



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA
DIPARTIMENTO DI Medicina clinica, sanità pubblica, scienze della vita e dell'ambiente

Dottorato di Ricerca in Scienze della salute e dell'ambiente

Curriculum Medicina Traslationale

XXXV ciclo

Titolo della tesi

Molecole di adesione (Nectina-4): un nuovo biomarker tumorale.

Dalla promozione tumorale alla viroterapia oncolitica

SSD MED/04

Dottorando

Stefano Croce

Coordinatore del corso

Prof. Maria Grazie Cifone

Tutor

Prof. Mauro Bologna

a.a. 2021/2022

Sommario

CAPITOLO 1	9
SCOPO DEL LAVORO	9
CAPITOLO 2	10
2.1 LA FAMIGLIA DELLE NECTINE	10
2.2 CARATTERISTICHE DELLE NECTINE	11
2.3 NECTINE E PATOLOGIE	14
2.4 NECTINA-4	15
CAPITOLO 3	17
3.1 IL TUMORE DELLA MAMMELLA	17
3.2 NECTINA-4 COME NUOVO BIOMARKER	18
3.3 CARCINOMA MAMMARIO METASTATICO	20
3.4 CARCINOMA MAMMARIO INVASIVO LUMINALE B (HER2 NEGATIVO)	21
3.5 TUMORE MAMMARIO TRIPLO NEGATIVI (TNBC)	22
3.6 PROGRESSIONE TUMORALE ED EFFICACIA TERAPEUTICA	23
3.7 LINFOANGIOGENESI E METASTASI	25
CAPITOLO 4	27
4.1 VIROTERAPIA ONCOLITICA E NECTINA-4	27
4.2 VIRUS DEL MORBILLO (MV): GENERALITÀ	28
4.3 CD46, SLAM/CD150 E PVRL4/NECTINA-4	29
4.4 NECTINA-4: RECETTORE E LIGANDO	32
4.5 PROPRIETÀ ONCOLITICHE DEL VIRUS DEL MORBILLO	33
4.6 MODIFICHE VIRALI	35
4.7 CHEMIOVIROTERAPIA	37
4.8 IMMUNOVIROTERAPIA	39
4.9 STUDI CLINICI E DATI	41
CAPITOLO 5	44
METODI	44
5.1 RACCOLTA DATI	44
5.2 STRATEGIA DI RICERCA	44
5.3 LETTERATURA SELEZIONATA	45

Abstract

Nectins determine Ca²⁺-independent cell adhesion in a number of tissues, including epithelial, endothelial, and neural tissues, at various stages of development. The nectin family consists of four members (nectin-1-4) whose extracellular domains participate in a complex network of interactions that include both homophilic and heterophilic adhesive associations between interacting cells. The nectin family is composed of immunoglobulin-like Ca²⁺-independent cell adhesion molecules and is found to consist of 4 main components: nectin-1, nectin-2, nectin-3, and nectin-4, respectively encoded by the Pvr11, Pvr12, Pvr13, and Pvr14 genes. Their structure is composed of an extracellular region with three immunoglobulin-like loops, a V-type loop, and two C2-type loops. In addition, a single region spanning the plasma membrane of the cell and a cytoplasmic tail containing the aphadin binding site. Aphadin is an actin-binding protein that is responsible for recruiting proteins necessary for cell-cell adhesion. In addition to homophilic and heterophilic interactions, nectins also play the role of binding other proteins, adding important physiological roles in multiple homeostatic and developmental processes through their involvement in immunomodulation and host-pathogen interactions. Nectin-4 interacts directly with aphadin through its cytoplasmic C-terminal tail. α -catenin and vinculin also play crucial roles in the cell adhesion process. α -Catenin also associates with β -catenin, which is recognized by the cytoplasmic cadherin domain. By these interactions, nectin-4 and aphadin recruit several proteins, including cadherins, to sites of cell-cell adhesion. The adherens junctions that are formed include nectin-4-afadin and cadherin-catenin complexes, both of which are associated with actin bundles. The interaction of Nectin-4 and cadherin with their respective adaptor molecules and the subsequent association of these adaptor proteins with actin bundles serve to stabilize adhesion sites between neighboring cells. Some members of the nectin family specifically interact with receptors expressed on specialized immune cells, T cells, and natural killer (NK) cells, resulting in the transmission of powerful immunomodulatory signals. Specifically, Nectin-4 binds to the immunoreceptor of T cells with Ig domains. This process creates inhibitory signals to T and NK cells. The stimulated signaling pathway then goes on to regulate functional T-cell activation, very often altering it, and any perturbations result in increased susceptibility to infections and malignancies (reduced T-cell activity) or the induction of autoimmunity (increased T-cell activity). The greatest expression of nectin-4 is found during fetal life at the placental level, while during adult life, its amount decreases dramatically, remaining in small traces at the level of various epithelial tissues. Precisely because of this characteristic, any overexpression of nectin-4 in adult tissues is compatible with tumor development. In line with the literature, the detected percentages indicate the presence of Nectin-4 in urothelial tumors in 83% of cases, in breast tumors in 78%, and in pancreatic tumors in 71%. Nectin-4 expression was also found in more than half of the lung, ovarian, head/neck and esophageal cancer samples analyzed. This study delves into different types of breast cancer, highlighting the role of the adhesion molecule and defining its prognostic and therapeutic ability. Nectin-4 has, in addition, been shown to be useful in the diagnosis of disease progression, with a focus on the metastatic process and lymphangiogenesis. Patients with tumors with high expression of nectin-4 show significantly higher risks of progression and cancer-specific mortality. In addition, for

several tumor types, the responsible metabolic pathway, namely the PI3K/Akt pathway, has been identified, although the molecular mechanisms require more research efforts to be precisely identified. Based on these findings, nectin-4 may assume the role of a new tumor biomarker. In addition, the study may be a starting point to further investigate the signaling pathways afferent to nectin-4, which may define a promising new therapeutic strategy for the control of both tumors and autoimmune diseases. This review also addresses the therapeutic relevance of the measles virus. The latter, from the literature, has been shown to interact with three different cellular receptors: CD46, SLAM/CD150, and PVRL4/Nectin-4. Measles virus hemagglutinin interacts with the variable V domain of nectin-4. The direct interaction between the adhesion molecule and the measles virus offers the approach of oncolytic virotherapy. This review addresses the oncolytic properties of the measles virus, focusing on developments to make virotherapy more effective; in addition, virotherapy can be used in addition to other existing types of treatment. Current clinical trials will also be covered.

Abbreviazioni

1. MV = Virus del morbillo
2. Ig = Immunoglobuline
3. FGF = Fibroblasti
4. PDGF = Fattore di crescita derivato dalle piastrine
5. Dominio PDZ
6. JAK-2 = Tirosin-chinasi
7. STAT5 = L'attivatore della trascrizione 5
8. PVRL1-PVRL2-PVRL3-PVRL4 = Gene codificante Nectina-1/2/3/4
9. SNPs = Polimorfismo a singolo nucleotide
10. kDa= Kilodalton
11. Dominio V = Dominio immunoglobulinico distale variabile
12. Dominio C = Dominio immunoglobulino costante
13. EMT = Transizione epitelio-mesenchimale
14. AKT = Protein-chinasi B o PKB
15. ADAM-17 = Enzima proteolitico
16. IMPORTIN- α 2 = Proteina di trasporto nucleare
17. BER = Riparazione del DNA
18. Src = Protein-chinasi
19. PI3K = Fosfatidil inositolo 3-chinasi
20. iNOS = Ossido nitrico sintasi
21. CXCR4 - CXCL12 = Pathway molecolare
22. ERBB2 = Human Epidermal Growth Factor Receptors 2, o HER2
23. TACE = Proteasi
24. EGFR = Epidermal growth factor
25. P53 = Oncosoppressore
26. ER = Recettore per gli estrogeni
27. PR = Recettore per il progesterone
28. GATA3 = Fattore di trascrizione
29. Ki67 = Marcatore di proliferazione
30. Grado SBR = Stadiazione tumori
31. TACE/ADAM-17 = Endoproteasi
32. CEA = Marcatore utilizzato come marker del tumore mammario metastatico
33. CA15.3 = Marcatore utilizzato come marker del tumore mammario metastatico
34. T47D - MCF-7 - MDA-MB-175 = Linee cellulari
35. DFS - OS - LRFS - DRFS = Indici di sopravvivenza
36. TNBC = Tumore mammario triplo negativo
37. SPECT/CT = Tomografia ad emissione di fotone singolo
38. PET = Tomografia ad emissione di positroni
39. TAPI-1 = Inibitore sintetico di TACE
40. TIMP-3 = Inibitore naturale di TACE
41. MUC1 = Mucina associata alla superficie cellulare
42. LYVE-1 = Recettore endoteliale del vaso linfatico 1
43. VEGF-C = Marcatore linfatico di linfoangiogenesi
44. VEGF-A = Fattore di crescita dell'endotelio vascolare

45. MMP-2 = Metalloproteasi
46. MMP-9 = Metalloproteasi
47. GSK-3 β - Gli-1 = Vie di segnalazione di nectina-4
48. T-VEC = Virus Herpes Simplex 1 adattato alla chemio/radio-viroterapia
49. Gene N = Nucleocapsid protein
50. Gene P = Phosphoprotein , facente parte del complesso RNA polimerasi
51. Gene C-V = Fattori di virulenza
52. Gene M = Proteina di matrice
53. Gene F = Proteina di fusione di membrana
54. Gene H = Emagglutinina, proteina legante il recettore di membrana presente sulle cellule
55. Gene L = Large protein
56. N_{CORE} = Regione N-terminale della proteina N
57. N_{TAIL} = Regione C-terminale della proteina N
58. HSP72 = Heat shock protein 72
59. IRF3 = Fattore di regolazione dell'interferone
60. RNP = Ribonucleoproteina
61. CD46 - CD150/SLAM = recettori riconosciuti dalla proteina H
62. C3b-C4b = Componenti del complemento in grado di proteggere da infezioni
63. SCR1-4 = Dominio extracellulare di CD46
64. STP = Dominio di CD46
65. Ser/Thr/Pro = Setina/Treonina/Prolina
66. SLAMF1 = Gene codificante SLAM
67. SH2 = Regione di legame di SLAM
68. DC-SIGN = Integrina di adesione specifica per cellule dendritiche
69. H358 – H441 = Linee cellulari permissive all'infezione
70. H23 – H522 = Linee cellulari non permissive all'infezione
71. GFP = Green fluorescent protein
72. FACS = Fluorescence-activated cell sorting
73. siRNA = Small interfering RNA
74. PVR o CD155 = Recettore del poliovirus
75. VCC-Fc = Forma solubile di nectina-4. 3 Domini presenti (VCC)
76. V-Fc = Forma solubile di nectina-4. 1 Dominio presente (V)
77. N4.40 = Anticorpo capace di riconoscere uno dei due domini C
78. N4.61 = Anticorpo capace di riconoscere il dominio V
79. Kd = Costante di dissociazione
80. nM = Nanometri
81. CD38 e CD20 = Ligandi maggiormente utilizzati nel linfoma non Hodgkin
82. CEA = Glicoproteina coinvolta nei complessi di adesione cellulare
83. NIS = Canale di simporto sodio-iodio
84. ¹²³I - ¹²⁴I - ¹²⁵I = Isotopi radioattivi
85. SCD = Supercitosina deaminasi
86. 5-FC = 5-fluorocitosina
87. NAP = Gene nitrato reductasi periplasmatica batterica
88. α CTLA-4 o α PD-L1 = Recettori inibenti l'attivazione dei linfociti T
89. PDAC = Adenocarcinoma del dotto pancreatico
90. 5-FU = 2,4-diosso-5fluoropirimidina
91. CD-UPRT = Complesso composto da una proteina di fusione, citosina deaminasi e uracile fosforibosil transferasi

92. 5-FUMP = 5-fluorouridina monofosfato
93. RIG-1 – MDA-5 – TLR7 = Recettori immunità innata
94. DDX58-IFN- β -STAT1-ISG15-MX1-MX2-OAS1-OAS2 = Geni stimolati dall'interferone, con funzioni antivirali
95. DAMPs = Damage-associated molecular patterns
96. PAMPs = Pathogen Associated Molecular Patterns
97. HMGB1 = Potente segnale agente sulle cellule dendritiche
98. TLR-4 = Toll-like receptor 4
99. HSP70 = Heat shock protein 70
100. TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand
101. CCL3-CCL4-CCL5-CXCL10 = Fattori di migrazione dei linfociti
102. IL-8-IL-6-IL-12-IL-2-IL4 = Interleuchina 8/6/12/2/4/1 β
103. MCP-1 = Chemochina
104. CD80 = Molecola stimolatrice di sintesi citochinica
105. TNF- α = Fattore di necrosi tumorale
106. CXCL9 = Segnale chemiotattico per le cellule T
107. MICA/B = Geni del Complesso maggiore di istocompatibilità di classe I
108. ULBP1 2-3 = Proteine leganti di superficie cellulare
109. CD112 = Componente delle adesioni cellulari
110. CTCL = Linfoma cutaneo a cellule T
111. PBMC = Cellule mononucleate del sangue periferico
112. FR α - IGFBP2 = Epitopi stimolatori verso le PBMC

Capitolo 1

Scopo del lavoro

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di raccogliere ed elaborare i dati disponibili in letteratura relativi alle potenzialità diagnostiche e terapeutiche della nectina-4 nel tumore della mammella, anche al fine di approfondire la strategia basata sull'approccio della viroterapia oncolitica.

Il lavoro è stato articolato nelle seguenti sezioni:

La sezione preliminare elenca le caratteristiche della famiglia delle nectine e le interazioni che permettono loro di svolgere la propria funzione di molecole di adesione. Introduce gli aspetti essenziali della nectina-4, esponendo con attenzione in primis il legame presente tra essa e la ghiandola mammaria, e poi il ruolo e le caratteristiche che indicano il suo possibile ruolo come nuovo biomarker tumorale.

La sezione successiva affronta il tumore della mammella, distinguendo il ruolo della nectina-4 nelle diverse tipologie di cancro. Questa revisione analizza il carcinoma mammario metastatico e non metastatico, il carcinoma mammario invasivo luminale B ed anche i tumori denominati tripli negativi. Senza trascurare il ruolo di nectina-4 nella progressione tumorale, nell'efficacia terapeutica, nella linfoangiogenesi e nel processo di metastatizzazione.

L'ultima sezione di questo lavoro si concentra sul ruolo della nectina-4 nella viroterapia oncolitica. Data l'affinità presente tra il virus del morbillo (MV) e nectina-4, lo studio intende offrire prospettive future di importante interesse.

Capitolo 2

2.1 La famiglia delle nectine

Fino a qualche decennio fa le nectine erano considerate come recettori di membrana particolarmente utili al poliovirus, in quanto permettevano al virus l'ingresso nella cellula e la sua fitness. Con il progresso scientifico si è individuato anche il ruolo cruciale che questa famiglia di proteine svolge nelle adesioni cellulari, nella cancerogenesi ed anche nella riparazione del DNA.

La famiglia delle nectine è composta da quattro membri: nectina-1, nectina-2, nectina-3 e nectina-4, rispettivamente codificate dai geni Pvlr1, Pvlr2, Pvlr3 e Pvlr4 (1; 2).

Le nectine sono molecole di adesione cellulare immunoglobulina-simile Ca^{2+} -indipendenti, costituite da un dominio extracellulare nella quale sono presenti tre loop immunoglobulina-simili, un'unica regione che attraversa la membrana plasmatica ed una coda citoplasmatica contenente un dominio afadina-vincolante. Dei tre loop immunoglobulina-simili, uno è di tipo V e due sono invece di tipo C2.

L'afadina è una proteina in grado di legare i filamenti di actina; per cui le nectine possono trans-interagire, le une con le altre grazie ai domini extracellulari che posseggono e formare adesioni cellule-cellula, ma possono anche legare l'afadina, a livello intracellulare, utilizzando la coda citoplasmatica, e collegarsi ai filamenti di actina. Inoltre, sono anche in grado di interagire eterofilicamente con molecole simili a Ig e modulare il sistema immunitario.

