



Fondazione M. Tettamanti
M. De Marchi ONLUS
Eretta in Ente morale
con D.P.R. 24/02/87
Prefettura di Milano n. 196/325/1

To:

Associazione Italiana Sindrome di Shwachman-Diamond (AISS)
Via Pioveghetto 15, - 35136 Padova
Tel - FAX +39 049 8736130
E-mail: aiss@shwachman.it

Associazione Italiana Sindrome di Shwachman-Diamond Research Grant: Report del primo anno e richiesta di supporto per il secondo anno

Titolo: ROLE OF THE HUMAN NICHE IN INDUCING AND SUPPORTING MYELODYSPLASTIC SYNDROME AND/OR LEUKAEMIA EVOLUTION IN SHWACHMAN-DIAMOND SYNDROME (SDS) PATIENTS

La SDS è una malattia ereditaria caratterizzata da insufficienza del pancreas esocrino e da alterazioni ematologiche legate a disfunzioni midollari. La SDS è inoltre associata a neutropenia costante o intermittente e, meno frequentemente, a piastrinopenia ed anemia; più raramente sono presenti anche mielodisplasia e leucemia. A queste anomalie si possono accostare, con frequenza variabile, una bassa statura, alterazioni scheletriche ed infezioni ricorrenti. E' stato dimostrato che il midollo osseo dei pazienti SDS non è in grado di supportare e mantenere il processo di ematopoiesi. Nei pazienti SDS la neutropenia ed i difetti funzionali dei neutrofili giocano un ruolo cruciale nelle complicanze dovute alle gravi infezioni ricorrenti, rappresentando una delle cause principali di morte nei primi 12 mesi di vita. Inoltre, in modelli murini è stato dimostrato come alterazioni a livello delle cellule mesenchimali stromali (MSCs) midollari che presentano l'alterazione del gene SBDS implicato nella SDS, possano indurre trasformazione maligna a livello delle cellule ematopoietiche. Al fine di comprendere i potenziali meccanismi alla base di questi fenomeni patogenetici, stiamo studiando *in vivo*, mediante un approccio senza *scaffold*, il ruolo delle SDS-MSCs nell'insufficienza midollare e nella predisposizione all'insorgenza di tumori ematologici. La comprensione dei meccanismi molecolari alla base della nicchia ematopoietica può essere particolarmente utile nell'identificazione di potenziali bersagli terapeutici per prevenire o trattare l'evoluzione della leucemia nei pazienti SDS.

Validazione dei risultati *in vivo* ed analisi molecolare degli organoidi a 4 settimane

Dopo aver isolato e caratterizzato nuove colture di cellule mesenchimali stromali derivanti da midollo osseo di pazienti SDS (n=9; totale pazienti n=29) e di donatori sani (HD) (n=3; totale

SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
C.F. 95587550153
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatrionmonza.it

CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167
Tel. Amm.: +39 039 233 2530
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatrionmonza.it

donatori n=13), abbiamo effettuato il differenziamento condrogenico come precedentemente riportato. Dopo aver confermato il successo del differenziamento condrogenico in entrambe le tipologie di colture (**Fig. 1A & B**), abbiamo proceduto all'impianto dei pellet cartilaginei in modo tale da riprodurre il modello di nicchia ematopoietica secondo il protocollo di Serafini et al. [Serafini et al., 2014]. A conferma dei dati preliminari dello scorso anno, solo i pellet cartilaginei ottenuti da donatori sani sono stati in grado di generare *in vivo* un ossicolo funzionale contenente trabecole ossee, vasi sinusoidali, tessuto adiposo ed abbondante componente midollare (**Fig. 2A & B**). In particolare, dei 150 pellet SDS impiantati, solo 24 (16%) sono stati raccolti a fine procedura e nessuno di essi è stato in grado di formare *in vivo* un ossicolo funzionale.

