di 5/6 marcatore fatta eccezione di SLC7A5 che è moderatamente espresso, il PDX 128 che esprime abbondante MCT4 e 126 che esprime abbondantemente MCT1. I PDX 1, 17 e 146 risultano avere spenta la via glicolitica, sono negativi per MCT1 e MCT4, viceversa il PDX 62 risulta avere accesa solo la via glicolitica. Infine, ci sono i PDX 15 e 24 che hanno espresso un solo marcatore per tutte e tre le vie metaboliche o i PDX 53 e 54 che invece esprimono 1 solo marcatore della via glicolitica e 1 solo marcatore della via OXPHOS.

4.3 CONFRONTO TRA DATI DI ESPRESSIONE IHC E DATI DI TRASCRITTOMICA

4.3.1 Confronto tra immunoistochimica e trascrittomico

L'RNA sequencing (RNA-Seq) e l'immunoistochimica (IHC) sono due potenti tecniche comunemente utilizzate nella ricerca sul cancro per la misurazione dei biomarcatori, in particolare nel cancro al seno e al polmone (Sorokin, 2020; Perou, 2000). Ciascun metodo offre vantaggi distinti, contribuendo in modo significativo alla comprensione della biologia del cancro.

L'RNA-Seq è una tecnica di alta capacità che permette l'analisi completa del trascrittoma, fornendo dati quantitativi sui livelli di espressione di migliaia di geni contemporaneamente. Questa tecnica può identificare nuovi biomarcatori, varianti di splicing e RNA non codificanti, offrendo una panoramica completa dei modelli di espressione genica nelle cellule tumorali. La sensibilità dell'RNA-Seq, capace di rilevare anche trascritti a bassa abbondanza, lo rende uno strumento robusto per scoprire cambiamenti molecolari sottili che potrebbero guidare la progressione del cancro o la resistenza alla terapia.

L'Immunoistochimica (IHC), d'altra parte, è una tecnica ampiamente utilizzata che si concentra sulla rilevazione e localizzazione di proteine specifiche

all'interno di sezioni tissutali. Fornisce un contesto spaziale, mostrando non solo se una proteina è espressa, ma anche dove è espressa all'interno dell'architettura tissutale.

Quando si confronta l'RNA-Seq con l'IHC, entrano in gioco diversi fattori:

- **Sensibilità e Specificità:** L'RNA-Seq fornisce un'analisi più sensibile e completa dell'espressione genica, ma non offre informazioni sui livelli di espressione delle proteine o sulla loro localizzazione. L'IHC, pur essendo meno completa, fornisce informazioni specifiche sulla presenza e distribuzione spaziale delle proteine, che spesso sono più direttamente correlate ai cambiamenti funzionali nelle cellule tumorali.
- **Rilevanza Clinica:** L'IHC è più radicata nella pratica clinica, in particolare per la valutazione di biomarcatori ben consolidati. È utilizzata di routine per diagnosticare e stratificare i tumori del seno e del polmone in base all'espressione proteica. L'RNA-Seq, sebbene sempre più utilizzato nella ricerca e in alcuni contesti clinici, è meno consolidato come strumento diagnostico di routine, ma offre prospettive promettenti per identificare nuovi biomarcatori e comprendere complessi modelli di espressione genica.
- **Correlazione tra Livelli di Trascritti e Proteine:** precedenti studi hanno dimostrato che i livelli di espressione dell'RNA non sempre si correlano direttamente con i livelli proteici, a causa di modifiche post-trascrizionali, degradazione proteica e altri meccanismi regolatori. Pertanto, mentre l'RNA-Seq può fornire un profilo completo dell'espressione genica, l'IHC è necessaria per validare che questi trascritti si traducano nei livelli di espressione proteica previsti.

Per stabilire l'eventuale correlazione tra i dati forniti dalla due tecniche per i 18 PDX analizzati nel presente lavoro di tesi, è stata confrontata l'espressione dei geni biomarcatori clinicamente utilizzabili misurata tramite sequenziamento dell'RNA e tramite immunisto chimica, valutandone sia la distribuzione dei valori (figura 37) sia la correlazione statistica mediante test di Spearman.

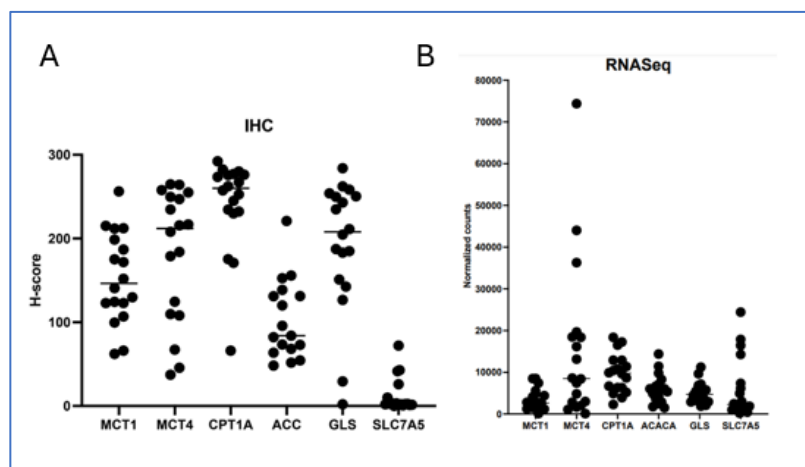


FIGURA 37: Confronto dei valori di espressione dei 6 marcatori ottenuti mediante IHC (grafico destra) e RNAseq (grafico sinistra).

Marcatore	Mediana IHC	Mediana RNAseq
MCT4	211,912	8521,325
MCT1	146,395	2663,079
GLS	207,997	4750,066
ACC	97,81	5862,985
SLC7A5	2,63	2290,66
CPT1A	259,99	9780,8

Tabella 11: mediane dei valori di H-score e dei valori di RNAseq dei 6 marcatori, in blu i valori mediani più bassi e in rosso quelli più alti.

I dati di RNAseq erano già presenti nel nostro laboratorio (tabella 12), i valori mediani di espressione dei trascritti (tabella 11), espressi come *normalized counts*, vanno da 2290,66 del gene *SLC7A5* a 9780,8 del gene *CPT1A*. I valori dei singoli PDX sono per *MCT1*, *CPT1A*, *ACACA*, *GLS* e *SLC7A5* localizzati attorno alla mediana, in particolare da un minimo di 116,2747 del PDX 146 a un massimo di 8524,947 del PDX 49 per *MCT1*; da 1879,773 del PDX 1 a 11245,55 del PDX 145 per *GLS*; da 213,58 del PDX 126 a 24421,23 del PDX 14 per *SLC7A5*; da 1510,88 del PDX 6 a 14387,99 del PDX 9 per *ACACA* e da 2303,48 del PDX 126 a 18386,09 del PDX 5 per *CPT1A*. Diversamente, i trascritti del gene *MCT4* mostrano conte attorno al valore mediano di 8521,32 che vanno dal 100,20 del PDX 15 al 44,032 del PDX 54, ma anche alcuni valori outliers di 36300,19, 44032, 66 e 74387,97 relativi ai PDX 128, 54 e 6, rispettivamente. In conclusione, i valori mediani di espressione di ciascun trascritto vedono, dal più grande al più piccolo, *CPT1A*, *MCT4*, *ACACA*, *GLS*, *MCT1*, *SLC7A5* mentre i valori mediani di espressione proteica vedono dal più grande al più piccolo *CPT1A*, *MCT4*, *GLS*, *MCT1*, *ACC* e *SLC7A5*. In entrambi i metodi, l'*SLC7A5* ha la mediana con il valore minore e il *CPT1A* ha la mediana con il valore maggiore, quindi il marcatore associato al metabolismo più abbondantemente espresso in questi campioni di PDX è stato *CPT1A*, quello meno espresso è *SLC7A5*.