Le nectine hanno la capacità di formare almeno tre diversi tipi di adesione cellula-cellula, in base al coinvolgimento di caderine e afadina: adesioni dipendenti da afadina e caderina, adesioni afadina-dipendente e caderina-indipendente, e adesioni afadina e caderina indipendenti. La rete giunzionale afadina e caderina dipendente è stata riscontrata nell'epitelio intestinale, ma anche a livello delle cellule endoteliali, fibroblasti e neuroni (3). La rete giunzionale afadina-dipendente e caderina-indipendente è riscontrata nelle adesioni tra spermatidi e cellule di Sertoli, nel testicolo (4); mentre la terza rete, afadina e

caderina indipendente, è stata dapprima riscontrata nelle adesioni tra gli assoni e le cellule basali del tubo neurale in formazione (5), successivamente tra i dendriti laterali delle cellule mitrali nel bulbo olfattivo (6) ed infine, tra le cellule luminali e basali dell'epitelio della ghiandola mammaria (7).

2.2 Caratteristiche delle nectine

Le nectine possono trans-interagire sia in modo omofilico che eterofilico, grazie ai domini extracellulari della loro struttura. Il processo inizia con le nectine che costruiscono un omodimero in *cis* a cui verranno poi aggiunti cluster laterali sulla superficie della cellula, ed in seguito i cluster che si sono appena formati vanno incontro ad una trans-interazione con i cluster presenti sulla superficie della cellula opposta (2; 8). Il ruolo cruciale in questo processo è svolto dal dominio V immunoglobulino-simile presente a livello extracellulare, che è in grado di formare dimeri trans (2).

Alcuni studi, al contrario, identificano i domini C2 i responsabili della formazione dei dimeri *cis* (9; 10).

Le trans-interazioni eterofiliche risultano aver maggior stabilità e maggiore resistenza rispetto alle trans-interazioni omofiliche (11, 12, 13); nello specifico, partendo dall'interazione più forte, possiamo catalogare le interazioni in questo modo: nectina-1/nectina-3; nectina-2/nectina-3; *trans*-interazioni omofiliche nectina-1/nectina-1, nectina-2/nectina-2 e nectina-3/nectina-3.

La capacità delle nectine di creare una rete così strutturata gli conferisce anche la capacità di mediare le adesioni eterotipiche coinvolte in tessuti ed apparati (4, 11, 14).

Un confronto rapido tra nectine e caderine evidenzia che, mentre le caderine hanno una diffusione laterale estremamente lenta ed una carente affinità per le trans-interazioni con le caderine delle superfici cellulari opposte, le nectine hanno una rapida diffusione laterale ed una notevole affinità per le trans-interazioni (15), e proprio queste proprietà rendono le nectine capaci di dare inizio al processo di adesione cellulare, seguito poi dall'intervento delle caderine che stabilizzano le adesioni e portano alla formazione delle giunzioni aderenti (11).

C'è anche un altro aspetto da considerare. Le nectine possono *cis*-interagire anche con recettori di membrana ed anche con l'integrina: nectina-1 ha affinità con il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) (16) e con l'integrina $\alpha v\beta 3$ (17), la nectina-3 può interagire con il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) (18), la nectina-4 invece con il recettore della prolattina (7). Le nectine e le Necl (molecole nectino-simili) riescono a stimolare ed inibire le vie di segnalazione regolate dai recettori appena citati, influenzando svariate funzioni cellulari come il movimento, la proliferazione, la polarizzazione, il differenziamento e la sopravvivenza cellulare, in associazione con altre proteine specifiche. Le nectine legano l'afadina tramite le loro code citoplasmatiche. Tutte le nectine, ad eccezione di nectina-1 β , nectina-3 γ e nectina-4, presentano un dominio conservato E/A-X-Y-V (dove X è un amminoacido) al C-terminale utile al legame con il dominio PDZ dell'afadina. Anche se nectina-4 non presenta questo dominio è comunque in grado di interagire con PDZ tramite la terminazione carbossilica (2).

Le nectine hanno un ruolo importante anche nella formazione di giunzioni cellula-cellula tra cellule epiteliali luminali e basali della ghiandola mammaria, con la presenza di un complesso nectina-1/nectina-4 associato al recettore della prolattina, in grado di stimolarne l'attivazione e la segnalazione (7).

La ghiandola mammaria si sviluppa, durante l'embriogenesi, dall'ispessimento del foglietto ventrale che diventa poi sorta di albero duttale rudimentale prima della nascita (19). I successivi sviluppi sono differenti in base al sesso, in quanto nelle donne la ghiandola mammaria prosegue il suo sviluppo in modo ormone-dipendente, subendo l'azione ormonale responsabile dello sviluppo alveolare, dell'elongazione e la ramificazione dei dotti. La gravidanza poi induce il differenziamento lattogenico. Gli ormoni che regolano questo processo sono gli estrogeni, il progesterone, la prolattina ma anche dei fattori di crescita, le citochine, il fattore di crescita insulino-simile di tipo 1, il fattore di crescita epidermico (19). La ghiandola mammaria è, quindi, costituita da vari dotti ed alveoli, organizzata in una struttura a doppio strato composto da cellule luminali interne circondate da cellule basali mioepiteliali (20), nello specifico, le cellule luminali

sfruttano la presenza di tutte le tipologie di giunzioni per la formazione di uno strato composto da cellule adiacenti. Infatti, si riscontrano le giunzioni aderenti, i desmosomi, le giunzioni strette e le giunzioni gap: le strette sono localizzate nella porzione più apicale delle membrane basali, le giunzioni aderenti nella parte basale, i desmosomi e le gap presenti in maniera casuale sulle membrane basolaterali. Le cellule basali, invece, formano uno strato interagendo e si legandosi tra loro tramite giunzioni aderenti, desmosomi e giunzioni gap (21).

Il sistema nectina-1/nectina-4 è localizzato al confine tra le cellule luminali e basali (7), ed è chiamato complesso nectina-1/nectina-4 perché è formato dalle trans-interazioni tra la nectina-1 delle cellule basali e la nectina-4 delle cellule luminali. A livello di questo complesso non si riscontrano componenti delle giunzioni strette o aderenti come la nectina-2 o l'afadina o l'E-caderina, ma non sono presenti nemmeno componenti dei desmosomi come la desmoplachina, né delle giunzioni gap come la connessina 43.

Tra le cellule luminali e le basali, inizialmente, si conosceva la presenza solo dei desmosomi, ma attualmente è stata riscontrata la presenza delle giunzioni gap (7), per cui possiamo identificare la presenza di tre tipologie di giunzioni: desmosomi, giunzioni gap e complesso nectina-1/nectina-4.

La funzionalità dei due membri del complesso è stata analizzata, insieme alle loro interazioni fisiche e funzionali, tramite topi femmina knock out per la nectina-1. La prima evidenza è risultata la non capacità di allattare al seno i cuccioli, in quanto la ghiandola mammaria, nonostante la gravidanza, ha un insufficiente sviluppo alveolare, una anormale morfologia dei dotti ed anche la mancanza di sintesi ex novo delle proteine del latte (7). Questi aspetti ci indicano, quindi, che la nectina-1 sia essenziale per i processi in questione. In più, l'assenza di nectina-1 in questi topi si ripercuote anche sul differenziamento lattogenico perché riveste un ruolo decisivo nell'interazione con il recettore prolattinico, capace di promuovere lo sviluppo alveolare e, appunto, il differenziamento lattogenico. Andando nel dettaglio, noi sappiamo che l'ormone principale responsabile dello sviluppo alveolare indotto dalla gravidanza, con successivo

differenziamento lattogenico, è la prolattina: la prolattina interagisce con il proprio recettore presente nelle cellule luminali ed induce l'attivazione della tirosin-chinasi JAK-2, che fosforila STAT5 (22), mentre nectina-1 e nectina-4 cis-interagiscono con il recettore prolattinico in modo da migliorare la segnalazione e la promozione dello sviluppo alveolare ed il differenziamento lattogenico in vivo (7).

2.3 Nectine e patologie

La famiglia delle nectine, fin qui descritta, riveste ruoli associati anche alla insorgenza e alla progressione di svariate patologie, come ad esempio l'Alzheimer e dei disturbi mentali correlati allo stress, ma possono arrivare anche alla promozione tumorale (4, 11). La presenza di mutazioni nel gene PVRL1 umano, codificante per la nectina-1, può determinare la comparsa del labbro leporino o di sindromi di displasie ectodermiche (23, 24), dei disordini autosomici recessivi che si traducono, clinicamente, in un aspetto del volto anomalo, aggiunto ad anomalie dentali, ipotricosi, ipercheratosi palmoplantare, oncodisplasia, sindattilia e, in alcuni casi, ritardo mentale. Mutazioni, invece, presenti sul gene PVRL4 umano, codificante per la nectina-4, hanno la capacità di determinare l'assenza di nectina-4, per cui la non capacità di interagire con la nectina-1 nel complesso descritto in precedenza, generando la sindrome di displasia ectodermica sindattilica, con combinazioni di anomalie a livello dentale ed anche del cuoio capelluto, a cui si aggiunge alopecia e sindattilia cutanea (25).

La presenza di un polimorfismo a singolo nucleotide o SNPs nel gene PVRL2 umano, codificante per la nectina-2, ha mostrato associazione con lo sviluppo di Alzheimer tardivo (26, 27, 28). Mentre cambiamenti nel gene PVRL3, codificante per la nectina-3, determinano patologie e difetti oculari, anche congeniti (29).

Le nectine localizzate sulla superficie cellulare, hanno anche la capacità di comportarsi come recettori sensibili all'ingresso di virus patogeni, infatti, nectina-1 e nectina-2 agiscono come recettori del virus Herpes simplex, mentre nectina-4 risulta idonea al legame con il morbillovirus, argomento che verrà approfondito successivamente (30, 31, 32).

2.4 Nectina-4

Come le altre nectine, la nectina-4 regola le adesioni cellula-cellula Ca^{2+} -indipendenti in vari tessuti, con particolare presenza a livello degli epitelii, è localizzata nella regione subapicale delle membrane laterali nelle cellule colonnari dell'epitelio e, inoltre, è uno dei costituenti principali delle giunzioni aderenti (12). È una proteina transmembrana composta da 510 amminoacidi circa, ed un peso molecolare di 55.5 kDa, la sua struttura è formata da una lunga regione extracellulare in cui è identificabile un dominio immunoglobulinico distale variabile (V), e due domini immunoglobulinici costanti (C2) anch'essi, un segmento transmembrana ed una coda citoplasmatica (1, 33, 34). La coda citoplasmatica presenta il sito di legame per l'afadina permettendo alla nectina-4 di connettersi all'actina del citoscheletro.

Dal punto di vista funzionale, la nectina-4 è una molecola di adesione, specializzata nella formazione di interazioni con altre molecole di nectina-4 ma anche con la nectina-1, formando complessi nectina-1/nectina-4 (35). A differenza delle altre nectine, la nectina-4 è abbondantemente espressa a livello fetale, nei trofoblasti placentari, ma, nell'età adulta, la sua espressione si riduce in modo drastico nei tessuti, essendo rilevabile solo a livelli bassi nella cute, nelle cellule ghiandolari dello stomaco, nella prostata, nei polmoni e nella trachea (2, 25). La sua over-espressione in tessuti adulti può, quindi, avere conseguenze patologiche o, comunque, rappresentare un fattore di alterazione biomolecolare da non trascurare.

È stato evidenziato il ruolo di nectina-4 nell'angiogenesi e nella metastatizzazione (36, 37, 38). Uno studio suggerisce che nectina-4 possa rimodellare il citoscheletro tramite l'innescamento della transizione epitelio-mesenchimale (EMT), processo, quest'ultimo, considerato il primo passo verso la metastatizzazione (39). Una down-regulation della nectina-4 nelle cellule tumorali papillari della tiroide ha soppresso l'EMT e l'invasività (40), evidenziando anche un ruolo cruciale il ruolo della cascata di segnalazione AKT verso l'EMT.

Sono in molti ad aver confermato il ruolo di nectina-4 come marker progressivo di metastasi, arrivando anche a suggerire che sia proprio la molecola ad essere la principale causa di metastasi (36, 41).

Chatterjee et al. hanno descritto un percorso molecolare capace di spiegare il ruolo di nectina-4 nell'angiogenesi e nella metastatizzazione: mentre il dominio extracellulare di nectina-4 ricopre un ruolo nell'angiogenesi, il dominio citoplasmatico è essenziale per la riparazione del DNA. Ha un ruolo centrale ADAM-17, un enzima proteolitico capace di tagliare la nectina-4 in condizioni ipossiche nelle cellule tumorali. Quest'ultimo riesce a separare il dominio citoplasmatico di nectina-4 che, una volta liberato, interagisce con IMPORTIN- α 2, trasloca nel nucleo ed avvia la riparazione del DNA (BER) (42). Il dominio extracellulare della nectina-4 segue invece un altro percorso: va ad interagire e a legarsi con l'integrina- β 4 endoteliale, stimolando la via Src-PI3K-AKT-iNOS e quindi l'angiogenesi (36). La produzione di nitrossido da parte della iNOS stimola ulteriormente l'angiogenesi e potenzia la vasodilatazione (42).

Recentemente, è stata dimostrata la capacità della nectina-4 di indurre l'asse CXCR4/CXCL12-LYVE1 che, a sua volta, promuove l'angiogenesi in alcuni tipi di tumore, come quello mammario (37). Inoltre, la nectina-4 ha la capacità di inibire l'attività delle cellule natural killer, riuscendo così a determinare, anche attraverso quest'altra via indiretta, e promuovere la progressione tumorale (43).

Capitolo 3

3.1 Il tumore della mammella

Il tumore della mammella è senza dubbio la patologia maligna più comune nelle donne, e si stima che riesca a colpire una donna su dieci nel corso della vita; è sicuramente caratterizzata da una grande eterogeneità a livello molecolare che ne limita l'efficacia terapeutica, nonostante, ad oggi, quest'ultima si attesti ad un'efficacia pari al 70% dei casi. La presenza di molteplici biomarcatori molecolari, in questo tipo di cancro, ha stimolato la ricerca a migliorare il loro rilevamento, la tassonomia, la diagnosi, la prognosi ed anche la terapia adatta, in più, hanno permesso la suddivisione delle classi di tumore alla mammella in diversi sottotipi. L'esempio più rilevante è ERBB2 (Human Epidermal Growth Factor Receptors 2, o HER2), un marker di prognosi sfavorevole presente e individuabile nel siero, utilizzato per il follow up nelle pazienti. Tramite microarrays sono stati individuati altri quattro sottotipi tumorali, oltre l'overespressione di ERBB2: tumore luminale-A, luminale-B, basal-like e HER2-positivo. Questa classificazione, però, manca di precisione in quanto studi e situazioni successive hanno presentato buone prognosi rivelarsi sfavorevoli e viceversa; per cui, acquisire maggiore precisione ed individuare nuovi marker in grado di migliorare prognosi e fase clinica è di fondamentale importanza. La nectina-4 ha attirato l'attenzione in questo senso, anche se con qualche limitazione.

Il complesso nectina-4/afadina è in grado di interagire in modo indiretto con il complesso E-caderina/ β -catenina. Letessier et al. hanno dimostrato che la perdita di afadina in pazienti con tumore della mammella ha portato ad esiti sfavorevoli (44). Sappiamo che la nectina-4 interagisce con l'afadina, ma ad oggi non sono ancora state individuate correlazioni tra l'espressione di entrambe le proteine ed il carcinoma mammario (2), invece, è dimostrata la correlazione tra E-caderina e β -catenina, confermando inoltre l'assenza di E-caderina in molti carcinomi lobulari (45). Quest'ultima, inoltre, è espressa nel 95% dei carcinomi duttali mentre la nectina-4 nel 61% dei casi, soltanto nel sottotipo di carcinoma duttale in cui sono espressi i marker basali.

Nonostante ciò, la nectina-4 è irrintracciabile nelle cellule epiteliali mammarie normali, ma notevolmente presente nelle linee cellulari tumorali della mammella, ed in più, nectina-4 può separarsi e diffondersi dalla superficie cellulare poiché l'azione della proteasi TACE gli permette di essere liberata nel flusso ematico, rendendola un marker sierico per il follow up di pazienti con tumore metastatico. La presenza di elevata TACE attiva nei tumori alla mammella ed i livelli elevati di nectina-4 nel siero sono confermati da Lafay et al. (41; 46). Tuttavia, l'elevata presenza sierica di nectina-4 è dimostrata anche in tumore mammario non metastatico, per cui non è un marker ideale per la diagnosi precoce.

