



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

**Dottorato in Scienze e Tecnologie diagnostiche in  
ambito Biomedico  
XXIII ciclo**

**Ruolo delle cellule staminali mesenchimali del  
midollo osseo nella storia naturale delle Neoplasie  
Mieloproliferative Philadelphia negative**

Tesi di dottorato di:  
*Dott.ssa Carla Guarnotta*

*SSD MED 08*

Tutor e Coordinatore:  
*Chiar.mo Prof. Vito Franco*

## Indice

1. Neoplasie mieloproliferative
  - 1.1 Definizione pag. 4
  - 1.2 Eziopatogenesi pag. 5
  - 1.3 Diagnosi pag. 7
2. Nicchia staminale emopoietica pag. 11
  - 2.1 La nicchia midollare nelle Neoplasie Mieloidi pag. 14
3. Proteine matricellulari pag. 16
  - 3.1 *SPARC*: struttura e funzione pag 18
  - 3.2 *SPARC* nelle neoplasie mieloidi e nei processi fibrotici pag. 21
4. Scopo della tesi pag 24
5. Materiali e metodi
  - 5.1 Selezione dei casi pag.25
  - 5.2 Modello murino pag 25
  - 5.3 Trattamento *in vivo* con trombopoiteina ricombinante (TPO) pag 26
  - 5.4 Analisi istologica ed immunofenotipica pag 26
  - 5.5 Isolamento coltura e trattamento di BM-MSC umane e murine pag 27
  - 5.6 Condizione di coltura e analisi delle cellule emopoietiche murine Lineage negative pag.29
  - 5.7 Saggi di Western Blotting pag 29
  - 5.8 Immunofluorescenza e microscopia confocale pag 30
  - 5.9 Analisi citofluorimetrica pag. 30
  - 5.10 Saggio di formazione di colonie midollari pag 31
  - 5.11 Analisi statistica pag 32
6. Risultati
  - 6.1 L'espressione stromale di *SPARC* caratterizza le neoplasie mieloidi con alterazioni nello stroma midollare e correla con segni di fallimento midollare pag 33
  - 6.2 L'espressione di *SPARC* contraddistingue le cellule BM-MSC CD146+ e si associa all'espansione degli osteoblasti alla base della progressione osteosclerotica pag 38

- 6.3 La proteina SPARC sintetizzata dallo stroma è necessaria all'induzione dei cambiamenti fibrotici che si accompagnano alla mieloproliferazione reattiva indotta dalla TPO pag 43
- 6.4 L'assenza di SPARC nello stroma midollare si associa a una maggiore risposta mielopoietica in risposta al trattamento con TPO pag 50
- 6.5 L'assenza di SPARC nel microambiente midollare induce le caratteristiche di un disordine mieloproliferativo in presenza di cellule ematopoietiche  $Apc^{min}$  pag. 54
- 7. Discussione pag 58
- 8. Bibliografia pag 60

## *1. NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE*

### *1.1 DEFINIZIONE*

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) sono un gruppo eterogeneo di patologie clonali della cellula staminale emopoietica (HSC) caratterizzate dalla proliferazione midollare di una o più linee mieloidi. Sono patologie primariamente dell'adulto con un picco in frequenza tra i cinquanta e settanta anni e incidenza annuale di circa 6-9/100.000 individui [1,2].

Nell'ambito delle MPN si riconoscono entità cliniche quali: la Leucemia Mieloide Cronica (CML), caratterizzata dalla presenza del cromosoma Philadelphia (Ph+), e neoplasie Ph negative (Ph-) che includono la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (ET) e la Mielofibrosi Primaria (PMF) caratterizzate, nello stress proliferativo, da un differente coinvolgimento delle linee eritroide, mieloide e megacariocitaria. In particolare, nelle fasi conclamate della PV la proliferazione del midollo emopoietico è tri-lineare mentre nella PMF essa coinvolge primariamente la linea mieloide e quella megacariocitaria; nella ET è selettivamente implicata quella megacariocitaria. La classificazione della World Health Organization (WHO) del 2008, basata su parametri clinici, istologici e molecolari, include nella categoria delle MPN anche altri disordini meno frequenti come: la Leucemia Neutrofila Cronica (CNL), la Leucemia Eosinofila Cronica (CEL), la Mastocitosi Sistemica e le Neoplasie Mieloproliferative non-classificabili (MPN-U) [1-4].

Il comune interessamento della cellula staminale comporta la presenza di caratteristiche cliniche simili e la presenza di forme transizionali fra le diverse entità neoplastiche, che spesso rende difficile la diagnosi differenziale.

A differenza di quanto si osserva nelle Sindromi Mielodisplastiche (MDS), caratterizzate da ematopoiesi inefficace, nelle MPN il vantaggio proliferativo si associa a una maturazione relativamente normale che esita nell'incremento di granulociti, globuli rossi e piastrine nel sangue periferico. Nelle fasi iniziali, aumentano prevalentemente le piastrine e il riscontro di una trombocitosi isolata persistente può rappresentare, in molti pazienti, l'unico segno di malattia. Tutte le MPN hanno il potenziale di andare incontro a evoluzione clonale e graduale progressione che culmina nel fallimento midollare causato da mielofibrosi o dalla trasformazione verso una fase blastica acuta. Spesso, nei soggetti affetti si riscontrano epatomegalia e splenomegalia, indotta dall'istaurarsi di ematopoiesi

extramidollare e/o al sequestro di cellule ematiche, rispettivamente nel fegato e nella milza [1-5].