	MCT4	MCT1	GLS	SLC7A5	ACC	CPT1A
1	7445,169533	1181,27	1879,773	645,7	5734,36	10435,31
5	13146,51474	4857,972	5458,73	7374,43	8271,24	18386,09
6	74387,97047	7435,804	5780,816	17887,83	1510,88	11378,73
9	16168,57357	1695,957	3948,295	4939,56	14387,99	5196,8
14	18485,28526	2490,213	9645,155	24421,23	9797,77	17275,72
15	100,2089393	2667,948	4533,305	1098,62	3675,55	10878,63
17	4843,773207	1245,71	4966,827	14291,11	6049,87	12886,95
24	8425,164161	1760,28	2091,403	2044,49	1769,3	9649,51
49	3009,830609	8524,947	5226,338	3033,8	7112,66	6357,48
52	19678,2249	5574,641	6636,211	6178,19	5364,75	16512,17
53	1084,396505	2804,443	4175,367	441,69	2480,89	9912,09
54	44032,66187	1477,957	3957,933	2117,78	6673,63	12921,47
62	18392,80119	4412,956	6869,298	1901	2875,39	6696,98
69	2043,5879	8496,359	3270,516	2463,56	6059,96	6329,59
126	2841,165697	1827,882	7167,486	213,58	11432,96	2303,48
128	36300,19972	2658,211	2906,09	1869,98	5991,61	8684,04
145	8617,486672	4107,76	11245,55	16452,16	4208,25	4902,22
146	1655,38463	116,2747	2958,885	999,04	4906,49	3930,39

TABELLA 12: *normalized counts*, in rosso i trascritti che sono maggiormente espressi per marcatore, in blu quelli meno espressi.

Abbiamo infine verificato con metodi statistici l'eventuale correlazione tra i dati forniti dai due metodi con il test di correlazione di Spearman.

Il test di Spearman è uno strumento versatile per analizzare relazioni tra variabili. La sua interpretazione si basa principalmente sul valore del coefficiente di correlazione (ρ) e sul p-value (p), che insieme indicano la forza e la significatività della correlazione.

I valori del ρ vengono interpretati come segue:

$\rho = 1$: Perfetta correlazione positiva

$\rho = -1$: Perfetta correlazione negativa

$\rho = 0$: Nessuna correlazione.

La forza della correlazione aumenta man mano che ci si avvicina ai valori 1 e -1. In particolare, quando la correlazione è positiva possiamo definire quattro livelli di forza:

$\rho =$ da 0.2 a 0.4 correlazione positiva debole

$\rho =$ da 0.4 a 0.6 correlazione positiva moderata

$\rho =$ da 0.6 a 0.8 correlazione positiva forte

$\rho =$ da 0.8 a correlazione positiva molto forte.

I valori del p-value (p) vengono interpretati come segue:

$P\text{-value} \leq 0.05$): Indica che è improbabile che l'osservata correlazione sia dovuta al caso; quindi, la correlazione è considerata statisticamente significativa.

$P\text{-value} \geq 0.05$): Indica che non ci sono sufficienti evidenze per concludere che esiste una correlazione statisticamente significativa.

Pertanto, è stato calcolato l'indice di correlazione di Spearman (ρ) per ciascun marcatore.

- MCT4: $\rho = 0,785$ (valore $p = \leq 0,001$) con intervallo di confidenza (C.I.) del 95% che va da 0,492 a 0,919
- MCT1: $\rho = 0,746$ (valore $p = \leq 0,001$) con C.I del 95% che va da 0,416 a 0,902
- GLS: $\rho = 0,00103$ (valore $p = \geq 0,99$) con C.I del 95% che va da -0,478 a 0,479.
- CPT1A: $\rho = 0,131$ (valore $p = 0,01$) con C.I del 95% che va da -0,371 a 0,574
- ACC: $\rho = 0,0392$ (valore $p = 0,88$) con C.I del 95% che va da -0,462 a 0,522
- SLC7A5: $\rho = 0,615$ (valore $p = 0,60$) con CI del 95% che va da 0,176 a 0,850

In conclusione, la correlazione tra i livelli di trascritto e delle corrispondenti proteine sono molto eterogenei tra i marcatori studiati, con valori di correlazioni positiva forte solo per MCT1 e MCT4 e moderata per SLC7A5.

4.4 IL PROTOCOLLO OPAL

4.4.1 MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI IMMUNOFLUORESCENZA MULTIPLEX MEDIANTE PROTOCOLLO OPAL (Akoya) E *STAINING* IN COLORATORE AUTOMATICO

Come descritto nei precedenti paragrafi, la digital pathology ha aperto nuove possibilità per la valutazione del metabolismo tumorale, come l'analisi quantitativa e spaziale delle immagini. In questo contesto, la valutazione dei singoli marcatori, specialmente a livello clinico, viene effettuata principalmente utilizzando l'immunoistochimica cromogenica (IHC). Questo approccio, sebbene economico e di facile standardizzazione, pone dei limiti ad analisi quantitative più complesse, ad esempio che analizzino la co-espressione a livello di singola cellula di due o più biomarcatori ed alla valutazione simultanea di più biomarcatori nello stesso saggio. Pertanto, le tecniche di colorazione multiplex hanno un potenziale significativo per migliorare la pratica diagnostica e la ricerca in oncologica. Per questi motivi, parte del presente lavoro di tesi ha riguardato la messa a punto di una metodica di imaging multiplex che sfrutta la tecnologia Opal-TSA.

Il primo passo nell'ottimizzazione di un pannello Multiplex è l'ottimizzazione di ogni singolo anticorpo, inclusa la diluizione, i tempi di incubazione e il blocco, si consiglia di sperimentare anche il recupero dell'antigene per determinare quale produce l'intensità di colorazione più elevata l'ottimizzazione serve a determinare le condizioni ottimali e viene fatta utilizzando l'IHC e anche utilizzando IF e il sistema TSA per creare protocolli individuali che forniranno risultati equivalenti tra IHC cromogenico e IF negli stessi controlli tissutali positivi e negativi, rivelando qualsiasi discrepanza o colorazione di fondo. Segue la definizione dei parametri di colorazione corretti per ciascuno dei singoli anticorpi e accoppiamenti Opal. I fluorofori opali devono essere accoppiati a ciascun marcatore, per facilitare la selezione si può tener conto della co-espressione e dell'abbondanza dell'espressione dei marcatori e quindi per i marcatori co-espressi selezionare i fluorofori che non sono spettralmente adiacenti, gli espressi bassi dovrebbero essere assegnati a fluorofori più luminosi, mentre i marcatori più abbondanti dovrebbero essere assegnati ai fluorofori meno luminosi.