3.2 Nectina-4 come nuovo biomarker

Il primo aspetto da sottolineare riguarda senza dubbio l'espressione di nectina-4 in diversi pannelli di cellule primarie e cellule tumorali, infatti molti studi dimostrano che la molecola è assente nelle cellule normali, tra cui cellule endoteliali, epiteliali ed ematopoietiche, mentre nelle cellule tumorali presenta un'espressione variabile a seconda del tipo di tumore in questione: assente nelle cellule leucemiche, espressa nel carcinoma prostatico e vescicale, espressa nel cancro ovarico ed espressa nel carcinoma epidermico (47). Nel tessuto mammario non canceroso Lafay et al. e Al-Torky et al. non hanno rilevato presenza significativa della molecola di adesione, mentre hanno riscontrato nectina-4 rispettivamente nel 68% e nel 74% delle linee cellulari mammarie tumorali (47, 48). Questi dati suggeriscono quindi che la nectina-4 è assente in cellule normali ed espressa a vari livelli in linee cellulari tumorali, tra cui soprattutto quello mammario. Come detto in precedenza, è stata ipotizzata una tassonomia basata sull'aspetto molecolare dei tumori al seno, anche se i limiti sono evidenti. Questo aspetto ha suggerito ad alcuni autori di tentare a definire i sottotipi di cancro tramite l'espressione proteica (47,49, 50), tentativi però preliminari e non completi, in quanto si è resa immediatamente necessaria l'individuazione di nuovi marcatori immunostochimici affidabili. A tal fine, Lafay et al. hanno confrontato l'espressione di nectina-4 con l'espressione di marcatori proteici noti in 52 campioni di tumore al seno in fase iniziale. Per individuare il sottotipo basale sono stati analizzati EGFR, P53 e P-caderina, per il luminale ER, PR, GATA3, ERBB2 e il marcatore di

proliferazione Ki67 (51, 52, 53). È stata valutata anche l'espressione di E-caderina, β -catenina e afadina, componenti associate alla funzione fisiologica di nectina-4.

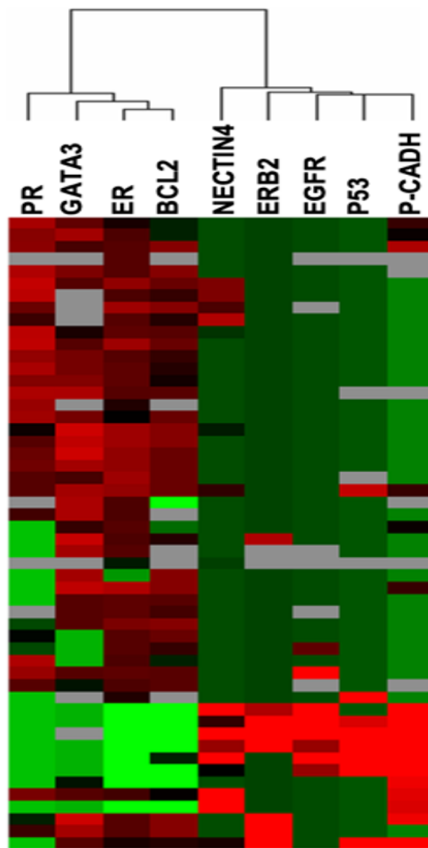


Figura 1: Rappresentazione grafica dei risultati di clustering gerarchico basato sull'espressione di 9 proteine in campioni di carcinoma mammario. Le righe indicano le proteine, mentre le colonne i campioni. La scala dei colori rappresenta l'espressione proteica: il rosso mostra la colorazione positiva, il verde quella negativa (47).

Le proteine sono state analizzate tramite clustering gerarchico e disposti per la visualizzazione in una matrice con codice colore. Nella figura 1 il rosso corrisponde ad una positività mentre il verde ad una negatività, con la scala dei colori che mostra l'intensità data dall'espressione proteica. La lunghezza dei rami che collegano le proteine rappresenta il loro grado di associazione. Si nota che la nectina-4 è stata rilevata in un cluster con EGFR, p53 e P-caderina con positività, mentre era correlata negativamente con l'espressione delle proteine implicate nel cluster luminale, ovvero ER, PR e GATA3. Inoltre, è stata registrata una

correlazione significativa con ERBB2, Ki67, E-caderina e β -catenina. Al-Torky et al., tramite immunohistochimica, hanno confermato la presenza di nectina-4 nel carcinoma duttale e nel carcinoma lobulare, in egual misura nei duttali non invasivi e invasivi, risultati che denotano una correlazione

diretta con il tipo istologico. Analogamente a Lafay et al., non sono stati rilevate correlazioni tra l'espressione di nectina-4 e l'aumento delle dimensioni del cancro, mentre, contrariamente a Lafay et al., lo studio ha evidenziato una associazione tra il grado SBR e il coinvolgimento di linfonodi ascellari. Lo studio mostra, inoltre, una maggiore espressione di nectina-4 in tumori ER e PR negativi, confermando i dati riportati in precedenza, non solo, perché risulta evidente l'overespressione in presenza di metastasi a distanza e recidiva locale e mortalità (48). Anche Athanassiadou et al. hanno riportato una

significativa associazione tra l'aumento di grado e il coinvolgimento dei linfonodi ascellari, mostrando però un anche un aumento delle dimensioni del tumore (54).

Riassumendo, i dati riportati suggeriscono che nectina-4 possa assumere il ruolo di nuovo marcatore proteico per il carcinoma mammario.

3.3 Carcinoma mammario metastatico

Il carcinoma duttale e quello lobulare costituiscono rispettivamente l'80% circa e il 15% circa dei tumori al seno. L'analisi dell'espressione di nectina-4 eseguita su questi sottotipi tumorali ha mostrato la presenza nel 62% dei casi del carcinoma duttale, ed il 6% del carcinoma di tipo lobulare, avvalorando gli studi condotti in precedenza. In più, suggerisce che l'espressione della nectina-4 risulta essere fortemente correlata al tipo istologico, poiché la molecola di adesione è assente in tessuti mammari normali, comprese cellule luminali, mioepiteliali, stromali ed endoteliali, ed altamente presente, invece, nel carcinoma mammario duttale (46). Lafay et al., utilizzando immunistochemica, riuscirono a localizzare nelle giunzioni intercellulari tra le cellule del carcinoma la presenza della nectina-4, risultato confermato anche dall'immunofluorescenza. Questi dati consentirono di considerare la nectina-4 come un nuovo potenziale biomarker per il carcinoma mammario duttale.

Sarà ora analizzata la situazione relativa al carcinoma mammario metastatico. Come sopra accennato, l'endoproteasi TACE/ADAM-17 (55) riesce a tagliare la nectina-4 in prossimità della membrana plasmatica, rilasciando la forma solubile nell'ambiente extracellulare. Prima degli studi sulla nectina-4, i marcatori comunemente utilizzati nella ricerca del carcinoma mammario metastatico erano CEA e CA15.3, non appropriati, però, per individuare metastasi e con molti casi di falsa positività. Lafay et al. dimostrarono e confermarono la presenza della parte solubile della nectina-4 nei soprannatanti di linee cellulari esprimenti nectina-4 (T47D, MCF-7, MDA-MB-175) (56). Confermarono inoltre l'assenza di nectina-4 in 44 dei 45 sieri di soggetti sani esaminati. Infine, gli autori analizzarono 53 campioni di siero di pazienti con carcinoma mammario non metastatico:

cinque campioni avevano livelli di nectina-4 al di sopra della soglia, e tra questi uno risultò positivo anche per CEA e CA15.3 (57). Lo studio fu ulteriormente esteso analizzando altri 182 campioni di siero di pazienti con cancro mammario metastatico. CEA e CA15.3 furono rilevati nel 53% e nel 50% dei campioni, rispettivamente, mentre la loro associazione raggiungeva il 67% dei campioni. Il dato più rilevante fu l'associazione tra CEA, CA15.3 e nectina-4, rilevata nel 74% dei casi. Inoltre, la sensibilità e la specificità di CEA e CA15.3 risultarono sovrapponibili a CEA+nectina-4 e CA15.3+nectina-4 (57). Lo stesso studio si è occupato anche di confrontare due gruppi di pazienti, con carcinoma mammario metastatico sincrono e metacrono, rilevando una percentuale maggiore di nectina-4 sierica nei pazienti del gruppo con carcinoma sincrono. I dati descritti consentivano agli autori di indicare nectina-4 come un nuovo biomarker sierico affidabile per questo tipo di carcinoma, in grado di migliorare il follow-up del paziente.

3.4 Carcinoma mammario invasivo luminale B (HER2 negativo)

I sottotipi luminale A o luminale B (HER2 negativo o HER2 positivo) vengono convenzionalmente differenziati in base alla positività del recettore per gli estrogeni (ER), del recettore del progesterone (PR) e l'assenza/presenza di HER2. Il sottotipo luminale B (HER2 negativo) rimane il carcinoma mammario più eterogeneo in quanto presenta un'ampia gamma di positività ai recettori appena citati, ed un elevato indice di proliferazione (58, 59).

Per analizzare l'espressione di nectina-4 Rajc et al. hanno condotto uno studio retrospettivo su 147 pazienti con carcinoma HER2 negativo (57): la presenza di nectina-4 è stata dimostrata in 112 casi su 147, il 76.19%. Tra questi, 76 si sono rilevati essere del sottotipo istologico duttale (51,7%), mentre 12 del sottotipo istologico lobulare (8,1%), avvalorando i dati forniti da Lafay et al., in cui tra i tipi di tumori testati il 61% presentava un carcinoma mammario duttale e il 6% quello di tipo lobulare. Per completezza di dati, nello studio di Rajc et al., le pazienti avevano un'età mediana di 62 anni, un periodo mediano di follow up di 80,7 mesi, 53 pazienti sono purtroppo decedute nel periodo di studio e 45 hanno presentato recidive (57).

La sovraespressione di nectina-4 era in modo significativo associata alla dimensione del tumore, senza però mostrare alcun tipo di correlazione con altri fattori promotori, come età, metastasi, stadiazione del tumore, sottotipo istologico, espressione di ER e PR e indice di proliferazione Ki-67. In più, tramite l'utilizzo delle curve di Kaplan-Meier si è dimostrata una significativa associazione tra l'espressione di nectina-4 con tutti gli indici di sopravvivenza (DFS, OS, LRFS e DRFS), tale associazione appariva significativa nei tassi di sopravvivenza anche in presenza di linfonodi ascellari negativi (57). In sintesi, nel carcinoma HER2 negativo nectina-4 può rivestire il ruolo di marcatore prognostico indipendente, anche se sono ancora molti gli aspetti biomolecolari da chiarire.

3.5 Tumore mammario triplo negativi (TNBC)

L'assenza di espressione di ER, di PR e della sovraespressione di HER2 caratterizzano il tumore mammario triplo negativo (TNBC), riscontrato nel 15-20% circa dei tumori al seno, e presentano similitudini genomiche con i tumori al seno basali, con un rischio molto elevato di recidiva sia precoce che viscerale rispetto ai non tripli negativi (60). Le caratteristiche molecolari che presentano questi tipi di tumori ne limitano fortemente le opzioni terapeutiche; infatti, l'assenza dei recettori e di HER2 impediscono di avere dei punti focali su cui concentrare delle terapie ormonali o con agenti specifici. Ad oggi, nonostante i grandi sforzi per individuare una terapia mirata efficace, l'unico trattamento possibile resta la chemioterapia, adiuvata dalla somministrazione di agenti a base di cisplatino. Molti studi si sono concentrati sull'uso di anticorpi monoclonali diretti contro proteine di membrana particolarmente espresse nel tessuto tumorale, in quanto tale approccio avrebbe maggior specificità, preservando i tessuti normali. Inoltre, legando agli anticorpi sostanze citotossiche, si otterrebbe una "potenza di fuoco" difficilmente ottenibile con i farmaci tradizionali. L'identificazione di un bersaglio ideale presente sulle cellule tumorali è quindi di estrema rilevanza. Nectina-4 riveste sicuramente le caratteristiche appena citate. Rabet et al., analizzando un pannello di 353 campioni di carcinoma mammario hanno individuato la presenza di nectina-4 nei tumori basali e confermato le similitudini tra TNBC e basal-like, evidenziando due gruppi distinti, ad alta

espressione e a bassa espressione, corrispondenti rispettivamente al 62% ed il 38% dei TNBC (61). Ad ulteriore conferma, la nectina-4 non è stata rilevata nell'epitelio normale della ghiandola mammaria, avvalorando ancora una volta il potenziale ruolo di biomarker tumorale e bersaglio terapeutico. Rabet et al. hanno ampliato lo studio analizzando 5673 carcinomi mammari invasivi, definiti tramite microarray di DNA e cinque sonde PVRL4/nectina-4 specifiche. Nectina-4 era altamente espressa nel 61% dei campioni tripli negativi e nel 62% in campioni basali. L'elevata espressione era associata a prognosi sfavorevole. Il tasso di sopravvivenza in assenza di metastasi, dato disponibile su 1037 pazienti, era del 61% a 5 anni. (61). Zeindler et al., invece, su un campione di 148 casi, hanno rilevato la presenza di nectina-4 in 86 casi (58%), senza differenze significative per quanto riguarda l'età media e il grado del tumore, mentre tra i gruppi ad alta e bassa espressione della molecola di adesione vi era una netta differenza, in quanto il gruppo con alta espressione era associato ad uno stadio tumorale inferiore (62). Non si conosce il reale motivo di questi dati contraddittori, ma forse il motivo risiede nel diverso approccio seguito: Rabet et al. hanno analizzato l'espressione dell'mRNA tramite microarray, mentre Zindler et al. si sono concentrati sull'analisi multivariata dei campioni. L'elevata espressione riscontrata di nectina-4 ha inoltre permesso un nuovo approccio diagnostico per il TNBC. Shao et al. hanno utilizzato un anticorpo anti-nectina-4 come vettore per una radiosonda in grado di identificare specificatamente la molecola di adesione nel TNBC. L'accumulo di radioattività e l'uso di tecniche di imaging, quali la SPECT/CT o la PET ha permesso una miglior diagnosi tumorale ed un'identificazione migliore in funzione di una terapia localizzata (55; 63).

3.6 Progressione tumorale ed efficacia terapeutica

Diversi studi hanno individuato una forte sovraregolazione della forma attiva della proteasi TACE nei tumori mammari (55, 64). Lafay et al. hanno chiarito il meccanismo con il quale TACE riesce a tagliare la nectina-4 e a rilasciare la sua forma solubile di 43,5 kDa, sia nel surnatante in una coltura, sia nel siero (41). Infatti, alcuni inibitori sintetici di TACE

(TAPI-1) e naturali (TIMP-3) o l'interferenza dell'RNA sono in grado di influenzare l'attività di TACE nella scissione della nectina-4 nei tumori al seno. TACE è, quindi, il principale responsabile della scissione della nectina-4 nei tumori al seno, oltre ad essere coinvolta in molte altre condizioni sia fisiologiche che patologiche. E', inoltre, in grado di regolare la scissione di MUC1 e contribuire alla formazione di CA15.3. Come detto anche in precedenza, i livelli sierici di nectina-4 sono spesso associati ai livelli di CEA e CA15.3 nei pazienti con carcinoma mammario metastatico, variando anche in correlazione diretta; ai tre marcatori risulta essere associata anche la presenza di MUC1 (64). CEA e CA15.3 sono utilizzati generalmente per monitorare l'evoluzione patologica nei pazienti, successiva alla prima remissione (65), l'idea di utilizzare anche la nectina-4 ha suscitato interesse nella possibilità di monitorare la progressione del cancro al seno e di anticipare l'identificazione della recidiva. Per questa ragione, Lafay et al. hanno selezionato pazienti con livelli sierici di CEA o CA15.3 aumentati nel corso della patologia: in una paziente la nectina-4 sierica (198 pM) e CA15.3 (151 U/ml) erano alti, in concomitanza della comparsa di metastasi polmonare 32 mesi dopo la diagnosi. La paziente aveva sviluppato metastasi cerebrali 39 mesi dopo la diagnosi. Nel corso della progressione tumorale i livelli di CA15.3 erano aumentati in modo lieve, mentre quelli di nectina-4 circolanti erano aumentati di due volte, complessivamente di 16 volte rispetto al tempo della diagnosi. Tali risultati suggerivano che nectina-4 può essere un biomarker prezioso per la valutazione della progressione della malattia (64). Lafay et al. hanno, inoltre, analizzato la correlazione tra i livelli sierici di nectina-4 e lo stato metastatico nei pazienti, evidenziando che il rilevamento della nectina-4 sierica alla diagnosi era strettamente associata alla presenza di metastasi multiple, con livelli maggiori nel carcinoma mammario metastatico sincrono rispetto al metacrono. CEA e CA15.3 rivestono un ruolo nella rilevazione della progressione tumorale, ma non sono state trovate associazioni con le metastasi. Non è stata rilevata corrispondenza tra i livelli di nectina-4 sierica e la dimensione della massa tumorale, il linfonodo ascellare o lo stato ER/PR.

