



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata

**RUOLO DELLA NICCHIA EMATOPOIETICA NELLA
PROGRESSIONE DELLE PATOLOGIE MIELOIDI**

**ROLE OF THE HEMATOPOIETIC NICHE IN THE
PROGRESSION OF MYELOID DISEASES**

Tesi di Laurea Magistrale di
Michela Gialluca

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa
Antonella Poloni

Sessione estiva Luglio 2022
Anno accademico 2021-2022

Indice

INTRODUZIONE	3
1 MICROAMBIENTE MIDOLLARE “NORMALE”	3
1.1 <i>Nicchia endostale</i>	6
1.2 <i>Nicchia vascolare</i>	8
1.3 <i>Cellule stromali mesenchimali (CSM)</i>	10
1.4 <i>Altre cellule presenti nella nicchia ematopoietica</i>	14
2 NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE	17
2.1 <i>Introduzione, criteri diagnostici e stratificazione del rischio</i>	17
2.2 <i>Basi molecolari delle Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative</i>	31
2.3 <i>Microambiente midollare nei pazienti con patologie mieloidi</i>	39
SCOPO DELLA TESI	43
MATERIALI E METODI	44
1 PAZIENTI E DONATORI NORMALI.....	44
2 SELEZIONE ED ESPANSIONE DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI (CSM)	46
2.1 <i>Congelamento</i>	47
3 ANALISI IMMUNOFENOTIPICA	48
4 CO-COLTURE.....	49
5 ESTRAZIONE DNA	52
6 PCR QUALITATIVA.....	53
7 PCR QUANTITATIVA.....	55
8 ANALISI STATISTICA DEI DATI	57
RISULTATI	58
1 CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI	58
1.1 <i>Selezione, espansione in vitro ed analisi immunofenotipica</i>	58
1.2 <i>CO-COLTURE</i>	63
DISCUSSIONE	65
BIBLIOGRAFIA	70

INTRODUZIONE

1 MICROAMBIENTE MIDOLLARE “NORMALE”

Il microambiente midollare (BMM), è un'entità cellulare e molecolare complessa costituita da cellule stromali mesenchimali (CSM), cellule endoteliali, nervi del sistema nervoso simpatico e cellule accessorie, come linfociti T e monociti, che svolgono un ruolo importante nell'omeostasi del BM. (*Figura 1*)

Compito del microambiente è regolare la quiescenza delle cellule staminali emopoietiche (CSE), il loro autorinnovamento e differenziazione mediante interazioni cellulari e molecolari.¹ Le CSM, inoltre, svolgono un ruolo importante nelle interazioni con le CSE. Anche la vascolarizzazione svolge un ruolo centrale nel midollo osseo (BM) mediante due tipi di vasi sanguigni, le arteriole e i capillari fenestrati.

Il microambiente midollare è un ambiente ipossico caratterizzato da un decrescente gradiente di ossigeno tra la parte più interna e quella più esterna, quindi tra i sinusoidi e le unità di rimodellamento osseo (6-1%),^{1,2} dovuto alla densa vascolarizzazione della zona centro-midollare del BM. Questa ipossia va ad indurre due fattori essenziali per l'autorinnovamento delle CSE a lungo termine: il fattore inducibile dell'ipossia (HIF)-1 α e HIF-2 α .³ Si ha, inoltre, un'elevata concentrazione di ione Calcio (Ca²⁺) nella regione dell'endostio.⁴

Nel microambiente midollare le interazioni tra CSM e CSE, mediate da citochine, recettori per le citochine e molecole di adesione, sono fondamentali per una corretta omeostasi del midollo osseo adulto.⁵ Sono state descritte due tipi differenti di nicchie, endostale e vascolare, le quali da un punto di vista anatomico-funzionale sono strettamente collegate.

Studi in vitro hanno dimostrato che le cellule del BMM, in particolare gli osteoblasti secernono citochine ematopoietiche come CXCL12 (SDF1), SCF (*stem cell factor*), Ang-1 (Angiopoietina-1), IL-6 (Interleuchina-6) e Jagged 1 (Jag1, ligando di Notch).^{6 7}, in grado di influenzare la regolazione delle CSE. SCF è espresso principalmente dalle cellule perivascolari del BM e, insieme a IL-6, supporta la normale emopoiesi, il mantenimento e la quiescenza delle CSE.⁸ L'Ang-1 presenta un effetto anti-apoptotico e regola la quiescenza delle CSE⁵, così come il TGF β 1 (fattore di crescita trasformante β 1).⁹

L'osteopontina (OPN) è una glicoproteina sintetizzata dagli osteoblasti nella regione endostale che riconosce l'integrina α v β 1 sulla superficie delle CSE e svolge un importante ruolo nell'adesione cellulare, nelle risposte infiammatorie e nell'angiogenesi. L'OPN svolge anche un ruolo nella localizzazione, proliferazione e mobilitazione delle CSE.¹⁰ Un modello murino di topi con carenza di questa glicoproteina (OPN) dimostra che quest'ultima trattiene le CSE nel BM regolandone negativamente il numero.¹¹ Gli osteoblasti esprimono

trombopoietina (TPO) sulla loro superficie che va ad attivare il recettore cMPL presente sulla superficie delle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche (HSPC). Questa interazione TPO/cMPL induce la quiescenza delle cellule staminali attraverso l'attivazione della via della β -integrina.¹²

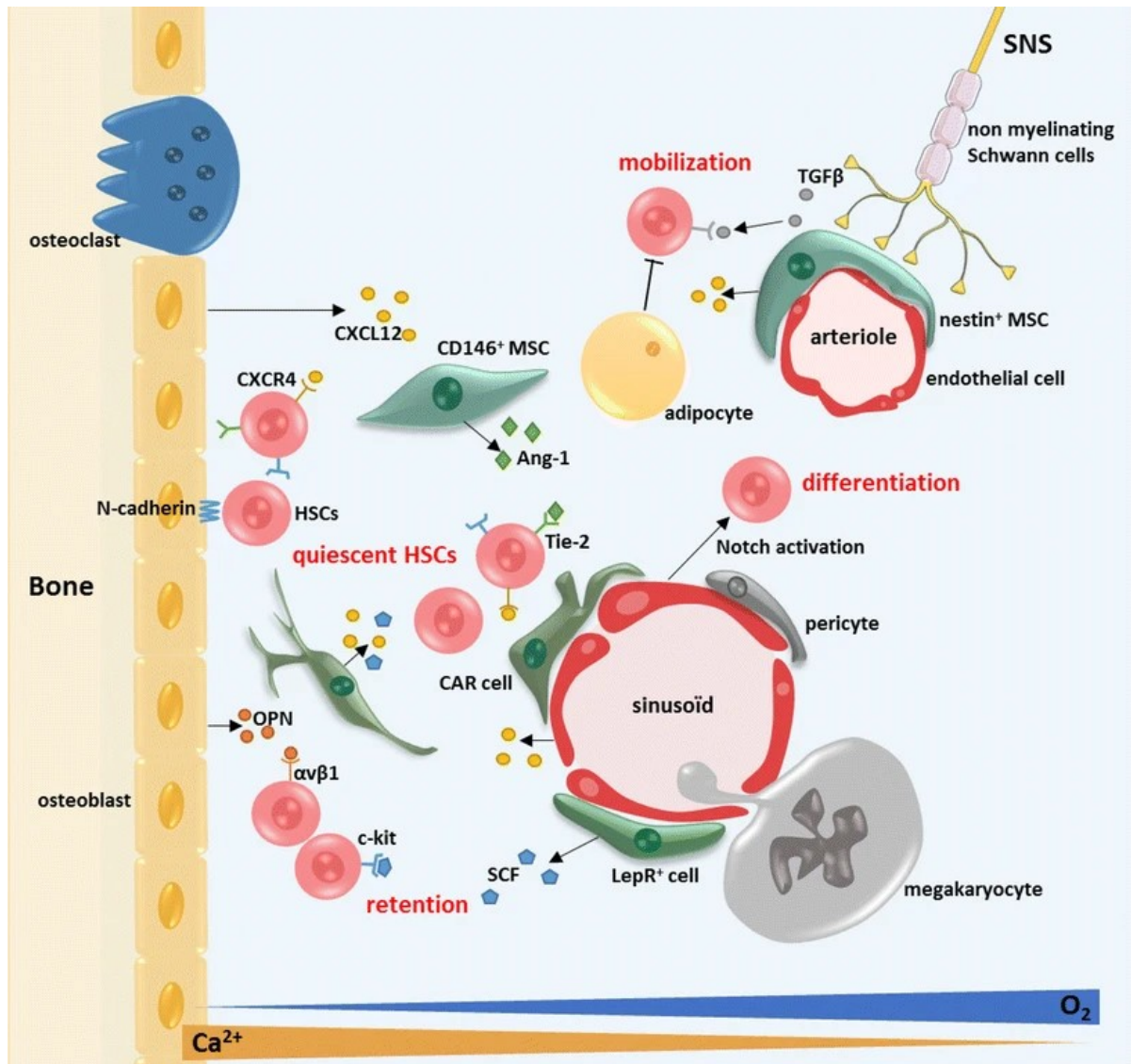


Figura 1. Microambiente midollare “normale”. Il destino delle CSE è regolato da uno specifico microambiente del BM: le nicchie. La nicchia endostale, vicina all’endostio, costituita da osteoblasti e osteoclasti. La nicchia vascolare, si trova nella zona centrale dell’osso, vicino alle sinusoidi. Diversi tipi di cellule compongono queste nicchie: CSM, cellule endoteliali, megacariociti, adipociti e il sistema nervoso simpatico. (M.Goulard)¹³

1.1 Nicchia endostale

La superficie endostale della nicchia è costituita da cellule che si allineano nell'interfaccia tra osso e midollo, a partire dal precursore più immaturo fino ad arrivare alle cellule più differenziate. All'interno di questo microambiente così eterogeneo, una matrice extracellulare ricca di glicoproteine e con una elevata concentrazione di calcio regola, insieme agli osteoblasti, *l'homing*, il mantenimento e la differenziazione delle CSE.

L'elevato contenuto minerale presente a livello osseo fa sì che la nicchia endostale sia un microambiente la cui concentrazione di ioni calcio può aumentare in caso di lesioni, infiammazione o rimodellamento osseo. Le CSE sono in grado di rispondere alla variazione della concentrazione di Ca^{2+} grazie alla presenza sulla membrana di un recettore (CaR) accoppiato ad una proteina G intracellulare che media tale risposta. Utilizzando modelli murini depleti del recettore CaR è stato dimostrato che gli animali sono in grado di produrre le CSE a livello epatico durante lo sviluppo embrionale; tuttavia, le cellule non sono in grado di raggiungere e colonizzare la superficie endostale del midollo. Questo modello ha contribuito a dimostrare come la risposta delle CSE alla concentrazione di Ca^{2+} sia coinvolta nell'establishment di una specifica nicchia endostale.

Studi a livello molecolare effettuati sugli osteoblasti hanno invece dimostrato che queste cellule possono produrre svariate molecole in grado di influenzare la regolazione delle CSE. Tra i fattori più rilevanti è opportuno citare la N-Caderina, una proteina trans-membrana espressa sia dagli osteoblasti che dalle CSE, responsabile dell'ancoraggio delle CSE alla nicchia.

Altre citochine stimolatorie prodotte dagli osteoblasti, ma anche da molte cellule del sangue sono di notevole importanza per il mantenimento dell'emopoiesi e la differenziazione delle CSE: G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), l'M-CSF (*Macrophage*), il GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage*), l'interleuchina 1 (IL-1) e l'interleuchina 6 (IL-6).

Tuttavia per una emopoiesi efficace e duratura è necessaria una corretta combinazione di fattori stimolatori e inibitori. Tra questi sono di rilevante importanza il TGF- β , (*Tumor Growth Factor β*), il LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) e il TNF- α e β (*Tumor Necrosis Factor*). È interessante notare come topi knockout per l'osteopontina (OPN), una proteina la cui espressione è specifica della nicchia endostale, presentino in vivo un numero di CSE in attiva divisione mitotica. Tale risultato suggerisce che questa proteina possa svolgere un ruolo importante nel mantenimento della quiescenza delle CSE.

In generale, la presenza di fattori inibitori fa sì che il pool delle CSE non si esaurisca con l'invecchiamento e possa garantire la continua produzione delle cellule mature del sangue. La simultanea presenza di fattori stimolatori ed inibitori è necessaria affinché all'interno della nicchia possano coesistere sia le CSE più indifferenziate e quiescenti con la capacità di ripopolare il midollo a lungo termine, sia gli elementi più maturi e proliferanti.¹⁴

1.2 Nicchia vascolare

È stato dimostrato che i sinusoidi midollari possono fungere da scaffold alternativo per la maturazione e la differenziazione delle CSE. Il termine “nicchia perivascolare” è stato originariamente utilizzato da Kopp e il suo gruppo nel 2005, per descrivere una regione anatomicamente e funzionalmente separata dalla nicchia endostale. La complessa struttura tridimensionale del midollo e la stretta associazione tra l'osso trabecolare e la rete microvascolare pone serie difficoltà alla reale identificazione di due nicchie separate.

Nel 1991 e nel 1992 due lavori di Tavassoli definirono le caratteristiche ultrastrutturali della nicchia midollare mostrando che i progenitori emopoietici più differenziati sembravano essere spazialmente più vicini ai sinusoidi midollari rispetto alle CSE più indifferenziate. Questi risultati suggerirono che l'interazione tra le CSE e la nicchia vascolare rappresenti uno step cruciale per la differenziazione emopoietica, Nel 2004, Avecilla e il suo Gruppo

dimostrarono, per la prima volta, come l'esposizione dei progenitori megacariocitari alle cellule endoteliali dei sinusoidi midollari promuovesse la trombopoiesi. Questi dati hanno supportato l'idea che la traslazione delle CSE verso la nicchia perivascolare fosse in grado di promuovere la maturazione e la differenziazione delle CSE. Gli Autori dimostrarono inoltre, che questo processo era principalmente mediato da due fattori chiamati CXCL-12 (*C-X-C Motif Chemokine Ligand-12*) o SDF1 (*Stromal Derived Factor 1*), e FGF-4 (*Fibroblast Growth Factor 4*), che erano in grado di aumentare nei megacariociti l'espressione di VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) e VLA-4 (*Very Late Antigen-4*) promuovendo la loro maturazione e il rilascio delle piastrine.