## 1.2 EZIOPATOGENESI

Le MPN, oltre alle caratteristiche cliniche comuni, mostrano analogie sia nella clonalità delle cellule staminali emopoietiche [2] sia nelle mutazioni che guidano la proliferazione e il mantenimento del clone neoplastico, e lo rendono maggiormente sensibile all'azione delle citochine presenti nel microambiente midollare. L'ipersensibilità citochinica nelle MPN è conseguenza della de-regolazione che interessa diversi *pathway* di trasduzione del segnale determinata da mutazioni somatiche che coinvolgono direttamente o indirettamente il controllo della crescita [6].

L'attivazione aberrante di segnali di trasduzione è stata evidenziata in numerose patologie ematologiche [6;7] ed è più frequentemente associata a mutazioni nel recettore tirosin chinasi (TK) o a molecole effettrici a esso legate [8]. Oltre che alla nota traslocazione genica BCR-ABL implicata nella LMC, all'interno delle tre classiche entità MPN, PV, ET e PMF, sono state riscontrate mutazioni associate ai geni TK *Janus-kinase 2* (*JAK2*) coinvolto nella via di trasduzione del segnale di recettori citochinici, e *MPL*, che codifica per il recettore della trombopoietina (TPO) [2].

In più della metà dei pazienti affetti da MPN sono state riconosciute numerose mutazioni somatiche associate all'attivazione del gene *JAK2* e la prima aberrazione genetica identificata è la mutazione puntiforme che coinvolge l'esone 14, derivata dalla sostituzione di una valina con una fenilalanina nel codone 617 (*JAK2-V616F*) [9-12]. Tale mutazione attiva costitutivamente *JAK2* che induce, a sua volta, iperfosforilazione di Stat5 cui consegue la deregolazione dei *pathway* di crescita, sopravvivenza e differenziazione delle cellule emopoietiche. Uno studio recente, identifica in *JAK2* mutato una funzione a livello del nucleo, indipendente dall'attivazione di Stat5, che comporta la deregolazione della proteina HP1alpha (*heterochromatin 1 alpha*), noto oncosoppressore in grado di: regolare la ricombinazione mitotica, partecipare alla riparazione del danno al DNA nonché alla repressione trascrizionale eterocromatinica. La frequenza della mutazione *JAK2-V616F* è del 95% in pazienti affetti da PV, circa il 50% in ET e PMF [4,6].

Nel 2006, è identificata una mutazione somatica attivante nel gene *MPL* che, attraverso l'attivazione del *pathway* JAK-STAT, regola la maturazione dei megacariociti e delle piastrine. La mutazione puntiforme, determinata dalla sostituzione del triptofano con la leucina al codone 515 (*MPL-W515L*), è stata descritta in pazienti con PMF negativi per *JAK2-V616F*. Similmente ai casi con mutazione del gene *JAK2*, quelle nel codone 515 del gene *MPL*, sono precoci e insorgono nelle cellule staminali emopoietiche (HSC). Tali mutazioni sono state osservate solo in pazienti con PMF e ET e non in soggetti con PV [6,7].

Nonostante il ruolo predominante delle mutazioni *JAK2-V617F* e *MPL-W515L* nella malattia, sono state descritte altre mutazioni con una più bassa frequenza: nell'esone 12 di *JAK2*, che determina anch'essa l'attivazione costitutiva del gene; nella famiglia di geni *TET* (*TET2*), *ASXL1* (*Additional Sex Combs-Like 1*), *EZH2* (*enhancer of zeste homolog 2*), che sembrano giocare un ruolo importante nella deregolazione epigenetica della trascrizione; *CBL* (*Casitas B-lineage lymphoma*), un protooncogene la cui alterazione genetica determina perdita della funzionalità e incrementa la proliferazione cellulare; *IDH* (*Isocitrate dehydrogenase*) cui consegue la formazione di un'oncoproteina che promuove la progressione della malattia; *LNK* (*as in Links*), un regolatore negativo del signaling di *JAK2*, e *IKZF1* (*IKAROS family zinc finger 1*) che codifica per il fattore di trascrizione Ikaros, regolatore emopoietico coinvolto nelle neoplasie linfoidi [13,14].

A queste mutazioni si associano alterazioni del cariotipo identificabili in aberrazioni nel numero dei cromosomi 1, 8 e 9; delezioni del cromosoma 5q, 13q, 20q e 9p; e disomie acquisite uni parentali (UPDs) [8].

Le mutazioni non sono mutualmente esclusive e probabilmente costituiscono eventi secondari nella gerarchia clonale che caratterizza la patologia [15]. Ad ogni modo l'eterogeneità fenotipica nelle varie MPN è associata alla molteplicità di alterazioni molecolari che possono verificarsi nel corso della malattia. In particolare sta emergendo la teoria secondo cui tali emopatie si originano da una mieloproliferazione oligoclonale piuttosto che monoclonale cambiando quanto affermato in studi precedenti secondo cui dal clone neoplastico ancestrale prendono origine specifici sub-cloni (Figura 1) [13].

