



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI 'ALDO MORO'

DIP. di MEDICINA di PRECISIONE e RIGENERATIVA e AREA JONICA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SANITÀ PUBBLICA, MEDICINA CLINICA E
ONCOLOGIA**

CICLO: XXXVII

COORDINATORE: PROF. JEAN-FRANÇOIS DESAPHY

***RUOLO DEL CD36 NELLA PROGRESSIONE DEL
MIELOMA MULTIPLO***

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE:
MED/09- medicina interna

DOTTORANDA: ELEONORA MALERBA

TUTOR: PROF. VITO RACANELLI

CO-TUTOR: PROF.SSA MARCELLA PRETE

ESAME FINALE 2025

INDICE

RIASSUNTO	pagina 1
INTRODUZIONE	pagina 2
IL MIELOMA MULTIPLO	pagina 2
PATOGENESI	pagina 2
EVOLUZIONE CLONALE DEL MIELOMA MULTIPLO	pagina 7
TERAPIA	pagina 16
<i>Trattamento iniziale nei pazienti eleggibili per il trapianto autologo di cellule staminali (ASCT)</i>	pagina 18
<i>Trattamento iniziale nei pazienti non eleggibili per il trapianto autologo di cellule staminali (ASCT)</i>	pagina 19
<i>Trattamento del mieloma multiplo recidivante</i>	pagina 20
IMMUNOSORVEGLIANZA	pagina 22
RUOLO DEL MICROAMBIENTE	pagina 26
IMMUNOGENICITÀ DELLE PLASMACELLULE	
NEL MIELOMA	pagina 30
CELLULE T CD8⁺ CITOTOSSICHE	
TUMORE-SPECIFICHE	pagina 31
CD4⁺ T HELPER CELLS	pagina 33
CELLULE T REGOLATORIE	pagina 34
CELLULE NATURAL KILLER (NK)	pagina 35
CELLULE T NATURAL KILLER (NKT)	pagina 36
CELLULE DENDRITICHE (DC)	pagina 37
CELLULE SOPPRESSIVE DI DERIVAZIONE	
MIELOIDE	pagina 38
CHECKPOINTS IMMUNOLOGICI (ICP)	
NEL MIELOMA MULTIPLO	pagina 39
FATTORI IMMUNOSOPPRESSIVI	pagina 40

**II SISTEMA IMMUNITARIO COME TARGET
TERAPEUTICO: UN APPROCCIO EFFICACE
PER IL TRATTAMENTO DEL MIELOMA
MULTIPLO** pagina 41

CD36 pagina 45

**REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE E DELL'ATTIVITÀ
DEL CD36** pagina 46

**IL CD36 REGOLA LO SVILUPPO DEL CANCRO:
CD36 E METABOLISMO DEGLI ACIDI GRASSI** pagina 47

**ESPRESSIONE E RUOLO DEL CD36 IN ALCUNI
TIPI DI CANCRO** pagina 48

Cancro al seno pagina 48

Carcinoma epatocellulare pagina 49

Carcinoma a cellule squamose orali pagina 50

Cancro della vescica pagina 51

Glioblastoma pagina 52

Cancro del colon-retto pagina 53

Cancro alla prostata pagina 54

Cancro ovarico pagina 55

Leucemie e linfomi pagina 56

INTERAZIONE TRA CD36 E CELLULE IMMUNITARIE pagina 60

**I RECETTORI ATTIVATI DAI PROLIFERATORI
DEI PEROSSISOMI (PPAR)** pagina 61

**FUNZIONE DEI PPAR β/δ NEL METABOLISMO
LIPIDICO** pagina 63

OBIETTIVI DELLO STUDIO pagina 64

MATERIALI E METODI pagina 67

RECLUTAMENTO DEI PAZIENTI pagina 67

ISOLAMENTO DEI LINFOMONOCITI pagina 68

CITOFUORIMETRIA	pagina 68
SEPARAZIONE IMMUNOMAGNETICA	pagina 68
IMMUNOFLUORESCENZA	pagina 68
STIMOLAZIONE CELLULARE E COLTURE	pagina 69
PEROSSIDAZIONE LIPIDICA	pagina 70
ANALISI STATISTICA	pagina 70

RISULTATI pagina 71

<i>Espressione del CD36 a livello della popolazione immunosoppressiva MDSCs e di quella citotossica T CD8⁺ nei pazienti con MGUS e con MM</i>	pagina 71
<i>La percentuale di cellule T CD8⁺ è significativamente più elevata nel midollo dei pazienti con MM rispetto ai pazienti con MGUS</i>	pagina 73
<i>La valutazione dell'espressione del CD36 sulle T CD8⁺ provenienti dal sangue midollare di 35 pazienti con MGUS e 35 pazienti con MM conferma l'aumento significativo dell'espressione del marcatore sulle T CD8⁺ di pazienti con MM</i>	pagina 73
<i>Nei pazienti con MM le cellule T CD8⁺ migrano dal sangue periferico al midollo osseo sede della neoplasia ed aumentano l'espressione del CD36</i>	pagina 74
<i>Le cellule T CD8⁺ di pazienti con MM hanno un fenotipo senescente</i>	pagina 75
<i>Le cellule CD8⁺CD57⁺ senescenti dei pazienti con MM eseguono uptake lipidico</i>	pagina 77
<i>Il CD36 è coinvolto nell'uptake lipidico</i>	pagina 78
<i>Il coinvolgimento del CD36 nell'uptake lipidico è confermato in citofluorimetria</i>	pagina 79
<i>L'aumento dell'espressione del CD36, incrementando l'uptake lipidico, riduce l'attività citotossica di linfociti T CD8⁺ nei pazienti con MM</i>	pagina 80
<i>PPARβ/δ modula l'espressione del CD36 e la produzione di IFN-γ nelle cellule di pazienti con MGUS e MM</i>	pagina 81

<i>L'aumento dell'espressione del CD36, incrementando l'uptake lipidico, aumenta la mortalità dei linfociti T CD8⁺ nei pazienti con MM</i>	pagina 83
<i>L'espressione del CD36 modula lo stato di perossidazione lipidica dei linfociti T CD8⁺ nei pazienti con MM</i>	pagina 84
<i>Il supplemento di acido grasso (FA) incrementa lo stato di perossidazione lipidica nelle T CD8⁺ di pazienti con MM</i>	pagina 85
<i>La stimolazione con l'inibitore della ferroptosi, la ferrostatina-1, ripristina la produzione di IFN-γ nelle cellule T CD8⁺ di pazienti MM</i>	pagina 86
<i>La stimolazione con l'inibitore della ferroptosi, la ferrostatina-1, riduce l'espressione del marcatore di senescenza (CD57) nelle T CD8⁺ di pazienti MM</i>	pagina 87
<i>Il supplemento di acido grasso determina la morte delle T CD8⁺ per ferroptosi nei pazienti con MM</i>	pagina 88
<i>L'aumento dell'espressione del CD36 correla con l'aumentata mortalità delle T CD8⁺ nei pazienti con MM, l'inibizione della ferroptosi riduce gradualmente la mortalità di queste cellule</i>	pagina 91
DISCUSSIONE	pagina 92
CONCLUSIONI	pagina 95
BIBLIOGRAFIA	pagina 97

RIASSUNTO

Il Mieloma Multiplo (MM) è una neoplasia ematologica maligna causata dalla trasformazione neoplastica di una cellula della linea B linfocitaria, detta plasmacellula (PC), dovuta al progressivo accumulo di mutazioni genetiche nel suo DNA.

La fisiopatologia del MM comprende un'evoluzione a più stadi attraverso la gammopatia monoclonale di significato indeterminato (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*, MGUS), lo Smoldering Mieloma (*Smouldering Multiple Myeloma*, SMM) asintomatico, il MM sintomatico (intramidollare, "attivo") e la leucemia plasmacellulare che differisce dal MM per la presenza di plasmacellule monoclonali circolanti.

Il MM è una malattia incurabile, altamente resistente ai farmaci. Nel corso degli ultimi vent'anni la prognosi delle persone affette da MM è notevolmente migliorata, con un netto incremento delle possibilità di ottenere una remissione della malattia prolungata e lunghe sopravvivenze. Quasi sempre, però, il MM tende a ripresentarsi, ovvero recidiva. Nuove evidenze supportano un ruolo essenziale del microambiente nella tumorigenesi e nell'avanzamento della neoplasia. Sono pertanto necessari nuovi bersagli terapeutici che interferiscano sia con PCs tumorali che con il microambiente midollare.

In questo progetto di dottorato, sulla base dei pannelli anticorpali *EuroFlow*, ci si è concentrati sulla immunofenotipizzazione citofluorimetrica delle cellule del microambiente midollare al fine di identificare nuove molecole coinvolte nella progressione della neoplasia, dalle fasi pre-maligne asintomatiche alla malattia conclamata. È stata riscontrata la rilevanza dell'espressione del marcatore CD36, un recettore *scavenger* espresso da più *subset* cellulari e coinvolto in diversi *pathway* cellulari; in particolar modo tale recettore effettua *uptake* di acidi grassi. Il nostro studio ha evidenziato un profilo immunofenotipico specifico nelle cellule T CD8⁺ dei pazienti con MM rispetto a quelli con MGUS, caratterizzato da una maggiore espressione del marcatore CD36 e da un aumento dell'assorbimento lipidico. L'*uptake* lipidico CD36 mediato si associa ad una condizione di senescenza delle cellule citotossiche, caratterizzata da una progressiva riduzione della loro capacità di produrre IFN- γ e di eliminare le cellule tumorali, da accumulo di perossidi e morte cellulare per ferroptosi. L'inibizione di CD36 si è dimostrata efficace nel ridurre la perossidazione lipidica e ripristinare la funzionalità delle cellule T CD8⁺ in vitro, aprendo nuove

prospettive per interventi mirati che potrebbero migliorare la risposta immunitaria nel MM. Inoltre, il ruolo del metabolismo lipidico e della ferroptosi nelle cellule T CD8⁺ senescenti suggerisce che la modulazione dell'*uptake* lipidico e della perossidazione potrebbe rappresentare un'importante strategia per prevenire o rallentare la progressione neoplastica. I risultati ottenuti permettono quindi di identificare il CD36 come un nuovo potenziale target terapeutico per il MM.

INTRODUZIONE

IL MIELOMA MULTIPLO

Il Mieloma Multiplo (MM) è una neoplasia maligna caratterizzata dalla proliferazione di cloni di plasmacellule nel midollo osseo, tipicamente accompagnata dalla secrezione di immunoglobuline monoclonali che sono rilevabili nel sangue e nelle urine. Le plasmacellule di MM presentano un'elevata longevità ed un forte tropismo verso l'osso ed il midollo osseo. Tra le discrasie plasmacellulari, il MM è la seconda più frequente patologia ematologica con un'incidenza di 6 su 100 000 per anno in USA e in Europa. L'incidenza del MM è dalle 2 alle 3 volte più alta negli Afro-Americani, manifestandosi come la più comune patologia ematologica in questo gruppo etnico. L'età media alla diagnosi è 69 anni; i tre quarti dei pazienti con diagnosi di MM presentano età superiore a 55 anni e 2 pazienti su 3 sono di sesso maschile. Con l'avvento delle nuove strategie terapeutiche, la sopravvivenza media è salita da 3 a 6 anni negli ultimi due decenni (Röllig C. et al., 2015) La fisiopatologia del MM comprende un'evoluzione a più stadi attraverso la gammopatia di significato indeterminato (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance*, MGUS), lo Smoldering Mieloma (*Smouldering Multiple Myeloma*, SMM) asintomatico, il MM sintomatico (intramidollare, "attivo") e la leucemia plasmacellulare che differisce dal MM per la presenza di plasmacellule monoclonali circolanti.

PATOGENESI

L'eziologia del MM è sconosciuta. Probabili fattori di rischio sono rappresentati dall'esposizione a sostanze tossiche ambientali e/o professionali (es. radiazioni ionizzanti, pesticidi, derivati del petrolio) e dall'obesità. Un'ipotesi interessante potrebbe essere quella di una stimolazione immunitaria cronica che porterebbe all'insorgenza del MM. Sono stati riportati anche casi familiari di comparsa della neoplasia in cui sembrerebbe essere presente il "fenomeno dell'anticipazione", ovvero

insorgenza precoce e spesso in forma più aggressiva nei figli rispetto ai genitori (Kyle R.A. et al., 2007)

Il clone neoplastico localizzandosi nel midollo osseo tende ad invadere e danneggiare l'osso determinando le principali manifestazioni cliniche tipiche della malattia avanzata: ipercalcemia, anemia, lesioni ossee generalmente multiple e dall'aspetto radiologico a "stampino" ed insufficienza renale, riassunte dall'acronimo CRAB (*hypercalcemia, renal insufficiency, anemia, bone lesions*) (**Tabella 1**) (Liu W.M. et al., 2004). Altre caratteristiche cliniche possono essere iperviscosità, letargia, neuropatia ed infezioni ricorrenti. Nelle fasi precoci della malattia prevalgono infezioni del tratto respiratorio; nelle fasi più avanzate predominano invece le infezioni del tratto urinario e setticemia.

Le plasmacellule di mieloma sono simili alle plasmacellule post-germinali e sono caratterizzate da una forte dipendenza dal midollo osseo, un'estesa mutazione somatica dei geni delle immunoglobuline e assenza di espressione delle IgM (*Immunoglobuline M*). In particolare, le plasmacellule di mieloma differiscono dalle plasmacellule sane perché conservano la potenzialità di tornare ad uno stato proliferativo inferiore (Röllig C. et al., 2015).

TABELLA 1. CRITERI CRAB

CRITERIO	DEFINIZIONE
Calcio sierico	>0,25 mmol/L sopra il limite massimo della norma, o in genere >2.75 mmol/L
Insufficienza renale	Creatinina >173 mmol/L
Anemia	Emoglobina <2 g/dL sotto il limite minimo della norma, o in genere <10 g/dL
Lesioni ossee	Lesioni litiche o osteoporosi con fratture da compressione
Altri	Iperviscosità sintomatica, amiloidosi, infezioni batteriche ricorrenti, con >2 episodi in 12 mesi

La diagnosi delle discrasie plasmacellulari si basa sui criteri diagnostici revisionati dall'*International Myeloma Working Group* nel 2014 e riportati nella **Tabella 2** (Rajkumar S.V. et al., 2014). Le novità sostanziali dei criteri diagnostici del 2014 sono rappresentate dall'introduzione dei tre biomarcatori di malignità, indicativi di imminente rischio di sviluppo di danno d'organo (stimato del 70-90% a due anni per singolo fattore) e da una migliore definizione dei criteri CRAB. Infatti, è stata precisata la definizione di insufficienza renale attraverso l'aggiunta del valore di clearance della creatinina < 40 /ml accanto al valore di creatininemia > 2 mg/dl e inoltre nella valutazione delle lesioni ossee, sono state aggiunte alla radiografia convenzionale la tomografia computerizzata (TC) e la tomografia ad emissione di positroni (PET-TC). La MGUS è caratterizzata da un numero leggermente elevato di plasmacellule clonali ($< 10\%$), dalla minima presenza di proteina M (< 30 g/L) e dall'assenza dei criteri CRAB. Talvolta può presentarsi un ulteriore stadio intermedio detto Smoldering MM, che è caratterizzato da una percentuale di plasmacellule midollari \geq al 10%, una componente monoclonale sierica ≥ 30 g/L e nessuna evidenza di danno d'organo (**Tabella 2**) (Rajkumar S.V. et al., 2014).

TABELLA 2. CRITERI DIAGNOSTICI (*International Myeloma Working Group*).

MGUS	Plasmacellule midollari < 10% Componente monoclonale sierica < 30 g/L No evidenza di danno d'organo
Mieloma Smouldering	Plasmacellule midollari ≥ 10% Componente monoclonale sierica ≥ 30g/L No evidenza di danno d'organo
Mieloma Multiplo	Plasmacellule midollari ≥ 60% Componente monoclonale sierica ≥ 30g/L Evidenza di danno d'organo Presenza di uno o più dei seguenti biomarcatori di malignità: – Plasmacellule midollari ≥ 60% – serum free light chain (sFLC) ratio (involved/uninvolved) > 100 – > 1 lesione focale alla Risonanza Magnetica (diametro almeno 5 mm)

Le basi patogenetiche del MM e della trasformazione della MGUS in MM sono in larga misura ancora sconosciute. L'evoluzione della MGUS e lo sviluppo del MM sembrano dipendere dalla diminuita efficacia delle cellule T citotossiche e dalla capacità delle plasmacellule tumorali di eluderne l'attività di sorveglianza antitumorale (Kyle R.A. et al., 2003). È stato dimostrato, infatti, che le cellule T CD8⁺ ad attività citotossica tumore-specifica, presenti nel midollo osseo di pazienti con MM, siano meno efficienti di quelle presenti nel midollo osseo di pazienti con MGUS. L'espressione delle diverse componenti molecolari del sistema di processazione e presentazione antigenica ristretta per le molecole HLA di classe I delle plasmacellule viene, infatti, progressivamente ridotta nel corso dell'evoluzione della MGUS in MM, con conseguente compromissione del riconoscimento e dell'eliminazione delle stesse plasmacellule da parte delle cellule T CD8⁺ citotossiche (Racanelli V. et al., 2010)

Oggigiorno è possibile diagnosticare il MM ad uno stadio precedente rispetto al passato. Fenomeni di mal di schiena acuti, in particolare nei soggetti più anziani, o di ambigua anemia dovrebbero indurre il soggetto ad eseguire test di screening per il MM. Le tecniche standard di screening includono l'analisi delle proteine totali nel siero, l'elettroforesi a carico di campioni di siero ed urina come la SPEP (*Serum protein electrophoresis*) e la UPEP (*Urine protein electrophoresis*), l'immunofissazione nel siero e nell'urina, la detection delle catene leggere di Ig nel siero e l'analisi di parametri addizionali: emocromo completo, creatinina sierica, analisi di elettroliti incluso il calcio, la lattato deidrogenasi, la β 2 microglobulina. In un soggetto con sospetto di MM il campione di midollo viene prelevato tramite aspirazione o tramite biopsia. I pazienti affetti da MM dovranno sottoporsi ad un'analisi radiografica totale dello scheletro, per rilevare eventuali lesioni litiche, osteopenia severa, fratture patologiche. È comune l'utilizzo di tecniche quali MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) o PET-CT. Disordini come la sindrome nefrosica, malfunzionamento cardiovascolare, neuropatia in pazienti non diabetici, ipertrofia ventricolare sinistra all'ecocardiogramma senza consistenti evidenze elettrocardiografiche, epatomegalia con imaging normale o albuminuria devono essere valutate attentamente per non trascurare fenomeni di amiloidosi da catene leggere, causata dalla loro secrezione.

Per misurare la risposta terapeutica e monitorare lo stato della malattia, il marker preferenziale è determinato dalla IgM sierica. In pazienti con secrezione di catene leggere è usata la proteinuria di Bence-Jones nei campioni di urina delle 24h, per pazienti con mieloma oligosecretorio il monitoraggio della patologia è eseguito tramite il test FLC (*Free Light Chains*), valutando eventuale anormalità del rapporto sapendo che il valore deve essere almeno di 100 mg/L. Altre tecniche come la citofluorimetria, l'ibridazione fluorescente in-situ, o la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) con oligonucleotidi specifici, possono contribuire a rilevare informazioni sulla malattia residua minima, raffinare la definizione di remissione completa e distinguere due gruppi responsive, positivi e negativi alla malattia minima residua, con chiare distinzioni nell'assenza di progressione e di sopravvivenza totale (Röllig C. et al., 2016)

EVOLUZIONE CLONALE DEL MIELOMA MULTIPLO

Finora non è stata raggiunta la comprensione di una chiara struttura della cellula staminale e del progenitore cellulare del MM, conoscenza indispensabile per l'utilizzo di terapie che possiedano come target proprio le cellule staminali. Da studi in vitro è stato ipotizzato che la cellula staminale di mieloma è parte di un sottoinsieme di precursori di cellule B $CD38^- CD19^+ CD27^+$, che non esprimono i classici *markers* di mieloma $CD38$ e $CD138$. Studi genomici hanno dimostrato la composizione clonale del MM alla diagnosi e durante la progressione della malattia. In contrasto con quanto si affermava nei decenni precedenti, i tumori, incluso il MM, non derivano da una singola cellula staminale tumorale, ma sono costituiti da un'espressione clonale di cellule che possiedono un'immensa diversità genetica. Questa teoria è supportata dall'evento clinico di malattia biconale o dall'attivazione verso una classe monoclonale di immunoglobuline nei pazienti con mieloma recidivante (**Figura 1**) (Röllig C. et al., 2016).

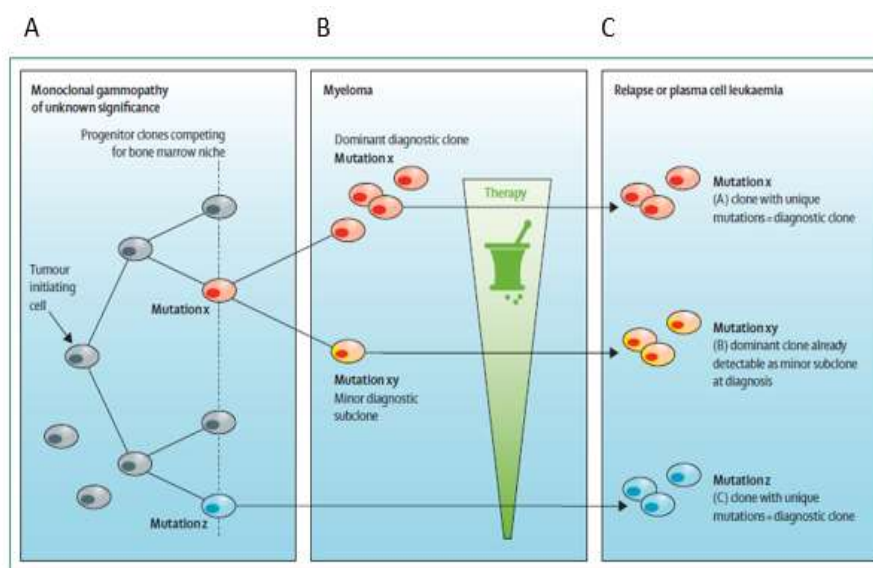


Figura 1. Sviluppo dei subcloni con un'unica mutazione *x* durante il progresso dalla MGUS a MM. (A) Nei casi ad alto rischio, i subcloni minori che sono difficilmente rilevabili nella diagnosi iniziale, possono acquisire delle mutazioni *xy* durante la terapia, dando origine alla recidiva. (B) I subcloni derivanti dalle cellule tumorali iniziali non rilevabili nella prima diagnosi potrebbero uscire dallo stato quiescente ed evolvere come cloni dominanti nella recidiva con una differente mutazione *z*. (C) Laddove i cloni con solo mutazioni non lineari *x* o *z* sono più suscettibili alla terapia, i subcloni che hanno acquisito le nuove mutazioni *xy* sono resistenti alle terapie convenzionali (Röllig C. et al., 2014).

Uno degli aspetti fondamentali nel cancro è la sequenza temporale in cui si verificano le aberrazioni genetiche. Il modello clinico che descrive la progressione tra MGUS, SMM e MM permette di comprendere la gerarchia genomica e l'evoluzione clonale del MM. Le aberrazioni genetiche iniziano con eventi predisponenti a livello germinale, seguiti da eventi precoci che innescano la malattia, fino a modifiche genetiche successive che portano alla progressione e alla resistenza ai trattamenti. Gli eventi genetici rilevati nello stadio di MGUS sono primari, mentre quelli presenti solo nello stadio di MM sono secondari e legati alla progressione tumorale. Strumenti analitici possono rilevare l'eterogeneità clonale per comprendere meglio la sequenza temporale delle alterazioni genomiche. Studi recenti di sequenziamento dell'esoma hanno migliorato la comprensione del panorama genomico della malattia. Gli eventi primari consistono nell'acquisizione di iperdiploidia, generalmente caratterizzata dalla presenza di trisomie a carico di differenti cromosomi (cromosomi 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, e/o 21) e di traslocazioni a carico dei geni che codificano per la catena pesante delle immunoglobuline (*IGH*), t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16) and t(14;20). Gli eventi secondari includono le traslocazioni cromosomiche a carico del gene *MYC*, le variazioni nel numero di copie e le mutazioni somatiche a carico di importanti pathways quali MAPK, NF- κ B, e di riparo del DNA. Gli eventi secondari permettono ad un subclone tumorale di acquisire un particolare vantaggio e sono indispensabili per la progressione tumorale (Manier S. et al., 2016).

Le informazioni genetiche ereditarie contribuiscono significativamente al rischio di sviluppare il cancro, con variazioni tra i diversi tipi di tumori. I familiari di pazienti con MM hanno un rischio 2-4 volte maggiore di sviluppare la malattia, indicando un forte contributo genetico ereditario. Studi su varianti genomiche su larga scala, come gli studi di associazione sull'intero genoma (GWAS), hanno identificato sette loci genetici associati a un rischio aumentato di MM, che spiegano circa il 13% del rischio familiare. Questi loci sono collegati anche a un maggior rischio di sviluppare MGUS suggerendo un ruolo precoce di queste suscettibilità genetiche. Alcuni loci di rischio sono associati a specifici sottotipi molecolari di MM e a caratteristiche cliniche, come le lesioni osteolitiche. Studi futuri potrebbero identificare ulteriori loci di suscettibilità, utili per individuare pazienti a rischio (Chubb D. et al., 2013), (Manier S. et al., 2016). La ipermutazione somatica e la ricombinazione del cambio di classe, processi cruciali nello sviluppo delle cellule B, sono coinvolti anche nella patogenesi del MM. Entrambi

i processi richiedono l'espressione di citosina deaminasi a filamento singolo di DNA (codificato da AICDA, comunemente denominata AID) e coinvolgono la generazione di rotture del DNA a doppio filamento nei loci codifica Ig. Nel MM, oltre il 90% delle traslocazioni coinvolgono il locus IGH sul cromosoma 14, con la conseguente sovraregolazione di oncogeni come MMSET/FGFR3 e CCND1 (ciclina D1). Queste traslocazioni, presenti già nello stadio di MGUS, promuovono la deregolazione delle cicline D e la transizione cellulare G1/S. Inoltre, alcuni studi mostrano una correlazione tra l'invecchiamento e una diminuzione delle traslocazioni IGH, mentre aumenta la frequenza di iperdiploidia (HRD) (González D. et al., 2007), (Manier S. et al., 2016). La traslocazione t(11;14) è una delle alterazioni più comuni nei pazienti con MM, con una prevalenza del 15-20%. Questa traslocazione porta a una sovraregolazione dell'espressione di CCND1, dovuta alla sua vicinanza all'enhancer di IGH. Normalmente, le cellule B esprimono le cicline D2 e D3, ma non la ciclina D1. Sebbene la t(11;14) sia considerata prognosticamente neutra, uno studio del 2015 ha rilevato che il 10% dei pazienti presenta una mutazione attivante in CCND1, e la coesistenza di queste alterazioni genetiche è associata a una prognosi sfavorevole (Walker B.A. et al., 2015), (Manier S. et al., 2016).

La traslocazione t(4;14) è presente in circa il 15% dei pazienti con MM ed è associata a una prognosi sfavorevole. Questa traslocazione porta alla deregolazione di FGFR3 e MMSET, con sovraespressione di MMSET in tutti i pazienti e di FGFR3 nel 70% dei casi. MMSET è una metiltransferasi che aumenta la metilazione di H3K36, modulando l'espressione genica, e di H4K20, influenzando la riparazione del DNA tramite il reclutamento della proteina 53BP1. FGFR3, invece, è un recettore tirosin-chinasico attivato da mutazioni oncogeniche, presenti nel 17% dei pazienti con t(4;14). Nonostante la prognosi negativa, trattamenti precoci con l'inibitore del proteasoma, bortezomib, migliorano la sopravvivenza (Avet-Loiseau H. et al., 2007), (Manier S. et al., 2016).

La traslocazione t(14;16) è presente in circa il 5% dei pazienti con MM e causa la sovraespressione della variante oncogenica c-MAF, un fattore di trascrizione che regola l'espressione di diversi geni, tra cui CCND2. I punti di rottura cromosomica si trovano a valle del gene MAF, nel gene soppressore tumorale WWOX. Mutazioni in MAF sono rilevate nel 13% dei pazienti con t(14;16). Uno studio del 2015 ha evidenziato che MAF aumenta l'espressione degli enzimi APOBEC3A e APOBEC3B,

generando una firma mutazionale denominata "firma APOBEC". La traslocazione t(14;16) è stata spesso associata a una prognosi sfavorevole, sebbene un'analisi su larga scala non abbia confermato questa correlazione (Walker B.A. et al., 2015), (Manier S. et al., 2016).

La traslocazione t(6;14), presente solo nell'1-2% dei pazienti con MM, comporta la fusione di CCND3 con gli enhancer di IGH, risultando in una sovraregolazione dell'espressione di CCND3. I punti di rottura si trovano all'estremità 5' di CCND3. Attualmente, non sono state riportate mutazioni specifiche in CCND3 per i pazienti con t(6;14). L'implicazione prognostica complessiva di questa traslocazione è considerata neutra (Prideaux S.M. et al., 2014), (Walker B.A. et al., 2015), (Manier S. et al., 2016).

La traslocazione t(14;20), la più rara tra le principali traslocazioni rilevate nei pazienti con MM (circa 1% dei casi), comporta la sovraregolazione dell'espressione di MAFB, un paralogo del gene MAF. Studi su microarray indicano che l'iperespressione di MAFB produce un profilo di espressione genica simile a quello associato all'iperespressione di MAF, suggerendo target comuni come CCND2. Il gene MAFB è mutato nel 25% dei pazienti con t(14;20). I tumori con t(14;20) mostrano una firma mutazionale APOBEC, probabilmente dovuta all'aumento dell'espressione di APOBEC4. La traslocazione t(14;20) è associata a una prognosi sfavorevole se rilevata dopo l'insorgenza del MM, ma, paradossalmente, a una malattia stabile a lungo termine se presente nelle fasi MGUS e SMM (Ross F.M. et al., 2010), (Walker B.A. et al., 2015), (Manier S. et al., 2016).

Le traslocazioni che coinvolgono MYC sono considerate eventi genomici secondari. Sebbene presenti solo nel 3-4% dei pazienti con MGUS o SMM, si riscontrano nel 15-20% dei pazienti con MM recentemente diagnosticato. Queste traslocazioni sono spesso associate a kataegis, un modello di ipermutazione localizzata dovuto alla deregolazione dell'attività APOBEC vicino ai punti di rottura della traslocazione. I loci partner più comuni nelle traslocazioni che coinvolgono MYC includono i geni IGH, IGL, IGK, FAM46C, FOXO3 e BMP6. Queste traslocazioni causano un'iperespressione significativa di MYC, probabilmente a causa della vicinanza dei super-enhancer del gene partner al locus MYC. Le traslocazioni che coinvolgono MYC sono frequenti nei tumori iperdiploidi (circa il 65% dei casi) e sono inversamente correlate con la traslocazione t(4;14). Sono associate a una prognosi sfavorevole,

specialmente quando coinvolgono un partner immunoglobulinico (Weinhold N. et al., 2016), (Manier S. et al., 2016).

Le variazioni del numero di copie (CNVs) nel MM variano notevolmente in termini di dimensioni, da delezioni o amplificazioni focali a eventi su bracci cromosomici o sull'intero genoma HRD. Come le mutazioni a singolo nucleotide, le CNVs possono agire sia come eventi driver sia come eventi passeggeri. Le CNVs altamente frequenti e ricorrenti sono probabilmente eventi driver, suggerendo che le regioni minimamente amplificate o delete contengano geni cruciali per lo sviluppo e la progressione del MM (Keats J.J. et al., 2007), (Manier S. et al., 2017).

L'iperdiploidia (HRD) negli esseri umani è definita come un numero di cromosomi compreso tra 48 e 74. È presente circa nel 50% dei pazienti con MGUS, SMM o MM al momento della diagnosi ed è caratterizzata da numerosi guadagni cromosomici, in particolare la trisomia dei cromosomi 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e/o 21. La causa di queste ampie alterazioni genomiche non è ben compresa, ma si ipotizza che possano derivare da un singolo evento mitotico catastrofico piuttosto che da un guadagno graduale dei cromosomi nel tempo. Solo una percentuale limitata di tumori iperdiploidi (<10%) presenta traslocazioni primarie che coinvolgono IGH, ma esiste una correlazione positiva tra l'HRD e traslocazioni che interessano MYC. L'HRD può precedere le traslocazioni primarie che coinvolgono IGH in alcuni pazienti. I tumori iperdiploidi mostrano eterogeneità biologica nelle vie di segnalazione, con espressioni variabili di geni associati alla proliferazione, al segnale NF- κ B, o a HGF e IL-6. I pazienti con HRD hanno generalmente una sopravvivenza migliore rispetto a quelli con ipodiploidia (<45 cromosomi), ma una prognosi peggiore se presentano anche lesioni citogenetiche avverse come del(17p) e t(4;14). Tra i pazienti con HRD, solo quelli con trisomia 3 o 5 mostrano una sopravvivenza globale significativamente migliore, mentre la trisomia 21 è associata a una prognosi sfavorevole (Chng W.J. et al., 2005), (Manier S. et al., 2017).

Le alterazioni che coinvolgono interi bracci cromosomici sono frequentemente osservate nei pazienti con MM. L'analisi approfondita delle amplificazioni o delezioni focali e delle regioni minimamente amplificate o delete nello stesso locus contribuisce alla comprensione dei meccanismi oncogenici sottostanti alle variazioni del numero di copie (CNVs) che interessano i bracci cromosomici (Manier S. et al., 2017).

L'acquisizione del braccio lungo del cromosoma 1 (1q gain) è presente nel 35-40% dei pazienti con MM e sembra avere un effetto avverso sulla sopravvivenza globale. Questo fenomeno è associato a instabilità nella regione pericentromerica 1q12 e a traslocazioni del braccio intero 1q, che potrebbero essere collegate a una specifica ipometilazione e quindi a una cromatina pericentromerica altamente decondensata. L'acquisizione della regione 1q21, rilevabile con un'apposita sonda per CKS1B, è un fattore prognostico indipendente da altre lesioni citogenetiche avverse e spesso associata a esiti sfavorevoli. Anche se i geni driver rilevanti su 1q non sono completamente esplorati, è stata identificata una regione minimamente amplificata tra 1q21.1 e 1q23.3 contenente 679 geni, tra cui oncogeni candidati come CKS1B, ANP32E, BCL9 e PDZK1. ANP32E, un inibitore della proteina fosfatasi 2A coinvolto nel rimodellamento della cromatina e nella regolazione trascrizionale, è particolarmente degno di nota poiché è associato indipendentemente a esiti negativi. Inoltre, il numero di copie di 1q sembra correlato con l'outcome clinico: i pazienti con almeno quattro copie di 1q hanno una prognosi meno favorevole rispetto a quelli con tre copie (Sawyer J.R. et al., 2014), (Fournier A. et al., 2010), (Manier S. et al., 2016). Circa il 30% dei pazienti con MM presenta delezioni del braccio corto del cromosoma 1 (1p), associate a una prognosi sfavorevole. Due regioni di interesse, 1p12 e 1p32.3, sono particolarmente rilevanti nella patogenesi del MM. La regione 1p12 contiene il gene candidato oncosoppressore FAM46C, il cui livello di espressione è positivamente correlato con proteine ribosomiali e fattori di iniziazione ed allungamento eucariotici coinvolti nella traduzione proteica. Questo gene è frequentemente mutato nei pazienti con MM (~10%) ed è indipendentemente associato a una prognosi negativa. La regione 1p32.3 può essere deleta emizigoticamente o omozigoticamente e contiene due geni, CDKN2C e FAF1. CDKN2C è un inibitore della ciclina dipendente chinasi 6, coinvolto nella regolazione negativa del ciclo cellulare, mentre FAF1 codifica per una proteina che promuove l'apoptosi tramite la via FAS. CDKN2C è deleta omozigoticamente nell' 1,5% dei pazienti con MM (Boyd K.D. et al., 2011), (Manier S. et al., 2017).

La delezione del braccio lungo del cromosoma 13 (del(13q)) è presente nel 45-50% dei pazienti con MM ed è comunemente associata a tumori non iperdiploidi. Questa delezione è anche osservata nei pazienti con MGUS, suggerendo la sua importanza come evento primario nella fase iniziale dell'oncogenesi. Nell' 85% dei pazienti con

del(13q), la delezione interessa l'intero braccio q, mentre nel restante 15% si riscontrano delezioni interstiziali. La regione minimamente deleta si estende tra 13q14.11 e 13q14.3 e contiene 68 geni, tra cui RB1, EBPL, RNASEH2B, RCBTB2 e i microRNA miR-16-1 e miR-15a. Gli studi molecolari hanno mostrato che i pazienti con queste delezioni hanno livelli significativamente più bassi del gene oncosoppressore RB1, il che potrebbe ridurre la loro capacità di regolare negativamente il ciclo cellulare. Stabilire il significato prognostico della del(13q) è complicato, poiché questa alterazione è spesso associata ad altre lesioni citogenetiche ad alto rischio, come t(4;14). Pertanto, la connessione storica tra del(13q) e prognosi negativa potrebbe essere un indicatore della sua associazione con tali lesioni (Fonseca R. et al., 2001), (Chiecchio L. et al., 2006), (Manier S. et al., 2017).

Le delezioni del cromosoma 17 sono principalmente emizigoti, interessano l'intero braccio p e sono osservate circa nel 10% dei pazienti con MM di nuova diagnosi, con una frequenza che aumenta fino all'80% nelle fasi più avanzate della malattia. La regione minimamente deleta include l'oncosoppressore TP53, e mutazioni in questo gene sono presenti nel 25-40% dei pazienti con del(17p). Il gene TP53, localizzato sul cromosoma 17p13, funge da regolatore trascrizionale che influenza l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA e l'apoptosi in risposta ai danni del DNA. Nei pazienti con MM, la perdita di 17p è associata a esiti prognostici negativi e allo sviluppo di malattia extramidollare (Palumbo A. et al., 2015), (Manier S. et al., 2016).

Le anomalie citogenetiche nel MM possono essere studiate mediante la cariotipizzazione convenzionale (CK) o l'ibridazione in situ fluorescente (FISH), e più recentemente mediante ibridazione genomica comparativa su array (Array-CGH) e array di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP-array). Sebbene la cariotipizzazione possa idealmente descrivere tutte le aberrazioni cromosomiche del clone neoplastico, ad eccezione di alcune traslocazioni criptiche, la quantità di cellule proliferanti necessarie ha limitato l'uso routinario della CK. Per questo motivo, nelle ultime linee guida dello *European Myeloma Network* (EMN), è raccomandata l'analisi FISH sulle plasmacellule, che dovrebbe includere almeno le anomalie t(4;14) e 17p⁻, con t(14;16) e +1q. Il mieloma iperdiploide (HRD MM), invece, non viene investigato routinariamente perché sono necessarie più sonde rispetto ai marcatori convenzionali. Tuttavia, nell'era dei nuovi agenti, l'identificazione dell'iperdiploidia si è rivelata utile nella prognosi del MM, poiché il mieloma trisomico può beneficiare maggiormente

del trattamento con lenalidomide e mantiene un esito favorevole (Barilà G. et al., 2020).

L'applicazione intensiva del sequenziamento massivo parallelo ha permesso il completamento di diversi studi di sequenziamento dell'intero esoma (WES), generando un compendio completo di geni driver nel MM. Finora, tre coorti di pazienti con MM sono state studiate utilizzando WES. Il primo studio ha incluso 203 pazienti, con WES eseguito sia alla diagnosi che alla recidiva; 23 di questi pazienti sono stati analizzati anche mediante sequenziamento dell'intero genoma. Un'altra coorte ha coinvolto 67 pazienti alla diagnosi o alla recidiva, con campioni sequenziali (prima del trattamento e alla recidiva) disponibili per 15 pazienti. L'ultimo studio di WES pubblicato ha compreso campioni ottenuti al momento della diagnosi da 463 pazienti con MM iscritti al trial Myeloma XI del National Cancer Research Institute (Chapman M.A. et al., 2011), (Bolli N. et al., 2014), (Walker B.A. et al., 2015), (Manier S. et al., 2016). Le mutazioni in geni come KRAS, NRAS, e BRAF sono tra le più comuni nel MM, riscontrate nel 40% circa dei pazienti. Queste mutazioni sono spesso subclonali e associate alla progressione della malattia. Tuttavia, non sembrano influenzare significativamente la sopravvivenza libera da progressione o la sopravvivenza complessiva (Walker B.A. et al., 2015). Geni della via NF- κ B come TRAF3, CYLD, e LTB mostrano mutazioni ricorrenti nel MM. Altre mutazioni in IKBKB, BIRC2, BIRC3, CARD11, e TRAF3IP1 sono meno significative statisticamente. Questa via è arricchita di geni mutati, ma, come la via MAPK, non influisce sugli esiti di sopravvivenza nei pazienti con MM di nuova diagnosi. Le mutazioni nei geni TP53, ATM, e ATR sono presenti in circa il 15% dei pazienti con MM. Questi geni sono cruciali per la riparazione del DNA e la risposta ai danni del DNA (Walker B.A. et al., 2015) (Keats J.J. et al., 2007). Le mutazioni in questi geni sono associate a esiti sfavorevoli nei pazienti con MM. DIS3, noto anche come RRP44, codifica per una RNA esonucleasi altamente conservata, che è parte del complesso esosomico coinvolto nella regolazione dell'elaborazione e abbondanza di RNA (Dziembowski A. et al., 2007), (Schmid M. et al., 2008) e partecipa all'eliminazione dell'mRNA instabile e nell'elaborazione di snoRNA, tRNA o rRNA stabili (Weber A.M. et al., 2014). Le mutazioni in DIS3 tendono a concentrarsi nella regione catalitica dell'enzima. FAM46C è considerato un gene oncosoppressore coinvolto nella regolazione della traduzione, ma il suo ruolo specifico nel MM è ancora poco chiaro (Manier S. et al., 2016).

Altri geni significativamente mutati nel MM, come PRDM1, IRF4, LTB e SP140, sono coinvolti nella differenziazione della linea cellulare B. PRDM1 (noto anche come BLIMP1) codifica un repressore trascrizionale essenziale per la differenziazione delle plasmacellule. Mutazioni a perdita di funzione di PRDM1 sono state osservate in pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B (Pasqualucci L. et al., 2006), (Tam W. et al., 2006). Nel MM, il profilo mutazionale di PRDM1 (incluse mutazioni frameshift e mutazioni dei siti di splicing) suggerisce anche un ruolo di oncosoppressore. IRF4 codifica un regolatore trascrizionale di PRDM1 ed è anch'esso ricorrentemente mutato nel MM. Insieme a PRDM1, IRF4 rappresenta un regolatore chiave della differenziazione delle cellule B. Nei pazienti con MM, le mutazioni in IRF4 colpiscono preferenzialmente un hotspot nel sito K123R all'interno del dominio del fattore regolatorio dell'interferone. Le mutazioni oncogeniche di IRF4 sono associate a una prognosi favorevole per i pazienti con MM di nuova diagnosi (Walker B.A. et al., 2015), (Manier S. et al., 2016).

In sintesi, le mutazioni driver nel MM coinvolgono vie di segnalazione critiche e processi di riparazione del DNA, con implicazioni variabili per la prognosi e la risposta al trattamento. La comprensione di queste alterazioni genetiche è fondamentale per il miglioramento delle strategie terapeutiche e per l'ottimizzazione del trattamento personalizzato (Manier S. et al., 2016).

Le cellule di mieloma mostrano varie morfologie e sono classificate in quattro tipi: mature, immature, pleomorfe e plasmablastiche. Le cellule mature (**Figura 2A**) sono di solito indistinguibili dalle cellule normali, con un nucleo eccentrico e assenza di nucleoli, abbondante citoplasma basofilo. Le cellule immature (**Figura 2B**) invece presentano un nucleo irregolare con cromatina più dispersa e solitamente nucleoli prominenti. Le cellule di mieloma pleomorfo (**Figura 2C**) hanno un aumentato polimorfismo nucleare, un nucleo polilobato e nucleoli prominenti. Le cellule del mieloma plasmablastico (**Figura 2D**) sono grandi, con aumento del polimorfismo nucleare (AMICR 2018).

Le cellule mielomatose hanno una maggiore espressione di CD138 (Sydecan-1), una glicoproteina di eparan solfato transmembrana, che ne regola la sopravvivenza e proliferazione. Il CD138 è usato come marcatore standard per l'identificazione delle plasmacellule tumorali in immunistochimica ed in citofluorimetria.

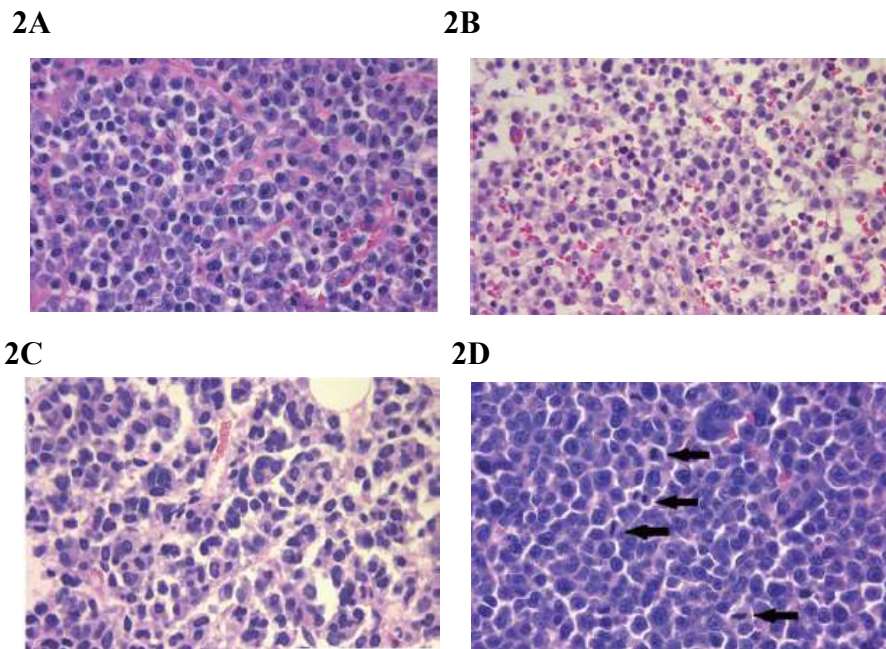


Figura 2. Caratteristiche citologiche delle cellule mielomatose (2A) mature, (2B) immature, (2C) pleomorfe, (2D) plasmablastiche.

TERAPIA

Trattamento del mieloma multiplo di nuova diagnosi

Il MM resta una neoplasia incurabile. Le diverse strategie di trattamento dei pazienti dipendono essenzialmente dallo stato della malattia e dall'età dei soggetti.

I pazienti con diagnosi di MGUS non necessitano di trattamento ma di regolari controlli per valutare la potenziale progressione della patologia verso il MM (il rischio di progressione è di solo l'1% per anno di vita). I pazienti affetti dalla forma smoldering non hanno indicazioni terapeutiche e dovranno sottoporsi a regolari controlli per valutare l'eventuale stato di progressione della malattia dato che i trattamenti precoci con le terapie convenzionali non hanno fornito benefici. Il rischio di progressione è più alto nei primi 5 anni e decresce successivamente. Il rischio totale di progressione è del 10% per anno nei primi 5 anni e dell'1% per anno per i successivi 10 anni (Röllig C. et al., 2015).