CEA e CA15.3 e nectina-4 possono anche indicare l'efficacia terapeutica successiva ad un trattamento atto a ridurre la malattia metastatica. A dimostrazione, sono stati seguiti 64

pazienti con carcinoma mammario metastatico metacrono dalla diagnosi al dopo trattamento, con prelievo sanguigno alla diagnosi e a distanza compresa tra uno e nove mesi nel dopo trattamento. Tutti i pazienti hanno mostrato espressione di nectina-4: 11 pazienti mostravano tutti e tre i marcatori sierici, 7 evidenziavano una diminuzione dei marcatori in associazione con la risposta clinica ed un caso di malattia stabile. 2 pazienti hanno mostrato un aumento associato alla progressione patologica, mentre la nectina-4 è stata rilevata in tutti i pazienti positivi per CEA o CA15.3, oppure negativi per entrambi. Nei restanti i livelli di nectina-4 hanno seguito il decorso clinico nel 90% dei casi (41).

In conclusione, la nectina-4 integra la rilevazione di CEA o CA15.3; inoltre, può essere rilevata laddove sono assenti gli altri due marcatori o presente solamente uno di essi, affermandosi come un marcatore complementare per il carcinoma mammario.

3.7 Linfoangiogenesi e metastasi

Come sopra descritto, Siddharth et al. hanno suggerito un meccanismo molecolare tramite cui nectina-4 è in grado di stimolare la via Src-PI3K-AKT-iNOS e di conseguenza l'angiogenesi anche grazie alla generazione di ossido nitrico. La linfoangiogenesi è il processo tramite cui vengono prodotti nuovi vasi linfatici in prossimità della neoformazione, nuovi vasi che sono in grado di fornire una via di trasporto iniziale per la diffusione di cellule metastatiche nei linfonodi regionali (66). Recentemente Sethy et al. hanno evidenziato la capacità della nectina-4 di stimolare l'asse CXCR4/CXCL12-LYVE1 e indurre angiogenesi linfatica in alcuni tumori, tra cui quello mammario. Analizzando circa 80 campioni di carcinoma del dotto invasivo, è stata registrata una correlazione significativa tra diversi fattori di rischio, tra cui occupazione, alcol e fumo di tabacco, ed espressione di nectina-4. CXCR4, esaminato nel tessuto normale adiacente e nel linfonodo ascellare, risultava altamente espresso in 17 su 18 campioni di carcinoma invasivo del dotto di III grado, a differenza del carcinoma di grado inferiore in cui era presente in pochi campioni, mentre in 26 campioni su 27 positivi alle metastasi linfonodali l'espressione di CXCR4 era anche in questo caso elevata, suggerendo quindi una forte correlazione con il

coinvolgimento linfonodale. I risultati evidenziavano, inoltre, anche una significativa associazione tra espressione di nectina-4 e CXCR4 nel carcinoma del dotto invasivo (67).

Il recettore endoteliale del vaso linfatico-1 (LYVE-1) è uno dei principali marcatori linfatici, ed insieme a VEGF-C rivestono un ruolo attivo nelle linfoangiogenesi, infatti la soppressione di VEGF-C nelle cellule endoteliali riesce ad inibire il processo (68), inoltre, la grande densità dei vasi linfatici LYVE-1 è significativamente associata a metastasi e prognosi infausta (69). Tramite immunohistochimica, LYVE-1 era aumentata nel linfonodo, mentre VEGF-A era relativamente bassa, con una densità maggiore sia a livello linfatico che sanguigno, rispettivamente tra il 10 e il 20%, e tra il 15 e l'8%. Dati strettamente correlati al grado tumorale. Entrambe le densità sono inoltre risultate associate all'espressione di nectina-4, determinando un ruolo centrale della molecola di adesione nell'induzione sia della linfoangiogenesi che dell'angiogenesi, in unione con CXCR4 (67). Inoltre, è stato dimostrato che l'eliminazione di nectina-4 e VEGF-C ha inibito la crescita e la migrazione linfoangiogenica, avvalorando ancora di più il ruolo centrale della molecola di adesione. Lo stesso risultato è apparso evidente anche nei confronti delle chemochine CXCR4 e CXCL12, in quanto Sethy et al., riducendo nectina-4 in coltura di cellule primarie, hanno mostrato una riduzione drastica delle chemochine, dimostrando che nectina-4 induce l'attivazione di quest'ultime, promovendo le metastasi linfatiche (67). Anche le metalloproteasi MMP-2 e MMP-9, coinvolte nel processo di eliminazione dell'ectodominio della nectina-4, nell'angiogenesi e nell'invasione linfatica, si sono mostrate elevate rispettivamente di circa 6,5 volte e circa 3 volte, in più, esaurendo nectina-4 e VEGF-C dal surnatante, il loro livello è diminuito notevolmente. Per cui, l'esaurimento di nectina-4 e VEGF-C ha un effetto limitante verso le metalloproteasi (67). In sintesi, gli studi indicano che i fattori di rischio influenzano l'espressione di nectina-4, ed i componenti delle sue vie di segnalazione (PI3K-AKT, GSK-3 β , Gli-1), l'associazione presente tra nectina-4 e l'asse CXCR4/CXCL12-LYVE-1 determina un ruolo chiave nella angiogenesi e nella linfoangiogenesi. Infine, la nectina-4 può ancora indurre metastasi linfatiche modulando l'asse delle chemochine.

Capitolo 4

4.1 Viroterapia oncolitica e Nectina-4

Quanto espresso fin qui ci mostra i ruoli che la nectina-4 riveste e le possibilità prognostiche che è in grado di offrire. L'aspetto però che la rende uno dei bersagli terapeutici più interessanti e da approfondire, sta nell'importanza che riveste nella viroterapia oncolitica.

La viroterapia oncolitica è una nuova frontiera della lotta al cancro, e si basa sulla modifica genetica di alcuni virus, definiti oncolitici, in modo da renderli capaci di penetrare le cellule tumorali ed eliminarle. Agisce su tre differenti livelli: innanzitutto l'ingresso del virus nelle cellule è diretto per le cellule tumorali, in quanto le modifiche rendono il virus altamente specifico, si può inoltre monitorare e tracciare la replicazione virale che il virus inizia una volta penetrato nelle cellule, ed infine riesce a stimolare ed incrementare la risposta del sistema immunitario, o delle terapie che sono in atto in quel momento, verso le cellule tumorali.

Il primo aspetto da considerare per la riuscita della viroterapia oncolitica risiede nella scelta, in base alle caratteristiche virali e cellulari, del virus adatto. Ad oggi sono di tre tipologie i virus disponibili per questa terapia, mentre sono molti quelli in fase di studio con promettenti aspettative.

I tre virus attualmente disponibili sono:

- Rignvir o Riga Virus, un picornavirus adatto ed utilizzato per il trattamento dei melanomi;
- Oncorine (h101), virus ricavato da opere di ingegnerizzazione di un adenovirus, che permettono di far ri-esprimere p53 nelle cellule tumorali ed attivare processi di apoptosi. Usato in presenza di cancro alla testa o del collo.
- T-VEC, ottenuto da modifiche effettuate sul virus herpes simplex 1 umano, ed usato per melanomi metastatici in associazione con chemio o radioterapie

Come detto, sono molti i virus in fase di sperimentazione clinica, ed anche con risultati incoraggianti nella remissione tumorale, in particolare MV ha mostrato e continua a

mostrare ottime possibilità, grazie anche a nectina-4 che funge da recettore di membrana per questo virus.

4.2 Virus del Morbillo (MV): generalità

MV, appartenente al genere morbillivirus, della famiglia dei paramyxovirus, è trasmesso principalmente tramite le vie respiratorie o per contatto diretto con secrezioni organiche; l'infezione ha inizio nel tratto respiratorio per poi diffondersi a livello sistemico per tutto l'organismo, interessando prevalentemente il tessuto linfoide, il fegato, i polmoni, la congiuntiva e la pelle (70; 71).

Dotato di envelope, con capsida a simmetria elicoidale, presenta un genoma non segmentato in grado di impedire il riassortimento genico, costituito da un unico filamento di RNA con polarità negativa, una regione leader composta da 52 amminoacidi, non codificante ma con funzione da promotore trascrizionale, è presente nella parte iniziale del genoma, mentre nella parte finale una regione trailer, non codificante, funge da terminatore trascrizionale. Il genoma, inoltre, è composto da 15894 nucleotidi, suddivisi in 6 geni, separati tra loro da sequenze intergeniche trinucleari, codificanti per 8 proteine virali.

La regione 3'-leader è seguita dai geni N (nucleocapsid protein), P (Phosphoprotein, facente parte del complesso RNA polimerasi) codificante per i fattori di virulenza C e V, M (matrix protein), F (membrane fusion protein), H (hemagglutinin, la proteina legante il recettore di membrana presente sulle cellule), ed infine la parte terminale composta dalla regione 5'-trailer in cui si riscontra anche il gene L (large protein) che riveste un ruolo di codifica per il complesso RNA polimerasi.

Sulla proteina N si riscontrano una regione N-terminale detta N_{CORE}, costituita da 400 amminoacidi circa, ed una regione C-terminale, chiamata N_{TAIL}, che gli consente di interagire sia con varie proteine virali, tra le quali il dominio C-terminale della proteina P e la proteina M sia con proteine ospiti come, ad esempio, l'Hsp72 (heat shock protein) o IRF3 (fattore di regolazione dell'interferone) (72).

La proteina N è responsabile della costruzione del nucleocapside, mentre le proteine V e C, codificate dal gene P, si comportano come agenti di virulenza, ovvero interferiscono con il pathway di segnalazione dell'interferone per sopprimere la risposta immunitaria ospite (73).

La proteina P, stabilendo connessioni e comunicazioni con le proteine N ed L, riveste un ruolo regolatore della corretta replicazione e trascrizione virale, ed agisce anche come cofattore e parte integrante del complesso della ribonucleoproteina RNP (74).

Il gene M codifica l'omonima proteina idrofobica che compone la matrice cellulare, riempiendo l'envelope lipidico e il core del nucleocapside, inoltre, interagisce anch'essa con il complesso RNP, esattamente come le code citoplasmatiche delle proteine H ed F, aspetto essenziale per la fusione cellulare attuata del virus. Infine, prende parte al ciclo replicativo virale organizzandone la struttura (75).

Sulla membrana virale si trovano due glicoproteine, H ed F, la proteina H riconosce e lega i specifici recettori di membrana della cellula ospite, ed avvia la fusione tra la membrana virale e quella cellulare, unione caratterizzata da vari riarrangiamenti strutturali mediati dalla proteina F (76; 77). I recettori che vengono riconosciuti dalla proteina H sono il CD46, il CD150/SLAM e PVRL4/Nectina-4.

Il gene L codifica invece per una RNA polimerasi RNA-dipendente, enzima essenziale per la replicazione virale, poiché guida la duplicazione del genoma virale, la polimerizzazione, il capping, la metilazione e la poliadenilazione (78). La replicazione virale avviene nel citoplasma, dove la polimerasi virale riconosce il complesso RNP quale punto di inizio della trascrizione virale (79).

4.3 CD46, SLAM/CD150 e PVRL4/Nectina-4

MV è in grado di interagire e legare tre diversi recettori presenti sulla membrana delle cellule ospiti:

1. CD46
2. SLAM/CD150
3. PVRL4/Nectina-4

CD46 è una proteina di membrana di tipo I, espressa sulla maggior parte dei tipi cellulari umani, ad eccezione dei globuli rossi, che riveste un ruolo cruciale nel regolare il sistema del complemento; nello specifico, CD46 opera come cofattore del fattore sierico I, capace di mediare il rilascio dei componenti C3b e C4b del complemento, in grado di proteggere la cellula ospite da infezioni patogene. Presenta un dominio extracellulare, un β -barile delimitato da loop flessibili, costituito da quattro sequenze consenso ripetute di 60 amminoacidi, SCR1-4. Il recettore CD46 possiede un dominio STP (Ser/Thr/Pro), un dominio transmembrana ad elica ed un dominio citoplasmatico con ruolo attivo nella trasduzione del segnale (80).

SLAM o CD150, codificato dal gene SLAMF1, posto sul cromosoma 1q22, è una glicoproteina presente sulla superficie di specifiche cellule immunitarie, le cellule dendritiche, le natural killer, i linfociti T e i linfociti B. I due domini extracellulari presenti sulla struttura di questo recettore corrispondono alle regioni variabile V e costante C della superfamiglia delle immunoglobuline, ed inoltre presentano un endodominio contenente una regione di legame SH2.

CD46 e CD150 sono i primi recettori individuati e responsabili del legame con la proteina H di MV. CD46 fu individuato su ceppi di MV presenti in laboratorio, durante la realizzazione del vaccino Edmonston (81), ma successivamente studiando una linea di linfociti B, immortalizzati tramite l'utilizzo del virus Eipstein-Barr, che consente una crescita virale senza adattamento, vennero isolati ceppi di MV wild type, nonostante i linfociti B non posseggano CD46 (82). Venne quindi ipotizzata la presenza di altri recettori in grado di interagire con MV, per cui l'attenzione fu rivolta alla molecola di segnalazione SLAM espressa su cellule B attivate, cellule T, monociti, etc. Ottenendo le strutture di CD46 e SLAM, Hashiguchi et al. sono stati in grado di individuare il legame essenziale per l'ingresso virale nella cellula (83). Anche Lectina DC-SIGN e Langerina si sono dimostrate

capaci di legare la proteina H di MV, ma contrariamente alle precedenti non attivano il cambiamento conformazionale mediato dalla proteina F, per cui non è possibile considerarli recettori (84). Inoltre, MV, preferisce il legame con SLAM rispetto a CD46. Negli ultimi 10-15 anni però, sempre in più occasioni, il virus ha dimostrato di essere in grado di infettare cellule in modo indipendente dalla presenza dei due recettori. Analizzando la diffusione di MV wild type, esprime la proteina fluorescente GFP, Muhlebach et al. hanno dimostrato che il virus è in grado di infettare solo cellule colonnari unite dal complesso di adesione apicale (85), e da questa condizione si ipotizzò che il virus si legasse ad una proteina giunzionale intercellulare per penetrare le cellule delle vie aeree. Utilizzando linee cellulari permissive all'infezione, H358 e H441, e linee cellulari non permissive, H23 e H522, sono state identificate, grazie ad analisi di microarray, 175 proteine transmembrana espresse maggiormente nelle cellule permissive: tra queste, le più espresse non hanno conferito suscettibilità all'infezione da MV, nonostante fossero presenti quattro claudine delle giunzioni strette ed E-caderina e nectina-3 delle giunzioni aderenti. Cambiando approccio e metodo, furono rilevati ben 222 mRNA associati a proteine di membrana, e, tra essi, selezionati 16 geni maggiormente espressi per poterli trasfettare, tramite plasmidi, in cellule non permissive che sarebbero poi state infettate con il virus avente GFP come reporter (85).

I maggiori riscontri arrivarono dal plasmide trasfettato che codificava per la molecola di adesione nectina-4, i livelli di espressione della proteina e le analisi FACS (fluorescence-activated cell sorting) con anticorpi specifici, hanno confermato la forte espressione della proteina nelle linee cellulari permissive all'infezione. Le linee non permissive invece non mostravano espressione di nectina-4.

Trattando le cellule con siRNA diretti per la nectina-4, si è notata la forte riduzione dell'infezione, e in un caso la completa cancellazione: questi dati confermarono che nectina-4 è funzionalmente corrispondente al recettore epiteliale proposto (85). In più, è stato dimostrato che le altre nectine umane testate non hanno la capacità di funzione da recettore per MV, compreso il recettore del poliovirus PVR o CD155.

4.4 Nectina-4: recettore e ligando

Come detto in precedenza, le nectine condividono tutte la medesima struttura, composta da tre domini extracellulare immunoglobulino-simile, dominio V e due domini C2, una singola elica transmembrana e un dominio intracellulare: per poter identificare il dominio o i domini direttamente responsabili del legame con la proteina H di MV, sono state utilizzate due forme solubili ricombinanti di nectina-4, VCC-Fc ed una più corta V-Fc. La prima con i tre domini presenti VCC, mentre la seconda con il solo dominio V. Entrambe le forme hanno mostrato la stessa efficacia (86). Per poter mappare entrambe le forme solubili si è ricorso ad anticorpi specifici, N4.40 capace di riconoscere uno dei due domini C, ed N4.61 riconosce il dominio V. N4.61 ha inibito quasi completamente l'ingresso virale, mentre N4.40, somministrato con una concentrazione cento volte maggiore, non ha inibito l'ingresso del virus. In conclusione, il dominio solubile V della nectina-4 è il principale sito di legame con la proteina H di MV, e gli anticorpi anti-V riescono a bloccare l'infezione (86). Separando, però, le forme solubili dei recettori tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide e trasferendoli sulle membrane, si osserva che il legame della proteina H alla nectina-4 parzialmente denaturata è forte come l'interazione tra H e SLAMF1 parzialmente denaturato. In più, il legame della proteina H a VCC-Fc è sensibilmente più forte e stabile rispetto a V-Fc (86). Delpeut et al., inoltre, hanno dapprima confermato che le interazioni tra il dominio V di MV e nectina-4 risultano essere più forti rispetto a quelle tra il virus e SLAM, e successivamente hanno constatato, tramite indagine cristallografica, che esistono tre interfacce di legame tra MV e nectina-4 (64).