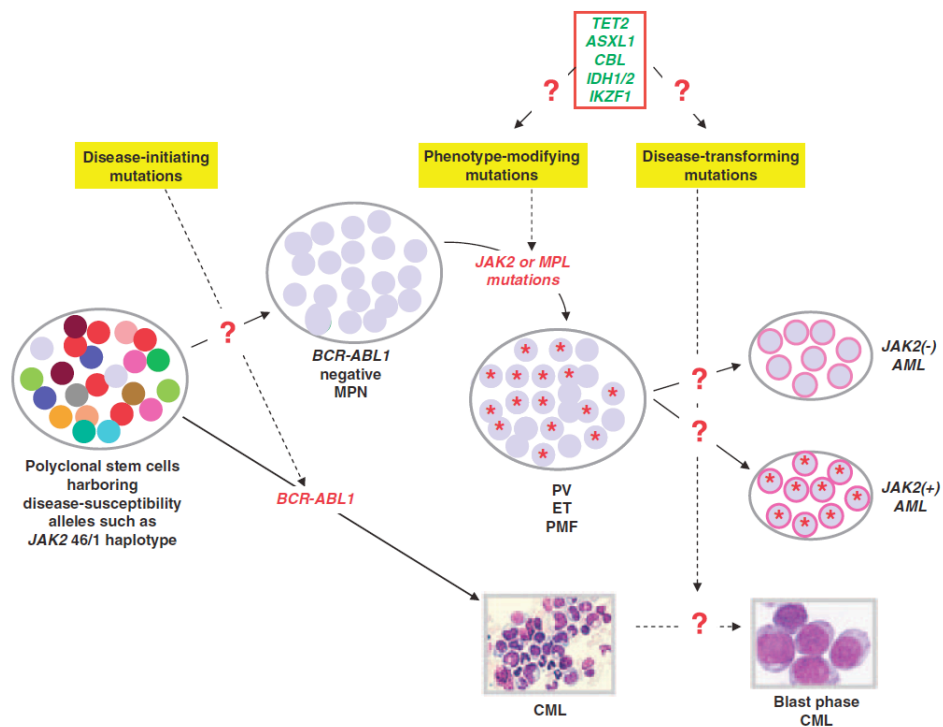


Figura 1. Origine clonale ed evoluzione delle neoplasie mieloproliferative. *Tefferi A. Leukemia 2010*

Alla mieloproliferazione clonale si accompagna uno stato infiammatorio secondario caratterizzato da modifiche stromali midollari e da un'anomala espressione di citochine pro-fibrogeniche e pro-angiogeniche, chemochine, metalloproteinasi (MMP) e i loro inibitori che contribuiscono ai processi di periferizzazione dei progenitori mieloidi e delle cellule endoteliali. Queste osservazioni indicano la possibilità che i mediatori infiammatori possono incidere sulla sopravvivenza e promuovere l'evoluzione clonale [15].

### 1.3 DIAGNOSI

La diagnosi delle MPN non si basa solo sul riscontro istologico ma è piuttosto l'integrazione tra le caratteristiche cliniche e laboratoristiche (anemia, aumentati livelli di lattato deidrogenasi, eritrocitosi, trombocitosi, granulocitosi) necessarie per una corretta diagnosi differenziale dalle forme di mieloproliferazione reattiva.

La genotipizzazione molecolare è diventata parte integrante dei criteri diagnostici (Figura 2) indicati nel WHO 2008, e l'analisi genetica delle mutazioni nei geni *JAK2* e *MPL* è diventata uno strumento standard per la diagnosi di MPN.

CRITERIA	POLYCYTHEMIA VERA	ESSENTIAL THROMBOCYTHEMIA	PRIMARY MYELOFIBROSIS
Major criteria	<p>1. Hgb &gt;18.5 g/dL (men) or &gt;16.5 g/dL (women)  <u>or</u> Hgb or Hct &gt; 99<sup>th</sup> percentile of reference range for age, sex, or altitude of residence  <u>or</u> Hgb &gt;17 g/dL (men) or &gt;15 g/dL (women) if associated with a documented and sustained increase of <math>\geq 2</math> g/dL from baseline that cannot be attributed to correction of iron deficiency  <u>or</u> elevated red cell mass &gt;25% above mean normal predicted value</p> <p>2. Presence of JAK2V617F or similar mutation</p>	<p>1. Sustained platelet count <math>\geq 450 \times 10^9/L</math>  2. BM showing proliferation mainly of the megakaryocytic lineage with increased numbers of enlarged, mature megakaryocytes. No significant increase or left-shift of neutrophil granulopoiesis or erythropoiesis  3. Not meeting the WHO criteria for PV, PMF, CML, or MDS or other myeloid neoplasm  4. Demonstration of JAK2V617F or other clonal marker  <u>or</u> no evidence of reactive thrombocytosis</p>	<p>1. Megakaryocyte proliferation and atypia* accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis  <u>or</u> In the absence of reticulin fibrosis, the megakaryocyte changes must be accompanied by increased marrow cellularity, granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis (ie, pre-fibrotic cellular-phase disease)</p> <p>2. Does not meet WHO criteria for CML, PV, MDS, or other myeloid neoplasm  3. Demonstration of JAK2V617F or other clonal marker  <u>or</u> no evidence of reactive marrow fibrosis</p>
Minor criteria	<p>1. BM showing hypercellularity for age and trilineage growth (panmyelosis)</p> <p>2. Subnormal serum Epo level</p> <p>3. EEC growth</p> <p>—</p>	—	<p>1. Leukoerythroblastosis</p> <p>2. Increased serum LDH</p> <p>3. Anemia</p> <p>4. Palpable splenomegaly</p>
Diagnostic combinations	Both major criteria + 1 minor criterion <u>or</u> first major criterion + 2 minor criteria	All 4 criteria must be met	All 3 major criteria + 2 minor criteria