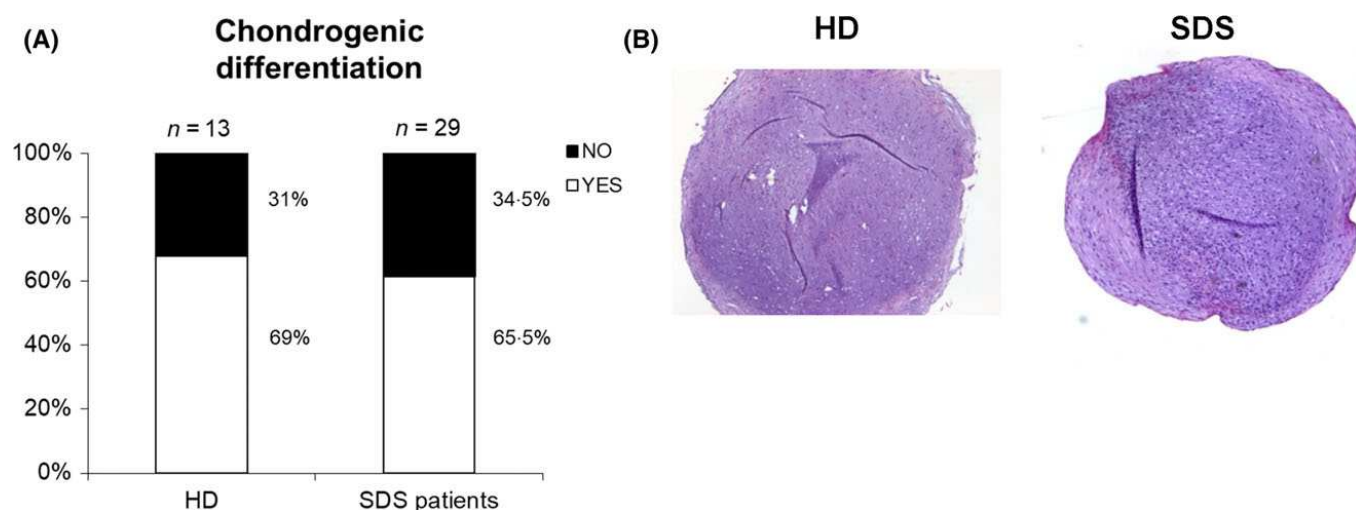


Figura 1. Differenziamento condrogenico *in vitro* delle MSCs. (A) Percentuale di successo; (B) esempio di colorazione ematossilina-eosina dei pellet cartilaginei [Bardelli et al., 2018].

Per indagare ulteriormente i meccanismi alla base dell'incapacità dei pellet derivati dalle cellule mesenchimali dei pazienti SDS di formare ossicoli *in vivo*, abbiamo deciso quindi di seguire nel tempo (*time point* di 2, 4 e 8 settimane) il trapianto di un ossicolo HD e di tre ossicoli SDS (UNP19, UPN7 e UPN13). Dopo 2 settimane dal trapianto, gli ossicoli SDS raccolti non hanno mostrato differenze rilevanti rispetto a quelli HD, ovvero in entrambi i casi l'analisi istologica degli ossicoli ha permesso di evidenziare la presenza di matrice cartilaginea endocondrale (**Fig. 3**). A 4 settimane, invece, abbiamo assistito al riassorbimento della cartilagine nel campione HD, con un'iniziale deposizione di matrice osteogenica, mentre negli ossicoli SDS questo processo è risultato meno evidente o addirittura assente. Non a caso, dopo 8 settimane abbiamo ottenuto con successo la formazione di una nicchia midollare solo negli ossicoli derivati dalle cellule HD. Per quanto riguarda i pazienti SDS, invece, o non siamo stati in grado di raccogliere nessun ossicolo alla fine della procedura (UPN7), oppure gli ossicoli raccolti non mostravano alcuna vascolarizzazione e/o

SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
C.F. 95587550153
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167
Tel. Amm.: +39 039 233 2530
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

formazione di nicchia midollare (UPN19 e UPN13). Inoltre, in accordo con i dati riportati in precedenza (**Fig. 2**), l'analisi istologica ha evidenziato la presenza di solo tessuto condrogenico e poco tessuto osteogenico. Per caratterizzare al meglio questo fenomeno, abbiamo analizzato l'espressione genica di alcuni geni implicati nel processo di generazione degli ossicoli, tra i quali legati ai fenomeni di ipossia (i.e. HIF1 α), angiogenesi (i.e. ANG-1), invasione (i.e. MMP-9) ed infiammazione (i.e. IL-1 β). I pellet cartilaginei dopo 4 settimane dall'impianto sono stati quindi sottoposti all'analisi dell'mRNA mediante Real-Time PCR. Sorprendentemente, non abbiamo trovato alcuna differenza di espressione nei geni indagati tra SDS e HD (dati non mostrati).