Le cellule endoteliali rivestono lo strato interno dei vasi, sono essenziali nel recupero emopoietico dopo radioterapia e trapianto di midollo, e possono supportare la differenziazione e la maturazione delle CSE in modelli in vitro. Questa stretta relazione esistente tra le CSE e le cellule endoteliali non è sorprendente vista l'origine embrionale dall'emoangioblasto.¹⁴

1.3 Cellule stromali mesenchimali (CSM)

Nel 1968 Friedenstein definisce le CSM, come una popolazione cellulare del midollo osseo, non ematopoietica e con potenziale differenziativo osteogenico. Trapianti sperimentali eterotipici, effettuati su modelli murini, hanno infatti dimostrato che queste cellule hanno la capacità di differenziare verso la linea osteogenica, cartilaginea e adipocitaria. In considerazione di questi risultati si ipotizza che all'interno della nicchia midollare possa risiedere un tipo di progenitori multipotenti non ematopoietici in grado di differenziare in diversi tessuti connettivi (tessuto osseo, cartilagineo e adiposo) derivanti dallo stesso progenitore embrionale comune.

Le CSM sono definite anche cellule reticolari avventiziali per la loro morfologia e per la loro caratteristica localizzazione. Queste cellule sono distribuite sia nella nicchia perivascolare, sulla superficie dei sinusoidi, sia nella nicchia endostale. Esse sono in contatto con le cellule del sangue e producono elevate quantità di CXCL-12 e Nestina, ed esprimono il recettore per la Leptina (LepR).

Nel 2006 Sugiyama definisce queste cellule come “*CXCL-12 Abundant Reticular cells*” (CAR) dimostrando l'importanza della loro interazione con il recettore CXCR-4, il quale è espresso sulla superficie delle cellule staminali emopoietiche. Infatti mentre la delezione di CXCL-12 negli osteoblasti non

influisce negativamente sulle CSE, quando la chemochina viene specificamente deleta, nelle CSM si osservano una diminuzione e una mobilizzazione delle CSE dal midollo. L'espressione di questa citochina viene indotta in risposta ad una ridotta emopoiesi, così da permettere la migrazione delle CSE verso l'area di interesse. CXCL-12 è infatti una citochina con proprietà chemiotattiche ed è essenziale per il mantenimento delle CSE nella nicchia.

Ulteriori dati a conferma del ruolo fondamentale delle CSM nel supporto dell'emopoiesi derivano da dati clinici e da esperimenti su modelli murini, che hanno dimostrato come il trapianto simultaneo di CSE e CSM porti a un miglior recupero emopoietico. Le CSM sono in grado di supportare l'emopoiesi sia attraverso meccanismi mediati dal contatto cellula-cellula, sia attraverso la secrezione di citochine e fattori di crescita come lo *Stem Cell Factor* (SCF), la trombopoietina, il LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), il TGF- β (*Tumor Necrosis Factor β*) l'IL-6, l'IL-8, l'IL-11, l'IL-12, l'IL-14, l'IL-15, il GM-CSF, l'M-CSF, e possono sintetizzare molecole di adesione e proteine della matrice extracellulare. L'insieme dei fattori secreti dalle CSM, al quale ci si riferisce con la parola "secretoma", è inoltre in grado di supportare processi rigenerativi in tessuti danneggiati. Il secretoma delle CSM, infatti, promuove processi

angiogenetici e allo stesso tempo riduce la frequenza di eventi apoptotici e di degenerazioni fibrotiche dei tessuti, durante i processi di guarigione.

Le CSM possiedono inoltre, anche proprietà immunomodulatorie. Se coltivate in vitro, queste cellule possono interagire e regolare la funzionalità delle cellule coinvolte nella risposta immunitaria primaria e secondaria, inibendo gli effetti mediati dalle proteine del complemento sulla proliferazione delle cellule mononucleate del sangue. È stato dimostrato che macrofagi M1 (fenotipo pro-infiammatorio), sotto l'influenza delle CSM si trasformano in macrofagi di tipo M2 (fenotipo anti-infiammatorio). L'effetto immunomodulatorio delle CSM è stato osservato anche su cellule T e cellule B, riducendo l'espressione di citochine e recettori pro-infiammatori sulla superficie di queste cellule. Questo rappresenta il razionale per l'attuale utilizzo clinico delle CSM nel setting del trapianto allogenico di CSE, per ridurre l'incidenza e la severità della malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), ed in altre malattie autoimmuni.

A causa della bassa frequenza delle CSM nel midollo (0,01-0,001% delle cellule totali), e a causa della mancanza di markers specifici per la loro identificazione, ancora poco è conosciuto riguardo le loro caratteristiche in vivo. La maggior parte dei dati sulle CSM deriva infatti da studi ex vivo, dove l'elevato potenziale proliferativo e la capacità di aderire alla plastica ne ha permesso l'isolamento e l'espansione in vitro. Ad oggi, diversi sono stati i

marcatori utilizzati per cercare di identificare uno specifico immunofenotipo delle CSM. Sono state utilizzate combinazioni di marker positivi (Stro-1, CD271, CD146, CD106, CD73, CD105, FZD9, SUSP2, LEPR, CD90) e negativi (CD44, CD31, CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79, CD19, HLA-DR), tuttavia nessuno di essi risulta specifico unicamente per le CSM. ¹⁴

1.4 Altre cellule presenti nella nicchia ematopoietica

Le cellule stromali mesenchimali e le cellule emopoietiche sono in stretto contatto con le cellule endoteliali nel BM. Diversi studi mostrano il ruolo chiave delle cellule endoteliali nella regolazione delle CSE nel microambiente. In un modello murino con interruzione di VEGFR2 (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e VE-caderina, è stato osservato un numero ridotto di HSPC, con cellule più differenziate.¹⁵ Una delezione della E-selectina sulla superficie delle cellule endoteliali promuove la quiescenza degli HSPC.¹⁶ Diversi altri tipi cellulari svolgono un ruolo importante nella regolazione del destino delle CSE nel microambiente midollare come i megacariociti, gli adipociti, i nervi del sistema nervoso simpatico e i macrofagi.

I megacariociti sono associati alla nicchia vascolare, e sono a stretto contatto con le CSE e ne regolano la proliferazione attraverso varie citochine (IGFBP-3, IGF-1). Essi ne regolano anche la loro quiescenza secernendo il fattore piastrinico 4 (PF4-CXCL4).^{17 18} In un modello murino, l'assenza di megacariociti porta a una perdita di quiescenza delle HSC migliorandone la differenziazione.¹⁸ Il ruolo dei megacariociti nel regolare la quiescenza delle HSC è anche mediato dal TGF β 1 contenuto nei loro granuli α insieme a PF4.¹⁹

Il tessuto adiposo nel BM ha un'origine mesenchimale.²⁰ Il ruolo delle cellule adipose riguardo l'omeostasi delle CSE nella loro nicchia è controverso. È

interessante notare che il numero di adipociti è inversamente proporzionale al numero di CSE e la loro diminuzione migliora l'attecchimento delle CSE.²¹ Uno studio recente ha dimostrato che le cellule adipose inibiscono l'emopoiesi e la rigenerazione del midollo osseo attraverso il rilascio di dipeptidil-peptidasi 4 (DPP4 o CD26), una proteina associata all'apoptosi e alla risposta immunitaria.²²

Il sistema nervoso simpatico (SNS) è implicato nella mobilitazione di CSE nel BM.²³ I neuroni nel BM sono terminali nervosi β -adrenergici.^{23 24} Il SNS è composto da cellule di Schwann non mielinizzanti che regolano la nicchia per attivazione di TGF β 1.²⁴ L'SNS regola l'espressione di CXCL12 da parte delle cellule del BMM perivascolari e al mantenimento delle HSC attraverso l'oscillazione circadiana.²⁵

I macrofagi sono stati descritti come elementi importanti del microambiente midollare. In un modello murino, la delezione delle cellule CD169+ (macrofagi) è dannosa.²⁶ I macrofagi esprimono anche CXCL12 e osteocalcina²⁷ e sono in grado di modulare l'espressione di CXCL12 da parte delle CSM^{26 27} portando al mantenimento delle CSE nella nicchia e per supportare la sopravvivenza degli osteoblasti.

L'uso del *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) diminuisce il numero di cellule osteoblastiche ed esaurisce i macrofagi nell'endostio²⁷, suggerendo che i macrofagi supportano gli osteoblasti nel mantenimento delle CSE.

2 NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE CRONICHE

2.1 *Introduzione, criteri diagnostici e stratificazione del rischio*

Secondo la vigente classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità del WHO del 2016 (WHO 2016), le Neoplasie Mieloproliferative sono un gruppo eterogeneo di disordini della cellula staminale ematopoietica comprendenti Leucemia Mieloide Cronica, *BCR-ABL1*-positiva (LMC); Policitemia Vera (PV); Trombocitemia Essenziale (TE); Mielofibrosi Primaria (PMF); Leucemia Neutrofila Cronica (LNC); Leucemia Eosinofila Cronica, non ulteriormente specificata (LEC); Mastocitosi; Neoplasie Mieloproliferative, non classificabili.

Gli aggiornamenti dei criteri diagnostici e dei fattori prognostici rispetto alla precedente classificazione WHO del 2008 sono stati doverosi a seguito dell'identificazione di alcuni markers molecolari che vengono esaminati tramite l'analisi del gene *expression profile* e l'utilizzo del *next generation sequencing*.²⁸

Come già detto le Neoplasie Mieloproliferative sono un gruppo eterogeneo di patologie clonale della cellula staminale emopoietica accumulate clinicamente da un andamento cronico, che si caratterizza per l'aumentata produzione di elementi maturi di una o più delle tre filiere emopoietiche fisiologiche – granulopoietica, megacariopoietica ed eritropoietica associato nella maggior

parte dei casi a un midollo ipercellulato per età all'esordio con effettiva maturazione e che si riflette con un aumento dei globuli bianchi, globuli rossi e/o piastrine all'esame emocromocitometrico di sangue periferico.

A partire dagli anni sessanta, l'individuazione del cromosoma Philadelphia da parte degli scienziati americani Peter Nowell e David Hungerford e della sua caratterizzazione nel 1972 da parte di Janet Rowley tramite l'individuazione della traslocazione reciproca tra il cromosoma 9 e il cromosoma 22; t(9;22) (q34;q11), che dà origine alla sequenza genica di fusione *BCR/ABL* ha permesso la distinzione storica della Leucemia Mieloide Cronica dalle altre Neoplasie Mieloproliferative (denominate per l'appunto Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative).²⁹

Alle Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia-negative (MPN Ph-), PV, TE e PMF, è mancato un marcatore genetico comune e patognomonico sino ai recenti studi che mostrano la complessità della patogenesi molecolare di queste patologie rispetto alla LMC. Attualmente, sono state identificate tre driver founding mutations a carico dei geni *JAK2*, *MPL* e *CALR*, e numerose altre alterazioni genetiche, alcune delle quali dotate di un importante significato prognostico.³⁰

Le malattie mieloproliferative croniche Ph- sono patologie rare, che possono colpire ogni fascia di età, ma gli studi stanno mostrando una incidenza

crescente.

L'incidenza in Europa è stimata pari a 1.8 casi/100.000 persone-anno; in dettaglio, l'incidenza della PV varia fra 0.4 e 2.8 casi/100.000 abitanti per anno; l'incidenza della TE varia fra 0.38 e 1.7 casi/100.000 abitanti per anno e l'incidenza della PMF varia fra 0.1 e 1 casi/100.000 abitanti per anno. Studi epidemiologici su ampie popolazioni hanno mostrato che i pazienti affetti da Policitemia Vera hanno una età media di diagnosi di 60 anni, mentre la patologia sembra essere estremamente rara sotto i 30 anni e nei bambini e presenta una incidenza maggiore nel sesso maschile (M:F = 1.2:1); la Trombocitemia Essenziale colpisce generalmente pazienti di età superiore ai 50 anni, ma presenta un picco di incidenza fra le giovani donne, intorno ai 30 anni mentre i pazienti con Mielofibrosi Primaria hanno una età media più avanzata intorno ai 70 anni, la frequenza cresce con l'avanzare dell'età, senza apparenti differenze di sesso ³¹.

In aggiunta a queste, la categoria nosologica della Mielofibrosi Prefibrotica è stata introdotta dalla WHO 2001³², contraddistinta a livello midollare da un quadro istopatologico peculiare: presenza di anomalie citologiche a carico della linea megacariocitaria e di alterazioni quantitative della cellularità midollare con iperplasia della linea granulopoietica, in assenza di significativa fibrosi.

La Mielofibrosi Prefibrotica continua ad essere oggetto di studio in quanto

presenta sia dal punto di vista clinico che dal punto di vista terapeutico-gestionale tratti comuni, tra le diverse Neoplasie Mieloproliferative, soprattutto con la Trombocitemia Essenziale; mentre dal punto di vista prognostico alcuni studi sembrano concludere con l'esistenza di una differenza in termini prognostici tra queste due categorie.^{33,34}

Di seguito sono elencati i criteri diagnostici secondo la vigente classificazione WHO 2016.

Criteri WHO 2016 per la diagnosi di Policitemia Vera

Criteri maggiori:

- Hb >16,5 g/dl (uomo), >16 g/dl (donna) o Hct >49% (uomo), >48% (donna), altra evidenza di aumentata massa eritrocitaria;
- Aumentata cellularità midollare con iperplasia trilineare con megacariociti pleomorfici, maturi*;
- Presenza della mutazione V617F del gene *JAK2* o altre mutazioni analoghe, quali quelle a carico dell'esone 12.

Criteri minori:

- Livelli sierici di eritropoietina inferiori al limite inferiore di norma.

**La Biopsia osteomidollare non è richiesta nei casi di eritrocitosi assoluta persistente: Hb>18,5 g/dl negli uomini (Hct = 55,5%) o Hb>16,5 g/dl nelle*

donne (Hct =49,5%) e in presenza dei tre criteri maggiori e di quello minore. Nonostante ciò, la presenza di una iniziale mielofibrosi (presente in più del 20% dei pazienti) può essere determinata esclusivamente con la procedura di biopsia osteomidollare nonchè dato predittivo di aumento del rischio di progressione di malattia in Mielofibrosi (MF post-PV)

Per porre diagnosi di PV è necessario che siano soddisfatti i tre criteri maggiori o i primi due criteri maggiori ed il criterio minore.