Fino all'inizio degli anni '90 del secolo scorso il bagaglio terapeutico del MM prevedeva l'utilizzo di agenti chemioterapici classici e la prognosi era infausta. I regimi polichemioterapici determinavano un più alto rate di risposta, senza tuttavia aumentare la sopravvivenza, che si attestava comunque intorno ai 3 anni (Myeloma

Trialists' Collaborative Group. *J Clin Oncol.* 1998), (Samson D. et al., 1989), (Cavo M. et al., 2002), (Rajkumar S.V. et al., 2022).

La prima rivoluzione nel trattamento del mieloma è sopraggiunta a metà degli anni '90, con l'introduzione del trapianto autologo di cellule staminali (ASCT), che ha permesso di incrementare i tassi di risposta e la sopravvivenza globale nei pazienti di età inferiore ai 60 anni (Attal M. et al., 1997), (Child J.A. et al., 2003).

Negli ultimi 15 anni, si è assistito a una seconda rivoluzione. La sopravvivenza al MM è migliorata significativamente grazie all'introduzione di farmaci come agenti immunomodulatori (IMiDs), inibitori del proteasoma e anticorpi monoclonali, basati su una più profonda conoscenza della biologia del mieloma e del microambiente in cui le cellule tumorali proliferano. Più recentemente, la FDA ha approvato per il trattamento del MM recidivante altre terapie come carfilzomib, pomalidomide, ixazomib, elotuzumab, daratumumab, isatuximab, selinexor, belantamab mafodotin e le terapie con cellule CAR-T, che promettono ulteriori miglioramenti negli esiti terapeutici (Kumar S.K. et al., 2014), (Rajkumar S.V. et al., 2022). Questi farmaci agiscono attraverso meccanismi diversi, alcuni dei quali non completamente compresi. Talidomide, lenalidomide e pomalidomide appartengono agli IMiDs che si legano alla proteina cereblon, attivando l'attività ligasica E3 e portando alla degradazione di fattori di trascrizione specifici delle cellule B, come le proteine ikaros (IKZF1) e aiolos (IKZF3). Oltre a ciò, possono indurre citotossicità diretta attraverso danno al DNA mediato dai radicali liberi e hanno proprietà antiangiogeniche, immunomodulatorie e inibitorie del fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) (Lu G. et al., 2014), (Lonial S. et al., 2019), (Rajkumar S.V. et al., 2022).

Gli inibitori del proteasoma più utilizzati sono bortezomib, carfilzomib e ixazomib.

Gli anticorpi monoclonali sono elotuzumab e daratumumab che agiscono rispettivamente sui target SLAMF7 e CD38; belantamab mafodotin che è un anticorpo umanizzato diretto contro l'agente di maturazione delle cellule B (BCMA), coniugato con monometil auristatina F, un agente che interrompe i microtubuli.

Recentemente per il trattamento del mieloma refrattario e recidivante è stata approvata la terapia con CAR-T, cellule T ingegnerizzate con recettore chimerico per gli antigeni associati al mieloma, ad esempio BCMA (Ito T. et al., 2010), (Krönke J. Et al., 2014), (Lu G. et al., 2014), (Lonial S. et al., 2019). In pazienti ad alto rischio con mieloma

smoldering, il trattamento precoce con lenalidomide e desametasone o con lenalidomide in monoterapia ha dimostrato benefici (Lonial S. et al., 2019).

Esiste un dibattito tra approcci di cura aggressivi, mirati alla risposta completa (CR), e strategie di controllo della malattia che privilegiano la qualità della vita e la sopravvivenza globale (OS). Recenti studi dimostrano che lo stato di malattia minima residua (MRD) negativa, misurato con metodi molecolari di nuova generazione o citometria a flusso, ha un valore prognostico favorevole, sebbene siano necessari ulteriori studi per determinare eventuali modifiche del trattamento basate sullo stato di MRD, che attualmente è utilizzato principalmente come parametro prognostico. Oggigiorno, i risultati relativi MRD sono raccomandati principalmente come parametro prognostico e non vengono utilizzati per prendere decisioni terapeutiche. Sono necessari ulteriori dati per stabilire se la negatività alla MRD possa essere utilizzata come endpoint surrogato per l'approvazione regolatoria e se una negatività prolungata alla MRD possa rappresentare un indicatore di cura in almeno un sottogruppo di pazienti (Kumar S. et al., 2016), (Rajkumar S.V. et al., 2022).

Trattamento iniziale nei pazienti eleggibili per il trapianto autologo di cellule staminali (ASCT)

Il trattamento del MM di nuova diagnosi e sintomatico dipende dalla idoneità al trapianto autologo ASCT, che dipende dall'età della persona e dalla presenza di malattie concomitanti, e dalla stratificazione del rischio. Il trapianto autologo rappresenta infatti la terapia d'elezione per le persone con età (fino ai 70-75 anni) e condizioni fisiche generali ottimali. I pazienti candidabili ricevono anzitutto una terapia di induzione così da ridurre al minimo la quantità di malattia e migliorare il più possibile il danno d'organo. Di norma, i pazienti ricevono 3-4 cicli di terapia di induzione prima della raccolta delle cellule staminali. Dopo la raccolta, si può eseguire il trapianto ASCT oppure continuare la terapia di induzione, posticipando il trapianto fino alla prima recidiva. Le opzioni terapeutiche iniziali più comuni sono trattamenti triplici e quadrupli, efficaci anche in caso di recidiva. Tra queste, la combinazione di bortezomib, lenalidomide e desametasone (VRd) e quella con daratumumab, lenalidomide e desametasone (DRd) rappresentano gli standard terapeutici (Rajkumar S.V. et al., 2010), che assicurano un migliore tasso di risposta in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS) e sopravvivenza globale (OS). Tuttavia,

l'uso prolungato della lenalidomide (>4-6 cicli) può richiedere l'uso di plerixafor per la mobilitazione delle cellule staminali. Tutti i pazienti trattati con lenalidomide richiedono profilassi antitrombotica (aspirina o, per pazienti a rischio, anticoagulanti). In alternativa, in presenza di insufficienza renale acuta o se la lenalidomide non è disponibile, si possono usare regimi contenenti bortezomib, come bortezomib-talidomide-desametasone (VTd) o bortezomib-ciclofosfamida-desametasone (VCd) (Moreau P. et al., 2016). I regimi quadrupli con daratumumab, in particolare, daratumumab con VRd (Dara-VRd) hanno dimostrato una maggiore efficacia rispetto al solo VRd, specialmente nei pazienti a rischio standard. Tuttavia, si consiglia di riservare questi regimi quadrupli ai pazienti con mieloma ad alto rischio fino a quando non saranno disponibili dati definitivi sulla sopravvivenza globale (Leung N. et al., 2019), (Rajkumar S.V. et al., 2022).

Il ruolo del trapianto allogenico, sia mieloablato che non mieloablato, è controverso. I tassi di mortalità legata al trattamento (10-20%) e di malattia da trapianto contro l'ospite (GVHD) sono elevati. Sebbene l'allogtrapianto sia considerato sperimentale, può essere preso in considerazione per pazienti giovani con malattia ad alto rischio disposti ad accettare l'alto rischio di mortalità e la natura non comprovata di questa terapia per un potenziale miglioramento della sopravvivenza a lungo termine (Stewart A.K. et al., 2009), (Rajkumar S.V. et al., 2022).

Dopo il trapianto è prevista una terapia di mantenimento con un immunomodulante in grado di prolungare la durata di remissione della malattia. La lenalidomide è lo standard di cura per la terapia di mantenimento nella maggior parte dei pazienti. Per i pazienti con mieloma ad alto rischio, si raccomanda la terapia di mantenimento combinata di bortezomib e lenalidomide (Benboubker L. et al; 2014).

Trattamento iniziale nei pazienti non eleggibili per il trapianto autologo di cellule staminali (ASCT)

Nei pazienti con MM di nuova diagnosi che non possono sottoporsi a ASCT per età avanzata o presenza di comorbidità, le principali opzioni terapeutiche iniziali includono VRd (bortezomib, lenalidomide, desametasone) e DRd (daratumumab, lenalidomide, desametasone). I regimi basati su melfalan non sono raccomandati a causa dei rischi di danno alle cellule staminali e sindrome mielodisplastica secondaria (Rajkumar S.V. et al., 2022). Il regime basato su bortezomib (VRd) ha mostrato un

beneficio in termini di sopravvivenza rispetto a Rd (lenalidomide, desametasone) ed è considerato la scelta preferita per la terapia iniziale. Viene somministrato per circa 8-12 cicli, seguito da terapia di mantenimento. In caso di difficoltà logistiche (come problemi di somministrazione parenterale), ixazomib può sostituire bortezomib. Nei pazienti anziani fragili, si consiglia una dose ridotta di lenalidomide e desametasone inizialmente a 20 mg settimanali, riducendo il dosaggio dopo i primi 4-6 cicli e sospendendo eventualmente il farmaco dopo il primo anno (Durie B.G.M. et al., 2017), (Facon T. et al., 2021).

Il regime DRd (daratumumab, lenalidomide, desametasone) è stato recentemente approvato per i pazienti con nuova diagnosi di mieloma, grazie ai risultati di un trial internazionale che ha dimostrato una PFS superiore rispetto a quella ottenuta con il regime Rd (70,6% vs 55,6% a 30 mesi). Tuttavia, a differenza di VRd, che ha una durata limitata, DRd richiede l'uso continuato di tutti e tre i farmaci fino alla progressione, aumentando i costi e la tossicità a lungo termine (Facon T. et al., 2019), (Kapoor P. et al., 2019).

Regimi basati su alchilanti (VCd) come melfalan vengono considerati solo in caso di problemi di accesso alla lenalidomide, e anche in questi casi si può preferire la ciclofosfamida, che non compromette la mobilizzazione delle cellule staminali. Il regime VCd (bortezomib, ciclofosfamida, desametasone) rappresenta un'alternativa al VMP (bortezomib, melfalan, prednisone), con risultati simili in termini di efficacia ma con meno effetti collaterali (Mateos M.V. et al., 2020).

Trattamento del mieloma multiplo recidivante

Quasi tutti i pazienti con MM alla fine recidivano, e la durata della remissione diminuisce progressivamente con ogni nuovo regime terapeutico. Per i pazienti refrattari a lenalidomide e bortezomib, la prognosi è generalmente sfavorevole, con una PFS mediana di 5 mesi e una OS di 9 mesi. La scelta della terapia dipende da diversi fattori, tra cui il momento della recidiva, la risposta ai trattamenti precedenti, l'aggressività della malattia e le condizioni generali del paziente. Quando si verifica una recidiva, è raccomandato l'uso di regimi terapeutici contenenti almeno due farmaci nuovi ai quali il paziente non è refrattario. Se il paziente è idoneo per un ASCT questa opzione dovrebbe essere considerata (Moreau P. et al., 2021), (Dimopoulos M.A. et al., 2021).

Le terapie disponibili comprendono bortezomib, che può essere ripreso se il paziente ha ottenuto una risposta positiva iniziale e successivamente ha avuto una recidiva dopo un periodo di remissione (Richardson P.G. et al., 2009). Daratumumab, che è efficace in pazienti pretrattati e può essere combinato con lenalidomide, bortezomib o pomalidomide (Mateos M.V. et al., 2020). Carfilzomib, un inibitore del proteasoma, è utile soprattutto nei pazienti refrattari a bortezomib e presenta un rischio minore di neurotossicità, sebbene possa causare effetti collaterali cardiaci in alcuni pazienti (Brinchen S. et al., 2019). Pomalidomide, un analogo della lenalidomide, è attivo anche nei pazienti che non rispondono più a lenalidomide e bortezomib. Può essere usato in combinazione con altri farmaci per ottenere un'efficacia significativa (Brinchen S. et al., 2018). Elotuzumab, un anticorpo che si combina bene con pomalidomide o lenalidomide, è stato approvato per pazienti con almeno due terapie precedenti (Lonial S. et al., 2015). Ixazomib, un inibitore del proteasoma orale, è efficace e pratico da somministrare settimanalmente (Moreau P. et al., 2016). Selinexor, che blocca l'exportina 1, ha mostrato efficacia in pazienti con molte linee terapeutiche precedenti, sebbene possa provocare effetti collaterali rilevanti (Grosicki S. et al., 2020). Isatuximab, simile a daratumumab, può essere usato con pomalidomide o carfilzomib e offre un'alternativa valida (Moreau P. et al., 2021). Doxorubicina e soxorubicina liposomiale sono antracicline e presentano un'attività marginale come singolo agente nel trattamento del mieloma multiplo. Uno studio clinico di fase III ha mostrato che il tempo mediano alla progressione (TTP) era superiore con bortezomib più doxorubicina liposomiale pegilata rispetto al solo bortezomib, rispettivamente 9,3 mesi contro 6,5 mesi e la sopravvivenza globale a 15 mesi era anch'essa superiore, 76% contro 65%. Nonostante questi risultati, la doxorubicina liposomiale è raramente utilizzata nel trattamento del mieloma multiplo recidivato a causa della disponibilità di altri agenti attivi. I regimi che includono doxorubicina, come PAD o VDT-PACE, possono essere utili per pazienti con mieloma multiplo aggressivo refrattario ad altri trattamenti standard (Orlowski R.Z. et al., 2007). Il venetoclax non è approvato per il mieloma multiplo, ma è disponibile commercialmente e ha un'attività specifica nei pazienti con sottotipo t(11;14). Tuttavia, in uno studio clinico randomizzato, è stata osservata una mortalità significativamente più alta con il venetoclax nei pazienti con mieloma recidivato, nonostante risposte più profonde e una migliore sopravvivenza libera da progressione. Pertanto, questo farmaco è considerato un'opzione investigativa e dovrebbe essere riservato ai soggetti con mieloma recidivato e sottotipo t(11;14) che

hanno scelte terapeutiche limitate (Kumar S. et al., 2017), (Kumar S. et al., 2019). Opzioni emergenti includono la terapia CAR-T, come idecabtagene vicleucel e ciltacabtagene autoleucel, che hanno mostrato significativi benefici clinici e sono approvate per pazienti con recidiva refrattaria. Anche gli anticorpi bispecifici e nuovi farmaci sperimentali come l'iberdomide e il modakafusp alpha stanno mostrando promettenti risultati in diversi studi clinici (Raje N. et al., 2019), (Rajkumar S.V. et al., 2022).

IMMUNOSORVEGLIANZA

Il sistema immunitario svolge principalmente tre distinti ruoli nella prevenzione del cancro: 1) protegge l'ospite dalle infezioni virali cercando di impedire lo sviluppo di tumori indotti da virus; 2) evita la creazione di un ambiente infiammatorio che possa favorire il processo di tumorigenesi; 3) elimina cellule tumorali in alcuni tessuti perché le nascenti cellule trasformate possono esprimere ligandi che attivano i recettori presenti sulle cellule del sistema immunitario innato ed adattativo (Vesely M.D. et al., 2011).

La continua interazione del sistema immunitario con lo sviluppo di un tumore è il risultato di uno stato dinamico di equilibrio. Questo equilibrio dipende dal bilanciamento tra i compartimenti T effettori e T regolatori. Laddove le cellule T regolatorie possono infiltrarsi ed accumularsi all'interno del tumore, le cellule T effettorie falliscono nel farlo. Il risultato di questo bilanciamento è critico per la sopravvivenza; in alcuni casi l'equilibrio può rapidamente sfociare nell'eliminazione delle cellule trasformate (neoplastiche); in molti altri casi l'equilibrio può sfociare nella sopravvivenza del tumore che si adatta per sfuggire al controllo da parte del sistema immunitario (Quezada S.A. et al., 2011) Inizialmente è stato proposto da Burnet e Thomas un concetto di immunosorveglianza secondo il quale il sistema immunitario fisiologicamente riconosce ed elimina cloni di cellule trasformate. Secondo tale teoria il sistema immunitario fornisce una sorveglianza continua all'organismo distruggendo le cellule che hanno subito mutazioni o modificazioni fenotipiche. Tale concetto in realtà è limitato poiché il sistema immunitario sembra avere da un lato un ruolo di contrasto dello sviluppo tumorale e dall'altro un ruolo di rimodellamento del clone neoplastico nel corso della sua progressione (Quezada S.A. et al., 2011).

Studi su modelli murini hanno dimostrato che somministrando cancerogeni chimici come ad esempio il 3'-metilcolantrene (MCA) a topi immunocompetenti e immunodeficienti, la probabilità di avere in questi animali l'insorgenza di tumore è nettamente superiore nei topi immunodeficienti. I topi immunodeficienti sono tali in quanto non esprimono il gene RAG-2 e di conseguenza, non potendo produrre cellule NKT, T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$, risultano essere deficitari della risposta immune sia innata che adattativa. Questi studi hanno evidenziato come i soggetti che presentano immunodeficienza siano più predisposti all'insorgenza del tumore, confermando il ruolo chiave del sistema immunitario nel contrastare lo sviluppo e la crescita tumorale (Vesely M.D. et al., 2011). Ulteriori studi condotti su modelli murini hanno dimostrato come i tumori sviluppati in topi immunocompetenti siano qualitativamente differenti da quelli sviluppati in topi immunodeficienti. Sono state utilizzate in questi esperimenti cellule tumorali di tumori cresciuti in topi immunocompetenti ed in topi immunodeficienti. Queste cellule tumorali, una volta prelevate e coltivate in vitro, sono state inoculate in topi *wilde-type*. Nel caso in cui le cellule inoculate provenissero da un tumore cresciuto in un topo immunocompetente si osservava la crescita del tumore in tutti i topi che erano stati sottoposti all'inoculo, quindi crescita del 100%. Nel caso in cui le cellule inoculate derivassero da tumori cresciuti in topi immunodeficienti il 50% dei topi inoculati sviluppava il tumore e il 50% no. Quindi nel primo caso si parla di tumori modificati da un punto di vista immunologico, nel secondo caso si parla di tumori modificati e non. I tumori modificati sono tumori in grado di ridurre la propria immunogenicità, sfuggire al controllo del sistema immunitario e continuare a crescere. I tumori non modificati invece sono riconosciuti dal sistema immunitario dell'ospite ed attaccati. Pertanto, è stato introdotto il termine più ampio di "*immunoediting*", per sottolineare la capacità del sistema immunitario non solo di riconoscere ed eliminare il tumore, ma anche di modificarlo, favorendone la sopravvivenza. Il processo di immunoediting consta di tre fasi sequenziali: eliminazione, equilibrio, evasione o *escape* (**Figura 3**) (Dunn G.P. et al., 2004). La fase di eliminazione coincide con l'originale concetto di immunosorveglianza ed è una fase in cui il sistema immunitario innato ed adattativo lavorano insieme per riconoscere i cloni trasformati e distruggere il tumore prima che possa diventare clinicamente evidente. Il meccanismo attraverso il quale il sistema immunitario è allertato dalla presenza del clone neoplastico non è completamente chiaro. Sono coinvolti diversi elementi: produzione di interferone (IFN) di tipo I che attiva le cellule dendritiche e

promuove l'induzione di risposte adattative contro il tumore; il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte delle cellule tumorali apoptotiche e da parte delle cellule dell'immunità innata; il rilascio di DAMPs (*damage-associated molecular pattern*) da parte delle cellule tumorali in necrosi o in seguito a danni tissutali determinati dall'invasione tumorale; l'espressione sulla superficie delle cellule tumorali dei ligandi di stress che si legano ai recettori di attivazione sulle cellule dell'immunità innata, inducendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie e immunomodulatorie che creano un microambiente che facilita lo sviluppo della risposta immunitaria adattativa tumore specifica. In questa fase è necessaria quindi una coordinata e bilanciata attivazione del sistema immunitario innato e del sistema immunitario adattativo per proteggere l'ospite dalla progressione tumorale (Dunn G.P. et al., 2004).

La fase di equilibrio è dovuta alla capacità di alcune cellule neoplastiche di sopravvivere alla fase di eliminazione e di essere funzionalmente quiescenti. Si crea un equilibrio dinamico tra il sistema immunitario adattativo dell'ospite (in questa fase il sistema immunitario innato non agisce) e le cellule tumorali; questo equilibrio che si instaura mantiene in uno stato di quiescenza le cellule tumorali stesse. Tale fase può durare anche delle decadi ed è caratterizzata dalla formazione di nuove varianti cellulari determinate dalle centinaia di nuove mutazioni che durante questo periodo coinvolgono il clone neoplastico. Questo permette al clone di acquisire un fenotipo tale da determinare una immunoresistenza. L'instabilità genomica sembra possa essere il meccanismo predominante nella generazione di queste nuove varianti tumorali con ridotta immunogenicità (Smyth M.J. et al., 2006).

La fase di *escape* è una fase in cui avviene la selezione delle cellule tumorali mutate in grado di resistere e/o evadere la risposta immunitaria. Il sistema immunitario durante la fase di *escape* non è più in grado di controllare il clone neoplastico con conseguente proliferazione incontrollata e formazione di un tumore clinicamente evidente. I meccanismi con i quali avviene l'immuno-evasione sono molteplici e comprendono sia alterazione dei meccanismi effettori immunitari sia acquisizione da parte delle cellule tumorali di resistenza immunitaria come per esempio l'espressione persistente di fattori pro-oncogenici come STAT3 oppure l'espressione di molecole effettrici anti-apoptotiche come BCL-2. Altri meccanismi importanti sono: cellule T antigene-specifiche funzionalmente deficienti, incapaci di migrare al sito tumorale (deficit di chemiotassi), o anergiche poiché prive del segnale costimolatorio, o incapaci

di differenziarsi nel microambiente tumorale; invisibilità del tumore al sistema immunitario a causa della ridotta e/o assente espressione di molecole MHC di classe I associata spesso a quella di componenti del sistema di processazione e presentazione dell'antigene; perdita di espressione di antigeni tumorali specie quelli più immunogenici (Bottino C. et al., 2006) formazione di uno stato immunosoppressivo nel microambiente tumorale; resistenza delle cellule tumorali alla lisi da parte dei linfociti T citotossici (CTL) (Medema J.P. et al., 2001); induzione da parte delle cellule tumorali dell'apoptosi nei linfociti T mediante la via del recettore FAS (Zitvogel L. et al., 2006) o ancora produzione di citochine e fattori inibitori della risposta T cellulare quali TNF- α , IL-10, GALECTINA-1, IDO (*indoleamina 2,3-diossigenasi*); reclutamento da parte del tumore di cellule Treg CD4⁺ CD25⁺ con attività immunosoppressiva. Una volta stimulate, le Treg inibiscono la funzione dei linfociti T tumore-specifici attraverso la produzione di citochine immunosoppressive, quali l'IL-10 e TGF- β , attraverso l'espressione di molecole costimolatorie ad azione inibente, quali CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*), PD-1 (*Programmed death 1*) ed il PD-L1 (*Programmed death ligand 1*) e attraverso il consumo di IL-2, citochina importante per il mantenimento della funzione dei CTL.

Non sempre si manifestano tutte e tre le fasi (eliminazione, equilibrio, escape), spesso si entra direttamente nella fase di equilibrio bypassando la fase iniziale di eliminazione. Tutti questi meccanismi possono cooperare durante la progressione del tumore allo scopo di limitare la capacità del sistema immune di controllarne la crescita.

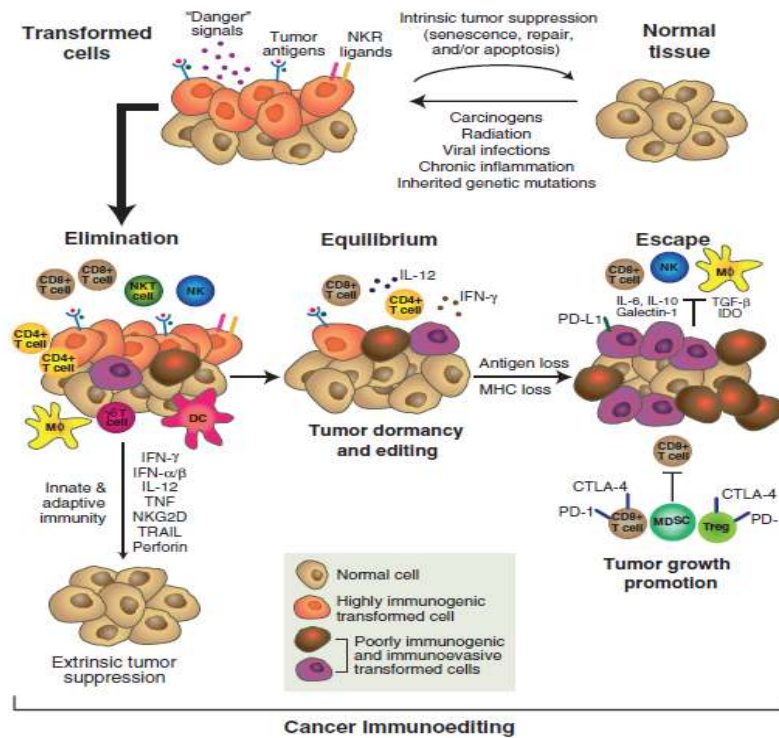


Figura 3. Immunoediting.

RUOLO DEL MICROAMBIENTE

Le recenti ricerche riguardo l'interazione tra le cellule di MM ed il loro microambiente midollare si focalizzano sull'interazione cellula-cellula e cellula-matrice; inoltre è di estrema importanza la funzionalità di molecole quali fattori di crescita, citochine e chemochine (**Figura 4**). La componente cellulare del microambiente comprende le cellule stromali midollari, osteoblasti, cellule endoteliali e le cellule dell'immunità innata ed adattativa, incluse le cellule T regolatorie. L'interazione tra il MM ed il suo microambiente sembra essere bidirezionale: ad esempio, da un lato le cellule di derivazione mieloide inducono la crescita delle cellule tumorali tramite la soppressione degli effetti del sistema immune, dall'altro sono stimulate nella proliferazione dalle stesse cellule di mieloma (Röllig C. et al., 2015). Il compartimento non cellulare include la matrice extracellulare, gas tra cui l'ossigeno e l'ambiente liquido (citochine, fattori di crescita e chemochine), che sono prodotti dal compartimento cellulare all'interno del microambiente midollare. Tutti questi elementi modulano in modo differenziale la progressione del tumore e possono anche funzionare sinergicamente (Liu W.M. et al., 2004). La stabilità clinica delle lesioni di

tipo MGUS, nonostante l'evoluzione del clone tumorale, suggerisce che l'avanzamento della malattia può dipendere anche dalla comunicazione tra cellule tumorali e microambiente tumorale (Leone P. et al., 2020). Le proteine ed i recettori della membrana cellulare rappresentano molecole che regolano la migrazione, la permeabilità cellulare, l'angiogenesi e la progressione neoplastica (Röllig C. et al., 2015). Le complesse interazioni tra cancro e sistema immunitario producono effetti sia pro che antitumorali, il cui equilibrio può essere spostato a favore di un ambiente immunosoppressivo che promuove la progressione del tumore. Da un lato, le plasmacellule tumorali possono essere rilevate da cellule dell'immunità innata ed adattativa ed in particolare le cellule T citotossiche tumore-specifiche possono essere osservate nel bone marrow dei pazienti con MGUS e MM (Leone P. et al., 2020); dall'altro, le PCs hanno la capacità di sviluppare un microambiente tollerante e di attivare sistemi immunosoppressivi al fine di bloccare risposte immunitarie efficaci. Meccanismi importanti di evasione della risposta immunitaria sono l'alterazione del fenomeno di processazione e presentazione dell'antigene e della risposta delle cellule T, la disfunzione delle cellule Natural Killer (NK) e T Natural Killer (NKT), il reclutamento locale, l'espansione e l'attivazione di cellule immunosoppressive come le cellule T regolatorie e le cellule soppressorie di derivazione mieloide (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*, MDSCs) e la differenziazione pro-tumorale dei macrofagi associati al tumore e delle cellule T-helper 17 (Th17) (Leone P. et al., 2020).

Svolgono un ruolo cruciale numerose citochine prodotte dalle cellule mielomatose e dalle cellule stromali come IL-6 (*interleuchina 6*), TNF- α (*Tumor necrosis factor α*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Per quanto riguarda l'IL-6 la trascrizione è mediata da NF- κ B (*nuclear factor κ B*) e dalla secrezione delle cellule mielomatose. In condizioni normali IL-6 è capace di stimolare la differenziazione dei linfociti B in plasmacellule ma non la loro proliferazione. Al contrario, nelle cellule di mieloma, IL-6 innesca la proliferazione cellulare (via RAS-MAPK), promuove la sopravvivenza (sistema JAK-STAT), aumenta la resistenza all'apoptosi (attivazione della via di segnale PI3K-AKT), stimola la secrezione di VEGF (Musolino C. et al., 2017)

TNF- α è una citochina prodotta da cellule mielomatose e cellule stromali del midollo osseo, attiva il fattore nucleare κ B e up-regola l'espressione di molecole di adesione, favorendo le interazioni delle cellule mielomatose con le cellule stromali e

promuovendo la sopravvivenza delle cellule tumorali e la protezione da stimoli apoptotici (Musolino C. et al., 2017).

Esiste anche un loop paracrino tra cellule endoteliali del microambiente midollare e cellule mielomatose. Le plasmacellule tumorali overesprimono e secernono VEGF il quale, interagendo con il recettore di tipo 2 per VEGF espresso sulle cellule endoteliali, stimola la proliferazione e la chemiotassi delle stesse, favorendo quindi il processo di angiogenesi ovvero di formazione di nuovi vasi a partire da vasi preesistenti (Ribatti D. et al., 2014). Le cellule endoteliali dei neovasi presentano alterazioni fenotipiche con alterata espressione di molecole coinvolte nella presentazione antigenica, quindi acquisiscono la capacità di modulare in senso negativo l'attività antitumorale delle cellule T CD8⁺ con cui vengono in contatto (Leone P. et al., 2018).

Un'aumentata densità microvascolare nel midollo osseo sembra correlare con la progressione di malattia e con una prognosi sfavorevole (Moschetta M. et al., 2016).

Le cellule mielomatose promuovono l'aumento dell'attività osteoclastica attraverso la produzione di fattori che attivano e stimolano gli osteoclasti quali TNF- α , MIP1- α (*Macrophage Inflammatory Proteins 1- α*), IL-3, IL-6, VEGF e RANKL e che inibiscono la produzione di OPG (*osteoprotegerina*) (Moschetta M. et al., 2016). L'OPG in condizioni normali sequestra RANKL (*Receptor Activator of Nuclear factor KB ligand*), espresso dalle cellule stromali e dagli osteoblasti, impedendone il legame con RANK (*Receptor Activator of Nuclear factor KB*) espresso sulla membrana cellulare dei precursori degli osteoclasti, inibendone quindi la maturazione e di conseguenza anche l'attività di riassorbimento osseo. In corso di MM l'espressione di RANKL aumenta, mentre quella di OPG diminuisce, si ha quindi un incremento del numero e dell'attività degli osteoclasti, con conseguente erosione ossea. Una diretta conseguenza del rimodellamento osteoclastico è l'ipercalcemia. Le cellule mielomatose secernono fattori che inibiscono il differenziamento degli osteoblasti. In particolare, il pathway WNT (*Wingless-type MMTV integration site family member*) gioca un ruolo fondamentale nel differenziamento degli osteoblasti. La molecola DKK1 (*Dickkopf-related protein 1*) è un inibitore del pathway WNT e risulta essere up-regolata nelle cellule mielomatose soprattutto dei pazienti con lesioni litiche. DKK1, in particolare, blocca il meccanismo di osteoblastogenesi, e favorisce quello di osteoclastogenesi incrementando l'espressione di RANKL e riducendo l'espressione di OPG (Sugiura H. et al., 2018).

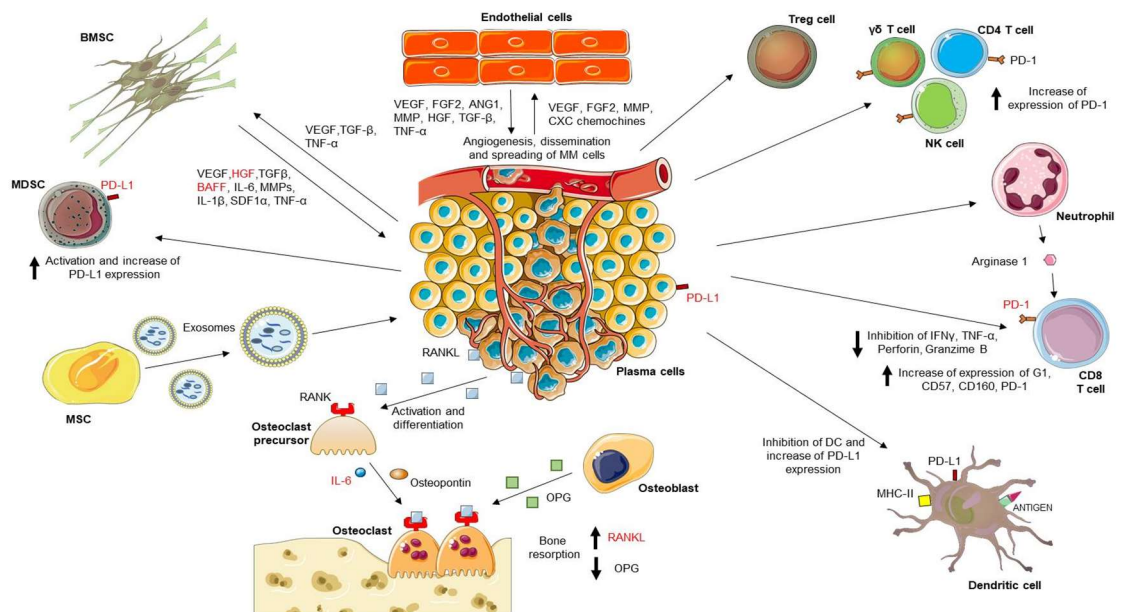


Figura 4. Ruolo del microambiente tumorale. Il microambiente midollare del MM è altamente arricchito di fattori che sostengono la proliferazione delle cellule residenti nel midollo osseo, comprese le plasmacellule di mieloma, le cellule endoteliali e le cellule stromali del midollo osseo (BMSC), attori di due importanti circoli viziosi. Da un lato, le BMSC rilasciano il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di crescita degli epatociti (HGF), il fattore di crescita trasformante- β (TGF- β), il fattore di attivazione delle cellule B (BAFF), l'interleuchina (IL)-6, le metalloproteinasi della matrice (MMP), l'IL-1 β , il fattore 1 alfa derivato dalle cellule stromali (SDF1 α), il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) che stimolano la proliferazione delle plasmacellule del mieloma. D'altra parte, le plasmacellule del mieloma producono VEGF, TGF- β , TNF- α che sostengono la crescita e l'attivazione delle BMSC e stimolatori delle cellule endoteliali come chemochine VEGF, FGF2, MMP, CXC che promuovono la neo-angiogenesi. Le cellule endoteliali stimolate rilasciano anche VEGF, FGF2, angiopoietina 1 (ANG1), MMP, HGF, TGF- β , TNF- α che assicurano l'apporto nutrizionale per la crescita del mieloma. Inoltre, le cellule staminali mesenchimali (MSC) presenti nel midollo di pazienti con MM rilasciano esosomi con maggiore espressione di proteine oncogene, citochine, proteina chinasi e microRNA (miRNA) che vengono trasferiti alle plasmacellule mielomatose con conseguente evoluzione della malattia. La progressione è favorita anche dall'ambiente fortemente immunosoppressore del midollo osseo. Le plasmacellule di MM inducono l'attivazione delle cellule T regolatorie (Treg) e delle cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSC) e l'aumento dell'espressione della morte cellulare programmata-1 (PD-1) sulle cellule T gamma delta ($\gamma\delta$), sulle cellule T CD4, sulle cellule natural killer (NK) e sulle cellule T CD8. I neutrofili secernono arginasi 1 coinvolta nella disfunzione delle cellule T CD8 a causa dell'aumentata espressione

di PD-1, G1, CD57, CD160 e della ridotta secrezione di IFN γ , TNF- α , perforina e granzima (B). Anche le cellule dendritiche subiscono inattivazione e aumentano i livelli di marcatori inibitori come il ligando di morte programmata 1 (PD-L1) (Solimando A.G. et al., 2022).

IMMUNOGENICITÀ DELLE PLASMACELLE NEL MIELOMA

La caratteristica distintiva delle plasmacellule di MGUS e MM è la produzione e l'espressione superficiale di un'immunoglobulina monoclonale (Ig) che trasporta determinanti antigenici (idiotipici o Id) unici nella variabile pesante (VH) (Mellstedt H. et al., 1984). Pertanto, la struttura idiotipica Ig è un antigene tumore-specifico del clone cellulare del mieloma, distinto dalle cellule normali o dalle plasmacellule normali, che può presentarsi come molecola intera sulla superficie cellulare o come peptidi nel solco delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) (Bogen B. et al., 1993), (Weiss S. et al., 1989). Diversi studi hanno descritto linfociti T citotossici idiotipo-specifici nei pazienti con MM con la capacità di lisare plasmacellule tumorali primarie autologhe. Molti potenziali epitopi di cellule T sono stati identificati all'interno della regione Ig-VH derivata dal tumore, tuttavia, la maggior parte di essi non ha innescato risposte di cellule T ad alta affinità (Brown R.D. et al., 2002). Due algoritmi di previsione dei peptidi, BIMAS e SYFPEITHI, hanno anche confermato la scarsa immunogenicità degli idiotipi umani con una bassa emivita legante (BIMAS) e un punteggio basso/intermedio (SYFPEITHI) sulla maggior parte dei moduli dell'antigene leucocitario umano (HLA) di interazione delle cellule T (Hansson L. et al., 2003), (Sze D.M. et al., 2003). Inoltre, la vaccinazione idiotipica nel MM è stata esaminata in studi clinici in cui si sono verificate risposte immunologiche in <50% dei pazienti e le risposte cliniche sono state poco frequenti (Bogen B. et al., 2006).

All'interno degli antigeni tumorali universali, molti antigeni associati al mieloma (ad esempio la trascrittasi inversa della telomerasi umana (hTERT) (Maecker B. et al., 2005), il surviving (Grube M. et al., 2007), l'antigene del carcinoma a cellule squamose esofagee di New York 1 (NY-ESO1) (Szmania S. et al., 2007), mucina-1 (MUC-1) (Treon S.P. et al., 2000), la molecola di adesione giunzionale A (JAM-A) (Kelly K.R. et al., 2015), (Solimando A.G. et al., 2017) ed il recettore per la motilità mediata dall'acido ialuronico (RHAMM) (Schmitt M. et al., 2008) sono stati identificati come bersagli riconosciuti dai linfociti T e utilizzati in molte strategie vaccinali, ma nella maggior parte dei casi queste ultime non sono riuscite a produrre

risposte clinicamente significative. Tuttavia, è necessario superare molti ostacoli, il più importante dei quali è l'*escape* delle plasmacellule di mieloma dalla risposta immunitaria specifica del tumore. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che le plasmacellule con i suoi ligandi CD80/CD86 espressi sulle cellule dendritiche (DC) del midollo osseo determinano una sottoregolazione dell'espressione delle subunità del proteasoma, un'alterazione del repertorio antigenico visualizzato sulla superficie delle plasmacellule tumorali e un ridotto riconoscimento delle plasmacellule mielomatose da parte delle cellule T citotossiche CD8⁺ (Leone P. et al., 2015), (Leone P. et al., 2020).

CELLULE T CD8⁺ CITOTOSSICHE TUMORE-SPECIFICHE

I meccanismi alla base della progressione da MGUS a MM non sono completamente compresi. Cellule T CD8⁺ specifiche per le plasmacellule tumorali sono state rilevate sia in pazienti con MGUS che in pazienti con MM (Racanelli V. et al., 2010), (Dhodapkar M.V. et al., 2003), (Dhodapkar M.V. et al., 2002), stabilendo così che non esiste tolleranza ai tumori plasmacellulari. Tuttavia, nel MM, la proliferazione delle plasmacellule non è contrastata dalle cellule T CD8⁺. Queste osservazioni hanno riaperto l'interesse per i meccanismi di immunosorveglianza della crescita tumorale (Finn O.J. et al., 2003). Sebbene le plasmacellule mielomatose non differiscano significativamente dai loro precursori MGUS precancerosi per quanto riguarda le anomalie citogenetiche (Fonseca R. et al., 2002), (Kuehl W.M. et al., 2002) e i profili di espressione genica (Zhan F. et al., 2002), è stato scoperto che le cellule T CD8⁺ non riescono a limitare l'espansione clonale delle plasmacellule tumorali nel MM. I nostri studi hanno dimostrato che la trasformazione maligna delle plasmacellule è associata ad un'espressione alterata dei componenti del macchinario di presentazione e dell'elaborazione dell'antigene HLA di classe I (APM). Queste alterazioni sono rilevabili ex vivo, si verificano a livello trascrizionale e, in alcuni casi, sono potenziate dall'IL-6, una citochina essenziale in questa patologia. Per alcuni componenti dell'APM, i cambiamenti sono correlati all'entità della lisi delle plasmacellule da parte delle cellule T CD8⁺ e alle variazioni del livello sierico della componente M nei pazienti con MGUS (Racanelli V. et al., 2010). La sottoregolazione delle subunità del proteasoma, in particolare, è maggiore nelle plasmacellule di pazienti con MM rispetto a quelle di pazienti con MGUS e le plasmacellule di MM vengono lisate meno facilmente dalle cellule T CD8⁺ citotossiche autologhe espanse in vitro rispetto alle

plasmacellule di MGUS. Questa differenza nella citotossicità è evidente a livello dell'epitopo e non è dovuta alle caratteristiche intrinseche delle cellule T CD8⁺, dato che non si osserva alcuna differenza quando le cellule T CD8⁺ vengono testate contro cellule bersaglio HLA-compatibili diverse dalle plasmacellule (Racanelli V. et al., 2010).

Questi risultati supportano l'ipotesi che la sottoregolazione della subunità del proteasoma diminuisce l'espressione dei peptidi dell'antigene tumorale sulle plasmacellule tumorali, consentendo loro di eludere il riconoscimento e l'uccisione delle cellule T CD8⁺ (Leone P. et al., 2015). Inoltre, queste alterazioni nell'espressione dei componenti APM sono specifiche di ciascun clone di plasmacellule precancerose e maligne, suggerendo che la risposta delle cellule T specifica del mieloma può differire da un paziente all'altro. Infatti, le cellule T CD8⁺ isolate da pazienti con MGUS e MM possono essere attivate ex vivo da cellule dendritiche (DC) caricate con lisati tumorali autologhi ma non allogenici (Dhodapkar M.V. et al., 2003), (Dhodapkar M.V. et al., 2002), (Wen Y.J. et al., 2002). La scoperta che la compromissione della risposta delle cellule T è limitata agli antigeni del mieloma è supportata anche dall'assenza di un'immunodeficienza clinica delle cellule T. I pazienti affetti da mieloma mostrano un'adeguata immunità delle cellule T contro gli antigeni esterni e non mostrano un'aumentata incidenza di infezioni micobatteriche o di seconde neoplasie associate a virus (Joshua D. et al., 2016).

Alcuni antigeni condivisi sono stati identificati come bersagli di una risposta immunitaria spontanea nei pazienti con MGUS ma non con MM, suggerendo la capacità del sistema immunitario di riconoscere lesioni precancerose. Ad esempio, il compartimento clonogenico CD138⁻ nei pazienti con MGUS esprime SOX2, una proteina delle cellule staminali embrionali coinvolta nel potenziale di inizio del tumore e nell'auto-rinnovamento delle cellule tumorali. L'espressione di questo antigene identifica eventuali progenitori del MM e il rilevamento di cellule T anti-SOX2 è associato a un miglioramento dell'esito clinico in pazienti con disturbi asintomatici delle plasmacellule. SOX2 è espresso anche dalle cellule CD138⁺ nei pazienti con MM attivo, che non sviluppano immunità anti-SOX2 (Spisek R. et al., 2007).

Studi recenti indicano anche che le cellule T citotossiche CD8⁺ specifiche per il MM non esprimono CD28 ed esprimono bassi livelli di proteina di morte cellulare programmata-1 (PD-1), antigene-4 dei linfociti T citotossici (CTLA-4), gene di attivazione dei linfociti 3 (LAG3) e immunoglobulina-3 delle cellule T (TIM-3) (Suen

H. et al., 2016). Queste caratteristiche rafforzano ulteriormente l'idea che le cellule T CD8⁺ specifiche per il MM non sono anergiche o esaurite. Sembrano invece "senescenti" dato che esprimono alti livelli di CD57, CD160 e del recettore G1 simile alla lectina delle cellule killer (KLRG1), non esprimono CD27 e CD28 e mostrano una debole proliferazione dopo la stimolazione dell'antigene (Suen H. et al., 2016). Quindi, fondamentalmente, le cellule T CD8⁺ specifiche per il MM appaiono differenziate tardivamente e sospese in uno stato iporesponsivo e non proliferativo. È interessante notare che questo stato è indipendente dai telomeri e potenzialmente reversibile (Suen H. et al., 2016) poiché le cellule T CD8⁺ specifiche per il MM presentano lunghezze dei telomeri normali per età e i pazienti con lunga sopravvivenza al MM possiedono cloni di cellule T citotossiche con capacità proliferativa conservata (Bryant C. et al., 2013), (Leone P. et al., 2020).

CD4⁺ T HELPER CELLS

Il ruolo delle cellule T helper CD4⁺ nel MM non è ancora chiaro; dati controversi possono essere giustificati da differenze tra midollo osseo e sangue periferico, o da un diverso metodo di quantificazione (conteggio assoluto rispetto a percentuale), o da cambiamenti nella polarizzazione Th1/Th2 durante il decorso della malattia. Mentre alcuni autori hanno riportato un alterato equilibrio Th1/Th2 fortemente supportato da IL-6, con un aumento della produzione di citochine Th2, come IL-10 e IL-4 e una diminuzione della produzione di citochine Th1, come IL-2 e IFN- γ (Frassanito M.A. et al., 2001), (Sharma A. et al., 2010), altri hanno descritto un elevato rapporto Th1/Th2 nei pazienti con MM alla diagnosi e in fase refrattaria, indicando una stretta correlazione con le caratteristiche cliniche (Feng P. et al., 2015), (Murakami H. et al., 2004), (Ogawara H. et al., 2005). Inoltre, livelli aumentati di PD-1 sulle cellule CD4⁺ sono stati osservati nei pazienti con MM con malattia minima residua persistente (MRD) e in caso di recidiva rispetto alle cellule T dei pazienti con MGUS e MM diagnosticati per la prima volta (Paiva B. et al., 2015). Le cellule CD4⁺ nel midollo osseo mielomatoso esprimendo PD1, interagiscono con le plasmacellule e le DC che mostrano sulla loro superficie il ligando di morte programmata 1 (PD-L1) promuovendo la soppressione delle cellule T e la progressione del MM (Dhodapkar M.V. et al., 2015).