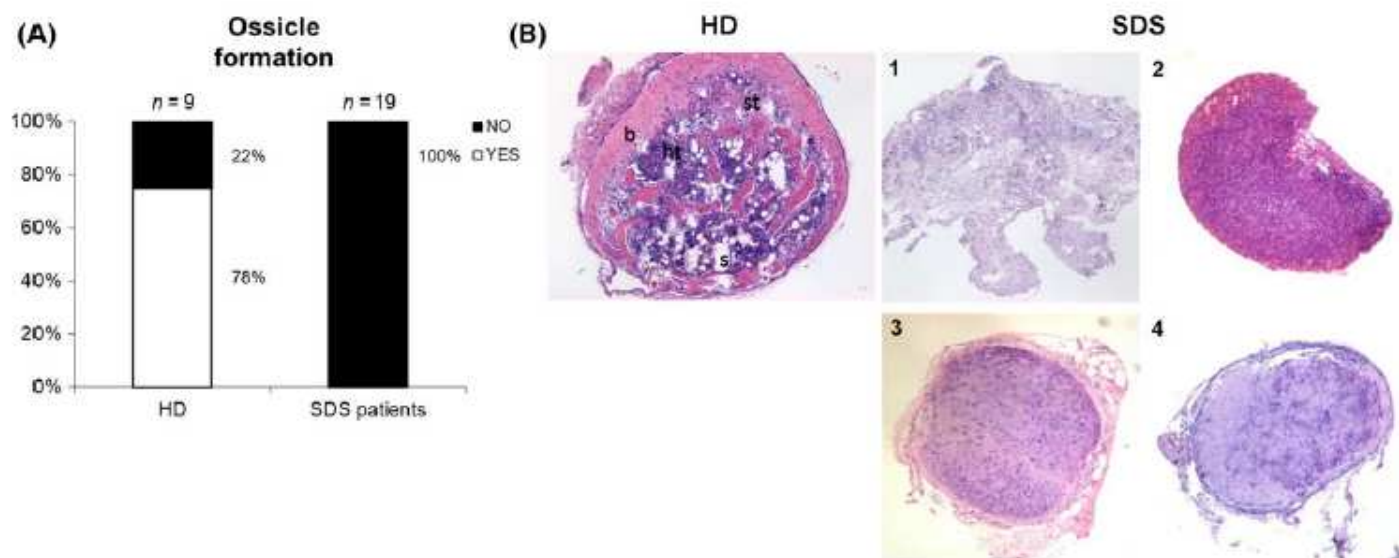


Figura 2. I pellet cartilaginei derivanti dalle cellule mesenchimali di pazienti SDS non sono in grado di ricreare *in vivo* un ossicolo funzionale. (A) Percentuale di successo. (B) Analisi istologica dei pellet SDS raccolti dopo 8 settimane. Le immagini mostrano assenza di vascolarizzazione e strutture del midollo osseo. Inoltre, il processo di differenziazione sembra essere interrotto a livello mesenchimale (2) o condrogenico (3 e 4) e talvolta sono presenti elementi infiammatori (1) o capsula fibrotica (4) [Bardelli et al., 2018].

Analisi *in vitro* mediante Matrigel Assay

Data l'assenza di vascolarizzazione che caratterizza gli ossicoli derivanti dai pazienti SDS, abbiamo verificato l'attività angiogenica delle MSCs mediante il saggio *in vitro* dell'angiogenesi Matrigel Assay. Questo saggio è uno dei modelli sperimentali più usati per studiare la formazione di una rete di capillari *in vitro* [Schnaper H.W. et al. 1993], in quanto costituisce una matrice biologicamente attiva in grado di mimare la membrana basale delle cellule di mammifero. Le cellule si depositano

SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
C.F. 95587550153
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167
Tel. Amm.: +39 039 233 2530
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

sul substrato gelatinoso e, dopo essere state opportunamente stimulate con i fattori da testare, vengono osservate al microscopio con lo scopo di analizzare se si organizzano spontaneamente in una rete di vasi del tutto simile alle reti di capillari dei tessuti *in vivo*. Quarantamila (40000) MSCs (SDS n=6, HD n=6) al passaggio 5 e risospese in uno specifico terreno di coltura arricchito di fattori angiogenici (VCBM) sono state quindi seminate in piastre da 24 pozzetti precedentemente trattati con il Matrigel. Le cellule sono state successivamente incubate a 37°C e la formazione dei tubuli è stata osservata al microscopio nelle seguenti 3 ore. Le immagini acquisite sono state analizzate mediante software “IMAGEJ, Angiogenesis Analyzer”. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato, tenendo come riferimento la semina delle TIME nel loro normale terreno di coltura (VCBM). Alla fine del periodo di osservazione, le cellule mesenchimali sono state isolate dal Matrigel mediante trattamento enzimatico (Dispasi) e sottoposte ad analisi di espressione genica (**Fig. 3**).