Criteri WHO 2016 per la diagnosi di Trombocitemia Essenziale

Criteri maggiori:

- Conta piastrinica superiore o uguale a 450.000/ μ l;
- Proliferazione prominente della linea megacariocitaria allo studio bioptico midollare, con megacariociti di grandi dimensioni e morfologia matura con nuclei iper lobulati. Non significativo aumento di granulopoiesi neutrofila o di eritropoiesi e, molto raramente, minima fibrosi midollare (grado 1);
- Assenza dei criteri diagnostici per Policitemia Vera, Mielofibrosi Primaria, Leucemia Mieloide Cronica *BCR-ABL1+*, Sindrome Mielodisplastica o altra neoplasia mieloide;
- Presenza di mutazione di *JAK2*, *CALR* o *MPL*

Criteri minori:

- Presenza di un marker clonale o assenza di piastrinosi reattiva

Per porre diagnosi di Trombocitemia Essenziale è necessario che siano soddisfatti tutti e quattro i criteri maggiori o i primi tre criteri maggiori ed il criterio minore.

Criteri WHO 2016 per la diagnosi di Mielofibrosi Prefibrotica (prePMF)

Criteri maggiori:

- Biopsia midollare mostrante proliferazione megacariocitaria e atipia senza fibrosi > grado 1, con incremento della cellularità midollare, proliferazione granulocitaria e, spesso, riduzione dell'eritropoiesi;
- Assenza dei criteri diagnostici per Policitemia Vera, Trombocitemia Essenziale, Leucemia Mieloide Cronica *BCR-ABL1+*, Sindrome Mielodisplastica o altra neoplasia mieloide;
- Presenza di mutazione di *JAK2*, *CALR* o *MPL*, in loro assenza, presenza di altro marker clonale o esclusione delle forme di fibrosi midollare reattiva.

Criteri minori (presenza di almeno uno dei seguenti criteri, confermato in due determinazioni consecutive):

- Anemia non attribuibile a comorbidità;
- Leucocitosi superiore o pari a 11.000/mmc;
- Splenomegalia palpabile;
- Incremento del livello di LDH sierico.

Per la diagnosi è necessaria la presenza dei tre criteri maggiori e di almeno un criterio minore.

Criteri WHO 2016 per la diagnosi di Mielofibrosi Primaria

Criteri maggiori:

- Proliferazione megacariocitaria con atipie, accompagnata da fibrosi reticolinica e/o collagene di grado 2 o 3;
- Assenza dei criteri diagnostici per Policitemia Vera, Trombocitemia Essenziale, Leucemia Mieloide Cronica *BCR-ABL1+*, Sindrome Mielodisplastica o altra neoplasia mieloide;
- Presenza di mutazione di *JAK2*, *CALR* o *MPL* o, in assenza di questi, di altro marcatore clonale; se assenti, esclusione delle forme di fibrosi midollare reattiva.

Criteri minori (presenza di almeno uno dei criteri seguenti, confermato in due determinazioni consecutive):

- Anemia non attribuibile a comorbidità;
- Leucocitosi superiore o pari a 11.000/mmc;
- Splenomegalia palpabile;
- Incremento del livello di LDH sierico;
- Leucoeritroblastosi.

Per la diagnosi è necessaria la presenza dei tre criteri maggiori e di almeno un criterio minore.

I criteri per una diagnosi corretta e riproducibile di Mielofibrosi post-PV o post-TE sono stati stilati dall'International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment nel 2008, e constano di parametri clinici e laboratoristici, che affiancano il dato istopatologico di aumentata fibrosi midollare.³⁵

Criteri WHO 2008 per la diagnosi di Mielofibrosi Post- Policitemia Vera

Criteri maggiori:

- Documentazione di precedente diagnosi di Policitemia Vera, definita secondo i criteri WHO 2008;

- Fibrosi a livello midollare di grado 2 o 3 (con scala 0-3) o di grado 3-4 (con scala 0-4);

Criteri minori (presenza di almeno due dei criteri seguenti):

- Anemia o perdita della necessità di salasso terapia per il controllo dell'ematocrito in assenza di terapia citoriduttiva;
- Leucoeritroblastosi nel sangue periferico;
- Aumento della splenomegalia inteso come splenomegalia palpabile ≥ 5 cm dal margine inferiore dell'arcata costale o nuovo riscontro di splenomegalia palpabile;
- Sviluppo di ≥ 1 sintomi sistemici (calo ponderale $\geq 10\%$ del peso corporeo in 6 mesi, sudorazioni notturne, febbre non altrimenti spiegabile $\geq 37,5$ °C)

Per la diagnosi è necessaria la presenza dei due criteri maggiori e di almeno due criteri minori.

Criteri WHO 2008 per la diagnosi di Mielofibrosi Post-Trombocitemia essenziale

Criteri maggiori:

- Documentazione di precedente diagnosi di Trombocitemia essenziale, definita secondo i criteri WHO 2008;

- Fibrosi a livello midollare di grado 2 o 3 (con scala 0-3) o di grado 3-4 (con scala 0-4);

Criteri minori (presenza di almeno due dei criteri seguenti):

- Anemia e perdita di Hb ≥ 2 g/dl rispetto al livello basale di Hb;
- Leucoeritroblastosi nel sangue periferico;
- Aumento della splenomegalia inteso come splenomegalia palpabile ≥ 5 cm dal margine inferiore dell'arcata costale o nuovo riscontro di splenomegalia palpabile;
- Sviluppo di ≥ 1 sintomi sistemici (calo ponderale $\geq 10\%$ del peso corporeo in 6 mesi, sudorazioni notturne, febbre non altrimenti spiegabile $\geq 37,5$ °C)
- Aumento del livello di LDH sierico.

Per la diagnosi è necessaria la presenza dei due criteri maggiori e di almeno due criteri minori.

Le Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative presentano intrinseci nella loro storia naturale due principali tipi di rischio: il rischio evolutivo sia in senso mielofibrotico sia in senso leucemico, in particolare dopo anni di storia di malattia; e il rischio vascolare sia in senso trombotico venoso e arterioso, sia

in termini di eventi emorragici, sia all'esordio di malattia che durante il follow up.

L'evoluzione leucemica stimata a venti anni è, invece, inferiore al 10% per i pazienti con PV e pari al 5% per i pazienti con TE^{36,37}; tassi più elevati caratterizzano, invece, i casi di mielofibrosi, con sensibili differenze fra le singole categorie prognostiche.

Studi su ampie casistiche hanno riportato tassi di prevalenza per eventi trombotici maggiori alla diagnosi variabili fra il 34 e il 39% per i pazienti con PV e variabili fra il 10 e il 29% per i pazienti con TE; la prevalenza di eventi trombotici durante il follow-up, invece, si è attestata fra l'8 e il 19% per i casi di PV e fra l'8 e il 31% per i casi di TE.³⁸

Ad eccezione del trapianto allogenico di cellule staminali, non si dispongono attualmente di terapie capaci di garantire la guarigione di queste patologie e la gestione dei pazienti con Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative è mirata a ridurre il rischio vascolare. La procedura trapiantologica ha un peculiare profilo di tossicità, nonché una mortalità trapianto-relata non irrilevante e i criteri di eleggibilità al trapianto allogenico spesso escludono questa possibilità ai pazienti, vista ad esempio l'età mediana di presentazione della patologia mieloproliferativa cronica. Per questa ragione gli attuali

interventi terapeutici in pazienti affetti da MPN hanno come obiettivo primario quello di ridurre il rischio di sviluppare un evento vascolare, cercando allo stesso tempo di minimizzare l'intrinseco rischio evolutivo.

Le scelte terapeutiche relative ai pazienti affetti da MPN vengono ad oggi prese in accordo con le raccomandazioni presenti all'interno delle linee guida dell'European Leukemia Network, pubblicate nel 2011 e poi aggiornate nel 2018.^{39,40}

Sulla base dei suddetti fattori di rischio, i pazienti con TE o con PV vengono considerati a basso rischio, quando non presentano nessuna delle caratteristiche ad alto rischio (età > 60 anni e pregressi eventi trombotici), e ad alto rischio, in presenza di almeno una delle variabili.

La Mielofibrosi è una patologia caratterizzata da una maggiore complessità sia sul piano biologico che su quello clinico-assistenziale, con sopravvivenze variabili dai 19 anni a meno di 5 anni; la stratificazione prognostica dei pazienti affetti da questa patologia è stata ed è, parallelamente, più articolata.

In particolare dal punti di vista molecolare, la presenza contestuale di più di una delle mutazioni ad alto rischio dette HMR (*ASXL1*, *EZH2*, *SRS2*, *IDH1* e *IDH2*) è stata dimostrata avere un impatto sia sull'evoluzione leucemica che sulla sopravvivenza (con una mediana di 2.6 anni in presenza di 2 o più

mutazioni, di 7 anni in presenza di una mutazione, e di 12.3 anni in assenza di mutazioni. (*Figura 2*)⁴¹

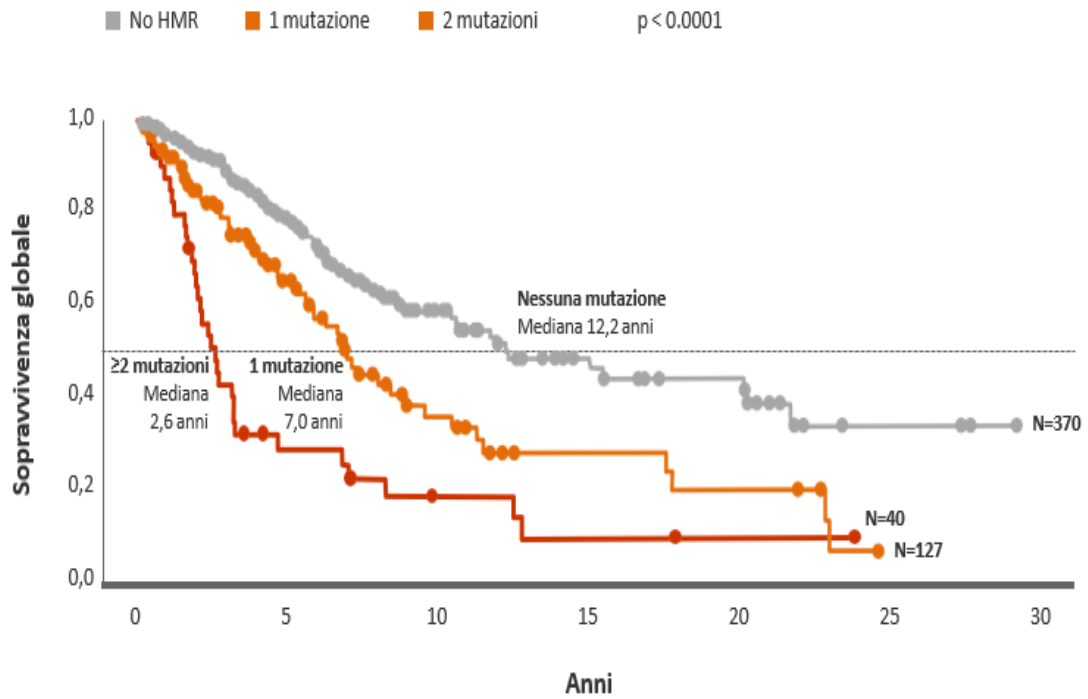


Figura 2. Sopravvivenza globale in base al numero delle mutazioni ad alto rischio molecolare (modificato da Guglielmelli et al. *Leukemia* 2014)⁴¹.

Tutti gli score prognostici applicabili a pazienti affetti da Mielofibrosi a confronto sono riportanti nella *figura 3*.

Prognostic Model	Risk Groups and Clinical Relevance
International Prognostic Scoring System (IPSS) [45] IPSS estimates survival at the time of diagnosis.	
Risk factors (weight):	
<ul style="list-style-type: none"> • Age >65 years (1 point) • Constitutional symptoms (1 point) • Hemoglobin <10 g/dL (1 point) • WBC count >25 × 10⁹/L (1 point) • Circulating blasts ≥1% (1 point) 	Low risk: 0 (median survival 11.3 years) Intermediate-1 risk: 1 point (7.9 years) Intermediate-2 risk: 2 points (4.0 years) High risk: ≥3 points (2.3 years)
Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) [46] DIPSS can be applied anytime during clinical course.	
Risk factors (weight):	
<ul style="list-style-type: none"> • Age >65 years (1 point) • Constitutional symptoms (1 point) • Hemoglobin <10 g/dL (2 points) • WBC count >25 × 10⁹/L (1 point) • Circulating blasts ≥1% (1 point) 	Low risk: 0 (median survival: not reached) Intermediate-1 risk: 1 point (14.2 years) Intermediate-2 risk: 2 points (4.0 years) High risk: ≥3 points (1.5 years)
DIPSS-plus [47] DIPSS-plus can be applied anytime during the clinical course.	
Risk factors (weight):	
<ul style="list-style-type: none"> • DIPSS score (DIPSS low = 0, DIPSS int-1 = 1 point, DIPSS int-2 = 2 points, DIPSS high = 3 points) • RBC transfusion need (1 point) • PLT count <100 × 10⁹/L (1 point) • Unfavorable karyotype (1 point) 	Low risk: 0 (median survival: 15.4 years) Intermediate-1 risk: 1 point (6.5 years) Intermediate-2 risk: 2 points (2.9 years) High risk: ≥3 points (1.3 years)
MIPSS70 [55] MIPSS70 is used to better select patients <70 years as candidates for allogeneic stem cell transplantation.	
Risk factors (weight):	
<ul style="list-style-type: none"> • One HMR mutation (1 point) • ≥2 HMR mutation (2 points) • Type 1/like CALR absent (1 point) • Hb <10 g/L (1 point) • WBC > 25 × 10⁹/L (2 points) • PLT count <100 × 10⁹/L (2 points) • Circulating blasts ≥2% (1 point) • Constitutional symptoms (1 point) • Bone marrow fibrosis ≥2 (1 point) 	Low risk: 0–1 points (median survival: 27.7 years) Intermediate risk: 2–4 points (7.1 years) High risk: ≥5 points (2.3 years)
Prognostic Model	Risk Groups and Clinical Relevance
MIPSS70+ version 2.0 [57] MIPSS70+ version 2.0 incorporates the revised cytogenetic risk levels, U2AF1Q157 as an additional HMR mutation, and new sex- and severity-adjusted hemoglobin thresholds.	
Risk factors (weight):	
<ul style="list-style-type: none"> • VHR karyotype (4 points) • Unfavorable karyotype (3 points) • ≥2 HMR mutation (3 points) • One HMR mutation (2 points) • Type 1/like CALR absent (2 points) • Severe anemia (2 points) • Moderate anemia (1 point) • Circulating blasts ≥2% (1 point) • Constitutional symptoms (2 points) 	Very low risk: 0 (median survival: not reached) Low risk: 1–2 points (16.4 years) Intermediate risk: 3–4 points (7.7 years) High risk: 5–8 points (4.1 years) Very high risk: ≥9 points (1.8 years)
GIPSS [59] GIPSS may be useful in early-stage patients because it can predict outcomes in the absence of clinical signs of progressive disease.	
Risk factors (weight):	
<ul style="list-style-type: none"> • VHR karyotype (2 points) • Unfavorable karyotype (1 point) • Type 1/like CALR absent (1 point) • ASXL1 mutation (1 point) • SRSF2 mutation (1 point) • U2AF1Q157 mutation (1 point) 	Low risk: 0 (median survival: 26.4 years) Intermediate-1 risk: 1 point (8 years) Intermediate-2 risk: 2 points (4.2 years) High risk: ≥3 points (2 years)

Figura 3. Score prognostici per pazienti affetti da Mielofibrosi e relative sopravvivenze per classe di rischio.