Livelli elevati di interleuchina (IL)-6, fattore di crescita trasformante (TGF)- β e IL-1 β nel microambiente del midollo osseo del mieloma promuovono la polarizzazione delle

cellule T helper produttrici di IL-17 (Th17) con conseguente aumento dei livelli di IL-17 nel midollo osseo e sangue periferico di pazienti con MM (Bryant C. et al., 2013), (Noonan K. et al., 2010), (Prabhala R.H. et al., 2010), (Shen C.J. et al., 2012). IL-17 induce la crescita delle plasmacellule tumorali e la formazione di colonie tramite il recettore di IL-17 e inibisce la risposta immunitaria Th1 (Prabhala R.H. et al., 2010). La quantità di cellule Th17 nel midollo osseo è correlata positivamente con le caratteristiche clinicopatologiche del MM, come lo stadio clinico del tumore, la concentrazione sierica di lattato deidrogenasi e la concentrazione di creatinina sierica (Shen C.J. et al., 2012). Inoltre, IL-17 svolge un ruolo nella malattia litica dell'osso mediata dagli osteoclasti (Noonan K. et al., 2010). Recentemente è stata proposta l'esistenza di un legame immunologico diretto tra l'intestino e il midollo osseo nel MM che coinvolge le cellule Th17. Utilizzando un modello murino Vk*MYC, è stato dimostrato che il microbiota intestinale induce la differenziazione delle cellule Th17 nell'intestino che sono in grado di migrare nel midollo osseo, dove promuovono la progressione del MM (Calcinotto A. et al., 2018). IL-17 attiva anche gli eosinofili coinvolti nell'homing delle plasmacellule nel midollo osseo e nel loro accumulo nella nicchia del midollo osseo (Calcinotto A. et al., 2018), (Chu V.T. et al., 2011), (Leone P. et al., 2020).

CELLULE T REGOLATORIE

Esiste una notevole controversia riguardo alla frequenza e alla funzione delle cellule T regolatorie (*Treg*) nel MM a causa della loro fonte (sangue periferico rispetto a midollo osseo), delle differenze nei test, nelle tecniche di purificazione e nei marcatori utilizzati per identificare queste cellule. La popolazione *Treg* è descritta come ridotta e/o disfunzionale (Feng P. et al., 2015), (Ganeshan P. et al., 2011), (Prabhala R.H. et al., 2006) o aumentata e/o funzionale (Bryant C. et al., 2013), (Beyer M. et al., 2006), (Braga W.M. et al., 2014), (Feyler S. et al., 2009), (Frassanito M.A. et al., 2015) (Giannopoulos K. et al., 2012), (Muthu Raja K.R. et al., 2012), (Wang J.N. et al., 2018) nei pazienti con MM rispetto ai pazienti con MGUS o ai controlli normali. Inoltre, l'aumento della frequenza delle cellule *Treg* CD4⁺ e CD8⁺ nei pazienti con MM è correlato alla fase attiva (Frassanito M.A. et al., 2015) e ad una ridotta sopravvivenza (Frassanito M.A. et al., 2015), (Alrasheed N. et al., 2020). Le plasmacellule di MM possono indurre direttamente *Treg* funzionali in modo contatto-dipendente agendo come cellule presentanti l'antigene (APC) immature e tollerogeniche (Frassanito M.A.

et al., 2015), nonché in modo indipendente dalle APC mediante l'espressione del ligando costimolatore inducibile delle cellule T (ICOSL) (Feyler S. et al., 2012). È possibile che le interazioni reciproche e dinamiche tra le cellule del microambiente del midollo osseo insieme al rilascio di citochine modulino la frequenza e l'attività soppressiva delle cellule *Treg*. Negli esperimenti di cocoltura, citochine come IL-10 e TGF- β e DC immature mieloidi umane sono le più efficaci per l'induzione e l'espansione della popolazione *Treg* (Banerjee D.K. et al., 2006), (Levings M.K. et al., 2005). L'interazione cellula tumorale-DC immatura stimola la produzione di TGF- β da parte delle DC inducendo la proliferazione delle cellule *Treg* (Ghiringhelli F. et al., 2005). Il nostro studio ha dimostrato che la cellula endoteliale (EC) può agire come APC semi-professionale stimolando una popolazione di cellule T CD8⁺ tumore-specifiche con funzione soppressiva all'interno del midollo osseo dei pazienti con MM (Leone P. et al., 2018). Inoltre, le cellule T antigene leucocitario umano G (HLA-G⁺) con un'attività inibitoria paragonabile alle *Treg* naturali possono essere generate nel midollo osseo di pazienti con MM dopo l'interazione plasmacellule tumorali-cellule T mediante trogocitosi di molecole immunosoppressive come HLA-G (Brown R. et al., 2012).

CELLULE NATURAL KILLER (NK)

La differenziazione, l'attivazione e la capacità citotossica delle cellule natural killer (NK) sono fortemente compromesse durante la progressione del MM (Dosani T. et al., 2015). Le plasmacellule di mieloma di pazienti in stadio iniziale mostrano bassi livelli di molecole MHC di classe I e alti livelli di catena A (MICA) correlata a MHC di classe I e sono facilmente riconosciute dalle cellule NK (Carbone E. et al., 2005). Tuttavia, un numero elevato di cellule NK nel midollo osseo e nel sangue dei pazienti con MM è associato a prognosi peggiori (García-Sanz R. et al., 1996). Il riconoscimento e l'uccisione delle cellule del mieloma da parte delle cellule NK coinvolge un'ampia gamma di recettori attivanti tra cui il gruppo natural killer 2D (NKG2D), la molecola accessoria del DNAX-1 (DNAM-1) e i recettori naturali della citotossicità (NCR) NKp46, NKp30 e NKp44 (Carbone E. et al., 2005), (El-Sherbiny Y.M. et al., 2007). Cambiamenti nell'espressione di questi recettori NK e dei ligandi dei recettori delle cellule NK sono stati osservati in campioni di midollo osseo di pazienti con MGUS e MM, suggerendo un ruolo della disfunzione delle cellule NK durante la progressione da MGUS a MM (Costello R.T. et al., 2013). Inoltre, a seguito

di un'ampia interazione con le cellule T citotossiche e NK, le plasmacellule del mieloma ottenute da pazienti con malattia attiva mostrano l'immunofenotipo della classe MHC I^{bright}/MICA^{dim}^{-/-}/CD95^{dim}^{-/-} che compromette la funzione delle cellule NK (Carbone E. et al., 2005), (Bernal M. et al., 2009), (Jinushi M. et al., 2008). Allo stesso modo, il numero di cellule NK effettrici localizzate nel midollo osseo diminuisce progressivamente durante la crescita del MM ed è correlato alla ridotta degranolazione delle cellule NK nel midollo osseo nei topi portatori di MM (Ponzetta A. et al., 2015). Inoltre, la perdita di MICA dalla superficie delle plasmacellule del mieloma può promuovere la sottoregolazione dell'espressione di NKG2D sulla superficie delle cellule NK indebolendo la risposta antitumorale mediata da NK (Jinushi M. et al., 2008), (von Lilienfeld-Toal M. et al., 2010). Le funzioni difettose delle cellule NK possono essere spiegate anche dall'espressione di PD-1 sulle cellule NK dei pazienti con MM che interagiscono con i suoi ligandi PD-L1 sulle plasmacellule tumorali riducendo la funzione delle cellule NK (Benson D.M. Jr et al., 2010). Inoltre, il rilascio di fattori solubili nel microambiente del midollo osseo può influenzare l'attività delle cellule NK. Ad esempio, un ambiente infiammatorio ricco di IFN- γ secreto dalle cellule immunitarie aumenta fortemente l'espressione di PD-L1 (Garcia-Diaz A. et al., 2019). Inoltre, le plasmacellule del mieloma primario esprimono alti livelli di molecole HLA-E che si legano al recettore inibitorio delle cellule NK NKG2A ostacolando le funzioni effettrici delle cellule NK (El-Sherbiny Y.M. et al., 2007), (Fauriat C. et al., 2007), (Sarkar S. et al., 2015) (Tognarelli S. et al., 2018), (Leone P. et al., 2020).

CELLULE T NATURAL KILLER (NKT)

La disfunzione delle cellule NKT è stata riconosciuta come potenzialmente importante nella predisposizione e progressione della malattia (Dhodapkar M.V. et al., 2016). Una progressiva diminuzione delle cellule NKT e una perdita di attività delle cellule NKT sia del sangue periferico che del midollo osseo nei pazienti con MM sono state descritte da molti gruppi, con la progressione della malattia correlata a una riduzione della produzione di IFN- γ da parte delle cellule NKT (Dhodapkar M.V. et al., 2003), (Nur H. et al., 2013), (Pasiarski M. et al., 2015). Allo stesso modo, è stata dimostrata una perdita di espressione di CD1d da parte delle plasmacellule del mieloma durante la progressione della malattia con conseguente disfunzione delle cellule NKT (Dhodapkar M.V. et al., 2003), (Nur H. et al., 2013), (Chan A.C. et al., 2014),

(Spanoudakis E. et al., 2009). Uno studio recente ha dimostrato un arricchimento delle molecole di lisofosfatidilcolina associate all'infiammazione nel siero di pazienti con MM rispetto a donatori sani insieme ad un aumento della frequenza delle cellule NKT di tipo II limitate a CD1d che riconoscono la lisofosfatidilcolina. Queste cellule rilasciano elevate quantità di IL-13, una citochina immunosoppressiva coinvolta nell'infiammazione e nell'angiogenesi che promuovono il tumore, supportando così il loro ruolo nella progressione della malattia (Chang D.H. et al., 2008). Inoltre, le cellule NKT di tipo II possono anche promuovere la differenziazione delle plasmacellule e svolgere un ruolo nell'inizio del MM (Nair S. et al., 2015), (Nair S. et al., 2018).

CELLULE DENDRITICHE (DC)

Il ruolo delle DC nella progressione del MM è controverso. Alcuni ricercatori hanno riportato funzionalità e profilo fenotipico compromessi, mentre altri hanno rilevato che queste cellule sono normali (Guillerey C. et al., 2016). Abbiamo dimostrato che le DC nel midollo osseo sono funzionali e svolgono un ruolo duplice, ma opposto, nel MM. Le DC sono concentrate nel midollo osseo durante la progressione da MGUS a MM e interagiscono sia con le cellule T che con le plasmacellule del mieloma. Da un lato, le DC sono in grado di captare le plasmacellule apoptotiche di mieloma, maturare ed elaborare gli antigeni di mieloma, presentarli in modo incrociato e attivare con successo le cellule T CD8⁺ infiltranti il midollo osseo specifiche; d'altra parte, utilizzando le loro molecole CD80/86 di superficie, le DC interagiscono con le plasmacellule tumorali non apoptotiche mediante il recettore CD28 che è sovraregolato sulla loro superficie, promuovendo una downregolazione dell'espressione della subunità del proteasoma e una conseguente fuga delle plasmacellule di mieloma dal riconoscimento e dalla citotossicità delle cellule T CD8⁺ (Leone P. et al., 2015). Inoltre, le DC plasmacitoidi promuovono la crescita delle plasmacellule tumorali, la sopravvivenza e la resistenza ai farmaci (Chauhan D. et al., 2009) ed esprimono elevati livelli superficiali di ligando di morte programmata 1 (PD-L1) che conferisce la soppressione immunitaria delle cellule T e delle cellule NK coinvolgendo i checkpoints immunitari (ICP) tramite l'asse di segnalazione PD1-PD-L1 (Ray A. et al., 2015), (Sponaas A.M. et al., 2015). Le DC mieloidi CD141⁺ esprimono anche PD-L1 e la proporzione di queste cellule è correlata alla percentuale di plasmacellule PD-L1⁺, suggerendo che entrambi i sottogruppi di cellule supportano l'inibizione della risposta delle cellule T antitumorali nel MM (Sponaas A.M. et al.,

2015). Le DC possono anche favorire indirettamente il processo di osteoclastogenesi inducendo l'espansione delle cellule Th17 nel microambiente midollare del mieloma (Dhodapkar K.M. et al., 2008) seguita dall'accumulo di IL-17, un potente fattore pro-osteoclastogenico (Kotake S. et al., 1999), (Leone P. et al., 2020).

CELLULE SOPPRESSIVE DI DERIVAZIONE MIELOIDE

Negli esseri umani, due sottoinsiemi principali di cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSC) con lo stesso livello di attività soppressiva possono essere identificati in base alla positività al CD14, MDSC granulocitiche (G-MDSC) che sono CD11b⁺CD14⁻CD33⁺CD15⁺HLA-DR^{-/low} e MDSC monocitiche (M-MDSC) che sono CD11b⁺CD14⁺CD33⁺HLA-DR^{-/low} (Peranzoni E. et al., 2010). Il coinvolgimento di questi sottogruppi nella patogenesi del MM non è ancora chiaro. Diversi studi hanno riscontrato un aumento significativo delle G-MDSC nel sangue periferico e nel midollo osseo di pazienti con MM di nuova diagnosi, recidivante e recidivante/refrattario rispetto ai donatori sani (Favaloro J. et al., 2014), (Görgün G.T. et al., 2013), (Ramachandran I.R. et al., 2013), mentre altri hanno descritto un aumento delle M-MDSC nei soggetti con prima diagnosi e pazienti con MM recidivante rispetto a quelli in remissione e ai donatori sani (Brimnes M.K. et al., 2010), (Wang Z. et al., 2015). Inoltre, il livello di M-MDSC è correlato alla progressione della malattia (Wang Z. et al., 2015). A causa della loro capacità di sopprimere l'immunità mediata dalle cellule T, le MDSC svolgono un ruolo importante nel favorire la fuga del tumore dall'immunosorveglianza (Görgün G.T. et al., 2013), (Ramachandran I.R. et al., 2013). Le MDSC secernono elevate quantità di arginasi che sequestra la L-arginina, un amminoacido essenziale per l'attività delle cellule T (Rodriguez P.C. et al., 2004). Inoltre, le MDSC possono inibire il recettore delle cellule T mediante nitrosilazione e rilascio di specie reattive dell'ossigeno (Serafini P. et al., 2006) ed esprimere sulla loro superficie elevati livelli di PD-L1 che può interagire con PD-1 espresso sulle cellule T (Castella B. et al., 2015). Inoltre, le MDSC inducono la differenziazione delle *Treg* attraverso meccanismi TGF- β -dipendenti e indipendenti che coinvolgono rispettivamente CD40 o IL-10 e IFN- γ (Favaloro J. et al., 2014), (Serafini P. et al., 2006), inducono l'anergia delle cellule NK attraverso il legame di TGF- β 1 alla membrana (Lazarova M. et al., 2019), (Li H. et al., 2009), promuovono l'angiogenesi tumorale mediante la secrezione di MMP-9 o la differenziazione diretta in cellula endoteliale (EC) (Yang L. et al., 2004) e stimolano la crescita del tumore attraverso il

rilascio di citochine e fattori di crescita (Görgün G.T. et al., 2013). Utilizzando modelli murini immunocompetenti, è stato dimostrato che l'immunosoppressione delle MDSC si verifica precocemente nel MM. In tale esperimento è stato dimostrato che le MDSC si accumulavano nel midollo osseo dei topi già una settimana dopo l'inoculazione del tumore e quando questi topi furono progettati per perdere la capacità di accumulare MDSC, la crescita delle plasmacellule tumorali era significativamente ridotta, confermando il ruolo critico dell'accumulo di MDSC nelle fasi iniziali della progressione della malattia (Ramachandran I.R. et al., 2013), (Leone P. et al., 2020).

CHECKPOINTS IMMUNOLOGICI (ICP) NEL MIELOMA MULTIPLO

I principali ICP, CTLA-4 e PD-1/PD-L1, sono emersi come i più comuni meccanismi di fuga immunitaria nel MM. Questi *pathway* sono cruciali nel contesto fisiologico per mantenere l'equilibrio immunitario dopo la risposta iniziale delle cellule T e prevenire l'eccessiva attivazione del sistema immunitario e il danno tissutale. Le cellule tumorali sovregolano questi meccanismi biologici di tolleranza e li sfruttano per eludere l'immunità dell'ospite (Gajewski T.F. et al., 2013). Per quanto riguarda il MM, esistono risultati contraddittori in questo campo, dovuti principalmente alle diverse fonti analizzate (sangue periferico rispetto al midollo osseo) che suggeriscono un ruolo fondamentale dell'ambiente locale nella regolazione dell'espressione delle cellule immunitarie. Diversi studi hanno riscontrato un aumento del numero di cellule *Treg* CTLA4⁺ nel midollo osseo dei pazienti con MM rispetto ai pazienti con MGUS e ai donatori sani (Braga W.M. et al., 2014), (Muthu Raja K.R. et al., 2012), (Zelle-Rieser C. et al., 2016), con una correlazione tra la proporzione di cellule contemporaneamente positive per CTLA4 e FoxP3 e lo stadio della malattia (Frassanito M.A. et al., 2015). L'espressione di PD-1 è aumentata sulle cellule T NK e $\gamma\delta$ isolate da pazienti con MM ed è correlata alla perdita della funzione delle cellule effettrici (Castella B. et al., 2015), (Benson D.M. Jr et al., 2010). Le cellule T CD4⁺ e CD8⁺ esprimono bassi livelli di PD-1 nei pazienti con MGUS e MM di nuova diagnosi, suggerendo che la sottoregolazione della loro funzione effettrice è in parte dovuta alla senescenza piuttosto che all'esaurimento mediato da PD-1 (Suen H. et al., 2016), (Zelle-Rieser C. et al., 2016), (Suen H. et al., 2015). Paiva et al. hanno riportato un aumento dei livelli di espressione di PD-1 sulle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ solo nel MM recidivante o recidivante/refrattario e in pazienti con malattia residua minima (Paiva B. et al., 2015). PD-L1 è fortemente espresso sulle plasmacellule ottenute da pazienti con MM con malattia attiva,

recidivante e refrattaria, mentre è stata riscontrata una bassa espressione su plasmacellule di pazienti con MGUS o donatori sani, suggerendo che l'espressione di PD-L1 è associata alla progressione del MM e resistenza ai farmaci (Paiva B. et al., 2015), (Sponaas A.M. et al., 2015), (Liu J. et al., 2007), (Tamura H. et al., 2013), (Yousef S. et al., 2015). Inoltre, fattori solubili come l'IFN- γ , l'IL-6 e l'indoleamina 2,3-diossigenasi (IDO), rilevati ad alti livelli nel microambiente del midollo osseo del mieloma, sovraregolano l'espressione di PD-L1 sulle plasmacellule del mieloma (Liu J. et al., 2007), (Tamura H. et al., 2013), (An G. et al., 2016). PD-L1 è espresso anche da altre cellule del microambiente del midollo osseo del mieloma, comprese le DC plasmacitoidi, le cellule NK e le MDSC, in base alle loro funzioni immunoregolatorie (Ray A. et al., 2015), (Sponaas A.M. et al., 2015), (Benson D.M. Jr et al., 2010), (Favaloro J. et al., 2014), (Tamura H. et al., 2013), (Leone P. et al., 2020).

FATTORI IMMUNOSOPPRESSIVI

Insieme alla comunicazione tra plasmacellule tumorali e cellule della nicchia del midollo osseo, un'elevata concentrazione di fattori immunosoppressivi tra cui TGF- β , IL-10, IL-6 e prostaglandina E2 nel microambiente del midollo osseo promuove la propagazione e la sopravvivenza del tumore e allo stesso tempo genera una grande disfunzione immunitaria (Pratt G. et al., 2007). Inoltre, il contatto tra le plasmacellule di mieloma e le DC immature del midollo osseo, attraverso l'interazione CD47-trombospondina-1, porta alla fusione spontanea delle DC e alla trans-differenziazione in osteoclasti (Kukreja A. et al., 2009), (Tucci M. et al., 2011), che, oltre al loro ruolo nelle lesioni ossee, promuovono un microambiente immunitario soppressivo che induce l'apoptosi delle cellule T mediante la sovraespressione di molecole ICP e il rilascio di IDO e APRIL (An G. et al., 2016). Inoltre, IDO provoca anergia nelle cellule T attivate, le induce a diventare Treg e genera una nicchia nutrizionalmente impoverita favorendo la sopravvivenza delle cellule di mieloma che hanno un basso indice proliferativo e sono meno sensibili alla deplezione di triptofano (An G. et al., 2016); APRIL incrementa l'espressione di PD-L1 sulle cellule di MM fornendo la soppressione immunitaria (An G. et al., 2016). Allo stesso tempo, l'instaurarsi di uno stato infiammatorio cronico contribuisce anche alla progressione della malattia (Botta C. et al., 2016). Sono stati rilevati livelli aumentati di citochine infiammatorie, come IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, TNF- α e IFN- γ rilevati nel siero midollare di pazienti con MM (Musolino C. et al., 2017) ed è stata descritta una firma

di otto geni (IL-8, IL-10, IL-17, CCL3, CCL5, VEGFA, EBI3 e NOS2) coinvolti nell'infiammazione delle cellule B in grado di distinguere le diverse fasi della progressione della malattia (MGUS/smoldering/symptomatic-MM) con una precisione dell'84% (Botta C. et al., 2016). Inoltre, l'infiammazione può portare a livelli elevati di lipidi bioattivi, come diverse specie di lisofosfatidilcolina, che possono legarsi alle molecole CD1d con conseguente disregolazione delle cellule immunitarie reattive ai lipidi, attivazione delle cellule NKT di tipo II ristrette a CD1d e produzione di quantità elevate di lipidi bioattivi della citochina immunosoppressiva IL-13 (Chang D.H. et al., 2008).

II SISTEMA IMMUNITARIO COME TARGET TERAPEUTICO: UN APPROCCIO EFFICACE PER IL TRATTAMENTO DEL MIELOMA MULTIPLO

Considerando il grande impatto immunosoppressivo del microambiente midollare nel MM, sono state elaborate molte strategie per superarlo e ripristinare l'immunosorveglianza (**Figura 5**). Il trapianto di cellule staminali (SCT) autologo successivo al trattamento mieloablativo consente l'introduzione di un nuovo sistema immunitario e ha contribuito significativamente a migliorare la sopravvivenza dei pazienti con MM negli ultimi 15 anni (Rajkumar S.V. et al., 2020). Sfortunatamente, la risposta del trapianto contro il mieloma (graft versus myeloma- GvM) è solitamente debole e la maggior parte dei pazienti presenta recidive. Un'alternativa è la terapia adottiva con linfociti infiltranti il midollo osseo arricchiti in cellule T specifiche per il mieloma che potenzia l'immunità antitumorale, ma ha una scarsa durabilità della risposta clinica (Noonan K.A. et al., 2015), o il SCT allogenico che fornisce un nuovo repertorio di cellule T, innesca una potente risposta GvM, ma che è limitata dall'elevata mortalità correlata al trapianto (Bensinger W. Et al., 2014). L'emergere di terapie di blocco degli immuno-checkpoint (ICP) nell'ultimo decennio ha suscitato grande interesse anche per il MM. Nonostante inizialmente, studi in vitro e in vivo abbiano dimostrato che il blocco di PD-1/PD-L1 ha potenziato le risposte immunitarie anti-mieloma mediate dalle cellule T e NK (Paiva B. et al., 2015), (Castella B. et al., 2015), (Benson D.M. Jr et al., 2010), (Görgün G. et al., 2015), (Hallett W.H. et al., 2011), (Kearl T.J. et al., 2013), suggerendo che l'inibizione dell'ICP potrebbe essere una promettente strategia terapeutica, gli studi clinici hanno fornito risultati

insoddisfacenti (Suen H. et al., 2015). Una possibile spiegazione è che le cellule T specifiche del mieloma abbiano un fenotipo anergico o senescente piuttosto che un fenotipo esaurito, un prerequisito per il successo delle terapie di blocco dell'ICP. Le attuali linee di evidenza indicano che il fenotipo senescente potrebbe essere invertito da farmaci immunomodulatori (IMiD), talidomide e dai suoi analoghi lenalidomide e pomalidomide, o inibitori dell'istone deacetilasi (Suen H. et al., 2016). Oltre ai loro effetti antitumorali diretti (Hideshima T. et al., 2000), gli IMiD promuovono l'attivazione immunitaria compreso il miglioramento funzionale delle cellule T, NK e NKT, l'aumento della produzione di citochine Th1, la riduzione dell'attività delle Treg, il miglioramento della maturazione e delle funzioni delle DC e il potenziamento degli anticorpi anti-tumorali (Hideshima T. et al., 2000), la citotossicità cellulo-mediata dipendente da anticorpi anti-MM (ADCC) (Costa F. et al., 2017), (Galustian C. et al., 2009), (Luptakova K. et al., 2013). Pertanto, gli IMiD esercitano effetti anti-angiogenici e antinfiammatori e possono interrompere le interazioni tra plasmacellule e microambiente del midollo osseo (Quach H. et al., 2010). È interessante notare che studi in vitro hanno dimostrato che il trattamento con lenalidomide riduce l'espressione di PD-1 sulle cellule T e NK e l'espressione di PD-L1 sulle plasmacellule tumorali e sulle MDSC (Benson D.M. Jr et al., 2010), suggerendo che gli IMiD potrebbero potenziare l'effetto dell'inibitore dell'ICP (Görgün G. et al., 2015). In effetti, le strategie terapeutiche combinate con IMiD e inibitori dell'ICP hanno ottenuto risultati promettenti con sicurezza accettabile e risposte durature. Uno studio di fase II (NCT02289222) che ha combinato l'anti-PD-1 pembrolizumab con pomalidomide e desametasone a basso dosaggio in 48 pazienti con MM recidivante/refrattario ha prodotto una risposta obiettiva del 60%, inclusa una risposta completa rigorosa/risposta completa dell'8%, una risposta parziale molto buona del 19% e una risposta parziale del 33%, con una durata mediana della risposta di 14,7 mesi (Badros A. et al., 2017). I successivi studi di fase III su pembrolizumab in combinazione con pomalidomide e desametasone (NCT02576977) o lenalidomide e desametasone (NCT02579863) sono stati interrotti dalla Food and Drug Administration statunitense a causa di risultati insoddisfacenti in termini di risposta obiettiva e elevata mortalità (Costa F. et al., 2018). Uno studio di fase I sull'anti-PD-1 nivolumab in combinazione con IMiD, daratumumab e inibitori del proteasoma ha rivelato che questa terapia combinata è efficace con un basso profilo di tossicità in pazienti con MM altamente pretrattati e refrattari. Sono in corso ulteriori studi clinici

per valutare l'efficacia e la tossicità di nivolumab in combinazione con altri farmaci anti-mieloma negli stadi iniziali della malattia e nei pazienti con MM a basso rischio. Inoltre, sono altamente attesi studi clinici sugli anticorpi monoclonali (mAb) anti-PD-L1 (atezolizumab e durvalumab) da soli o in combinazione con altri agenti anti-mieloma (Soekojo C.Y. et al., 2020). Lo studio di fase III ICARIA-MM che ha confrontato la combinazione di isatuximab, pomalidomide e desametasone rispetto a pomalidomide e desametasone da soli in pazienti con MM recidivante/refrattario ha rivelato che isatuximab nel regime di combinazione ha aumentato il numero di pazienti che hanno ottenuto una risposta e ha migliorato significativamente l'intensità della risposta e la sopravvivenza libera da progressione mediana (Attal M. et al., 2019). Strategie alternative includono l'uso di agenti per interrompere le interazioni tra cellule del midollo osseo e mieloma. Uno di questi agenti è elotuzumab, un mAb umanizzato che si lega a SLAMF7 (membro 7 della famiglia delle molecole di segnalazione di attivazione linfocitaria), un recettore immunomodulatore espresso su diverse cellule ematopoietiche, comprese le cellule di mieloma e le cellule NK (Balasa B. et al., 2015), (Cannons J.L. et al., 2011), (Collins S.M. et al., 2013). Uno studio di fase I, multicentrico, in aperto, con incremento della dose di elotuzumab ha mostrato un profilo di tossicità favorevole ma nessuna risposta obiettiva con malattia stabile riportata nel 26% dei pazienti (Zonder J.A. et al., 2012). Tuttavia, la combinazione di elotuzumab con pomalidomide e desametasone ha rivelato un miglioramento significativo rispetto a pomalidomide e desametasone da soli negli esiti del trattamento dei pazienti con MM recidivante/refrattario. Nello specifico, il tasso di risposta globale è stato più elevato nel gruppo elotuzumab (53%) rispetto al gruppo di controllo (26%) con una migliore sopravvivenza libera da progressione osservata principalmente nei pazienti pretrattati con almeno quattro linee terapeutiche precedenti o nei pazienti considerati affetti da malattia ad alto rischio sulla base dei criteri dell'*International Myeloma Working Group* (Dimopoulos M.A. et al., 2018).

L'immunoterapia con cellule T ingegnerizzate con recettore chimerico per l'antigene (CAR-T) di mieloma, ad esempio CAR-T anti-antigene di maturazione delle cellule B (BCMA), è usata per il trattamento del mieloma refrattario e recidivante. Tuttavia, la durata di risposta è limitata e anche i pazienti con una risposta iniziale completa alla fine vanno incontro ad una ricaduta. Inoltre, gli effetti collaterali includono la sindrome da rilascio di citochine e neurotossicità (Cohen A.D. et al., 2019), (Raje N. et al., 2019). Il principale meccanismo di resistenza alla terapia con cellule CAR-T è l'evasione di

cellule tumorali completamente differenziate che esprimono livelli più bassi di BCMA. Recentemente, il recettore SLAM CD229/LY9 è stato utilizzato come potenziale bersaglio per la terapia con cellule CAR-T nel MM grazie alla sua forte e più ampia espressione sulla superficie delle plasmacellule del midollo osseo di pazienti con MM e MGUS e su cellule precursori delle cellule di mieloma resistenti alla chemioterapia (Carulli G. et al., 2016), (Muccio V.E. et al., 2016), (Yousef S. et al., 2015). Le cellule CAR-T CD229 hanno mostrato un'attività forte e persistente contro il MM in vitro e in vivo, colpendo in modo efficiente non solo le plasmacellule di MM differenziate terminalmente, ma anche le cellule B della memoria e le cellule di propagazione mielomatose (Radhakrishnan S.V. et al., 2020).

Altre immunoterapie, inclusi nuovi anticorpi bi-specifici, che mettono le cellule tumorali in contatto con le cellule effettrici immunitarie, ad esempio, le cellule T e le cellule NK, e i vaccini in combinazione con mAb o inibitori del checkpoint sono ancora in studi clinici in fase iniziale (Soekojo C.Y. et al., 2020). Ad oggi, gli anticorpi bi-specifici sono stati valutati in pazienti con MM recidivante/refrattario con risultati promettenti (Soekojo C.Y. et al., 2020), (Leone P. et al., 2020).

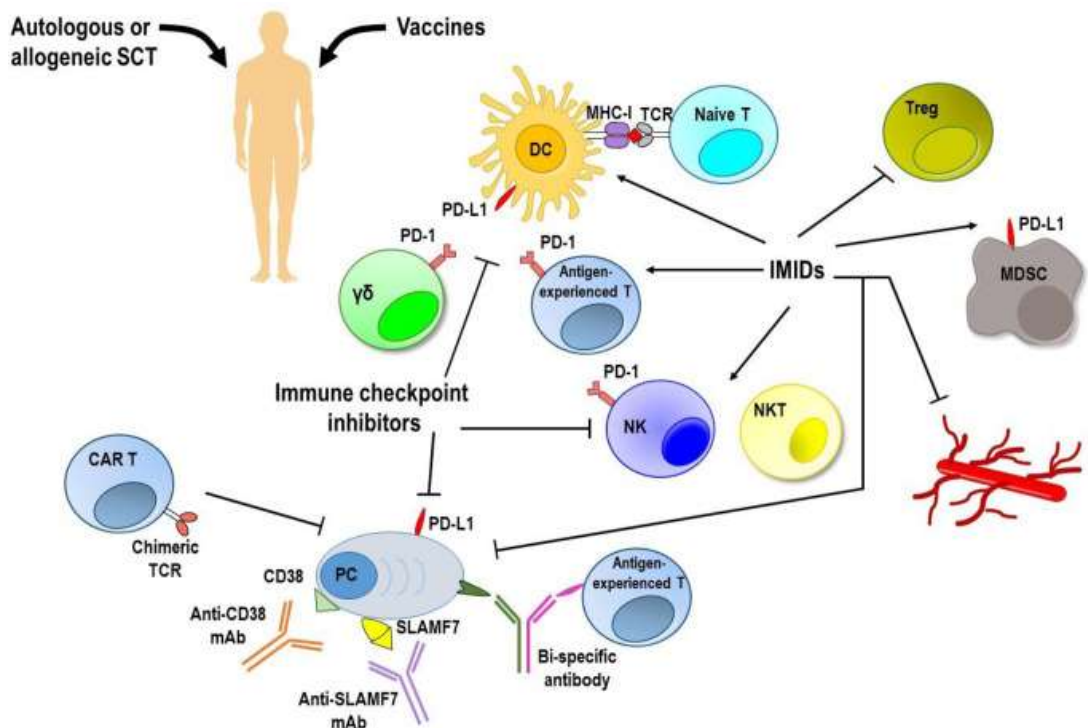


Figura 5. Il sistema immunitario come target terapeutico. Il microambiente immunosoppressore del MM rimane il principale ostacolo all'ottenere una risposta terapeutica duratura insieme ad una bassa tossicità. Le strategie di vaccinazione non

hanno mostrato una chiara efficacia clinica. Il trapianto autologo e allogenico di cellule staminali (SCT) successivo al trattamento mieloablativo consente l'introduzione di un nuovo sistema immunitario, ma genera una risposta immunitaria antitumorale molto debole. Gli inibitori del checkpoint immunitario, i farmaci immunomodulatori (IMiD) e gli anticorpi monoclonali (mAb) utilizzati come agenti singoli hanno fornito risultati insoddisfacenti. L'immunoterapia con cellule T del recettore chimerico dell'antigene (CAR-T) trasferite adottivamente e nuovi anticorpi bi-specifici è attualmente in fase di sperimentazione in studi clinici, e i risultati iniziali sono stati incoraggianti. Inoltre, approcci più recenti basati sulla combinazione di strategie immunoterapeutiche stanno ottenendo risultati promettenti con sicurezza accettabile e risposte durature. DC, cellule dendritiche; $\gamma\delta$, cellule T gamma delta; MDSC, cellule soppressive di derivazione mieloide; MHC-I, complesso maggiore di istocompatibilità di classe I; NK, cellule natural killer; NKT, cellule T natural killer; PC, plasmacellule; PD-1, morte cellulare programmata-1; PD-L1, ligando di morte programmata 1; SLAMF7, membro 7 della famiglia delle molecole di segnalazione di attivazione linfocitaria; TCR, recettore delle cellule T; Treg, cellule T regolatorie (Leone P. et al., 2020).

CD36

CD36 è una proteina multifunzionale coinvolta in diverse patologie tra cui cancro, malattie metaboliche ed infezioni. È espressa sulla superficie di cellule tumorali, stromali e immunitarie, e svolge un ruolo fondamentale nell'assorbimento dei lipidi, nel riconoscimento immunologico, nell'infiammazione, nell'angiogenesi, nell'adesione e nell'apoptosi; processi che influenzano l'inizio, lo sviluppo e la progressione del cancro.

CD36 è una glicoproteina transmembrana nota anche come FAT (*fatty acids translocase*- traslocasi degli acidi grassi), GPIV (glicoproteina IV) piastrinica, GP88 e SR-B2 (*scavenger receptor class B protein*- recettore scavenger di proteine di classe B); è localizzata sul cromosoma 7q11.2 ed è correlata alla famiglia del gene GP. Il CD36 umano contiene 472 aminoacidi e ospita due domini transmembrana, una grande regione extracellulare contenente siti di legame con il ligando e una singola coda citoplasmatica corta su ciascun terminale. Il dominio extracellulare della proteina forma due cavità idrofobiche che mediano l'assorbimento di acidi grassi essenziali, fosfolipidi e colesterolo. Inoltre i residui del dominio CLESH (sequenza omologa CD36 Emp) possono interagire con il dominio ripetuto 2 (TSR) di TSP-1 per regolare l'aggregazione piastrinica e l'angiogenesi tumorale (Wang J. et al., 2019). Studi recenti hanno rivelato che CD36 lega gli acidi grassi per agevolare il loro traffico nelle cellule,

preparando il processo di utilizzo dei lipidi (Pepino M.Y. et al., 2014), e regola lo sviluppo tumorale tramite la riprogrammazione del metabolismo del glucosio e degli acidi grassi (Pascual G. et al., 2021). Questa molecola media anche un'interazione complessa tra cellule tumorali e cellule immunitarie all'interno del microambiente tumorale (TME) per influenzare i comportamenti maligni delle cellule tumorali. CD36 contribuisce alla tumorigenesi e allo sviluppo di molteplici tipi di cancro, tra cui leucemia mieloide acuta (LMA), cancro al seno, cancro del colon retto, cancro gastrico e altre neoplasie (Pascual G. et al., 2021).

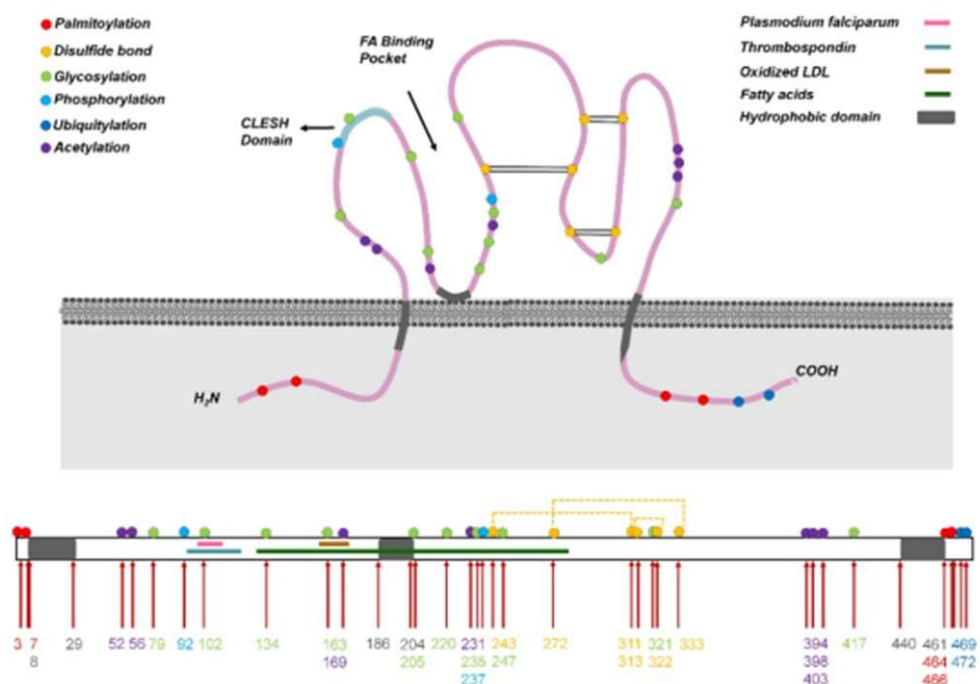


Figura 6. Recettore CD36 (Wang J. et al., 2019).

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE E DELL'ATTIVITÀ DEL CD36

Il livello di espressione di CD36 è regolato da vari fattori, tra cui stimoli ambientali e fattori trascrizionali. Numerose biomolecole, tra cui acidi grassi e *low density lipoprotein* (LDL) ossidate (ox-LDL), potrebbero sovraregolare trascrizionalmente l'espressione di CD36 per attivare ulteriormente la segnalazione oncogenica a valle e aumentare le capacità di traffico. ox-LDL può aumentare la fosforilazione mediata da CD36 dell'attivazione di JAK2 e STAT3 per migliorare i fenotipi di staminalità del cancro alla vescica (Ma X. et al., 2021). Una serie di fattori trascrizionali può legarsi al promotore di CD36 per aumentarne l'espressione. Negli epatociti, la stimolazione degli acidi grassi ambientali potrebbe guidare la sovraespressione di SOX2, quindi la

sovraregolazione trascrizionale di CD36 per guidare la steatosi epatica e persino il carcinoma epatocellulare (HCC). È stato scoperto un ciclo positivo tra STAT3 e CD36 nelle cellule del cancro al seno per mediare la progressione del tumore. STAT3 potrebbe legarsi direttamente al promotore di CD36 per aumentare la sua espressione (Gyamfi J. et al., 2021). CD36 potrebbe anche attivare l'asse di segnalazione STAT3/NF-κB per promuovere l'angiogenesi tumorale e la staminalità. Anche la modifica post-traduzionale è fondamentale per l'aumento trascrizionale dell'espressione di questo marcatore (Jiang M. et al., 2019). L'idrofobicità della proteina CD36 viene compromessa a causa della mancanza di palmitoilazione riducendone la distribuzione sulla membrana plasmatica, sottoregolando così l'assorbimento di acidi grassi nelle cellule dell'epatoma (Zhao L. et al., 2018). È stato scoperto che le palmitoil aciltransferasi contenenti il motivo Asp–His–His–Cys (DHHC), DHHC4 e DHHC5, mediano la palmitoilazione di CD36, aumentando così l'assorbimento degli acidi grassi (Wang J. et al., 2019). Meccanicisticamente CD36 potrebbe legarsi agli acidi grassi per essere depalmitoilato e reclutare la tirosina chinasi per fosforilare JNK e VAV in modo da mediare l'assorbimento endocitotico di questi lipidi (Hao J.W. et al., 2020).

IL CD36 REGOLA LO SVILUPPO DEL CANCRO: CD36 E METABOLISMO DEGLI ACIDI GRASSI

Sebbene la biosintesi degli acidi grassi sia considerata essenziale per lo sviluppo del tumore, le cellule tumorali fanno ancora molto affidamento sull'assorbimento dei lipidi dal microambiente tumorale per sostenere la loro richiesta di energia. L'assorbimento degli acidi grassi indotto da CD36 agisce come un processo chiave che prepara alla successiva ossidazione degli acidi grassi (FAO), contribuendo ai fenotipi maligni delle cellule tumorali (Ladanyi A. et al., 2018). Hanno caratterizzato un gruppo di cellule tumorali della mucosa orale CD36⁺ con elevata capacità metastatica evidenziando un ruolo chiave del metabolismo lipidico mediato da CD36 nella colonizzazione metastatica (Pascual G. et al., 2017).

ESPRESSIONE E RUOLO DEL CD36 IN ALCUNI TIPI DI CANCRO

Cancro al seno

Il tumore al seno è al primo posto per incidenza di casi di cancro a livello mondiale e al quinto per mortalità entro il 2020 (Ferlay J. et al., 2021). La proteina CD36 è sovraespressa nei tumori al seno rispetto ai tessuti normali. L'analisi tramite immunohistochimica ha mostrato che nei campioni di tessuto normale l'espressione di CD36 è minima o assente, mentre nel 35% dei campioni di tumore al seno vi è una forte espressione di CD36, nel 46,7% una moderata espressione e solo nel 18,3% un'espressione bassa o nulla. La maggior parte dei tessuti tumorali con alta espressione di CD36 presenta anche una forte infiltrazione di adipociti (Gyamfi J. et al., 2021), suggerendo che CD36 contribuisca alla ristrutturazione del microambiente tumorale (TME).

Nei pazienti con tumore al seno HER2⁺, l'alta espressione di CD36 è correlata a una prognosi sfavorevole. In un modello murino di tumore mammario HER/neu, l'espressione di CD36 è indotta dalla terapia anti-HER2 (lapatinib o trastuzumab), e la delezione specifica di CD36 nella ghiandola mammaria sopprime la crescita tumorale e prolunga la sopravvivenza (Feng W.W. et al., 2019). Coerentemente, i geni associati al metabolismo lipidico sono arricchiti nelle cellule di cancro al seno HER2⁺ resistenti al lapatinib. In queste cellule, CD36 è altamente espresso sia a livello di RNA che di proteina, e la sua riduzione tramite siRNA induce la morte cellulare per apoptosi. Inoltre, gli xenotrapianti di cellule resistenti al lapatinib trattati con un anticorpo anti-CD36 sono stati sensibilizzati al lapatinib (Feng W.W. et al., 2020), dimostrando un ruolo chiave di CD36 nello sviluppo e nella risposta alla terapia dei tumori al seno HER2⁺ (Guerrero-Rodríguez S.L. et al., 2022).

L'espressione di CD36 è stata riportata in linee cellulari tumorali appartenenti a diversi sottotipi intrinseci: luminali (Liang Y. Et al., 2018), basali, (Gyamfi J. et al., 2021) ed HER2-enriched (arricchite della mutazione HER2), (Feng W.W. et al., 2020), ma sono necessari ulteriori studi per analizzarne il ruolo funzionale in questi sottotipi. (Gyamfi J. et al., 2021) hanno utilizzato diverse linee cellulari di tumore al seno (BT-483, HCC2218, MCF-7 e MDA-MB-468) co-coltivate con adipociti per analizzare il ruolo di CD36 nel cancro al seno. L'interazione tra adipociti e cellule tumorali che sovraesprimono CD36 aumenta: 1) la formazione di gocce lipidiche (LD) e l'accumulo di acidi grassi (FA); 2) la proliferazione; 3) la migrazione e invasione; 4) la

tumorigenesi in topi nude Balb/c xenotrapiantati; 5) l'assorbimento di acidi grassi, correlato all'attivazione del programma di transizione epitelio-mesenchimale (EMT); e 6) l'espressione di marcatori associati alle cellule staminali tumorali (CSC), come CD44, CD133, ALDH, OCT4 e SOX2. La co-coltura promuove anche l'attivazione delle vie di segnalazione ERK1/2 e STAT3, con un incremento concomitante della popolazione di cellule tumorali con fenotipo staminale (CD44⁺/CD36⁺). In linea con ciò, la riduzione dell'espressione di CD36 diminuisce le caratteristiche proliferative, migratorie e invasive delle cellule tumorali e riduce l'espressione dei fattori di trascrizione regolatori dell'EMT, così come i marcatori di EMT e staminalità. Questa evidenza dimostra il ruolo di CD36 nelle caratteristiche cellulari chiave per la progressione del tumore al seno e sottolinea la speciale influenza degli adipociti nell'induzione dell'EMT e della staminalità nelle cellule tumorali CD36⁺ (Guerrero-Rodríguez S.L. et al., 2022).

Carcinoma epatocellulare

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è il tumore primario più comune del fegato, essendo il sesto tumore più comune per incidenza e la terza causa di morte per cancro a livello mondiale (Ferlay J. et al., 2021). I dati del The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) e del Gene Expression Omnibus (GEO) mostrano che l'mRNA di CD36 è altamente espresso nei tessuti di HCC rispetto ai tessuti epatici normali; analogamente, le linee cellulari di HCC (SMMC-7721, PLC/PRF/5 e HepG2) mostrano alti livelli di mRNA e proteina CD36 (Luo X. et al., 2021). Nei campioni di HCC vi è una correlazione positiva tra l'espressione dei marcatori EMT (Vimentin, SNAIL1, ZEB1, ZEB2, TGFB e PORCN) e l'espressione di CD36 (Nath A. et al., 2015). La sovraespressione forzata di CD36 nelle linee cellulari di HCC (SK-Hep-1 e Huh7) promuove la proliferazione, la migrazione e l'invasione cellulare. Le cellule mostrano un aumento della glicolisi e della capacità glicolitica, con una maggiore produzione di acido lattico. In vivo, la sovraespressione di CD36 induce una maggiore incidenza tumorale con metastasi epatiche arricchite di cellule CD36⁺. A livello meccanicistico, CD36 attiva la via Src e i suoi effettori a valle PI3K/AKT nelle cellule di HCC; di conseguenza, inibitori di PI3K o AKT o l'inibizione della via glicolitica invertono l'aumento della proliferazione e migrazione cellulare (Luo X. et al., 2021). D'altra parte, la riduzione dell'espressione di CD36 nelle cellule di HCC (SMMC-7721 e HepG2) aumenta la β -ossidazione degli acidi grassi, attiva la via della lipofagia, riduce l'accumulo di lipidi

epatici (Wang J. et al., 2019), inibisce la proliferazione cellulare e riduce la migrazione e l'invasione (Luo X. et al., 2021). Questi risultati indicano che la riprogrammazione metabolica mediata da CD36 potrebbe essere cruciale per lo sviluppo dell'HCC.

