

Dottorato di ricerca in Oncologia e Chirurgia Sperimentali
Progetto di ricerca della Dott.ssa Valeria Cancila

Studio delle dinamiche microambientali del midollo osseo nell'emopoiesi pro-tumorale: identificazione di nuovi determinanti funzionali

Il processo sequenziale attraverso il quale una popolazione di cellule staminali dà origine a tutte le filiere differenziative ematiche viene denominato emopoiesi. Le cellule staminali emopoietiche (HSC) sono funzionalmente definite come cellule in grado di ricostituire l'emopoiesi se trapiantate in un soggetto irradiato [1] e si caratterizzano principalmente per la capacità di auto-rinnovamento e di multipotenzialità. Successivamente sottoposte ad una serie di "decisioni" differenziative, esse perdono progressivamente la loro capacità "multipotente", replicandosi o differenziandosi in un progenitore linfoide comune (CLP) o in un progenitore mieloide comune (CMP). Queste cellule danno poi origine a progenitori differenziati in cellule B (BCP), cellule NK (NKP), cellule T (TCP), granulociti (GP), monociti (MP), eritrociti (EP), e megacariociti (MkP) [2,3]. Tale percorso deve essere altamente efficiente, ma al contempo plastico e regolato, in funzione dei cambiamenti dello stato di omeostasi dell'organismo.

L' induzione ed il mantenimento di un'organizzazione gerarchica di popolazioni emopoietiche nel midollo osseo è assicurata dall'esistenza di "nicchie stromali" funzionali al sostegno delle quote emopoietiche staminali e differenziate. Tali nicchie, la nicchia osteoblastica o endosteale e la nicchia vascolare, sono caratterizzate da una diversa localizzazione topografica nel contesto del parenchima midollare e da una distinta composizione cellulare: la prima è associata alle trabecole ossee e composta principalmente da elementi staminali mesenchimali, fibroblasti endosteali ed osteoblasti; la seconda, localizzata negli spazi inter-trabecolari del midollo, è ricca in elementi endoteliali ed avventiziali reticolari. La distinta compartimentalizzazione e composizione cellulare delle due nicchie assicura funzioni differenti, la nicchia osteoblastica deputata al mantenimento delle cellule staminali emopoietiche in uno stato di quiescenza che ne favorisca l'auto-rinnovamento e la nicchia vascolare impegnata nel sostegno alla differenziazione ed immissione in circolo della progenie emopoietica [4]. L'emopoiesi pertanto è strettamente correlata alle caratteristiche del microambiente midollare in cui le cellule staminali si sviluppano e dipende dal mantenimento dei normali gradienti di fattori strutturali (matrice extracellulare e proteine matricellulari), chemiotattici (es. CXCL12/CXCR4) e di adesione (es. E- e P-Selectine). L'elevata plasticità funzionale del comparto emopoietico è quindi associata ad una analoga plasticità delle nicchie stromali,

capaci di adattare struttura e rapporti in funzione delle esigenze di output emopoietico. Il midollo emopoietico, come sistema, subisce l'influenza di distretti "lontani" in cui avviene la produzione di citochine attive sull'emopoiesi in risposta a stimoli. Questi fattori solubili, legandosi a specifici recettori, sono in grado di influenzare la capacità di espansione e differenziazione delle HSCs.

La normale emopoiesi, coinvolgendo gli organi linfoidi secondari e le mucose, immette in circolo popolazioni diversificate, implicate nella risposta adattativa e innata. Durante la risposta ad un'infezione sistemica l'emopoiesi precoce viene riadattata per fornire risposte efficaci all'incrementato bisogno di cellule immunitarie; si tratta di un meccanismo di regolazione "a lunga distanza" dalla periferia al midollo osseo definito mielopoiesi di emergenza.

Il primo passo cruciale coinvolge il rilevamento e il riconoscimento di segnali di pericolo che si realizza attraverso i recettori di riconoscimento specializzati (PRR), i quali rilevano patterns molecolari associati ai patogeni (PAMPs) e patterns molecolari associati a danno (DAMPs) [5].

Il concetto classico di induzione della mielopoiesi di emergenza presuppone che l'attivazione dei PRRs inneschi una cascata di eventi di segnalazione, che porti al rilascio di citochine infiammatorie e di chemochine [6,7]. Ciò conduce all'attivazione divisionale, alla proliferazione, alla differenziazione e migrazione di staminali emopoietiche ed effettrici mieloidi, tutte finalizzate a un'efficiente risposta immunitaria contro l'infezione e ad un veloce ristabilimento dell'omeostasi ematopoietica.

L'espressione di una varietà di citochine e PRR sulle HSCs suggerisce un loro ruolo attivo sulla modulazione dell'emopoiesi precoce durante infezioni e infiammazioni sistemiche.