Parallelamente all'ottimizzazione degli anticorpi, è necessaria la creazione di una libreria spettrale per rilevare la corretta eccitazione degli spettri da ciascun fluoroforo nella slide colorata con IF multiplex ed evitare sovrapposizioni tra gli intervalli di eccitazione e gli intervalli di emissione del fluoroforo durante l'analisi. Ogni pixel dovrebbe essere classificato come una combinazione lineare di spettri utilizzando una libreria come riferimento di spettri di intensità noti per costituire un'immagine. In questo modo, è possibile determinare la percentuale di ogni spettro di base che contribuisce a ciascun pixel. Utilizzando queste percentuali, è possibile determinare un'intensità totale in un pixel poiché la quantità di ciascun pixel specifico dal tessuto colorato può essere misurata quantitativamente con riferimento alla libreria spettrale. Generare una libreria spettrale appropriata richiede l'imaging di singoli campioni colorati con un anticorpo primario diretto contro un antigene ben noto e altamente prevalente (ad esempio, CD20, CD3, ecc.) utilizzando solo un colorante fluorescente alla volta.

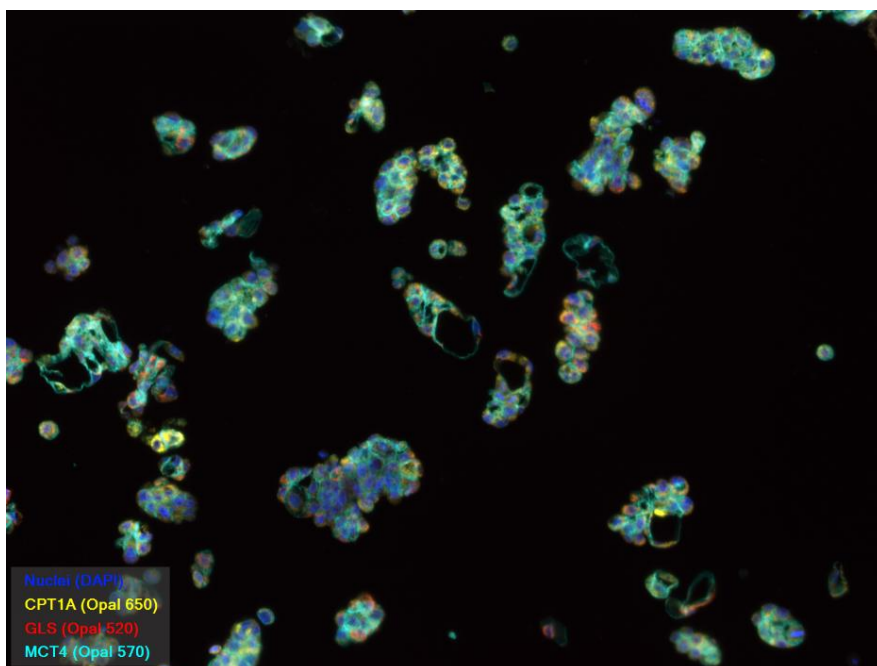


Figura 38: ROI del PDX 52 effettuata durante la generazione della libreria spettrale ad ingrandimento 200x. Si riescono ad apprezzare soprattutto MCT4 e i nuclei, mentre GLS e CPT1A, colocalizzando, sono visibili ma meno apprezzabili, nonostante siano stati scelti Opal con spettri di emissione distanti e il seguente ordine di marcatura, GLS-Opal 520, MCT4-Opal 570 e CPT1a-Opal 650.

Sono stati analizzati 5 PDX (PDX 9, 15, 17, 52 e 54), già caratterizzati metabolicamente tramite IHC. I marcatori inclusi nel test sono MCT4 (via glicolitica), GLS (via della glutammina) e CPT1A (via degli acidi grassi).

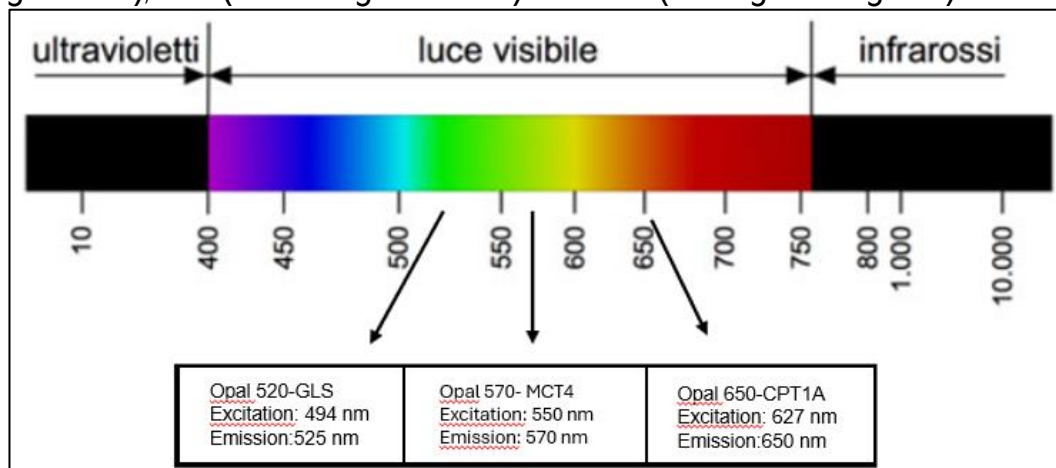


Figura 39: Spettri di eccitazione ed emissione degli Opal utilizzati per targhettare GLS, MCT4 e CPT1A.

In seguito alla marcatura, effettuata con l'ausilio del coloratore automatico Bond RX, abbiamo proceduto all'analisi dei vetrini. L'analisi con Mantra (Akoya Biosystem) viene fatta su regioni di interesse (ROI) scelte dall'operatore arbitrariamente.

Per ogni PDX sono state analizzate 5 ROI, catturandone le immagini multispettro e procedendo all'*unmixing* sulla base della libreria prodotta in

precedenza e alla sottrazione del segnale di autofluorescenza con il *software* InForm (Akoya Biosciences)

Nelle figure 40, 41, 42, 43 e 44 sono riportate le ROI esemplificative dei PDX 15-17, 52-54 e 9, rispettivamente. Come si può osservare in figura 40 e 41, nei PDX 17 e 15 si apprezza sia il segnale di membrana di MCT4 (azzurro), che quello citoplasmatico di CPT1A (verde). I PDX 52 e 54 mostrano una buona espressione di MCT4 e CPT1A e qualche cellula esprime GLS, ma a livelli qualitativamente inferiori rispetto al GLS saggiato con IHC (figura 45). Infine, abbiamo notato una differenza qualitativa nel segnale di GLS anche per il PDX 9, che in IHC era completamente negativo (figura 45), mentre con multiplex risulta positivo (figura 44).

