



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

*Modulo richiesta assegno*

<b>TUTOR</b>	<b>Lucia Catani</b>		
<b>PRODUZIONE SCIENTIFICA TUTOR</b>			
Punteggio VRA			

<b>Commissione proposta</b> 3 commissari + 1 supplente	Lucia Catani
	Simona Soverini
	Alessandro Broccoli
	Fausto Castagnetti

<b>TITOLO DEL PROGETTO</b>		
ASSEGNO FINANZIATO DA PROGETTO COMPETITIVO <i>(barrare la casella corrispondente)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
SE IL FINANZIAMENTO È COMPETITIVO L'ENTE FINANZIATORE		
PROGETTO/ATTIVITÀ A SCOPO COMMERCIALE <i>(es. sperimentazione profit)</i>	<input type="checkbox"/> SI	<input checked="" type="checkbox"/> NO
CARATTERISTICHE DEL PROGETTO <i>(biomedico/osservazionale/clinico-interventistico/multidisciplinare)</i>	Biomedico	
STATO DI APPROVAZIONE DEL PROGETTO DA PARTE DEL COMITATO ETICO <i>(se necessario per il tipo di studio barrare o evidenziare la casella corrispondente)</i>	<input type="checkbox"/> Ottenuto	<input checked="" type="checkbox"/> In corso
<b>DESCRIZIONE DEL PROGETTO</b> <i>(max 800 parole)</i>		



## DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

La classical Hairy Cell Leukemia (HCL) è una rara malattia linfoproliferativa indolente ma ancora incurabile. I pazienti affetti da HCL presentano splenomegalia, fibrosi del midollo osseo e pancitopenia. La malattia è inoltre caratterizzata principalmente da infiltrazione di cellule capellute maligne (Hairy cells (HCs)) nel midollo osseo, nel fegato e nella milza. La mutazione *BRAFV600E*, presente nella quasi totalità dei pazienti, determina un'attivazione costitutiva della via Ras-Raf-MEK-ERK con promozione della sopravvivenza e della proliferazione cellulare. E' stato inoltre dimostrato che la mutazione BRAF induce senescenza cellulare. Inoltre, è stata descritta una forte dipendenza delle HCs dagli stimoli extracellulari, comprese le interazioni con le cellule stromali e la matrice del midollo osseo. Tuttavia, questo quadro istopatologico unico e la sua patogenesi sono ancora parzialmente sconosciuti. Le vescicole extracellulari (EV) sono particelle nanometriche con un ruolo nel microambiente tumorale. In base alle dimensioni e alla biogenesi, sono state identificate vescicole extracellulari piccole (S-) e grandi (L-) EVs. Le EVs sono presenti in vari fluidi biologici (compreso il sangue) ed agiscono come mediatori della comunicazione intercellulare grazie al loro cargo di acidi nucleici, proteine, metaboliti e lipidi. Tuttavia, il ruolo delle EVs nel microambiente tumorale dell'HCL è tuttora completamente sconosciuto.

Caratteristiche specifiche della malattia rendono difficoltoso lo sviluppo di marcatori diagnostici e prognostici nell'HCL. In particolare, poiché la maggior parte dei pazienti con HCL sviluppa pancitopenia, di solito è presente una quantità limitata di cellule tumorali ottenuto dal sangue periferico e l'aspirazione durante la biopsia del midollo osseo è spesso gravata da fibrosi del midollo osseo. Inoltre, le fonti primarie del midollo osseo solitamente non coinvolgono focolai metastatici, qualcosa che è, viceversa, rilevabile nel flusso sanguigno. Infine, le linee cellulari di HCL sono prive della mutazione *BRAFV600E* e quindi probabilmente non rappresentano un modello valido.

Una biopsia liquida basata su EV nell'HCL può essere altamente istruttiva. L'ipotesi di questa proposta è che nelle Evs di pazienti con HCL contribuiscono al mantenimento del clone tumorale attraverso la regolazione di cellule chiave del microambiente, comprese le cellule immunitarie e le cellule stromali, favorendo l'insufficienza/evasione immune e la fibrosi del midollo osseo. Di conseguenza, le EVs possono essere determinanti nell'identificare una "signature" correlata alla biologia, specifica della malattia e associata all'outcome, che può essere sfruttata come vulnerabilità terapeutica.