Figura 3: Criteri diagnostici WHO per la diagnosi delle neoplasie mieloproliferative. *Vannucchi AM et al. CA Cancer J Clin. 2009*

Il rilevamento di una di queste mutazioni stabilisce inequivocabilmente la presenza di una neoplasia mieloproliferativa ed esclude la diagnosi di forme reattive, ma il loro riscontro non è di ausilio alla corretta identificazione della patologia neoplastica. Pertanto, la valutazione della morfologia del midollo osseo resta fondamentale per il corretto inquadramento delle MPN e, valore diagnostico importante è il riscontro del pattern proliferativo e morfologico dei megacariociti (Figura 3).

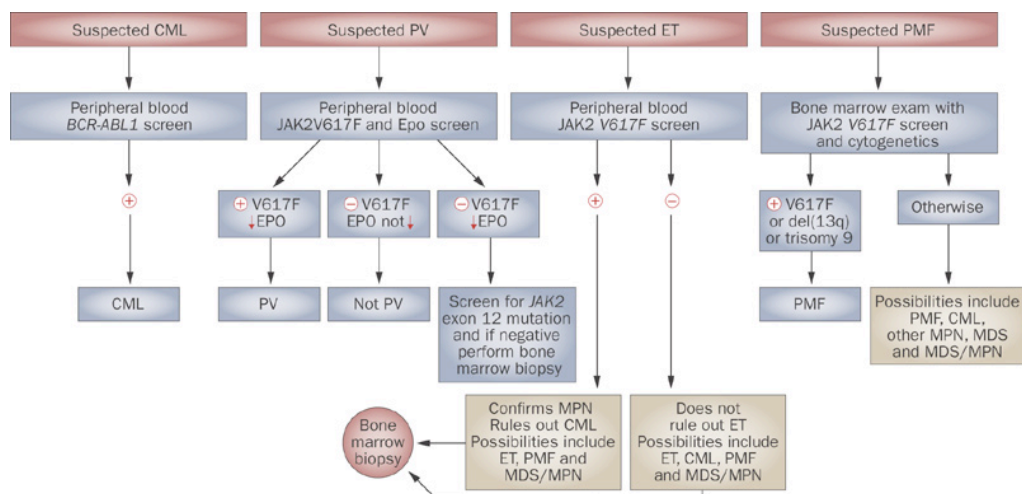


Figura 3: Algoritmo diagnostico basato sulla genetica e sull'istologia. *Tefferi A et al. Nat Rev Clin Oncol. 2009*



Per esempio, la formazione di cluster megacariocitari è caratteristica delle forme classiche di MPN (PV, ET e PMF) ed è meno comune nelle MDS e nelle forme reattive [4,15,16].

Nella biopsia osteomidollare sono evidenziabili alterazioni stromali, comuni in queste patologie, quali la fibrosi midollare, l'angiogenesi e l'osteosclerosi (Figura 4) [17,18].

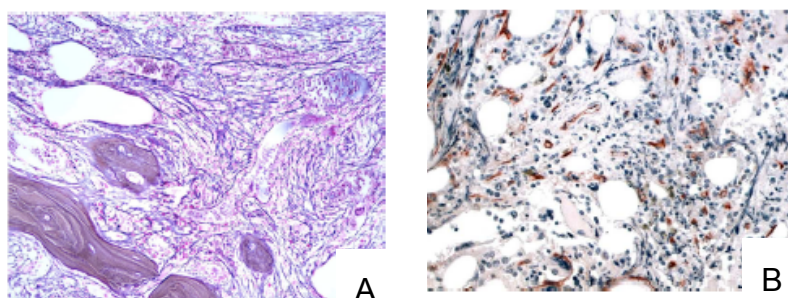


Figura 4: Alterazioni stromali nelle MPN. Sezioni di midollo colorate per fibre reticolari (Gomori) (A), CD34 (marcatore vascolare) (B).