CD36 è anche coinvolto nella staminalità dell'HCC. Le cellule HepG2 e Huh7 resistenti al sorafenib mostrano una maggiore capacità clonogenica e tumorigenica e un'espressione aumentata del trasportatore ABCB1A e dei fattori di trascrizione OCT4 e NANOG (Bort A. et al., 2020). Queste cellule accumulano più lipidi neutri e presentano una maggiore espressione degli enzimi coinvolti nella sintesi di trigliceridi e acidi grassi: ATP-citrato liasi, acetil-CoA carbossilasi e sintasi degli acidi grassi; di conseguenza, mostrano una lipogenesi de novo attiva. L'aumento dell'espressione di CD36 media un maggiore assorbimento di acidi grassi, riducendo la β -ossidazione attraverso un meccanismo mediato da AMPK (Bort A. et al., 2020). Come per altri tipi di cancro, questi risultati supportano l'idea che la biosintesi dei lipidi sia coinvolta nel mantenimento della staminalità (Guerrero-Rodríguez S.L. et al., 2022).

Carcinoma a cellule squamose orali

Il carcinoma a cellule squamose orali (OSCC) si origina nella cavità orale ed è uno dei tipi più comuni di cancro della testa e del collo (Ali, 2022). CD36 è fortemente espresso nei tessuti OSCC invasivi, mentre l'epitelio orale normale presenta un'espressione debole di CD36 (Sakurai K. et al., 2020). In uno studio di coorte retrospettivo su pazienti con OSCC diagnosticato primariamente, quelli con alta espressione di CD36 mostravano una minore probabilità di sopravvivenza libera da progressione, con solo il 34% dei pazienti vivi o senza recidiva a 60 mesi. Lo studio ha anche dimostrato un aumento di 45 volte del rischio di metastasi ai linfonodi nel gruppo con alta espressione di CD36 (Haidari S. et al., 2020). In varie linee cellulari OSCC (HSC-1, HSC-3, HSC-4 e Ca9-22), l'espressione di CD36 è correlata con Ki-67, PDGFR β e una bassa espressione di E-caderina (Sakurai K. et al., 2020), suggerendo che CD36 partecipi alla proliferazione e migrazione cellulare. Coerentemente, le cellule CD36⁺ mostrano un'attività migratoria maggiore rispetto alle cellule CD36⁻ (Sakurai K. et al., 2020), e la sovraespressione forzata di CD36 in linee cellulari OSCC (SCC-25, VDH-00 e JHU-029) o in cellule derivate da pazienti aumenta l'espressione di geni associati alla metastasi e la loro capacità di metastatizzare ai linfonodi (Pascual G. et al., 2017).

La β -ossidazione degli acidi grassi (FAO) è cruciale per la formazione di metastasi da parte delle cellule CD36⁺. La sottopopolazione di cellule OSCC con il fenotipo immunitario CD36⁺/CD44^{bright} esprime livelli più elevati di enzimi coinvolti nella β -ossidazione dei FA. L'alimentazione ricca di grassi nei topi transgenici (NGS) o l'esposizione ex vivo delle cellule tumorali all'acido palmitico (PA) aumenta la dimensione e la frequenza delle metastasi linfonodali negli xenotrapianti di OSCC (Pascual G. et al., 2017). Al contrario, le cellule CD36⁻ isolate tramite FACS non generano metastasi linfonodali, e la riduzione dell'espressione di CD36 tramite short-hairpin RNA (shRNA) diminuisce il carico metastatico. Sebbene le cellule con una mutazione in CD36 (CD36-K164A) possano generare alcune metastasi linfonodali, le lesioni presentano cellule con un maggiore contenuto di gocce lipidiche (Pascual G. et al., 2017), indicando che CD36 è essenziale per la riprogrammazione metabolica e l'adattamento alla nicchia metastatica. Inoltre, le cellule CD36⁺/CD44^{bright} mostrano un potenziale metastatico dieci volte maggiore rispetto alla popolazione CD44^{bright} e generano lesioni metastatiche che riproducono l'eterogeneità molecolare e cellulare dei tumori originali (Pascual G. et al., 2017), suggerendo che CD36 possa essere un marcatore delle cellule iniziatrici di metastasi (Guerrero-Rodríguez S.L. et al., 2022).

Cancro della vescica

Il cancro della vescica è la neoplasia più comune delle vie urinarie e si suddivide in due tipi con caratteristiche molecolari diverse: nel 75% dei casi è confinato alla mucosa ed è chiamato cancro della vescica non muscolo-invasivo (NMIBC), mentre gli altri casi corrispondono al cancro della vescica muscolo-invasivo (MIBC) (Dobruich J. et al., 2021), (Jeong H. et al., 2021). I campioni tumorali NMIBC mostrano un'aumentata espressione dei trasportatori di acidi grassi FATP4, CD36 e ACSL1 (Jeong H. et al., 2021). Nel cancro della vescica di tipo MIBC, l'espressione di CD36 è correlata a una maggiore profondità di invasione tumorale (stadio pT) e agli stadi avanzati della malattia (pT3b-T4) (Pardo J.C. et al., 2022). L'espressione di CD36 è importante nella biologia della popolazione di cellule staminali tumorali (CSC) nei tumori della vescica. Il silenziamento di CD36 nelle cellule di cancro alla vescica umane riduce la clonogenicità e l'espressione dei marcatori di staminalità (ALDHA1, CD44, KLF4 e Nanog) indotti dall'esposizione a oxLDL. Coerentemente, la riduzione di CD36 diminuisce la crescita tumorale negli xenotrapianti, l'effetto pro-tumorale di una dieta ricca di grassi e colesterolo e l'espressione tumorale dei marcatori di

staminalità (Yang L. et al., 2021). Queste evidenze dimostrano che CD36 partecipa al mantenimento della staminalità e alla progressione della crescita tumorale e che oxLDL, non solo gli acidi grassi come riportato per altri tipi cellulari tumorali, potrebbe innescare segnali rilevanti mediati da CD36 (Guerrero-Rodríguez S.L. et al., 2022).

Glioblastoma

Il glioblastoma (GBM) è il tumore cerebrale maligno più aggressivo e frequente negli adulti (DeAngelis L.M. et al., 2001). Dati raccolti da Liang et al. e analizzati da Hale et al. mostrano che l'espressione di CD36 a livello di mRNA e proteina è correlata a una prognosi sfavorevole per i pazienti con GBM, indicando CD36 come un marcatore prognostico per la sopravvivenza dei pazienti (Liang Y. et al., 2005), (Hale J. S. et al., 2014). I GBM umani sono tumori altamente vascolarizzati che dipendono dalla formazione di nuovi vasi sanguigni per la crescita (Jain R. K. et al., 2007). Pertanto, sono state impiegate terapie antiangiogeniche per colpire i GBM, che hanno, tuttavia, portato alla promozione dell'invasione tumorale e delle recidive (Pàez-Ribes M. et al., 2009), (Keunen O. et al., 2011). TSP-1 è una proteina antiangiogenica che esercita i suoi effetti attraverso le sue tre ripetizioni di tipo 1 (3TSR). Le 3TSR inducono apoptosi nelle cellule endoteliali interagendo con CD36, attivando così l'apoptosi mediata da p59fyn/p39/caspasi-3 o sovraregolando i recettori di morte TRAIL DR4 e DR5 (Jiménez B. et al., 2000), (Ren B. et al., 2009). Poiché CD36 è espresso anche in un sottogruppo di cellule di GBM, sono state utilizzate cellule staminali mesenchimali ingegnerizzate che esprimono TSR3 per sensibilizzare le cellule di GBM all'apoptosi mediata da TRAIL attraverso l'attivazione della segnalazione di CD36 e la sovraregolazione dei recettori TRAIL DR4/DR5 (Choi S. H. et al., 2015).

CD36 è espresso nelle cellule staminali tumorali (CSC) del GBM, dove aiuta a mantenere la staminalità. L'analisi multidimensionale dei marcatori di staminalità ha identificato che il fenotipo immunitario CD44⁺/CD133⁺/ITGA6⁺/CD36⁺ è utile per arricchire cellule con caratteristiche staminali da diverse fonti, e la combinazione dell'espressione di CD44, CD133, ITGA6 e CD36 identifica tumori di pazienti con una sopravvivenza significativamente più breve (Erhart F. et al., 2019). La riduzione dell'espressione di CD36 tramite siRNA in vari xenotrapianti di GBM impatta sullo stato CSC 1) riducendo l'espressione di integrina $\alpha 6$; 2) attenuando la formazione di cellule tumorali; 3) diminuendo la frequenza di cellule staminali; 4) abrogando la

capacità di inizio tumorale; e 5) diminuendo le principali vie di segnalazione per il mantenimento delle CSC come SOX2, AKT fosforilato e STAT3 fosforilato (Hale J. S. et al., 2014). Inoltre, l'attivazione della segnalazione di CD36 tramite oxLDL aumenta la proliferazione della popolazione di CSC (Hale et al., 2014), dimostrando che l'espansione del pool di CSC associata a una prognosi sfavorevole è parzialmente mediata dal riconoscimento di oxLDL da parte di CD36 (Guerrero-Rodríguez S. L. et al., 2022).

Cancro del colon-retto

Il cancro del colon-retto (CRC) è la terza causa di incidenza e la seconda causa principale di morte legata al cancro (Ferlay J. et al., 2021), (Sung H. et al., 2021). L'analisi dei microarray dei tessuti CRC ha mostrato che i livelli di CD36 sono significativamente più alti rispetto alla mucosa normale, e l'espressione di CD36 è aumentata nelle metastasi epatiche e polmonari del CRC (Drury J. et al., 2022). Dati dall'Human Protein Atlas indicano che alti livelli di mRNA di CD36 sono associati a una ridotta sopravvivenza a 5 anni nei pazienti con CRC. Tuttavia, i livelli di mRNA di CD36 sono significativamente più bassi nei tessuti cancerosi del CRC nel database TCGA (Drury J. et al., 2020) o negli studi disponibili in GEO (Zhang X. et al., 2019). Per affrontare questa discrepanza, Drury et al. (2020) hanno studiato l'espressione della proteina CD36 nei tumori primari del CRC, scoprendo che può essere simile o superiore a quella nella mucosa normale, mentre la forma glicosilata di CD36 è più alta nelle metastasi epatiche del CRC rispetto al fegato normale o alla mucosa colica. L'analisi dei tumori derivati da xenotrapianti di pazienti con CRC ha dimostrato che l'espressione di CD36 glicosilato è associata ai tumori metastatici. Studi meccanicistici sul ruolo di CD36 sono stati condotti in modelli di CRC. L'overespressione di CD36 nelle linee cellulari CRC (HCT116, HT29, HT29LuM3) porta a: 1) sovraregolazione della proliferazione cellulare mediante l'aumento dell'espressione di survivin e una diminuzione del clivaggio di caspasi-3 e PARP; 2) aumento della capacità invasiva; e 3) aumento della formazione e del diametro delle colonie (Drury J. et al., 2020). Effetti opposti sono stati generati dalla riduzione forzata dell'espressione di CD36 tramite siRNA. Le cellule con sovraespressione di CD36 mostrano una maggiore frequenza di tumori ortotopici e formano più noduli metastatici rispetto alle cellule controllo (Drury J. et al., 2022), mentre le cellule con knockdown di CD36 formano significativamente meno metastasi polmonari dopo iniezione nella vena coda, suggerendo che questa

molecola promuove l'espansione delle cellule tumorali e/o iniziatrici di metastasi. Inoltre, le cellule CD36^{high} isolate da xenotrapianti derivati da pazienti con CRC presentano un'elevata espressione di survivin e formano tumori più grandi rispetto alle cellule CD36^{low} derivate dallo stesso tumore (Drury J et al., 2022), indicando che CD36 gioca anche un ruolo nella sopravvivenza e/o proliferazione delle cellule CRC. D'altra parte, Fang et al. hanno riscontrato come l'espressione della proteina CD36 è assente o debole nei campioni umani di CRC e hanno associato il segnale negativo di CD36 a una sopravvivenza complessiva peggiore (Fang Y. et al., 2019). Pertanto, sono necessari ulteriori studi utilizzando metodi e reagenti standardizzati per chiarire se l'espressione della proteina CD36 possa essere prognostica nel CRC.

CD36 potrebbe anche partecipare alla resistenza alla radioterapia (RT) delle cellule CRC. Nelle cellule HCT116, l'espressione di JAK2 aumenta dopo RT, portando all'attivazione di STAT3, che causa una limitata apoptosi indotta da RT e un aumento del potenziale clonogenico (Park S. Y. et al., 2019). CD36 è sovraregolato da RT e il silenziamento di JAK2 abolisce tale effetto (Park et al., 2019), dimostrando che CD36 è un gene bersaglio della via JAK2/STAT3 nelle cellule CRC (Guerrero-Rodríguez S. L. et al., 2022).

Cancro alla prostata

Il cancro alla prostata (PC) è il più diagnosticato e la seconda causa principale di morte tra gli uomini (Siegel R.L. et al., 2022). I pazienti con PC che consumano elevate quantità di grassi saturi nella dieta aumentano il rischio di mortalità (Epstein M.M. et al., 2012), (Richman E. L. et al., 2013) e l'assorbimento di glucosio, la lipogenesi de novo, l'assorbimento e l'immagazzinamento di acidi grassi (FA) risultano aumentati nei tessuti prostatici maligni (Watt M. J. et al., 2019), suggerendo che il metabolismo lipidico favorisca la progressione del tumore. Di conseguenza, un'espressione elevata del gene CD36 è associata a una ridotta sopravvivenza libera da recidive e a una maggiore incidenza di metastasi nel gruppo di pazienti con PC del TCGA (Watt M. J. et al., 2019).

L'esposizione di linee cellulari di tumore prostatico umano (PC3 e LNCaP) agli acidi grassi (FA) aumenta l'assorbimento di questi e favorisce la proliferazione cellulare. Al contrario, la riduzione di CD36 mediante shRNA riduce: 1) l'assorbimento e l'ossidazione degli acidi grassi liberi; 2) l'incorporazione degli acidi grassi nei lipidi complessi; 3) la proliferazione cellulare; e 4) la migrazione in risposta agli acidi grassi

liberi. La ri-espressione di CD36 nelle cellule in cui era stato soppresso ripristina i livelli di assorbimento di acidi grassi e la proliferazione a livelli basali rispetto alle linee cellulari di tumore prostatico originarie (Watt M. J. et al., 2019). Queste evidenze concordano con il fatto che il tessuto adiposo periprostatico può fornire acidi grassi per sostenere la progressione del tumore alla prostata (Taylor R. A. et al., 2015), (Lo J. C. et al., 2016). Negli xenotrapianti formati da cellule di tumore prostatico con riduzione di CD36, l'assorbimento di acidi grassi dal microambiente tumorale (TME) è compromesso, riducendo la biosintesi lipidica, l'attivazione delle vie oncogeniche di segnalazione lipidica e attenuando la crescita tumorale (Watt et al., 2019). Pertanto, il metabolismo lipidico mediato da CD36 promuove la progressione del tumore prostatico (Guerrero-Rodríguez S. L. et al., 2022).

Cancro ovarico

Il cancro ovarico (OvCa) è il quinto tumore più comune e uno dei più letali tra le donne (Siegel R. L. et al., 2022). L'espressione di CD36 è aumentata nel tumore ovarico umano primario e nelle metastasi viscerali (Wang S. et al., 2016). CD36 potrebbe mediare la stimolazione paracrina della crescita tumorale da parte degli adipociti, poiché questi ultimi promuovono la crescita e le metastasi del tumore ovarico fornendo acidi grassi (FA) (Nieman K. M. et al., 2011), (Nieman K. M. et al., 2013). La cocoltura di adipociti umani primari (HPA) con linee cellulari di OvCa (SKOV3ip1, HeyA8 o OVCAR-5) induce nelle cellule tumorali: 1) l'espressione di CD36 a livello di mRNA e proteine; 2) l'assorbimento di FA e un aumento del contenuto intracellulare di colesterolo; 3) l'accumulo di gocce lipidiche (LD); e 4) cambiamenti nel trascrittoma, caratterizzati dall'induzione di un profilo citochinico pro-infiammatorio, dallo stress ossidativo e dall'attivazione di vie che regolano la sintesi di lipidi e colesterolo (Ladanyi et al., 2018). La soppressione di CD36 tramite shRNA nelle cellule SKOV3ip1 ha ridotto: 1) l'espressione di CD36 indotta dagli adipociti; 2) l'assorbimento di FA e il contenuto intracellulare di colesterolo, anche con stimoli HPA; 3) l'accumulo di LD; 4) l'invasione e la migrazione stimulate dagli adipociti; 5) il metabolismo anaerobico del glucosio, aumentando invece l'ossidazione del glucosio; e 6) la tumorigenesi in vivo nei topi nude e il numero di noduli metastatici (Ladanyi A. et al., 2018). Il ruolo di CD36 nella popolazione di cellule staminali tumorali ovariche (CSC) è stato recentemente descritto. L'analisi del trascrittoma delle CSC della linea cellulare OVCAR3 mostra un aumento significativo dell'mRNA di CD36,

insieme alle carbossilasi coinvolte nella biosintesi degli acidi grassi. Le CSC ovariche mostrano una correlazione positiva tra l'espressione di CD36 e quella degli enzimi del metabolismo lipidico e del marcatore di staminalità OCT4 (Ghoneum A. et al., 2020). Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per chiarire le implicazioni funzionali di CD36 nelle CSC dei tumori ovarici.

Nel cancro della cervice avanzato, l'espressione di CD36 è correlata a una scarsa differenziazione tumorale, all'espressione dei marcatori di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e alla positività delle metastasi linfonodali. Pertanto, un'elevata espressione di CD36 è stata proposta come biomarcatore di prognosi sfavorevole. CD36 è espresso nelle linee cellulari di cancro della cervice (C33a, Hce1, HeLa e SiHa). Il trattamento delle cellule con TGF- β , un classico induttore di EMT, promuove l'espressione di CD36, suggerendo un legame tra l'attivazione di EMT e l'espressione di questa molecola. La riduzione di CD36 tramite siRNA in queste linee cellulari: 1) inibisce la migrazione cellulare; 2) diminuisce la capacità di invasione; 3) attenua la formazione di colonie; 4) aumenta il tasso di apoptosi; e 5) modifica la morfologia e l'espressione proteica associate a EMT (Deng M. et al., 2019). Allo stesso modo, la sovraespressione forzata di CD36 nelle cellule del cancro della cervice promuove la proliferazione, la migrazione e l'invasione cellulare (Yang P. et al., 2018), (Deng M. et al., 2019). Inoltre, la sovraespressione di CD36 favorisce la formazione di colonie in vitro, promuove EMT (Deng et al., 2019) e attiva la via di segnalazione Src/ERK1/2 (Yang P. et al., 2018). In vivo, le cellule con sovraespressione di CD36 mostrano una crescita tumorale e una capacità metastatica aumentate (Yang P. et al., 2018), (Deng M. et al., 2019), (Guerrero-Rodríguez S. L. et al., 2022).

Leucemie e linfomi

La leucemia è caratterizzata dalla proliferazione anomala delle cellule del sangue nel midollo osseo e negli organi ematopoietici. Nei pazienti con leucemia mieloide acuta (AML), l'espressione di CD36 è alta nei tumori in stadio avanzato e si correla a una citogenetica sfavorevole, una ridotta sopravvivenza globale e una minore sopravvivenza libera da malattia (Guerrero-Rodríguez S. L. et al., 2022). In AML, CD36 collabora con segnali solubili del microambiente tumorale (TME) per promuovere la progressione del cancro e la resistenza alla chemioterapia. Le cellule AML trattate con IL-6 mostrano un aumento dell'accumulo di lipidi, un maggiore assorbimento di acidi grassi (FA) e un incremento dell'espressione di CD36 a livello

di mRNA e proteina (Zhang Y. et al., 2022). I pazienti con AML con alta espressione di IL-6R mostrano resistenza alla chemioterapia e metabolismo lipidico alterato (Zhou J. et al., 2009), (Tse C. et al., 2020). La segnalazione indotta da IL-6 attiva STAT3, potenziando la tumorigenesi e la resistenza alla chemioterapia (Mauer J. et al., 2015). La riduzione dell'assorbimento di FA tramite l'inibizione di CD36 reprime la resistenza indotta da IL-6 ai farmaci citotossici. In modo simile, il knockdown di CD36 riduce l'assorbimento di FA e aumenta l'apoptosi indotta dalla chemioterapia, anche in presenza di IL-6, dimostrando che CD36 è coinvolto nell'induzione della resistenza alla chemioterapia nelle cellule leucemiche. Il knockdown di STAT3 riduce l'espressione di CD36 e l'assorbimento di FA, ma aumenta l'apoptosi, mostrando che la resistenza indotta da IL-6 dipende da STAT3, che a sua volta promuove l'espressione di CD36 regolando l'attivazione di STAT3 (Zhang Y. et al., 2022). Insieme a CD36, l'apolipoproteina C2 (APOC2) è altamente espressa nei campioni di pazienti con AML. Utilizzando cellule HEK293T, è stato dimostrato che APOC2 co-immunoprecipita con CD36 (Zhang T. et al., 2020). L'overespressione simultanea di APOC2 e CD36 nelle linee cellulari AML THP-1 o MOLM-13 aumenta la proliferazione cellulare, attivata dalla fosforilazione di ERK e LYN, in confronto all'overespressione singola di APOC2 o CD36. Il knockdown di CD36 tramite short hairpin RNA (shRNA) provoca una diminuzione dei livelli proteici di p-ERK anche nelle cellule con sovraespressione di APOC2, suggerendo un ruolo cruciale di CD36 nell'attivazione di ERK. In vivo, il knockdown di APOC2 e CD36 riduce il carico leucemico e l'innesto nel midollo osseo, nella milza e nel sangue periferico (Zhang T. et al., 2020); quindi, la segnalazione APOC2-CD36 potrebbe essere un obiettivo terapeutico interessante.

Il linfoma a cellule mantellari (MCL) è un sottotipo aggressivo di linfoma non-Hodgkin con la peggior prognosi, una scarsa risposta alla chemioterapia e un'alta incidenza di resistenza ai farmaci (Zaja F. et al., 2014). I pazienti con MCL con la massima espressione di CD36 hanno una sopravvivenza globale più breve (Luanpitpong S. et al., 2019). Nel MCL, il Bortezomib (BTZ) è combinato con chemioterapia citotossica per ottenere un tasso di risposta più elevato (Yazbeck V. et al., 2018). Le cellule MCL resistenti al BTZ hanno un contenuto lipidico cellulare aumentato e un'upregolazione della proteina CD36 sulla superficie cellulare e nei compartimenti intracellulari. L'overespressione di CD36 porta all'accumulo di gocce lipidiche (LD) e a una diminuzione dell'apoptosi. Di conseguenza, l'inibizione di CD36

nelle stesse cellule le sensibilizza all'apoptosi indotta da BTZ (Luanpitpong S. et al., 2019). Questi risultati suggeriscono l'utilità dell'inibizione di CD36 nella terapia combinata per trattare il MCL resistente ai farmaci e propongono l'espressione di CD36 come predittiva della risposta terapeutica.

Anche nella biologia della leucemia linfoblastica a cellule B (B-LL) e della leucemia linfatica cronica (CLL) CD36 sembra giocare un ruolo importante. Nei campioni pediatrici di B-LL del Children's Health of Atlanta, l'espressione di CD36 si correla con un cattivo esito. I campioni di pazienti con cellule B-LL positive per CD36 mostrano una sopravvivenza libera da eventi ridotta e una sopravvivenza globale inferiore rispetto ai pazienti CD36⁻ (Newton J. G. et al., 2017). Nella CLL, l'espressione di CD36 è più alta nei campioni tumorali rispetto a quelli di individui sani. Le cellule CLL immagazzinano lipidi in vacuoli e attivano le vie metaboliche tramite cui adipociti e miociti producono energia, un processo che potrebbe dipendere da CD36. Come nelle cellule AML, la sottoregolazione di STAT-3 nelle cellule CLL tramite siRNA riduce l'espressione di CD36 (Rozovski U. et al., 2018). Anche se gli inibitori delle tirosina chinasi sono trattamenti altamente efficaci per le leucemie, la malattia non è completamente curabile poiché la sottopopolazione di cellule staminali leucemiche (LSC) è parzialmente resistente a questi farmaci (Jiang X. et al., 2007). Le LSC possono sfruttare il loro TME, come il tessuto adiposo, per supportare le loro uniche necessità metaboliche e promuovere la loro sopravvivenza e crescita (Ye H. et al., 2016). Il tessuto adiposo gonadico (GAT) funge da serbatoio per le LSC e aiuta ad attivare il metabolismo degli acidi grassi in una sottopopolazione di LSC che esprime CD36 ed effettua un'elevata ossidazione degli acidi grassi (FAO). Sebbene le cellule CD36⁺ abbiano caratteristiche metaboliche simili a quelle delle cellule staminali ematopoietiche quiescenti, l'espressione di CD36 non è stata rilevata nelle popolazioni normali di staminali/progenitrici. La sottopopolazione di LSC CD36⁺ è meno sensibile ai chemioterapici rispetto alle LSC CD36⁻ in seguito alla somministrazione ex vivo di diversi farmaci. Questi risultati sono stati corroborati in vivo in un modello murino di AML, dove le LSC CD36⁺ nel midollo osseo e nel GAT risultavano arricchite dopo la chemioterapia. Il knockout di CD36 ha ridotto l'assorbimento di FA e FAO, diminuendo il carico leucemico nel GAT e aumentando la risposta ai farmaci chemioterapici nei topi leucemici, indicando che CD36 potenzia la colonizzazione leucemica del GAT e contribuisce alla chemio-resistenza delle LSC. Risultati simili sono stati trovati in almeno quattro degli otto campioni umani primari di leucemia

mieloide cronica (CML) o campioni di AML (Ye H. et al., 2016). Questo studio: 1) propone l'esistenza di eterogeneità metabolica nelle LSC; 2) indica un ruolo delle LSC CD36⁺ nella progressione tumorale; e 3) suggerisce che la modulazione del metabolismo degli acidi grassi potrebbe contribuire all'eradicazione delle LCS.

Le cellule tumorali possono coordinare e rimodellare in modo robusto gli acidi grassi esogeni in lipidi di segnalazione oncogenici, come glicerofosfolipidi, sfingolipidi e lipidi eteri (Louie et al. 2013). È importante sottolineare che l'assorbimento degli acidi grassi indotto da CD36 è cruciale per il lipidoma alterato e la produzione di lipidi di segnalazione oncogenici, come lisofosfolipidi acilici ed eteri. Nei tumori della prostata PTEN^{-/-}, l'inibizione di CD36 compromette l'assorbimento degli acidi grassi dalle cellule stromali adiacenti, riduce l'accumulo di lipidi di segnalazione oncogenici e diminuisce la biosintesi dei lipidi dai precursori degli acidi grassi. La terapia con anticorpi monoclonali anti-CD36 potrebbe decrementare la crescita del cancro della prostata PTEN^{-/-}, indicando potenziali effetti terapeutici dell'inibizione di questa molecola nel trattamento del cancro (Watt M. J. et al., 2019). Nel complesso, CD36 contribuisce all'accumulo di lipidi di segnalazione oncogenica per regolare l'insorgenza e la progressione del tumore.

Gli LD sono un tipo di organello responsabile dell'immagazzinamento dei lipidi. Condividono una struttura comune costituita da un nucleo idrofobico di lipidi neutri, che comprende principalmente triacilglicerolo ed estere del colesterolo e un monostrato di fosfolipidi (Olzmann J. A. et al., 2019). Gli LD possono essere interpretati come interruttori che regolano l'accumulo e il consumo di lipidi per la funzione cellulare, tra cui la produzione di ATP, la protezione contro lo stress ossidativo o la biogenesi della membrana per supportare la sopravvivenza e la crescita delle cellule tumorali (Petan T. et al., 2018). Pertanto, gli LD sono strettamente collegati al metabolismo dei lipidi e all'attivazione della segnalazione, che contribuisce alla proliferazione delle cellule tumorali, alla staminalità, alle metastasi e alla resistenza ai farmaci. Nel cancro ovarico, la sovraespressione di CD36 aumenta il numero e le dimensioni degli LD e il contenuto di colesterolo intracellulare per ridurre il contenuto di specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulare. Al contrario, l'inibizione di CD36 compromette efficacemente l'assorbimento degli acidi grassi dal TME nelle cellule del cancro ovarico, sopprimendo quindi la crescita, l'invasione e la migrazione del tumore (Ladanyi A. et al., 2018). È stato scoperto che REDD1, un attore metabolico mediato dallo stress, riprogramma il metabolismo degli acidi grassi

e migliora lo sviluppo di tumori mutanti RAS a seconda dell'assorbimento dei lipidi mediato da CD36. Nelle cellule mutanti RAS, la perdita di REDD1 induce l'accumulo di lipidi mediato da HIF1 α tramite PPAR γ e CD36, portando a un aumento dell'accumulo di lipidi e a un'elevata ossidazione degli acidi grassi. Nel complesso, questo asse HIF1 α /PPAR γ /CD36 fornisce opportunità terapeutiche essenziali per i tumori mutanti RAS/REDD1 (Qiao S. et al., 2020).

INTERAZIONE TRA CD36 E CELLULE IMMUNITARIE

CD36 ha un ruolo nella promozione tumorale influenzando il comportamento di altri componenti del TME. I macrofagi associati al tumore (TAM) mostrano un'elevata espressione di CD36, che aumenta ulteriormente l'OXPPOS mitocondriale, l'accumulo delle specie reattive dell'ossigeno ROS, la fosforilazione di JAK1 e la defosforilazione di SHP1, migliorando la differenziazione e la funzione dei TAM. (Su P. et al., 2020). È interessante notare che CD36 facilita anche l'assorbimento di miR-375 di derivazione tumorale, procurandone l'accumulo nei TAM. miR-375 può agire su TNS3 e PXN favorendo il livello di infiltrazione dei TAM (Frank A. C. et al., 2019). Le cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSC) compromettono le risposte delle cellule T antitumorali e promuovono la trasformazione maligna. Il CD36 espresso a livello delle MDSC può indurre l'assorbimento di acidi grassi da un abbondante pool di lipidi all'interno del TME. Al contrario, l'inibizione di CD36 potrebbe compromettere significativamente l'assorbimento degli acidi grassi e l'accumulo di lipidi, inibire OXPPOS e sopprimere la proliferazione tumorale attraverso una risposta dipendente dalle cellule T CD8⁺. È stato scoperto che l'inibizione farmacologica di FAO nelle MDSC blocca i segnali inibitori immunitari MDSC-mediati ed inibisce la produzione di citochine inibitorie (Hossain F. et al., 2015). Pertanto, l'inibizione di FAO è stata considerata un nuovo approccio per bloccare le MDSC. Le cellule *Treg* mostrano una maggiore espressione di CD36, che può aumentare la flessibilità mitocondriale per riprogrammare queste cellule in modo che siano più adattate al TME acido. L'inibizione di CD36 a livello delle *Treg* compromette la loro funzione aumentando gli effetti antitumorali nel cancro alla mammella (Hao J. W. et al., 2020). Inoltre, l'inibizione di CD36 aumenta anche gli effetti antitumorali della terapia anti-proteina 1 della morte cellulare programmata (anti-PD1). Nel cancro pancreatico ortotopico, durante la presentazione dell'antigene tumorale apoptotico da parte delle cellule dendritiche, CD36 potenzia la fagocitosi

delle cellule tumorali apoptotiche, compromettendo l'innescamento delle cellule T CD4⁺ (Oh D. S. et al., 2019). Al contrario, il blocco di CD36 compromette la fagocitosi delle cellule tumorali apoptotiche, aumenta l'innescamento delle cellule T CD4⁺ nelle cellule dendritiche carenti di Atg5 e compromette la crescita tumorale (Oh D. S. et al., 2019). Nel melanoma CD36 regola anche l'assorbimento degli acidi grassi da parte delle cellule T CD8⁺ inducendo la perossidazione lipidica e la ferroptosi, inibendo così la produzione di citochine citotossiche e l'anti-immunità (Ma X. et al., 2021). Inoltre, in linee cellulari murine di cancro al colon retto (MC38) e di melanoma (B16), Xu et al. hanno rilevato il ruolo di CD36 nell'assorbimento di oxLDL a carico delle cellule T CD8⁺ per aumentare la perossidazione lipidica e la sovraregolazione della chinasi p38, mettendo in risalto l'asse oxLDL-CD36 nella regolazione dell'immunità antitumorale (Xu S. et al., 2021). Pertanto, CD36 è importante per la regolazione dei fenotipi metabolici delle cellule immunitarie stromali per modulare la risposta immunitaria e lo sviluppo del tumore, manifestandosi come potenziale bersaglio terapeutico per la gestione del cancro. In effetti la deregolazione di CD36 è comunemente osservata in varie cellule tumorali, tra cui leucemia mieloide acuta, cancro al seno, cancro del colon-retto, cancro gastrico (Farge T et al., 2017), (Jiang M. et al., 2019), (Fang Y. et al., 2019), (Zaoui M. et al., 2019).

I RECETTORI ATTIVATI DAI PROLIFERATORI DEI PEROSSISOMI (PPAR)

I fattori di trascrizione chiamati Recettori Attivati dai Proliferatori dei Perossisomi (PPAR) furono scoperti 30 anni fa nei roditori (Issemann I. et al., 1990) e appartengono alla sottofamiglia 1 della super-famiglia dei recettori nucleari degli ormoni (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). I PPAR sono i recettori nucleari attivati dagli acidi grassi e comprendono tre sottotipi: PPAR α , PPAR γ e PPAR δ (anche designato come PPAR β) (Grygiel-Górniak B. et al., 2014). Sebbene tutti i PPAR svolgano un ruolo regolatore fondamentale nell'omeostasi energetica, ciascuno di essi ha funzioni e siti di espressione specifici (Grygiel-Górniak B. et al., 2014). Tutti i PPAR condividono le proprietà strutturali di base della maggior parte dei recettori nucleari, consistendo in quattro domini funzionali denominati A/B, C, D ed E/F (Nielsen R. et al., 2006). Il dominio N-terminale A/B contiene una funzione di attivazione indipendente dal ligando (AF-1), responsabile della fosforilazione di

PPAR. Il dominio centrale conservato di legame al DNA (DBD), chiamato anche dominio C, è composto da due dita di zinco ed è responsabile del legame di PPAR all'elemento di risposta dei proliferatori dei perossisomi (PPRE) nel promotore dei geni bersaglio. Il dominio D è un sito di ancoraggio per vari cofattori. Il dominio E è anche chiamato dominio di legame al ligando (LBD). Questo è composto da 12 eliche che formano una grande tasca di legame idrofobica a forma di Y, che permette alla molecola di legare ligandi lipofili endogeni o esogeni, conferendo specificità al ligando. Il legame del ligando stabilizza il LBD e promuove cambiamenti conformazionali che abilitano l'interazione con complessi coattivatori. Il reclutamento di cofattori di PPAR che partecipano al processo di trascrizione è mediato dalla funzione di attivazione dipendente dal ligando-2 (AF-2), situato nel dominio E/F (Christofides A. et al., 2020). La piena attività trascrizionale dei PPAR richiede il legame con ligandi lipidici specifici, l'eterodimerizzazione con un altro recettore nucleare (recettore X dei retinoidi, RXR), l'interazione con un certo numero di coattivatori trascrizionali, tra cui i coattivatori PGC-1 α e PGC-1 β , e il legame del complesso agli elementi di risposta dei PPAR (PPRE) nel promotore dei geni bersaglio (Nagy L. et al., 2004). Ogni membro dei PPAR ha una diversa preferenza di ligando che potrebbe essere spiegata dalle differenze nelle dimensioni o nella lipofilia delle loro tasche di legame (Michalik L. et al., 2006). Studi dettagliati con spettrometria di massa di scambio idrogeno-deuterio hanno identificato come stati strutturalmente e funzionalmente distinti dei PPAR siano indotti dal legame di agonisti rispetto ad antagonisti o agonisti inversi (Heidari Z. et al., 2019). I PPAR sono codificati da geni separati con sequenze specifiche ma sovrapposte tra le diverse specie. Il gene umano PPAR α è situato sul cromosoma 22, mentre il gene PPAR γ , per il quale sono state identificate tre isoforme (Fajas L. et al., 1998), si trova sul cromosoma 3, e PPAR β/δ è localizzato sul cromosoma 6 (Moreno M. et al., 2010). I ligandi naturali dei PPAR includono metaboliti derivati dai lipidi come acidi grassi, acil-CoA, glicerofosfolipidi ed eicosanoidi. I lipidi alimentari attivano i PPAR, come dimostrato dall'aumento dell'espressione dei geni bersaglio di PPAR α nel fegato e dei geni bersaglio di PPAR β/δ nel muscolo scheletrico, indotto da una dieta ricca di grassi (HFD) nei topi (Garcia-Roves P. et al., 2007).

FUNZIONE DEI PPAR β/δ NEL METABOLISMO LIPIDICO

È noto che PPAR β/δ promuove il catabolismo lipidico in vari tessuti e funge da mediatore dell'ossidazione degli acidi grassi e della combustione dei grassi (Coll T. et al., 2009). PPAR β/δ attiva enzimi disaccoppianti che producono calore nei tessuti adiposi bruni e nei muscoli, e protegge contro l'obesità e il fegato grasso (Wolf G. et al., 2003). In alternativa, o in parallelo, PPAR- β/δ potrebbe mediare i suoi effetti sul metabolismo dei grassi regolando l'espressione delle adipochine (Choi K. C. et al., 2007) e sopprimendo l'attivazione della STAT3 indotta da IL-6 (Serrano-Marco L. et al., 2011). Questo effetto potrebbe contribuire alla prevenzione della resistenza insulinica indotta da IL-6 negli adipociti. Pertanto, la modulazione terapeutica di PPAR- β/δ potrebbe rappresentare un approccio promettente per il trattamento dell'obesità e della sindrome metabolica. Va tuttavia notato che è necessaria cautela nell'uso di modulatori farmacologici dei PPAR, poiché molti di questi composti possono agire su più sottotipi di PPAR, sebbene a concentrazioni efficaci diverse (EC50) (Nandhikonda P. et al., 2013). Alcuni studi suggeriscono che l'attivazione di PPAR β/δ promuove la formazione di cellule schiumose e l'accumulo di lipidi attraverso l'alterazione dell'espressione di geni coinvolti nell'assorbimento, nella conservazione, nel metabolismo e nell'efflusso dei lipidi, compresi i recettori scavenger di classe A e CD36 (Vosper H. et al., 2001), (Shi H. et al., 2016). In accordo con questi studi, la delezione genetica di PPAR β/δ nelle cellule ematopoietiche di topi con deficit di LDLR determina una significativa riduzione delle lesioni aterosclerotiche aortiche, dell'espressione genica proinfiammatoria e dell'infiltrazione macrofagica delle lesioni aterosclerotiche (Li G. et al., 2016).

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Questo progetto di dottorato è focalizzato sullo studio del microambiente midollare e sull'analisi delle interazioni plasmacellula tumorale – microambiente e plasmacellula tumorale – cellule del sistema immunitario nei pazienti con MGUS e MM. L'immunofenotipizzazione citofluorimetrica delle cellule del microambiente midollare è stata eseguita sulla base dell'espressione di marcatori scelti dal pannello anticorpale *EuroFlow* (Figura 7) (van Dongen J.J. et al., 2012).



Tube	V450	BV510	FITC	PE	PerCPcy5.5	PECy7
0-B (MO)	CD38 *** (V450, BD, Ref.646851 (2,5uL)	CD27 (BV510, Biolegend, Ref.302836) (0,5uL)	cytIgM+ cytIgA (3 uL + 20 uL)	cytIgG+cytIgA (5 uL + 2 uL)	CD45 (PerCPcy5.5, Biolegend, Ref.304028) (0,5 uL)	CD19 (PECy7, Be coulter, Re IM3628) (5 uL)
1-B (SP)	CD38 *** (V450, BD, Ref.646851 (2,5 uL)	CD27 (BV510, Biolegend, Ref.302836) (0,5uL)	suIgM+ suIgA (3 uL + 20 uL)	suIgG+suIgA (5 uL + 2 uL)	CD45 (PerCPcy5.5, Biolegend, Ref.304028) (0,5 uL)	CD19 (PECy7, Be coulter, Re IM3628) (5 uL)
2-T	TIGIT (BV421, Clone:A15153G, Biolegend, Ref.372709) (1uL)	CD127 (BD: 563086) (2.5uL)	CD25 (BD, Ref.345796) (10 uL)	CD39 (PE, Clone: BD, Ref.555464) (10uL)	CD8 (PerCPcy5.5, BD, C lone: SK1 Ref.341050) (2 uL)	PD-1 (PECy7, Be coulter, Ref.A7888 (10uL)
3-T	CD27 (BD, Ref.562513) (2,5uL)	CD45RA (BD, Ref.563031) (2,5uL)	CD62L (FITC, BD, Ref.347443) (2,5uL)	CXCR3 (BD, Ref. 557185) (15uL)	CD8 (PerCPcy5.5, BD, Ref.341050) (2 uL)	CCR4 (Biolegend 9409) (2.5uL)
4-NK	CD27 (BD, Ref.562513) (2,5uL)	CD56 (BD, Ref.563041) (2,5uL)	CD62L (FITC, BD, Ref.347443) (2,5uL)	CD39 (PE, BD, ref.555464) (10uL)	HLADR (PerCPcy5.5, BD, Ref. 552764) (10 uL)	CD16 (PEC BD, Ref.55; (1 uL de dil + TCRgδ (PECy7, BD Ref.655411 (1 uL)
5-G/M-MDSCs	HLADR (PB, Biolegend, Ref.307633) (1 uL de dil. 1:5)	CD45 (OC515, Cytognos, Ref.45OC2-100T) (5uL)	CD36 (FITC, SANQUIN, Ref.M1613) (5uL)	SLAN (PE, MACs, Ref. 130-093-029) (15uL)	CD34 (PerCPcy5.5, BD, Ref.347222) (5uL)	CD16 (PECy7, BD Ref.55774. (2uL)

Figura 7. Pannello anticorpale Euroflow (van Dongen J.J. et al., 2012).

L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato che il recettore scavenger CD36, coinvolto in numerose funzioni cellulari tra cui l'*uptake* di acidi grassi, è diversamente espresso tra le popolazioni cellulari del midollo di pazienti con MGUS e MM. In particolare, nei pazienti con MM, la sua espressione è significativamente ridotta nelle cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSC), mentre è significativamente aumentata nelle cellule T CD8⁺ citotossiche. Questi risultati suggeriscono che la ridotta espressione a carico delle MDSC possa favorire un ambiente pro-tumorale, mentre l'aumento di CD36 a livello delle cellule T CD8⁺ potrebbe contribuire alla inefficace risposta antitumorale. Studi recenti su neoplasie solide evidenziano che gli adipociti associati ai tumori (CAA) possono agevolare la proliferazione neoplastica attraverso la secrezione di molecole che influenzano il microambiente immunitario e il metabolismo tumorale (Zhao Y. et al., 2020). Anche nel midollo osseo, ricco di

adipociti, l'abbondanza di tessuto adiposo appare correlata con l'avanzamento del MM (Chang Y. et al., 2017). In particolare, disordini lipidici e alti livelli di acidi grassi regolano l'attivazione metabolica delle cellule tumorali ed immunitarie (Chang Y. et al., 2017). Negli ultimi anni è stato dimostrato che, in modelli animali, una obesità indotta dalla dieta produce una sindrome simil-mielomatosa (Lwin S.T. et al., 2015) e recentemente uno studio del profilo lipidomico e metabolomico ha evidenziato un'alterazione in pazienti con MM rispetto ai pazienti con MGUS (Gonsalves W.I. et al., 2020).

Comprendere i meccanismi alla base della disfunzione delle cellule T citotossiche nel microambiente midollare è fondamentale per migliorare le strategie terapeutiche contro questa neoplasia.

Gli obiettivi dello studio sono stati valutare:

- L'espressione del CD36 nella popolazione CD8⁺, isolata a partire da sangue midollare e periferico di pazienti con MM e MGUS
- L'espressione dei marcatori di *exhaustion* (PD1 e TIM3) e di senescenza (CD57 e KLRG1) a carico della popolazione CD8⁺, proveniente da sangue midollare di pazienti con MM e con MGUS
- L'*uptake* lipidico mediante stimolazione con il lipide sintetico fluorescente *Bodipy FL C₁₆*, nei pazienti con MM e con MGUS, analizzando la correlazione di espressione di CD8, CD36, CD57/KLRG1 e *Bodipy FL C₁₆*
- Mediante citofluorimetria ed immunofluorescenza, la variazione dell'*uptake* lipidico in questa popolazione CD8⁺ senescente in seguito al trattamento delle cellule con l'inibitore di CD36
- Mediante citofluorimetria, la variazione della produzione di IFN- γ e dell'espressione di 7AAD, un *marker* di mortalità cellulare, da parte delle CD8⁺, isolate da sangue midollare di pazienti MM, in seguito a stimolazione con inibitore di CD36 e supplemento di acido grasso
- Lo stato di perossidazione delle cellule CD8⁺, isolate da sangue midollare di pazienti con MM, in seguito a stimolazione con inibitore di CD36 e supplemento di acido grasso, per valutare se la ridotta vitalità sia dovuta al meccanismo di morte regolata della ferroptosi
- La variazione della produzione di IFN- γ e dell'espressione di 7AAD nelle CD8⁺ isolate da sangue midollare di pazienti con MM, in seguito al trattamento con l'inibitore della ferroptosi, la ferrostatina-1
- La produzione di IFN- γ e l'espressione di marcatori di *exhaustion* e senescenza dopo il trattamento delle CD8⁺, provenienti da campioni di sangue midollare

di pazienti con MM e con MGUS, con l'agonista e l'inibitore di un ulteriore recettore di acidi grassi PPAR β/δ a confronto con l'inibitore di CD36

- La variazione dell'*uptake* lipidico mediante *Bodipy FL C₁₆* a carico delle CD8⁺, provenienti da campioni di sangue midollare di pazienti con MM e con MGUS, in seguito al trattamento di queste cellule con l'agonista e l'inibitore di un ulteriore recettore di acidi grassi PPAR β/δ a confronto con l'inibitore di CD36

MATERIALI E METODI

RECLUTAMENTO DEI PAZIENTI

I campioni di sangue di midollo osseo, di sangue periferico e di siero sono stati prelevati da 35 pazienti con MGUS e 35 con MM, seguiti presso il reparto di medicina interna del Policlinico di Bari tra il 2021 e il 2024, previo consenso informato. La stadiazione e lo stato della malattia sono stati effettuati secondo i criteri diagnostici dell'*International Myeloma Working Group*, previa valutazione clinica, esami radiologici e di laboratorio (**Tabella. 3**).