2.2 Basi molecolari delle Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative

Le conoscenze riguardo le basi molecolari delle Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative hanno come cardine l'identificazione nel 2005 della mutazione puntiforme V617F del gene *JAK2* da parte di quattro gruppi di ricercatori. Tali studi hanno determinato il primo grande passo verso la comprensione della patogenesi molecolare delle MPN Ph negative.⁴²⁻⁴⁵

Il gene *JAK2* codifica per una proteina tirosinchinasi non recettoriale (Janus Kinase 2), fondamentale nella via di trasduzione del segnale mediato dai recettori delle citochine, che non possiede un'attività catalitica intrinseca ma utilizza effettori proteici intracellulari. In condizioni fisiologiche, il legame del ligando al recettore ne determina una modifica conformazionale e ciò porta all'attivazione costitutiva dell'attività tirosinochinasica delle molecole di JAK associate con la porzione intracellulare del recettore stesso. A seguire, si attivano più vie metaboliche intracellulari, incluse quella mediata dai fattori di trascrizione STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), la via delle MAP chinasi e la via della fosfatidilinositolo-3-fosfato chinasi/AKT.

La mutazione puntiforme a livello dell'esone 14 del gene *JAK2* e in particolare di una singola sostituzione nucleotidica G>T in posizione 1849, con

conseguente sostituzione dell'aminoacido valina con l'aminoacido fenilalanina al residuo 617 (V617F) è la *driver founding mutation* con incidenza maggiore nelle Neoplasie Mieloproliferative, presente in più del 95% dei pazienti con PV e nel 50-60% dei pazienti affetti da TE e PMF.⁴²⁻⁴⁴

Sempre a carico del gene *JAK2* sono state, in seguito, riportate ulteriori mutazioni, sia inserzioni che delezioni, principalmente nell'esone 12 di questo gene, con analogo significato funzionale di attivazione. Tali alterazioni forniscono la base genetica per la piccola porzione di pazienti con Policitemia Vera (meno del 5%) che non presentano la classica mutazione V617F.⁴⁶ La prognosi dei pazienti con PV che presentano mutazioni a carico dell'esone 12 di *JAK2* non sembra essere dissimile a quelli con la classica mutazione V617F.⁴⁷

Nel 2006 è stato compiuto un ulteriore passo in avanti nella conoscenza delle basi molecolari delle Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative grazie all'individuazione di mutazioni a carico dell'esone 10 del gene *MPL*, che codifica per il recettore della trombopoietina, in una piccola quota di pazienti con TE (3-5%) e con PMF (8-11%).^{48,49} Anche le mutazioni di *MPL*, così come quelle di *JAK2*, comportano un *gain of function* ed esplicano la loro azione mediante un'attivazione della via di segnalazione intracellulare JAK-STAT.^{48,50} Quelle che vengono riscontrate più frequentemente sono la W515L e la

W515K^{50,51} ma occasionalmente altri codoni possono essere interessati, come accade ad esempio nel caso della mutazione S505N, che si riscontra sia in casi sporadici di neoplasia mieloproliferativa, come mutazione acquisita, sia in casi di Trombocitosi Ereditaria, come mutazione *germline*.⁵²

È stata riscontrata una associazione fra lo stato omozigote per la mutazione di *MPL* (in seguito a fenomeni di *copy neutral loss of heterozigosity*, CN-LOH) ed un incremento della fibrosi midollare.⁵³

Nonostante tali avanzamenti scientifici e gli sforzi compiuti negli anni successivi, una quota non trascurabile di pazienti, circa il 40% dei casi di TE e PMF, è rimasta priva di un marcatore genetico noto, fino al dicembre 2013, quando due gruppi di ricercatori hanno evidenziato in modo indipendente, grazie a tecniche di *whole-exome sequencing*, la presenza di mutazioni somatiche ricorrenti nel gene *CALR* in gran parte dei pazienti con TE e PMF che non presentavano mutazioni a carico di *JAK2* o *MPL*.^{54,55}

Fin dalle prime osservazioni è risultato evidente come le mutazioni di *CALR* fossero altamente specifiche per questa categoria e il gene *CALR* è risultato il secondo per frequenza di mutazione nel campo delle Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative, dopo il gene *JAK2*.

Pur essendo state evidenziati ad oggi più di 50 sottotipi di mutazione di *CALR*, circa l'85% dei pazienti presenta uno dei due sottotipi più frequenti:

- Mutazione di tipo 1: una delezione di 52 paia di basi (c.1099_1150del; L367fs*46; responsabile del 44%–53% dei casi);
- Mutazione di tipo 2, un'inserzione di 5 paia di basi (c.1154_1155insTTGTC; K385fs*47; responsabile del 32%–42% dei casi). (*Figura 4*)

Il rimanente 15% dei casi è rappresentato da altre inserzioni e delezioni o da una combinazione dei due eventi genetici, presenti spesso in un numero particolarmente esiguo di pazienti.⁵⁶

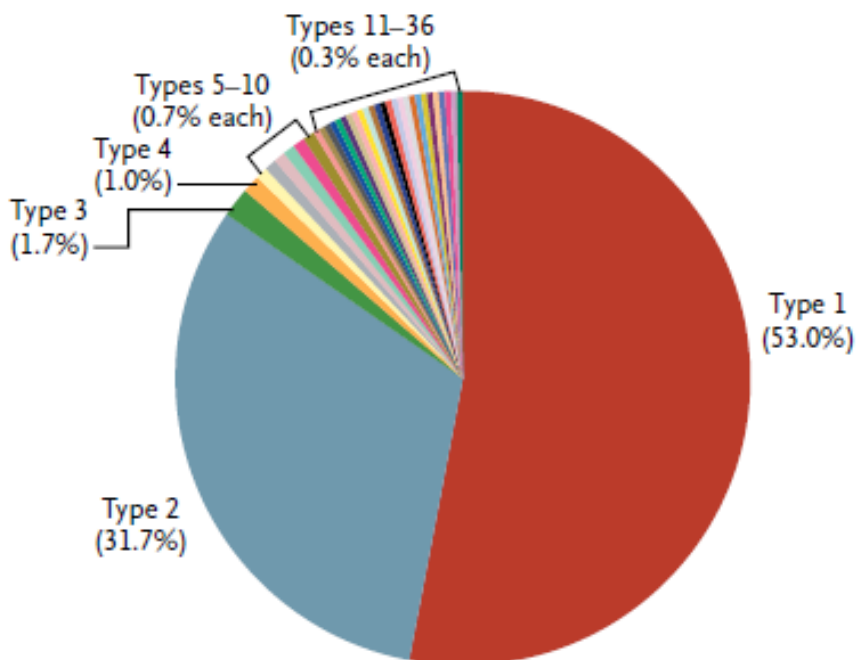


Figura 4. Frequenza delle 36 differenti mutazioni identificate del gene *CALR* nel 2013 ((Klampfl et al)⁵⁴)

Le mutazioni somatiche di *JAK2*, *MPL* e *CALR* si presentano come eventi genetici mutualmente esclusivi nella quasi totalità dei casi e si comportano come *driver founding mutations*, in quanto determinano un vantaggio selettivo sia in termini di sopravvivenza che di capacità replicative della cellula, conferendole capacità di autorinnovamento e portando così alla formazione di un clone mutato. (Figura 5)

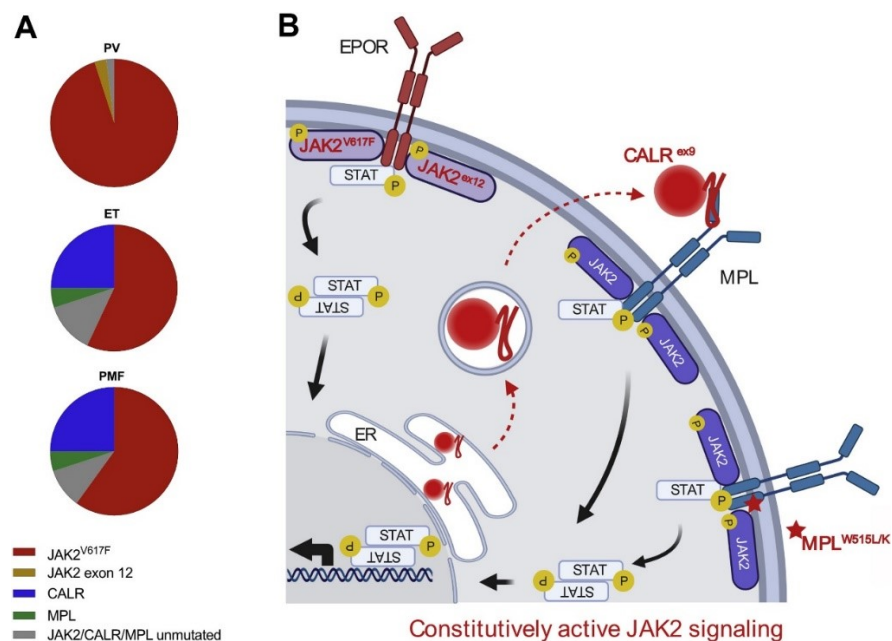


Figura 5. Mutazioni somatiche driver nelle MPN che attivano il segnale JAK-STAT. (A) Frequenza delle mutazioni driver founding nelle patologie MPN, PV, TE, e PMF. (B) la mutazione V617F del gene *JAK2* si associa a EPO-R e MPL in tutti i sottotipi di MPN. Le mutazioni nell'esone 12 del gene *JAK2* si associa esclusivamente a EPO-R nelle PV. Le mutazioni *CALR* si trovano nell'esone 9 e si presentano in TE e PMF. Mutazioni di *MPL* sono a carico dell'esone 10 come mutazioni missenso soprattutto del residuo W515 e si trovano in pazienti con TE e PMF. Le tre mutazioni driver somatiche (*JAK2*, *CALR* e *MPL*) convergono nella attivazione costitutiva del pathway di signaling JAK2-STAT. (Szybinski, 2021)⁵⁷

Questo non implica che le tre suddette mutazioni costituiscano il primo evento genetico somatico nella patogenesi delle MPN, come testimoniato da alcuni studi che hanno mostrato anche mutazioni a carico di altri geni, quali ad esempio *TET2*. Queste mutazioni possono pertanto precedere l'acquisizione della mutazione di *JAK2* e l'ordine di acquisizione delle diverse mutazioni sembrerebbe influenzare il fenotipo clinico dei pazienti, andando a determinare la spiccata eterogeneità tipica di queste entità nosologiche, anche a fronte della medesima founding mutation.⁵⁸ Lo scenario patogenetico delle Neoplasie Mieloproliferative è ulteriormente complicato dalla presenza di eventi mutazionali addizionali, che possono affiancare le sopracitate *driver mutations*, talvolta precedendole, come già evidenziato; i geni interessati sono quelli coinvolti nella regolazione epigenetica della trascrizione o nei processi di splicing (*SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*).³⁰ (**Figura 6**)

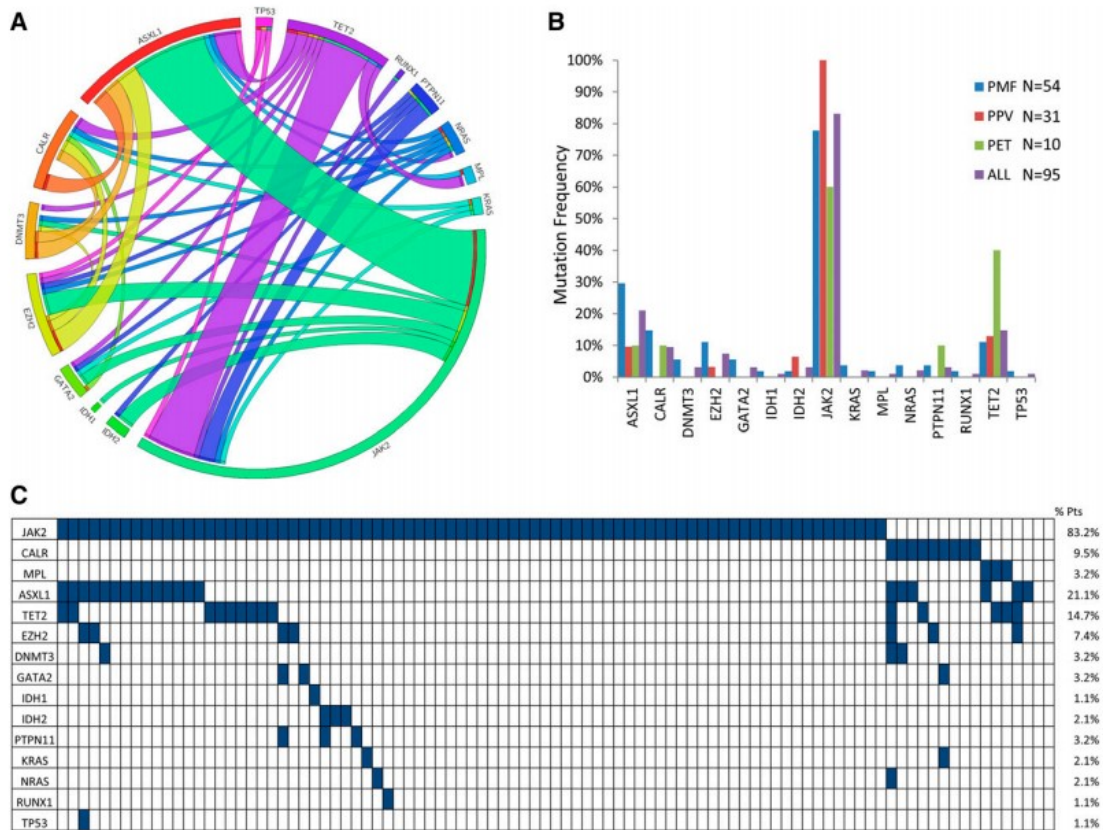


Figura 6. Frequenza e distribuzione delle mutazioni. (Patel, Blood 2015)⁵⁹

Le principali mutazioni ritrovate sono:

- regolatori epigenetici che coinvolgono la metilazione del DNA (DNMT3A) e la demetilazione (TET2);
- modificatori dell'attività istonica relati al complesso PRC2 (EZH2, ASXL1);
- fattori coinvolti nello splicing dell'RNA (SRSF2, U2AF1, SF3B1, ZRSR2).