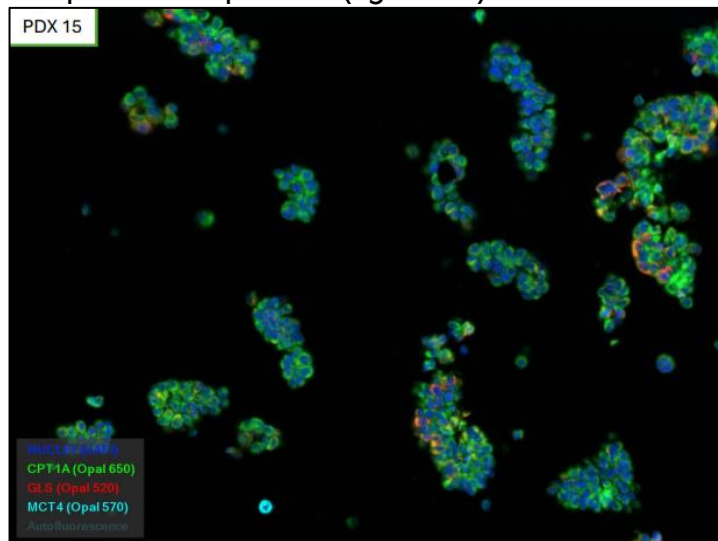


FIGURA 40: immagine 200x acquisita al Mantra (Akoya biosciences) del PDX 15, si possono apprezzare in blu i nuclei, in azzurro l'MCT4, in rosso il GLS e in verde il CPT1A.

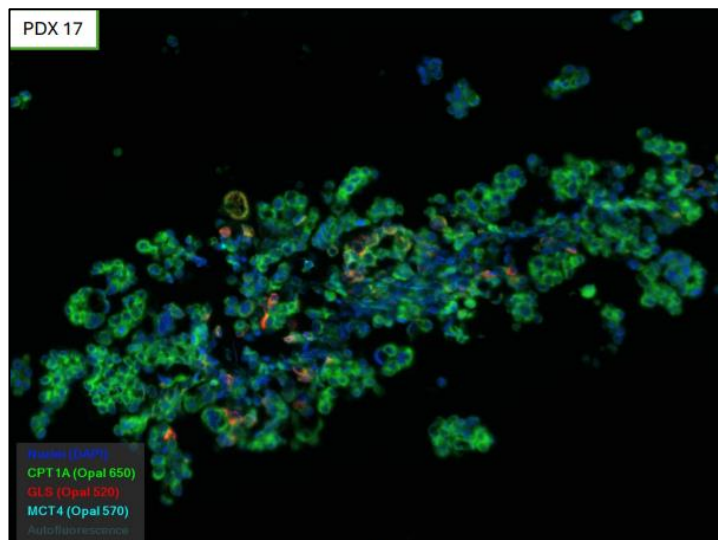


FIGURA 41: immagine 200x acquisita al Mantra (Akoya biosciences) del PDX 17, si possono apprezzare in blu i nuclei, in azzurro l'MCT4, in rosso il GLS e in verde il CPT1A.

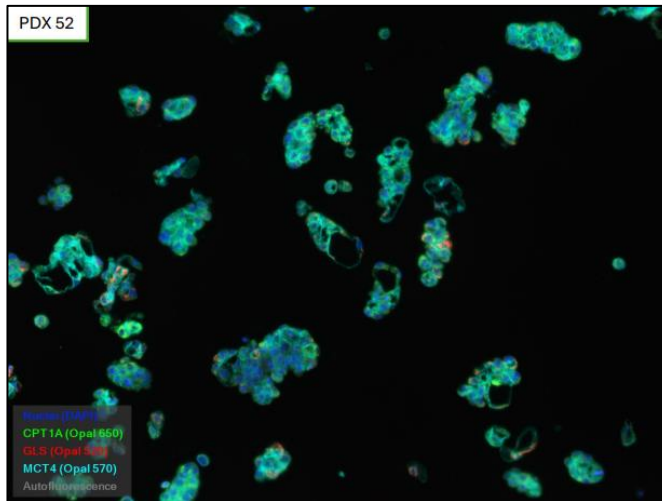


FIGURA 42: immagine 200x acquisita al Mantra (Akoya biosciences) del PDX 52, si possono apprezzare in blu i nuclei, in azzurro l'MCT4, in rosso il GLS e in verde il CPT1A.

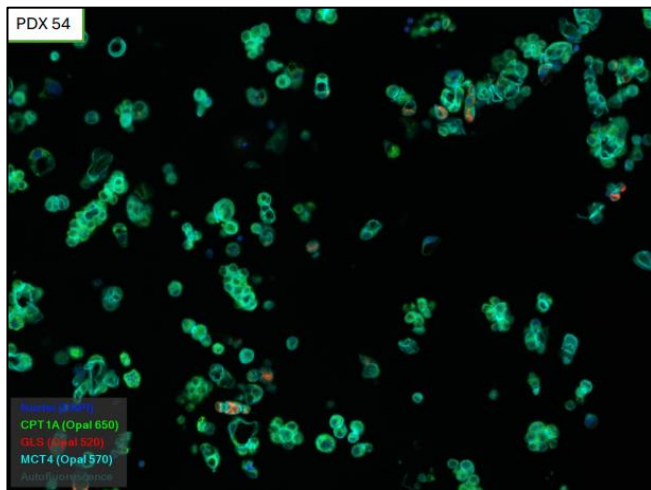


FIGURA 43: immagine 200x acquisita al Mantra (Akoya biosciences) del PDX 54, si possono apprezzare in blu i nuclei, in azzurro l'MCT4, in rosso il GLS e in verde il CPT1A.

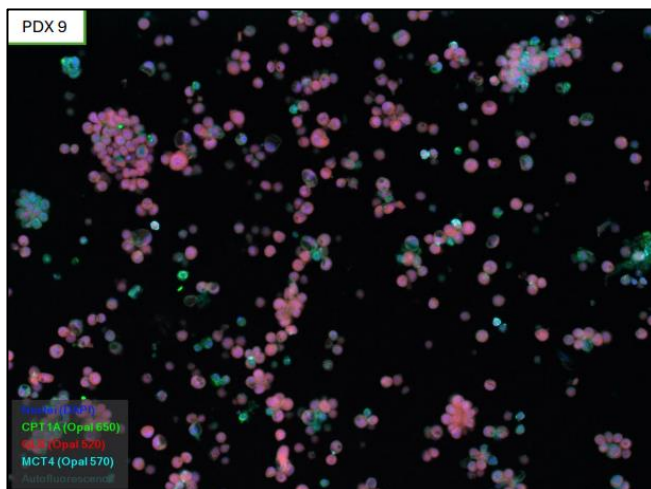


FIGURA 44: immagine 200x acquisita al Mantra (Akoya biosciences) del PDX 9, si possono apprezzare in blu i nuclei, in azzurro l'MCT4, in rosso il GLS e in verde il CPT1A.