Come mostrato in **Fig. 4A**, la capacità di formare tubuli da parte delle MSCs derivanti dai pazienti SDS risulta alterata rispetto a quella mostrata dalle cellule MSCs-HD. In particolare, l’analisi delle immagini effettuata tramite software “IMAGEJ, Angiogenesis Analyzer” ha permesso di evidenziare una generale riduzione della quantificazione di tutti i parametri indagati, tra i quali numero di giunzioni, segmenti, maglie e nodi (dati non mostrati).

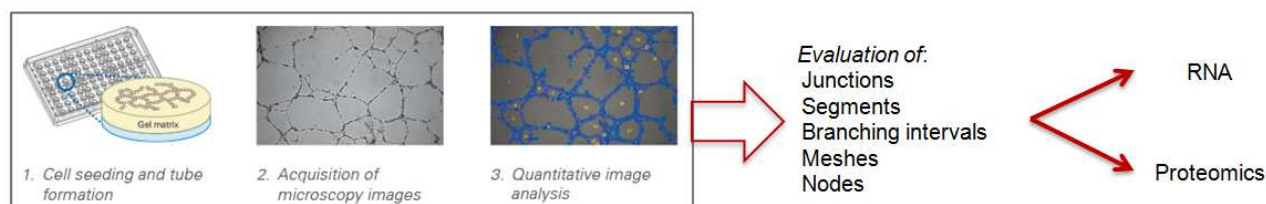


Figura 3. Schema sperimentale relativo al Matrigel Assay.

Dall’analisi molecolare, effettuata a partire dalle MSCs isolate dal Matrigel Assay risospese in terreno angiogenico VCBM, è emersa una diminuzione statisticamente significativa nell’espressione del fattore angiogenico VEGFA da parte delle cellule mesenchimali SDS rispetto alle MSCs-HD (**Fig. 4B**).

SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
C.F. 95587550153
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167
Tel. Amm.: +39 039 233 2530
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

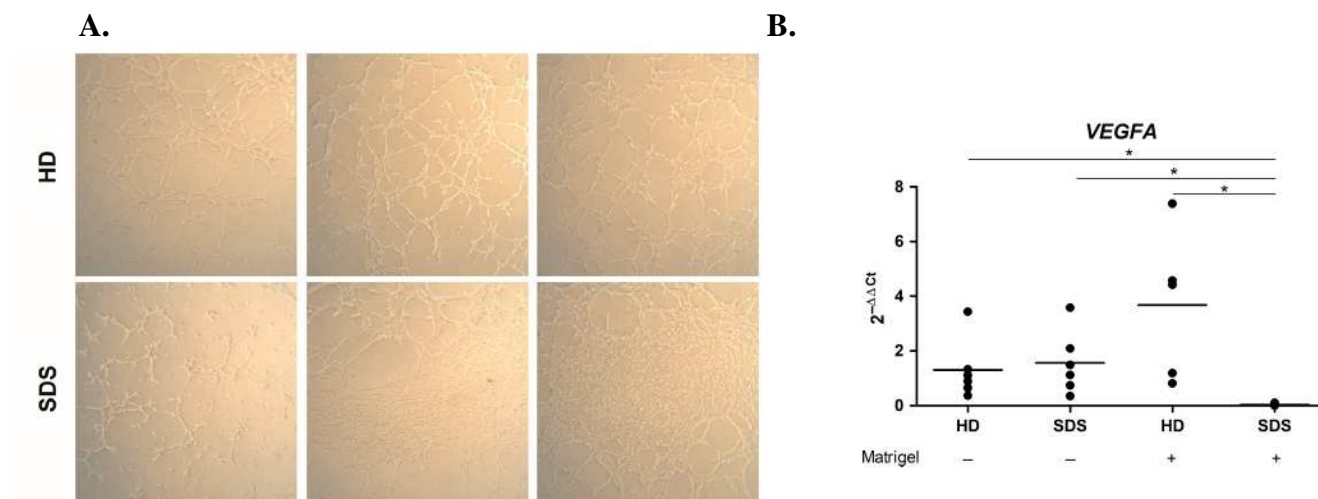


Figura 4. Matrigel Assay effettuato su MSCs risospese in VCBM. (A) Immagini microscopiche delle cellule MSCs su Matrigel. (B) Grafico a punti dell'espressione di VEGFA. (C) Grafico a linee dell'espressione di VEGFA. (D) Grafico a linee dell'espressione di VEGFA. (E) Grafico a linee dell'espressione di VEGFA. (F) Grafico a linee dell'espressione di VEGFA. (G) Grafico a linee dell'espressione di VEGFA. (H) Grafico a linee dell'espressione di VEGFA. (I) Grafico a linee dell'espressione di VEGFA. (J) Grafico a linee dell'espressione di VEGFA. [Bardelli et al., 2018].