- Le mutazioni IDH1 and IDH2 portano a un accumulo intracellulare del metabolita 2-idrossiglutarato al posto dell'alfa-chetoglutarato, interferendo con l'azione di TET2.
- Si trovano mutati anche i fattori attivatori (RAS) o regolatori (CBL, LNK/SH2B3) il segnale intracellulare che sono coinvolti nella regolazione della trascrizione/ riparo del DNA (TP53).

Mutazioni di ASXL1, EZH2, IDH1/2 e SRSF2 vengono considerate ad alto rischio molecolare (HMR), conferendo una peggiore prognosi e le mutazioni di TP53, IDH1/2, and SRSF2 sono coinvolte nella forma blastica delle MPN.⁶⁰

2.3 Microambiente midollare nei pazienti con patologie mieloidi

Nelle neoplasie mieloidi acute e croniche, il *cross-talk* delle cellule mieloidi neoplastiche con il BMM svolge un ruolo importante nella progressione della malattia. Nei pazienti con neoplasia mieloide, ci sono modificazioni morfologiche del BMM: ad esempio, in pazienti con AML (Leucemia Mieloide Acuta) e MDS (Sindromi mielodisplastiche) si osserva un aumento dell'angiogenesi o una fibrosi midollare si può riscontrare in pazienti con MPN Ph negativi e in pazienti con MDS.^{61,62,63}

Una compromissione della vascolarizzazione è stata osservata anche nel modello AML-PDX.⁶⁴

Nei pazienti con neoplasie mieloidi, una possibilità di approcciarsi alle alterazioni del BMM è quella di isolare e studiare le CSM. Infatti, diversi studi suggeriscono che le modificazioni funzionali delle CSM siano correlate alla storia naturale di malattie mieloidi come AML, MDS, MPN Ph negative e CML.^{61 62}

Il rimodellamento del BMM è particolarmente visibile nelle biopsie BM dei pazienti con MPN pre-fibrotiche: le cellule CD271+ diminuiscono nelle nicchie endostale e vascolare e sono associate a megacariociti displastici.⁶³

È interessante notare che è stata segnalata una riduzione del numero di fibre nervose simpatiche associate alle CSM nel BM dei pazienti con MPN.⁶⁴

Pochi studi si sono focalizzati sul comportamento delle MPN-CSM in vitro. Martinaud et al mostrano capacità clonogeniche e di supporto all'emopoiesi delle MPN-CSM identiche a quelle normali e un aumento della capacità differenziativa delle PMF-CSM in osteoblasti, in vitro, e di mineralizzare se iniettate per via sottocutanea rispetto alle normali CSM e anche alle CSM derivate da pazienti PV ed ET.⁶⁵ Questa capacità è associata a una sovra-regolazione dell'espressione di Runx2, Dlx5, OPN.

Due studi su pazienti con PV riportano un'inibizione delle CSM verso gli inibitori di JAK2 portando a una diminuzione dell'apoptosi delle cellule mutate.^{66,67} Nei pazienti con PMF, JAK2^{V617F} attiva il complesso CXCL12/CXCR4 tramite la via PI3K e aumenta la chemiotassi delle cellule ematopoietiche.⁶⁷

Le CSE di pazienti PV sovra-esprimono citochine fibrogeniche e infiammatorie come TGF- β 1 e BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*), che stimolano la via di differenziazione osteogenica.^{65 68} L'espressione di CD9 (tetraspanina 29), nota per essere implicata nell'interazione delle CSE con lo stroma, diminuisce

sulla superficie delle cellule CD34+ nei pazienti con PMF, essendo inversamente correlata alla fibrosi.⁶⁹

In uno studio che utilizza un modello di coltura in vitro 3D, viene riportato che le MPN-CSM hanno una capacità ridotta di supportare le CSE e che le ET-CSM produrrebbero livelli inferiori di G-CSF e IL-17. In questo studio, gli autori hanno anche riportato un aumento della deposizione di fibronectina da parte delle MPN-CSM e lo hanno confermato mediante microarray tissutali di biopsie MPN-BM pre-fibrotiche⁶⁷.

Ci sono pochissimi studi sulle CML-CSE e sul loro ruolo nella CML BMM.

La maggior parte degli studi è stata condotta con linee cellulari stromali. È stato riportato che le CML-CSM hanno un ruolo protettivo sulle CSE in vitro diminuendo la loro apoptosi⁷⁰, questo ruolo è mediato dall'asse CXCR4/CXCL12⁶⁹. Uno studio ha riportato la presenza della stessa aberrazione genetica, il BCR-ABL, sia nel clone neoplastico che nelle cellule endoteliali, suggerendo che l'evento molecolare potesse essersi verificato a livello più precoce della differenziazione, negli emangioblasti.⁷¹ (*Figura 7*)

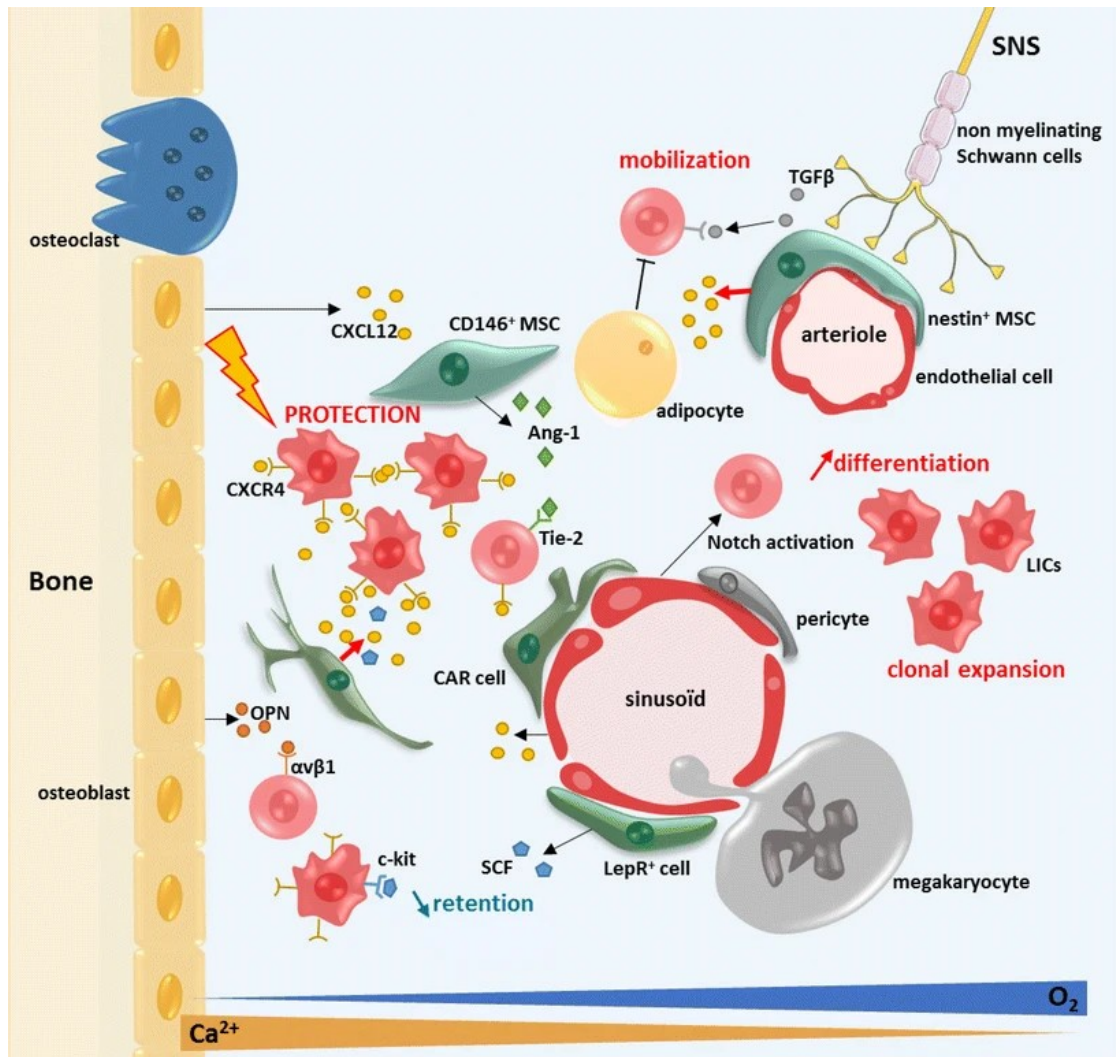


Figura 7. Microambiente midollare in pazienti con patologie mieloidi. Il BMM conferisce un ambiente protettivo dall'apoptosi per le cellule leucemiche iniziali (LIC) tramite l'asse CXCR4/CXCL12. CXCR4 è altamente espresso sulla superficie di LIC e CXCL12 è altamente espressa dalle CSM.¹³

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro è quello di studiare le caratteristiche specifiche delle cellule stromali mesenchimali (CSM), il loro contributo alla risposta infiammatoria e sulla selezione dei cloni maligni nelle patologie mieloidi croniche.

Alla base del progetto c'è l'idea che un iniziale stimolo infiammatorio dalle cellule staminali mieloidi provochi l'attivazione delle CSM; le cellule CSM così attivate mantengono la *myeloid-derived* infiammazione e regolano l'espansione delle cellule T regolatorie portando a un conseguente stato di immunosoppressione.⁷²

Quindi si sono confrontate il fenotipo e la funzionalità di CSM di pazienti affetti da MPN, con le CSM di donatori normali, poi sono state allestite delle co-culture con le CMN dei pazienti e con le CSM dei donatori e degli stessi pazienti per verificare se le differenti popolazioni di CSM, normali e patologiche potessero influire sull'evoluzione leucemica di queste patologie.

Parte del progetto sarà anche lo studio delle interazioni delle CSM-CSE con i T-Reg normali e del paziente per verificare un possibile ripristino della normale funzionalità di questa popolazione cellulare, disregolata in queste patologie, da parte di un microambiente non infiammato.

MATERIALI E METODI

1 PAZIENTI E DONATORI NORMALI

Per questo studio sono stati analizzati 16 campioni di sangue midollare di pazienti affetti da disordini mieloproliferativi cronici (MPN) alla diagnosi. Sono state utilizzate, le cellule di scarto non impiegate per le procedure diagnostiche routinarie per la patologia, dopo consenso informato del paziente, in accordo con le linee guida della dichiarazione di Helsinki e il protocollo di studio era stato approvato dal Comitato Etico locale.

Le caratteristiche sono descritte in *tabella 1*; si tratta di pazienti MPN tutti JAK2+ con *VAF* (*variant allele fraction*) compresa tra il 4% e il 35%. I pazienti di riferimento sono 7 femmine e 12 maschi con un'età media di 62 anni (range 30-82) e, nello specifico, 2 sono PMF , 5 PV, 12 TE.

Per lo studio delle CSM sono stati utilizzati 5 campioni di midollo osseo umano normale, da donatori sottoposti ad espianto midollare per donazione volontaria, dopo consenso informato, i donatori erano maschi, di età media 34 anni (range 20-50);

Per lo studio il materiale è stato reperito dai filtri utilizzati dopo l'espianto per purificare il prodotto da reinfondere al paziente, filtri normalmente eliminati.

<i>PAZIENTE</i>	<i>SESSO</i>	<i>ETA'</i>	<i>DIAGNOSI</i>	<i>%JAK^{V617F}</i>
<i>1</i>	F	51	<i>TE</i>	5%
<i>2</i>	M	68	<i>PV</i>	20%
<i>3</i>	M	67	<i>PV</i>	32%
<i>4</i>	M	58	<i>TE</i>	11%
<i>5</i>	M	70	<i>TE</i>	9%
<i>6</i>	M	71	<i>PV</i>	26%
<i>7</i>	F	40	<i>TE</i>	8%
<i>8</i>	M	69	<i>TE</i>	16%
<i>9</i>	M	69	<i>TE</i>	16%
<i>10</i>	M	61	<i>PMF</i>	13%
<i>11</i>	M	59	<i>PV</i>	8%
<i>12</i>	F	67	<i>PV</i>	5%
<i>13</i>	F	66	<i>PMF</i>	35%
<i>14</i>	F	73	<i>TE</i>	7%
<i>15</i>	F	30	<i>TE</i>	4%
<i>16</i>	F	66	<i>TE</i>	15%
<i>17</i>	M	32	<i>TE</i>	11%
<i>18</i>	M	64	<i>TE</i>	11%
<i>19</i>	M	74	<i>TE</i>	9%

Tabella 1. Caratteristiche cliniche pazienti MPN: TE, trombocitemia essenziale. PV, policitemia vera. PMF, mielofibrosi idiopatica.

2 SELEZIONE ED ESPANSIONE DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI (CSM)

Le cellule mononucleate (CMN) ottenute dal midollo osseo di donatori normali o dei pazienti affetti da MPN sono state isolate mediante stratificazione su Ficoll (MP Biomediacals). Il campione è stato diluito 1:3 con PBS (Phosphate Buffered Saline), stratificato su Ficoll, e centrifugato ad una velocità di 1520 rpm per 30'.

Le cellule mononucleate sono state raccolte, diluite con PBS e lavate due volte mediante centrifugazione. Al termine della centrifuga il surnatante è stato eliminato e le cellule sono state risospese con 1 ml di PBS, e infine contate al contaglobuli Beckman Coulter. (*Figura 8*)

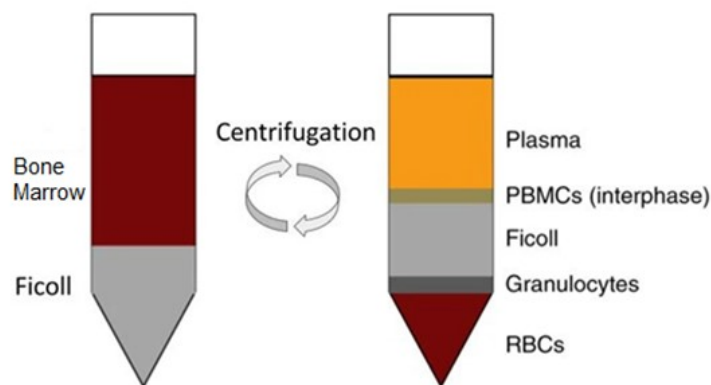


Figura 8. Separazione CMN su gradiente di densità

Le CMN sono state seminate in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biological Industries) supplementato con il 20% di siero fetale bovino (Fetal bovine serum, FBS, Biological Industries), in fiasche T25 cm² alla densità di 3x10⁶ cellule/cm² ed incubate a 37°C in 5% CO₂.