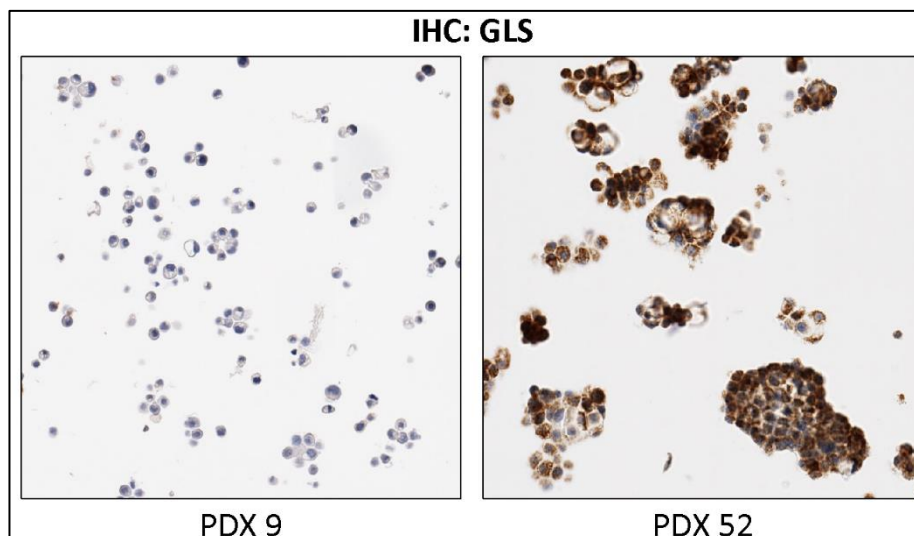


Figura 45: Colorazione IHC del PDX 9 (pannello di sinistra) e PDX 52 (pannello di destra) di GLS a ingrandimento 200x. Si può apprezzare occhiometricamente che il primo non esprime il marcatore mentre il secondo lo esprime abbondantemente.

4.4.2 CONFRONTO TRA I LIVELLI DI ESPRESSIONE DI MCT4, GLS E CPT1A MEDIANTE IMMUNOISTOCHEMICA ED IMMUNOFLUORESCENZA

Per confrontare la sensibilità tecnica di IHC e multiplex con Opal-TSA, abbiamo convertito digitalmente il segnale fluorescente in cromogenico (simil DAB) mediante il *software* InForm™ e analizzato le immagini con il software QuPath, usando gli algoritmi già settati per l'analisi delle immagini IHC. Abbiamo scelto di utilizzare lo stesso algoritmo e non quelli forniti dal *software* InForm per evitare ulteriori *bias*. I risultati sono riportati in figura 45 e mostrano il confronto tra l'H-score ottenuto dalle immagini ottenute con le due tecniche (IHC *versus* "Mantra", per la metodica con Opal). Il marcatore CPT1A ha ottenuto le performances migliori, con risultati comparabili in termini di H-score. L'espressione di MCT4 mostra invece delle differenze tra le due tecniche, con risultati in generale più bassi in tutti i PDX, che tuttavia mantengono l'andamento fornito dall'IHC: i PDX 52 e 54 sono quelli con H-score maggiore. Questi risultati sembrano suggerire che la tecnica multiplex per questo marcatore sia meno sensibile, a parità di concentrazione di anticorpo primario e tempo di ibridazione. I risultati più controversi sono quelli del il marcatore GLS, il quale mostra H-score inferiori a 50 in PDX con H-score calcolato su vetrino IHC superiore a 200 (PDX 15, 17, 52) o a 100 (PDX 54), e H-score superiore a 50 in PDX con H-score IHC vicino allo 0 (PDX 9). Quest'ultimo PDX presenta anche una notevole variabilità tra gli H-score ottenuti dalle varie ROI (figura 44) con un valore medio di 87,4 ed una deviazione standard di 90,2.

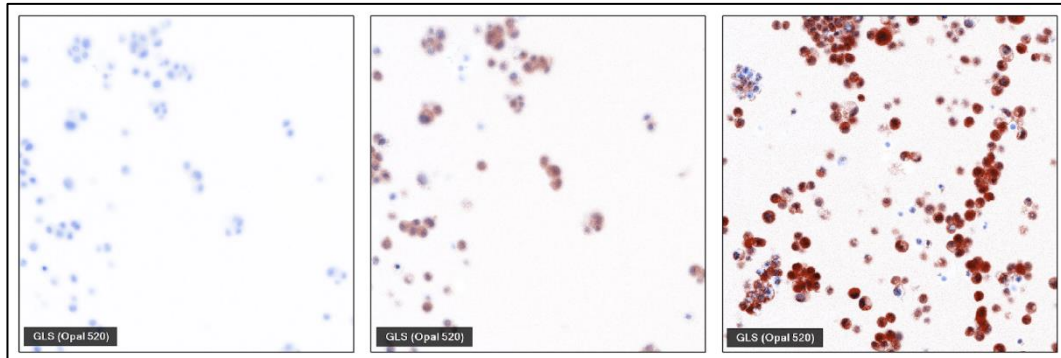


Figura 46: Alcune ROI di esempio del PDX 9 convertite digitalmente in segnale cromogenico. Le 3 ROI mostrano la differente espressione di GLS presente nel campione 9. Ingrandimento 200x.

Curiosamente, il PDX 9 è l'unico tra quelli analizzati a non esprimere CPT1A: rimane da chiarire se ci sia un'interferenza tra CPT1A e GLS che porti al mascheramento del segnale di GLS, o se ci sia stato un problema a livello immunohistochimico alla base di questa differenza. Sono elementi da considerare anche la differenza di secondario tra le due tecniche, in entrambi i casi fornito come pronto all'uso dalle due ditte produttrici (Leica Biosystem e Akoya Biosciences) e la differenza tra analisi *whole slide* (IHC) e per ROI (Opal).

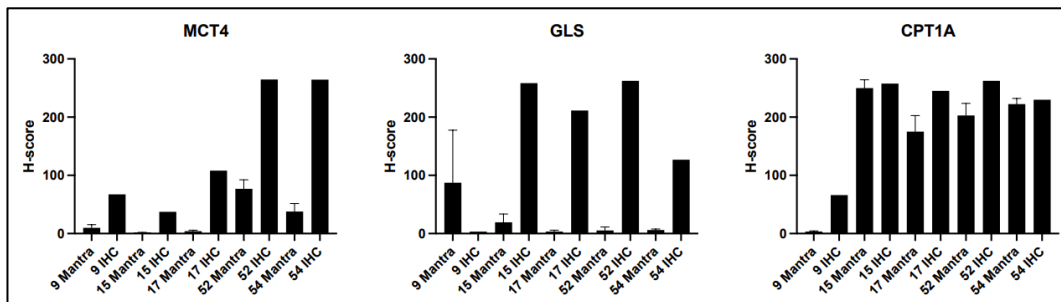


Figura 47: Livelli di espressione di MCT4, GLS e CPT1A ottenuti mediante IHC e multiplex (denominata "Mantra") ed espressi come H-score. Gli h-score dell'Opal-TSA sono stati quantificati per tutte le ROI (n=5) e mostrati in grafico come valore medio.

4.4.3 ANALISI DELLA COLOCALIZZAZIONE DI GLS, MCT4 e CPT1A NEI CELL BLOCK DI PDX OVARICI

Come descritto in precedenza, uno dei vantaggi dell'approccio multiplex IHC con Opal-TSA è la possibilità di valutare l'espressione di due o più marcatori a livello di singola cellula. In questo caso la quantificazione viene fatta usando l'algoritmo di co-localizzazione proposto dal software InForm® (Akoya biosciences), il quale fornisce come risultato finale le percentuali di co-localizzazione dei marcatori nella ROI analizzata dopo aver impostato le *threshold* per i marcatori ed il DAPI (nuclei) come *counterstain*. Dopo aver analizzato 5 ROI e fatto la media delle percentuali, possiamo concludere che le percentuali ottenute rispecchiano le *performances* dei singoli marcatori mostrate nel precedente paragrafo (figura 45), evidenziando, come atteso,

l'assenza di co-espressione nel PDX 9 (che esprime solo GLS), co-espressione di GLS e CPT1A nel PDX 15 (30,6 %) e di MCT4 e CPT1A nei PDX 52 (89 %) e 54 (68,4%). Inoltre, la co-espressione dei tre marcatori è apprezzabile, seppur minimamente, solo nel PDX 54 (12,3 %), in linea con la bassa espressione di GLS già rilevata singolarmente (figura 46).