I parametri cinetici del legame tra nectina-4 nativa e H nativa vanno nella stessa direzione: la costante di dissociazione (K_d) di SLAMF1 era di 93,5 nM, mentre quella di H e nectina-4 di 20 nM, quindi ben cinque volte più veloce rispetto a SLAMF1. Considerando che la K_d di CD46 e H è di circa 79 nM, si può facilmente esprimere che la nectina-4 è la proteina legata ad H con maggiore affinità. Nelle cellule che comunque esprimevano sia nectina-4 che SLAMF1, si è evidenziata un'infezione molto più efficiente rispetto a cellule

esprimenti sono SLAMF1, suggerendo che l'accessibilità del recettore riesce ad influenzare maggiormente la diffusione virale rispetto ad altri parametri (86).

La presenza di nectina-4 appare quindi un fattore chiave per la diffusione virale, e per valutarne concretamente la rilevanza, Muhlebach et al. si sono serviti di cellule epiteliali primarie delle vie aeree coltivate: queste cellule sono in grado di formare complessi di adesione apicale ricche di giunzioni strette e aderenti, e costituendo una morfologia formata da un epitelio colonnare pluristratificato e ciliato, molto simile alle vie aeree umane. In questa struttura è stata innanzitutto confermata l'espressione dell'mRNA di nectina-4, ma per poter eliminarne la presenza sono stati introdotti siRNA specifici in modo da eliminare del 90% l'espressione dell'mRNA. Una volta infettate le colture, sono risultati presenti quattro centri infettivi nelle cellule trattate solamente con siRNA di controllo negativo, mentre nelle cellule trattate con siRNA anti-nectina-4 non stati rilevati centri infettivi (86).

Un secondo test è stato condotto con l'utilizzo di un MV che presenta due mutazioni amminoacidiche nella proteina H, il MV-nectin-4blind, che gli impediscono l'ingresso nelle cellule tramite il recettore nectina-4. I centri infettivi erano limitati ad una-due cellule su cento. Quindi l'infezione da MV dipende dalla presenza di nectina-4 per entrare nelle vie aeree umane e per un'efficiente diffusione laterale.

4.5 Proprietà oncolitiche del virus del morbillo

MV ha mostrato più volte di avere la capacità di replicarsi con grande efficienza nelle cellule cancerose, e non sono rare le osservazioni di regressioni spontanee di alcune forme di linfoma in seguito ad infezione naturale da parte del virus (87). L'elevata espressione dei recettori SLAM, CD46 e Nectina-4 presente in diversi tipi di cellule tumorali rappresentano un bersaglio accurato per la viroterapia oncolitica.

Queste capacità oncolitiche sono attribuite alla sovraespressione di SLAMF1 nei linfociti trasformati (88), capacità che si riflette anche su altri tipi di cancro, infatti, l'utilizzo del virus come viroterapia oncolitica è attualmente presente in studi clinici basati sul carcinoma ovarico (89).

In letteratura è dimostrato che infezioni naturali di morbillo sono in grado di far regredire casi di linfoma di Burkitt e linfoma di Hodgkin, e poiché i due tipi di tumore esprimono alto SLAM e nectina-4 è possibile presumere che il virus abbia infettato i tumori ed innescato una reazione immunitaria diretta contro i recettori, determinando la distruzione delle cellule tumorali (90-91). In più, in MV è possibile inserire, tramite modifiche ingegnerizzate, geni terapeutici, come ad esempio il simporto di ioduro di sodio, in grado di concentrare lo iodio radioattivo e adiuvarne la radioterapia (92). MV offre buone possibilità nel campo della viroterapia oncolitica in quanto è manipolabile ed inoltre, il legame con la nectina-4 può diventare il bersaglio ideale per questo tipo di terapia. Delpout et al. hanno ampliato il campo di azione del connubio MV-nectina-4, dimostrando che questa unione può rivelarsi determinante per la viroterapia riguardante anche adenocarcinomi PVRL4-positivi derivanti da tumori del polmone, della mammella e del colon (64). Chiaramente andranno approfonditi i problemi relativi alla sicurezza, all'infezione di fondo e all'effetto degli anticorpi. Una delle problematiche a destare maggiori preoccupazioni riguardo la viroterapia oncolitica è la capacità di continuare la regressione tumorale, una volta che il virus è stato eliminato dall'organismo ospite. Per ovviare a questa situazione si prendono in considerazione innanzitutto l'uso di modifiche genetiche del virus in grado di migliorare la viroterapia, l'uso adiuvante di terapie cliniche quali radioterapia e chemioterapia ed anche la stimolazione immunitaria antitumorale (64).

4.6 Modifiche virali

I virus possono essere trattati e modificati in modo da renderli adatti agli obiettivi prefissati, e sono vari gli aspetti sui quali intervenire, in modo da avere una viroterapia il più efficace possibile.

Innanzitutto, si può anche semplicemente inoculare MV attenuato, analogamente a quello presente nel vaccino Edmonston, ma questa pratica non è tra le più valide in quanto potrebbe determinare una stimolazione anticorpale lieve.

Si può quindi intervenire per alterare il tropismo di MV inserendo geni tumore-specifici nelle regioni C-terminali dell'emagglutinina, capaci di indirizzare l'ingresso nelle cellule; i ligandi maggiormente utilizzati nel linfoma non Hodgkin o nel tumore ovarico sono il CD20 o il CD38 (93).

La viroterapia consente anche di tracciare il tropismo virale all'interno della cellula, inserendo nel virus, geni reporter specifici, in questo caso i geni maggiormente utilizzati sono il CEA o il NIS, facilmente individuabili nella cellula, il gene CEA è una glicoproteina coinvolta nei complessi di adesione cellulare, sintetizzata nello sviluppo fetale ma assente nella vita adulta, come la nectina-4.

Il canale di simporto sodio-iodio, NIS, invece, ha il compito di assicurare la disponibilità dello iodio per la sintesi degli ormoni tiroidei, per cui trasporta nella cellula tiroidea due ioni sodio ed una molecola di iodio.

Inserendo questi due reporter in MV, si hanno due metodi di rintracciabilità, in quanto il CEA viene rilasciato nel circolo ematico suggerendo quindi la presenza di un cancro, mentre il NIS trasportando lo iodio, può essere tracciato tramite inoculazione di isotopi di iodio radioattivo, e rende visibili le masse o le cellule tumorali.

La presenza nel circolo sanguigno, però, permette un monitoraggio in tempo reale dell'espressione genica virale, ma non da informazioni sulla localizzazione dell'infezione e della sua diffusione. Con il NIS, invece, questi aspetti risultano più semplici, grazie all'utilizzo di isotopi radioattivi come ^{123}I , ^{124}I e ^{125}I .

Altro aspetto da considerare per la viroterapia è la possibilità di aumentare l'efficacia di altre terapie antitumorali in atto in un individuo:

- Si parla di radioviroterapia proprio utilizzando le proprietà di NIS e quindi sfruttare un isotopo come ^{123}I per l'entrata di radiazioni β grazie al canale di simporto, coniugandola con l'azione della radioterapia (94; 95; 96)
- Nella chemioviroterapia, MV viene reso in grado di esprimere delle convertasi che riescono a tramutare profarmaci chemioterapici in metaboliti tossici, ed indurre la distruzione cellulare
- L'immunoviroterapia, invece, mira ad indurre la riattivazione della risposta immunitaria, potenziandola grazie all'inserimento di geni immunomodulatori.

Nella chemioviroterapia va riportato il caso della supercitosina deaminasi (SCD) in grado di tramutare il profarmaco 5-fluorocitosina(5-FC) in 5-fluorouracile, per poi convertirla in 5-fluorouridina-monofosfato. L'inoculazione di un virus modificato con l'inserimento di SCD e 5-FC ha il potenziale, non solo di limitare la progressione tumorale ma anche di amplificare notevolmente l'efficacia della terapia antitumorale, soprattutto in caso di epatocarcinoma e tumore ovarico.

Nell'immunoviroterapia sono molti i geni potenzialmente adatti per riuscire a riattivare l'azione immunitaria ed il suo potenziamento. Tra i primi presi in considerazione va citato il gene nitrato reductasi periplasmatica batterica o NAP, in grado di stimolare la risposta citochinica nel sito tumorale e segnalare la presenza del tumore al sistema immunitario. È anche possibile agire su altri check point immunologici fondamentali, che nelle cellule tumorali vengono elusi; la crescita e la proliferazione dei linfociti T è finemente regolata da segnali co-stimolatori e co-inibitori che mantengono un equilibrio tra attivazione e soppressione linfocitaria. Per cui, inoculando virus modificati e aventi anticorpi anti- $\alpha\text{CTLA-4}$ o anti- $\alpha\text{PD-L1}$, recettori che inibiscono l'attivazione dei linfociti T, verrà stimolata la loro attivazione e la loro infiltrazione nelle cellule tumorali, con un potenziale di riduzione della progressione tumorale notevole.

4.7 Chemioviroterapia

Tra i tipi di cancro presi più in esame per la chemioviroterapia, abbiamo l'adenocarcinoma del dotto pancreatico (PDAC), frequentemente capace di sviluppare metastasi, anche dopo resezione. Le possibilità terapeutiche per questa tipologia di cancro erano, in passato, spesso limitate alla chemioterapia palliativa, ma con il passare del tempo sono state introdotte le pirimidine fluorurate fino all'approvazione della gemcitabina (2,2-difluorodeossicitidina). Si è arrivati all'uso associato di chemioterapia e 5-fluorouracile (2,4-diosso-5fluoropirimidina [5-FU]).

Ad oggi, si utilizza la chemioterapia adiuvante a base di fluoropirimidina, con l'uso di Folfirinox o gemcitabina in associazione con la capecitabina (5-fluoro-N-[(pentilossi)carbonil]-deossicitidina), un profarmaco di 5-FU (97). Nonostante ciò, i dati indicano che nella maggior parte dei casi PDAC torna a manifestarsi acquisendo refrattarietà al trattamento.

La viroterapia si inserisce in questo quadro ed offre buone prospettive per il superamento della resistenza alle terapie appena descritte.

Singh et al. hanno modificato MV inserendo il complesso CD-UPRT ed hanno indagato sulla sua efficienza. Il complesso CD-UPRT è composto da una proteina di fusione di *Escherichia coli*, citosina deaminasi e uracile fosforibosil transferasi, in grado di convertire 5-FC inizialmente in 5-FU per poi successivamente nel suo metabolita attivo, la 5-fluorouridina monofosfato (5-FUMP) (97).

Il primo dato ottenuto riguarda il ruolo di CD46, SLAM e nectina-4 poiché sono in grado di mediare l'ingresso di MV, e la loro sovraespressione nei tumori epiteliali, annesso il PDAC oggetto dello studio, gioca un ruolo cruciale nell'infezione.

Lo studio pone la presenza di qualche limite legato soprattutto al CD46 e di nectina-4, in quanto la loro presenza su cellule non tumorali, potrebbe determinare una perdita di selettività dell'ingresso virale, ma l'uso di ulteriori agenti diretti contro la nectina-4, valutati in altri studi clinici, rafforzano l'uso della molecola come bersaglio molecolare (97).

Le linee cellulari prese in esame hanno evidenziato la presenza di sensibilità variabile all'infezione da MV, confermando, inoltre, la grande eterogeneità dei tumori PDAC, aspetto, questo, che ha innanzitutto influenzato i risultati della chemioviroterapia, poiché sia l'uso di MV contenente il complesso CD-UPRT, e sia l'uso del virus associato al 5-FC, ha mostrato avere più efficacia su cellule del sottotipo basale. Ma ha anche suggerito che la variabilità molecolare dei tumori, dei futuri pazienti di chemioviroterapia, pone sfide considerevoli. L'individuazione più accurata dei sottotipi di PDAC, e di altri tipi di cancro, può essere un primo approccio per migliorare l'approccio terapeutico (98,99,100).

L'utilizzo di 5-FC ha mostrato efficacia su tutte le linee cellulari testate, anche in cellule tumorali non infettate, suggerendo l'assenza di interazioni tra i diversi componenti della terapia, e avvalorando precedenti studi in cui aveva dimostrato efficacia, in associazione anche con il virus, in diversi tipi di cancro (101; 102).

In vivo le applicazioni sembrano rispondere in modo più accurato (97).

Utilizzando il modello murino, Singh et al. hanno dimostrato l'espressione intratumorale del profarmaco convertasi, dopo una singola somministrazione del virus con il complesso CD-UPRT, con un'efficace replicazione virale e relativa espressione del transgene (97).

Nell'applicare la terapia alla fase clinica, potrebbero però presentarsi dei potenziali limiti, in quanto il microambiente stromale presente nel PDAC è costituito da una matrice extracellulare molto densa in grado di arginare la distribuzione dei farmaci (103-104).

Trasporre questo aspetto in diversi tipi di cancro è sicuramente la strada da percorrere per approfondire la variabilità molecolare nei microambienti tumorali.

Nonostante questo, altri aspetti ci indicano un percorso ottimistico: le citochine tra cellule stromali e maligne rafforzano la replicazione di alcuni virus oncolitici piuttosto che limitarli (105), in più, le cellule stromali e le cellule neoplastiche offrono un targeting migliore al virus (106), ed infine, la chemioviroterapia può determinare un rimodellamento della matrice extracellulare nel PDAC con effetti benefici sulla terapia.

Questi sono aspetti non confermati, ma che sicuramente richiedono una certa attenzione.

Nessuno studio ha mostrato, ad oggi, la completa remissione di PDAC, ma gli studi riportati suggeriscono che la strada intrapresa su questo tipo di cancro e su altri, pone le basi per prospettive migliori.

4.8 Immunoviroterapia

MV ha la capacità attenuare gli effetti tumorali non solamente tramite l'infezione ed il suo ciclo litico, ma anche determinando le risposte immunitarie antitumorali. L'oncolisi provocata dal virus è determinata dagli effetti citopatici, quali, ad esempio, la formazione di sincizi multinucleati che vanno incontro a perdita di integrità della membrana e successiva morte cellulare (107). La replicazione virale e l'oncolisi sono state riscontrate in numerosi xenotrapianti di cancro umano, come le neoplasie ematologiche contro il linfoma (108;109), il mieloma (110) cancro ovarico (111), glioblastoma (112), carcinoma epatocellulare (113), cancro alla prostata (114), cancro al seno (115), cancro cervicale (116) e cancro gastrico (117).

Il reale meccanismo di morte indotta dall'attività oncolitica da MV non è ancora del tutto chiarita, in quanto gli studi hanno evidenziato prove contrastanti; infatti, l'aumento di marcatori apoptotici è stato individuato in molti studi: nelle cellule del cancro cervicale umano sono stati riscontrati segni evidenti di apoptosi, dipendente dalla caspasi-3, il conseguente blocco di quest'ultima ha ridotto la morte cellulare e limitato la replicazione virale. In vivo, i topi xenotrapiantati, con caspasi-3 attiva, hanno mostrato effetti migliori con la somministrazione della terapia oncolitica con MV, capace di limitare la crescita tumorale, la replicazione e la sopravvivenza (118).

L'oncolisi mediata da MV innesca attivazione dell'immunità innata. I recettori RIG-I, MDA-5 e TLR7 rilevano MV determinando l'attivazione di uno stato pro-infiammatorio e antivirale (119), infatti Rajaraman et al. hanno rilevato che le cellule di glioblastoma umano infettate inducono un aumento trascrizionale del sensore DDX58, insieme a IFN- β , STAT1 ed altri geni stimolati dall'interferone aventi funzioni antivirali, tra cui ISG15, MX1, MX2, OAS1 e OAS2 (120).