Al fine di comprendere al meglio il meccanismo dell'angiogenesi *in vitro* aberrante osservato nelle MSCs-SDS, il saggio angiogenico è stato eseguito risospesando le cellule MSCs sia in un terreno normalmente utilizzato per la coltura delle stesse (condizione basale; DMEM+2% FBS) sia nello specifico terreno di coltura precedentemente utilizzato (VCBM). In particolare, il Matrigel Assay è stato ripetuto analizzando altre colture cellulari MSCs-SDS (n=4) e HD (n=2) e, al termine del periodo di osservazione di 3 ore, le cellule MSCs sono state isolate e sottoposte ad indagine di espressione genica.

SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
C.F. 95587550153
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167
Tel. Amm.: +39 039 233 2530
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

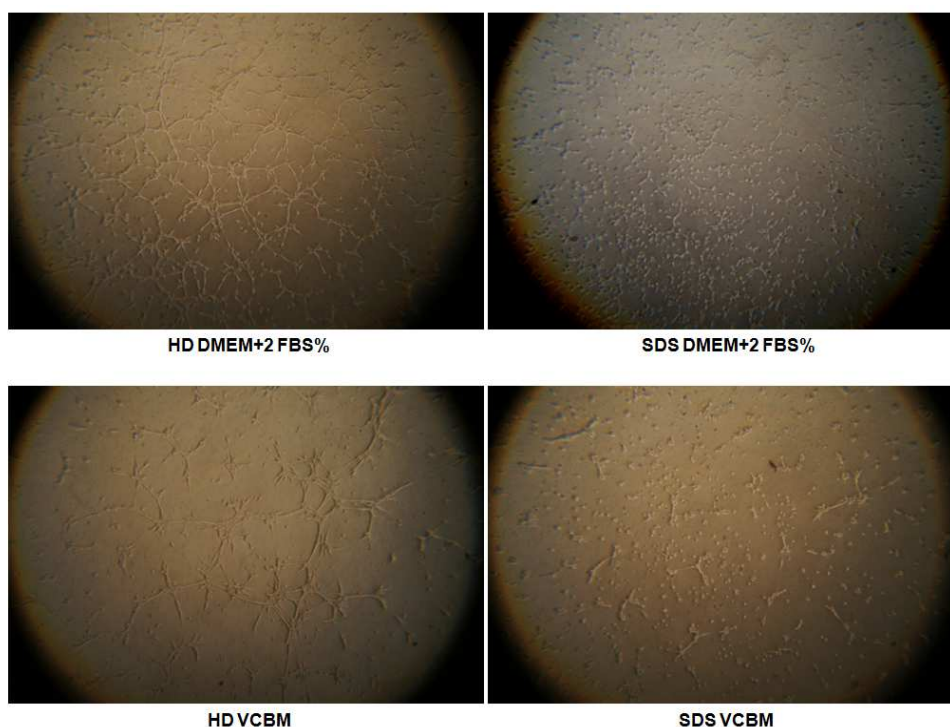


Figura 5. Immagini rappresentative del Matrigel Assay effettuato su MSCs risospese in DMEM+2% FBS e VCBM.

Come mostrato in **Fig. 5**, la capacità di formare tubuli da parte delle MSCs derivanti dai pazienti SDS anche nella condizione basale è risultata alterata rispetto a quella mostrata dalle cellule MSCs-HD. Purtroppo, l'analisi delle immagini effettuata tramite software "IMAGEJ, Angiogenesis Analyzer" ha permesso di evidenziare una riduzione statisticamente significativa solo nel parametro delle maglie, indice della complessità della struttura tubulare (**Fig. 6**). L'analisi della condizione in VCBM, invece, ha confermato i risultati precedentemente riportati (dati non mostrati).

SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
C.F. 95587550153
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167
Tel. Amm.: +39 039 233 2530
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