In particolar modo la differenziazione mieloidi si correla ad un aumento di citochine quali:

- Fattori stimolanti la crescita di granulociti (G-CSF), di macrofagi (M-CSF) e di granulociti-macrofagi (GM-CSF)

- Citochine emopoietiche quali, SCF, IL-3, IL-6 e Flt3 ligand

È stato dimostrato che nel corso di infezioni sistemiche tali citochine vengono rilasciate, raggiungendo concentrazioni sieriche fino a cento volte sopra i livelli di normalità mostrando un ruolo chiave nella risposta mieloidi [8,9].

Sembra quindi ragionevole supporre che anche in vivo, in particolare durante l'infezione, quando citochine, induttrici di cellule mieloidi, sono altamente elevate, staminali progenitrici non-committed vengono selettivamente istruite a differenziarsi in cellule della linea mielo-monocitica, con conseguente mielopoiesi d'emergenza.

Un meccanismo complementare per assicurare la produzione ematopoietica rafforzata prevede che, durante le infezioni, la secrezione di citochine infiammatorie (IL-1, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF) riduca l'espressione dei fattori di crescita e di ritenzione per la linfopoiesi e quindi mobiliti i linfociti dal midollo osseo agli organi linfoidi periferici secondari [10], lasciando spazio libero nel midollo che possa agevolare la mielopoiesi.

L'adattamento della funzione emopoietica del midollo osseo, che porti alla preferenziale selezione di specifiche popolazioni mieloidi, non è funzione esclusiva delle risposte ad infezioni. La rigenerazione tissutale a seguito di un insulto prodotto da una generica noxa condivide con l'emopoiesi da stress propria delle infezioni la richiesta di popolazioni mieloidi specializzate quali macrofagi con funzione regolatoria (M2), granulociti neutrofili e mastociti che contribuiscano al riparo ed al rimodellamento tissutale mediante la sintesi di fattori attivi sugli elementi epiteliali e/o mesenchimali (es. IL10, TGF β , IL33, IL23, VEGFs, PDGFs). La trasformazione neoplastica può essere considerata a pieno titolo un'alterazione permanente dell'omeostasi di un tessuto, una ferita che non guarisce, in risposta alla quale è ragionevole identificare un tentativo di adattamento dell'emopoiesi.

Il cancro è associato ad una disfunzione immunitaria contraddistinta dalla presenza di fattori pro-infiammatori ed immunosoppressivi che contribuiscono alla crescita tumorale e alla sua progressione. Le cellule neoplastiche, mediante un'attiva interazione con gli elementi stromali vicini, rilasciano fattori solubili che inducono l'espansione di cellule ad attività tollerogena che, richiamate nel sito tumorale, esercitano una funzione inibitoria nei confronti delle potenziali risposte anti-tumorali. Le principali cellule implicate nel mantenimento della tolleranza immunitaria sono:

- cellule T regolatorie (Treg), rappresentano i mediatori principali del mantenimento della tolleranza immunitaria ed agiscono sopprimendo una grande varietà di risposte immunitarie sia fisiologiche che patologiche contro antigeni self e non self [11]
- cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) inibiscono potentemente l'immunità antitumorale innata e adattativa mediata dai linfociti T
- macrofagi associati al tumore (TAM) giocano un ruolo importante nella crescita del tumore, progressione e metastasi e possono rilasciare sostanze pro-tumorali che consentono l'angiogenesi e il rimodellamento tissutale
- cellule dendritiche associate al tumore (tDCS) mediano la soppressione immunitaria [12]
- neutrofili associati al tumore (TAN) con polarizzazione funzionale N2 (pro tumorale), anch'essi supportano la progressione tumorale promuovendo l'angiogenesi, l'invasione, metastasi e immunosoppressione [13]

Le neoplasie sfruttano questi elementi del sistema immunitario innato e adattativo creando perturbazioni significative nel processo di mielopoiesi. Tuttavia, i meccanismi attraverso i quali un clone neoplastico nascente sia in grado di fornire segnali al midollo osseo per istruirne un'emopoiesi complice dello sviluppo neoplastico non sono ad oggi conosciuti.

Conoscere la natura delle risposte immunitarie antitumorali e le variazioni neoplastiche indotte dalla risposta immunitaria e dal sistema ematopoietico può guidare ad una migliore diagnosi e trattamento [14]. In tal senso, studi recenti condotti hanno dimostrato che il microambiente stromale ed immunologico influenzano le fasi più precoci dello sviluppo di un clone neoplastico poiché alterazioni estrinseche al clone, quali la struttura difettiva della matrice extracellulare o l'attivazione deregolata di componenti infiammatorie, sono capaci di vicariare la "massa critica" di lesioni genetiche necessarie a conferire il fenotipo neoplastico.