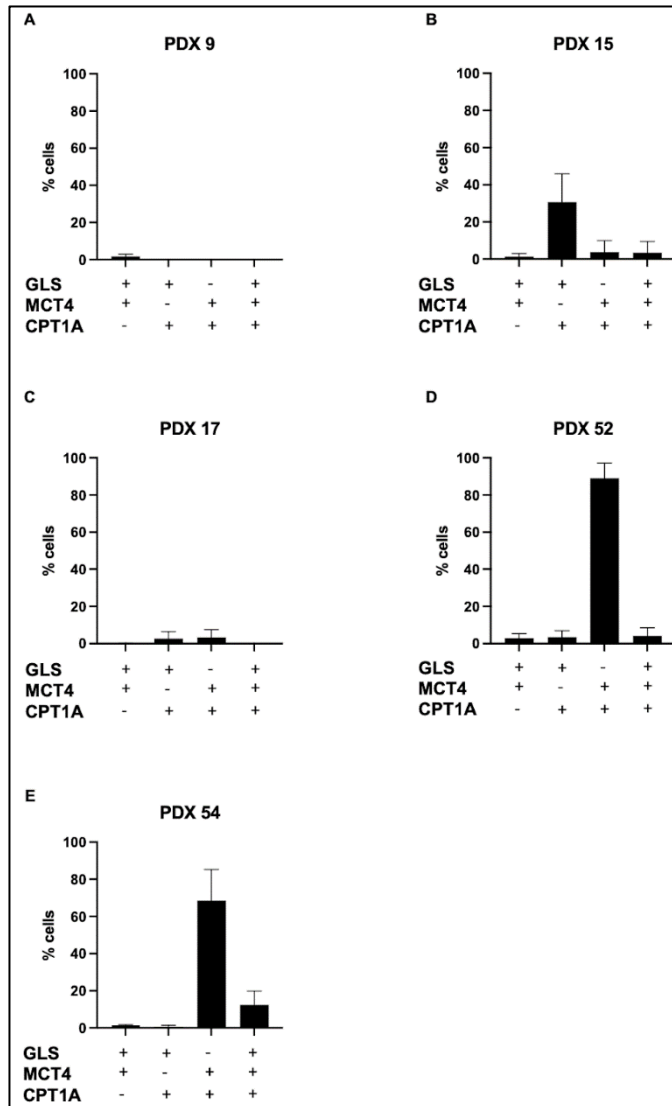


Figura 48: Le percentuali di co-localizzazione dei marcatori ottenute analizzando le 5 ROI di ciascun marcatore e facendo la media.

5. DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

Il tumore ovarico è la neoplasia ginecologica più letale. Sebbene la maggior parte delle pazienti risponda inizialmente al trattamento standard con chemioterapia e chirurgia, la maggior parte recidiva e sviluppa chemioresistenza. Pertanto, è necessario comprendere meglio sia come le cellule tumorali riprogrammino le loro vie di segnalazione metabolica in ambienti carenti di nutrienti, sia i possibili target terapeutici specifici.

In questa tesi, abbiamo confrontato alcune metodiche di laboratorio per determinare l'espressione di marcatori collegati al metabolismo cellulare tumorale. L'immunoistochimica (IHC) accoppiata alla quantificazione dell'espressione proteica mediante *digital pathology* si è rivelata una tecnica essenziale nello studio del metabolismo tumorale nelle cellule ascitiche di xenotrapianti di pazienti ovarici (PDX), mediante lo sviluppo e l'applicazione di un pannello di 6 marcatori metabolici, appartenenti alle principali vie metaboliche: MCT4/MCT1 (via glicolitica), CPT1A/ACC (via degli acidi grassi) e SLC7A5/GLS (*pathway* della glutammina). I dati ottenuti sono stati anche integrati e correlati con quelli trascrittomici. Ulteriore punto cardine della tesi è stata la messa a punto di un test multiplex.

Tenendo in considerazione la complessità del metabolismo tumorale, per interpretare i dati immunoistochimici abbiamo deciso di adottare una classificazione semplificata dei tumori in sottogruppi "glicolitici" e "OXPHOS" (Ferrarini et al, 2023). I tumori glicolitici assorbono il glucosio e lo metabolizzano preferenzialmente attraverso la glicolisi in lattato, che viene esportato dalle cellule attraverso trasportatori monocarbossilati (MCT), come MCT4 ed MCT1. Al contrario, i tumori OXPHOS possono utilizzare diversi substrati come combustibili mitocondriali, i principali dei quali sono rappresentati dalla glutammina e dagli acidi grassi. Per la classificazione, abbiamo inoltre definito come plurimetabolici quei PDX che mostravano un'elevata espressione di entrambi i marcatori associati alla glicolisi (MCT1 ed MCT4) in combinazione con uno dei *pathway* "OXPHOS" (con positivi GLS e SLC7A5 e/o ACC e CPT1A). Nel 45% dei casi (8/18) i marcatori erano concordi e permettevano una classificazione. In particolare, il 12,5% (1/8) come glicolitico ed il 25% (2/8) come "OXPHOS". Inoltre, i risultati immunoistochimici con il pannello sviluppato indicano che il 50% dei PDX (4/8) classificabili ha attive le tre vie metaboliche e sono definibili come plurimetabolici. Solo un campione degli 8 (PDX 9) risulta negativo per tutti i marcatori analizzati e potrebbe esser definito come ipometabolico. I restanti 10/18 campioni (55%) sono difficili da interpretare perché i marcatori analizzati presentano andamenti contrastanti: per questi casi sarebbe necessario aggiungere ulteriori marcatori per ogni via che permetta di stabilire se la via è attiva o spenta.

In quest'ottica, potremmo aggiungere la glicoproteina di membrana CD147, già nota per essere associata funzionalmente a MCT1 ed MCT4 e usata in pannelli immunoistochimici in combinazione con i trasportatori MCT. Ai marcatori della via degli acidi grassi si potrebbe aggiungere l'acido grasso sintasi (FAS), che ha ruolo chiave nella via. Infine, alla via della glutammina si potrebbe aggiungere il trasportatore SLC1A5, già noto per l'associazione con l'espressione di GLS in saggi IHC (Yu-Ying, 2023).

Essendo il metabolismo correlato alla proliferazione, sono stati verificati i tempi di crescita del tumore, cioè il tempo che intercorre tra l'inoculo delle cellule tumorali e il sacrificio del topo ed è di 33 giorni per i plurimetabolici (valore dato dalla media dei tempi dei 4 PDX plurimetabolici) e 40 giorni per l'ipometabolico.