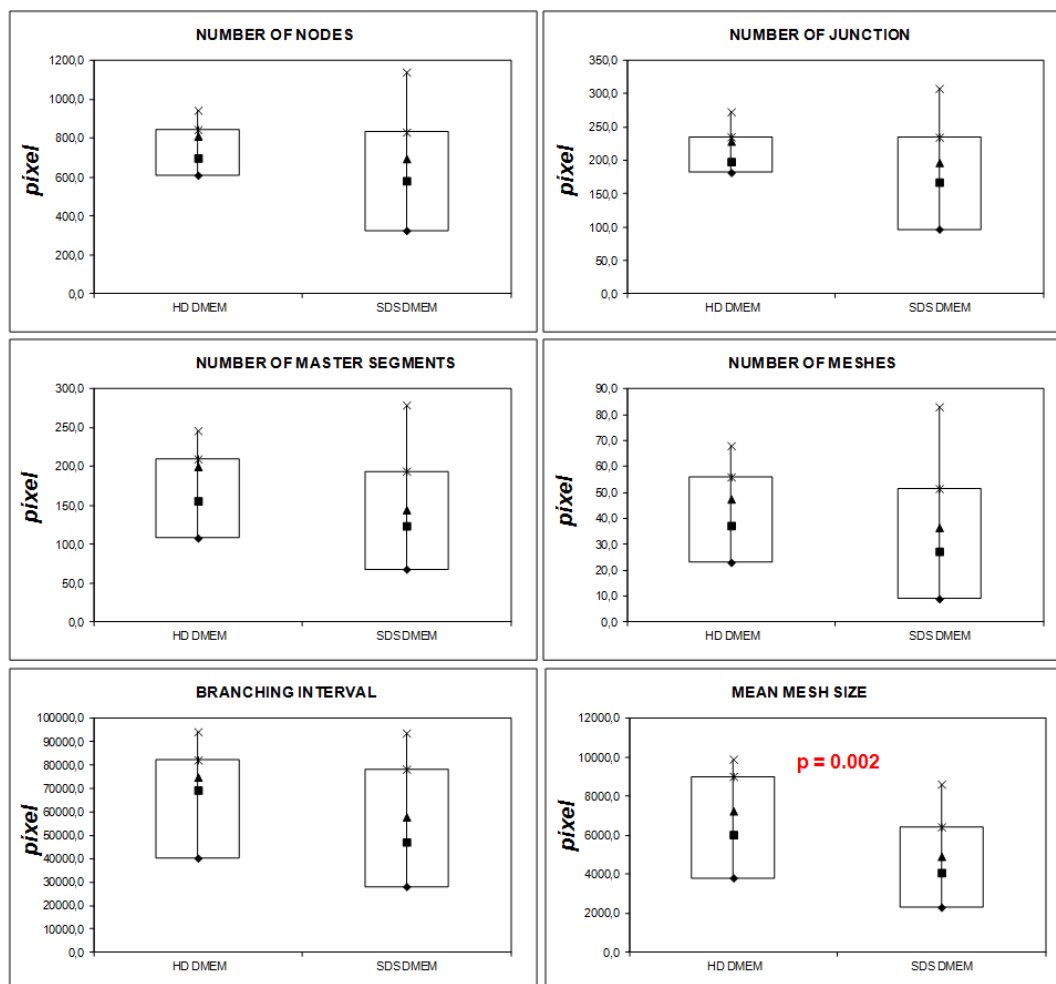


Figura 6. Quantificazione dei parametri del Matrigel Assay effettuato su MSCs risospese in DMEM+2% FBS.

L'analisi di espressione genica ha permesso di evidenziare una generale up-regolazione nell'espressione di VEGFA sia nella condizione basale che VCBM. In particolare, siamo stati in grado di confermare la diminuzione di espressione precedentemente identificata nelle MSCs-SDS anche nella condizione basale quando confrontata all'espressione specifica ottenuta dalle MSCs-HD (DMEM+2% FBS: *fold change* SDS = 3.02, HD = 4.15; VCBM: *fold change* SDS = 1.70, HD = 2.86) (**Fig. 7**).

SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
C.F. 95587550153
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatrionmonza.it

CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167
Tel. Amm.: +39 039 233 2530
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatrionmonza.it

