

Prof. Carlo Puccillo M.D. Lab of Immunology Department of medical and Biological Science

Vincitore del bando di concorso ASMAS , erogato € 10000 Novembre/2014 per 3 anni

Relazione semestrale del progetto finanziato ASIMAS:

Studio del ruolo di molecole biologiche che abbiano effetto sulla modulazione dell'attività dei mastociti in condizioni di iperattività o neoplastiche.

I mastociti (MCS) svolgono un ruolo centrale nell'anafilassi e nelle malattie allergiche, ma il loro ruolo non è limitato solo a questo. Infatti, in virtù di un incredibile numero di recettori espressi in membrana che gli permettono di interagire con altre cellule, immuni e non, di legare prodotti della matrice extracellulare e di campionare il microambiente per la presenza di molecole solubili, il loro ruolo è più simile a quello di un sensore in grado di rielaborare le informazioni ricevute, integrarle, regolare l'espressione geniche di conseguenza e rilasciare molecole o vescicole (esosomi) o esprimere in membrana nuove molecole. Questa plasticità funzionale fa sì che i mastociti siano coinvolti in moltissimi processi biologici e, che con pieno merito, possano essere considerate cellule regolatorie del sistema immunitario contribuendo sia all'omeostasi dei tessuti e del sistema immunitario che alla regolazione di risposte contro i patogeni. E' facile, quindi, immaginare che una loro cattivo funzionamento possa vederle coinvolte in varie malattie autoimmuni, condizioni infiammatorie e alcune neoplasie. La Mastocitosi riunisce un gruppo eterogeneo di malattie caratterizzate dalla presenza di MC eccessivi in uno o più tessuti. Si tratta di una malattia rara, e l'incidenza esatta non è nota, dato che molte patologie in cui un alterato funzionamento dei MC potrebbe essere presente non è riconosciuto ancora. Il presente progetto, partendo dallo studio dei meccanismi di attivazione dei mastociti, sta sviluppando molecole che hanno la funzione di modulare la funzione riconducendole alla loro funzione normale.

Nel corso dei primi sei mesi del progetto, come dai lavori allegati alla presente relazione, e nei quali è stato riconosciuto il finanziamento ricevuto dall'ASIMAS, si è proceduto su due distinti percorsi. Il primo si è intrapreso nel tentativo di comprendere i meccanismi alla base della proliferazione ed attivazione di queste cellule ed il secondo è indirizzato allo sviluppo di molecole che siano in grado di regolare o restituire il corretto funzionamento della cellula.

In passato avevamo scoperto che i MC interagiscono con le cellule T regolatorie e questo, normalmente, portava alla determinazione del livello di soglia di attivazione di entrambe le cellule. Invece, in un processo infiammatorio il mastocita converte il Treg in una cellula Th17 tipica delle risposte infiammatorie croniche e coinvolta nelle patologie autoimmuni. Perché questo possa avvenire il MC deve ricevere numerosi segnali e abbiamo studiato come si integrano nel mastocita¹ e come questo si riflette in una modifica dell'attività della cellula. Inoltre, abbiamo scoperto che una alterata funzionalità del MC, come si trova nella mastocitosi, può portare ad una modificata interazione con un altro tipo di cellula regolatoria, la cellula Breg, che svolge un ruolo nella omeostasi intestinale^{2,3}. Infatti, abbiamo visto che i mastociti regolano il processo di sviluppo e di proliferazione delle cellule B regolatorie e che di esse sono responsabili dell'homing intestinale. Alterazioni del rapporto tra queste due cellule può portare ad una perdita del controllo di produzione della IL10 rilasciata dalle Breg a livello intestinale con conseguente sviluppo o aggravamento di patologie infiammatorie intestinali. Un dato molto importante che abbiamo trovato è che le cellule MC oltre a dialogare con le altre cellule del microambiente sia immunitarie che stromali tramite rilascio di citochine o contatti cellula-cellule, rilasciano vescicole in grado di veicolare a distanza molecole come i miRNA (piccole molecole endogene di RNA non codificante, attivi nella regolazione trascrizionale e post-trascrizionale dell'espressione genica). Queste vescicole hanno un ruolo molto importante nello

stabilire un microambiente soppressivo o infiammatorio cronico associato a patologie tumorali o croniche ^{2,4,5}.

Questi studi ci hanno portato sia in passato che negli ultimi mesi ad individuare molecole che sono fondamentali per regolare i livelli di soglia dell'attivazione dei mastociti e tramite loro spegnere fastidiosi processi come le reazioni di ipersensibilità o altre invalidanti patologie ^{6,7}. Come da programma abbiamo concentrato la nostra attenzione su una molecola, OX40L, che ha il suo recettore, OX40, sui Treg e che se stimolata è in grado di innalzare la soglia di attivazione del MC riportando, in modelli animali di patologie da iperattivazione mastocitaria, a livelli fisiologici. Avevamo sviluppato una forma solubile di OX40 (sOX40)⁸ da somministrare ai topi ed oggi con il contributo dell'ASIMAS abbiamo sviluppato una forma umana dello stesso e lo abbiamo sperimentato su linee di MC derivate da pazienti con mastocitosi o con leucemie mastocitarie e basofile in modelli di coculture. I dati preliminari in vitro confermano quanto visto nel topo. Inoltre, abbiamo sviluppato altri recettori solubili in grado di interagire ligandi sui MC con la speranza di modificare in maniera fine la regolazione dell'attività della cellula. Questo sforzo è dovuto alla necessità di personalizzare le terapie dato che non tutte le sindromi da iperattivazione mastocitaria o di mastocitosi sono uguali tra loro.

1. Sibilano, R., Frossi, B. & Pucillo, C. E. Mast cell activation: A complex interplay of positive and negative signaling pathways. *Eur. J. Immunol.* (2014). doi:10.1002/eji.201444546
2. Mion, F, D'Inca, F, Danelli, L, Pucillo, C. No Title Mast cells control the expansion and differentiation of IL-10-competent B cells. *J. Immunol.* **in press**, (2014).
3. Mion, F. *et al.* IL-10 production by B cells is differentially regulated by immune-mediated and infectious stimuli and requires p38 activation. *Mol. Immunol.* **62**, 266–276 (2014).
4. Rigoni, A., Colombo, M. P. & Pucillo, C. The Role of Mast Cells in Molding the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 1–10 (2014). doi:10.1007/s12307-014-0152-8
5. Mion, F., Benvenuti, F., Pucillo, C. & Vitale, G. in *Regul. B Cells SE - 12* (eds. Vitale, G. & Mion, F.) **1190**, 163–179 (Springer New York, 2014).
6. Gri, G. *et al.* CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Mast Cell Degranulation and Allergic Responses through OX40-OX40L Interaction. *Immunity* **29**, 771–781 (2008).
7. Frossi, B., Gri, G., Tripodo, C. & Pucillo, C. Exploring a regulatory role for mast cells: "MCregs"? *Trends Immunol.* **31**, 97–102 (2010).
8. Sibilano, R., Pucillo, C. & Frossi, B. in *TNF Superfamily SE - 3* (ed. Bayry, J.) **1155**, 23–30 (Springer New York, 2014).

Tutte le referenze del 2014 hanno il riconoscimento all'ASIMAS per il contributo datoci