TABELLA 3. DATI CLINICI

Characteristic	Controls	MGUS	MM
No. patients	10	35	35
Median age, years (range)	65 (52 - 77)	62 (49 - 75)	66 (47 - 81)
Sex			
Male, n (%)	6 (60)	20 (60)	18 (52)
Female, n (%)	4 (40)	15 (40)	17 (48)
Iron deficiency anemia, n (%)	7 (70)	N.A.	N.A.
Thrombocytopenia, n (%)	3 (30)	N.A.	N.A.
Immunoglobulin subtype, n (%)			
IgG k	N.A.	22 (80)	25 (72)
IgG λ	N.A.	5 (10)	5 (12)
IgA k	N.A.	5 (5)	3 (12)
IgA λ	N.A.	3 (5)	2 (4)
International Staging System, n (%)			
I	N.A.	N.A.	8 (16)
II	N.A.	N.A.	16 (40)
III	N.A.	N.A.	11 (44)

Abbreviazioni: MGUS = monoclonal gammopathy of undetermined significance; MM = multiple myeloma; Ig = immunoglobulin; N.A. = not applicable.

ISOLAMENTO DEI LINFOMONOCITI

I linfomonociti sono stati isolati dai campioni di agoaspirato midollare (BMMCs) e periferico (PBMCs) dei pazienti affetti da MGUS e MM tramite centrifugazione basata sulla densità con un gradiente di Ficoll-paque plus (GE Healthcare Life Sciences).

CITOFUORIMETRIA

I linfomonociti isolati sono stati marcati con vari anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi a seconda della popolazione cellulare da identificare: anti-CD36 PE (Ficoeritrina) (Miltenyi); anti-CD3 PerCP Cy5.5 (Complesso proteico-peridina-clorofilla) (Becton dickinson BD) e FITC (Isotiocianato di Fluoresceina); anti-CD8 PerCP Cy5.5 (BD); anti-PD1 FITC (Miltenyi biotec); anti-TIM3 PE (Miltenyi Biotec); anti-KLRG1 APC (Alloficocianina) (Miltenyi Biotec); anti-CD57 APC (BD) anti-CD45 APC (BD); anti-CD14 FITC (Miltenyi Biotec); anti-HLA-DR PerCP Cy5.5 (BD); anti-IFN- γ FITC (Miltenyi Biotec); anti-7AAD (7-amino actinomicina) APC (BD).

I campioni sono stati incubati a 4 °C per 30' e sottoposti a un lavaggio con PBS freddo contenente BSA allo 0,1%. Successivamente i campioni sono stati acquisiti al citofluorimetro BD Accuri™ C6 Plus. L'analisi è stata eseguita mediante il software C6 Plus Analysis.

Per la valutazione della produzione intracellulare di IFN- γ , le cellule marcate in superficie sono state fissate e permeabilizzate con la soluzione Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences), lavate con la soluzione Perm/Wash (BD Biosciences) e immuno-marcate con l'anticorpo monoclonale specifico per IFN- γ . Le cellule sono state incubate a 4°C per 30', lavate con la soluzione Perm/Wash e con PBS, ed acquisite al citofluorimetro.

SEPARAZIONE IMMUNOMAGNETICA

I linfomonociti sono stati sottoposti a separazione immunomagnetica per l'isolamento delle T CD8⁺ con biglie immunomagnetiche CD8 MicroBeads human (Miltenyi Biotec).

IMMUNOFLUORESCENZA

L'*uptake* lipidico eseguito dai linfociti T CD8⁺ precedentemente isolati mediante separazione immunomagnetica è stato rilevato in immunofluorescenza, tramite

microscopio Nikon 550L. Le CD8⁺ sono state trattate con 50 μ M *Bodipy FL C₁₆ green* (D3821, Invitrogen) per 20h. Le cellule sono state raccolte, e trasferite in tubi di citofluorimetria; sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS freddo contenente BSA allo 0,1%; le cellule sono state trattate con l'anticorpo primario CD36 (TA500921, Origene) (diluizione 1:100) e sono state incubate a 4 °C per 30'. Dopo l'incubazione è stato effettuato il lavaggio con PBS freddo contenente BSA allo 0,1%; e le cellule sono state trattate con l'anticorpo secondario *Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor™ 546* (A11003, Invitrogen), con una concentrazione finale di 4 μ g/mL. Le cellule marcate con l'anticorpo secondario sono state incubate a 4 °C per 30'. Dopo l'incubazione ed il successivo lavaggio con PBS freddo contenente BSA allo 0,1%, le cellule sono state trattate con 0,1 mg/mL dapi (D9542, Sigma-aldrich), incubate al buio a temperatura ambiente per 10' e lavate con PBS freddo contenente BSA allo 0,1%. Il pellet cellulare è stato risospeso in 20 μ l e deposto sul vetrino per l'analisi al microscopio a fluorescenza Nikon 550L.

STIMOLAZIONE CELLULARE E COLTURE

I BMDCs dei pazienti con MGUS e MM sono stati coltivati su piastre U-bottom da 96 well (Falcon; BD Biosciences) in terreno RPMI-1640 integrato con siero fetale bovino al 10% (FBS), L-glutamina 2 mM, penicillina 100 U/mL e streptomina 100 μ g/mL (tutti Sigma-Aldrich), e sono state stimolate con uno dei seguenti stimoli: (i) 10 μ g/mL PHA (L890, Sigma-Aldrich); (ii) 2 μ g/mL CD36.1 (JC63.1, inibitore di CD36, Cayman); (iii) 1 μ M GSK3787 (inibitore di PPAR β/δ , Selleckchem); (iv) 10 μ M GW501516 (agonista di PPAR β/δ , Selleckchem); (v) 2 μ M *Bodipy FL C₁₆ green* (D3821, Invitrogen); (vi) S-F 7050 (supplemento di acido grasso), (diluizione 1:10 della soluzione madre); (vii) 5 μ M SML0583-5MG (ferrostatina-1).

Per ogni pozzetto sono state piastrate 5 x 10⁵ cellule in un volume finale di 200 μ l.

Le cellule sono state inizialmente stimolate con 10 μ g/mL PHA e dopo 6h sono stati aggiunti gli altri stimoli. Per l'analisi fenotipica e per la valutazione della produzione di interferone gamma (IFN- γ) le cellule sono state incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂ con gli appropriati stimoli per 20h. Per la valutazione della produzione intracellulare di citochine, è stata bloccata la secrezione di IFN- γ a livello dell'apparato del Golgi attraverso l'aggiunta nelle ultime 5h del *Golgi Plug* (1 μ l/ml; BD Biosciences).

PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

È stata valutata la perossidazione lipidica a carico delle cellule T CD8⁺, seguendo le indicazioni del kit *lipid peroxidation assay* (cell-based) (abcam, ab243377).

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software Prism (GraphPad Software). Sono stati utilizzati test statistici non parametrici a causa di non normale distribuzione dei dati. Il test Kruskal-Wallis è stato usato per l'analisi della varianza; il Mann-Whitney U test è stato usato per i campioni indipendenti; il Wilcoxon test è stato usato per i campioni non indipendenti.

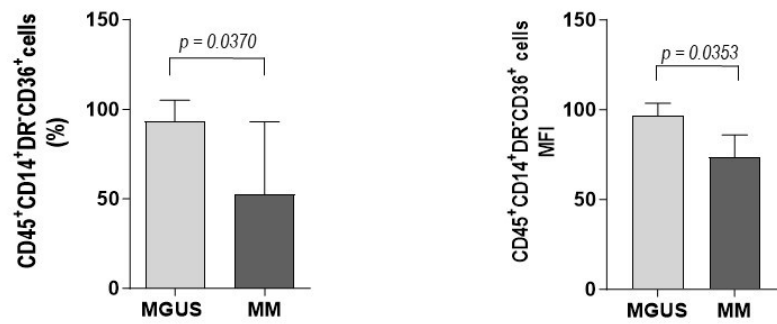
RISULTATI

Espressione del CD36 a livello della popolazione immunosoppressiva MDSCs e di quella citotossica T CD8⁺ nei pazienti con MGUS e con MM.

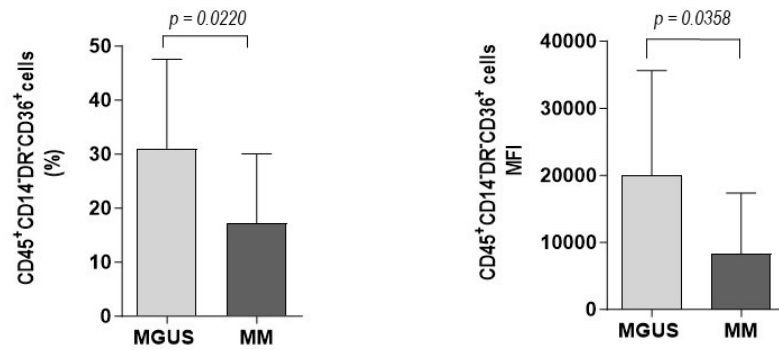
Facendo riferimento al pannello anticorpale *Euroflow*, abbiamo valutato l'espressione citofluorimetrica di diversi marcatori di attivazione a carico delle popolazioni cellulari che compongono il microambiente midollare. Tra tutti i marcatori analizzati, abbiamo ottenuto una differenza significativa di espressione tra pazienti con MGUS e pazienti con MM, solo per il marcatore CD36 a carico della popolazione immunosoppressiva delle MDSCs e della popolazione citotossica dei linfociti T CD8⁺. Nell'ambito della popolazione MDSCs, abbiamo identificato le cellule M-MDSCs (*monocytic myeloid derived suppressor cells*) come cellule CD45⁺CD14⁺HLA-DR⁻, e le cellule G-MDSCs (*granulocytic myeloid derived suppressor cells*) come cellule CD45⁺CD14⁻HLA-DR⁻. In entrambe le sottopopolazioni l'espressione del CD36 risulta essere significativamente ridotta nei pazienti con MM rispetto ai pazienti con MGUS (**Figura 8A-B**).

Nei linfociti T CD8⁺, identificati come cellule CD3⁺CD8⁺, il CD36 presenta un trend di espressione opposta rispetto alla popolazione immunosoppressiva delle MDSCs. In effetti l'espressione del marcatore risulta significativamente aumentata nelle T CD8⁺ di pazienti con MM piuttosto che nelle T CD8⁺ di pazienti con MGUS (**Figura 8C**). Questo pattern di espressione opposto tra la popolazione immunosoppressiva e quella citotossica ha suggerito il potenziale ruolo del CD36 nella progressione neoplastica. Abbiamo, quindi, focalizzato il nostro studio prettamente sull'espressione del marcatore CD36 sulla popolazione di cellule T CD8 positive al fine di comprendere il ruolo di tale recettore nella disfunzione della popolazione citotossica e quindi nella progressione neoplastica.

A



B



C

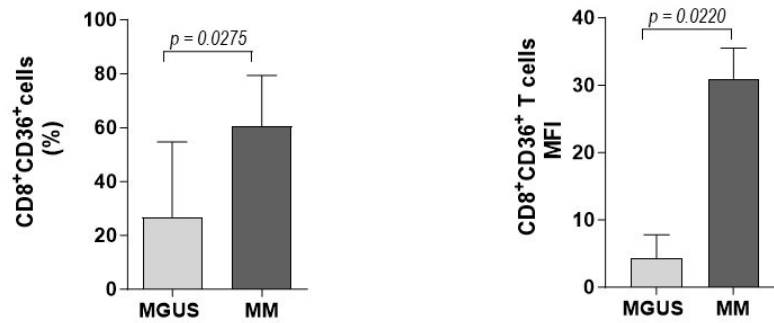


Figura 8. Valutazione in citofluorimetria dell'espressione del CD36 nelle M-MDSCs (**Figura 8A**), nelle G-MDSCs (**Figura 8B**) e nei linfociti T-CD8⁺ (**Figura 8C**) dei pazienti con MGUS e MM.

La percentuale di cellule T CD8⁺ è significativamente più elevata nel midollo dei pazienti con MM rispetto ai pazienti con MGUS

Allo scopo di valutare la percentuale di cellule T CD8⁺ nel midollo, sede della neoplasia, abbiamo isolato i linfomonociti da campioni di sangue midollare di 35 pazienti con MGUS e di 35 pazienti con MM, e abbiamo valutato in citofluorimetria la percentuale di cellule T CD8⁺ marcando le cellule con gli anticorpi monoclonali anti-CD3 FITC e anti-CD8 PerCP Cy5.5. È stata osservata una maggiore percentuale di T CD8⁺ nel midollo dei pazienti con MM (**Figura 9**).

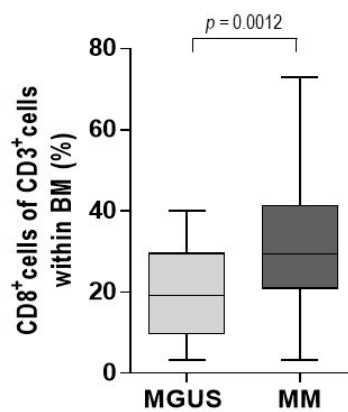


Figura 9. Valutazione in citofluorimetria della percentuale di cellule T CD8⁺ nel sangue midollare di 35 pazienti con MGUS e 35 con MM.

La valutazione dell'espressione del CD36 sulle T CD8⁺provenienti dal sangue midollare di 35 pazienti con MGUS e 35 pazienti con MM conferma l'aumento significativo dell'espressione del marcatore sulle T CD8⁺ di pazienti con MM.

Per validare il dato di partenza relativo all'espressione del CD36 nei linfociti T CD8⁺ dei pazienti con MGUS e con MM, abbiamo isolato i linfomonociti da un numero incrementato di campioni di sangue midollare: 35 campioni di sangue midollare provenienti da pazienti con MGUS e 35 provenienti da pazienti con MM. E abbiamo valutato in citofluorimetria l'espressione del CD36 sulle T CD8⁺ di questi pazienti. I dati ottenuti hanno rilevato l'aumento significativo dell'espressione del CD36 sulle T CD8⁺ dei pazienti con la malattia conclamata (MM) rispetto alla controparte pre-neoplastica (MGUS) (**Figura 10**), validando i risultati ottenuti in precedenza.

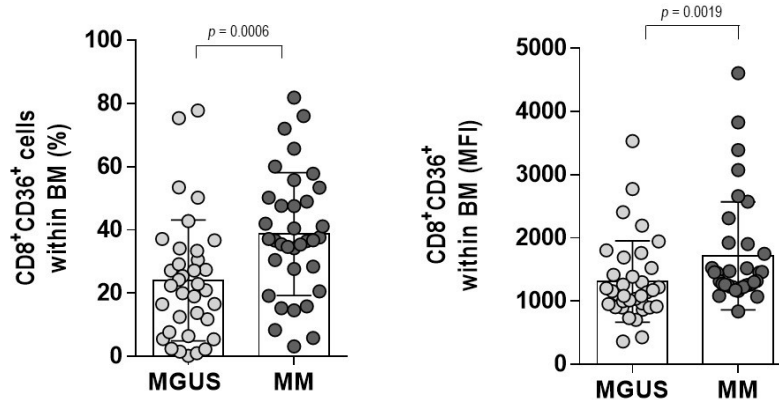


Figura 10. Valutazione in citofluorimetria dell'espressione del CD36 sulle T CD8⁺ provenienti dal sangue midollare di 35 pazienti con MGUS e 35 pazienti con MM.

Nei pazienti con MM le cellule T CD8⁺ migrano dal sangue periferico al midollo osseo sede della neoplasia ed aumentano l'espressione del CD36

Per 10 dei pazienti con MM è stata valutata in citofluorimetria la percentuale di cellule T CD8⁺CD36⁺ a partire dai linfomonociti isolati dai campioni di sangue midollare a confronto con i linfomonociti isolati dai campioni di sangue periferico. Abbiamo osservato una maggiore percentuale di cellule CD8⁺CD36⁺ nel midollo di pazienti con MM rispetto al sangue periferico (**Figura 11**), indicando che nei pazienti con MM le cellule T CD8⁺ migrano dal sangue periferico al midollo, sede della neoplasia, ed aumentano l'espressione del CD36.

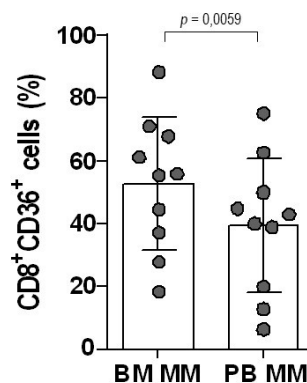


Figura11. Valutazione in citofluorimetria della percentuale di cellule T CD8⁺CD36⁺ nel sangue midollare a confronto con il sangue periferico di 10 pazienti con MM.

Le cellule T CD8⁺ di pazienti con MM hanno un fenotipo senescente

Mediante citofluorimetria abbiamo valutato l'espressione dei marcatori di *exhaustion* ossia PD1 (**Figura 12A**) e TIM3 (**Figura 12B**) e di senescenza ossia KLRG1 (**Figura 12C**) e CD57 (**Figura 12D**), sulle cellule CD8⁺ appartenenti alla popolazione di linfomonociti isolata da campioni di sangue midollare di 35 pazienti con MGUS e 35 pazienti con MM. I dati ottenuti rilevano una significatività solo per l'aumentata espressione dei marcatori di senescenza sulle T CD8⁺ di pazienti con MM rispetto ai pazienti con MGUS (**Figura 12C-D**). Non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di pazienti per quanto riguarda l'espressione di PD1 e TIM3 (**Figura 12A-B**). In seguito, a partire dai linfomonociti isolati dal sangue midollare di 30 pazienti con MGUS e 30 pazienti con MM, abbiamo effettuato la valutazione citofluorimetrica della percentuale di cellule T CD8⁺ appartenenti alla popolazione doppia positiva per i marcatori di *exhaustion* PD1⁺TIM3⁺ (**Figura 13A**) e tripla positiva per i marcatori di *exhaustion* e senescenza PD1⁺TIM3⁺CD57⁺/KLRG1⁺ (**Figura 13B/C**), ottenendo una significatività solo per la maggiore percentuale di cellule T CD8⁺ positive per PD1⁺TIM3⁺CD57⁺/KLRG1⁺ nei pazienti con MM. Quest'ultima popolazione tripla positiva rappresenta le *late differentiated senescent cells*, ossia le cellule senescenti differenziate tardivamente. Quindi le cellule T CD8⁺ dei pazienti con MM sembrano esprimere prioritariamente un immunofenotipo senescente piuttosto che *exhausted*.

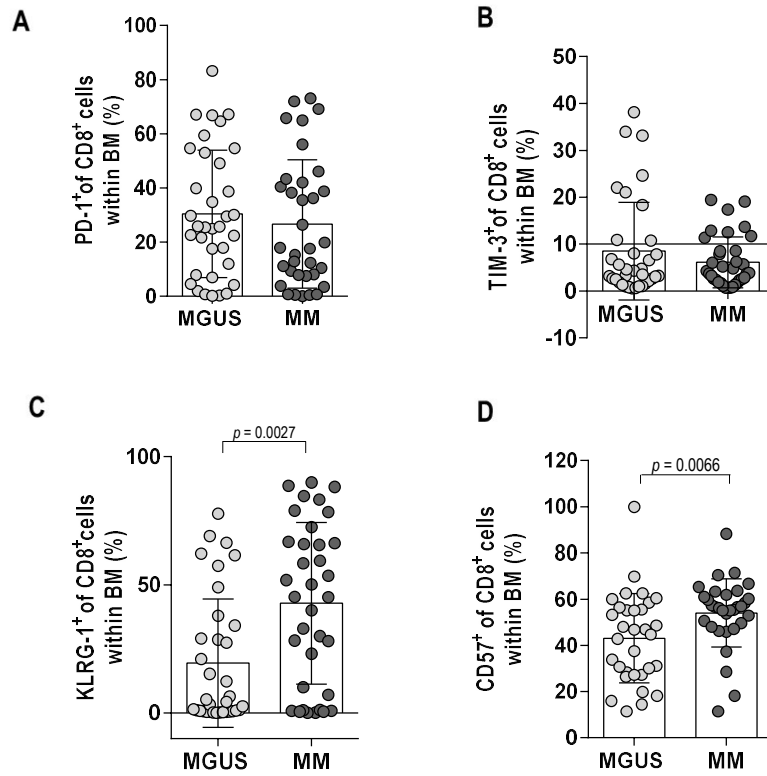


Figura 12. Valutazione mediante citofluorimetria dell'espressione dei marcatori di exhaustion PD1 (**Figura 12A**) e TIM3 (**Figura 12B**) e di senescenza KLRG1 (**Figura 12C**) e CD57 (**Figura 12D**), sulle cellule T CD8⁺ di campioni di sangue midollare di pazienti MGUS ed MM.

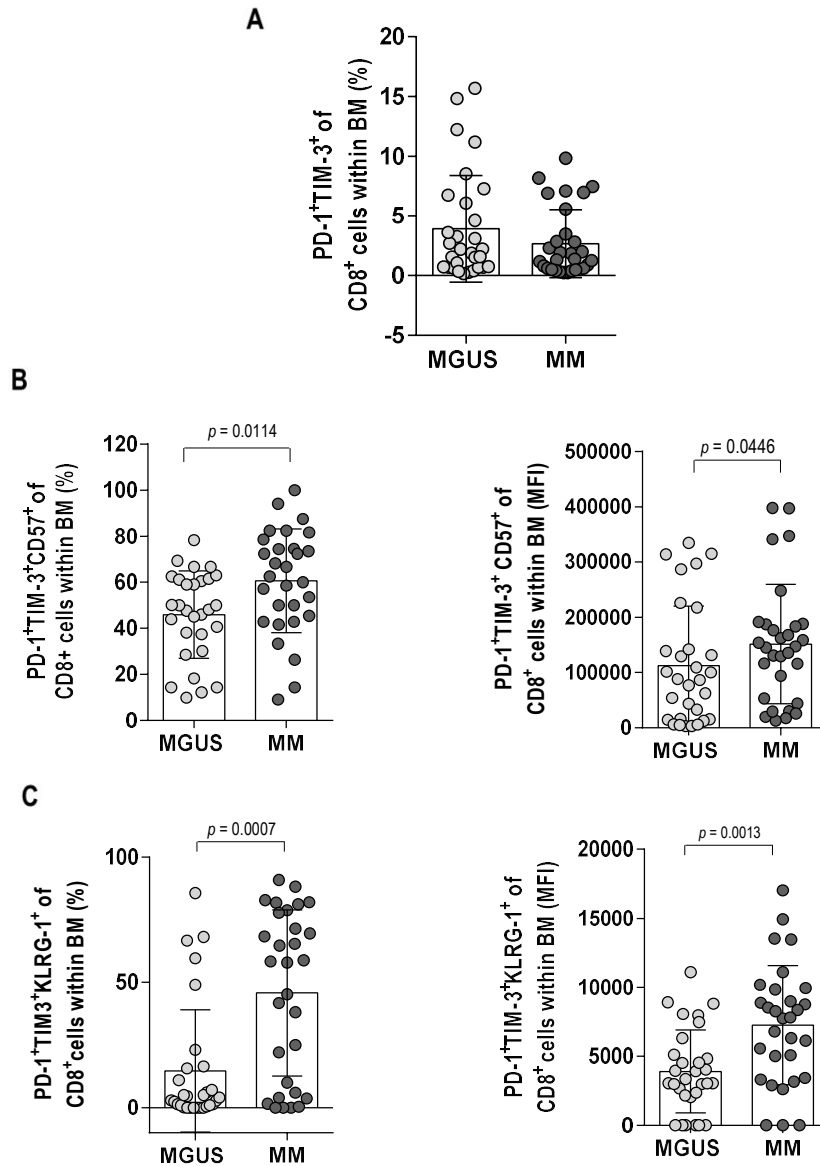


Figura 13. Valutazione mediante citofluorimetria della percentuale di cellule T CD8⁺ doppie positive per i marcatori di exhaustion PD1⁺TIM3⁺ (**Figura 13A**) e triple positive per i marcatori di exhaustion e senescenza PD1⁺TIM3⁺CD57⁺/KLRG1⁺ (**Figura 13B-C**) (le late differentiated senescent cells) nei pazienti con MGUS e con MM.

Le cellule CD8⁺CD57⁺ senescenti dei pazienti con MM eseguono uptake lipidico

Allo scopo di valutare l'uptake lipidico in citofluorimetria, i linfomonociti isolati da pazienti con MGUS e pazienti con MM sono stati stimolati con un lipide sintetico

fluorescente *Bodipy FL C₁₆*. Dopo 20 ore, è stato eseguito lo staining con anticorpi anti-CD8 PercyP 5.5, anti-CD36 PE, anti-CD57/KLRG1 APC.

L'analisi citofluorimetrica ha dimostrato una maggiore capacità di inglobare i lipidi delle cellule T senescenti CD8⁺ CD57⁺ nei campioni di pazienti con MM piuttosto che in quelle di pazienti con MGUS (**Figura 14A**). Non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di pazienti per quanto riguarda le cellule T CD8⁺KLRG1⁺ (**Figura 14B**).

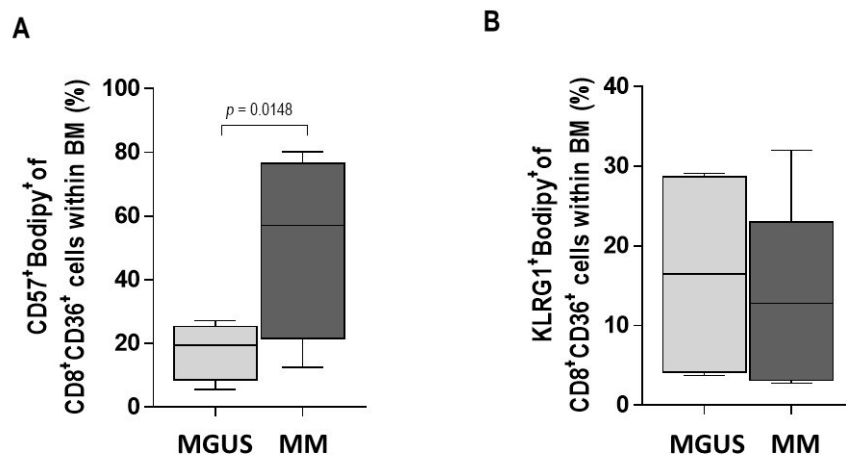


Figura 14. Valutazione mediante citofluorimetria dell'uptake lipidico da parte delle CD8⁺CD36⁺CD57⁺ (**Figura 14A**) e delle CD8⁺CD36⁺KLRG1⁺ (**Figura 14B**) di pazienti con MGUS e MM.

Il CD36 è coinvolto nell'uptake lipidico

Per dimostrare il coinvolgimento del CD36 nell'uptake lipidico abbiamo isolato le cellule T CD8⁺ dai linfomonociti ottenuti dall'agoaspirato midollare dei pazienti con MM, mediante separazione immunomagnetica, le abbiamo trattate con l'inibitore di CD36 (JC63.1) e abbiamo valutato l'uptake lipidico mediante immunofluorescenza. Nell'immagine riportata in **Figura 15** si può notare in verde l'espressione del *Bodipy FL C₁₆*, in rosso l'espressione del CD36 e in blu il dapi. Nella cellula trattata con l'inibitore di CD36 si riduce drasticamente l'espressione del segnale rosso relativo all'espressione del CD36 e del segnale verde relativo al *Bodipy*, indicando una riduzione dell'uptake lipidico da parte della cellula.

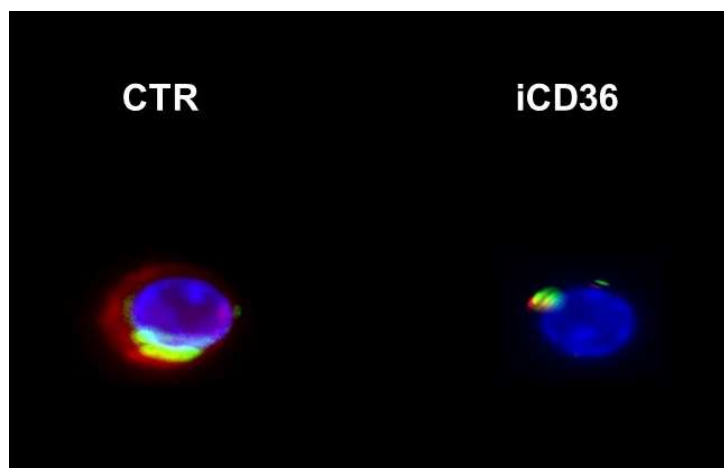


Figura 15. Valutazione dell'uptake lipidico delle T CD8⁺ controllo (CTR) e inibite con l'inibitore di CD36 (iCD36) isolate dal sangue midollare di paziente con MM.

Il coinvolgimento del CD36 nell'uptake lipidico è confermato in citofluorimetria

Per avere un'ulteriore conferma del coinvolgimento dell'uptake lipidico da parte del recettore CD36, abbiamo analizzato questo dato anche mediante citofluorimetria, identificando nel contesto delle cellule CD8⁺CD36⁺Bodipy⁺ la popolazione CD57⁺ senescente (**Figura 16**). I risultati mostrano una riduzione significativa dell'uptake lipidico da parte delle cellule trattate con l'inibitore di CD36 rispetto alle cellule controllo, confermando il ruolo del CD36 nell' uptake lipidico.

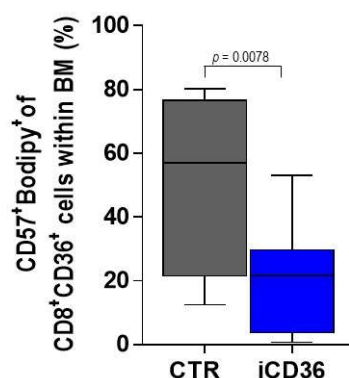


Figura 16. Valutazione mediante citofluorimetria dell'uptake lipidico da parte delle cellule CD8⁺CD36⁺CD57⁺ di pazienti con MM.

L'aumento dell'espressione del CD36, incrementando l'uptake lipidico, riduce l'attività citotossica di linfociti T CD8⁺ nei pazienti con MM

Le cellule T CD8⁺ isolate dai linfomonociti dei pazienti con MM sono state trattate in vitro con l'inibitore di CD36 e il supplemento di acido grasso (FA) (S-F 7050) e abbiamo valutato in citofluorimetria la produzione di IFN- γ . I dati ottenuti dimostrano come nella popolazione controllo (CTR), ossia non trattata, la produzione di IFN- γ risulta più elevata rispetto alla popolazione controllo trattata con il supplemento di acido grasso (CTR + FA) ad indicare come l'uptake di acidi grassi riduca l'attività citotossica delle cellule T CD8⁺. L'inibizione del CD36 (iCD36), inibendo il CD36 e quindi l'uptake lipidico, aumenta notevolmente la produzione di IFN- γ da parte delle T CD8⁺, mentre la copresenza dell'inibitore di CD36 e del supplemento dell'acido grasso (iCD36 + FA) determina nuovamente la riduzione della produzione della citochina citotossica, anche se quest'ultima risulta più elevata che nella condizione CTR + FA (**Figura 17**).

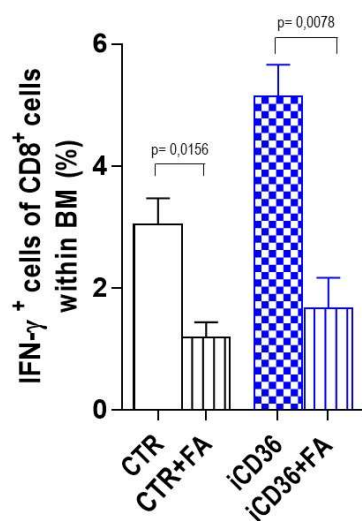


Figura 17. Valutazione in citofluorimetria della variazione della produzione di IFN- γ , da parte delle cellule T CD8⁺, isolate dai linfomonociti di pazienti con MM, in seguito a stimolazione con l'inibitore di CD36 (iCd36) e il supplemento di acido grasso (FA).

PPAR β/δ modula l'espressione del CD36 e la produzione di IFN- γ nelle cellule di pazienti con MGUS e MM

Dallo studio della letteratura sappiamo che PPAR β/δ è coinvolto nella regolazione dell'*uptake* lipidico, del metabolismo lipidico e nella regolazione dell'espressione del CD36. Abbiamo quindi analizzato in citofluorimetria la variazione dell'espressione del CD36 e la produzione di IFN- γ dopo il trattamento delle T CD8⁺ isolate dal sangue midollare di pazienti sia con MGUS che con MM con l'agonista e l'inibitore di PPAR β/δ , valutando le condizioni: controllo (CTR); inibizione del CD36 (ICD36), stimolazione con l'agonista di PPAR β/δ (APPAR) e inibizione di PPAR β/δ (IPPAR) (**Figura 18**). Dal grafico si può notare l'aumento della produzione di IFN- γ nella condizione di sola inibizione delle cellule con l'inibitore di CD36, come già dimostrato precedentemente, e nella condizione di inibizione delle cellule con l'inibitore di PPAR β/δ rispetto alle cellule controllo, nonché l'abbassamento della produzione della citochina nella condizione di stimolazione con l'agonista di PPAR β/δ rispetto alle cellule controllo. Questi dati dimostrano che PPAR β/δ modula l'espressione del CD36 e la produzione di IFN- γ , per cui la produzione di IFN- γ viene incrementata in presenza dell'inibitore di PPAR β/δ , che riduce l'espressione del CD36; viceversa la produzione di IFN- γ viene ridotta in presenza dell'agonista di PPAR β/δ , che incrementa l'espressione del CD36 (**Figura 18**). In seguito, abbiamo valutato in immunofluorescenza la variazione dell'*uptake* lipidico mediante l'utilizzo del lipide sintetico fluorescente *Bodipy FL C₁₆* a carico delle cellule T CD8⁺, isolate mediante separazione immunomagnetica dalla popolazione di linfomonociti ottenuta da campioni di sangue midollare di pazienti con MGUS e MM, in correlazione con l'espressione del CD36. Abbiamo analizzato le condizioni controllo (CTR); cellule inibite con l'inibitore del CD36 (iCD36), cellule stimulate con l'agonista di PPAR β/δ (aPPAR β/δ) e cellule inibite con l'inibitore di PPAR β/δ (iPPAR β/δ). Dall'immagine (**Figura 19**) si può notare l'incremento del segnale rosso relativo all'espressione del CD36 in presenza dell'agonista di PPAR β/δ e la riduzione di tale segnale in presenza dell'inibitore di PPAR β/δ . Questo trend è correlato ad un aumento dell'*uptake* lipidico, indicato dal *Bodipy*, visibile in verde, in presenza dell'agonista di PPAR β/δ ed ad una riduzione dell'*uptake* lipidico in presenza dell'inibitore di PPAR β/δ ; questa variazione è visibile sia nelle cellule di pazienti con MM che in quelle di pazienti con MGUS. Inoltre si può notare come l'espressione del CD36 e quindi anche l'*uptake* lipidico sia

maggiore nelle T CD8⁺ dei pazienti con MM, piuttosto che in quelle dei pazienti con MGUS, come già dimostrato precedentemente.

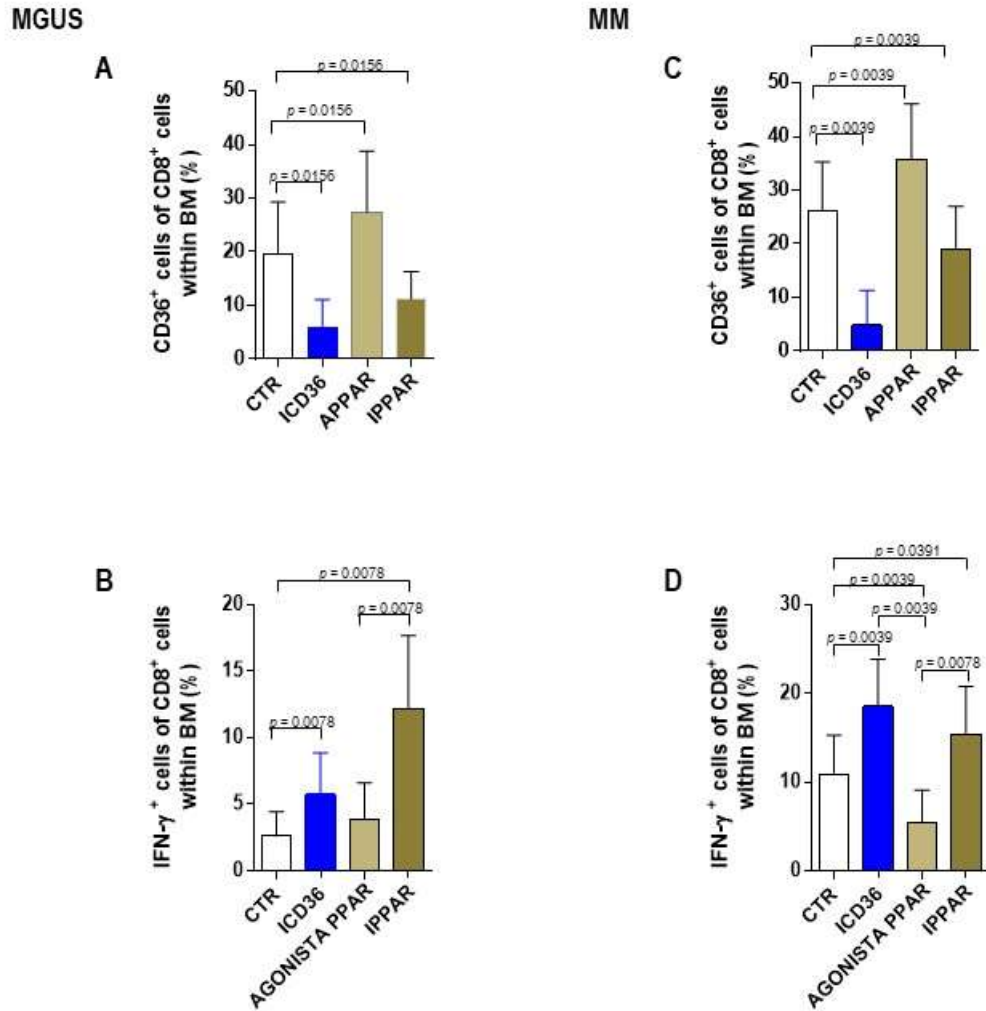


Figura 18. Valutazione mediante citofluorimetria dell'espressione del CD36 e della produzione di IFN- γ da parte delle T CD8⁺ isolate da campioni di sangue midollare di pazienti con MGUS (**Figura 18A- B**) e con MM (**Figura 18C- D**), nelle condizioni CTR; ICD36, AGONISTA PPAR e IPPAR.

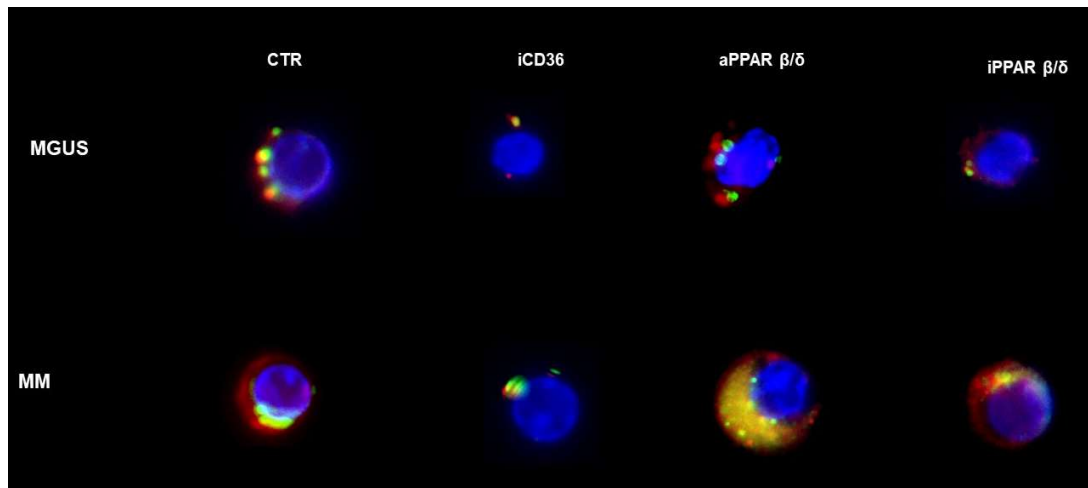


Figura 19. Valutazione dell'uptake lipidico in immunofluorescenza, mediante l'utilizzo del lipide sintetico fluorescente Bodipy FL C₁₆, in correlazione con l'espressione del CD36 nelle cellule T CD8⁺, isolate dal sangue midollare di pazienti con MGUS e MM, nelle condizioni: CTR; iCD36; aPPARβ/δ e iPPARβ/δ.

L'aumento dell'espressione del CD36, incrementando l'uptake lipidico, aumenta la mortalità dei linfociti T CD8⁺ nei pazienti con MM

Allo scopo di determinare se l'uptake lipidico aumentasse la mortalità delle cellule T CD8⁺, abbiamo analizzato, mediante citofluorimetria, la variazione di un marker di mortalità, il 7AAD, nelle cellule di pazienti con MM stimulate e non con FA e iCD36, valutando le condizioni: CTR; CTR + FA; iCD36; iCD36 + FA. L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato un aumento dell'espressione del 7AAD e quindi della mortalità cellulare, nella condizione CTR + FA rispetto alla condizione CTR. L'inibizione di CD36 (iCD36) procura una significativa riduzione della mortalità di queste cellule, che si ripresenta in seguito alla combinazione dell'inibitore di CD36 con il supplemento dell'acido grasso (iCD36 + FA) (**Figura 20**), suggerendo un ruolo del CD36 e dell'uptake lipidico nella mortalità delle cellule T CD8⁺.

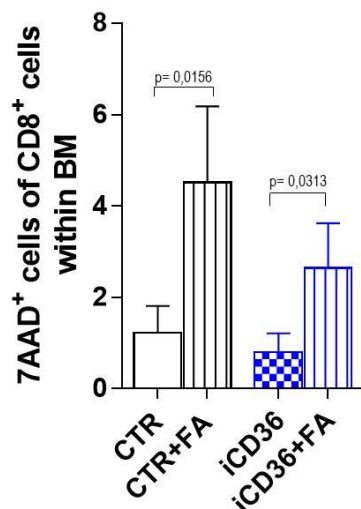


Figura 20. Valutazione mediante citofluorimetria della variazione della mortalità delle cellule T CD8⁺, isolate dai linfomonociti di pazienti con MM, nelle condizioni CTR; CTR + FA; iCD36; iCD36 + FA.

L'espressione del CD36 modula lo stato di perossidazione lipidica dei linfociti T CD8⁺ nei pazienti con MM

Per comprendere se la mortalità di queste cellule fosse dovuta ad un accumulo di perossidi lipidici, ed avvenisse quindi tramite un meccanismo di ferroptosi, abbiamo valutato lo stato di perossidazione lipidica a carico della popolazione CD8⁺ isolata dai linfomonociti di pazienti con MM e trattata con l'inibitore di CD36 utilizzando un kit specifico. Questo kit sfrutta una sonda fluorescente che cambia emissione da rosso a verde in base alla presenza di prodotti della perossidazione lipidica, in particolare i lipidi reattivi ai radicali liberi, o i radicali derivati da perossidi lipidici. In condizioni normali, la sonda emette fluorescenza rossa, quando reagisce con i prodotti della perossidazione lipidica, cambia conformazione chimica, modificando il suo spettro di emissione verso il verde. La riduzione del rapporto tra colorazione fluorescente in rosso PE e quella fluorescente in verde FITC, è indicativa dell'aumento dello stato di perossidazione lipidica nelle cellule. Nella condizione controllo (CTR) il rapporto PE/FITC risulta ridotto rispetto alla condizione di inibizione con iCD36, ad indicare che l'inibizione del recettore CD36, diminuendo l'*uptake* di acidi grassi, decrementa anche lo stato di perossidazione lipidica di queste cellule (**Figura 21A**). Questa condizione può essere osservata anche valutando lo spostamento del picco di segnale

più a destra nella condizione iCD36, indicativo di minor grado di perossidazione lipidica, rispetto alla condizione CTR (**Figura 21B**).

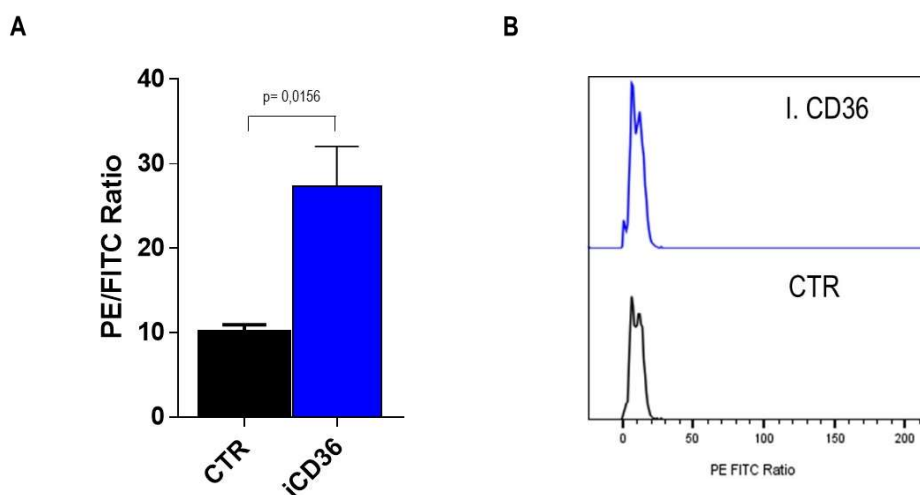


Figura 21. Valutazione dello stato di perossidazione lipidica delle $T CD8^+$ di pazienti con MM, mediante la valutazione del rapporto PE/FITC (**Figura 21A**) e del picco di segnale (**Figura 21 B**) nelle condizioni controllo (CTR) e inibizione del CD36 (iCD36).