*Obiettivo specifico 1:* Identificare una "signature" basata sulle EVs ed associata all'"outcome"

*Obiettivo specifico 2:* Comprendere il ruolo delle EVs nell' "educazione" del microambiente immunitario

*Obiettivo specifico 3:* Comprendere il ruolo delle EVs nel modellare il microambiente stromale

Il progetto prevede l'arruolamento di pazienti affetti da HCL (N = 25; secondo le linee guida di consenso (Blood 2017; 129: 553)) e di donatori sani (HD; N = 12)). I criteri di inclusione: 1) Diagnosi di HCL-Gruppo 1: pazienti alla diagnosi (N = 10); Gruppo 2: pazienti con recidiva che necessitano di trattamento (N=5); Gruppo 3: pazienti in risposta completa >2 anni (N=10); 3) età >18 anni; 4) consenso informato firmato.

a) Per identificare la "signature" delle EVs circolanti, le S- e L-EVs (S- (100.000xg) e L-EV (20.000xg) derivate dal plasma (sangue periferico e/o midollo osseo) di pazienti HCL e HD (solo sangue periferico), saranno isolate mediante ultracentrifugazione o Size Exclusion Chromatography. Il fenotipo delle S- e L-EV isolate da pazienti con HCL o HD sarà caratterizzato mediante citometria a flusso multidimensionale (MACSplex Kit e pannelli personalizzati). Verrà inoltre studiata l'espressione di S- e L-EV di marcatori HC (CD11c, CD103, CD123, CD25), di adesione e di senescenza (CD57, beta-galattosidase, p16, p21). Il cargo di RNA (microRNA e RNA totale) delle EVs (sia S-EVs che L-EVs) isolate dal plasma di pazienti/HD sarà testato mediante sequenziamento dell'RNA. La composizione lipidica di S- e L-EVs sarà inoltre valutata utilizzando cromatografia liquida/spettrometria di massa.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

b) Per comprendere se le EVs contribuiscono all'immuno-evasione, selezionate cellule immuni (monociti, cellule T e B), isolate immunomagneticamente dal sangue periferico di pazienti con HCL o HD saranno trattate in vitro per 24 e 48 ore con dosi crescenti (5, 10, 20 microgrammi/ml) di S- e L-EVs isolate dal plasma di pazienti/HD e, quindi, caratterizzate per sopravvivenza, apoptosi, capacità di migrazione e capacità di produrre citochine/chemochine e l'espressione di markers di senescenza. Sulla base della dose/tempo più efficace di S- e L-EV in termini di capacità di produzione di citochine/chemochine, verrà inoltre analizzato il contenuto di mRNA (Gene Expression Profiling) delle cellule immunitarie trattate con EVs.

c) Per studiare il ruolo delle EVs nel microambiente stromale dell'HCL, S- e L-EVs (5,10,20 microgrammi/ml) provenienti da pazienti con HCL e HD verranno utilizzate per trattare in vitro le cellule B di HD e le cellule stromali mesenchimali (linea cellulare stromale umana HS-5) in co-cultura 2D per 24 e 48 ore. Inoltre, con l'obiettivo di ricapitolare la complessa interazione tra cellule HC e stroma, i trattamenti verranno eseguiti in modelli 3D di co-cultura. Le cellule stromali verranno poi caratterizzate per la loro capacità di produrre citochine infiammatorie/fibrotiche.

**DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ DELL'ASSEGNISTA**

(per i **nuovi** assegni: max 400 parole; competenze richieste, scansione temporale della formazione, scansione temporale dell'attività, obiettivi primari e secondari)

(per i **rinnovi**: max 600 parole – da integrare con la relazione dell'assegnista; formazione raggiunta, attività effettuata, obiettivi raggiunti/competenze acquisite, formazione ancora da acquisire (se pertinente), scansione temporale dell'attività durante il rinnovo)

*Punti*

L'assegnista deve avere esperienza di almeno 2 anni nell'isolamento e caratterizzazione delle vescicole extracellulari

Gli obiettivi sono gli stessi del progetto, ovvero:

Obiettivo specifico 1: Identificare una "signature" basata sulle EVs ed associata all'"outcome"

Obiettivo specifico 2: Comprendere il ruolo delle EVs nell' "educazione" del microambiente immunitario

Obiettivo specifico 3: Comprendere il ruolo delle EVs nel modellare il microambiente stromale

L'attività dell'assegnista comprende:

a) isolamento del plasma povero di piastrine; b) isolamento delle vescicole extracellulari dal plasma dei pazienti e dei controlli normali; c) caratterizzazione del fenotipo/cargo delle EVs mediante citofluorimetria/sequenziamento; d) allestimento di co-culture con cellule immuni/stromali; e) preparazione abstract per Congressi e lavori scientifici per giornali con "peer review".

**SE RINNOVO, SI RICORDA DI ALLEGARE ANCHE LA RELAZIONE DELL'ASSEGNISTA CON LA SUA PRODUZIONE SCIENTIFICA.**

*Scheda attività assistenziale (se prevista)*



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

<b>ATTIVITÀ ASSISTENZIALI DELL'ASSEGNISTA/ N. ORE SETTIMANA (max 18 ore settimanali)</b>
NO
<b>AZIENDA SANITARIA PRESSO CUI SI SVOLGERÀ L'ATTIVITÀ</b>

Si ricorda che, come previsto dagli Accordi sull'impiego nell'attività assistenziale dei Titolari di assegni di ricerca, sottoscritti tra l'Università di Bologna e le Aziende Ospedaliere di riferimento, una volta stipulato il contratto con il vincitore della selezione, il tutor deve consegnare alla Direzione Medica Ospedaliera la relativa modulistica, nella quale andranno riportate le attività qui segnalate.

## Progetto di ricerca

### ***“Ruolo delle vescicole extracellulari circolanti nella Hairy Cell Leukemia”***

#### ***“Role of circulating extracellular vesicles in Hairy Cell Leukemia”***

La classical Hairy Cell Leukemia (HCL) è una rara malattia linfoproliferativa indolente ma ancora incurabile. I pazienti affetti da HCL presentano splenomegalia, fibrosi del midollo osseo e pancitopenia. La malattia è inoltre caratterizzata principalmente da infiltrazione di cellule capellute maligne (Hairy cells (HCs)) nel midollo osseo, nel fegato e nella milza. La mutazione *BRAFV600E*, presente nella quasi totalità dei pazienti, determina un'attivazione costitutiva della via Ras-Raf-MEK-ERK con promozione della sopravvivenza e della proliferazione cellulare. E' stato inoltre dimostrato che la mutazione BRAF induce senescenza cellulare. Inoltre, è stata descritta una forte dipendenza delle HCs dagli stimoli extracellulari, comprese le interazioni con le cellule stromali e la matrice del midollo osseo. Tuttavia, questo quadro istopatologico unico e la sua patogenesi sono ancora parzialmente conosciuti. Le vescicole extracellulari (EV) sono particelle nanometriche con un ruolo nel microambiente tumorale. In base alle dimensioni e alla biogenesi, sono state identificate vescicole extracellulari piccole (S-) e grandi (L-) EVs. Le EVs sono presenti in vari fluidi biologici (compreso il sangue) ed agiscono come mediatori della comunicazione intercellulare grazie al loro cargo di acidi nucleici, proteine, metaboliti e lipidi. Tuttavia, il ruolo delle EVs nel microambiente tumorale dell'HCL è tuttora completamente sconosciuto.

Caratteristiche specifiche della malattia rendono difficoltoso lo sviluppo di marcatori diagnostici e prognostici nell'HCL. In particolare, poiché la maggior parte dei pazienti con HCL sviluppa pancitopenia, di solito è presente una quantità limitata di cellule tumorali ottenuto dal sangue periferico e l'aspirazione durante la biopsia del midollo osseo è spesso gravata da fibrosi del midollo osseo. Inoltre, le fonti primarie del midollo osseo solitamente non coinvolgono focolai metastatici, qualcosa che è, viceversa, rilevabile nel flusso sanguigno. Infine, le linee cellulari di HCL sono prive della mutazione *BRAFV600E* e quindi probabilmente non rappresentano un modello valido.