La morte delle cellule tumorali determina il rilascio di molecole associate al danno (Damage-associated molecular patterns, DAMPs) o a patogeni (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs), in grado di attivare la risposta immunitaria innata. In presenza di carcinoma epatocellulare umano, l'infezione da morbillo determina il rilascio della calreticulina, insieme all'ATP e, soprattutto, di HMGB1 (121), un potente segnale che agisce sulle cellule dendritiche tramite Toll-like receptor 4 (TLR4) (122), mentre il mesotelioma pleurico produce alti livelli di HSP70 (122).

L'INF- α , inoltre, stimola la sovraregolazione di TRAIL. Achard et al. hanno dimostrato che questo aspetto richiede la presenza di un virus o delle cellule tumorali infettate da virus (123).

I recettori TLR7, RIG-I e MDA-5, attivati da MV, innescano la maturazione delle cellule dendritiche, che attuano la presentazione dell'antigene (122; 124). Questi ultimi aspetti dimostrano che l'immunoviroterapia riesce a fornire molecole stimolatorie e citochine pro-infiammatorie, necessarie per l'attivazione completa delle cellule T (125; 126).

I limiti degli studi appena citati risiedono nel fatto che sono attuati in vitro, per cui per analizzare il tutto in vivo sono stati sviluppati modelli murini in grado di supportare l'infezione da morbillo. Nei topi, Grossardt et al. hanno testimoniato per la prima volta la presenza e quindi l'infiltrazione di cellule T nel tumore, in questo caso carcinoma coloretale, sette giorni dopo l'inoculazione del virus (127). Successivamente, uno studio su topi immunocompetenti con carcinoma polmonare ha mostrato la presenza di linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ dopo il trattamento (128), ed in più, trattando con un MV portatore di transgeni immunomodulatori, si può dimostrare l'infiltrazione di cellule T effettrici (129; 130; 131; 132).

I meccanismi che determinano l'infiltrazione di cellule T dopo l'immunoviroterapia si basano su fattori di migrazione dei linfociti, quali CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10 (119). Rivestono un ruolo centrale anche i neutrofili, che attivati dall'infezione virale secernono IL-8, TNF- α , TRAIL (133; 134). Stimolano, inoltre, l'immunità antitumorale tramite MCP-1, in grado di attirare monociti e cellule T (133), e hanno un ruolo nell'immunità antivirale stimolando l'espressione di IFN- α .

I macrofagi associati ai tumori presentano prevalentemente fenotipo M2, ma l'interazione con un virus è in grado di indurre la loro ripolarizzazione. A riguardo, Tan et al. hanno riportato la ripolarizzazione M1, grazie alla sovraregolazione di molecole stimolatorie come CD80, la produzione di citochine, quali IL-1 β , TNF- α , IL-6, e la secrezione di segnali chemiotattici per le cellule T, fra cui CXCL9 e CXCL10 (135).

MV è in grado anche di attivare la capacità citotossica delle cellule natural killer, stimolando l'espressione di MICA/B, ULBP1, 2 e 3, CD112 o CD155 (136).

4.9 Studi clinici e dati

Nel 2005, pazienti con linfoma cutaneo a cellule T (CTCL) sono stati trattati il ceppo vaccinale Edmonston-Zagreb (137), trattamento adiuvato da inoculazione di INF- α in modo da prevenire una replicazione virale incontrollata. Si sono ottenuti, quindi, campioni di siero e di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), e di biopsie tumorali prima e dopo il trattamento.

Le biopsie hanno mostrato una diminuzione dell'espressione del CD4 intratumorali ed aumento quantitativo di mRNA di CD8 e IFN- γ . A livello sierico si sono rilevati aumenti di IL-2 e di IL-12 dopo il trattamento, con aumento dei livelli anticorpali in tutti i pazienti (138).

Lo studio ha mostrato la regressione clinica nei siti dell'iniezione virale e regressione distante in alcuni pazienti, suggerendo, quindi, un efficace contributo antitumorale della viroterapia (137).

Due studi eseguiti su tumori ovarici, contrariamente al CTCL, non hanno evidenziato nessun potenziamento anticorpale anti-morbillo, né alcun cambiamento significativo di cellule CD4 e CD8, dei livelli anticorpali o dei fattori del complemento (139; 140).

La sopravvivenza globale si è dimostrata prolungata, limitando la progressione tumorale. I risultati hanno indotto gli autori a suggerire che fosse intervenuto prevalentemente un meccanismo immuno-mediato piuttosto che un effetto dell'oncolisi virus-mediata. Infatti,

l'aumento di IFN- γ e IL-4, e l'assenza di risposte anticorpali contro FR α , IGFBP2, CEA o HER-2, epitopi con cui sono state stimulate le PBMC, vanno in quella direzione.

Dispenzieri et al. hanno completato uno studio sul mieloma multiplo in cui i pazienti hanno ricevuto MV modificato con il gene NIS con o senza ciclofosfamide: dei 32 pazienti reclutati, 4 hanno dato risposte parziali ed uno ha mostrato remissione completa (141, 142). Uno studio successivo sui medesimi pazienti ha testato nelle PBMC la reattività verso una serie di antigeni del cancro ai testicoli, frequentemente espressi dalle cellule del mieloma (138).

Il maggior numero di pazienti mostrava risposte da parte delle cellule T preesistenti contro questi antigeni, risultato ancora presente dopo sei settimane dal trattamento. Un paziente ha avuto una risposta eccellente alla viroterapia, andando incontro a remissione completa: studiandolo in modo più approfondito, mostrava innanzitutto risposte sia anti-morbillo che anti-mieloma, senza cambiamenti significativi tra pre e post trattamento. È stato paragonato ad un altro paziente con risposte parziali, e quest'ultimo ha evidenziato, a sei settimane dal trattamento, un aumento delle cellule T CD3+ periferiche, un aumento evidente di cellule memoria, un aumento dell'espressione di PD-1 sulle cellule T CD8+ periferiche. Il cambiamento tra i due casi può essere identificato nella memoria immunitaria, evidentemente migliore nel paziente con remissione completa. Nonostante ciò, anche nel secondo paziente le risposte sono risultate significative, per cui gli autori hanno suggerito che la viroterapia oncolitica possa agire come un vaccino antigene-anticorpo, potenziato dal blocco del checkpoint immunitario (138).

Riassumendo, la viroterapia sembra generalmente ben tollerata, con effetti secondari limitati. La diversità immunitaria determina risposte antivirali differenti, in nessun caso è stata riscontrata immunosoppressione tipica di MV wild type, anzi ha potenziato l'immunità antitumorale.

Publicazione	Fonte	Tipo di studio	Link
Siddharth S. 2018	International journal of biochemistry and cell biology	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30056265/
Sethy C. 2020	Journal of cancer research and clinical oncology	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31617074/
Nishiwada S. 2015	Journal of experimental & clinical cancer research	Nectina-4/Cancro mammario	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387735/
Hao R.T. 2019	.Canc. Manag. Res. 11, 2565	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31114323/
Fabre-Lafay S. 2005	J Biol Chem 2005	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15784625/
Chatterjee S. 2021	European journal of pharmacology, volume 911	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34547246/
Reches A. 2020	J. Immunother. Cancer.8, 2020	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32503945/
Fabre-Lafay S. 2007	BMC cancer 2007	Nectina-4/Cancro mammario	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868744/
Al-Torky H. 2015	Arch Clin Exp Surg 2015	Nectina-4/Cancro mammario	https://www.ejournals.org/ejournals-articles/tumor-expression-of-nectin4-as-a-prognostic-marker-in-breast-cancer.pdf
Livasy C.A. 2006	Mod Pathol 2006	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16341146/
Nielsen T.O. 2004	Clin Cancer Res 2004	Nectina-4/Cancro mammario	https://aacrjournals.org/dincares/article/10/16/5367/96410/Immunohistochemical-and-Clinical-Characterization
Jacquemier J. 2005	J Pathol 2005	Nectina-4/Cancro mammario	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225211/
Rajc J. 2017	Pathology-Research and practice 213 (2017)	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28778498/
Haque R. 2012	C.E.B.P.A.A.C.R.C.A.S. Prev. Oncol. 21 (October (10)) (2012)	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22989461/
Polyak K. 2011	J. Clin. Invest. 121 (October (10)) (2011)	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21965334/
Anders C.K. 2009	Clin Breast Cancer 2009	Nectina-4/Cancro mammario	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919761/
Rabet M.M. 2017	Annals of oncology 28	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27998973/
Zeindler J. 2019	Front Med 2019	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31572728/
Wong H.L.X. 2016	Nat. Commun. 7 (2016)	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26926389/
Sethy C. 2021	Vascular pharmacology 140 (2021)	Nectina-4/Cancro mammario	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33945869/
Hashiguchi T. 2011	Nat. Struct. Mol. Biol. 18, 135–141 (2011)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21217702/
Noyce S.R. 2012	Microbiology, September 2012	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22721863/
Mühlbach D.M. 2011	Nature Vol.480, 22/29 December 2011	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22048310/
Cattaneo R. 2008	Nature Rev. Microbiol. 6, 529–540 (2008)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18552863/
Buchheit A.D. 2003	Mol Ther 2003	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12573619/
Dingli D. 2004	Blood 2004	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14604966/
Msaouel P. 2009	Curr. Opin. Mol. Ther. 2009 Feb	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19169959/
Hutzen B. 2012	BMC Cancer 12, 508 (2012).	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23134812/
Singh H.M. 2021	Molecular therapy: oncolytics, Vol.21, June 2021.	Morbillo/Nectina-4	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8182383/
Collisson E.A. 2011	Nat. Med. 17, 500–503. (2011).	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21460848/
Yu K. 2019	Nat. Commun. 10, 3574. (2019).	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31395879/
Zaoui K. 2012	Cancer Gene Ther. 19, 181–191. (2012).	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22076043/
Maurer C. 2019	Int. J. Oncol. 55, 347–358. (2019).	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31268165/
Avasoufi K. 2020	Curr. Opin. Virol. 41 (2020)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32330821/
Russell S.J. 2018	Cancer Cell 33 (2018)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29634947/
Zhang Y. 2012	J. Immunol. 188 (2012)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22180616/
Grote D. 2003	Cancer Res. 63 (2003)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14559838/
Klose C. 2019	BMC Cancer 19 (2019)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31795974/
Galanis E. 2015	Cancer Res. 75 (2015)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25398436/
Russell S.J. 2014	Mayo Clin. Proc. 89 (2014)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24835528/
Dispenzieri A. 2017	Leukemia 31 (2017)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28439108/
Packiriswamy N. 2020	Leukemia (2020)	Morbillo/Nectina-4	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32327728/

Tabella 1 Nella tabella sono indicati gli studi più rilevanti riportati nello studio

Capitolo 5

Metodi

5.1 Raccolta dati

I dati bibliografici raccolti provengono da diversi database:

- Il database della National Library of Medicine, MedLine/PubMed® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>)
- Il database Elsevier® (<https://www.elsevier.com>)
- Il database MDPI® (<https://www.mdpi.com>)
- Il database Frontiers® (<https://www.frontiersin.org>)
- Il database BMC Cancer® (<https://bmccancer.biomedcentral.com>)

Nella raccolta sono stati incluse lettere, editoriali e articoli speciali riguardanti gli argomenti oggetto dello studio. Esclusi invece abstract, notizie e note.

5.2 Strategia di ricerca

La ricerca non è stata limitata ad anni specifici, ma riscontrando dati più datati con nuovi studi recenti. Non sono stati prese in considerazione limitazioni riguardanti disegni di progetto oppure lingue specifiche.

Per ogni ricerca nei database è stata utilizzata una frase composta da diverse parole. "Nectin-4", "Nectin-4 in Breast Cancer", "Measles virus and Nectin-4" e "Oncolytic virotherapy, Nectin-4 and Measles virus" sono le parole maggiormente utilizzate.

I risultati ottenuti sono stati selezionati manualmente in modo da escludere pubblicazioni non ritenute adatte, ed un'attenta analisi del testo ha permesso uno screening maggiormente accurato. In quest'ultimo aspetto, sono stati riconsiderati quegli studi che mostravano incertezza di inclusione.

5.3 Letteratura selezionata

Lo studio prevede l'analisi ed il comportamento di nectina-4 nel contesto del cancro mammario, per cui la letteratura inclusa si concentra su pubblicazioni basate su questa tipologia di cancro, direttamente connessa al ruolo centrale della molecola di adesione. Si ipotizza un nuovo possibile ruolo come biomarker tumorale, per cui gli studi inclusi prendono in esame i risultati fino ad oggi ottenuti.

Inoltre, la viroterapia oncolitica è basata su MV, per cui sono esclusi studi, articoli o pubblicazioni non riguardanti altri agenti virali, non direttamente collegati a nectina-4.

Bibliografia

1. Takai Y., Nakanishi H. *Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions: J Cell Sci* 2003; **116** (Pt 1): 17-27.
2. Reymond N., Fabre S., Lecocq E., Adelaide J., Dubreuil P., Lopez M. *Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. J Biol Chem* 2001; **276**: 43205-43215.
3. Mizoguchi A., Nakanishi H., Kimura K., Matsubara K., Ozaki-Kuroda K., Katata T., Honda T., Kiyohara Y., Heo K., Higashi M., Tsutsumi T., Sonodda S., Ide Cc., Takai Y. *Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses. J Cell Biol* 2002; **156**: 555-565.
4. Huang K., Lui W.Y. *Nectins and nectin-like molecules (Necls): recent findings and their role and regulation in spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol* 2016.
5. Okabe N., Shimizu K., Ozaki-Kuroda K., Nakanishi H., Morimoto K., Takeuchi M., Katsumaru H., Murakami F., Takai Y. *Contacts between the commissural axons and the floor plate cells are mediated by nectins. Dev Biol* 2004; **273**: 244-256.
6. Inoue T., Fujiwara T., Rikitake Y., Maruo T., Mandai K., Kimura K., Kayahara t., Wang S., Itoh Y., Sai k., Mori M., Mizoguchi A., Takai Y. *Nectin-1 spots as a novel adhesion apparatus that tethers mitral cell lateral dendrites in a dendritic meshwork structure of the developing mouse olfactory bulb. J Comp Neurol* 2015; **523**: 1824-1839.
7. Kitayama M., Mizutani K., Maruoka M., Mandai K., Sakakibara S., Ueda Y., Komori T., Shimono Y., Takai Y. *A novel nectin-mediated cell adhesion apparatus that is implicated in prolactin receptor signaling for mammary gland development. J Biol Chem* 2016.
8. Satoh-Horikawa K., Nakanishi H., Takahashi K., Miyahara M., Nishimura M., Tachibana K., Mizoguchi A., Takai Y. *Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows hemophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities. J Biol Chem* 2000; **275**: 10291-10299.
9. Momose Y., Honda T., Inagaki M., Shimizu K., Irie K., Nakanishi H., Takai Y. *Role of the second immunoglobulin-like loop of nectin in cell-cell adhesion. Biochem Biophys Res Commun* 2002; **293**: 45-49.

10. Yasumi M., Shimizu K., Honda T., Takeuchi M., Takai Y. *Role of each immunoglobulin-like loop of nectin for its cell-cell adhesion activity. Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; **302**: 61-66.
11. Mandai K., Rikitake Y., Mori M., Takai Y. *Nectins and nectin-like molecules in development and disease. Curr Top Dev Biol* 2015; **112**: 197-231
12. Harrison O.J., Vendome J., Brasch J., Jin X., Hong S., Katsamba P.S., Ahlsen G., Troyanovsky R.B., Troyanovsky S.M., Honig B., Shapiro L. *Nectin ectodomain structures reveal a canonical adhesive interface. Nat Struct Mol Biol* 2012; **19**: 906-915.
13. Ikeda W., Kakunaga S., Itoh S., Shingai T., Takekuni K., Satoh K., Inoue Y., Hamaguchi A., Morimoto K., Takeuchi M., Imai T., Takai Y. *Tage4/Nectin-like molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule nectin-3 and enhances migration. J Biol Chem* 2003; **278**: 28167-28172.
14. Rikitake Y., Mandai K., Takai Y. *The role of nectins in different types of cell-cell adhesion. J Cell Sci* 2012; **125** (Pt 16): 3713-3722.
15. Troyanovsky R.B., Indra I., Chen C.S., Hong S., Troyanovsky S.M. *Cadherin controls nectin recruitment into adherens junctions by remodeling the actin cytoskeleton. J Cell Sci* 2015; **128**: 140-149.
16. Bojesen K.B., Clausen O., Rohde K., Christensen C., Zhang L., Li S., Kohler L., Nielbo S., Nielsen J., Gjørland M.D., Poulsen F.M., Bock E., Berezin V. *Nectin-1 binds and signals through the fibroblast growth factor receptor. J Biol Chem* 2012; **287**: 37420-37433.
17. Sakamoto Y., Ogita H., Hirota T., Kawakatsu T., Fukuyama T., Yasumi M., Kanzaki N., Ozaki M., Takai Y. *Interaction of integrin $\alpha_3\beta_3$ with nectin. Implication in cross-talk between cell-matrix and cell-cell junctions. J Biol Chem* 2006; **281**: 19631-19644.
18. Kanzaki N., Ogita H., Komura H., Ozaki M., Sakamoto Y., Majima T., Ijuin T., Takenawa T., Takai Y. *Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival. J Cell Sci* 2008; **121** (Pt 12): 2008-2017.
19. Macias H., Hinck L. *Mammary gland development. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2012; **1**: 533-557.