La fibrosi è un evento secondario che non è legato alla trasformazione clonale dei fibroblasti ma alla produzione eccessiva di citochine e fattori di crescita da parte dei megacariociti e di altri tipi cellulari che stimolano la proliferazione dei fibroblasti, la sintesi e deposizione di fibronectina e di collagene. Dal punto di vista clinico, i pazienti affetti da MPN possono presentare, nelle fasi conclamate di malattia, splenomegalia ed epatomegalia, secondarie all'instaurarsi di emopoiesi extramidollare in queste sedi, che prende il nome di metaplasia mieloide. La metaplasia mieloide osservata in corso di MPN è causata dalla mobilizzazione delle cellule staminali emopoietiche dal midollo osseo a seguito di una progressiva trasformazione della nicchia emopoietica midollare, che rende inospitale la loro permanenza [4,5].

Sebbene l'evoluzione di tutte e tre le forme di MPN contempra la trasformazione verso forme acute, l'evento più frequente è la fibrosi midollare con conseguente fallimento dell'emopoiesi. L'evoluzione fibrotica, costante nella mielofibrosi primaria, possibile nella policitemia vera, molto rara nella trombocitemia essenziale, è in gran parte responsabile della differente prognosi e storia naturale di questi disordini. Se da un lato, infatti, la trombocitemia essenziale è nella maggior parte dei casi caratterizzata da una sopravvivenza a lungo termine sovrapponibile a quella di controlli sani e da un'incidenza di eventi avversi a carattere trombotico/emorragico molto bassa [19], la mielofibrosi primaria dall'altro ha i caratteri di una malattia rapidamente progressiva e letale [20,21].

La mediana di sopravvivenza è molto variabile, una parte dei pazienti muore poco dopo la diagnosi, mentre pochi sopravvivono per più tempo. Esistono diversi sistemi prognostici che permettono, mediante l'identificazione di fattori prognostici, la stratificazione di rischio dei pazienti affetti. Anche se oggi si avvicendano nuove terapie farmacologiche, il trattamento è essenzialmente palliativo e l'allo-trapianto (HSTC) è la cura di elezione, quindi, è necessario identificare correttamente i pazienti che possono trarne beneficio [22]. Lo score prognostico maggiormente utilizzato è lo score di Lillie particolarmente importante nei giovani pazienti che hanno la potenzialità di sfruttare l'HSTC; a questo sistema prognostico si affianca lo score di Cervantes che rappresenta uno strumento utile per aiutare il clinico e il paziente nella decisione terapeutica più appropriata [4,15, 23].

## 2. NICCHIA STAMINALE EMOPOIETICA

La presenza di un microambiente in grado di determinare il fato delle cellule staminali ematopoietiche (HSC) fu proposta nel 1978, quando R. Schofield ipotizzava una struttura in grado di ospitare e regolare le cellule staminali ematopoietiche [24]. Ad oggi, diverse evidenze scientifiche dimostrano che, per mantenere l'emopoiesi in vivo, le cellule stromali midollari si organizzano in compartimenti specializzati chiamate nicchie stromali dove le HSC e le cellule mesenchimali comunicano attraverso segnali trasmessi per contatto diretto cellula-cellula o cellula- matrice extracellulare (ECM) e mediante mediatori solubili (fattori di crescita e citochine).

Le nicchie sono compartimenti funzionali all'interno dei tessuti che sono in grado di ospitare e regolare l'auto-rinnovamento e il differenziamento delle HSC ma rappresentano inoltre, un microambiente che supporta le attività delle cellule immuni. Poiché il sistema emopoietico e quello immune devono rapidamente rispondere e adattarsi alle necessità dell'organismo, la nicchia, all'interno del midollo, non va vista come un compartimento statico bensì come un microambiente che processa e trasmette continuamente informazioni [25].

Studi hanno individuato una diversa localizzazione spaziale delle differenti popolazioni di HSC: l'analisi su sezioni di tessuto di midollo osseo ha mostrato che esse si localizzano principalmente in due distinte regioni, in particolare circa il 60% di queste cellule sono associate con le cellule endoteliali sinusoidali ed il 14% si trovano in prossimità della superficie endosteale [26].

La presenza di queste regioni ha introdotto il concetto che, in condizioni fisiologiche, le HSC risiedono principalmente in due nicchie; una chiamata *nicchia vascolare* localizzata in prossimità dei vasi sanguigni, l'altra chiamata *nicchia osteoblastica* localizzata in prossimità della superficie endosteale. La posizione delle HSC all'interno delle nicchie è dinamica e, in condizioni di stress, non solo possono spostarsi rapidamente dalla nicchia osteoblastica a quella vascolare (processo di mobilizzazione) passando poi alla circolazione sistemica; ma possono anche compiere il processo inverso, muovendosi dalla circolazione sistemica alla nicchia osteoblastica [27,28].

La nicchia osteoblastica, in stretta prossimità con le trabecole ossee, è principalmente costituita da fibroblasti endosteali e osteoblasti in associazione alle HSC, che mostrano un gradiente di maturazione attraverso le aree intertrabecolari nel parenchima midollare.

All'interno della nicchia osteoblastica cooperano segnali cellula-cellula e cellula matrice attraverso cui gli osteoblasti regolano lo stato di quiescenza e di auto rinnovamento delle HSC. Gli osteoblasti sintetizzano numerose citochine emopoietiche che includono G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-1, IL6, IL7 e CXCL12, importante chemochina coinvolta nei processi di mobilitazione delle HSC che possono modulare le funzioni delle HSC.