Una biopsia liquida basata su EV nell'HCL può essere altamente istruttiva. L'ipotesi di questa proposta è che nelle Evs di pazienti con HCL contribuiscono al mantenimento del clone tumorale attraverso la regolazione di cellule chiave del microambiente, comprese le cellule immunitarie e le cellule stromali, favorendo l'insufficienza/evasione immune e la fibrosi del midollo osseo. Di conseguenza, le EVs possono essere determinanti nell'identificare una “signature” correlata alla biologia, specifica della malattia e associata all' outcome, che può essere sfruttata come vulnerabilità terapeutica.

*Obiettivo specifico 1:* Identificare una “signature” basata sulle EVs ed associata all'“outcome”

*Obiettivo specifico 2:* Comprendere il ruolo delle EVs nell' “educazione” del microambiente immunitario

*Obiettivo specifico 3:* Comprendere il ruolo delle EVs nel modellare il microambiente stromale

Il progetto prevede l'arruolamento, di pazienti affetti da HCL (N = 25; secondo le linee guida di consenso (Blood 2017; 129: 553)) e di donatori sani (HD; N = 12)). I criteri di inclusione: 1) Diagnosi di HCL-Gruppo 1: pazienti alla diagnosi (N = 10); Gruppo 2: pazienti con recidiva che necessitano di

trattamento (N=5); Gruppo 3: pazienti in risposta completa >2 anni (N=10); 3) età >18 anni; 4) consenso informato firmato.

a) Per identificare la “signature” delle EVs circolanti, le S- e L-EVs (S- (100.000xg) e L-EV (20.000xg) derivate dal plasma (sangue periferico e/o midollo osseo) di pazienti HCL e HD (solo sangue periferico), saranno isolate mediante ultracentrifugazione o Size Exclusion Chromatography. Il fenotipo delle S- e L-EV isolate da pazienti con HCL o HD sarà caratterizzato mediante citometria a flusso multidimensionale (MACSplex Kit e pannelli personalizzati). Verrà inoltre studiata l'espressione di S- e L-EV di marcatori HC (CD11c, CD103, CD123, CD25), di adesione e di senescenza (CD57, beta-galattosidase, p16, p21). Il cargo di RNA (microRNA e RNA totale) delle EVs (sia S-EVs che L-EVs) isolate dal plasma di pazienti/HD sarà testato mediante sequenziamento dell'RNA. La composizione lipidica di S- e L-EVs sarà inoltre valutata utilizzando cromatografia liquida/spettrometria di massa.

b) Per comprendere se le EVs contribuiscono all'immuno-evasione, selezionate cellule immuni (monociti, cellule T e B), isolate immunomagneticamente dal sangue periferico di pazienti con HCL o HD saranno trattate in vitro per 24 e 48 ore con dosi crescenti (5, 10, 20 microgrammi/ml) di S- e L-EVs isolate dal plasma di pazienti/HD e, quindi, caratterizzate per sopravvivenza, apoptosi, capacità di migrazione e capacità di produrre citochine/chemochine e l'espressione di markers di senescenza. Sulla base della dose/tempo più efficace di S- e L-EV in termini di capacità di produzione di citochine/chemochine, verrà inoltre analizzato il contenuto di mRNA (Gene Expression Profiling) delle cellule immunitarie trattate con EVs.

c) Per studiare il ruolo delle EVs nel microambiente stromale dell'HCL, S- e L-EVs (5,10,20 microgrammi/ml) provenienti da pazienti con HCL e HD verranno utilizzate per trattare in vitro le cellule B di HD e le cellule stromali mesenchimali (linea cellulare stromale umana HS-5) in co-coltura 2D per 24 e 48 ore. Inoltre, con l'obiettivo di ricapitolare la complessa interazione tra cellule HC e stroma, i trattamenti verranno eseguiti in modelli 3D di co-coltura. Le cellule stromali verranno poi caratterizzate per la loro capacità di produrre citochine infiammatorie/fibrotiche.