Nel presente progetto di studio nel contesto dell'iter di Dottorato di Ricerca ci riproponiamo di indagare la natura delle modifiche del microambiente emopoietico nelle fasi precoci ed avanzate dello sviluppo di un clone neoplastico, nel tentativo di identificare specifiche caratteristiche del rimodellamento del comparto mesenchimale ed emopoietico del midollo osseo, che possano essere associate all'istruzione di una ematopoiesi pro-tumorale. L'identificazione di tali caratteristiche consentirebbe di programmare studi funzionali atti a determinare i fattori regolatori essenziali dell'emopoiesi pro-tumorale e ad elaborare strategie terapeutiche.

Sotto il profilo metodologico saranno dapprima analizzati i campioni di tessuto emopoietico midollare di coorti di topi BALB-neuT transgenici per il gene neu e proni allo sviluppo spontaneo di carcinomi della mammella. I campioni di tessuto emopoietico saranno relativi a topi di differente età (ed a controlli BALB non transgenici) corrispondenti a differenti fasi di cancerogenesi dell'albero ghiandolare mammario. L'analisi del tessuto emopoietico sarà effettuata sotto il profilo istopatologico, immunofenotipico (per marcatori di linea e di polarizzazione funzionale) e molecolare (profilo di espressione genica). Accanto alle variazioni nella qualità e distribuzione degli elementi emopoietici saranno valutate le modifiche delle componenti cellulari ed extracellulari delle nicchie stromali. La contemporanea analisi istopatologica ed immunofenotipica delle lesioni periferiche primitive dell'epitelio mammario (displasia, carcinoma in situ, carcinoma invasivo) consentirà un livello di correlazione tra dati inerenti lo sviluppo del clone neoplastico e dati relativi all'adattamento della risposta emopoietica senza precedenti.

L'auspicata identificazione di elementi caratterizzanti o determinanti nel processo di istruzione della emopoiesi pro-tumorale condurrà allo sviluppo di modelli in vivo *ad-hoc* che consentano di saggiare l'effettiva specificità e l'importanza di tali caratteristiche/determinanti nello sviluppo e nella progressione neoplastica.

Infine, la validazione di eventuali risultati ottenuti nell'ambito murino sarà operata (previa autorizzazione da parte del Comitato Etico Istituzionale) mediante l'analisi di biopsie osteo-midollari di pazienti con linfoma di Hodgkin a diverso stadio di malattia (I-III). Il linfoma di Hodgkin rappresenta un modello ideale di cooptazione di elementi mieloidi derivati dal midollo emopoietico ed è caratterizzato da una progressione che in parte ricalca quella delle "neoplasie solide" ed offre la possibilità di una contemporanea valutazione della sede "primaria" di sviluppo del clone neoplastico e del midollo emopoietico (biopsizzato alla diagnosi per fini di stadiazione).

Il lavoro sperimentale del progetto si articolerà su tre anni ed implicherà l'utilizzo di metodiche di istologia patologica classica (colorazioni istochimiche e microscopia ottica a luce trasmessa), di immuno-localizzazione in situ (immunoistochimica in singola e doppia marcatura ed immunofluorescenza in multipla marcatura), di immuno-fenotipizzazione (citometria a flusso a multiparametrica), di morfometria (microscopia digitale), e di biologia molecolare (estrazione di acidi nucleici da campioni fissati e decalcificati; studio di espressione genica mediante array).

L'ipotesi progettuale trova concreta applicazione nelle dinamiche di ricerca e nelle infrastrutture del Laboratorio di Immunologia dei Tumori diretto dal Prof. Claudio Tripodo.

Luogo e data Palermo, 11/08/2015

NOME E COGNOME (FIRMA)

Valeria Concio

BIBLIOGRAFIA

- [1] Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. . *Annu Rev Med.* 2005;56:509-38.
- [2] Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000; 404(6774):193-197.
- [3] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* 2008;132(4): 631-644.
- [4] Sangaletti S, Tripodo C, Portararo P, Dugo M, Vitali C, Botti L, Guarnotta C, Cappetti B, Gulino A, Torselli I, Casalini P, Chiodoni C, Colombo MP. Stromal niche communalities underscore the contribution of the matricellular protein SPARC to B-cell development and lymphoid malignancies. *Oncoimmunology.* 2014 Jun 5;3:e28989.
- [5] Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5(10):987-995.
- [6] Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 2011;32(10):452-460.
- [7] Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):762-774.
- [8] Selig C, Nothdurft W. Cytokines and progenitor cells of granulocytopoiesis in peripheral blood of patients with bacterial infections. *Infect Immun.* 1995;63(1):104-109.
- [9] Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, et al. Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood.* 1990; 76(10):1962-1964.
- [10] Cheers C, Haigh AM, Kelso A, Metcalf D, Stanley ER, Young AM. Production of colonystimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infect Immun.* 1988;56(1):247-251.
- [11] Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 127, 759-767 (2010).
- [12] Rehman A, Hemmert KC, Ochi A. Role of Fatty-Acid Synthesis in Dendritic Cell Generation and Function, *J Immunol* 2013; 190:4640-4649.
- [13] Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012 Jun;82(3):296-309.
- [14] Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2011; 29:610-8