Dopo 3 giorni le cellule non adese sono state eliminate tramite lavaggio con PBS ed è stato aggiunto terreno fresco.

Raggiunto l'80% circa della confluenza, le cellule aderenti alla superficie della fiasca sono state staccate mediante tripsinizzazione, contate e riseminate fino ad ottenere una popolazione pura di CSM.

2.1 Congelamento

Inoltre, una aliquota cellulare è stata congelata a -20° per successiva estrazione del DNA, una seconda aliquota è stata criopreservata a -80° in terreno di congelamento: FBS+10% DMSO (Dimetilsolfossido) per esperimenti successivi.

3 ANALISI IMMUNOFENOTIPICA

Le CSM dopo 3-4 passaggi di coltura sono state studiate in citofluorimetria per valutarne la purezza. Le cellule sono state marcate con anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi a diversa fluorescenza (*tabella 2*) e incubate per 15' a temperatura ambiente al buio, perché fotolabili. Al termine dell'incubazione è stato eseguito un lavaggio con 1 ml di PBS (centrifugazione a 2000 rpm per 5'), eliminato il surnatante e il pellet di cellule marcate, risospeso in 500 ul di PBS, è stato studiato attraverso un citofluorimetro Beckman Coulter DxFLEX. I dati sono stati analizzati mediante il software CytExpert for DxFLEX. È stato utilizzato come controllo negativo il medesimo campione non marcato.

ANTICORPI	FLUORESCENZA	
CD105	FITC	<i>Biolegend</i>
CD73	PE	<i>BD Pharmingen</i>
CD13	PECy7	<i>BD Biosciences</i>
CD14	APC	<i>Beckman-Coulter</i>
CD45	KO	<i>Beckman-Coulter</i>
CD3	APCCy7	<i>BD Biosciences</i>
CD19	supernova	<i>Beckman-Coulter</i>

Tabella 2. Pannello degli anticorpi monoclonali coniugati usati per l'analisi immunofenotipica

4 CO-COLTURE

Sono stati allestiti i seguenti sistemi di co-coltura:

- CSM normali e CMN del paziente (CMN_{V617F})
- CSM del paziente (CSM_{V617F}) e CMN del paziente (CMN_{V617F})

Le CSM sono state irradiate in 2 ml di PBS, ad un'intensità di 25Gy per 6'.

Le CSM irradiate sono state seminate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di 6×10^5 in 2 ml di DMEM+20%FBS e incubate a 37°C in 5% CO₂.

Dopo 3 giorni di coltura, alle CSM, adese alla superficie delle piastre, sono state aggiunte le CMN_{V617F}, dopo scongelamento, alla concentrazione di 2×10^6 cellule/pozzetto in un volume di 2 ml di terreno di coltura (DMEM + 20% FBS).

Insieme alle co-culture sono sempre state effettuate colture di CSM da sole e CMN_{V617F} da sole, utilizzate come controlli.

I sistemi utilizzati sono riportati in *figura 9*.

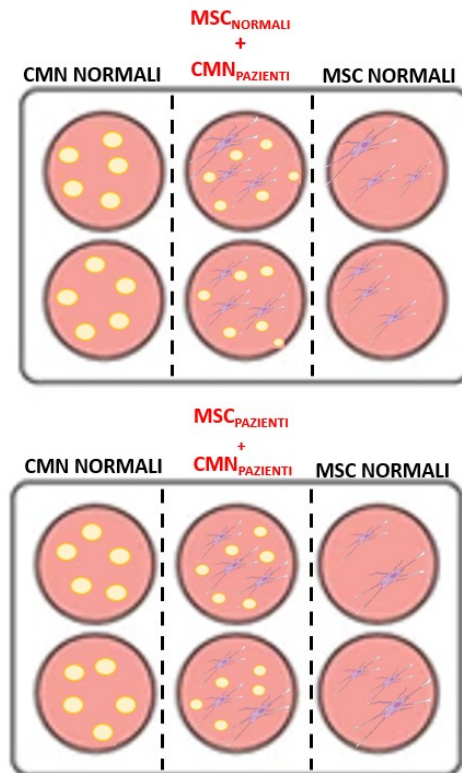


Figura 9. Sistemi di colture di controllo e co-culture: CSM normali+CMN pazienti; CSM pazienti+CMN pazienti

Le colture sono state incubate in termostato a 37°C e al 5% di CO₂ per due settimane aggiungendo dopo 7 giorni 1 ml di terreno fresco. (**Figura 10**)

Al termine della co-cultura il surnatante e lo stroma con le cellule adese sono stati raccolti, le cellule dopo 2 lavaggi sono state contate ed è stata fatta l'analisi molecolare.

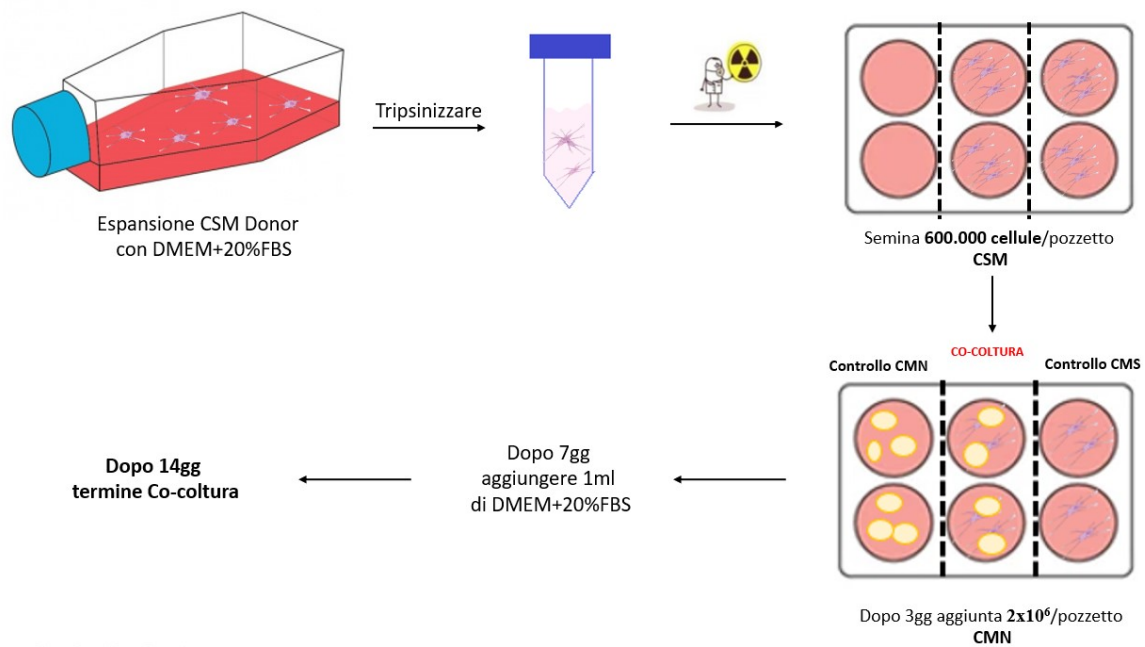


Figura 10. Co-coltura CSM (normale e paziente) + CMN paziente

5 ESTRAZIONE DNA

Il DNA totale è stato estratto con QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen) e quantificato con il Nanodrop. La purezza del campione estratto è stata valutata dal rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e quella a 280 nm (1,7-1,9). Il DNA estratto è stato diluito ad una concentrazione di 5ng/μl in Buffer AE (Qiagen).

6 PCR QUALITATIVA

Il test di primo livello eseguito sul DNA estratto da midollo osseo dei pazienti, che si suppone essere affetti da MPN, riguarda la ricerca della mutazione V617F sul gene JAK2. Si tratta di un'analisi qualitativa che permette di definire se il paziente è portatore o meno di questa mutazione.

Il kit utilizzato è ipsogen JAK2 MutaSearch (Qiagen), per la strumentazione Rotor-Gene Q (Rotore da 72), ottimizzato per 25 ng di DNA genomico purificato seguendo le reazioni wild type (PPM-WT) e JAK2 V617F (PPM-VF) riportate in *tabella 3*.

Con la miscela di primer e sonda JAK2 V617F (PPM-JAK2 V617F)	
n campioni di DNA	n x 2 reazioni
3 controlli DNA	6 reazioni (PC-VF, NC-VF e COS-VF, ognuno testato in duplicato)
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni
Con la miscela di primer e sonda JAK2 WT (PPM-JAK2 WT)	
n campioni di DNA	n x 2 reazioni
3 controlli DNA	6 reazioni (PC-VF, NC-VF e COS-VF, ognuno testato in duplicato)
Acqua come materiale di controllo	2 reazioni

Tabella 3. Numero di reazioni per strumenti Rotor-Gene Q con rotore a 72 provette

La procedura prevede la preparazione di due miscele qPCR , PPM-VF e PPM-WT , (TaqMan Universal PCR Master Mix 2x + Primers e Probe mix 25x + acqua nucleasi-free) di cui 20 μ l sono dispensati nelle apposite strip.

Il materiale da quantificare è aggiunto in una quantità pari a 5 μ l per poter ottenere 25 ng di DNA.

Questo processo di PCR include 3 diverse fasi. La prima fase definita “*Hold*” viene condotta ad una temperatura di 50° per 2’, seguita da una seconda fase, “*Hold 2*” ad una temperatura di 95° C per 15’ e, infine, l’ultima fase “*Cycling*” in cui si hanno 50 cicli a 95° per 15” , seguiti poi da una temperatura di 62° C per 1’ con l’acquisizione della fluorescenza FAM nel canale *Green*.

7 PCR QUANTITATIVA

La PCR quantitativa viene utilizzata per valutare la VAF di JAK2^{V617F} alla diagnosi nelle CMN dei pazienti, nelle CSM normali, nelle CSM dei pazienti, dopo co-coltura nei 3 diversi modelli.

Il kit utilizzato è Ipsogen JAK2 MutaQuant (Qiagen), per la strumentazione Rotor-Gene Q (Rotore da 72) , ottimizzato per 25 ng di DNA genomico purificato seguendo le reazioni wild type (PPM-WT) e JAK2 V617F (PPM-VF) riportate in *tabella 4*.

CAMPIONI	REAZIONI
Con JAK2 V617F mix (PPM-WT)	
4 standards wild-type	8 reazioni, ognuno in duplicato
n campioni di DNA	n x 2 reazioni
2 controlli	4 reazioni: controllo positivo (PC-VF) e controllo negativo (NC-VF), ognuno in duplicato
bianco (acqua)	2 reazioni
CAMPIONI	REAZIONI
Con JAK2 V617F mix (PPM-VF)	
4 M-VF standards	8 reazioni, ognuno in duplicato
n campioni di DNA	n x 2 reazioni
2 controlli	4 reazioni: controllo positivo (PC-VF) e controllo negativo (NC-VF), ognuno in duplicato
bianco (acqua)	2 reazioni

Tabella 4. Numero di reazioni

Preparate le due qPCR mix, PPM-VF e PPM-WT , (TaqMan Universal PCR Master Mix 2x + Primers e Probe mix 25x + acqua nucleasi-free) ne sono stati dispensati 20 µl nelle apposite strip. Al fine di ottenere 25 ng di DNA , sono stati aggiunti 5 µl del materiale da quantificare.

Il seguente processo di PCR prevede 3 fasi: la prima “*Hold*” ad una temperatura di 50° per 2’, una seconda fase definita “*Hold*” condotta ad una temperatura di 95° C per 15’ e, infine, la fase definita “*Cycling*” che prevede in un primo momento, 50 cicli a 95° per 15’’, seguiti poi da una temperatura di 62° C per 1’ con l’acquisizione della fluorescenza FAM nel canale *Cycling A Green*.

Tenendo conto di una *threshold* pari a 0,03 la percentuale di JAK_{V617F} è calcolata con la seguente formula:

$$JAK2 V617F \% = \frac{CN_{V617F}}{(CN_{V617F} + CN_{WT})} \times 100$$

dove:

- CN_{V617F} = numero copie mutate
- CN_{WT} = numero copie wild type

8 ANALISI STATISTICA DEI DATI

I dati sono stati presentati come media \pm deviazioni standard (SDs) ed analizzati con Student's t-test. Le differenze tra i campioni sono stati considerati statisticamente significative per $p < 0.05$.

RISULTATI

1 CARATTERIZZAZIONE DELLE CELLULE STROMALI MESENCHIMALI

1.1 *Selezione, espansione in vitro ed analisi immunofenotipica*

Per questo studio sono state allestite colture liquide di CSM isolate da midollo osseo di pazienti MPN alla diagnosi e CSM di donatori normali. Le CSM di donatori normali, presentavano una morfologia simil-fibroblastica e in coltura raggiungevano la confluenza in minor tempo rispetto alle CSM dei pazienti.

Le CSM di donatori normali e le CSM_{V617F} sono state studiate mediante microscopio invertito (Leica) a due diversi ingrandimenti, 40x e 63x.

(Figura 11 e 12)

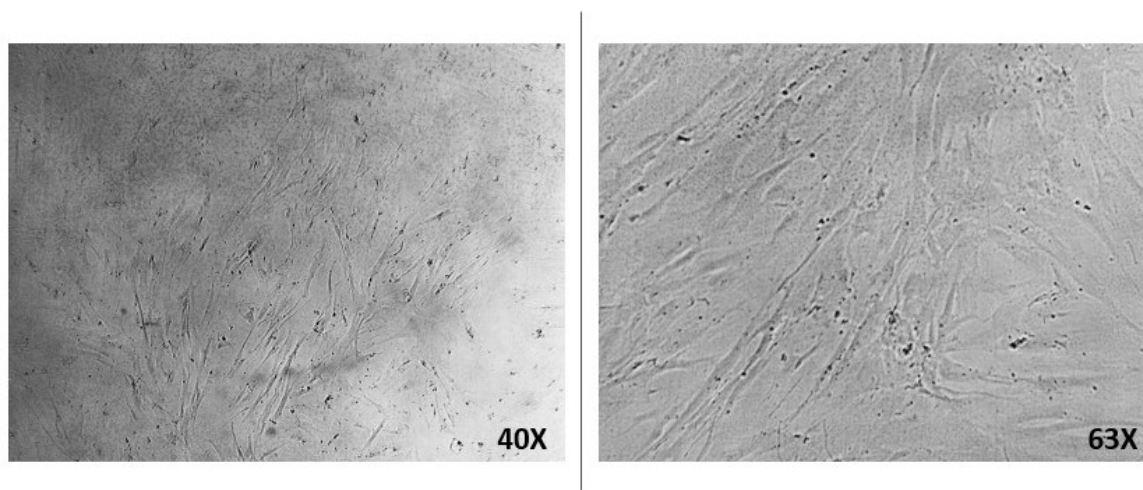


Figura 11. Visualizzazione al microscopio di CSM di donatori normali a due diversi ingrandimenti.