Gli osteoblasti sintetizzano molecole coinvolte nei *pathway* regolazione della nicchia come *Jagged* (Jag1) e l'*Angiopoietin-1* (Ang-1) che, attraverso l'interazione con i propri recettori *Notch* e *Tie2*, mantengono rispettivamente le cellule staminali in uno stato indifferenziato favorendo l'espansione del pool di staminali, e in uno stato di quiescenza. Esprimono, inoltre, numerose molecole di adesione (VCAM1, ICAM, annexin II, N-cadherin, CD44 e CD164) che facilitano, non solo le interazioni tra le diverse componenti cellulari, ma anche il transito delle HSC attraverso le nicchie. Le cellule osteoblastiche sono in grado di produrre una matrice extracellulare altamente mineralizzata creando alte concentrazioni di  $Ca^{2+}$  in prossimità della zona periendosteale a cui le cellule staminali rispondono attraverso il recettore sensibile al calcio. Attraverso la sintesi di RANK-L e M-CSF sono responsabili, in collaborazione con le cellule stromali, della maturazione degli osteoclasti che, una volta attivati, determinano la proliferazione e la mobilitazione delle HSC. Per mitigare l'azione di RANKL, gli stessi osteoblasti secernono l'osteoprotegerina (OPG) che, legandosi a RANKL, ne impedisce l'interazione con il recettore (RANK) presente sulla membrana degli osteoclasti. Altra popolazione, che partecipa alla modulazione dei processi localizzazione delle HSC all'interno della nicchia osteoblastica, è rappresentata dai macrofagi, infatti, la loro delezione *in vivo* determina la mobilitazione delle cellule staminali attraverso la riduzione nell'espressione di molecole di adesione e recettori chemochinici sulle cellule stromali e sugli osteoblasti. Inoltre i macrofagi sono sensibili all'azione del G-CSF che, esercitando un effetto inibitorio su questa popolazione cellulare, influenza a sua volta le altre componenti della nicchia. [25, 28, 29-31].

La nicchia vascolare è coinvolta nella maturazione e attivazione dei segnali di differenziazione cellulare e controlla l'intravasazione e l'extravasazione dal midollo osseo delle HSC così come degli elementi estranei, ad esempio cellule tumorali di origine non midollare. La nicchia vascolare sembra regolare l'emopoiesi non solo a livello del midollo ma anche in organi secondari quali la milza, supportando il concetto che le cellule endoteliali spleniche possano funzionare come una "nicchia di riserva" a supporto dell'espansione delle HSC e delle cellule progenitrici quando il midollo è sottoposto a

stress. Le cellule che organizzano la nicchia vascolare includono cellule endoteliali dei sinusoidi midollari e cellule stromali che esprimono il marcatore CD10. Le cellule endoteliali sintetizzano fattori che promuovono l'emopoiesi come il G-CSF, che promuove la mobilitazione delle HSC e dei progenitori emopoietici, GM-CSF, M-CSF, c-KIT (SCF), IL6 e FLT3. Mostrano inoltre l'espressione di molecole di adesione quali la E-selectina, la P-selectina utilizzate dalle HSC per la migrazione trans-endoteliale, ma anche V-CAM 1 e ICAM [25,28,29-31].

Studi sulle componenti cellulari della nicchia stromale midollare, hanno portato alla recente identificazione di cellule stromali CD146+ come cellule staminali mesenchimali multipotenti del midollo osseo (BMMSC). In un modello murino queste cellule si sono dimostrate capaci di organizzare un microambiente stromale completo in grado di sostenere l'emopoiesi attraverso l'espressione di citochine (tra cui VEGF, IL-3, GM-CSF, G-CSF) e molecole di adesione.

In condizioni fisiologiche le BMMSC CD146+ risiedono nella parete dei vasi sinusoidali in posizione sub-endoteliale e mostrano caratteristiche fenotipiche e funzionali proprie delle cellule murali avventizie (espressione di actina del muscolo liscio, NG2, deposizione di collagene e fibre) e sono in grado di promuovere la neoangiogenesi attraverso la produzione di angiopoietina-1 e la sua interazione con il recettore Tie-2 presente nelle cellule endoteliali [32,33].

Le cellule endoteliali, quindi, sono circondate da cellule staminali CD146+ che fungono da supporto strutturale e grazie al loro potenziale di staminalità possono rigenerare la popolazione cellulare di origine mesenchimale del midollo.

Nello stroma midollare è possibile identificare una sottopopolazione di cellule mesenchimali che produce elevati quantitativi di CXCL12 e pertanto prende il nome di cellula CAR (*CXCL12-abundant reticular cell*). Tale tipo cellulare non ha una posizione definita ma è piuttosto dispersa nel midollo e produce fattori che supportano l'emopoiesi e la quiescenza delle HSC. Un'altra componente del midollo, che non può essere facilmente assegnata ad una delle nicchie specializzate, è rappresentata dagli adipociti. Gli adipociti mostrano una correlazione inversa con la cellularità ematopoietica in condizioni fisiologiche (età correlate) e patologiche (fallimento midollare); hanno un ruolo attivo nel regolare l'omeostasi attraverso meccanismi di soppressione sulle HSC, mediante la riduzione del G-CSF, GM-CSF e il rilascio di adiponectina e TNF [25].