20. Muschler J., Streuli C.H. *Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; **2**: a003202.
21. McLachlan E., Shao Q., Laird D.W. *Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression. J Membr Biol* 2007; **218**: 107-121
22. Xu R., Nelson C.M., Muschler J.L., Veiseh M., Vonderhaar B.K., Bissell M.J. *Sustained activation of STAT5 is essential for chromatin remodeling and maintenance of mammary-specific function. J Cell Biol* 2009; **184**: 57-66
23. Sözen A., Hecht T.J., Spritz A.R. *Mutation analysis of the PVRL1 gene in caucasians with non-syndromic cleft lip/palate. Genetic testing and molecular biomarkers, Vol.13 NO.5, 2009.*
24. Suzuki K., Hu D., Bustos T., Zlotogora J., Costa R.A., Helms A.J., Spritz A.R. *Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. Nature genetics* 25, 427-430 (2000)
25. Brancati F., Fortugno P., Bottillo I., Lopez M., Josselin E., Boudghene-Stambouli O., Agolini E., Bernardini L., Bellacchio E., Iannicelli M., Rossi A., Dib-Lachachi A., Stuppia L., Palka G., Mundlos S., Stricker S., Kornak U., Zambruno G., Dallapiccola B. *Mutations in PVRL4, encoding cell adhesion molecule nectin-4, cause ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome. American Journal of Human Genetics* 2010; **87**: 265-273.
26. Harold D., Abraham R., Hollingworth P., Sims R., Gerrish A., Hamshere M.L., Pahwa J.S., Moskvina V., Dowzell K., Williams A., Jones A., Thomas C., Stretton A., Morgan A.R., Lovestone S., Powell J., Proitsi P., Lupton M.K., Brayne C., Rubinsztein D.C., Gill M., Lawlor B., Lynch A., Morgan k., Williams J. *Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. Nat Genet* 2009; **41**: 1088-1093.
27. Logue M.W., Schu M., Vardarajan B.N., Buross J., Green R.C., Go R.C., Griffith P., Obisesan T.O., Shatz R., Borenstein A., Cupples L.A., Lunetta L.K., Fallina D., Baldwin C.T., Farrer L.A. *Multi-Institutional Research on Alzheimer Genetic Epidemiology (MIRAGE) Study Group. A comprehensive genetic association study of Alzheimer disease in African Americans. Arch Neurol* 2011; **68**: 169-1579.

28. Takei N., Miyashita A., Tsukie T., Arai H., Asada T., Imagawa M., Shoji M., Higuchi S., Urakami K., Kimura H., Kakita A., Takahashi H., Tsuji S., Kanazawa I., Ihara Y., Odani S., Kuwano R. *Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer Disease. Genetic association study on in and around the APOE in late-onset Alzheimer disease in Japanese. Genomics* 2009; **93**: 441-448.
29. Lachke S.A., Higgins A.W., Inagaki M., Saadi I., Xi Q., Long M., Quade B.J., Talkowski M.E., Gusella J.F., Fujimoto A., Robinson M.L., Yang Y., Duong Q.T., Shapira I., Motro B., Miyoshi J., Takai Y., Morton C.C., Maas R.L. *The cell adhesion gene PVRL3 is associated with congenital ocular defects. Hum Genet* 2012; **131**: 235-250.
30. Geraghty R.J., Krumpal C., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Spear P.G. *Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. Science* 1998; **280**: 1618-1620
31. Mühlebach M.D., Mateo M., Sinn P.L., Prüfer S., Uhlig K.M., Leonard V.H., Navaratnarajah C.K., Frenzke M., Wong X.X., Sawatsky B., Ramachandran S., McCray P.B., Cichutek K., Messling V., Lopez M., Cattaneo R. *Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. Nature* 2011; **480**: 530-533.
32. Warner M.S., Geraghty R.J., Martinez W.M., Montgomery R.I., Whitbeck J., Xu R., Eisenberg R.J., Cohen G.H., Spear P.G. *A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. Virology* 1998; **246**: 179-189.
33. Bork P., Holm L., Sander C. *The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. J Mol Biol* 1994; **242**: 309-320.
34. Harpaz Y., Chothia C. *Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. J Mol Biol* 1994; **238**: 528-539.
35. Yasumi M., Shimizu K, Honda T, Takeuchi M, Takai Y. *Role of each immunoglobulin-like loop of nectin for its cell-cell adhesion activity. Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; **302**: 61-66.

36. Siddharth S., Nayak A., Das S., Nayak D., Panda J., Wyatt D.M., Kundu N.C. *The soluble nectin-4 ecto-domain promotes breast cancer induced angiogenesis via endothelial integrin- β 4*. *International journal of biochemistry and cell biology*, 102 (2018) 151-160.
37. Sethy C., Goutam K., Nayak D., Pradhan R., Molla S., Chatterjee S., Rout N., Wyatt M.D., Narayan S., Kundu N.C. *Clinical significance of a PVRLA 4 encoded gene nectin-4 in metastasis and angiogenesis for tumor relapse*. *Journal of cancer research and clinical oncology* 146, 245-259 (2020).
38. Nishiwada S., Sho M., Yasuda S., Shimada K., Yamato I., Akahori T., Kinoshita S., Nagai M., Konishi N., Nakajima Y. *Nectin-4 expression contributes to tumor proliferation, angiogenesis and patient prognosis in human pancreatic cancer*. *Journal of experimental & clinical cancer research* 34, 30 (2015).
39. Samanta D., Ramagopal G.U., Rubinstein R., Vigdorovich V., Nathenson S.G., Almo S.C. *Structure of nectin-2 reveals determinants of hemophilic and heterophilic interactions that control cell-cell adhesion*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 14836-14840.
40. Hao R.T., Zheng C., Wu C.Y., Xia E.J., Zhou X.F., Quan R.D., Zhang X.H. *NECTIN4 promotes papillary thyroid cancer cell proliferation, migration, and invasion and triggers EMT by activating AKT*. *Canc. Manag. Res.* 11, 2565. 2019
41. Fabre-Lafay S., Garrido-Urbani S, Reymond N, Goncalves A, Dubreuil P, Lopez M. *Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for a tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM17*. *J Biol Chem* 2005; **280**: 19543-19550
42. Chatterjee S., Sinha S., Kundu N.C. *Nectin cell adhesion molecule-4 (NECTIN-4): A potential target for cancer therapy*. *European journal of pharmacology*, volume 911, 15 November 2021, 174516.
43. Reches A., Ophir Y., Stein N., Kol I., Isaacson B., Amikam Y.C., Elnekave A., Tsukerman P., Brlic P.K., Lenac T., Seliger B. *Nectin-4 is a novel TIGIT ligand which combines checkpoint inhibition and tumor specificity*. *J. Immunother. Cancer*.8, 2020.
44. Letessier A., Garrido-Urbani S., Ginestier C., Fournier G., Esterni B., Monville F., Adelaide J., Geneix J., Xerri L., Dubreuil P., Viens P., Charafe-Jauffret E., Jacquemier J.,

- Birnbaum D., Lopez M., Chaffanet M. *Correlated break at PARK2/FRA6E and loss of AF-6/Afadin protein expression are associated with poor outcome in breast cancer. Oncogene; 2006.*
45. Jacquemier J., Eisinger F., Nogues C., Suun Z.Z., Guinebretiere J.M., Peyrat J.P., Geneix J., Lidereau R., Birnbaum D., Sobol H. *Histological type and syncytial growth pattern affect E-cadherin expression in a multifactorial analysis of a combined panel of sporadic and BRCA1-associated breast cancer. Int J Cancer 1999; 83: 45-49*
46. Borrell-Pages M., Rojo F., Albanell J., Baselga J., Arribas J. *TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors. Embo J 2003; 22: 1114-1124*
47. Fabre-Lafay S., Monville F., Garrido-Urbani S., Berruyer-Pouyet C., Ginestier C., Reymond N., Finetti P., Sauvan R., Adélaïde J., Geneix J., Lecocq E., Popovici C., Dubreuil P., Viens P., Gonçalves A., Charafe-Jauffret E., Jacquemier J., Birnbaum D., Lopez M. *Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. BMC cancer 2007; 7, 73: 1-16.*
48. Al-Torky H., Nagah A.G., El-Fayomi T., Fayed H., Tayel H., Sakr M. *Tumor expression of Nectin-4 as a prognostic marker in breast cancer. Arch Clin Exp Surg 2015; 4:178-184.*
49. Jacquemier J., Ginestier C., Rougemont J., Bardou V.J., Charafe-Jauffret E., Geneix J., Adelaide J., Koki A., Houvenaeghel G., Hassoun J., Maraninchi D., Viens P., Birnbaum D., Bertucci F. *Protein expression pro- filing identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis. Cancer Res 2005, 65:767-779.*
50. Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Monville F., Finetti P., Adelaide J., Cervera N., Fekairi S., Xerri L., Jacquemier J., Birnbaum D., Bertucci F. *Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. Oncogene 2006, 25:2273-2284.*
51. Livasy C.A., Karaca G., Nanda R., Tretiakova M.S., Olopade O.I., Moore D.T., Perou C.M. *Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Mod Pathol 2006, 19:264-271.*
52. Nielsen T.O., Hsu F.D., Jensen K., Cheang M., Karaca G., Hu Z., Hernandez-Boussard T., Livasy C., Cowan D., Dressler L., Akslen L.A., Ragaz J., Gown A.M., Gilks C.B., van de Rijn M., Perou C.M. *Immunohisto- chemical and clinical characterization of the basal-like sub- type of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res 2004, 10:5367-5374.*

53. Jacquemier J., Padovani L., Rabayrol L., Lakhani S.R., Penault-Llorca F., Denoux Y., Fiche M., Figueiro P., Maisongrosse V., Ledoussal V., Martinez Penuela J., Udvarhely N., El Makdissi G., Ginestier C., Geneix J., Charafe-Jauffret E., Xerri L., Eisinger F., Birnbaum D., Sobol H. *Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. J Pathol* 2005, 207:260-268.
54. Athanassiadou A.M., Patsouris E., Tsipis A., Gonidi M., Athanassiadou P. *The significance of Survivin and Nectin-4 expression in the prognosis of breast carcinoma. Folia Histochem Cytobiol* 2011;49: 26-33.
55. Bouleftour W., Sargos P., Magne N.. *Nectin-4: a tumor cell target and status of inhibitor development. Current Oncology Reports (2023) 25:181-188*
56. Kedashiro S., Kameyama T., Mizutani K. & Takai Y. (2022). *Stimulatory role of nectin-4 and p95-ErbB2 in multilayered T47D cell proliferation. Genes to Cells, 27(6), 451-464.*
57. Rajc J., Gugic D., Frohlich I., Marjanovic K., Dumencic B. *Prognostic role of nectin-4 expression in luminal B (HER2 negative) breast cancer. Pathology-Research and practice* 213 (2017) 1102-1108.
58. Haque R., Ahmed S.A., Inzhakova G., Shi J., Avila C., Polikoff J. Bernstein L., Enger S.M., Press M.F. *Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades, Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cospons. Am. Soc. Prev. Oncol. 21 (October (10)) (2012) 1848–1855.*
59. Polyak K. *Heterogeneity in breast cancer, J. Clin. Invest. 121 (October (10)) (2011) 3786–3788.*
60. Anders C.K., Carey L.A. *Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. Clin Breast Cancer* 2009; 9 (Suppl 2): S73–S81
61. Rabet M.M., Cabaud O., Josselin E., Finetti P., Castellano R., Farina A., Agavnian-Couquiaud E., Saviane G., Collette Y., Viens P., Goncalves A., Ginestier C., Charafe-Jauffret E., Birnbaum D., Olive D., Bertucci F., Lopez M. *Nectin-4: a new prognostic biomarker for efficient therapeutic targeting of primary and metastatic triple-negative breast cancer. Annals of oncology* 28: 769-776, 2017.

62. Zeindler J., Soysal S.D., Piscuoglio S., Charlotte K.Y., Mechera R., Isaak A., Weber W.P., Muenst S., Kurzeder C. *Nectin-4 expression is an independent prognostic biomarker and associated with better survival in triple-negative breast cancer. Front Med 2019; Volume 6, article 200: 1-7.*
63. Shao F., Pan Z., Long Y., Zhu Z., Wang K., Ji H., Zhu K., Song W., Song Y., Song X., Gai Y., Liu Q., Qin C., Jiang D., Zhu J., Lan X. *Nectin-4 targeted immunoSPECT/CT imaging and photothermal therapy of triple -negative breast cancer. Journal of Nanobiotechnology (2022) 20:243*
64. Delpout S., Noyce R.S., Richardson C.D. *The tumor-associated marker, PVRL4 (nectin-4), is the epithelial receptor for morbilliviruses. Viruses 2014, 6, 2286-2286; doi:10.3390/v6062268*
65. Lauro S., Trasatti L., Bordin F., Lanzetta G., Bria E., Gelibter A., Reale M.G., Vecchione A. *Comparison of CEA, MCA, CA 15-3 and CA 27-29 in follow-up and monitoring therapeutic response in breast cancer patients. Anticancer Res 1999, 19:3511-3515.*
66. Karlsen T.V., Reikvam T., Tofteberg A., Nikpey E., Skogstrand T., Wagner M, Tenstad O., Wiig H., *Lymphangiogenesis facilitates initial lymph formation and enhances the dendritic cell mobilizing chemokine CCL21 without affecting migration, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 37 (2017) 2128–2135.*
67. Sethy C., Goutam K., Das B., Dash S.R., Kundu N.C. *Nectin-4 promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer by relutaging CXCR4-LYVE-1 axis. Vascular pharmacology 140 (2021) 106865.*
68. Wong H.L.X., Jin G. Cao R., Zhang S., Cao Y., Zhou Z. *MT1-MMP sheds LYVE-1 on lymphatic endothelial cells and suppresses VEGF-C production to inhibit lymphangiogenesis, Nat. Commun. 7 (2016) 1–17.*
69. Bono P., Wasenius V.-M., Heikkila P., Lundin J., Jackson D.G., Joensuu H. *High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer, Clin. Cancer Res. 10 (2004) 7144–7149.*
70. Biesbroeck L., Sidbury R. *Viral exanthems: an update. Dermatol Ther 2013; 26 (6): 433-438.*
71. Ludlow M., McQuaid S., Milner D., Swart R.L., Duprex W.P. *Pathological consequences of systemic measles virus infection. J Pathol 2015; 235 (2): 253-265.*

72. Zhang X., Bourhis J.M., Longhi S., Carsillo T., Buccellato M., Morin B., Canard B., Oglesbee M. *Hsp72 recognizes a P binding motif in the measles virus N protein C-terminus. Virology* 2005; **337**: 162-174
73. Devaux P., Cattaneo R. *Measles virus P protein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. J Virol* 2004; **78**: 11632-11640.
74. Krumm S.A., Takeda M., Plemper R.K. *The measles virus nucleocapsid protein tail domain is dispensable for viral polymerase recruitment and activity. J Biol Chem* 2013; **288**: 29943-29953.
75. Iwasaki M., Takeda M., Shirogane Y., Nakatsu Y., Nakamura T., Yanagi Y. *The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. J Virol* 2009; **83**: 10374-10383.
76. Mühlebach M.D., Leonard V.H.J., Cattaneo R. *The measles virus fusion protein transmembrane region modulates availability of an active glycoprotein complex and fusion efficiency. J Virol* 2008; **82**: 11437-11445
77. Navaratnarajah C.K., Oezguen N., Rupp L., Kay L., Leonard V.H.J., Braun W., Cattaneo R. *The heads of the measles virus attachment protein move to transmit the fusion-triggering signal. Nat Struct Mol Biol* 2011; **18**: 128-134.
78. Blumberg B.M., Crowley J.C., Silverman J.I., Menonna J., Cook S.D. *Measles virus L protein evidences elements of ancestral RNA polymerase. Virology* 1988; **164**: 487-497.
79. Whelan S.P., Barr J.N., Wertz G.W. *Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. Curr Top Microbiol Immunol* 2004; **283**: 61-119.
80. Arbuckle J.H., Medveczky G. *The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. Microbes Infect* 2011; **13**: 731-741.
81. Yanagi Y., Takeda M., Ohno S., Hashiguchi T. *Measles virus receptors. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 329, 13–30 (2009).
82. Kobune F., Sakata H., Sugiura A. *Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. J. Virol.* 64, 700–705 (1990).