Il supplemento di acido grasso (FA) incrementa lo stato di perossidazione lipidica nelle $T CD8^+$ di pazienti con MM

Lo stato di perossidazione lipidica è stato valutato in seguito all'aggiunta con il supplemento di acido grasso (FA), ossia nelle condizioni: cellule controllo, non trattate, cellule trattate solo con FA (CTR + FA), cellule trattate con iCD36 e cellule trattate con iCD36 ed FA (iCD36 + FA). Sia nella condizione CTR + FA che nella condizione iCD36 + FA si può notare la riduzione del rapporto PE/FITC, ad indicare che il supplemento di acido grasso determina l'aumento dello stato di perossidazione lipidica delle cellule $T CD8^+$ dei pazienti con MM (**Figura 22A**). Questa evidenza può essere confermata anche dalla valutazione dello *shift* a sinistra del picco di segnale nelle condizioni CTR + FA e iCD36 + FA (**Figura 22B**)

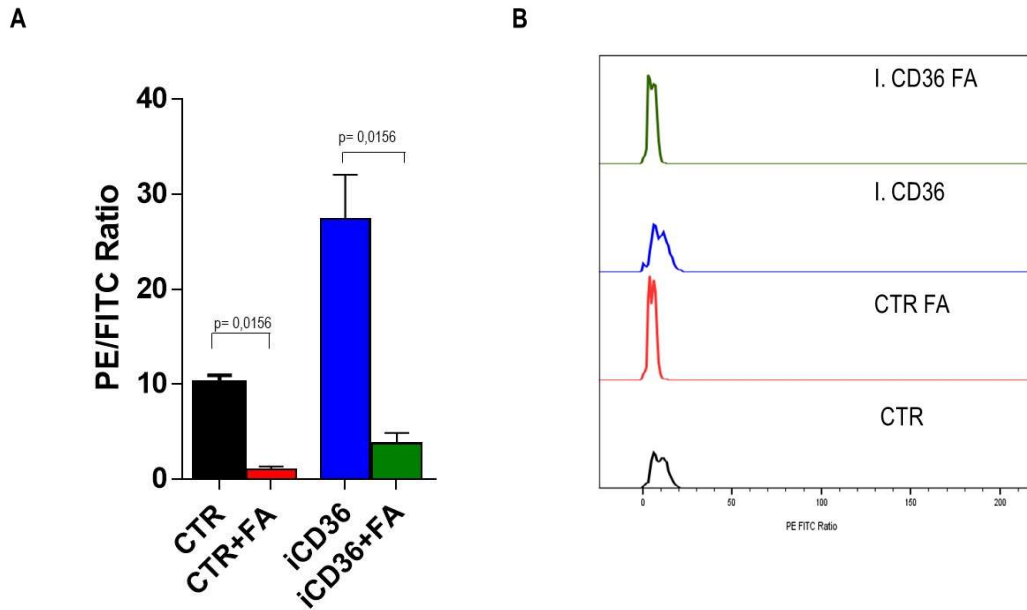


Figura 22. Valutazione dello stato di perossidazione lipidica nelle cellule T CD8⁺ di pazienti con MM, nelle condizioni CTR; CTR + FA; iCD36; iCD36 + FA, mediante l'analisi del rapporto PE/FITC (**Figura 22A**) e del picco di segnale (**Figura 22B**).

La stimolazione con l'inibitore della ferroptosi, la ferrostatina-1, ripristina la produzione di IFN- γ nelle cellule T CD8⁺ di pazienti MM

Successivamente abbiamo ripetuto gli esperimenti di stimolazione in vitro, trattando le cellule CD8⁺ di pazienti con MM anche con l'inibitore della ferroptosi, la ferrostatina-1 (Fe), ed abbiamo valutato in citofluorimetria la produzione di IFN- γ (**Figura 23**). Nelle cellule controllo trattate con FA (CTR+FA) si nota una riduzione della produzione di IFN- γ rispetto alle cellule non trattate (CTR) che viene ripristinata in parte con l'aggiunta dell'inibitore della ferrostatina-1 (Fe). Nelle cellule trattate con iCD36, la produzione di IFN- γ aumenta significativamente rispetto alla condizione CTR; si riduce drasticamente con l'aggiunta di FA e viene in parte ripristinata con l'inibitore Fe.

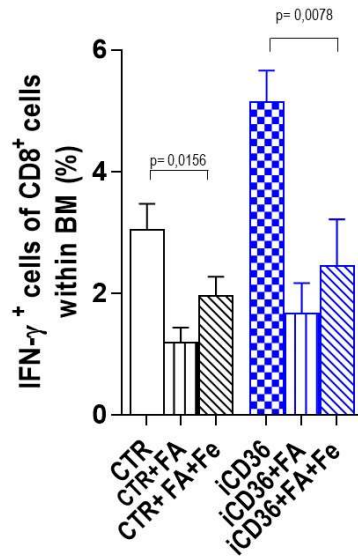


Figura 23. Valutazione della produzione di IFN- γ , da parte delle T CD8⁺ di pazienti con MM, mediante citofluorimetria, nelle condizioni controllo (CTR); controllo più supplemento di acido grasso (CTR + FA); controllo più supplemento di acido grasso ed inibitore della ferroptosi (ferrostatina-1) (CTR + FA + Fe); inibitore di CD36 (iCD36); inibitore di CD36 più supplemento di acido grasso (iCD36 + FA); inibitore di CD36 più supplemento di acido grasso ed inibitore della ferroptosi (ferrostatina-1) (CTR + FA + Fe).

La stimolazione con l'inibitore della ferroptosi, la ferrostatina-1, riduce l'espressione del marcatore di senescenza (CD57) nelle T CD8⁺ di pazienti MM

A livello delle cellule stimulate in vitro, abbiamo analizzato in citofluorimetria l'espressione del marcatore di senescenza (CD57) (**Figura 24A**) e di *exhaustion* (PD1) (**Figura 24B**). L'espressione di entrambi i marcatori aumenta notevolmente sia nella condizione controllo più supplemento di acido grasso (CTR + FA), che nella condizione inibitore di CD36 più supplemento di acido grasso (iCD36 + FA). Tale espressione tende a diminuire con l'aggiunta dell'inibitore della ferroptosi, la ferrostatina-1 (Fe), nelle condizioni CTR + FA + Fe e iCD36 + FA + Fe per quanto riguarda le cellule T CD8⁺CD36⁺CD57⁺. Per quanto riguarda le cellule T CD8⁺CD36⁺PD1⁺, questo trend è confermato solo per le cellule inibite con l'inibitore del CD36.

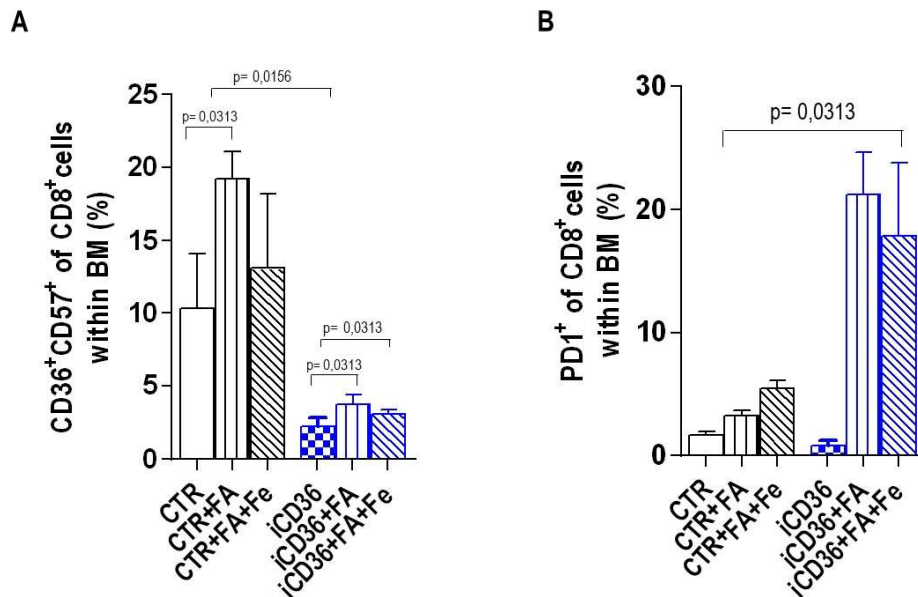


Figura 24. Valutazione mediante citofluorimetria dell'espressione dei marcatori di senescenza (CD57) (**Figura 24A**) ed exhaustion (PD1) (**Figura 24B**), sulle cellule T CD8⁺ di pazienti con MM, nelle condizioni CTR; CTR + FA; CTR + FA + Fe; iCD36; iCD36 + FA; iCD36 + FA + Fe.

Il supplemento di acido grasso determina la morte delle T CD8⁺ per ferroptosi nei pazienti con MM

Si è valutata, quindi, la mortalità delle T CD8⁺, provenienti dai campioni di sangue midollare di pazienti con MM, anche in presenza dell'inibitore della ferroptosi, Fe, nelle condizioni CTR; CTR + FA; CTR + FA + Fe; iCD36; iCD36 + FA; iCD36 + FA + Fe, analizzando l'espressione del marker 7AAD in citofluorimetria (**Figura 25A**). I dati dimostrano una significativa riduzione della mortalità delle cellule in presenza dell'inibitore della ferroptosi, Fe, sia nelle cellule controllo, che nelle cellule inibite con l'inibitore del CD36, indicando che l'acido grasso determina la morte delle T CD8⁺ tramite ferroptosi nei pazienti con MM. Abbiamo quindi valutato nuovamente lo stato di perossidazione lipidica nelle T CD8⁺ isolate da campioni di sangue midollare di pazienti con MM, con l'aggiunta della condizione di inibizione della ferroptosi con la ferrostatina-1, sia per il controllo (CTR + FA + Fe) che per le cellule

trattate con l'inibitore di CD36 (iCD36 + FA + Fe). In entrambi i casi si ha un aumento del rapporto PE/FITC rispetto alle condizioni di sola stimolazione con il supplemento di acido grasso (CTR + FA e iCD36 + FA) (**Figura 25B**), ad indicare che la ferrostatina-1 inibendo il meccanismo di ferroptosi va a modulare il processo di perossidazione lipidica e a ridurre lo stato di perossidazione di queste cellule. Tale dato può essere validato anche tramite l'osservazione dello *shift* verso destra dei picchi di segnale nelle condizioni CTR + FA + Fe e iCD36 + FA + Fe rispetto alle condizioni con il solo supplemento di acido grasso (CTR + FA e iCD36 + FA) (**Figura 25C**).

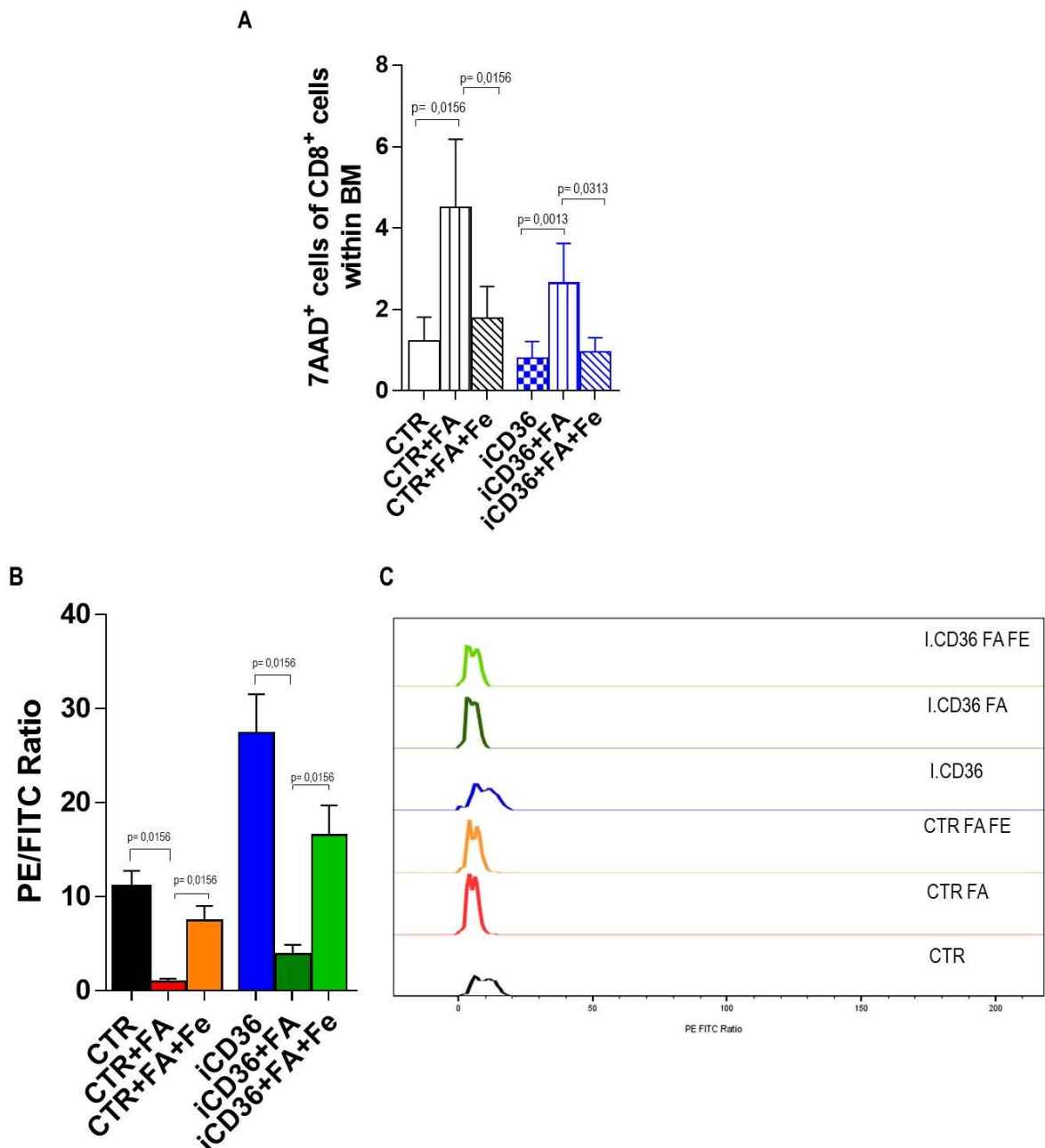


Figura 25. Valutazione della mortalità delle cellule T CD8⁺ provenienti da campioni di sangue midollare di pazienti con MM, mediante l'analisi citofluorimetrica dell'espressione del marcatore 7AAD, nelle condizioni: CTR; CTR + FA; CTR + FA + Fe; iCD36; iCD36 + FA; iCD36 + FA + Fe (**Figura 25A**). Valutazione dello stato di perossidazione lipidica delle cellule T CD8⁺, derivanti dai campioni di sangue midollare dei pazienti con MM, nelle condizioni: CTR; CTR + FA; CTR + FA + Fe; iCD36; iCD36 + FA; iCD36 + FA + Fe, mediante l'analisi del rapporto PE/FITC (**Figura 25B**) e del picco di segnale (**Figura 25C**).

L'aumento dell'espressione del CD36 correla con l'aumentata mortalità delle T CD8⁺ nei pazienti con MM, l'inibizione della ferroptosi riduce gradualmente la mortalità di queste cellule

Successivamente abbiamo analizzato la correlazione tra la mortalità delle cellule T CD8⁺ e l'espressione del CD36, nelle condizioni CTR; CTR + FA; iCD36; iCD36 + FA, in 10 campioni di sangue midollare di pazienti con MM (**Figura 26**). I risultati ottenuti rilevano come la mortalità delle cellule T CD8⁺ correli con l'espressione del CD36, infatti all'aumentata espressione del CD36 corrisponde l'aumento della mortalità delle T CD8⁺. L'aggiunta dell'acido grasso FA, determina il decremento dell'espressione di CD36 sulle CD8⁺, comportando l'aumento della mortalità di queste cellule.

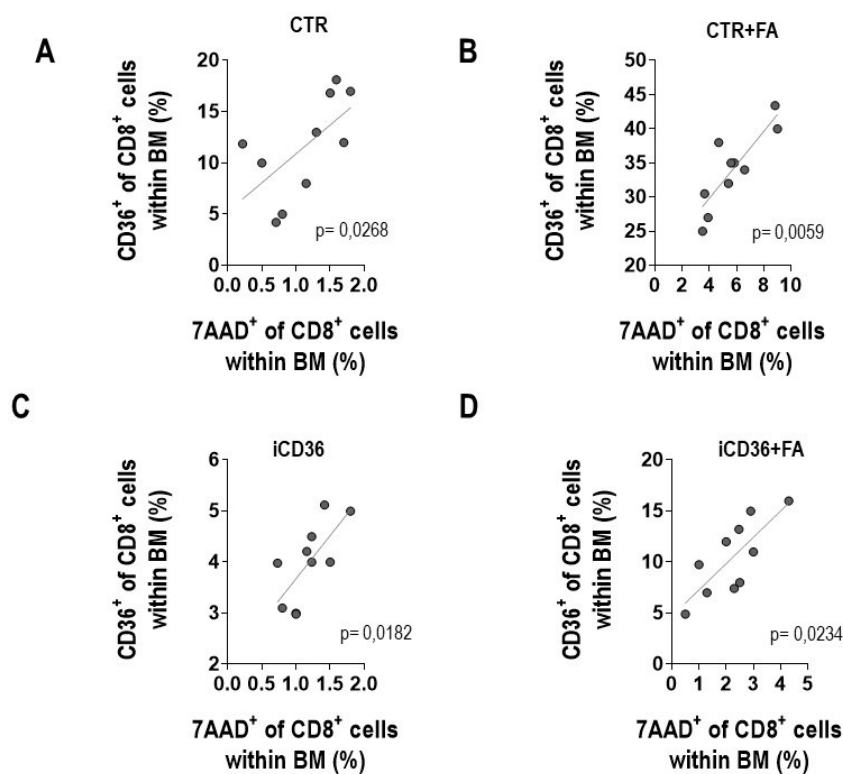


Figura 26. Valutazione, nelle cellule T CD8⁺, isolate dal sangue midollare di 10 pazienti con MM, della correlazione tra espressione del CD36 e mortalità cellulare, mediante analisi dell'espressione del marker 7AAD in citofluorimetria, nelle condizioni: CTR (**Figura 26A**); CTR + FA (**Figura 26B**); iCD36 (**Figura 26C**); iCD36 + FA (**Figura 26D**).

DISCUSSIONE

Trattandosi di una glicoproteina di membrana, il recettore CD36 è stato studiato in molti tipi di cellule di mammifero, come adipociti, macrofagi ed epatociti (Silverstein et Febbraio, 2009), (Pepino et al., 2014). Tuttavia, il suo ruolo nelle cellule T è poco conosciuto. In questo studio, abbiamo scoperto che il CD36 incrementa l'*uptake* lipidico nelle cellule T CD8⁺ midollari di pazienti con MM, attivando il meccanismo di perossidazione lipidica ed inducendo il meccanismo di morte regolata per ferroptosi. Questo processo smorza la funzione effettrice delle cellule T CD8⁺ e compromette la loro capacità antitumorale. Recentemente Manzo et al. (Manzo T. et al., 2020) hanno scoperto che le cellule T intrapancreatiche CD8⁺ accumulano progressivamente specifici acidi grassi a catena lunga (LCFA), che, invece di fornire una fonte di carburante, compromettono la loro funzione mitocondriale e innescano un'importante riprogrammazione trascrizionale dei *pathway* coinvolti nel metabolismo lipidico, con la conseguente riduzione del catabolismo degli acidi grassi. In particolare, le cellule T CD8⁺ intrapancreatiche mostrano specificamente una *down*-regolazione dell'enzima acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga (VLCAD), che esacerba l'accumulo di LCFA e acidi grassi a catena molto lunga (VLCFA) che mediano la lipotossicità. La riprogrammazione metabolica delle cellule T tumore-specifiche attraverso l'espressione forzata di acil-CoA deidrogenasi a catena molto lunga (*acyl-CoA dehydrogenase very long chain- ACADVL*) consente una maggiore sopravvivenza e persistenza delle cellule T intratumorali in un modello murino ingegnerizzato di adenocarcinoma duttale pancreatico (PDA), superando uno dei principali ostacoli all'immunoterapia per il PDA.

La ferroptosi è un tipo specifico di morte cellulare programmata, caratterizzata principalmente da perossidazione lipidica non controllata e dipendente dal ferro. È un processo che coinvolge stress ossidativo e l'accumulo di prodotti tossici derivanti dai lipidi. Il ruolo del ferro è cruciale nella ferroptosi perché facilita la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) tramite reazioni come la reazione di Fenton, che porta alla formazione di radicali liberi altamente reattivi. Questi radicali possono attaccare i lipidi nelle membrane cellulari iniziando la perossidazione lipidica. Quando questi lipidi vengono perossidati si formano prodotti tossici come i malondialdeidi (MDA) e 4-idrossinonenali (4-HNE), che danneggiano ulteriormente le strutture cellulari e compromettono la funzionalità della membrana. Una volta che inizia la

perossidazione lipidica, si crea un ciclo di feedback positivo: i prodotti tossici derivati dai lipidi perossidati danneggiano ulteriormente la membrana e rilasciano più radicali liberi, che a loro volta promuovono ulteriore perossidazione lipidica e alimentano la ferroptosi (Jiang X. et al., 2021).

Wang et al. hanno recentemente dimostrato che le cellule T CD8⁺ attivate dall'immunoterapia attivano la perossidazione lipidica specifica della ferroptosi nelle cellule tumorali, contribuendo all'efficacia antitumorale dell'immunoterapia. L'IFN- γ rilasciato dalle cellule T CD8⁺ riduce l'espressione di SLC3A2 e SLC7A11, due subunità del sistema antiporto glutammato-cistina xc-, compromettendo l'assorbimento della cistina da parte delle cellule tumorali e, di conseguenza, favorendo la perossidazione lipidica e la ferroptosi nelle cellule tumorali. (Wang H. et al., 2019). Matsushita et al. hanno dimostrato che Gpx4, un gene soppressore della ferroptosi, è fondamentale per l'espansione delle cellule T e la protezione dalle infezioni virali e parassitarie (Matsushita M. et al., 2015). Ma X. et al., hanno dimostrato che l'inibizione della ferroptosi nelle cellule T CD8⁺ intratumorali di melanoma migliora la funzione antitumorale delle cellule, mentre l'induzione della ferroptosi nelle cellule T compromette la loro funzione antitumorale. Inoltre, hanno scoperto che la delezione di CD36 nelle cellule T CD8⁺ in combinazione con anticorpi anti-PD-1 determina effetti antitumorali migliori rispetto a ciascuno dei due da solo (Ma X, et al., 2021).

I nostri risultati mostrano un'interessante differenza nel profilo immunofenotipico delle cellule CD8⁺ tra pazienti affetti da MGUS e MM. In particolare, l'aumentata espressione del marcatore CD36 sui linfociti CD8⁺ nei pazienti con MM suggerisce un ruolo chiave di questo recettore nell'assorbimento lipidico, nell'indurre la senescenza cellulare e la perdita della funzione citotossica. L'analisi dell'espressione di marcatori di senescenza (CD57, KLRG1) e di *exhaustion* (PD1, TIM3) ha evidenziato che la popolazione CD8⁺ nei pazienti con MM tende a presentare un fenotipo più senescente che *exhausted*, in linea con studi che correlano la senescenza alla progressione tumorale (Suen H. et al, 2016). L'analisi della co-espressione di marcatori di senescenza e di *exhaustion* ha evidenziato una maggiore prevalenza di cellule triple positive (PD1⁺, TIM3⁺, CD57⁺/KLRG1⁺) nei pazienti con MM rispetto a quelli con MGUS. Queste "*late differentiated senescent cells*" rappresentano uno stadio avanzato di differenziamento e senescenza, che è stato associato ad un'espressione alterata di citochine e a una compromissione della funzionalità immunitaria. La

presenza di questa popolazione tripla positiva potrebbe rappresentare un *marker* prognostico significativo, indicativo di una progressione della malattia e di un microambiente tumorale ostile. L'analisi dell'interazione tra questi marcatori potrebbe fornire ulteriori spunti sul meccanismo di disfunzione delle cellule T nella patogenesi del mieloma multiplo.

L'aumento dell'*uptake* lipidico, osservato mediante il tracciante fluorescente *Bodipy FL C₁₆*, supporta l'ipotesi che l'accumulo lipidico nelle cellule CD8⁺ senescenti influenzi il loro stato funzionale. L'inibizione di CD36 riduce significativamente l'assorbimento lipidico e aumenta la produzione di IFN- γ , indicando che il blocco di CD36 può parzialmente ripristinare la funzionalità delle cellule CD8⁺ senescenti. Tali effetti sono ulteriormente confermati dall'aggiunta dell'acido grasso FA, che determina una riduzione della produzione di IFN- γ e un aumento della perossidazione lipidica, fenomeni che suggeriscono un'associazione tra accumulo lipidico e disfunzione immunitaria delle cellule T CD8⁺.

I risultati ottenuti dalla valutazione dell'espressione del marcatore di mortalità 7AAD nelle cellule CD8⁺ hanno fornito ulteriori indicazioni sulla funzionalità di queste popolazioni linfocitarie nei pazienti con MM. Il marcatore 7AAD è un colorante impermeabile alla membrana che è generalmente escluso dalle cellule vitali, mentre penetra in quelle morte o danneggiate e si intercala al DNA, permettendo di valutare la mortalità cellulare in condizioni di stress metabolico e infiammatorio.

Nelle nostre analisi, abbiamo osservato un aumento dell'espressione di 7AAD nelle cellule CD8⁺ dei pazienti con MM, in particolare nelle condizioni in cui si era verificato un accumulo di acidi grassi. Questo incremento suggerisce che l'accumulo lipidico, associato a un profilo metabolico alterato, contribuisce ad un aumento della mortalità di queste cellule. L'inibizione di CD36 ha mostrato un effetto protettivo significativo, riducendo l'espressione di 7AAD e quindi la mortalità cellulare.

L'aumento dell'espressione di marcatori di senescenza e della perossidazione lipidica in presenza di FA e il loro decremento in seguito al trattamento con ferrostatina-1 (inibitore della ferroptosi) rafforza l'ipotesi di un meccanismo di morte regolata per ferroptosi indotta dagli acidi grassi in questa popolazione CD8⁺. Inoltre, la valutazione delle cellule CD8⁺ in presenza di ferrostatina-1 (Fe), ha dimostrato un aumento della produzione di IFN- γ da parte delle T CD8⁺, indicativo di un ripristino della

funzionalità di queste cellule, nonché un decremento della mortalità cellulare: le condizioni sperimentali hanno rivelato come il trattamento con Fe, sia da solo che in combinazione con l'inibitore di CD36, conduca a una diminuzione della percentuale di cellule CD8⁺ positive per 7AAD, avvalorando l'ipotesi che la ferroptosi potrebbe giocare un ruolo importante nella mortalità di queste cellule.

Infine, la sperimentazione con agonista e inibitore del recettore di acidi grassi PPAR β/δ ha mostrato come l'inibizione di PPAR β/δ riduca l'espressione del CD36 a carico della popolazione CD8 citotossica, favorisca la produzione di IFN- γ da parte delle cellule T CD8⁺ e riduca l'uptake lipidico da parte delle stesse cellule, mentre l'attivazione di PPAR β/δ causa effetti opposti. Questi dati suggeriscono che PPAR β/δ stimola l'espressione di CD36 e la sua modulazione può rappresentare un potenziale *target* terapeutico per limitare la disfunzione lipidica e migliorare la risposta immunitaria nei pazienti con MM.

Questi risultati evidenziano come la modulazione dell'espressione di CD36 possa svolgere un ruolo fondamentale nel preservare la vitalità e la funzionalità delle cellule CD8⁺, suggerendo che il blocco di questo recettore potrebbe contrastare gli effetti deleteri dell'accumulo lipidico e migliorare la risposta immunitaria delle cellule T nei pazienti con MM

CONCLUSIONI

Il nostro studio ha evidenziato un profilo immunofenotipico specifico nelle cellule CD8⁺ dei pazienti con MM rispetto a quelli con MGUS, caratterizzato da una maggiore espressione del marcatore CD36 e da un aumento dell'assorbimento lipidico. Questo meccanismo sembra contribuire alla senescenza delle cellule citotossiche, con una progressiva riduzione della loro capacità di produrre IFN- γ e combattere le cellule tumorali. L'inibizione di CD36 si è dimostrata efficace nel ridurre la perossidazione lipidica e ripristinare parzialmente la funzionalità delle cellule CD8⁺ in vitro, aprendo nuove prospettive per interventi mirati che potrebbero migliorare la risposta immunitaria nel mieloma multiplo. Inoltre, il ruolo del metabolismo lipidico e della ferroptosi nelle cellule CD8⁺ senescenti suggerisce che la modulazione dell'*uptake* lipidico e della perossidazione potrebbe rappresentare un'importante strategia per prevenire o rallentare la progressione neoplastica. Questi risultati delineano il CD36

come *target* terapeutico innovativo per migliorare la vitalità e la funzione citotossica delle cellule CD8⁺ nei pazienti con mieloma multiplo.

BIBLIOGRAFIA

2018 Americas Conference on Medical Imaging and Clinical Research (AMICR 2018), Panama, 23-25 December 2018. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018 Dec;124 Suppl 2:3-119. doi: 10.1111/bcpt.13173. PMID: 30548213.

Alrasheed N, Lee L, Ghorani E, Henry JY, Conde L, Chin M, Galas-Filipowicz D, Furness AJS, Chavda SJ, Richards H, De-Silva D, Cohen OC, Patel D, Brooks A, Rodriguez-Justo M, Pule M, Herrero J, Quezada SA, Yong KL. Marrow-Infiltrating Regulatory T Cells Correlate with the Presence of Dysfunctional CD4⁺PD-1⁺ Cells and Inferior Survival in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2020 Jul 1;26(13):3443-3454. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1714. Epub 2020 Mar 27. PMID: 32220887.

An G, Acharya C, Feng X, Wen K, Zhong M, Zhang L, Munshi NC, Qiu L, Tai YT, Anderson KC. Osteoclasts promote immune suppressive microenvironment in multiple myeloma: therapeutic implication. *Blood*. 2016 Sep 22;128(12):1590-603. doi: 10.1182/blood-2016-03-707547. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27418644; PMCID: PMC5034739.

Attal M, Harousseau JL. Standard therapy versus autologous transplantation in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1997 Feb;11(1):133-46. doi: 10.1016/s0889-8588(05)70419-6. PMID: 9081208.

Attal M, Richardson PG, Rajkumar SV, San-Miguel J, Beksac M, Spicka I, Leleu X, Schjesvold F, Moreau P, Dimopoulos MA, Huang JS, Minarik J, Cavo M, Prince HM, Macé S, Corzo KP, Campana F, Le-Guenec S, Dubin F, Anderson KC; ICARIA-MM study group. Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019 Dec 7;394(10214):2096-2107. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32556-5. Epub 2019 Nov 14. Erratum in: *Lancet*. 2019 Dec 7;394(10214):2072. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32944-7. PMID: 31735560.

Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L, Marit G, Michaux L, Voillat L, Renaud M, Grosbois B, Guillermin G, Benboubker L, Monconduit M, Thieblemont C, Casassus P, Caillot D, Stoppa AM, Sotto JJ, Wetterwald M, Dumontet C, Fuzibet JG, Azais I, Dorvaux V, Zandecki M, Bataille R, Minvielle S, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3489-95. doi: 10.1182/blood-2006-08-040410. Epub 2007 Jan 5. PMID: 17209057.

Badros A, Hyjek E, Ma N, Lesokhin A, Dogan A, Rapoport AP, Kocoglu M, Lederer E, Philip S, Milliron T, Dell C, Goloubeva O, Singh Z. Pembrolizumab,

pomalidomide, and low-dose dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*. 2017 Sep 7;130(10):1189-1197. doi: 10.1182/blood-2017-03-775122. Epub 2017 May 1. PMID: 28461396.

Balasa B, Yun R, Belmar NA, Fox M, Chao DT, Robbins MD, Starling GC, Rice AG. Elotuzumab enhances natural killer cell activation and myeloma cell killing through interleukin-2 and TNF- α pathways. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Jan;64(1):61-73. doi: 10.1007/s00262-014-1610-3. Epub 2014 Oct 7. PMID: 25287778; PMCID: PMC4282702.

Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM. Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2655-61. doi: 10.1182/blood-2006-03-011353. Epub 2006 Jun 8. PMID: 16763205; PMCID: PMC1895594.

Barilà G, Bonaldi L, Grassi A, Martines A, Liço A, Macrì N, Nalio S, Pavan L, Berno T, Branca A, Calabretto G, Carrino M, Teramo A, Manni S, Piazza F, Semenzato G, Zambello R. Identification of the true hyperdiploid multiple myeloma subset by combining conventional karyotyping and FISH analysis. *Blood Cancer J*. 2020 Feb 17;10(2):18. doi: 10.1038/s41408-020-0285-6. PMID: 32066724; PMCID: PMC7026173.

Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, Catalano J, Belch AR, Cavo M, Pinto A, Weisel K, Ludwig H, Bahlis N, Banos A, Tiab M, Delforge M, Cavenagh J, Gheraldes C, Lee JJ, Chen C, Oriol A, de la Rubia J, Qiu L, White DJ, Binder D, Anderson K, Feraud JP, Moreau P, Attal M, Knight R, Chen G, Van Oostendorp J, Jacques C, Ervin-Haynes A, Avet-Loiseau H, Hulin C, Facon T; FIRST Trial Team. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N Engl J Med*. 2014 Sep 4;371(10):906-17. doi: 10.1056/NEJMoa1402551. PMID: 25184863.

Bensinger W. Allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014 Oct;28(5):891-902. doi: 10.1016/j.hoc.2014.06.001. Epub 2014 Jul 25. PMID: 25212888.

Benson DM Jr, Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, Baiocchi RA, Zhang J, Yu J, Smith MK, Greenfield CN, Porcu P, Devine SM, Rotem-Yehudar R, Lozanski G, Byrd JC, Caligiuri MA. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood*. 2010 Sep 30;116(13):2286-94. doi: 10.1182/blood-2010-02-271874. Epub 2010 May 11. PMID: 20460501; PMCID: PMC3490105.

Bernal M, Garrido P, Jiménez P, Carretero R, Almagro M, López P, Navarro P, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Changes in activatory and inhibitory natural killer (NK) receptors may induce progression to multiple myeloma: implications for tumor

evasion of T and NK cells. *Hum Immunol.* 2009 Oct;70(10):854-7. doi: 10.1016/j.humimm.2009.07.004. Epub 2009 Jul 4. PMID: 19580833.

Beyer M, Kochanek M, Giese T, Endl E, Weihrauch MR, Knolle PA, Classen S, Schultze JL. In vivo peripheral expansion of naive CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood.* 2006 May 15;107(10):3940-9. doi: 10.1182/blood-2005-09-3671. Epub 2006 Jan 12. PMID: 16410445.

Bogen B, Ruffini PA, Corthay A, Fredriksen AB, Frøyland M, Lundin K, Røsjø E, Thompson K, Massaia M. Idiotype-specific immunotherapy in multiple myeloma: suggestions for future directions of research. *Haematologica.* 2006 Jul;91(7):941-8. PMID: 16818282.

Bogen B, Weiss S. Processing and presentation of idiotypes to MHC-restricted T cells. *Int Rev Immunol.* 1993;10(4):337-55. doi: 10.3109/08830189309061709. PMID: 8294847.

Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, Van Loo P, Alexandrov LB, Martincorena I, Dawson KJ, Iorio F, Nik-Zainal S, Bignell GR, Hinton JW, Li Y, Tubio JM, McLaren S, O' Meara S, Butler AP, Teague JW, Mudie L, Anderson E, Rashid N, Tai YT, Shamas MA, Sperling AS, Fulciniti M, Richardson PG, Parmigiani G, Magrangeas F, Minvielle S, Moreau P, Attal M, Facon T, Futreal PA, Anderson KC, Campbell PJ, Munshi NC. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nat Commun.* 2014;5:2997. doi: 10.1038/ncomms3997. PMID: 24429703; PMCID: PMC3905727.

Bort A, Sánchez BG, de Miguel I, Mateos-Gómez PA, Diaz-Laviada I. Dysregulated lipid metabolism in hepatocellular carcinoma cancer stem cells. *Mol Biol Rep.* 2020 Apr;47(4):2635-2647. doi: 10.1007/s11033-020-05352-3. Epub 2020 Mar 3. PMID: 32125560.

Botta C, Di Martino MT, Ciliberto D, Cucè M, Correale P, Rossi M, Tagliaferri P, Tassone P. A gene expression inflammatory signature specifically predicts multiple myeloma evolution and patients survival. *Blood Cancer J.* 2016 Dec 16;6(12):e511. doi: 10.1038/bcj.2016.118. PMID: 27983725; PMCID: PMC5223153.

Bottino C, Moretta L, Moretta A. NK cell activating receptors and tumor recognition in humans. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;298:175-82. doi: 10.1007/3-540-27743-9_9. PMID: 16323416.

Boyd KD, Ross FM, Walker BA, Wardell CP, Tapper WJ, Chiecchio L, Dagrada G, Konn ZJ, Gregory WM, Jackson GH, Child JA, Davies FE, Morgan GJ; NCRI Haematology Oncology Studies Group. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clin Cancer Res.* 2011 Dec 15;17(24):7776-84. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1791. Epub 2011 Oct 12. PMID: 21994415; PMCID: PMC5751883.

Braga WM, da Silva BR, de Carvalho AC, Maekawa YH, Bortoluzzo AB, Rizzatti EG, Atanackovic D, Colleoni GW. FOXP3 and CTLA4 overexpression in multiple myeloma bone marrow as a sign of accumulation of CD4(+) T regulatory cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2014 Nov;63(11):1189-97. doi: 10.1007/s00262-014-1589-9. Epub 2014 Aug 7. PMID: 25099367; PMCID: PMC4209089.

Brimnes MK, Vangsted AJ, Knudsen LM, Gimsing P, Gang AO, Johnsen HE, Svane IM. Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scand J Immunol.* 2010 Dec;72(6):540-7. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02463.x. PMID: 21044128.

Bringhen S, Mina R, Cafro AM, Liberati AM, Spada S, Belotti A, Gaidano G, Patriarca F, Troia R, Fanin R, De Paoli L, Rossi G, Lombardo A, Bertazzoni P, Palumbo A, Sonneveld P, Boccadoro M. Once-weekly carfilzomib, pomalidomide, and low-dose dexamethasone for relapsed/refractory myeloma: a phase I/II study. *Leukemia.* 2018 Aug;32(8):1803-1807. doi: 10.1038/s41375-018-0024-1. Epub 2018 Jan 30. PMID: 29479061.

Bringhen S, Mina R, Petrucci MT, Gaidano G, Ballanti S, Musto P, Offidani M, Spada S, Benevolo G, Ponticelli E, Galienucci P, Cavo M, Di Toritto TC, Di Raimondo F, Montefusco V, Palumbo A, Boccadoro M, Larocca A. Once-weekly *versus* twice-weekly carfilzomib in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a pooled analysis of two phase I/II studies. *Haematologica.* 2019 Aug;104(8):1640-1647. doi: 10.3324/haematol.2018.208272. Epub 2019 Feb 7. PMID: 30733270; PMCID: PMC6669142.

Brown R, Kabani K, Favaloro J, Yang S, Ho PJ, Gibson J, Fromm P, Suen H, Woodland N, Nassif N, Hart D, Joshua D. CD86⁺ or HLA-G⁺ can be transferred via trogocytosis from myeloma cells to T cells and are associated with poor prognosis. *Blood.* 2012 Sep 6;120(10):2055-63. doi: 10.1182/blood-2012-03-416792. Epub 2012 Jun 15. PMID: 22705596.

Brown RD, Ho PJ. Detection of malignant plasma cells in the bone marrow and peripheral blood of patients with multiple myeloma. *Methods Mol Biol.* 2002;179:85-91. doi: 10.1385/1-59259-238-4:085. PMID: 11692875.

Bryant C, Suen H, Brown R, Yang S, Favaloro J, Aklilu E, Gibson J, Ho PJ, Iland H, Fromm P, Woodland N, Nassif N, Hart D, Joshua DE. Long-term survival in multiple myeloma is associated with a distinct immunological profile, which includes proliferative cytotoxic T-cell clones and a favourable Treg/Th17 balance. *Blood Cancer J.* 2013 Sep 13;3(9):e148. doi: 10.1038/bcj.2013.34. PMID: 24036947; PMCID: PMC3789202.

Calcinotto A, Brevi A, Chesi M, Ferrarese R, Garcia Perez L, Grioni M, Kumar S, Garbitt VM, Sharik ME, Henderson KJ, Tonon G, Tomura M, Miwa Y, Esplugues E, Flavell RA, Huber S, Canducci F, Rajkumar VS, Bergsagel PL, Bellone M.

Microbiota-driven interleukin-17-producing cells and eosinophils synergize to accelerate multiple myeloma progression. *Nat Commun.* 2018 Dec 3;9(1):4832. doi: 10.1038/s41467-018-07305-8. PMID: 30510245; PMCID: PMC6277390.

Cannons JL, Tangye SG, Schwartzberg PL. SLAM family receptors and SAP adaptors in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:665-705. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101302. PMID: 21219180.

Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, Groh V, Spies T, Pollio G, Cosman D, Catalano L, Tassone P, Rotoli B, Venuta S. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood.* 2005 Jan 1;105(1):251-8. doi: 10.1182/blood-2004-04-1422. Epub 2004 Aug 24. PMID: 15328155.

Carulli G, Buda G, Azzarà A, Ciancia EM, Sammuri P, Domenichini C, Guerri V, Petrini M. CD229 Expression on Bone Marrow Plasma Cells from Patients with Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathies of Uncertain Significance. *Acta Haematol.* 2016;135(1):11-4. doi: 10.1159/000380939. Epub 2015 Aug 15. PMID: 26303094.

Castella B, Foglietta M, Sciancalepore P, Rigoni M, Coscia M, Griggio V, Vitale C, Ferracini R, Saraci E, Omedé P, Riganti C, Palumbo A, Boccadoro M, Massaia M. Anergic bone marrow V γ 9V δ 2 T cells as early and long-lasting markers of PD-1-targetable microenvironment-induced immune suppression in human myeloma. *Oncoimmunology.* 2015 May 26;4(11):e1047580. doi: 10.1080/2162402X.2015.1047580. PMID: 26451323; PMCID: PMC4589055.

Cavo M, Benni M, Ronconi S, Fiacchini M, Gozzetti A, Zamagni E, Cellini C, Tosi P, Baccarani M, Tura S; Writing Committee of the "Bologna 90" Clinical Trial. Melphalan-prednisone versus alternating combination VAD/MP or VND/MP as primary therapy for multiple myeloma: final analysis of a randomized clinical study. *Haematologica.* 2002 Sep;87(9):934-42. PMID: 12217805.

Chan AC, Neeson P, Leeansyah E, Tainton K, Quach H, Prince HM, Harrison SJ, Godfrey DI, Ritchie D, Berzins SP. Natural killer T cell defects in multiple myeloma and the impact of lenalidomide therapy. *Clin Exp Immunol.* 2014 Jan;175(1):49-58. doi: 10.1111/cei.12196. PMID: 24032527; PMCID: PMC3898554.

Chang DH, Deng H, Matthews P, Krasovsky J, Ragupathi G, Spisek R, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV. Inflammation-associated lysophospholipids as ligands for CD1d-restricted T cells in human cancer. *Blood.* 2008 Aug 15;112(4):1308-16. doi: 10.1182/blood-2008-04-149831. Epub 2008 Jun 5. PMID: 18535199; PMCID: PMC2515141.

Chang Y, Robidoux J. Dyslipidemia management update. *Curr Opin Pharmacol.* 2017 Apr;33:47-55. doi: 10.1016/j.coph.2017.04.005. Epub 2017 May 17. PMID: 28527325.

Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, Harview CL, Brunet JP, Ahmann GJ, Adli M, Anderson KC, Ardlie KG, Auclair D, Baker A, Bergsagel PL, Bernstein BE, Drier Y, Fonseca R, Gabriel SB, Hofmeister CC, Jagannath S, Jakubowiak AJ, Krishnan A, Levy J, Liefeld T, Lonial S, Mahan S, Mfuko B, Monti S, Perkins LM, Onofrio R, Pugh TJ, Rajkumar SV, Ramos AH, Siegel DS, Sivachenko A, Stewart AK, Trudel S, Vij R, Voet D, Winckler W, Zimmerman T, Carpten J, Trent J, Hahn WC, Garraway LA, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*. 2011 Mar 24;471(7339):467-72. doi: 10.1038/nature09837. PMID: 21430775; PMCID: PMC3560292.

Chauhan D, Singh AV, Brahmandam M, Carrasco R, Bandi M, Hideshima T, Bianchi G, Podar K, Tai YT, Mitsiades C, Raje N, Jaye DL, Kumar SK, Richardson P, Munshi N, Anderson KC. Functional interaction of plasmacytoid dendritic cells with multiple myeloma cells: a therapeutic target. *Cancer Cell*. 2009 Oct 6;16(4):309-23. doi: 10.1016/j.ccr.2009.08.019. PMID: 19800576; PMCID: PMC2762396.

Chiecchio L, Protheroe RK, Ibrahim AH, Cheung KL, Rudduck C, Dagrada GP, Cabanas ED, Parker T, Nightingale M, Wechalekar A, Orchard KH, Harrison CJ, Cross NC, Morgan GJ, Ross FM. Deletion of chromosome 13 detected by conventional cytogenetics is a critical prognostic factor in myeloma. *Leukemia*. 2006 Sep;20(9):1610-7. doi: 10.1038/sj.leu.2404304. Epub 2006 Jul 6. PMID: 16826223.

Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003 May 8;348(19):1875-83. doi: 10.1056/NEJMoa022340. PMID: 12736280.

Chng WJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, Winkler JM, Jalal SM, Bergsagel PL, Chesi M, Trendle MC, Oken MM, Blood E, Henderson K, Santana-Dávila R, Kyle RA, Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Greipp PR, Fonseca R. A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS. *Blood*. 2005 Sep 15;106(6):2156-61. doi: 10.1182/blood-2005-02-0761. Epub 2005 May 26. PMID: 15920009; PMCID: PMC1895145.

Choi KC, Lee SY, Yoo HJ, Ryu OH, Lee KW, Kim SM, Baik SH, Choi KM. Effect of PPAR-delta agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and resistin in rat adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May 25;357(1):62-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.114. Epub 2007 Mar 28. PMID: 17418807.

Choi SH, Tamura K, Khajuria RK, Bhare D, Nesterenko I, Lawler J, Shah K. Antiangiogenic variant of TSP-1 targets tumor cells in glioblastomas. *Mol Ther*. 2015 Feb;23(2):235-43. doi: 10.1038/mt.2014.214. Epub 2014 Oct 31. PMID: 25358253; PMCID: PMC4445617.

Christofides A, Konstantinidou E, Jani C, Boussiotis VA. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism*. 2021 Jan;114:154338. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154338. Epub 2020 Aug 11. PMID: 32791172; PMCID: PMC7736084.

Chu VT, Fröhlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, Lee JJ, Löhning M, Berek C. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*. 2011 Feb;12(2):151-9. doi: 10.1038/ni.1981. Epub 2011 Jan 9. PMID: 21217761.

Chubb D, Weinhold N, Broderick P, Chen B, Johnson DC, Försti A, Vijayakrishnan J, Migliorini G, Dobbins SE, Holroyd A, Hose D, Walker BA, Davies FE, Gregory WA, Jackson GH, Irving JA, Pratt G, Fegan C, Fenton JA, Neben K, Hoffmann P, Nöthen MM, Mühleisen TW, Eisele L, Ross FM, Straka C, Einsele H, Langer C, Dörner E, Allan JM, Jauch A, Morgan GJ, Hemminki K, Houlston RS, Goldschmidt H. Common variation at 3q26.2, 6p21.33, 17p11.2 and 22q13.1 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet*. 2013 Oct;45(10):1221-1225. doi: 10.1038/ng.2733. Epub 2013 Aug 18. PMID: 23955597; PMCID: PMC5053356.

Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Lancaster E, Vogl DT, Weiss BM, Dengel K, Nelson A, Plesa G, Chen F, Davis MM, Hwang WT, Young RM, Brogdon JL, Isaacs R, Pruteanu-Malinici I, Siegel DL, Levine BL, June CH, Milone MC. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest*. 2019 Mar 21;129(6):2210-2221. doi: 10.1172/JCI126397. PMID: 30896447; PMCID: PMC6546468.

Coll T, Rodríguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, Eyre E, Palomer X, Vázquez-Carrera M. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Curr Mol Pharmacol*. 2009 Jan;2(1):46-55. doi: 10.2174/1874467210902010046. PMID: 20021445.

Collins SM, Bakan CE, Swartzel GD, Hofmeister CC, Efebera YA, Kwon H, Starling GC, Ciarlariello D, Bhaskar S, Briercheck EL, Hughes T, Yu J, Rice A, Benson DM Jr. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 Dec;62(12):1841-9. doi: 10.1007/s00262-013-1493-8. Epub 2013 Oct 26. PMID: 24162108; PMCID: PMC4134870.

Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 1998 Dec;16(12):3832-42. doi: 10.1200/JCO.1998.16.12.3832. PMID: 9850028.

Costa F, Vescovini R, Bolzoni M, Marchica V, Storti P, Toscani D, Accardi F, Notarfranchi L, Dalla Palma B, Manferdini C, Manni S, Todaro G, Lisignoli G, Piazza F, Aversa F, Giuliani N. Lenalidomide increases human dendritic cell maturation in

multiple myeloma patients targeting monocyte differentiation and modulating mesenchymal stromal cell inhibitory properties. *Oncotarget*. 2017 May 23;8(32):53053-53067. doi: 10.18632/oncotarget.18085. PMID: 28881793; PMCID: PMC5581092.

Costello RT, Boehrer A, Sanchez C, Mercier D, Baier C, Le Treut T, Sébahoun G. Differential expression of natural killer cell activating receptors in blood versus bone marrow in patients with monoclonal gammopathy. *Immunology*. 2013 Jul;139(3):338-41. doi: 10.1111/imm.12082. PMID: 23360454; PMCID: PMC3701180.

DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med*. 2001 Jan 11;344(2):114-23. doi: 10.1056/NEJM200101113440207. PMID: 11150363.

Deng M, Cai X, Long L, Xie L, Ma H, Zhou Y, Liu S, Zeng C. CD36 promotes the epithelial-mesenchymal transition and metastasis in cervical cancer by interacting with TGF- β . *J Transl Med*. 2019 Oct 26;17(1):352. doi: 10.1186/s12967-019-2098-6. PMID: 31655604; PMCID: PMC6815430.

Dhodapkar MV, Geller MD, Chang DH, Shimizu K, Fujii S, Dhodapkar KM, Krasovsky J. A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. *J Exp Med*. 2003 Jun 16;197(12):1667-76. doi: 10.1084/jem.20021650. Epub 2003 Jun 9. PMID: 12796469; PMCID: PMC2193955.

Dhodapkar MV, Krasovsky J, Olson K. T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):13009-13. doi: 10.1073/pnas.202491499. Epub 2002 Sep 16. PMID: 12235374; PMCID: PMC130577.

Dhodapkar MV, Krasovsky J, Osman K, Geller MD. Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med*. 2003 Dec 1;198(11):1753-7. doi: 10.1084/jem.20031030. Epub 2003 Nov 24. PMID: 14638846; PMCID: PMC2194131.

Dhodapkar MV, Sexton R, Das R, Dhodapkar KM, Zhang L, Sundaram R, Soni S, Crowley JJ, Orlowski RZ, Barlogie B. Prospective analysis of antigen-specific immunity, stem-cell antigens, and immune checkpoints in monoclonal gammopathy. *Blood*. 2015 Nov 26;126(22):2475-8. doi: 10.1182/blood-2015-03-632919. Epub 2015 Oct 14. PMID: 26468228; PMCID: PMC4661169.

Dhodapkar MV. MGUS to myeloma: a mysterious gammopathy of underexplored significance. *Blood*. 2016 Dec 8;128(23):2599-2606. doi: 10.1182/blood-2016-09-692954. Epub 2016 Oct 13. PMID: 27737890; PMCID: PMC5146746.

Dimopoulos MA, Dytfeld D, Grosicki S, Moreau P, Takezako N, Hori M, Leleu X, LeBlanc R, Suzuki K, Raab MS, Richardson PG, Popa McKiver M, Jou YM, Shelat SG, Robbins M, Rafferty B, San-Miguel J. Elotuzumab plus Pomalidomide and

Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2018 Nov 8;379(19):1811-1822. doi: 10.1056/NEJMoa1805762. PMID: 30403938.

Dimopoulos MA, Terpos E, Boccadoro M, Delimpasi S, Beksac M, Katodritou E, Moreau P, Baldini L, Symeonidis A, Bila J, Oriol A, Mateos MV, Einsele H, Orfanidis I, Ahmadi T, Ukropec J, Kampfenkel T, Schechter JM, Qiu Y, Amin H, Vermeulen J, Carson R, Sonneveld P; APOLLO Trial Investigators. Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone versus pomalidomide and dexamethasone alone in previously treated multiple myeloma (APOLLO): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2021 Jun;22(6):801-812. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00128-5. PMID: 34087126.

Dobruch J, Oszczudłowski M. Bladder Cancer: Current Challenges and Future Directions. *Medicina (Kaunas).* 2021 Jul 24;57(8):749. doi: 10.3390/medicina57080749. PMID: 34440955; PMCID: PMC8402079.

Dosani T, Carlsten M, Maric I, Landgren O. The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of myeloma [corrected] and their uses in immunotherapies. *Blood Cancer J.* 2015 Apr 17;5(4):e306. doi: 10.1038/bcj.2015.32. Erratum in: *Blood Cancer J.* 2015 Jul 03;5:e321. doi: 10.1038/bcj.2015.49. PMID: 25885426; PMCID: PMC4450330.

Drury J, Rychahou PG, He D, Jafari N, Wang C, Lee EY, Weiss HL, Evers BM, Zaytseva YY. Inhibition of Fatty Acid Synthase Upregulates Expression of CD36 to Sustain Proliferation of Colorectal Cancer Cells. *Front Oncol.* 2020 Jul 31;10:1185. doi: 10.3389/fonc.2020.01185. PMID: 32850342; PMCID: PMC7411002.

Drury J, Rychahou PG, Kelson CO, Geisen ME, Wu Y, He D, Wang C, Lee EY, Evers BM, Zaytseva YY. Upregulation of CD36, a Fatty Acid Translocase, Promotes Colorectal Cancer Metastasis by Increasing MMP28 and Decreasing E-Cadherin Expression. *Cancers (Basel).* 2022 Jan 5;14(1):252. doi: 10.3390/cancers14010252. PMID: 35008415; PMCID: PMC8750155.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803. PMID: 15032581.

Durie BGM, Hoering A, Abidi MH, Rajkumar SV, Epstein J, Kahanic SP, Thakuri M, Reu F, Reynolds CM, Sexton R, Orlowski RZ, Barlogie B, Dispenzieri A. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2017 Feb 4;389(10068):519-527. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31594-X. Epub 2016 Dec 23. PMID: 28017406; PMCID: PMC5546834.

Dziembowski A, Lorentzen E, Conti E, Séraphin B. A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Jan;14(1):15-22. doi: 10.1038/nsmb1184. Epub 2006 Dec 17. PMID: 17173052.

El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, Cook G, Feyler S, Richards SJ, Davies FE, Morgan GJ, Cook GP. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;67(18):8444-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4230. PMID: 17875681.

Epstein MM, Kasperzyk JL, Mucci LA, Giovannucci E, Price A, Wolk A, Håkansson N, Fall K, Andersson SO, Andrén O. Dietary fatty acid intake and prostate cancer survival in Örebro County, Sweden. *Am J Epidemiol.* 2012 Aug 1;176(3):240-52. doi: 10.1093/aje/kwr520. Epub 2012 Jul 10. PMID: 22781428; PMCID: PMC3491963.

Erhart F, Blauensteiner B, Zirkovits G, Printz D, Soukup K, Klingenbrunner S, Fischhuber K, Reitermaier R, Halfmann A, Lötsch D, Spiegl-Kreinecker S, Berger W, Visus C, Dohnal A. Gliomasphere marker combinatorics: multidimensional flow cytometry detects CD44+/CD133+/ITGA6+/CD36+ signature. *J Cell Mol Med.* 2019 Jan;23(1):281-292. doi: 10.1111/jcmm.13927. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30467961; PMCID: PMC6307809.

Facon T, Kumar S, Plesner T, Orlowski RZ, Moreau P, Bahlis N, Basu S, Nahi H, Hulin C, Quach H, Goldschmidt H, O'Dwyer M, Perrot A, Venner CP, Weisel K, Mace JR, Raje N, Attal M, Tiab M, Macro M, Frenzel L, Leleu X, Ahmadi T, Chiu C, Wang J, Van Rampelbergh R, Uhlar CM, Kobos R, Qi M, Usmani SZ; MAIA Trial Investigators. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med.* 2019 May 30;380(22):2104-2115. doi: 10.1056/NEJMoa1817249. PMID: 31141632; PMCID: PMC10045721.

Facon T, Venner CP, Bahlis NJ, Offner F, White DJ, Karlin L, Benboubker L, Rigaudeau S, Rodon P, Voog E, Yoon SS, Suzuki K, Shibayama H, Zhang X, Twumasi-Ankrah P, Yung G, Rifkin RM, Moreau P, Lonial S, Kumar SK, Richardson PG, Rajkumar SV. Oral ixazomib, lenalidomide, and dexamethasone for transplant-ineligible patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 2021 Jul 1;137(26):3616-3628. doi: 10.1182/blood.2020008787. PMID: 33763699; PMCID: PMC8462404.

Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998 Oct 30;438(1-2):55-60. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01273-3. PMID: 9821958.

Fang Y, Shen ZY, Zhan YZ, Feng XC, Chen KL, Li YS, Deng HJ, Pan SM, Wu DH, Ding Y. CD36 inhibits β -catenin/c-myc-mediated glycolysis through ubiquitination of GPC4 to repress colorectal tumorigenesis. *Nat Commun.* 2019 Sep 4;10(1):3981. doi: 10.1038/s41467-019-11662-3. PMID: 31484922; PMCID: PMC6726635.

Farge T, Saland E, de Toni F, Aroua N, Hosseini M, Perry R, Bosc C, Sugita M, Stuani L, Fraisse M, Scotland S, Larrue C, Boutzen H, Féliu V, Nicolau-Travers ML, Cassant-Sourdy S, Broin N, David M, Serhan N, Sarry A, Tavitian S, Kaoma T, Vallar L, Iacovoni J, Linares LK, Montersino C, Castellano R, Griessinger E, Collette Y,

Duchamp O, Barreira Y, Hirsch P, Palama T, Gales L, Delhommeau F, Garmy-Susini BH, Portais JC, Vergez F, Selak M, Danet-Desnoyers G, Carroll M, Récher C, Sarry JE. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov.* 2017 Jul;7(7):716-735. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0441. Epub 2017 Apr 17. PMID: 28416471; PMCID: PMC5501738.

Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, Costello RT. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood.* 2007 Jan 1;109(1):323-30. doi: 10.1182/blood-2005-08-027979. Epub 2006 Aug 29. PMID: 16940427.

Favaloro J, Liyadipitiya T, Brown R, Yang S, Suen H, Woodland N, Nassif N, Hart D, Fromm P, Weatherburn C, Gibson J, Ho PJ, Joshua D. Myeloid derived suppressor cells are numerically, functionally and phenotypically different in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2014 Dec;55(12):2893-900. doi: 10.3109/10428194.2014.904511. Epub 2014 May 12. PMID: 24625328.

Feng P, Yan R, Dai X, Xie X, Wen H, Yang S. The alteration and clinical significance of Th1/Th2/Th17/Treg cells in patients with multiple myeloma. *Inflammation.* 2015 Apr;38(2):705-9. doi: 10.1007/s10753-014-9980-4. PMID: 25034833.

Feng WW, Bang S, Kurokawa M. CD36: a key mediator of resistance to HER2 inhibitors in breast cancer. *Mol Cell Oncol.* 2020 Jan 23;7(2):1715766. doi: 10.1080/23723556.2020.1715766. PMID: 32158927; PMCID: PMC7051136.

Feng WW, Wilkins O, Bang S, Ung M, Li J, An J, Del Genio C, Canfield K, DiRenzo J, Wells W, Gaur A, Robey RB, Guo JY, Powles RL, Sotiriou C, Pusztai L, Febbraio M, Cheng C, Kinlaw WB, Kurokawa M. CD36-Mediated Metabolic Rewiring of Breast Cancer Cells Promotes Resistance to HER2-Targeted Therapies. *Cell Rep.* 2019 Dec 10;29(11):3405-3420.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.008. PMID: 31825825; PMCID: PMC6938262.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer.* 2021 Apr 5. doi: 10.1002/ijc.33588. Epub ahead of print. PMID: 33818764.

Feyler S, Scott GB, Parrish C, Jarmin S, Evans P, Short M, McKinley K, Selby PJ, Cook G. Tumour cell generation of inducible regulatory T-cells in multiple myeloma is contact-dependent and antigen-presenting cell-independent. *PLoS One.* 2012;7(5):e35981. doi: 10.1371/journal.pone.0035981. Epub 2012 May 29. PMID: 22666318; PMCID: PMC3362588.

Feyler S, von Lilienfeld-Toal M, Jarmin S, Marles L, Rawstron A, Ashcroft AJ, Owen RG, Selby PJ, Cook G. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+)CD4(-)CD8(-)alpha-betaTCR(+) Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with

disease burden. *Br J Haematol*. 2009 Mar;144(5):686-95. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07530.x. Epub 2008 Dec 26. PMID: 19133978.

Finn OJ. Premalignant lesions as targets for cancer vaccines. *J Exp Med*. 2003 Dec 1;198(11):1623-6. doi: 10.1084/jem.20031787. Epub 2003 Nov 24. PMID: 14638849; PMCID: PMC2194136.

Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Dewald GW. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1417-24. PMID: 12149226.

Fonseca R, Oken MM, Harrington D, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR, Dewald GW. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia*. 2001 Jun;15(6):981-6. doi: 10.1038/sj.leu.2402125. PMID: 11417487.

Fournier A, McLeer-Florin A, Lefebvre C, Duley S, Barki L, Ribeyron J, Alboukadel K, Hamaidia S, Granjon A, Gressin R, Lajmanovich A, Bonnefoix T, Chauvelier S, Debernardi A, Rousseaux S, de Fraipont F, Figeac M, Kerckaert JP, De Vos J, Usson Y, Delaval K, Grichine A, Vourc'h C, Khochbin S, Feil R, Leroux D, Callanan MB. 1q12 chromosome translocations form aberrant heterochromatic foci associated with changes in nuclear architecture and gene expression in B cell lymphoma. *EMBO Mol Med*. 2010 May;2(5):159-71. doi: 10.1002/emmm.201000067. PMID: 20432501; PMCID: PMC3377314.

Frank AC, Ebersberger S, Fink AF, Lampe S, Weigert A, Schmid T, Ebersberger I, Syed SN, Brüne B. Apoptotic tumor cell-derived microRNA-375 uses CD36 to alter the tumor-associated macrophage phenotype. *Nat Commun*. 2019 Mar 8;10(1):1135. doi: 10.1038/s41467-019-08989-2. PMID: 30850595; PMCID: PMC6408494.

Frassanito MA, Cusmai A, Dammacco F. Deregulated cytokine network and defective Th1 immune response in multiple myeloma. *Clin Exp Immunol*. 2001 Aug;125(2):190-7. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01582.x. PMID: 11529908; PMCID: PMC1906126.

Frassanito MA, Ruggieri S, Desantis V, Di Marzo L, Leone P, Racanelli V, Fumarulo R, Dammacco F, Vacca A. Myeloma cells act as tolerogenic antigen-presenting cells and induce regulatory T cells in vitro. *Eur J Haematol*. 2015 Jul;95(1):65-74. doi: 10.1111/ejh.12481. Epub 2015 Feb 23. PMID: 25409753.

Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013 Oct;14(10):1014-22. doi: 10.1038/ni.2703. PMID: 24048123; PMCID: PMC4118725.

Galustian C, Meyer B, Labarthe MC, Dredge K, Klaschka D, Henry J, Todryk S, Chen R, Muller G, Stirling D, Schafer P, Bartlett JB, Dalglish AG. The anti-cancer agents lenalidomide and pomalidomide inhibit the proliferation and function of T regulatory

cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Jul;58(7):1033-45. doi: 10.1007/s00262-008-0620-4. Epub 2008 Nov 14. PMID: 19009291; PMCID: PMC11030759.

Ganeshan P, Hakim M, Verma R, Sharma A, Kumar L. Significantly reduced regulatory T cell population in patients with untreated multiple myeloma. *Leuk Res.* 2011 Jul;35(7):874-8. doi: 10.1016/j.leukres.2010.11.010. Epub 2010 Dec 10. PMID: 21146215.

Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, Zaretsky JM, Sun L, Hugo W, Wang X, Parisi G, Saus CP, Torrejon DY, Graeber TG, Comin-Anduix B, Hu-Lieskovan S, Damoiseaux R, Lo RS, Ribas A. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* 2017 May 9;19(6):1189-1201. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.031. Erratum in: *Cell Rep.* 2019 Dec 10;29(11):3766. doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.113. PMID: 28494868; PMCID: PMC6420824.

Garcia-Roves P, Huss JM, Han DH, Hancock CR, Iglesias-Gutierrez E, Chen M, Holloszy JO. Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 19;104(25):10709-13. doi: 10.1073/pnas.0704024104. Epub 2007 Jun 4. PMID: 17548828; PMCID: PMC1965577.

García-Sanz R, González M, Orfão A, Moro MJ, Hernández JM, Borrego D, Carnero M, Casanova F, Báñez A, Jiménez R, Portero JA, San Miguel JF. Analysis of natural killer-associated antigens in peripheral blood and bone marrow of multiple myeloma patients and prognostic implications. *Br J Haematol.* 1996 Apr;93(1):81-8. doi: 10.1046/j.1365-2141.1996.4651006.x. PMID: 8611480.

Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 2005 Oct 3;202(7):919-29. doi: 10.1084/jem.20050463. Epub 2005 Sep 26. PMID: 16186184; PMCID: PMC2213166.

Ghoneum A, Gonzalez D, Abdulfattah AY, Said N. Metabolic Plasticity in Ovarian Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel).* 2020 May 17;12(5):1267. doi: 10.3390/cancers12051267. PMID: 32429566; PMCID: PMC7281273.

Giannopoulos K, Kaminska W, Hus I, Dmoszynska A. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br J Cancer.* 2012 Jan 31;106(3):546-52. doi: 10.1038/bjc.2011.575. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22223085; PMCID: PMC3273338.

Gonsalves WI, Broniowska K, Jessen E, Petterson XM, Bush AG, Gransee J, Lacy MQ, Hitosugi T, Kumar SK. Metabolomic and Lipidomic Profiling of Bone Marrow Plasma Differentiates Patients with Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance from Multiple Myeloma. *Sci Rep.* 2020 Jun 24;10(1):10250. doi: 10.1038/s41598-020-67105-3. PMID: 32581232; PMCID: PMC7314797.

González D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, van Dongen JJ, San Miguel JF, Morgan GJ. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3112-21. doi: 10.1182/blood-2007-02-069625. Epub 2007 Jul 18. PMID: 17634408.

Görgün G, Samur MK, Cowens KB, Paula S, Bianchi G, Anderson JE, White RE, Singh A, Ohguchi H, Suzuki R, Kikuchi S, Harada T, Hideshima T, Tai YT, Laubach JP, Raje N, Magrangeas F, Minvielle S, Avet-Loiseau H, Munshi NC, Dorfman DM, Richardson PG, Anderson KC. Lenalidomide Enhances Immune Checkpoint Blockade-Induced Immune Response in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2015 Oct 15;21(20):4607-18. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0200. Epub 2015 May 15. PMID: 25979485; PMCID: PMC4609232.

Görgün GT, Whitehill G, Anderson JL, Hideshima T, Maguire C, Laubach J, Raje N, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans. *Blood*. 2013 Apr 11;121(15):2975-87. doi: 10.1182/blood-2012-08-448548. Epub 2013 Jan 15. PMID: 23321256; PMCID: PMC3624943.

Grosicki S, Simonova M, Spicka I, Pour L, Kriachok I, Gavriatopoulou M, Pylypenko H, Auner HW, Leleu X, Doronin V, Usenko G, Bahlis NJ, Hajek R, Benjamin R, Dolai TK, Sinha DK, Venner CP, Garg M, Gironella M, Jurczynski A, Robak P, Galli M, Wallington-Beddoe C, Radinoff A, Salogub G, Stevens DA, Basu S, Liberati AM, Quach H, Goranova-Marinova VS, Bila J, Katodritou E, Oliynyk H, Korenkova S, Kumar J, Jagannath S, Moreau P, Levy M, White D, Gatt ME, Facon T, Mateos MV, Cavo M, Reece D, Anderson LD Jr, Saint-Martin JR, Jeha J, Joshi AA, Chai Y, Li L, Peddagali V, Arazy M, Shah J, Shacham S, Kauffman MG, Dimopoulos MA, Richardson PG, Delimpasi S. Once-per-week selinexor, bortezomib, and dexamethasone versus twice-per-week bortezomib and dexamethasone in patients with multiple myeloma (BOSTON): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2020 Nov 14;396(10262):1563-1573. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32292-3. PMID: 33189178.

Grube M, Moritz S, Obermann EC, Rezvani K, Mackensen A, Andreesen R, Holler E. CD8+ T cells reactive to survivin antigen in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 1;13(3):1053-60. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1722. PMID: 17289902.

Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J*. 2014 Feb 14;13:17. doi: 10.1186/1475-2891-13-17. PMID: 24524207; PMCID: PMC3943808.

Guerrero-Rodríguez SL, Mata-Cruz C, Pérez-Tapia SM, Velasco-Velázquez MA. Role of CD36 in cancer progression, stemness, and targeting. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Dec 8;10:1079076. doi: 10.3389/fcell.2022.1079076. PMID: 36568966; PMCID: PMC9772993.

Guillerey C, Nakamura K, Vuckovic S, Hill GR, Smyth MJ. Immune responses in multiple myeloma: role of the natural immune surveillance and potential of immunotherapies. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Apr;73(8):1569-89. doi: 10.1007/s00018-016-2135-z. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26801219; PMCID: PMC11108512.

Gyamfi J, Yeo JH, Kwon D, Min BS, Cha YJ, Koo JS, Jeong J, Lee J, Choi J. Interaction between CD36 and FABP4 modulates adipocyte-induced fatty acid import and metabolism in breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2021 Sep 24;7(1):129. doi: 10.1038/s41523-021-00324-7. PMID: 34561446; PMCID: PMC8463699.

Haidari S, Tröltzsch M, Knösel T, Liokatis P, Kasintsova A, Eberl M, Ortner F, Otto S, Fegg F, Boskov M, Probst FA. Fatty Acid Receptor CD36 Functions as a Surrogate Parameter for Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021 Aug 17;13(16):4125. doi: 10.3390/cancers13164125. PMID: 34439279; PMCID: PMC8391200.

Hale JS, Otvos B, Sinyuk M, Alvarado AG, Hitomi M, Stoltz K, Wu Q, Flavahan W, Levison B, Johansen ML, Schmitt D, Neltner JM, Huang P, Ren B, Sloan AE, Silverstein RL, Gladson CL, DiDonato JA, Brown JM, McIntyre T, Hazen SL, Horbinski C, Rich JN, Lathia JD. Cancer stem cell-specific scavenger receptor CD36 drives glioblastoma progression. *Stem Cells.* 2014 Jul;32(7):1746-58. doi: 10.1002/stem.1716. PMID: 24737733; PMCID: PMC4063873.

Hallett WH, Jing W, Drobyski WR, Johnson BD. Immunosuppressive effects of multiple myeloma are overcome by PD-L1 blockade. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011 Aug;17(8):1133-45. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.03.011. Epub 2011 Apr 12. PMID: 21536144.

Hansson L, Rabbani H, Fagerberg J, Osterborg A, Mellstedt H. T-cell epitopes within the complementarity-determining and framework regions of the tumor-derived immunoglobulin heavy chain in multiple myeloma. *Blood.* 2003 Jun 15;101(12):4930-6. doi: 10.1182/blood-2002-04-1250. Epub 2003 Feb 6. PMID: 12576325.

Hao JW, Wang J, Guo H, Zhao YY, Sun HH, Li YF, Lai XY, Zhao N, Wang X, Xie C, Hong L, Huang X, Wang HR, Li CB, Liang B, Chen S, Zhao TJ. CD36 facilitates fatty acid uptake by dynamic palmitoylation-regulated endocytosis. *Nat Commun.* 2020 Sep 21;11(1):4765. doi: 10.1038/s41467-020-18565-8. PMID: 32958780; PMCID: PMC7505845.

Heidari Z, Chrisman IM, Nemetchek MD, Novick SJ, Blayo AL, Patton T, Mendes DE, Diaz P, Kamenecka TM, Griffin PR, Hughes TS. Definition of functionally and structurally distinct repressive states in the nuclear receptor PPAR γ . *Nat Commun.* 2019 Dec 20;10(1):5825. doi: 10.1038/s41467-019-13768-0. PMID: 31862968; PMCID: PMC6925260.

Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies FE, Tai YT, Treon SP, Lin B, Schlossman RL, Richardson P, Muller G, Stirling DI, Anderson KC. Thalidomide and

its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):2943-50. PMID: 11049970.

Hossain F, Al-Khami AA, Wyczechowska D, Hernandez C, Zheng L, Reiss K, Valle LD, Trillo-Tinoco J, Maj T, Zou W, Rodriguez PC, Ochoa AC. Inhibition of Fatty Acid Oxidation Modulates Immunosuppressive Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances Cancer Therapies. *Cancer Immunol Res*. 2015 Nov;3(11):1236-47. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0036. Epub 2015 May 29. PMID: 26025381; PMCID: PMC4636942.

Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990 Oct 18;347(6294):645-50. doi: 10.1038/347645a0. PMID: 2129546.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*. 2010 Mar 12;327(5971):1345-50. doi: 10.1126/science.1177319. PMID: 20223979.

Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Aug;8(8):610-22. doi: 10.1038/nrn2175. PMID: 17643088.

Jeong H, Oh HE, Kim H, Lee JH, Lee ES, Kim YS, Choi JW. Upregulation of Fatty Acid Transporters is Associated With Tumor Progression in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2021 Mar 30;27:594705. doi: 10.3389/pore.2021.594705. PMID: 34257543; PMCID: PMC8262182.

Jiang M, Wu N, Xu B, Chu Y, Li X, Su S, Chen D, Li W, Shi Y, Gao X, Zhang H, Zhang Z, Du W, Nie Y, Liang J, Fan D. Fatty acid-induced CD36 expression via O-GlcNAcylation drives gastric cancer metastasis. *Theranostics*. 2019 Jul 9;9(18):5359-5373. doi: 10.7150/thno.34024. PMID: 31410220; PMCID: PMC6691574.

Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Apr;22(4):266-282. doi: 10.1038/s41580-020-00324-8. Epub 2021 Jan 25. PMID: 33495651; PMCID: PMC8142022.

Jiang X, Zhao Y, Smith C, Gasparetto M, Turhan A, Eaves A, Eaves C. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia*. 2007 May;21(5):926-35. doi: 10.1038/sj.leu.2404609. Epub 2007 Mar 1. PMID: 17330101.

Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med*. 2000 Jan;6(1):41-8. doi: 10.1038/71517. PMID: 10613822.

Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, Tai YT, Prabhala RH, Ritz J, Neuberg D, Anderson KC, Carrasco DR, Dranoff G. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 29;105(4):1285-90. doi: 10.1073/pnas.0711293105.

Epub 2008 Jan 17. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2024 Jul 9;121(28):e2410959121. doi: 10.1073/pnas.2410959121. PMID: 18202175; PMCID: PMC2234130.

Joshua D, Suen H, Brown R, Bryant C, Ho PJ, Hart D, Gibson J. The T Cell in Myeloma. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2016 Oct;16(10):537-542. doi: 10.1016/j.clml.2016.08.003. Epub 2016 Aug 10. PMID: 27601001.

Kapoor P, Rajkumar SV. MAIA under the microscope - bringing trial design into focus. Nat Rev Clin Oncol. 2019 Jun;16(6):339-340. doi: 10.1038/s41571-019-0198-0. PMID: 30850718.

Kearl TJ, Jing W, Gershan JA, Johnson BD. Programmed death receptor-1/programmed death receptor ligand-1 blockade after transient lymphodepletion to treat myeloma. J Immunol. 2013 Jun 1;190(11):5620-8. doi: 10.4049/jimmunol.1202005. Epub 2013 Apr 24. PMID: 23616570; PMCID: PMC3891840.

Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, Van Wier S, Tiedemann R, Shi CX, Sebag M, Braggio E, Henry T, Zhu YX, Fogle H, Price-Troska T, Ahmann G, Mancini C, Brents LA, Kumar S, Greipp P, Dispenzieri A, Bryant B, Mulligan G, Bruhn L, Barrett M, Valdez R, Trent J, Stewart AK, Carpten J, Bergsagel PL. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. Cancer Cell. 2007 Aug;12(2):131-44. doi: 10.1016/j.ccr.2007.07.003. PMID: 17692805; PMCID: PMC2083698.

Kelly KR, Espitia CM, Zhao W, Wendlandt E, Tricot G, Zhan F, Carew JS, Nawrocki ST. Junctional adhesion molecule-A is overexpressed in advanced multiple myeloma and determines response to oncolytic reovirus. Oncotarget. 2015 Dec 1;6(38):41275-89. doi: 10.18632/oncotarget.5753. PMID: 26513296; PMCID: PMC4747405.

Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SA, Fack F, Thorsen F, Taxt T, Bartos M, Jirik R, Miletic H, Wang J, Stieber D, Stuhr L, Moen I, Rygh CB, Bjerkvig R, Niclou SP. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 1;108(9):3749-54. doi: 10.1073/pnas.1014480108. Epub 2011 Feb 14. PMID: 21321221; PMCID: PMC3048093.

Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. J Clin Invest. 1999 May;103(9):1345-52. doi: 10.1172/JCI5703. PMID: 10225978; PMCID: PMC408356.

Krönke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, Svinkina T, Heckl D, Comer E, Li X, Ciarlo C, Hartman E, Munshi N, Schenone M, Schreiber SL, Carr SA, Ebert BL. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. Science. 2014 Jan 17;343(6168):301-5. doi:

10.1126/science.1244851. Epub 2013 Nov 29. PMID: 24292625; PMCID: PMC4077049.

Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):175-87. doi: 10.1038/nrc746. PMID: 11990854.

Kukreja A, Radfar S, Sun BH, Insogna K, Dhodapkar MV. Dominant role of CD47-thrombospondin-1 interactions in myeloma-induced fusion of human dendritic cells: implications for bone disease. *Blood*. 2009 Oct 15;114(16):3413-21. doi: 10.1182/blood-2009-03-211920. Epub 2009 Aug 6. PMID: 19661269; PMCID: PMC2765677.

Kumar S, Kaufman JL, Gasparetto C, Mikhael J, Vij R, Pegourie B, Benboubker L, Facon T, Amiot M, Moreau P, Punnoose EA, Alzate S, Dunbar M, Xu T, Agarwal SK, Enschede SH, Levenson JD, Ross JA, Maciag PC, Verdugo M, Touzeau C. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood*. 2017 Nov 30;130(22):2401-2409. doi: 10.1182/blood-2017-06-788786. Epub 2017 Oct 10. PMID: 29018077.

Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, Munshi N, Lonial S, Bladé J, Mateos MV, Dimopoulos M, Kastritis E, Boccadoro M, Orłowski R, Goldschmidt H, Spencer A, Hou J, Chng WJ, Usmani SZ, Zamagni E, Shimizu K, Jagannath S, Johnsen HE, Terpos E, Reiman A, Kyle RA, Sonneveld P, Richardson PG, McCarthy P, Ludwig H, Chen W, Cavo M, Harousseau JL, Lentzsch S, Hillengass J, Palumbo A, Orfao A, Rajkumar SV, Miguel JS, Avet-Loiseau H. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016 Aug;17(8):e328-e346. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30206-6. PMID: 27511158.

Kumar S, Rajkumar SV. Surrogate endpoints in randomised controlled trials: a reality check. *Lancet*. 2019 Jul 27;394(10195):281-283. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31711-8. PMID: 31354129.

Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, Kapoor P, Dingli D, Hayman SR, Leung N, Lust J, McCurdy A, Russell SJ, Zeldenrust SR, Kyle RA, Rajkumar SV. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*. 2014 May;28(5):1122-8. doi: 10.1038/leu.2013.313. Epub 2013 Oct 25. PMID: 24157580; PMCID: PMC4000285.

Kyle RA, Rajkumar SV. Epidemiology of the plasma-cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007 Dec;20(4):637-64. doi: 10.1016/j.beha.2007.08.001. PMID: 18070711.

Kyle RA, Treon SP, Alexanian R, Barlogie B, Björkholm M, Dhodapkar M, Lister TA, Merlini G, Morel P, Stone M, Branagan AR, Leblond V. Prognostic markers and criteria to initiate therapy in Waldenström's macroglobulinemia: consensus panel

recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003 Apr;30(2):116-20. doi: 10.1053/sonc.2003.50038. PMID: 12720119.

Ladanyi A, Mukherjee A, Kenny HA, Johnson A, Mitra AK, Sundaresan S, Nieman KM, Pascual G, Benitah SA, Montag A, Yamada SD, Abumrad NA, Lengyel E. Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. *Oncogene.* 2018 Apr;37(17):2285-2301. doi: 10.1038/s41388-017-0093-z. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29398710; PMCID: PMC5920730.

Lazarova M, Steinle A. Impairment of NKG2D-Mediated Tumor Immunity by TGF- β . *Front Immunol.* 2019 Nov 15;10:2689. doi: 10.3389/fimmu.2019.02689. PMID: 31803194; PMCID: PMC6873348.

Leone P, Berardi S, Frassanito MA, Ria R, De Re V, Cicco S, Battaglia S, Ditunno P, Dammacco F, Vacca A, Racanelli V. Dendritic cells accumulate in the bone marrow of myeloma patients where they protect tumor plasma cells from CD8⁺ T-cell killing. *Blood.* 2015 Sep 17;126(12):1443-51. doi: 10.1182/blood-2015-01-623975. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26185130; PMCID: PMC4592278.

Leone P, Di Lernia G, Solimando AG, Cicco S, Saltarella I, Lamanuzzi A, Ria R, Frassanito MA, Ponzoni M, Ditunno P, Dammacco F, Racanelli V, Vacca A. Bone marrow endothelial cells sustain a tumor-specific CD8⁺ T cell subset with suppressive function in myeloma patients. *Oncoimmunology.* 2018 Oct 22;8(1):e1486949. doi: 10.1080/2162402X.2018.1486949. PMID: 30546939; PMCID: PMC6287798.

Leone P, Solimando AG, Malerba E, Fasano R, Buonavoglia A, Pappagallo F, De Re V, Argentiero A, Silvestris N, Vacca A, Racanelli V. Actors on the Scene: Immune Cells in the Myeloma Niche. *Front Oncol.* 2020 Oct 29;10:599098. doi: 10.3389/fonc.2020.599098. PMID: 33194767; PMCID: PMC7658648.

Leung N, Bridoux F, Batuman V, Chaidos A, Cockwell P, D'Agati VD, Dispenzieri A, Fervenza FC, Fervenza FC, Fervenza JP, Gibbs S, Gillmore JD, Herrera GA, Jaccard A, Jevremovic D, Kastiris E, Kukreti V, Kyle RA, Lachmann HJ, Larsen CP, Ludwig H, Markowitz GS, Merlini G, Mollee P, Picken MM, Rajkumar VS, Royal V, Sanders PW, Sethi S, Venner CP, Voorhees PM, Wechalekar AD, Weiss BM, Nasr SH. The evaluation of monoclonal gammopathy of renal significance: a consensus report of the International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Jan;15(1):45-59. doi: 10.1038/s41581-018-0077-4. Erratum in: *Nat Rev Nephrol.* 2019 Feb;15(2):121. doi: 10.1038/s41581-018-0102-7. PMID: 30510265; PMCID: PMC7136169.

Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Tr cells. *Blood.* 2005 Feb 1;105(3):1162-9. doi: 10.1182/blood-2004-03-1211. Epub 2004 Oct 12. PMID: 15479730.

Li G, Chen C, Laing SD, Ballard C, Biju KC, Reddick RL, Clark RA, Li S. Hematopoietic knockdown of PPAR δ reduces atherosclerosis in LDLR $^{-/-}$ mice. *Gene Ther.* 2016 Jan;23(1):78-85. doi: 10.1038/gt.2015.78. Epub 2015 Aug 23. PMID: 26204499; PMCID: PMC4939901.

Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol.* 2009 Jan 1;182(1):240-9. doi: 10.4049/jimmunol.182.1.240. PMID: 19109155.

Liang Y, Han H, Liu L, Duan Y, Yang X, Ma C, Zhu Y, Han J, Li X, Chen Y. CD36 plays a critical role in proliferation, migration and tamoxifen-inhibited growth of ER-positive breast cancer cells. *Oncogenesis.* 2018 Dec 21;7(12):98. doi: 10.1038/s41389-018-0107-x. PMID: 30573731; PMCID: PMC6302092.

Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczkowski K, Hetuin D, Saudemont A, Quesnel B. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood.* 2007 Jul 1;110(1):296-304. doi: 10.1182/blood-2006-10-051482. Epub 2007 Mar 15. PMID: 17363736.

Liu WM, Strauss SJ, Chaplin T, Shahin S, Propper DJ, Young BD, Joel SP, Malpas JS. s-thalidomide has a greater effect on apoptosis than angiogenesis in a multiple myeloma cell line. *Hematol J.* 2004;5(3):247-54. doi: 10.1038/sj.thj.6200351. PMID: 15167912.

Lo JC, Clark AK, Asci N, Frydenberg M, Risbridger GP, Taylor RA, Watt MJ. Obesity does not promote tumorigenesis of localized patient-derived prostate cancer xenografts. *Oncotarget.* 2016 Jul 26;7(30):47650-47662. doi: 10.18632/oncotarget.10258. PMID: 27351281; PMCID: PMC5216968.

Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, Walter-Croneck A, Moreau P, Mateos MV, Magen H, Belch A, Reece D, Beksac M, Spencer A, Oakervee H, Orłowski RZ, Taniwaki M, Röllig C, Einsele H, Wu KL, Singhal A, San-Miguel J, Matsumoto M, Katz J, Bleickardt E, Poulart V, Anderson KC, Richardson P; ELOQUENT-2 Investigators. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 2015 Aug 13;373(7):621-31. doi: 10.1056/NEJMoa1505654. Epub 2015 Jun 2. PMID: 26035255.

Lonial S, Lee HC, Badros A, Trudel S, Nooka AK, Chari A, Abdallah AO, Callander N, Lendvai N, Sborov D, Suvannasankha A, Weisel K, Karlin L, Libby E, Arnulf B, Facon T, Hulin C, Kortüm KM, Rodríguez-Otero P, Usmani SZ, Hari P, Baz R, Quach H, Moreau P, Voorhees PM, Gupta I, Hoos A, Zhi E, Baron J, Piontek T, Lewis E, Jewell RC, Dettman EJ, Popat R, Esposti SD, Opalinska J, Richardson P, Cohen AD. Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2020 Feb;21(2):207-221. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30788-0. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31859245.

Lu G, Middleton RE, Sun H, Naniong M, Ott CJ, Mitsiades CS, Wong KK, Bradner JE, Kaelin WG Jr. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science*. 2014 Jan 17;343(6168):305-9. doi: 10.1126/science.1244917. Epub 2013 Nov 29. PMID: 24292623; PMCID: PMC4070318.

Luanpitpong S, Janan M, Thumanu K, Poohadsuan J, Rodboon N, Klaihmon P, Issaragrisil S. Deciphering the Elevated Lipid via CD36 in Mantle Cell Lymphoma with Bortezomib Resistance Using Synchrotron-Based Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Single Cells. *Cancers (Basel)*. 2019 Apr 24;11(4):576. doi: 10.3390/cancers11040576. PMID: 31022903; PMCID: PMC6521097.

Luo X, Zheng E, Wei L, Zeng H, Qin H, Zhang X, Liao M, Chen L, Zhao L, Ruan XZ, Yang P, Chen Y. The fatty acid receptor CD36 promotes HCC progression through activating Src/PI3K/AKT axis-dependent aerobic glycolysis. *Cell Death Dis*. 2021 Mar 26;12(4):328. doi: 10.1038/s41419-021-03596-w. PMID: 33771982; PMCID: PMC7997878.

Luptakova K, Rosenblatt J, Glotzbecker B, Mills H, Stroopinsky D, Kufe T, Vasir B, Arnason J, Tzachanis D, Zwicker JI, Joyce RM, Levine JD, Anderson KC, Kufe D, Avigan D. Lenalidomide enhances anti-myeloma cellular immunity. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 Jan;62(1):39-49. doi: 10.1007/s00262-012-1308-3. Epub 2012 Jun 24. PMID: 22733396; PMCID: PMC4098790.

Lwin ST, Olechnowicz SW, Fowler JA, Edwards CM. Diet-induced obesity promotes a myeloma-like condition in vivo. *Leukemia*. 2015 Feb;29(2):507-10. doi: 10.1038/leu.2014.295. Epub 2014 Oct 7. PMID: 25287992.

Ma X, Xiao L, Liu L, Ye L, Su P, Bi E, Wang Q, Yang M, Qian J, Yi Q. CD36-mediated ferroptosis dampens intratumoral CD8⁺ T cell effector function and impairs their antitumor ability. *Cell Metab*. 2021 May 4;33(5):1001-1012.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2021.02.015. Epub 2021 Mar 9. PMID: 33691090; PMCID: PMC8102368.

Maecker B, von Bergwelt-Baildon MS, Anderson KS, Vonderheide RH, Anderson KC, Nadler LM, Schultze JL. Rare naturally occurring immune responses to three epitopes from the widely expressed tumour antigens hTERT and CYP1B1 in multiple myeloma patients. *Clin Exp Immunol*. 2005 Sep;141(3):558-62. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02879.x. PMID: 16045747; PMCID: PMC1809449.

Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Feb;14(2):100-113. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.122. Epub 2016 Aug 17. PMID: 27531699.

Manier S, Salem KZ, Park J, Landau DA, Getz G, Ghobrial IM. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017

Feb;14(2):100-113. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.122. Epub 2016 Aug 17. PMID: 27531699.

Manzo T, Prentice BM, Anderson KG, Raman A, Schalck A, Codreanu GS, Nava Lauson CB, Tiberti S, Raimondi A, Jones MA, Reyzer M, Bates BM, Spraggins JM, Patterson NH, McLean JA, Rai K, Tacchetti C, Tucci S, Wargo JA, Rodighiero S, Clise-Dwyer K, Sherrod SD, Kim M, Navin NE, Caprioli RM, Greenberg PD, Draetta G, Nezi L. Accumulation of long-chain fatty acids in the tumor microenvironment drives dysfunction in intrapancreatic CD8⁺ T cells. *J Exp Med*. 2020 Aug 3;217(8):e20191920. doi: 10.1084/jem.20191920. PMID: 32491160; PMCID: PMC7398173.

Mateos MV, Cavo M, Blade J, Dimopoulos MA, Suzuki K, Jakubowiak A, Knop S, Doyen C, Lucio P, Nagy Z, Pour L, Cook M, Grosicki S, Crepaldi A, Liberati AM, Campbell P, Shelekhova T, Yoon SS, Iosava G, Fujisaki T, Garg M, Krevvata M, Chen Y, Wang J, Kudva A, Ukropec J, Wroblewski S, Qi M, Kobos R, San-Miguel J. Overall survival with daratumumab, bortezomib, melphalan, and prednisone in newly diagnosed multiple myeloma (ALCYONE): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2020 Jan 11;395(10218):132-141. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32956-3. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31836199.

Matsushita M, Freigang S, Schneider C, Conrad M, Bornkamm GW, Kopf M. T cell lipid peroxidation induces ferroptosis and prevents immunity to infection. *J Exp Med*. 2015 Apr 6;212(4):555-68. doi: 10.1084/jem.20140857. Epub 2015 Mar 30. PMID: 25824823; PMCID: PMC4387287.

Mauer J, Denson JL, Brüning JC. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol*. 2015 Feb;36(2):92-101. doi: 10.1016/j.it.2014.12.008. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25616716.

Medema JP, de Jong J, Peltenburg LT, Verdegaal EM, Gorter A, Bres SA, Franken KL, Hahne M, Albar JP, Melief CJ, Offringa R. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11515-20. doi: 10.1073/pnas.201398198. Epub 2001 Sep 18. PMID: 11562487; PMCID: PMC58761.

Mellstedt H, Holm G, Björkholm M. Multiple myeloma, Waldenström's macroglobulinemia, and benign monoclonal gammopathy: characteristics of the B cell clone, immunoregulatory cell populations and clinical implications. *Adv Cancer Res*. 1984;41:257-89. doi: 10.1016/s0065-230x(08)60018-4. PMID: 6428176.

Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2006 Dec;58(4):726-41. doi: 10.1124/pr.58.4.5. PMID: 17132851.

Moreau P, Dimopoulos MA, Mikhael J, Yong K, Capra M, Facon T, Hajek R, Špička I, Baker R, Kim K, Martinez G, Min CK, Pour L, Leleu X, Oriol A, Koh Y, Suzuki K, Risse ML, Asset G, Macé S, Martin T; IKEMA study group. Isatuximab, carfilzomib, and dexamethasone in relapsed multiple myeloma (IKEMA): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2021 Jun 19;397(10292):2361-2371. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00592-4. Epub 2021 Jun 4. PMID: 34097854.

Moreau P, Hulin C, Macro M, Caillot D, Chaletteix C, Roussel M, Garderet L, Royer B, Brechignac S, Tiab M, Puyade M, Escoffre M, Stoppa AM, Facon T, Pegourie B, Chaoui D, Jaccard A, Slama B, Marit G, Laribi K, Godmer P, Luycx O, Eisenmann JC, Allangba O, Dib M, Araujo C, Fontan J, Belhadj K, Wetterwald M, Dorvaux V, Femand JP, Rodon P, Kolb B, Glaisner S, Malfuson JV, Lenain P, Biron L, Planche L, Caillon H, Avet-Loiseau H, Dejoie T, Attal M. VTD is superior to VCD prior to intensive therapy in multiple myeloma: results of the prospective IFM2013-04 trial. *Blood*. 2016 May 26;127(21):2569-74. doi: 10.1182/blood-2016-01-693580. Epub 2016 Mar 21. PMID: 27002117.