Quindi, sebbene la funzione tipicamente riconosciuta allo stroma midollare sia di supporto fisico e protezione delle HSC, esso ha un ruolo fondamentale nel formare il microambiente adatto ad ospitare l'ematopoiesi (Figura 5).

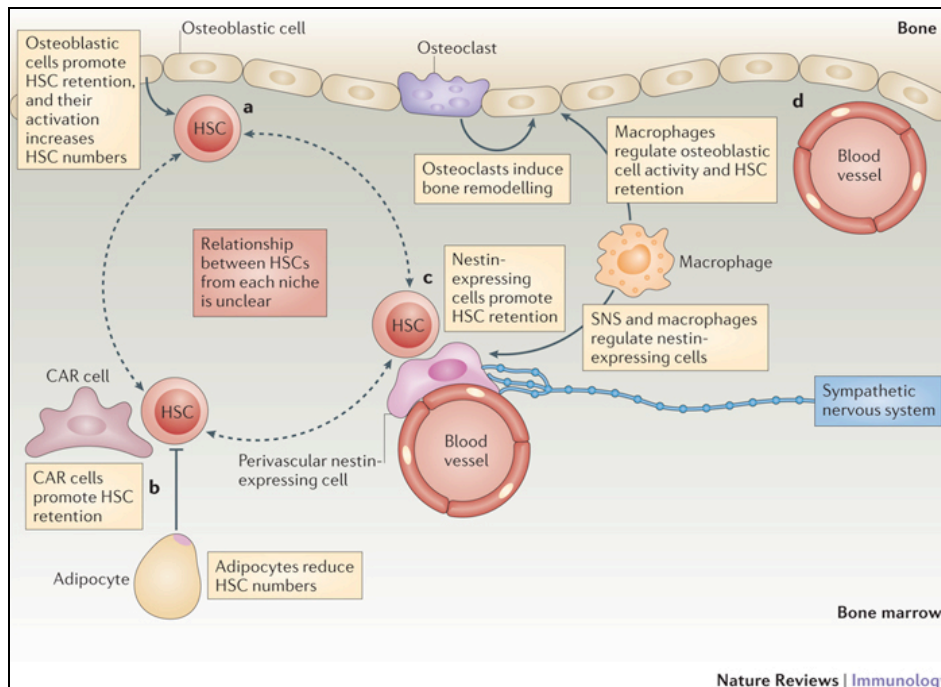


Figura 5: Nicchie emopoietiche staminali. *Mercier FE et al. Nat Rev Immunol. 2011*

## 2.1. LA NICCHIA MIDOLLARE NELLE NEOPLASIE MIELOIDI

Lo stroma midollare esercita un ruolo importante nella regolazione e nel mantenimento dell'emopoiesi quindi, alterazioni nella sua composizione possono emergere come fattore prognostico rilevante. Le neoplasie ematologiche sono caratterizzate da notevoli cambiamenti nel microambiente del midollo, determinati sia dalla pressione del clone neoplastico nel plasmare un microambiente adatto alla sua sopravvivenza sia da alterazioni croniche dell'omeostasi midollare. Prototipo sono le MPN, caratterizzate da radicali modifiche midollari rappresentate da angiogenesi, fibrosi e deposizione di nuovo osso (osteosclerosi), che assumono significato clinico e prognostico come indice di fallimento midollare [34].

Le alterazioni del microambiente stromale in corso di MPN sono conseguenza del rilascio nel microambiente di citochine pro-fibrotiche e pro-angiogeniche, come PDGF, FGF, TGF- $\beta$  e VEGF, da parte delle cellule mieloidi neoplastiche, che attivano cronicamente le

cellule dello stromali, inducendo modifiche nell'espressione delle molecole di adesione, un'eccessiva deposizione di matrice extracellulare e innescando meccanismi di angiogenesi.

I cambiamenti stromali indotti nelle MPN sono determinati anche dalla proliferazione delle cellule avventizie reticolari, identificate per mezzo del marcatore *Nerve growth factor* (NGF) e da un arricchimento nella componente staminale mesenchimale evidenziabile mediante il marcatore CD146 [34,35]. La presenza di queste cellule è significativamente aumentata negli stadi avanzati della mielofibrosi idiopatica e risulta associata alla presenza di indicatori del fallimento dell'emopoiesi midollare, alla fibrosi e alla densità microvascolare; evidenziando il loro coinvolgimento nei cambiamenti stromali che si verificano nelle fasi avanzate della PMF [36].

Altri studi, hanno dimostrato che, in casi di PMF in fase avanzata, l'incremento delle BM-MSK è associato a un'iperespressione del PDGFR- $\beta$ ; indicando il possibile ruolo di quest'ultimo nel sostenere la proliferazione di questi precursori mesenchimali [36].

Questo recettore è un membro della famiglia dei recettori per il fattore di crescita delle piastrine (PDGFR-A e PDGFR-B) comprendente recettori con attività TK implicati nelle vie di proliferazione e/o attivazione cellulare.