83. Hashiguchi T., Ose T., Kubota M., Maita N., Kamishikiryo J., Maenaka K., Yanagi Y. *Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 135–141 (2011).
84. de Witte, L., Marion A.B.T., Schneider-Schaulies S., Kooyk Y., Geijtenbeek T.B.H. *Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection*. *J. Virol.* 80, 3477–3486 (2006).
85. Noyce S.R, Richardson C.D. *Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus*. *Microbiology*, September 2012, Vol.20. No.9.
86. Mühlebach D.M., Mateo M., Sinn L.P., Prufer S., Uhlig M.K., Leonard J.H.V., Navaratnarajah K.C., Frenzke M., Wong X.X., Sawatsky B., Ramachandran S., McCray B.P.J., Cichutek K., Messling V., Lopez M., Cattaneo R. *Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus*. *Nature* Vol.480, 22/29 December 2011.
87. Cattaneo R., Miest T., Shashkova E.V., & Barry M.A. *Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded*. *Nature Rev. Microbiol.* 6, 529–540 (2008)
88. Tatsuo H., Ono, N., Tanaka K. & Yanagi Y. *SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus*. *Nature* 406, 893–897 (2000).
89. Galanis E., Hartmann L.C., Cilby W.A., Long J.H., Peethambaram P.P., Barrette B.A., Kaur S.J., Haluska P.J., Aderca I., Zollman P.J., Sloan J.A., Keeney G., Atherton P.J., Podratz K.C., Dowdy S.C., Stanhope C.R., Wilson T.O., Federspiel M.J., Peng K.W., Russell S.J. *Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer*. *Cancer Res.* 70, 875–882 (2010).
90. Bluming AZ, Ziegler J.L. *Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection*. *Lancet* 2: 105–106. (1971).
91. Zygiert Z. *Hodgkin's disease: remissions after measles*. *Lancet* 1: 593. (1971).
92. Li H., Peng K.W., Russell J.S. *Oncolytic measles virus encoding thyroidal sodium iodide symporter for squamous cell cancer of the head and neck radiovirotherapy*. *Hum. Gene Ther.* 23, 295–301(2012).

93. Bucheit A.D., Kumar S, Grote DM, Lin Y, von Messling V, Cattaneo RB, Fielding AK. *An oncolytic measles virus engineered to enter cells through the CD20 antigen. Mol Ther* 2003; 7: 62-72.
94. Dingli D., Peng KW, Harvey ME, Greipp PR, O'Connor MK, Cattaneo R, Morris JC, Russell SJ. *Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. Blood* 2004; 103(5): 1641-1646.
95. Msaouel P., Dispenzieri A., Galanis E. *Clinical testing of engineered oncolytic measles virus strains in the treatment of cancer: an overview. Curr. Opin. Mol. Ther.* 2009 Feb; 11(1); 43-53
96. Hutzen B., Pierson R.C., Russell J.S., Galanis E., Raffel C., Studebaker W.A. *Treatment of medulloblastoma using an oncolytic measles virus encoding the thyroidal sodium iodide symporter shows enhanced efficacy with radioiodine. BMC Cancer* 12, 508 (2012).
97. Singh M.H., Leber M.F., Bossow S., Engeland E.C., Dessila J., Grossardt C., Zaoui K., Bell J.C., Kalle C., Ungerechts G. *MicroRNA-sensitive oncolytic measles virus for chemovirotherapy of pancreatic cancer. Molecular therapy: oncolytics, Vol.21, June 2021.*
98. Collisson E.A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W.J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G.E., Jakkula, L. *Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. Nat. Med.* 17, 500–503. (2011).
99. Yu, K., Chen, B., Aran, D., Charalel, J., Yau, C., Wolf, D.M., van 't Veer, L.J., Butte, A.J., Goldstein, T., and Sirota, M. *Comprehensive transcriptomic analysis of cell lines as models of primary tumors across 22 tumor types. Nat. Commun.* 10, 3574. (2019).
100. Bailey, P., Chang, D.K., Nones, K., Johns, A.L., Patch, A.M., Gingras, M.C., Miller, D.K., Christ, A.N., Bruxner, T.J., Quinn, M.C., et al.; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative (2016). *Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. Nature* 531, 47–52.
101. Zaoui, K., Bossow, S., Grossardt, C., Leber, M.F., Springfield, C., Plinkert, P.K., Kalle, C., and Ungerechts, G. *Chemovirotherapy for head and neck squamous cell carcinoma with EGFR-targeted and CD/UPRT-armed oncolytic measles virus. Cancer Gene Ther.* 19, 181–191. (2012).

102. Maurer S., Salih, H.R., Smirnow, I., Lauer, U.M., and Berchtold, S. *Suicide gene-armed measles vaccine virus for the treatment of AML. Int. J. Oncol.* 55, 347–358. (2019).
103. Mahadevan, D., and Von Hoff, D.D. *Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. Mol. Cancer Ther.* 6, 1186–1197. (2007).
104. Maurer, C., Holmstrom, S.R., He, J., Laise, P., Su, T., Ahmed, A., Hibshoosh, H., Chabot, J.A., Oberstein, P.E., Sepulveda, A.R. *Experimental microdissection enables functional harmonisation of pancreatic cancer subtypes. Gut* 68, 1034–1043. (2019).
105. Ilkow, C.S., Marguerie, M., Batenchuk, C., Mayer, J., Ben Neriah, D., Cousineau, S., Falls, T., Jennings, V.A., Boileau, M., Bellamy, D., et al. (2015). *Reciprocal cellular crosstalk within the tumor microenvironment promotes oncolytic virus activity. Nat. Med.* 21, 530–536.
106. Jing, Y., Chavez, V., Khatwani, N., Ban, Y., Espejo, A.P., Chen, X., and Merchan, J.R. (2020). *In vivo antitumor activity by dual stromal and tumor-targeted oncolytic measles viruses. Cancer Gene Ther.* 27, 910–922.
107. Donnelly O.G., Errington-Mais F., Steele L., Hadac E., Jennings V., Scott K., Peach H., Phillips R.M., Bond J., Pandha H., Harrington K., Vile R., Russell S., Selby P., Melcher A.A. *Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma, Gene Ther.* 20 (2013) 7–15.
108. Grote D., Russell S.J., Cornu T.I., Cattaneo R., Vile R., Poland G.A., Fielding A.K. *Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice, Blood.* 97 (2001) 3746–3754.
109. Künzi V., Oberholzer P.A., Heinzerling L., Dummer R., Naim H.Y. *Recombinant measles virus induces cytolysis of cutaneous T-cell lymphoma in vitro and in vivo, J. Invest. Dermatol.* 126 (2006) 2525–2532.
110. Peng K.W., Ahmann G.J., Pham L., Greipp P.R., Cattaneo R., Russell S.J. *Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus, Blood* 98 (2001) 2002–2007.
111. Peng K.W., TenEyck C.J., Galanis E., Kalli K.R., Hartmann L.C., Russell S.J. *Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus, Cancer Res.* 62 (2002) 4656–4662.

112. Phuong L.K., Allen C., Peng K.W., Giannini C., Greiner S., TenEyck C.J., Mishra P.K., Macura S.I., Russell S.J., Galanis E.C. *Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiforme*, *Cancer Res.* 63 (2003) 2462–2469.
113. Blechacz B., Splinter P.L., Greiner S., Myers R., Peng K.W., Federspiel M.J., Russell S.J., LaRusso N.F. *Engineered measles virus as a novel oncolytic viral therapy system for hepatocellular carcinoma*, *Hepatology* 44 (2006) 1465–1477.
114. Liu C., Hasegawa K., Russell S.J., Sadelain M., Peng K.W. *Prostate-specific membrane antigen retargeted measles virotherapy for the treatment of prostate cancer*, *Prostate* 69 (2009) 1128–1141.
115. Iankov I.D., Msaouel P., Allen C., Federspiel M.J., Bulur P.A., Dietz A.B., Gastineau D., Ikeda Y., Ingle J.N., Russell S.J., Galanis E. *Demonstration of anti-tumor activity of oncolytic measles virus strains in a malignant pleural effusion breast cancer model*, *Breast Cancer Res. Treat.* 122 (2010) 745–754.
116. Wang B., Yan X., Guo Q., Li Y., Zhang H., Xie J.S., Meng X. *Deficiency of caspase3 in tumor xenograft impairs therapeutic effect of measles virus Edmoston strain*, *Oncotarget* 6 (2015) 16019–16030.
117. Lv Y., Zhou D., Hao X., Zhu M., Zhang C., Zhou D., Wang J., Liu R., Wang Y., Gu W., Shen H., Chen X., Zhao Z. *A recombinant measles virus vaccine strain rMV-Hu191 has oncolytic effect against human gastric cancer by inducing apoptotic cell death requiring integrity of lipid raft microdomains*, *Cancer Lett.* 460 (2019) 108–118.
118. Marti G.P., Engeland C.E. *Mechanisms of measles virus oncolytic immunotherapy*. *Cytokine and growth reviews* 56 (2020) 28-38.
119. Ayasoufi K., Pfaller C.K. *Seek and hide: the manipulating interplay of measles virus with the innate immune system*, *Curr. Opin. Virol.* 41 (2020) 18–30.
120. Rajaraman S., Canjuga D., Ghosh M., Codrea M.C., Sieger R., Wedekink F., Tatagiba M., Koch M., Lauer U.M., Nahnsen S., Rammensee H.G., Mühlebach M.D., Stevanovic S., Tabatabai G. *Measles virus-based treatments trigger a pro-inflammatory*

- cascade and a distinctive immunopeptidome in glioblastoma, Mol. Ther. - Oncolytics. 12 (2018) 147–161.*
121. Chen A., Zhang Y., Meng G., Jiang D., Zhang H., Zheng M., Xia M., Jiang A., Wu J., Beltinger C., Wei J. *Oncolytic measles virus enhances antitumour responses of adoptive CD8+NKG2D+ cells in hepatocellular carcinoma treatment, Sci. Rep. 7 (2017) 5170.*
 122. Gauvrit A., Brandler S., Sapede-Peroz C., Boisgerault N., Tangy F., Gregoire M. *Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response, Cancer Res. 68 (2008) 4882–4892.*
 123. Achard C., Guillerme J.B., Bruni D., Boisgerault N., Combredet C., Tangy F., Jouvenet N., Grégoire M., Fonteneau J.F. *Oncolytic measles virus induces tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated cytotoxicity by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells, Oncoimmunology 6 (2016) e1261240.*
 124. Guillerme J.B., Boisgerault N., Roulois D., Ménager J., Combredet C., Tangy F., Fonteneau J.F., Gregoire M. *Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells, Clin. Cancer Res. 19 (2013) 1147–1158*
 125. Curtsinger J.M., Mescher M.F. *Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation, Curr. Opin. Immunol. 22 (2010) 333–340.*
 126. Russell S.J., Barber G.N. *Oncolytic viruses as antigen-agnostic cancer vaccines, Cancer Cell 33 (2018) 599–605.*
 127. Grossardt C., Engeland C.E., Bossow S., Halama N., Zaoui K., Leber M.F., Springfield C., Jaeger D., von Kalle C., Ungerechts G. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic measles virus is an effective therapeutic cancer vaccine, Hum. Gene Ther. 24 (2013) 644–654.*
 128. Zhao D., Chen P., Yang H., Wu Y., Zeng X., Zhao Y., Wen Y., Zhao X., Liu X., Wei Y., Li Y. *Live attenuated measles virus vaccine induces apoptosis and promotes tumor regression in lung cancer, Oncol. Rep. 29 (2013) 199–204.*
 129. Engeland C.E., Grossardt C., Veinalde R., Bossow S., Lutz D., Kaufmann J.K., Shevchenko I., Umansky V., Nettelbeck D.M., Weichert W., Jäger D., von Kalle C.,

- Ungerechts G. *CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy*, *Mol. Ther.* 22 (2014) 1949–1959.
130. Speck T., Heidbuechel J.P.W., Veinalde R., Jaeger D., von Kalle C., Ball C.R., Ungerechts G., Engeland C.E. *Targeted BiTE expression by an oncolytic vector augments therapeutic efficacy against solid tumors*, *Clin. Cancer Res.* 24 (2018) 2128–2137.
131. Veinalde R., Grossardt C., Hartmann L., Bourgeois-Daigneault M.C., Bell J.C., Jäger D., von Kalle C., Ungerechts G., Engeland C.E. *Oncolytic measles virus encoding interleukin-12 mediates potent antitumor effects through T cell activation*, *Oncoimmunology.* 6 (2017) e1285992.
132. Backhaus P.S., Veinalde R., Hartmann L., Dunder J.E., Jeworowski L.M., Albert J., Hoyler B., Poth T., Jäger D., Ungerechts G., Engeland C.E. *Immunological effects and viral gene expression determine the efficacy of oncolytic measles vaccines encoding IL-12 or IL-15 agonists*, *Viruses.* 11 (2019) 914.
133. Zhang Y., Patel B., Dey A., Ghorani E., Rai L., Elham M., Castleton A.Z., Fielding A.K. *Attenuated, oncolytic, but not wild-type measles virus infection has pleiotropic effects on human neutrophil function*, *J. Immunol.* 188 (2012) 1002–1010.
134. Grote D., Cattaneo R., Fielding A.K. *Neutrophils contribute to the measles virus-induced antitumor effect: enhancement by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression*, *Cancer Res.* 63 (2003) 6463–6468.
135. Tan D.Q., Zhang L., Ohba K., Ye M., Ichiyama K., Yamamoto N. *Macrophage response to oncolytic paramyxoviruses potentiates virus-mediated tumor cell killing*, *Eur. J. Immunol.* 46 (2016) 919–928.
136. Klose C., Berchtold S., Schmidt M., Beil J., Smirnow I., Venturelli S., Burkard M., Handgretinger R., Lauer U.M. *Biological treatment of pediatric sarcomas by combined virotherapy and NK cell therapy*, *BMC Cancer* 19 (2019) 1172
137. Heinzerling L., Künzi V., Oberholzer P.A., Kündig T., Naim H., Dummer R. *Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells*, *Blood* 106 (2005) 2287–2294.

138. Galanis E, Hartmann L.C., Cliby W.A., Long H.J., Peethambaram P.P., Barrette B.A., Kaur J.S., Haluska P.J., Aderca I., Zman P.J., Sloan J.A., Keeney G., Atherton P.J., Podratz K.C., Dowdy S.C., Stanhope C.R., Wilson T.O., Federspiel M.J., Peng K.W., Russell S.J. *Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer*, *Cancer Res.* 70 (2010) 875-882.
139. Galanis E., Atherton P.J., Maurer M.J., Knutson K.L., Dowdy S.C., Cliby W.A., Haluska P. Jr., Long H.J., Oberg A., Aderca I., Block M.S., Bakkum-Gamez J., Federspiel M.J., Russell S.J., Kalli K.R., Keeney G., Peng K.W., Hartmann L.C. *Oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter to treat drug-resistant ovarian cancer*, *Cancer Res.* 75 (2015) 22–30.
140. Russell S.J., Federspiel M.J., Peng K.-W, Tong C., Dingli D., Morice W.G., Lowe V., O'Connor M.K., Kyle R.A., Leung N., Buadi F.K., Rajkumar S.V., Gertz M.A., Lacy M.Q., Dispenzieri A. *Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy*, *Mayo Clin. Proc.* 89 (2014) 926–933.
141. Dispenzieri A., Tong C., LaPlant B., Lacy M.Q., Laumann K., Dingli D., Zhou Y., Federspiel M.J., Gertz M.A., Hayman S., Buadi F., O'Connor M., Lowe V.J., Peng K.W., Russell S.J. *Phase I trial of systemic administration of Edmonston strain of measles virus genetically engineered to express the sodium iodide symporter in patients with recurrent or refractory multiple myeloma*, *Leukemia* 31 (2017) 2791–2798.
142. Packiriswamy N., Upreti D., Zhou Y., Khan R., Miller A., Diaz R.M., Rooney C.M., Dispenzieri A., Peng K.-W., Russell S.J. *Oncolytic measles virus therapy enhances tumor antigen-specific T-cell responses in patients with multiple myeloma*, *Leukemia* (2020).