L'espressione genica nei tessuti tumorali può essere saggiata sia a livello di mRNA che di proteine; entrambi i tipi di analisi presentano vantaggi e limiti. Il livello delle proteine riflette più da vicino il fenotipo del cancro perché si tratta di proteine che eseguono importanti funzioni molecolari intracellulari. Tuttavia, i livelli di mRNA e di proteine di geni noti sono fortemente correlati nelle cellule di mammifero, tanto che i livelli di mRNA spiegano circa l'84% della varianza dell'espressione proteica. Ciò è stato confermato anche in diversi organismi da forti correlazioni tra l'mRNA e il *footprinting* ribosomiale o i dati di proteomica quantitativa (Kirk et al, 2000). In questa tesi, è stata confrontata statisticamente la correlazione tra dati IHC e dati di trascrittomica tramite Spearman's test. Curiosamente, gli unici marcatori che mostrano correlazione sono molecole di membrana (MCT1, MCT4 ed SLC7A5). Per gli altri marcatori (ACC, CPT1A e GLS), le discordanze potrebbero essere dovute a meccanismi che impattano su regolazione post-trascrizionale o stabilità proteica, oppure a errori tecnici.

L'immunoistochimica convenzionale (IHC) è una tecnica diagnostica ampiamente utilizzata. Tuttavia, questa tecnica è associata a una serie di limitazioni, tra le quali la capacità di marcare un solo marcatore per sezione di tessuto. Per superare questi limiti è stata sviluppata recentemente l'IHC multiplex che sfrutta i fluorofori Opal coniugati con TSA, una tecnica che consente la rilevazione simultanea di più marcatori su una singola sezione di tessuto e lo studio completo della composizione e della funzionalità cellulare. In quest'ottica, abbiamo implementato e testato su un ristretto numero di campioni un pannello IHC multiplex comprendente i marcatori MCT4, GLS e CPT1A. In una precedente pubblicazione del gruppo era stata saggiata la co-espressione di MCT4 e GLS in molteplici campioni di PDX di NSCLC mediante IHC cromogenica, tecnica che non rendeva possibile la valutazione in contemporanea di CPT1A (Ferrarini et al, 2023). Il protocollo settato in questa tesi, ha permesso la valutazione della co-espressione dei marcatori, sebbene una successiva ottimizzazione degli anticorpi secondari, delle concentrazioni dei primari, dello smascheramento e dei tempi di ibridazione sia necessaria per GLS ed MCT4, che hanno mostrato una ridotta sensibilità tecnica con le condizioni testate rispetto all'IHC convenzionale. Per le limitate performances di GLS, la co-espressione rilevata è stata soprattutto quella di CPT1A-MCT4 (fino a più dell'80% nel PDX 52). Questa tecnica presenta grandi potenzialità come possibilità di analizzare più marcatori sullo stesso tessuto e di quantificarne la co-espressione ma anche diversi limiti, tra i quali la possibilità di analisi su ROI decise arbitrariamente dall'operatore. In questo senso si stanno evolvendo sistemi che sfruttano la tecnologia Opal e che analizzino l'intero vetrino (ad esempio il Phenolmager ®, Akoya biosciences).

In conclusione, i risultati di questo lavoro di tesi supportano la fattibilità di una classificazione metabolica dei PDX di tumore ovarico basata sulla

quantificazione dei marcatori IHC mediante *digital pathology*. Esistono, tuttavia, alcune limitazioni intrinseche a questo studio, tra cui il numero ridotto di marcatori analizzati, che andranno integrati nel pannello per permettere una classificazione di tutti i PDX. Nella tesi è stata anche dimostrata la correlazione tra risultati di IHC ed RNAseq per i marcatori di membrana ed è stato implementato un protocollo di IHC multiplex con fluorofori Opal che ha consentito lo studio della co-espressione dei biomarcatori, sebbene ulteriori ottimizzazioni si rendano necessarie. In futuro potrebbe essere interessante anche integrare lo studio con altre tecnologie emergenti, quali proteomica e *single-cell analysis* e validare i risultati ottenuti su coorti di PDX ovarici più ampie. Ulteriori sviluppi di questi risultati potrebbero coinvolgere il confronto tra il PDX e il tumore primario originale e la validazione tra la caratterizzazione metabolica e la risposta alle terapie metaboliche.

6. BIBLIOGRAFIA

- De Leo, Antonio, Donatella Santini, Claudio Ceccarelli, Giacomo Santandrea, Andrea Palicelli, Giorgia Acquaviva, Federico Chiarucci, et al. 2021. «What Is New on Ovarian Carcinoma: Integrated Morphologic and Molecular Analysis Following the New 2020 World Health Organization Classification of Female Genital Tumors». *Diagnostics* 11 (4): 697.
- «<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/guida-ai-tumori/tumore-delle-ovaie>». s.d.
- Mavaddat N, Peock S, Frost D, Ellis S, Platte R, Fineberg E, Evans DG, Izatt L, Eeles RA, Adlard J, Davidson R, Eccles D, Cole T, Cook J, Brewer C, Tischkowitz M, Douglas F, Hodgson S, Walker L, Porteous ME, Morrison PJ, Side LE, Kennedy MJ, Houghton C, Donaldson A, Rogers MT, Dorkins H, Miedzybrodzka Z, Gregory H, Eason J, Barwell J, McCann E, Murray A, Antoniou AC, Easton DF; EMBRACE. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst.* 2013 Jun 5;105(11):812-22. doi: 10.1093/jnci/djt095. Epub 2013 Apr 29. PMID: 23628597.
- Koushik A, Grundy A, Abrahamowicz M, Arseneau J, Gilbert L, Gotlieb WH, Lacaille J, Mes-Masson AM, Parent MÉ, Provencher DM, Richardson L, Siemiatycki J. Hormonal and reproductive factors and the risk of ovarian cancer. *Cancer Causes Control.* 2017 May;28(5):393-403. doi: 10.1007/s10552-016-0848-9. Epub 2017 Jan 19. PMID: 28102526.
- Arora T, Mullangi S, Vadakekut ES, et al. Epithelial Ovarian Cancer. [Updated 2024 May 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567760/>
- Linee guida CARCINOMA DELL'OVAIO Edizione 2021- Associazione Italiana di Oncologia Medica <https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG%20502%20AIO M Ca%20ovaio%202021>
- Pillay V, Hadebe B, Vorster M. Molecular Imaging and Theranostics in Ovarian Cancer: The Role of Nuclear Medicine. In: Lele S, editor. *Ovarian Cancer* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 Sep 8. Chapter 5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585993/> doi: 10.36255/exon-publications-ovarian-cancer-theranostics
- Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int J Radiat Biol.* 2019 Jul;95(7):912-919. doi: 10.1080/09553002.2019.1589653. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30822194.
- Ralph J DeBerardinis, Nabil Sayed, Dara Ditsworth, Craig B Thompson,
- Brick by brick: metabolism and tumor cell growth, Volume 18, Issue 1, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2008.02.003>.
- Koppenol, W.H.; Bounds, P.L.; Dang, C.V. Otto Warburg's Contributions to Current Concepts of Cancer Metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011, 11, 325–337, doi:10.1038/nrc3038.