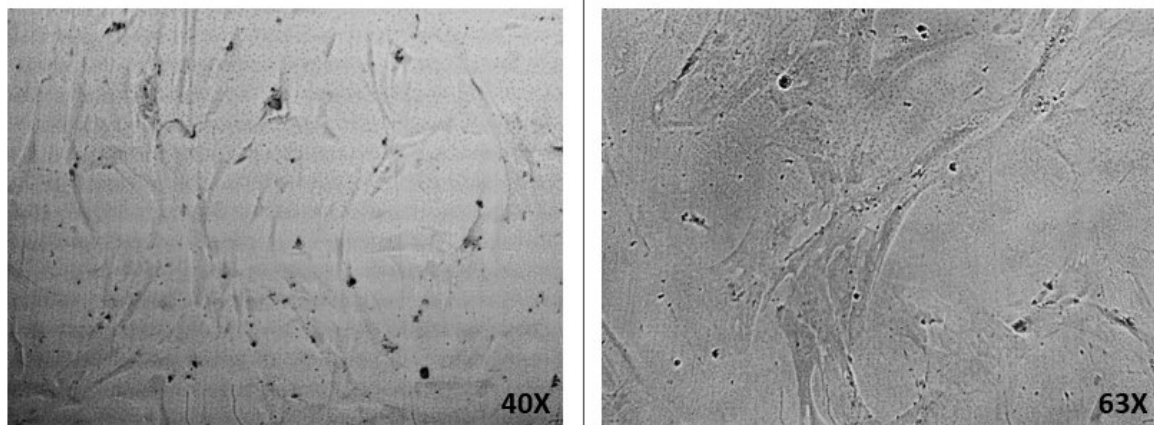


Figura 12. Visualizzazione al microscopio di CSM_{V617F} a due diversi ingrandimenti.

Le CSM dei pazienti hanno mostrato un'evidente variabilità nella loro crescita in coltura; solo le CSM di due pazienti, entrambi affetti da TE e con-Vaf di JAK^{V617F} pari al 15% e all'11%, con età rispettivamente di 66 e 32 anni, hanno avuto una crescita ottimale fino al quinto passaggio. Alcuni campioni hanno avuto un blocco della crescita già dal primo passaggio, mentre altre cellule dal secondo passaggio perdevano la morfologia simil-fibroblastica presentando una forma più grande e allargata. Le cellule che riuscivano ad espandere, presentavano comunque una crescita più lenta rispetto a quella dei donatori, necessitando quindi di più giorni di coltura per raggiungere la confluenza. Si è ipotizzato che questa variabilità potesse dipendere da fattori quali età, diagnosi e *VAF* di JAK2.

È stata quindi confrontata l'espansione di CSM di pazienti di età differente, ponendo un *cut-off* a 65 anni, di pazienti con le 3 differenti diagnosi e di pazienti con *VAF* di JAK2 superiore e inferiore al 10%.

Non si sono evidenziate differenze in termini di crescita tra le CSM di pazienti in relazione ai tre fattori presi in considerazione. Questo, quindi, lascia supporre che, molto probabilmente, la variabilità nell'espansione delle CSM patologiche non dipenda da questi parametri bensì da caratteristiche intrinseche del paziente stesso. (*Figura 13*)

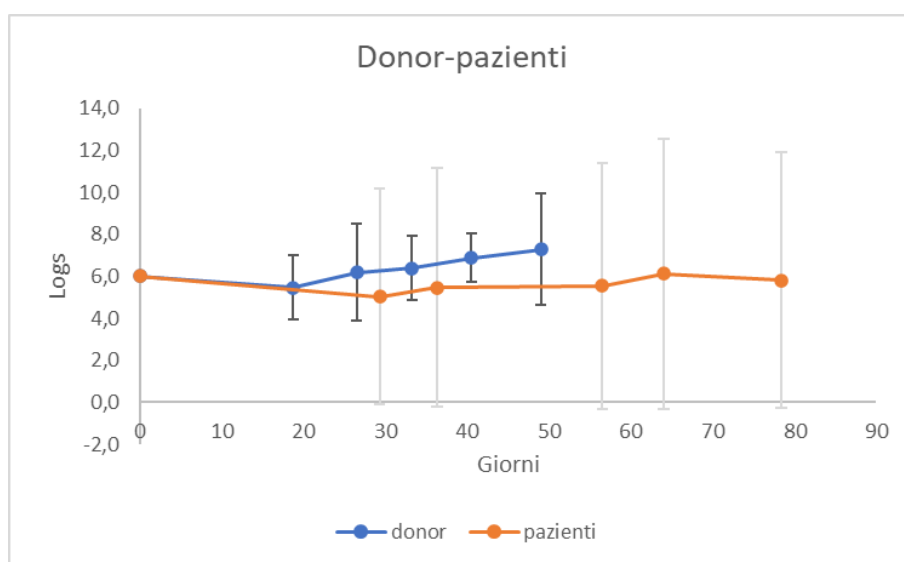


Figura 13. Curva di crescita. Nel grafico viene riportata la curva di crescita di CSM di donatori normali e CSM_{V617F}. I risultati sono calcolati come media \pm deviazione standard. Ogni punto della curva rappresenta un passaggio di coltura.

Dal terzo passaggio, il fenotipo delle cellule studiate è stato analizzato per l'espressione dei seguenti antigeni: CD105, CD73, CD13, CD45, CD14, CD3 e CD19. Come atteso, le cellule dopo il terzo passaggio di coltura sono risultate positive per il CD105, CD73 e CD13 e negative per il CD45, CD14, CD3 e CD19. (*Figura 14-15*)

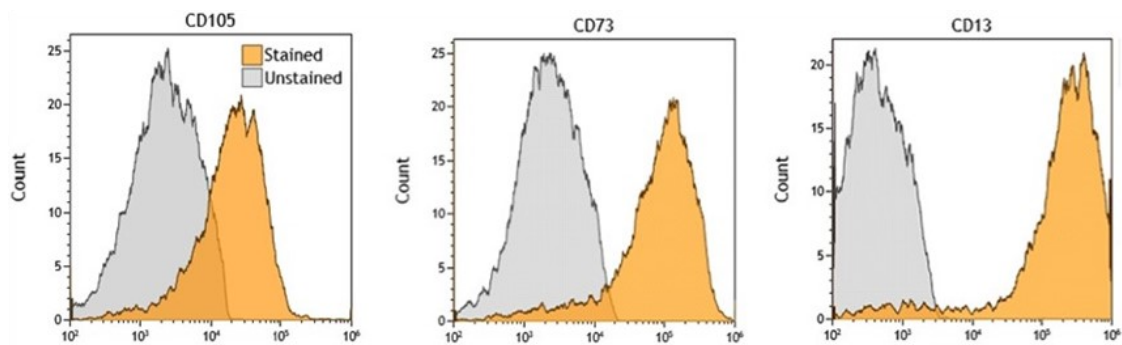


Figura 14. Analisi immunofenotipica. Analisi delle molecole di superficie delle CSM espanse in vitro. In arancio, antigeni di superfici positivi; in grigio controlli negativi.

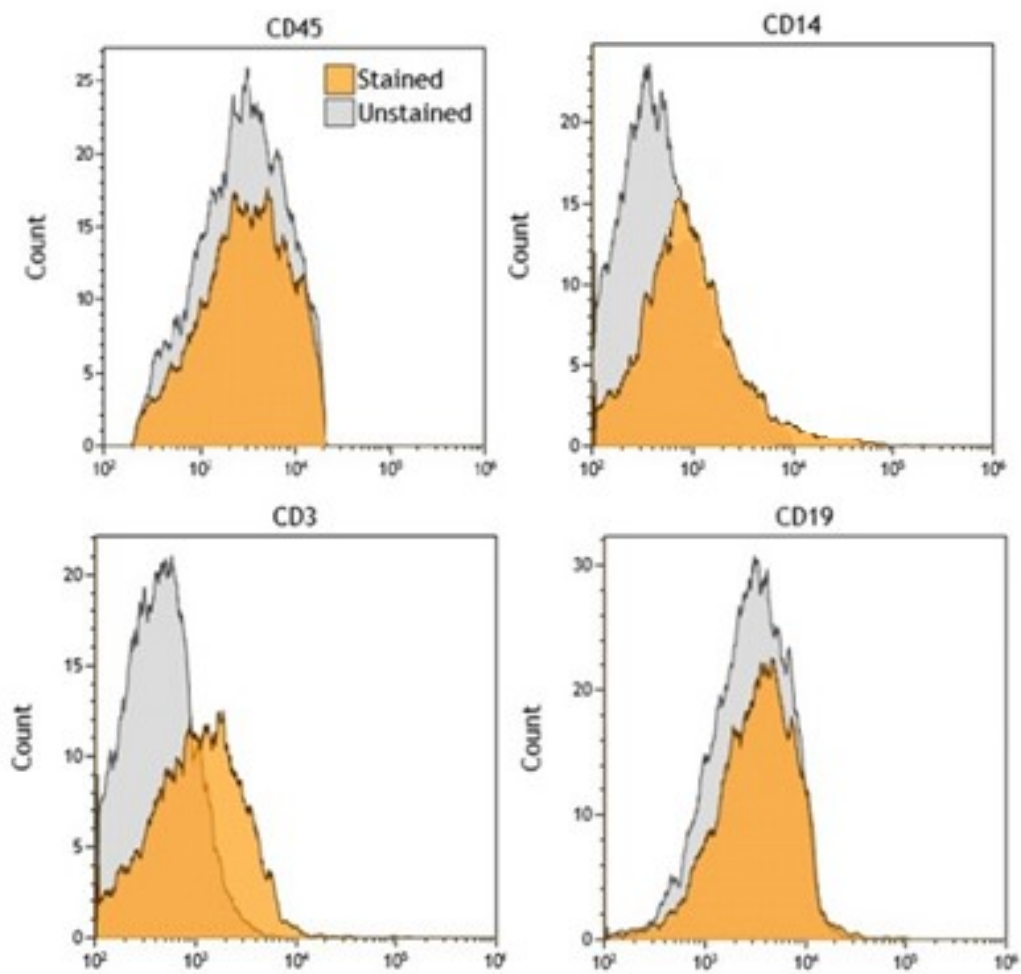


Figura 15. Analisi immunofenotipica. Analisi delle molecole di superficie delle CSM espanse in vitro. In arancio, antigeni di superfici negativi; in grigio controlli negativi.

1.2 CO-COLTURE

Sono stati allestiti esperimenti di co-coltura tra:

-CSM normali e CMN_{V617F}

-CSM_{V617F} e CMN_{V617F}

Nello specifico sono stati effettuati 7 esperimenti di co-coltura tra CSM normali e CMN_{V617F}. Dopo 14 giorni di coltura, tutti i sistemi hanno mostrato un decremento della VAF di JAK2 rispetto a quella dell'esordio. La riduzione media è stata del $64\% \pm 23$.

In parallelo, sono stati allestiti 2 sistemi di co-coltura tra CSM_{V617F} e CMN_{V617F}.

In entrambi gli esperimenti, dopo 14 giorni di coltura, la VAF di JAK2 si riduceva rispetto all'esordio. Il decremento medio è stato del $40\% \pm 3$.

Come controllo negativo, sono state effettuate colture di CSM normali da sole e CMN_{V617F} da sole. I 4 esperimenti di controllo delle CMN patologiche, hanno tutti mostrato un decremento della VAF di **JAK^{V617F}** rispetto all'esordio. La riduzione media è stata del 60 ± 22 .

Analizzando mediante T-test le riduzioni di VAF di **JAK^{V617F}** nei due sistemi di co-coltura, si è ottenuta una differenza statisticamente significativa con p-value pari a 0.04. (*Figura 16*)

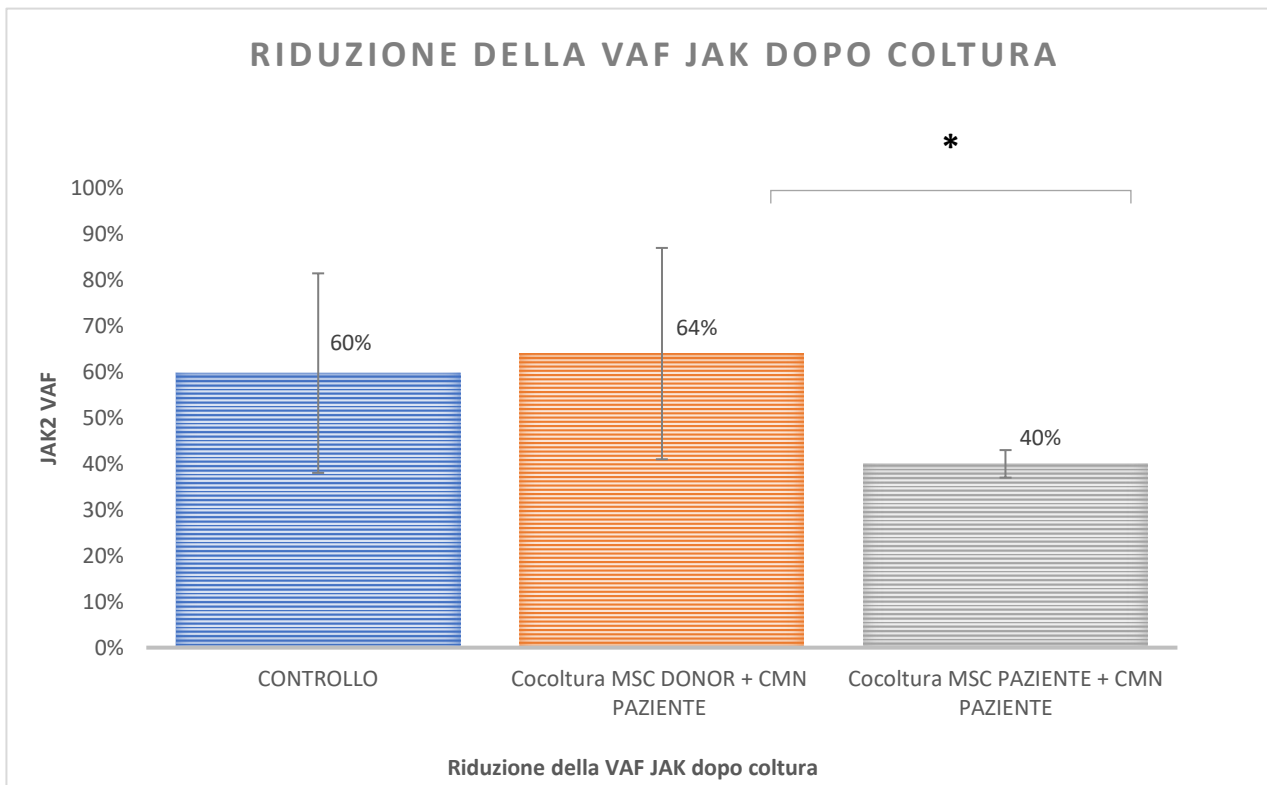


Figura 16. Riduzione della % di JAK^{V617F} dopo coltura

DISCUSSIONE

Nel 1977 Michael Dexter in un esperimento *ex vivo* dimostrò che le CSE hanno bisogno di uno stroma di supporto per poter mantenere la staminalità e la capacità di sostenere una corretta emopoiesi. L'anno successivo, Schoefield sviluppò per la prima volta il concetto di nicchia emopoietica intesa come uno spazio anatomico limitato, dove le CSE possono essere mantenute e dove i processi di differenziazione sono inibiti. L'autore stesso ipotizzò che le CSE fossero in stretto contatto con la superficie ossea e che questa interazione fosse la responsabile della capacità di autorinnovamento e del blocco differenziativo.