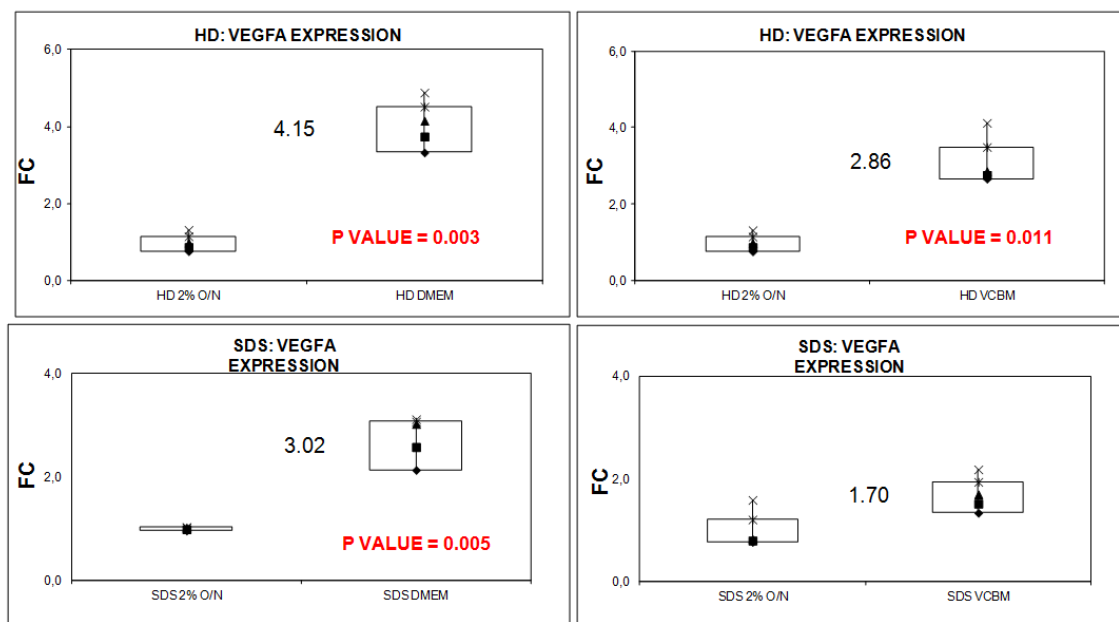


Figura 7. Analisi dell'espressione genica di VEGFA.

Abbiamo esteso l'indagine molecolare allo studio dell'espressione delle angiopoietine, poiché la funzione biologica di angiopoietina-2 (ANG-2) è strettamente legata alla biodisponibilità di VEGFA [Lobov et al., 2002; Hao et al., 2011]. Come mostrato in **Fig. 8**, l'espressione di ANG-2 è up-regolata sia nella condizione basale che VCBM. In particolare, questa up-regolazione di ANG-2 da parte delle MSCs-SDS risulta maggiore nella condizione basale quando confrontata all'espressione ottenuta dalle MSCs-HD (*fold change* SDS = 2.61, HD = 2.12). Purtroppo, nella condizione VCBM il dato invece non risulta statisticamente significativo (*fold change* SDS = 2.19, HD = 2.09). La up-regolazione di ANG-2 è confermata anche dall'analisi dell'espressione di angiopoietina-1 (ANG-1) e del rispettivo *ratio* ANG-2/ANG-1, a favore di ANG-2 (dati non mostrati). Dall'analisi molecolare dell'espressione di TIE-2, il recettore tirosin chinasi specifico sia per ANG-2 che ANG-1, è emersa una diminuzione nell'espressione di questo recettore da parte delle MSCs-SDS nella condizione VCBM quando confrontata all'espressione ottenuta dalle MSCs-HD (VCBM: *fold change* SDS = 0.86, HD = 1.34) (**Fig. 9**).

SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
C.F. 95587550153
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatrionza.it

CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167
Tel. Amm.: +39 039 233 2530
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatrionza.it