Moreau P, Kumar SK, San Miguel J, Davies F, Zamagni E, Bahlis N, Ludwig H, Mikhael J, Terpos E, Schjesvold F, Martin T, Yong K, Durie BGM, Facon T, Jurczynszyn A, Sidana S, Raje N, van de Donk N, Lonial S, Cavo M, Kristinsson SY, Lentzsch S, Hajek R, Anderson KC, João C, Einsele H, Sonneveld P, Engelhardt M, Fonseca R, Vangsted A, Weisel K, Baz R, Hungria V, Berdeja JG, Leal da Costa F, Maiolino A, Waage A, Vesole DH, Ocio EM, Quach H, Driessen C, Bladé J, Leleu X, Riva E, Bergsagel PL, Hou J, Chng WJ, Mellqvist UH, Dytfeld D, Harousseau JL, Goldschmidt H, Laubach J, Munshi NC, Gay F, Beksac M, Costa LJ, Kaiser M, Hari P, Boccadoro M, Usmani SZ, Zweegman S, Holstein S, Sezer O, Harrison S, Nahi H, Cook G, Mateos MV, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Richardson PG. Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: recommendations from the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol*. 2021 Mar;22(3):e105-e118. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30756-7. PMID: 33662288.

Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Senese R, Cioffi F, Goglia F, Lanni A, de Lange P. PPARs: Nuclear Receptors Controlled by, and Controlling, Nutrient Handling through Nuclear and Cytosolic Signaling. *PPAR Res*. 2010;2010:435689. doi: 10.1155/2010/435689. Epub 2010 Aug 1. PMID: 20814433; PMCID: PMC2929508.

Moschetta M, Mishima Y, Kawano Y, Manier S, Paiva B, Palomera L, Aljawai Y, Calcinotto A, Unitt C, Sahin I, Sacco A, Glavey S, Shi J, Reagan MR, Prosper F, Bellone M, Chesi M, Bergsagel LP, Vacca A, Roccaro AM, Ghobrial IM. Targeting vasculogenesis to prevent progression in multiple myeloma. *Leukemia*. 2016 May;30(5):1103-15. doi: 10.1038/leu.2016.3. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26859080.

Muccio VE, Saraci E, Gilestro M, Gattei V, Zucchetto A, Astolfi M, Ruggeri M, Marzanati E, Passera R, Palumbo A, Boccadoro M, Omedè P. Multiple myeloma: New surface antigens for the characterization of plasma cells in the era of novel agents.

Cytometry B Clin Cytom. 2016 Jan;90(1):81-90. doi: 10.1002/cyto.b.21279. Epub 2015 Sep 23. PMID: 26287276.

Murakami H, Ogawara H, Hiroshi H. Th1/Th2 cells in patients with multiple myeloma. *Hematology*. 2004 Feb;9(1):41-5. doi: 10.1080/10245330310001652437. PMID: 14965867.

Musolino C, Allegra A, Innao V, Allegra AG, Pioggia G, Gangemi S. Inflammatory and Anti-Inflammatory Equilibrium, Proliferative and Antiproliferative Balance: The Role of Cytokines in Multiple Myeloma. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:1852517. doi: 10.1155/2017/1852517. Epub 2017 Sep 26. PMID: 29089667; PMCID: PMC5635476.

Muthu Raja KR, Kubiczko L, Rihova L, Piskacek M, Vsianska P, Hezova R, Pour L, Hajek R. Functionally suppressive CD8 T regulatory cells are increased in patients with multiple myeloma: a cause for immune impairment. *PLoS One*. 2012;7(11):e49446. doi: 10.1371/journal.pone.0049446. Epub 2012 Nov 13. PMID: 23152910; PMCID: PMC3496705.

Nagy L, Schwabe JW. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci*. 2004 Jun;29(6):317-24. doi: 10.1016/j.tibs.2004.04.006. PMID: 15276186.

Nair S, Boddupalli CS, Verma R, Liu J, Yang R, Pastores GM, Mistry PK, Dhodapkar MV. Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation. *Blood*. 2015 Feb 19;125(8):1256-71. doi: 10.1182/blood-2014-09-600270. Epub 2014 Dec 11. PMID: 25499455; PMCID: PMC4335081.

Nair S, Sng J, Boddupalli CS, Seckinger A, Chesi M, Fulciniti M, Zhang L, Rauniyar N, Lopez M, Neparidze N, Parker T, Munshi NC, Sexton R, Barlogie B, Orlowski R, Bergsagel L, Hose D, Flavell RA, Mistry PK, Meffre E, Dhodapkar MV. Antigen-mediated regulation in monoclonal gammopathies and myeloma. *JCI Insight*. 2018 Apr 19;3(8):e98259. doi: 10.1172/jci.insight.98259. PMID: 29669929; PMCID: PMC5931125.

Nandhikonda P, Yasgar A, Baranowski AM, Sidhu PS, McCallum MM, Pawlak AJ, Teske K, Feleke B, Yuan NY, Kevin C, Bikle DD, Ayers SD, Webb P, Rai G, Simeonov A, Jadhav A, Maloney D, Arnold LA. Peroxisome proliferation-activated receptor δ agonist GW0742 interacts weakly with multiple nuclear receptors, including the vitamin D receptor. *Biochemistry*. 2013 Jun 18;52(24):4193-203. doi: 10.1021/bi400321p. Epub 2013 Jun 10. PMID: 23713684; PMCID: PMC3724348.

Nath A, Li I, Roberts LR, Chan C. Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 2015 Oct 1;5:14752. doi: 10.1038/srep14752. PMID: 26424075; PMCID: PMC4589791.

Newton JG, Horan JT, Newman S, Rossi MR, Ketterling RP, Park SI. CD36-positive B-lymphoblasts Predict Poor Outcome in Children With B-lymphoblastic Leukemia.

Pediatr Dev Pathol. 2017 Jun;20(3):224-231. doi: 10.1177/1093526616688753. Epub 2017 Feb 8. PMID: 28521628.

Nielsen R, Grøntved L, Stunnenberg HG, Mandrup S. Peroxisome proliferator-activated receptor subtype- and cell-type-specific activation of genomic target genes upon adenoviral transgene delivery. *Mol Cell Biol.* 2006 Aug;26(15):5698-714. doi: 10.1128/MCB.02266-05. PMID: 16847324; PMCID: PMC1592764.

Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, Romero IL, Carey MS, Mills GB, Hotamisligil GS, Yamada SD, Peter ME, Gwin K, Lengyel E. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med.* 2011 Oct 30;17(11):1498-503. doi: 10.1038/nm.2492. PMID: 22037646; PMCID: PMC4157349.

Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Oct;1831(10):1533-41. doi: 10.1016/j.bbali.2013.02.010. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23500888; PMCID: PMC3742583.

Noonan K, Marchionni L, Anderson J, Pardoll D, Roodman GD, Borrello I. A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. *Blood.* 2010 Nov 4;116(18):3554-63. doi: 10.1182/blood-2010-05-283895. Epub 2010 Jul 27. PMID: 20664052; PMCID: PMC4017298.

Noonan KA, Huff CA, Davis J, Lemas MV, Fiorino S, Bitzan J, Ferguson A, Emerling A, Luznik L, Matsui W, Powell J, Fuchs E, Rosner GL, Epstein C, Rudraraju L, Ambinder RF, Jones RJ, Pardoll D, Borrello I. Adoptive transfer of activated marrow-infiltrating lymphocytes induces measurable antitumor immunity in the bone marrow in multiple myeloma. *Sci Transl Med.* 2015 May 20;7(288):288ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa7014. PMID: 25995224; PMCID: PMC4634889.

Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell.* 1999 Apr 16;97(2):161-3. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80726-6. PMID: 10219237.

Nur H, Fostier K, Aspeslagh S, Renmans W, Bertrand E, Leleu X, Favreau M, Breckpot K, Schots R, De Waele M, Van Valckenborgh E, De Bruyne E, Facon T, Elewaut D, Vanderkerken K, Menu E. Preclinical evaluation of invariant natural killer T cells in the 5T33 multiple myeloma model. *PLoS One.* 2013 May 31;8(5):e65075. doi: 10.1371/journal.pone.0065075. PMID: 23741460; PMCID: PMC3669090.

Ogawara H, Handa H, Yamazaki T, Toda T, Yoshida K, Nishimoto N, Al-ma'Quol WH, Kaneko Y, Matsushima T, Tsukamoto N, Nojima Y, Matsumoto M, Sawamura M, Murakami H. High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma. *Leuk Res.* 2005 Feb;29(2):135-40. doi: 10.1016/j.leukres.2004.06.003. PMID: 15607360.

Oh DS, Lee HK. Autophagy protein ATG5 regulates CD36 expression and anti-tumor MHC class II antigen presentation in dendritic cells. *Autophagy.* 2019

Dec;15(12):2091-2106. doi: 10.1080/15548627.2019.1596493. Epub 2019 Apr 6. PMID: 30900506; PMCID: PMC6844530.

Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Mar;20(3):137-155. doi: 10.1038/s41580-018-0085-z. PMID: 30523332; PMCID: PMC6746329.

Orlowski RZ, Nagler A, Sonneveld P, Bladé J, Hajek R, Spencer A, San Miguel J, Robak T, Dmoszynska A, Horvath N, Spicka I, Sutherland HJ, Suvorov AN, Zhuang SH, Parekh T, Xiu L, Yuan Z, Rackoff W, Harousseau JL. Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared with bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression. *J Clin Oncol.* 2007 Sep 1;25(25):3892-901. doi: 10.1200/JCO.2006.10.5460. Epub 2007 Aug 6. PMID: 17679727.

Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell.* 2009 Mar 3;15(3):220-31. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.027. PMID: 19249680; PMCID: PMC2874829.

Paiva B, Azpilikueta A, Puig N, Ocio EM, Sharma R, Oyajobi BO, Labiano S, San-Segundo L, Rodriguez A, Aires-Mejia I, Rodriguez I, Escalante F, de Coca AG, Barez A, San Miguel JF, Melero I. PD-L1/PD-1 presence in the tumor microenvironment and activity of PD-1 blockade in multiple myeloma. *Leukemia.* 2015 Oct;29(10):2110-3. doi: 10.1038/leu.2015.79. Epub 2015 Mar 17. PMID: 25778100.

Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T, Brinchen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spencer A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci MT, Orlowski RZ, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos MA, Durie BG, Anderson KC, Sonneveld P, San Miguel J, Cavo M, Rajkumar SV, Moreau P. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol.* 2015 Sep 10;33(26):2863-9. doi: 10.1200/JCO.2015.61.2267. Epub 2015 Aug 3. PMID: 26240224; PMCID: PMC4846284.

Pardo JC, Sanhueza T, Ruiz de Porras V, Etxaniz O, Rodriguez H, Martinez-Cardús A, Grande E, Castellano D, Climent MA, Lobato T, Estudillo L, Jordà M, Carrato C, Font A. Prognostic Impact of CD36 Immunohistochemical Expression in Patients with Muscle-Invasive Bladder Cancer Treated with Cystectomy and Adjuvant Chemotherapy. *J Clin Med.* 2022 Jan 19;11(3):497. doi: 10.3390/jcm11030497. PMID: 35159947; PMCID: PMC8836680.

Park SY, Lee CJ, Choi JH, Kim JH, Kim JW, Kim JY, Nam JS. The JAK2/STAT3/CCND2 Axis promotes colorectal Cancer stem cell persistence and

radioresistance. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Sep 11;38(1):399. doi: 10.1186/s13046-019-1405-7. PMID: 31511084; PMCID: PMC6737692.

Pascual G, Avgustinova A, Mejetta S, Martín M, Castellanos A, Attolini CS, Berenguer A, Prats N, Toll A, Hueto JA, Bescós C, Di Croce L, Benitah SA. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*. 2017 Jan 5;541(7635):41-45. doi: 10.1038/nature20791. Epub 2016 Dec 7. PMID: 27974793.

Pascual G, Domínguez D, Elosúa-Bayes M, Beckedorff F, Laudanna C, Bigas C, Douillet D, Greco C, Symeonidi A, Hernández I, Gil SR, Prats N, Bescós C, Shiekhattar R, Amit M, Heyn H, Shilatifard A, Benitah SA. Dietary palmitic acid promotes a prometastatic memory via Schwann cells. *Nature*. 2021 Nov;599(7885):485-490. doi: 10.1038/s41586-021-04075-0. Epub 2021 Nov 10. PMID: 34759321.

Pasiarski M, Grywalska E, Kosmaczewska A, Gózdź S, Steckiewicz P, Garus B, Bilski M, Hymos A, Roliński J, Bilski M, Roliński J. Assessment of peripheral blood and bone marrow T, NK, NKT and dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015 Dec 31;69:1435-42. PMID: 27259215.

Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, Monti S, Grunn A, Nandula SV, Aster JC, Murty VV, Shipp MA, Dalla-Favera R. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2006 Feb 20;203(2):311-7. doi: 10.1084/jem.20052204. PMID: 16492805; PMCID: PMC2118216.

Pepino MY, Klein S. Response to comment on Pepino et al. Sucralose affects glycemic and hormonal responses to an oral glucose load. *Diabetes care* 2013;36:2530-2535. *Diabetes Care*. 2014 Jun;37(6):e149. doi: 10.2337/dc14-0268. PMID: 24855177; PMCID: PMC4876772.

Pepino MY, Kuda O, Samovski D, Abumrad NA. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2014;34:281-303. doi: 10.1146/annurev-nutr-071812-161220. Epub 2014 May 16. PMID: 24850384; PMCID: PMC4329921.

Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, Bronte V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol*. 2010 Apr;22(2):238-44. doi: 10.1016/j.coi.2010.01.021. Epub 2010 Feb 17. PMID: 20171075.

Perry JSA, Russler-Germain EV, Zhou YW, Purtha W, Cooper ML, Choi J, Schroeder MA, Salazar V, Egawa T, Lee BC, Abumrad NA, Kim BS, Anderson MS, DiPersio JF, Hsieh CS. Transfer of Cell-Surface Antigens by Scavenger Receptor CD36 Promotes Thymic Regulatory T Cell Receptor Repertoire Development and Allostolerance. *Immunity*. 2018 Jun 19;48(6):1271. doi: 10.1016/j.immuni.2018.05.011. Erratum for: *Immunity*. 2018 May 15;48(5):923-936.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.007. PMID: 29924978; PMCID: PMC6015728.

Petan T, Jarc E, Jusović M. Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Molecules*. 2018 Aug 3;23(8):1941. doi: 10.3390/molecules23081941. PMID: 30081476; PMCID: PMC6222695.

Ponzetta A, Benigni G, Antonangeli F, Sciumè G, Sanseviero E, Zingoni A, Ricciardi MR, Petrucci MT, Santoni A, Bernardini G. Multiple Myeloma Impairs Bone Marrow Localization of Effector Natural Killer Cells by Altering the Chemokine Microenvironment. *Cancer Res*. 2015 Nov 15;75(22):4766-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1320. Epub 2015 Oct 5. PMID: 26438594.

Prabhala RH, Neri P, Bae JE, Tassone P, Shammass MA, Allam CK, Daley JF, Chauhan D, Blanchard E, Thatte HS, Anderson KC, Munshi NC. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):301-4. doi: 10.1182/blood-2005-08-3101. Epub 2005 Sep 8. PMID: 16150935; PMCID: PMC1895365.

Prabhala RH, Pelluru D, Fulciniti M, Prabhala HK, Nanjappa P, Song W, Pai C, Amin S, Tai YT, Richardson PG, Ghobrial IM, Treon SP, Daley JF, Anderson KC, Kutok JL, Munshi NC. Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. *Blood*. 2010 Jul 1;115(26):5385-92. doi: 10.1182/blood-2009-10-246660. Epub 2010 Apr 15. PMID: 20395418; PMCID: PMC2902136.

Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2007 Sep;138(5):563-79. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06705.x. PMID: 17686051.

Prideaux SM, Conway O'Brien E, Chevassut TJ. The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv Hematol*. 2014;2014:864058. doi: 10.1155/2014/864058. Epub 2014 Apr 3. PMID: 24803933; PMCID: PMC3996928.

Qiao S, Koh SB, Vivekanandan V, Salunke D, Patra KC, Zaganjor E, Ross K, Mizukami Y, Jeanfavre S, Chen A, Mino-Kenudson M, Ramaswamy S, Clish C, Haigis M, Bardeesy N, Ellisen LW. REDD1 loss reprograms lipid metabolism to drive progression of *RAS* mutant tumors. *Genes Dev*. 2020 Jun 1;34(11-12):751-766. doi: 10.1101/gad.335166.119. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32273287; PMCID: PMC7263146.

Quach H, Ritchie D, Stewart AK, Neeson P, Harrison S, Smyth MJ, Prince HM. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma. *Leukemia*. 2010 Jan;24(1):22-32. doi: 10.1038/leu.2009.236. Epub 2009 Nov 12. PMID: 19907437; PMCID: PMC3922408.

Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Allison JP. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev*. 2011 May;241(1):104-18. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01007.x. PMID: 21488893; PMCID: PMC3727276.

Racanelli V, Leone P, Frassanito MA, Brunetti C, Perosa F, Ferrone S, Dammacco F. Alterations in the antigen processing-presenting machinery of transformed plasma cells are associated with reduced recognition by CD8⁺ T cells and characterize the progression of MGUS to multiple myeloma. *Blood*. 2010 Feb 11;115(6):1185-93. doi: 10.1182/blood-2009-06-228676. Epub 2009 Dec 11. PMID: 20008301; PMCID: PMC2826230.

Radhakrishnan SV, Luetkens T, Scherer SD, Davis P, Vander Mause ER, Olson ML, Yousef S, Panse J, Abdiche Y, Li KD, Miles RR, Matsui W, Welm AL, Atanackovic D. CD229 CAR T cells eliminate multiple myeloma and tumor propagating cells without fratricide. *Nat Commun*. 2020 Feb 7;11(1):798. doi: 10.1038/s41467-020-14619-z. PMID: 32034142; PMCID: PMC7005855.

Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, Liedtke M, Rosenblatt J, Maus MV, Turka A, Lam LP, Morgan RA, Friedman K, Massaro M, Wang J, Russotti G, Yang Z, Campbell T, Hege K, Petrocca F, Quigley MT, Munshi N, Kochenderfer JN. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2019 May 2;380(18):1726-1737. doi: 10.1056/NEJMoa1817226. PMID: 31042825; PMCID: PMC8202968.

Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, Weiss B, LeLeu X, Zweegman S, Lonial S, Rosinol L, Zamagni E, Jagannath S, Sezer O, Kristinsson SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson KC, Durie BG, Miguel JF. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014 Nov;15(12):e538-48. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5. Epub 2014 Oct 26. PMID: 25439696.

Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, Fonseca R, Vesole DH, Williams ME, Abonour R, Siegel DS, Katz M, Greipp PR; Eastern Cooperative Oncology Group. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2010 Jan;11(1):29-37. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70284-0. Epub 2009 Oct 21. Erratum in: *Lancet Oncol*. 2010 Jan;11(1):14. PMID: 19853510; PMCID: PMC3042271.

Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2022 Aug;97(8):1086-1107. doi: 10.1002/ajh.26590. Epub 2022 May 23. PMID: 35560063; PMCID: PMC9387011.

Ramachandran IR, Martner A, Pisklakova A, Condamine T, Chase T, Vogl T, Roth J, Gabrilovich D, Nefedova Y. Myeloid-derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow. *J Immunol*. 2013 Apr 1;190(7):3815-23. doi: 10.4049/jimmunol.1203373. Epub 2013 Mar 4. PMID: 23460744; PMCID: PMC3608837.

Ray A, Das DS, Song Y, Richardson P, Munshi NC, Chauhan D, Anderson KC. Targeting PD1-PDL1 immune checkpoint in plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells, natural killer cells and multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2015 Jun;29(6):1441-4. doi: 10.1038/leu.2015.11. Epub 2015 Jan 30. PMID: 25634684; PMCID: PMC5703039.

Ren B, Best B, Ramakrishnan DP, Walcott BP, Storz P, Silverstein RL. LPA/PKD-1-FoxO1 Signaling Axis Mediates Endothelial Cell CD36 Transcriptional Repression and Proangiogenic and Proarteriogenic Reprogramming. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Jun;36(6):1197-208. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307421. Epub 2016 Mar 24. PMID: 27013613; PMCID: PMC4882231.

Richardson PG, Weller E, Jagannath S, Avigan DE, Alsina M, Schlossman RL, Mazumder A, Munshi NC, Ghobrial IM, Doss D, Warren DL, Lunde LE, McKenney M, Delaney C, Mitsiades CS, Hideshima T, Dalton W, Knight R, Esseltine DL, Anderson KC. Multicenter, phase I, dose-escalation trial of lenalidomide plus bortezomib for relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 1;27(34):5713-9. doi: 10.1200/JCO.2009.22.2679. Epub 2009 Sep 28. PMID: 19786667; PMCID: PMC2799050.

Richman EL, Kenfield SA, Chavarro JE, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Willett WC, Chan JM. Fat intake after diagnosis and risk of lethal prostate cancer and all-cause mortality. *JAMA Intern Med*. 2013 Jul 22;173(14):1318-26. doi: 10.1001/jamainternmed.2013.6536. PMID: 23752662; PMCID: PMC3935610.

Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, Delgado A, Correa P, Brayer J, Sotomayor EM, Antonia S, Ochoa JB, Ochoa AC. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res*. 2004 Aug 15;64(16):5839-49. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0465. PMID: 15313928.

Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *Lancet*. 2015 May 30;385(9983):2197-208. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60493-1. Epub 2014 Dec 23. PMID: 25540889.

Ross FM, Chiecchio L, Dagrada G, Protheroe RK, Stockley DM, Harrison CJ, Cross NC, Szubert AJ, Drayson MT, Morgan GJ; UK Myeloma Forum. The t(14;20) is a poor prognostic factor in myeloma but is associated with long-term stable disease in monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Haematologica*. 2010 Jul;95(7):1221-5. doi: 10.3324/haematol.2009.016329. Epub 2010 Apr 21. PMID: 20410185; PMCID: PMC2895050.

Rozovski U, Harris DM, Li P, Liu Z, Jain P, Ferrajoli A, Burger J, Thompson P, Jain N, Wierda W, Keating MJ, Estrov Z. STAT3-activated CD36 facilitates fatty acid uptake in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget*. 2018 Apr 20;9(30):21268-21280. doi: 10.18632/oncotarget.25066. PMID: 29765537; PMCID: PMC5940394.

Sakurai K, Tomihara K, Yamazaki M, Heshiki W, Moniruzzaman R, Sekido K, Tachinami H, Ikeda A, Imaue S, Fujiwara K, Noguchi M. CD36 expression on oral squamous cell carcinoma cells correlates with enhanced proliferation and migratory activity. *Oral Dis.* 2020 May;26(4):745-755. doi: 10.1111/odi.13210. Epub 2020 Mar 3. PMID: 31603606.

Samson D, Gaminara E, Newland A, Van de Pette J, Kearney J, McCarthy D, Joyner M, Aston L, Mitchell T, Hamon M, et al. Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma. *Lancet.* 1989 Oct 14;2(8668):882-5. doi: 10.1016/s0140-6736(89)91549-3. PMID: 2571813.

Sarkar S, van Gelder M, Noort W, Xu Y, Rouschop KM, Groen R, Schouten HC, Tilanus MG, Germeraad WT, Martens AC, Bos GM, Wieten L. Optimal selection of natural killer cells to kill myeloma: the role of HLA-E and NKG2A. *Cancer Immunol Immunother.* 2015 Aug;64(8):951-63. doi: 10.1007/s00262-015-1694-4. Epub 2015 Apr 29. PMID: 25920521; PMCID: PMC4506464.

Sawyer JR, Tian E, Heuck CJ, Epstein J, Johann DJ, Swanson CM, Lukacs JL, Johnson M, Binz R, Boast A, Sammartino G, Usmani S, Zangari M, Waheed S, van Rhee F, Barlogie B. Jumping translocations of 1q12 in multiple myeloma: a novel mechanism for deletion of 17p in cytogenetically defined high-risk disease. *Blood.* 2014 Apr 17;123(16):2504-12. doi: 10.1182/blood-2013-12-546077. Epub 2014 Feb 4. PMID: 24497533; PMCID: PMC3990913.

Schmid M, Jensen TH. The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends Biochem Sci.* 2008 Oct;33(10):501-10. doi: 10.1016/j.tibs.2008.07.003. Epub 2008 Sep 9. PMID: 18786828.

Schmitt M, Schmitt A, Rojewski MT, Chen J, Giannopoulos K, Fei F, Yu Y, Götz M, Heyduk M, Ritter G, Speiser DE, Gnjatich S, Guillaume P, Ringhoffer M, Schlenk RF, Liebisch P, Bunjes D, Shiku H, Dohner H, Greiner J. RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1357-65. doi: 10.1182/blood-2007-07-099366. Epub 2007 Oct 31. PMID: 17978170.

Serafini P, Borrello I, Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol.* 2006 Feb;16(1):53-65. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.07.005. Epub 2005 Sep 15. PMID: 16168663.

Serrano-Marco L, Rodríguez-Calvo R, El Kochairi I, Palomer X, Michalik L, Wahli W, Vázquez-Carrera M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- β / δ (PPAR- β / δ) ameliorates insulin signaling and reduces SOCS3 levels by inhibiting STAT3 in interleukin-6-stimulated adipocytes. *Diabetes.* 2011 Jul;60(7):1990-9. doi: 10.2337/db10-0704. Epub 2011 May 26. PMID: 21617181; PMCID: PMC3121427.

- Sharma A, Khan R, Joshi S, Kumar L, Sharma M. Dysregulation in T helper 1/T helper 2 cytokine ratios in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2010 May;51(5):920-7. doi: 10.3109/10428191003699563. PMID: 20367137.
- Shen CJ, Yuan ZH, Liu YX, Hu GY. Increased numbers of T helper 17 cells and the correlation with clinicopathological characteristics in multiple myeloma. *J Int Med Res*. 2012;40(2):556-64. doi: 10.1177/147323001204000217. PMID: 22613416.
- Shi H, Mao X, Zhong Y, Liu Y, Zhao X, Yu K, Zhu R, Wei Y, Zhu J, Sun H, Mao Y, Zeng Q. Lanatoside C Promotes Foam Cell Formation and Atherosclerosis. *Sci Rep*. 2016 Jan 29;6:20154. doi: 10.1038/srep20154. PMID: 26821916; PMCID: PMC4731744.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022 Jan;72(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21708. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35020204.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7-34. doi: 10.3322/caac.21551. Epub 2019 Jan 8. PMID: 30620402.
- Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*. 2009 May 26;2(72):re3. doi: 10.1126/scisignal.272re3. PMID: 19471024; PMCID: PMC2811062.
- Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. 2006;90:1-50. doi: 10.1016/S0065-2776(06)90001-7. PMID: 16730260.
- Soekojo CY, Ooi M, de Mel S, Chng WJ. Immunotherapy in Multiple Myeloma. *Cells*. 2020 Mar 3;9(3):601. doi: 10.3390/cells9030601. PMID: 32138182; PMCID: PMC7140529.
- Solimando AG, Brandl A, Mattenheimer K, Graf C, Ritz M, Ruckdeschel A, Stühmer T, Mokhtari Z, Rudelius M, Dotterweich J, Bittrich M, Desantis V, Ebert R, Trerotoli P, Frassanito MA, Rosenwald A, Vacca A, Einsele H, Jakob F, Beilhack A. JAM-A as a prognostic factor and new therapeutic target in multiple myeloma. *Leukemia*. 2018 Mar;32(3):736-743. doi: 10.1038/leu.2017.287. Epub 2017 Sep 28. PMID: 29064484; PMCID: PMC5843918.
- Solimando AG, Malerba E, Leone P, Prete M, Terragna C, Cavo M, Racanelli V. Drug resistance in multiple myeloma: Soldiers and weapons in the bone marrow niche. *Front Oncol*. 2022 Sep 21;12:973836. doi: 10.3389/fonc.2022.973836. PMID: 36212502; PMCID: PMC9533079.
- Spanoudakis E, Hu M, Naresh K, Terpos E, Melo V, Reid A, Kotsianidis I, Abdalla S, Rahemtulla A, Karadimitris A. Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2498-507. doi: 10.1182/blood-2008-06-161281. Epub 2008 Dec 3. PMID: 19056691.

Spisek R, Kukreja A, Chen LC, Matthews P, Mazumder A, Vesole D, Jagannath S, Zebroski HA, Simpson AJ, Ritter G, Durie B, Crowley J, Shaughnessy JD Jr, Scanlan MJ, Gure AO, Barlogie B, Dhodapkar MV. Frequent and specific immunity to the embryonal stem cell-associated antigen SOX2 in patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med*. 2007 Apr 16;204(4):831-40. doi: 10.1084/jem.20062387. Epub 2007 Mar 26. PMID: 17389240; PMCID: PMC2118551.

Sponaas AM, Moharrami NN, Feyzi E, Standal T, Holth Rustad E, Waage A, Sundan A. PDL1 Expression on Plasma and Dendritic Cells in Myeloma Bone Marrow Suggests Benefit of Targeted anti PD1-PDL1 Therapy. *PLoS One*. 2015 Oct 7;10(10):e0139867. doi: 10.1371/journal.pone.0139867. PMID: 26444869; PMCID: PMC4596870.

Stewart AK. Reduced-intensity allogeneic transplantation for myeloma: reality bites. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3135-6. doi: 10.1182/blood-2008-12-173526. PMID: 19342498.

Su P, Wang Q, Bi E, Ma X, Liu L, Yang M, Qian J, Yi Q. Enhanced Lipid Accumulation and Metabolism Are Required for the Differentiation and Activation of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Res*. 2020 Apr 1;80(7):1438-1450. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2994. Epub 2020 Feb 3. Erratum in: *Cancer Res*. 2022 Mar 1;82(5):945. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-4296. PMID: 32015091; PMCID: PMC7127942.

Suen H, Brown R, Yang S, Ho PJ, Gibson J, Joshua D. The failure of immune checkpoint blockade in multiple myeloma with PD-1 inhibitors in a phase 1 study. *Leukemia*. 2015 Jul;29(7):1621-2. doi: 10.1038/leu.2015.104. Epub 2015 May 19. PMID: 25987102.

Suen H, Brown R, Yang S, Weatherburn C, Ho PJ, Woodland N, Nassif N, Barbaro P, Bryant C, Hart D, Gibson J, Joshua D. Multiple myeloma causes clonal T-cell immunosenescence: identification of potential novel targets for promoting tumour immunity and implications for checkpoint blockade. *Leukemia*. 2016 Aug;30(8):1716-24. doi: 10.1038/leu.2016.84. Epub 2016 Apr 22. PMID: 27102208.

Sugiura H, Tsukushi S, Yoshida M, Nishida Y. What Is the Success of Repeat Surgical Treatment of a Local Recurrence After Initial Wide Resection of Soft Tissue Sarcomas? *Clin Orthop Relat Res*. 2018 Sep;476(9):1791-1800. doi: 10.1007/s11999-000000000000158. PMID: 30794216; PMCID: PMC6259807.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.

Sze DM, Brown RD, Yuen E, Gibson J, Ho J, Raitakari M, Basten A, Joshua DE, Fazekas de St Groth B. Clonal cytotoxic T cells in myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2003 Oct;44(10):1667-74. doi: 10.1080/1042819031000097438. PMID: 14692517.

Szmania S, Tricot G, van Rhee F. NY-ESO-1 immunotherapy for multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2006 Oct;47(10):2037-48. doi: 10.1080/10428190600742292. PMID: 17071474.

Tam W, Gomez M, Chadburn A, Lee JW, Chan WC, Knowles DM. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2006 May 15;107(10):4090-100. doi: 10.1182/blood-2005-09-3778. Epub 2006 Jan 19. PMID: 16424392.

Tamura H, Ishibashi M, Yamashita T, Tanosaki S, Okuyama N, Kondo A, Hyodo H, Shinya E, Takahashi H, Dong H, Tamada K, Chen L, Dan K, Ogata K. Marrow stromal cells induce B7-H1 expression on myeloma cells, generating aggressive characteristics in multiple myeloma. *Leukemia*. 2013 Feb;27(2):464-72. doi: 10.1038/leu.2012.213. Epub 2012 Jul 25. PMID: 22828443.

Taylor RA, Lo J, Ascui N, Watt MJ. Linking obesogenic dysregulation to prostate cancer progression. *Endocr Connect*. 2015 Dec;4(4):R68-80. doi: 10.1530/EC-15-0080. PMID: 26581226; PMCID: PMC4653354.

Tognarelli S, Wirsching S, von Metzler I, Rais B, Jacobs B, Serve H, Bader P, Ullrich E. Enhancing the Activation and Releasing the Brakes: A Double Hit Strategy to Improve NK Cell Cytotoxicity Against Multiple Myeloma. *Front Immunol*. 2018 Nov 27;9:2743. doi: 10.3389/fimmu.2018.02743. PMID: 30542346; PMCID: PMC6277768.

Treon SP, Maimonis P, Bua D, Young G, Raje N, Mollick J, Chauhan D, Tai YT, Hideshima T, Shima Y, Hilgers J, von Mensdorff-Pouilly S, Belch AR, Pilarski LM, Anderson KC. Elevated soluble MUC1 levels and decreased anti-MUC1 antibody levels in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):3147-53. PMID: 11049996.

Tse C, Warner A, Farook R, Cronin JG. Phytochemical Targeting of STAT3 Orchestrated Lipid Metabolism in Therapy-Resistant Cancers. *Biomolecules*. 2020 Jul 28;10(8):1118. doi: 10.3390/biom10081118. PMID: 32731620; PMCID: PMC7464013.

Tucci M, Ciavarella S, Strippoli S, Brunetti O, Dammacco F, Silvestris F. Immature dendritic cells from patients with multiple myeloma are prone to osteoclast differentiation in vitro. *Exp Hematol*. 2011 Jul;39(7):773-83.e1. doi: 10.1016/j.exphem.2011.04.006. Epub 2011 Apr 25. PMID: 21569821.

van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécresse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepański T, Kalina T, de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonça A, Macintyre E, Martin-Ayuso M, Hrusak O, Vidriales MB, Orfao A; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive

and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 Sep;26(9):1908-75. doi: 10.1038/leu.2012.120. Epub 2012 May 3. PMID: 22552007; PMCID: PMC3437410.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324. PMID: 21219185.

von Lilienfeld-Toal M, Frank S, Leyendecker C, Feyler S, Jarmin S, Morgan R, Glasmacher A, Märten A, Schmidt-Wolf IG, Brossart P, Cook G. Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Jun;59(6):829-39. doi: 10.1007/s00262-009-0807-3. Epub 2009 Dec 19. PMID: 20024547; PMCID: PMC11030819.

Vosper H, Patel L, Graham TL, Khoudoli GA, Hill A, Macphee CH, Pinto I, Smith SA, Suckling KE, Wolf CR, Palmer CN. The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):44258-65. doi: 10.1074/jbc.M108482200. Epub 2001 Sep 13. PMID: 11557774.

Walker BA, Wardell CP, Murison A, Boyle EM, Begum DB, Dahir NM, Proszek PZ, Melchor L, Pawlyn C, Kaiser MF, Johnson DC, Qiang YW, Jones JR, Cairns DA, Gregory WM, Owen RG, Cook G, Drayson MT, Jackson GH, Davies FE, Morgan GJ. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. *Nat Commun*. 2015 Apr 23;6:6997. doi: 10.1038/ncomms7997. PMID: 25904160; PMCID: PMC4568299.

Wang H, Franco F, Tsui YC, Xie X, Trefny MP, Zappasodi R, Mohmood SR, Fernández-García J, Tsai CH, Schulze I, Picard F, Meylan E, Silverstein R, Goldberg I, Fendt SM, Wolchok JD, Merghoub T, Jandus C, Zippelius A, Ho PC. CD36-mediated metabolic adaptation supports regulatory T cell survival and function in tumors. *Nat Immunol*. 2020 Mar;21(3):298-308. doi: 10.1038/s41590-019-0589-5. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32066953; PMCID: PMC7043937.

Wang J, Li Y. CD36 tango in cancer: signaling pathways and functions. *Theranostics*. 2019 Jul 9;9(17):4893-4908. doi: 10.7150/thno.36037. PMID: 31410189; PMCID: PMC6691380.

Wang JN, Cao XX, Zhao AL, Cai H, Wang X, Li J. Increased activated regulatory T cell subsets and aging Treg-like cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a case control study. *Cancer Cell Int*. 2018 Nov 19;18:187. doi: 10.1186/s12935-018-0687-8. PMID: 30479566; PMCID: PMC6245875.

Wang S, Blois A, El Rayes T, Liu JF, Hirsch MS, Gravidal K, Palakurthi S, Bielenberg DR, Akshen LA, Drapkin R, Mittal V, Watnick RS. Development of a prosaposin-derived therapeutic cyclic peptide that targets ovarian cancer via the tumor

microenvironment. *Sci Transl Med.* 2016 Mar 9;8(329):329ra34. doi: 10.1126/scitranslmed.aad5653. PMID: 26962158; PMCID: PMC6261358.

Wang Z, Zhang L, Wang H, Xiong S, Li Y, Tao Q, Xiao W, Qin H, Wang Y, Zhai Z. Tumor-induced CD14+HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with tumor progression and outcome of therapy in multiple myeloma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2015 Mar;64(3):389-99. doi: 10.1007/s00262-014-1646-4. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25548095; PMCID: PMC11028624.

Watt MJ, Clark AK, Selth LA, Haynes VR, Lister N, Rebello R, Porter LH, Niranjana B, Whitby ST, Lo J, Huang C, Schittenhelm RB, Anderson KE, Furic L, Wijayarathne PR, Matzaris M, Montgomery MK, Papargiris M, Norden S, Febbraio M, Risbridger GP, Frydenberg M, Nomura DK, Taylor RA. Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. *Sci Transl Med.* 2019 Feb 6;11(478):eaau5758. doi: 10.1126/scitranslmed.aau5758. PMID: 30728288.

Weber AM, Ryan AJ. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther.* 2015 May;149:124-38. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.12.001. Epub 2014 Dec 13. PMID: 25512053.

Weinhold N, Kirn D, Seckinger A, Hielscher T, Granzow M, Bertsch U, Egerer G, Salwender H, Blau IW, Weisel K, Hillengass J, Raab MS, Hose D, Goldschmidt H, Jauch A. Concomitant gain of 1q21 and MYC translocation define a poor prognostic subgroup of hyperdiploid multiple myeloma. *Haematologica.* 2016 Mar;101(3):e116-9. doi: 10.3324/haematol.2015.136929. Epub 2015 Nov 26. PMID: 26611471; PMCID: PMC4815741.

Weiss S, Bogen B. B-lymphoma cells process and present their endogenous immunoglobulin to major histocompatibility complex-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jan;86(1):282-6. doi: 10.1073/pnas.86.1.282. PMID: 2492101; PMCID: PMC286448.

Wen YJ, Min R, Tricot G, Barlogie B, Yi Q. Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy. *Blood.* 2002 May 1;99(9):3280-5. doi: 10.1182/blood.v99.9.3280. PMID: 11964294.

Wolf G. The function of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor delta in energy homeostasis. *Nutr Rev.* 2003 Nov;61(11):387-90. doi: 10.1301/nr.2003.nov.387-390. PMID: 14677574.

Xu S, Chaudhary O, Rodríguez-Morales P, Sun X, Chen D, Zappasodi R, Xu Z, Pinto AFM, Williams A, Schulze I, Farsakoglu Y, Varanasi SK, Low JS, Tang W, Wang H, McDonald B, Tripple V, Downes M, Evans RM, Abumrad NA, Merghoub T, Wolchok JD, Shokhirev MN, Ho PC, Witztum JL, Emu B, Cui G, Kaech SM. Uptake of oxidized lipids by the scavenger receptor CD36 promotes lipid peroxidation and dysfunction in CD8⁺ T cells in tumors. *Immunity.* 2021 Jul 13;54(7):1561-1577.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2021.05.003. Epub 2021 Jun 7. PMID: 34102100; PMCID: PMC9273026.

Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian LM, Carbone DP, Lin PC. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004 Oct;6(4):409-21. doi: 10.1016/j.ccr.2004.08.031. PMID: 15488763.

Yang L, Sun J, Li M, Long Y, Zhang D, Guo H, Huang R, Yan J. Oxidized Low-Density Lipoprotein Links Hypercholesterolemia and Bladder Cancer Aggressiveness by Promoting Cancer Stemness. *Cancer Res*. 2021 Nov 15;81(22):5720-5732. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0646. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34479964.

Yang P, Su C, Luo X, Zeng H, Zhao L, Wei L, Zhang X, Varghese Z, Moorhead JF, Chen Y, Ruan XZ. Dietary oleic acid-induced CD36 promotes cervical cancer cell growth and metastasis via up-regulation Src/ERK pathway. *Cancer Lett*. 2018 Dec 1;438:76-85. doi: 10.1016/j.canlet.2018.09.006. Epub 2018 Sep 11. PMID: 30213558.

Yazbeck V, Shafer D, Perkins EB, Coppola D, Sokol L, Richards KL, Shea T, Ruan J, Parekh S, Strair R, Flowers C, Morgan D, Kmiecziak M, Bose P, Kimball A, Badros AZ, Baz R, Lin HY, Zhao X, Reich RR, Tombes MB, Shrader E, Sankala H, Roberts JD, Sullivan D, Grant S, Holkova B. A Phase II Trial of Bortezomib and Vorinostat in Mantle Cell Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018 Sep;18(9):569-575.e1. doi: 10.1016/j.clml.2018.05.023. Epub 2018 Jun 6. PMID: 30122201.

Ye H, Adane B, Khan N, Sullivan T, Minhajuddin M, Gasparetto M, Stevens B, Pei S, Balys M, Ashton JM, Klemm DJ, Woolthuis CM, Stranahan AW, Park CY, Jordan CT. Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. *Cell Stem Cell*. 2016 Jul 7;19(1):23-37. doi: 10.1016/j.stem.2016.06.001. Epub 2016 Jun 30. PMID: 27374788; PMCID: PMC4938766.

Yousef S, Kovacovics-Bankowski M, Salama ME, Bhardwaj N, Steinbach M, Langemo A, Kovacovics T, Marvin J, Binder M, Panse J, Kröger N, Luetkens T, Atanackovic D. CD229 is expressed on the surface of plasma cells carrying an aberrant phenotype and chemotherapy-resistant precursor cells in multiple myeloma. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(7):1606-11. doi: 10.1080/21645515.2015.1046658. PMID: 26001047; PMCID: PMC4514151.

Yousef S, Marvin J, Steinbach M, Langemo A, Kovacovics T, Binder M, Kröger N, Luetkens T, Atanackovic D. Immunomodulatory molecule PD-L1 is expressed on malignant plasma cells and myeloma-propagating pre-plasma cells in the bone marrow of multiple myeloma patients. *Blood Cancer J*. 2015 Mar 6;5(3):e285. doi: 10.1038/bcj.2015.7. PMID: 25747678; PMCID: PMC4382668.

Zaja F, Federico M, Vitolo U, Zinzani PL. Management of relapsed/refractory mantle cell lymphoma: a review of current therapeutic strategies. *Leuk Lymphoma*. 2014 May;55(5):988-98. doi: 10.3109/10428194.2013.825903. Epub 2013 Aug 31. PMID: 23865835.

Zaoui M, Morel M, Ferrand N, Fellahi S, Bastard JP, Lamazière A, Larsen AK, Béréziat V, Atlan M, Sabbah M. Breast-Associated Adipocytes Secretome Induce Fatty Acid Uptake and Invasiveness in Breast Cancer Cells via CD36 Independently of Body Mass Index, Menopausal Status and Mammary Density. *Cancers (Basel)*. 2019 Dec 13;11(12):2012. doi: 10.3390/cancers11122012. PMID: 31847105; PMCID: PMC6966437.

Zelle-Rieser C, Thangavadivel S, Biedermann R, Brunner A, Stoitzner P, Willenbacher E, Greil R, Jöhrer K. T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site. *J Hematol Oncol*. 2016 Nov 3;9(1):116. doi: 10.1186/s13045-016-0345-3. PMID: 27809856; PMCID: PMC5093947.

Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, Bumm K, Zheng M, Tian E, Sanderson R, Yang Y, Wilson C, Zangari M, Anaissie E, Morris C, Muwalla F, van Rhee F, Fassas A, Crowley J, Tricot G, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1745-57. doi: 10.1182/blood.v99.5.1745. PMID: 11861292.

Zhang T, Yang J, Vaikari VP, Beckford JS, Wu S, Akhtari M, Alachkar H. Apolipoprotein C2 - CD36 Promotes Leukemia Growth and Presents a Targetable Axis in Acute Myeloid Leukemia. *Blood Cancer Discov*. 2020 Sep;1(2):198-213. doi: 10.1158/2643-3230.BCD-19-0077. PMID: 32944714; PMCID: PMC7494214.

Zhang X, Yao J, Shi H, Gao B, Zhang L. LncRNA TINCR/microRNA-107/CD36 regulates cell proliferation and apoptosis in colorectal cancer via PPAR signaling pathway based on bioinformatics analysis. *Biol Chem*. 2019 Apr 24;400(5):663-675. doi: 10.1515/hsz-2018-0236. PMID: 30521471.

Zhang Y, Guo H, Zhang Z, Lu W, Zhu J, Shi J. IL-6 promotes chemoresistance via upregulating CD36 mediated fatty acids uptake in acute myeloid leukemia. *Exp Cell Res*. 2022 Jun 1;415(1):113112. doi: 10.1016/j.yexcr.2022.113112. Epub 2022 Mar 25. PMID: 35346671.

Zhao L, Zhang C, Luo X, Wang P, Zhou W, Zhong S, Xie Y, Jiang Y, Yang P, Tang R, Pan Q, Hall AR, Luong TV, Fan J, Varghese Z, Moorhead JF, Pinzani M, Chen Y, Ruan XZ. CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue inflammation in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2018 Sep;69(3):705-717. doi: 10.1016/j.jhep.2018.04.006. Epub 2018 Apr 27. PMID: 29705240.

Zhao Y, Zhao MF, Jiang S, Wu J, Liu J, Yuan XW, Shen D, Zhang JZ, Zhou N, He J, Fang L, Sun XT, Xue B, Li CJ. Liver governs adipose remodelling via extracellular vesicles in response to lipid overload. *Nat Commun*. 2020 Feb 5;11(1):719. doi: 10.1038/s41467-020-14450-6. PMID: 32024826; PMCID: PMC7002740.

Zhou J, Bi C, Janakakumara JV, Liu SC, Chng WJ, Tay KG, Poon LF, Xie Z, Palaniyandi S, Yu H, Glaser KB, Albert DH, Davidsen SK, Chen CS. Enhanced activation of STAT pathways and overexpression of survivin confer resistance to

FLT3 inhibitors and could be therapeutic targets in AML. *Blood*. 2009 Apr 23;113(17):4052-62. doi: 10.1182/blood-2008-05-156422. Epub 2009 Jan 14. PMID: 19144991.

Zhou X, Einsele H, Danhof S. Bispecific Antibodies: A New Era of Treatment for Multiple Myeloma. *J Clin Med*. 2020 Jul 9;9(7):2166. doi: 10.3390/jcm9072166. PMID: 32659909; PMCID: PMC7408718.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):715-27. doi: 10.1038/nri1936. Epub 2006 Sep 15. PMID: 16977338.

Zonder JA, Mohrbacher AF, Singhal S, van Rhee F, Bensinger WI, Ding H, Fry J, Afar DE, Singhal AK. A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. *Blood*. 2012 Jul 19;120(3):552-9. doi: 10.1182/blood-2011-06-360552. Epub 2011 Dec 19. PMID: 22184404; PMCID: PMC4467882.