Le componenti chiave del microambiente midollare sono rappresentate dalle CSM, precursori non emopoietici altamente proliferanti, dotati di potenziale di *self-renewal* a lungo termine e di differenziazione multilineare.^{73,74}

In tutte le neoplasie e negli ultimi anni anche nelle neoplasie mieloidi è stato dimostrato che il *cross-talk* delle cellule mieloidi neoplastiche con il BMM svolge un ruolo importante nell'insorgenza e nella progressione della malattia.

Nei pazienti con neoplasia mieloide, sono state dimostrate modificazioni morfologiche del BMM: ad esempio, in pazienti con AML (Leucemia Mieloide Acuta) e MDS (Sindromi Mielodisplastiche) è stato osservato un aumento dell'angiogenesi o una fibrosi.^{61,62,63}

Due studi su pazienti con PV riportano che il ruolo protettivo delle CSM contro l'inibitore di JAK2 porta a una diminuzione dell'apoptosi delle cellule mutate di JAK2^{V617F}.^{66 67}

Una possibilità di studiare le alterazioni del BMM è quella di isolare e studiare le CSM del BM in vitro. Infatti, diversi studi suggeriscono che le modificazioni funzionali delle CSM del BM siano correlate alla storia naturale di malattie mieloidi come AML, MDS, MPN non-Philadelphia e CML.^{61,62}

Vari studi dimostrano che nel midollo dei pazienti CML, e CML-CP (*chronic phase*) si ha una significativa riduzione dell'espressione di CXCL12 rispetto ai campioni di controllo.

Mukaida e collaboratori, utilizzando modelli di topi con il transgene BCR-ABL, dimostrano che il miR-126 derivato dall'esosoma secreto dalle cellule LMC riduce l'espressione di CXCL12 nelle cellule endoteliali del midollo osseo.⁷⁵ La ridotta espressione in queste cellule può indurre l'*outflow* delle cellule CML nel flusso sanguigno.

I pazienti con PV, ET e MFI hanno mostrato pattern di localizzazione caratteristici delle cellule CXCL12-positive nel midollo osseo. I casi con mutazioni driver oncogeniche (ODM), come JAK2 , calreticolina (CALR) e mutazioni MPL, hanno mostrato una notevole diminuzione del numero di

cellule CXCL12-positive nel midollo osseo. In precedenza viene riferito che le cellule ematopoietiche con mutazioni JAK2 con la secrezione dell'IL-1 β inducono la distruzione della nicchia del midollo osseo attraverso la ridotta espressione di CXCL12. ⁷⁶

In questo studio si è analizzato il ruolo della nicchia emopoietica e, nello specifico, il contributo delle CSM nei disordini mieloproliferativi cronici Ph negativi, con mutazione del JAK2^{V617F}. Nello specifico sono state studiate 2 PMF, 12 TE e 5 PV con l'allestimento di sistemi di co-cultura con le CSM degli stessi pazienti e con CSM normali.

La purificazione e l'espansione delle CSM delle CSM dei pazienti in coltura hanno evidenziato una variabilità nella loro crescita da paziente a paziente e diversa rispetto alle CSM dei donatori normali; alcune CSM_{V617F} non presentavano alcuna crescita sin dal primo passaggio, altre hanno avuto un blocco della crescita dal secondo passaggio e solo le CSM di due pazienti hanno mostrato una crescita fino al quinto passaggio. Andando a valutare l'età dei pazienti, la diagnosi e la *VAF* delle cellule mutate, nessuna di queste variabili correlava con la diversità di espansione delle CSM.

Sono state poi messe a punto le condizioni ottimali per l'allestimento delle co-culture, concentrazione cellulare, diversi terreni di coltura, tempistiche differenti.

Quindi sono state allestite le co-culture per 2 settimane con DMEM + 20% di FBS alla concentrazione di 600.000 CSM irradiate/pozzetto e 2×10^6 CSE/pozzetto.

I risultati hanno mostrato in tutti gli esperimenti di co-cultura un decremento della *VAF* di JAK2 rispetto a quella dell'esordio.

La riduzione nel sistema di co-cultura con le CSM normali ha mostrato una riduzione statisticamente significativa, rispetto a quella con le CSM del paziente.

Quindi possiamo ipotizzare che le CSM della malattia contribuiscano al permanere e forse anche alla progressione delle lesioni genetiche iniziali. La riduzione che comunque abbiamo visto, verosimilmente è in relazione con le condizioni sperimentali in vitro.

Dobbiamo ora capire come le CSM interagiscono con le CSE, direttamente, o tramite altre cellule del microambiente.

In questo progetto era previsto anche l'allestimento di co-culture con cellule T regolatorie del paziente e normali (CSM - CSE - cellule Treg) con lo scopo di

investigare anche il loro ruolo nel microambiente midollare infiammato in questi pazienti affetti da MPN e il loro eventuale cross-talk con le CSM.

Comprendere come le cellule del BMM possano influire nella progressione della malattia è di fondamentale importanza per future applicazioni in campo clinico e terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

1. Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* **505**, 327–334 (2014).
2. Yu, V. W. C. & Scadden, D. T. Heterogeneity of the Bone Marrow Niche. *Curr. Opin. Hematol.* **23**, 331–338 (2016).
3. Rouault-Pierre, K. *et al.* HIF-2 α Protects Human Hematopoietic Stem/Progenitors and Acute Myeloid Leukemic Cells from Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Stem Cell* **13**, 549–563 (2013).
4. Adams, G. B. *et al.* Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* **439**, 599–603 (2006).
5. Arai, F. *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149–161 (2004).
6. Calvi, L. M. *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841–846 (2003).
7. Taichman, R. S. & Emerson, S. G. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **179**, 1677–1682 (1994).

8. Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G. & Morrison, S. J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457–462 (2012).
9. Yamazaki, S. *et al.* TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* **113**, 1250–1256 (2009).
10. Nilsson, S. K. *et al.* Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* **106**, 1232–1239 (2005).
11. Stier, S. *et al.* Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J. Exp. Med.* **201**, 1781–1791 (2005).
12. Qian, H. *et al.* Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **1**, 671–684 (2007).
13. Goulard, M., Dosquet, C. & Bonnet, D. Role of the microenvironment in myeloid malignancies. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1377–1391 (2018).
14. Giuliani, N. & Olivieri, A. Emopoiesi. in *Ematologia* 1–24 (Idelson-Gnocchi).
15. Butler, J. M. *et al.* Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **6**, 251–264 (2010).

16. Winkler, I. G. *et al.* Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat. Med.* **18**, 1651–1657 (2012).
17. Norozi, F., Shahrabi, S., Hajizamani, S. & Saki, N. Regulatory role of Megakaryocytes on Hematopoietic Stem Cells Quiescence by CXCL4/PF4 in Bone Marrow Niche. *Leuk. Res.* **48**, 107–112 (2016).
18. Bruns, I. *et al.* Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence via Cxcl4 secretion. *Nat. Med.* **20**, 1315–1320 (2014).
19. Zhao, M. *et al.* Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **20**, 1321–1326 (2014).
20. Berry, R., Rodeheffer, M. S., Rosen, C. J. & Horowitz, M. C. Adipose Tissue Residing Progenitors (Adipocyte Lineage Progenitors and Adipose Derived Stem Cells (ADSC). *Curr. Mol. Biol. Rep.* **1**, 101–109 (2015).
21. Naveiras, O. *et al.* Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**, 259–263 (2009).
22. Ambrosi, T. H. *et al.* Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell* **20**, 771-784.e6 (2017).

23. Katayama, Y. *et al.* Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* **124**, 407–421 (2006).
24. Yamazaki, S. *et al.* Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* **147**, 1146–1158 (2011).
25. Lucas, D., Battista, M., Shi, P. A., Isola, L. & Frenette, P. S. Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell* **3**, 364–366 (2008).
26. Chow, A. *et al.* Bone marrow CD169⁺ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J. Exp. Med.* **208**, 261–271 (2011).
27. Winkler, I. G. *et al.* Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* **116**, 4815–4828 (2010).
28. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
29. Tefferi, A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am. J. Hematol.* **91**, 50–58 (2016).

30. Nangalia J, G. T. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Program* **Dec 5**, 287–96 (2014).
31. Vannucchi, A.M. , T. Barbui, F.Cervantes, C. Harrison, et al. Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, treatment and follow up. *Ann. Oncol.* (2015).
32. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *Lyon Fr. IARC* (2001).
33. Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: why does it matter. *Best Pr. Res Clin Hematol* **Jun**, 129–40 (2014).
34. Alvarez-Larrán A, Ancochea A, García M, et al. A.-. WHO-histological criteria for myeloproliferative neoplasms: reproducibility, diagnostic accuracy and correlation with gene mutations and clinical outcomes. *Br J Haematol* **Sep**, 911–9 (2014).
35. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia* **Feb**, 437–8 (2008).

36. Barbui, T. *et al.* Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: A international study. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3179–3184 (2011).
37. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, *et al.* Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* **Oct 26**, 2507–13 (2014).
38. Tefferi A, E. M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin Thromb Hemost* **Jun**, 313–20 (2007).
39. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, *et al.* Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European Leukemia Net. *J Clin Oncol* **Feb 20**, 761–70 (2011).
40. Barbui, T. *et al.* Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia* **32**, 1057–1069 (2018).
41. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, *et al.* The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* **Sep**, 1804–10 (2014).

42. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature* **Apr 28**, 1144–8 (2005).
43. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **Apr**, 387–97 (2005).
44. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 1054–1061.
45. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Eng J Med* 1779–90 (2005).
46. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Eng J Med* **Feb 1**, 459–68 (2007).
47. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* **Mar 10**, 2813–6 (2011).
48. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPL W515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* **Jul**, e270 (2006).

49. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL 515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* **Nov15**, 3472–6 (2006).
50. Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia* **Aug**, 1557–66 (2008).
51. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, et al. MPL 515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* **Jul 1**, 141–9 (2008).
52. Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* **Jun 1**, 4198–200 (2004).
53. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood* **May23**, 4388–95 (2013).
54. Klampfl, T. *et al.* Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2379–2390 (2013).

55. Nangalia, J. *et al.* Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2391–2405 (2013).
56. Guglielmelli P, Nangalia J, Green AR, *et al.* CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: hidden behind the reticulum. *Am. J. Hematol.* **May**, 453–6 (2014).
57. Szybinski, J. & Meyer, S. C. Genetics of Myeloproliferative Neoplasms. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **35**, 217–236 (2021).
58. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, *et al.* Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Eng J Med* **Feb 12**, 601–12 (2015).
59. Patel, K. P. *et al.* Correlation of mutation profile and response in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. *Blood* **126**, 790–797 (2015).
60. Morsia, E., Torre, E., Poloni, A., Olivieri, A. & Rupoli, S. Molecular Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: From Molecular Landscape to Therapeutic Implications. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
61. Blau, O. *et al.* Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp. Hematol.* **35**, 221–229 (2007).

62. Li, J. *et al.* Differential Gene Expression Profile Associated with the Abnormality of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Aplastic Anemia. *PLoS ONE* **7**, e47764 (2012).
63. Leimkühler, N. B. *et al.* Heterogeneous bone-marrow stromal progenitors drive myelofibrosis via a druggable alarmin axis. *Cell Stem Cell* **28**, 637-652.e8 (2021).
64. Arranz, L. *et al.* Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature* **512**, 78–81 (2014).
65. Martinaud, C. *et al.* Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Cells Contributes to Primary Myelofibrosis. *Cancer Res.* **75**, 4753–4765 (2015).
66. Manshour, T. *et al.* Bone marrow stroma-secreted cytokines protect JAK2(V617F)-mutated cells from the effects of a JAK2 inhibitor. *Cancer Res.* **71**, 3831–3840 (2011).
67. Abdelouahab, H. *et al.* CXCL12/CXCR4 pathway is activated by oncogenic JAK2 in a PI3K-dependent manner. *Oncotarget* **8**, 54082–54095 (2016).
68. Bedekovics, J., Kiss, A., Beke, L., Károlyi, K. & Méhes, G. Platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR β) expression is limited to activated stromal cells in the bone marrow and shows a strong correlation with the grade of myelofibrosis. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **463**, 57–65 (2013).

69. Desterke, C. *et al.* Tetraspanin CD9 participates in dysmegakaryopoiesis and stromal interactions in primary myelofibrosis. *Haematologica* **100**, 757–767 (2015).
70. Aggoune, D. *et al.* Modeling the influence of stromal microenvironment in the selection of ENU-induced BCR-ABL1 mutants by tyrosine kinase inhibitors. *Oncoscience* **1**, 57–68 (2014).
71. Gunsilius, E. *et al.* Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet Lond. Engl.* **355**, 1688–1691 (2000).
72. Kadle, R. L. *et al.* Microenvironmental cues enhance mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation and regulatory T-cell expansion. *PLOS ONE* **13**, e0193178 (2018).
73. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. & Kulagina, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **4**, 267–274 (1976).
74. Jiang, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41–49 (2002).
75. Mukaida, N., Tanabe, Y. & Baba, T. Chemokines as a Conductor of Bone Marrow Microenvironment in Chronic Myeloid Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, E1824 (2017).

76.Li, A. J. & Calvi, L. M. The microenvironment in myelodysplastic syndromes: Niche-mediated disease initiation and progression. *Exp. Hematol.* **55**, 3–18 (2017).