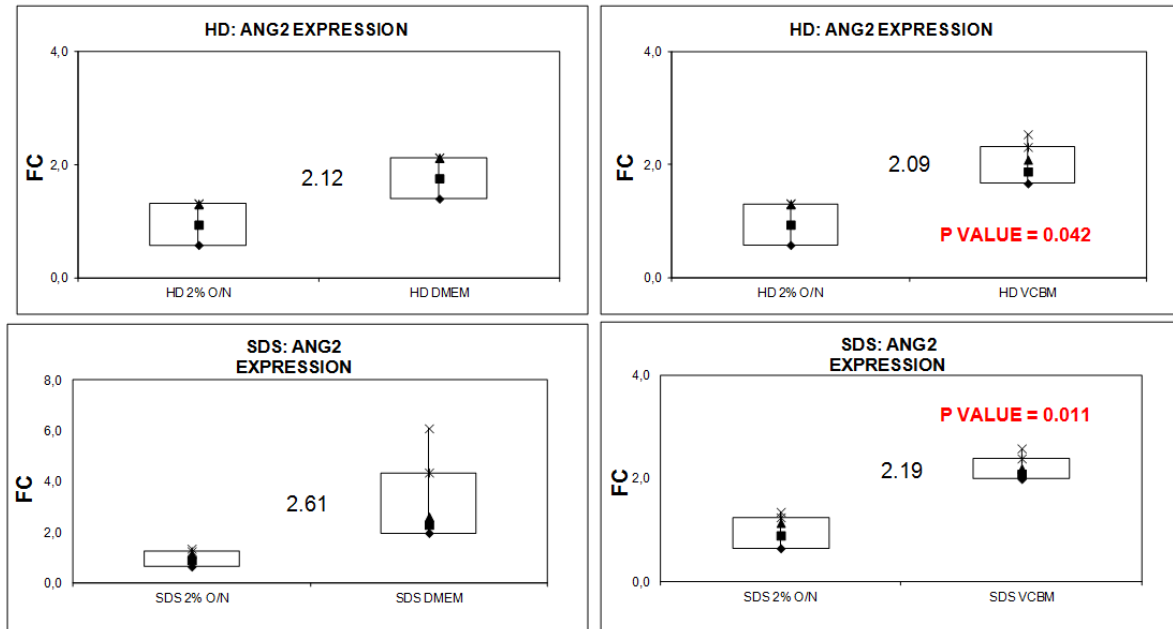


Figura 8. Analisi dell'espressione genica di Angiopoietina-2.

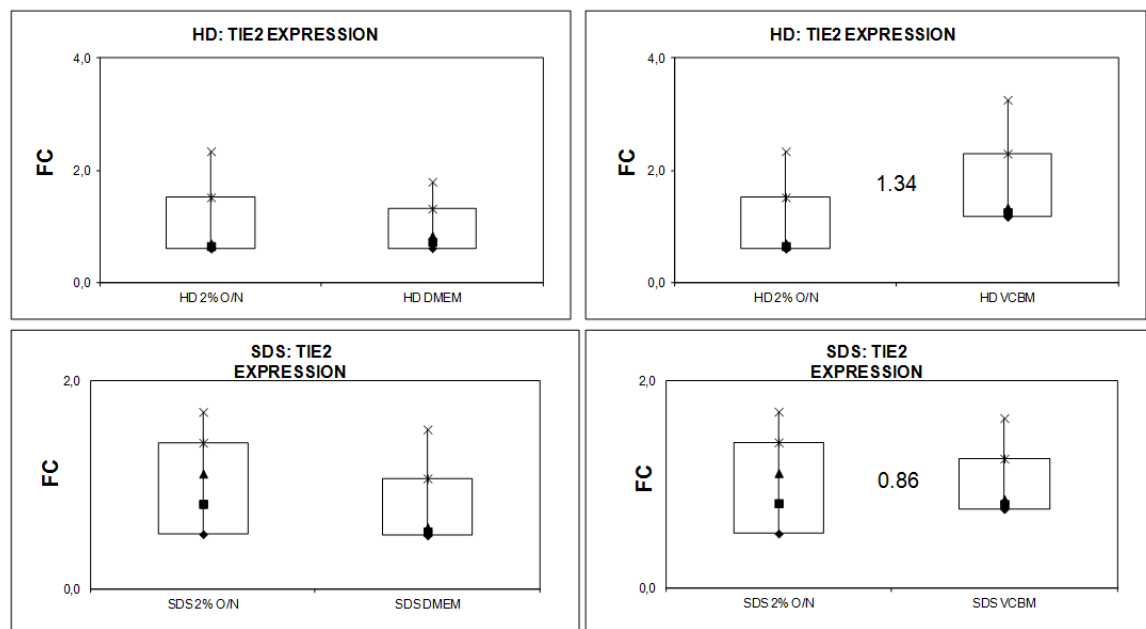


Figura 9. Analisi dell'espressione genica di TIE-2.

SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
C.F. 95587550153
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatrionza.it

CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167
Tel. Amm.: +39 039 233 2530
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatrionza.it



Fondazione M. Tettamanti
M. De Marchi ONLUS
Eretta in Ente morale
con D.P.R. 24/02/87
Prefettura di Milano n. 196/325/1

FONDAZIONE TETTAMANTI

Per lo studio e la cura delle leucemie ed emopatie infantili

Piano sperimentale per il prossimo anno

Al fine di comprendere le nostre osservazioni:

- Verrà aumentato il numero di pazienti analizzati.
- Verranno analizzati le alterazioni cellulari e molecolari delle MSC indotte a cellule endoteliali in modo da comprendere il difetto alla base della vascolarizzazione osservato nel modello *in vivo* di nicchia ematopoietica

Monza, 30/1/2019

Firma

SEDE

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
C.F. 95587550153
Tel. Segr.: +39 039 233 3513 - Fax: +39 039 2301646
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it

CENTRO DI RICERCA M. TETTAMANTI

Clinica Pediatrica, Università di Milano-Bicocca,
Azienda Ospedaliera San Gerardo
Via Pergolesi, 33 - 20052 Monza (Mi) Italia
Tel.: +39 039 233 3661 - Fax: +39 039 233 2167
Tel. Amm.: +39 039 233 2530
E-mail: fondazione.tettamanti@pediatriamonza.it