- Siddika, Ayesha, Md. Nurujjaman, Abdul Auwal, Tasfik Ul Haque Pronoy, e Farhadul Islam. 2023. «Metabolism of Cancer Stem Cell». In *Cancer Stem Cells: Basic Concept and Therapeutic Implications*, a cura di Farhadul Islam e Alfred K. Lam, 83–100. Singapore: Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-3185-9_5.
- Dolly Sharma, Mamta Singh, Reshma Rani, Role of LDH in tumor glycolysis: Regulation of LDHA by small molecules for cancer therapeutics, *Seminars in Cancer Biology*, Volume 87, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.11.007>.
- Bose, Sminu, e Anne Le. 2018. «Glucose Metabolism in Cancer». In *The Heterogeneity of Cancer Metabolism*, a cura di Anne Le, 1063:3–12. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77736-8_1.
- Newsholme, E. A., B. Crabtree, e M. S. M. Ardawi. 1985. «The Role of High Rates of Glycolysis and Glutamine Utilization in Rapidly Dividing Cells». *Bioscience Reports* 5 (5): 393–400. <https://doi.org/10.1007/BF01116556>.
- Ullah, Mohammed S., Andrew J. Davies, e Andrew P. Halestrap. 2006. «The Plasma Membrane Lactate Transporter MCT4, but Not MCT1, Is Up-Regulated by Hypoxia through a HIF-1 α -Dependent Mechanism». *Journal of Biological Chemistry* 281 (14): 9030–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511397200>.
- Hay, Nissim. 2016. «Reprogramming Glucose Metabolism in Cancer: Can It Be Exploited for Cancer Therapy?» *Nature Reviews Cancer* 16 (10): 635–49. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.77>.
- Li, Ting, Christopher Copeland, e Anne Le. 2021. «Glutamine Metabolism in Cancer». In *The Heterogeneity of Cancer Metabolism*, a cura di Anne Le, 1311:17–38. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_2.
- Yang, Lifeng, Sriram Veneti, e Deepak Nagrath. 2017. «Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism». *Annual Review of Biomedical Engineering* 19 (1): 163–94. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>.
- Sadras, Teresa, Lai N. Chan, Gang Xiao, e Markus Müschen. 2021. «Metabolic Gatekeepers of Pathological B Cell Activation». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 16 (1): 323–49. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-061020-050135>.
- Son, Jaekyoung, Costas A. Lyssiotis, Haoqiang Ying, Xiaoxu Wang, Sujun Hua, Matteo Ligorio, Rushika M. Perera, et al. 2013. «Glutamine Supports Pancreatic Cancer Growth through a KRAS-Regulated Metabolic Pathway». *Nature* 496 (7443): 101–5. <https://doi.org/10.1038/nature12040>.
- Gao, Ping, Irina Tchernyshyov, Tsung-Cheng Chang, Yun-Sil Lee, Kayoko Kita, Takafumi Ochi, Karen I. Zeller, et al. 2009. «C-Myc Suppression of miR-23a/b Enhances Mitochondrial Glutaminase Expression and Glutamine Metabolism». *Nature* 458 (7239): 762–65. <https://doi.org/10.1038/nature07823>.

- Csibi, Alfred, Sarah-Maria Fendt, Chenggang Li, George Pouligiannis, Andrew Y. Choo, Douglas J. Chapski, Seung Min Jeong, et al. 2013. «The mTORC1 Pathway Stimulates Glutamine Metabolism and Cell Proliferation by Repressing SIRT4». *Cell* 153 (4): 840–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.023>.
- Pérez-Escuredo, Jhudit, Rajesh K Dadhich, Suveera Dhup, Andrea Cacace, Vincent F Van Hée, Christophe J De Saedeleer, Martina Sboarina, et al. 2016. «Lactate Promotes Glutamine Uptake and Metabolism in Oxidative Cancer Cells». *Cell Cycle* 15 (1): 72–83. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1120930>.
- Menendez Menendez, Javierabel, Tomás Alarcón, e Jorge Joven. 2014. «Gerometabolites: The Pseudohypoxic Aging Side of Cancer Oncometabolites». *Cell Cycle* 13 (5): 699–709. <https://doi.org/10.4161/cc.28079>.
- Icard, Philippe, Laurent Poulain, e Hubert Lincet. 2012. «Understanding the Central Role of Citrate in the Metabolism of Cancer Cells». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1825 (1): 111–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.10.007>.
- Currie, Erin, Almut Schulze, Rudolf Zechner, Tobias C. Walther, e Robert V. Farese. 2013. «Cellular Fatty Acid Metabolism and Cancer». *Cell Metabolism* 18 (2): 153–61. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>.
- Jin, Jonghwa, Jun-Kyu Byun, Yeon-Kyung Choi, e Keun-Gyu Park. 2023. «Targeting Glutamine Metabolism as a Therapeutic Strategy for Cancer». *Experimental & Molecular Medicine* 55 (4): 706–15. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-00971-9>.
- Liang, Kai. 2023. «Mitochondrial CPT1A: Insights into structure, function, and basis for drug development». *Frontiers in Pharmacology* 14 (marzo):1160440. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1160440>.
- Zhang, Yi, Qiong Li, Zhao Huang, Bowen Li, Edouard C. Nice, Canhua Huang, Liuya Wei, e Bingwen Zou. 2022. «Targeting Glucose Metabolism Enzymes in Cancer Treatment: Current and Emerging Strategies». *Cancers* 14 (19): 4568. <https://doi.org/10.3390/cancers14194568>.
- Ferrarini, Federica, Elisabetta Zulato, Massimo Moro, Paola Del Bianco, Cristina Borzi, Giovanni Esposito, Tiziana Zanin, Gabriella Sozzi, e Stefano Indraccolo. 2023. «Metabolic classification of non-small cell lung cancer patient-derived xenografts by a digital pathology approach: A pilot study». *Frontiers in Oncology* 13 (febbraio):1070505. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1070505>.
- Bankhead, Peter, Maurice B. Loughrey, José A. Fernández, Yvonne Dombrowski, Darragh G. McArt, Philip D. Dunne, Stephen McQuaid, et al. 2017. «QuPath: Open Source Software for Digital Pathology Image Analysis». *Scientific Reports* 7 (1): 16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>.
- Pike, Lisa S., Amy L. Smift, Nicole J. Croteau, David A. Ferrick, e Min Wu. 2011. «Inhibition of Fatty Acid Oxidation by Etomoxir Impairs NADPH Production and Increases Reactive Oxygen Species Resulting in ATP Depletion and Cell Death in Human Glioblastoma Cells». *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1807 (6): 726–34.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.022>.

- Sorokin, Maxim, Kirill Ignatev, Elena Poddubskaya, Uliana Vladimirova, Nurshat Gaifullin, Dmitriy Lantsov, Andrew Garazha, et al. 2020. «RNA Sequencing in Comparison to Immunohistochemistry for Measuring Cancer Biomarkers in Breast Cancer and Lung Cancer Specimens». *Biomedicines* 8 (5): 114.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8050114>.
- Perou, Charles M., Therese Sørlie, Michael B. Eisen, Matt Van De Rijn, Stefanie S. Jeffrey, Christian A. Rees, Jonathan R. Pollack, et al. 2000. «Molecular Portraits of Human Breast Tumours». *Nature* 406 (6797): 747–52. <https://doi.org/10.1038/35021093>.