Comunque, i processi implicati nella patogenesi delle MPN sono conseguenza dell'alterazione nel *cross-talk* tra le cellule emopoietiche e stromali che, condizionate dal clone neoplastico, acquisiscono nuove proprietà e partecipano alla creazione di un microambiente atipico che favorisce il mantenimento del clone e compromette la normale emopoiesi. Secondo questa ipotesi, l'instabilità tra la nicchia endosteale e vascolare all'interno del midollo osseo prenderebbe parte alla patogenesi della malattia. Nei pazienti affetti da PMF, si osserva frequentemente, in prossimità dell'endotelio dei seni midollari e splenici, la presenza di gruppi di megacariociti distrofici e immaturi suggerendo che le nicchie vascolari svolgono un ruolo cruciale nella dismegacariopoiesi che caratterizza la PMF, probabilmente attraverso l'asse IL-8/CXCR1-2, deputato alla differenziazione dei megacariociti. A loro volta le citochine prodotte dal clone mediano la reazione del midollo attivando i meccanismi di angiogenesi e fibrosi.

Inoltre, l'aumentata produzione di osteoprotegerina e la sintesi di *bone morphogenetic protein 1* (BMP-1), da parte delle cellule stromali, potrebbe contribuire ad una sbilanciata attività osteogenica cui consegue l'osteosclerosi frequentemente associata a mielofibrosi nei pazienti affetti da panmielosi acuta (APMF) [34,35,37].

Considerando che HSC normali non possono sopravvivere in un microambiente patologico, si attiva la loro mobilizzazione dal midollo osseo verso organi sede di emopoiesi extramidollare quali la milza e il fegato. Questo processo è possibile grazie a diversi meccanismi, tra i quali, espressione alterata molecole di adesione della membrana e integrine, una ridotta espressione di CXCR4 sulle HSC, un'interruzione dell'asse CXCR4/SDF-1 in seguito a una riduzione nel milieu di CXCL12 ad opera di un incrementato *uptake* da parte del clone neoplastico e dalla sua degradazione ad opera di metallo proteinasi prodotte sia dal clone che dalle cellule infiammatorie richiamate dal clone neoplastico stesso [34,37,38].

Il *pathway* JAK/STAT è noto essere coinvolto nella attivazione di geni responsabili della sintesi di metalloproteasi, tale evidenza suggerisce che la mutazione *JAK2V617F* potrebbe prendere parte nel processo di mobilizzazione delle HSC.

Sebbene le alterazioni nello stroma midollare siano considerate secondarie a effetti delle citochine, lo stroma non è uno “spettatore innocente” ma ha un ruolo attivo nella patogenesi e nella progressione della malattia modificando sia il decorso clinico che la risposta alla terapia [37,38].



### 3. PROTEINE MATRICELLULARI

La matrice extracellulare (ECM) è ormai considerata come un regolatore dinamico e multifunzionale non è più come un'impalcatura inerte per l'organizzazione delle cellule nei tessuti. L'ECM è in grado di modulare la biodisponibilità e l'attività di fattori di crescita, di citochine, di chemochine, ed enzimi extracellulari; inoltre, le proteine che compongono la matrice possono interagire direttamente con recettori di superficie e innescare l'attivazione di trasduzione del segnale, regolando così le diverse funzioni cellulari [39,40]. Le proteine matricellulari, classe di proteine non strutturali della ECM, possiedono funzioni regolatorie attuate mediante diretto legame ad altre proteine della matrice, a specifici recettori di superficie così come a fattori di crescita e citochine [41] cellulari ad altri fattori ambientali. Alcune di queste proteine sono membri della famiglia *Small Integrin Binding Ligands* (SIBLINGS) e agiscono attraverso i recettori per le integrine. Questo piccolo gruppo di proteine include la trombospondina (TSP-1, TSP-2), SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), l'Osteopontina (OPN), la Tenascina (TN-C, TN-X) e membri della famiglia CCN (che comprendono 6 membri, CCN1-6), mostrano bassi livelli di espressione basale nei soggetti adulti ma sono tempestivamente up-regolati durante i processi di *wound healing* e rimodellamento tissutale, quali la formazione di decidua, il rimodellamento miocardiale e in risposta a patogeni esterni; la loro espressione aberrante è associata con lo sviluppo e la progressione tumorale [41-44]. Inoltre, alcune proteine matricellulari, come SPARC e CCN3, possono traslocare al nucleo e fungere, rispettivamente, da inibitori del ciclo cellulare e regolatori della trascrizione genica [45,46].

La famiglia di proteine SPARC è rappresentata da diversi membri: SPARC, *hevin* chiamata anche *SPARC-like*, *secreted modular calcium binding protein* (SMOC) 1 e 2, *testicans* 1, 2 e 3 (SPOCK) e *follicle-stimulating protein like protein 1* (FSLT1). Ogni membro possiede un dominio legante il calcio (EC) e un dominio E-F costituito da *helix loop helix*. In base alle sequenze di omologia i membri di tale famiglia possono essere separati in 4 gruppi filogenetici: (1) SPARC e *hevin*; (2) SMOC 1 e 2; (3) *testicans* 1,2 e 3; (4) FSLT1 (figura 6) [47].

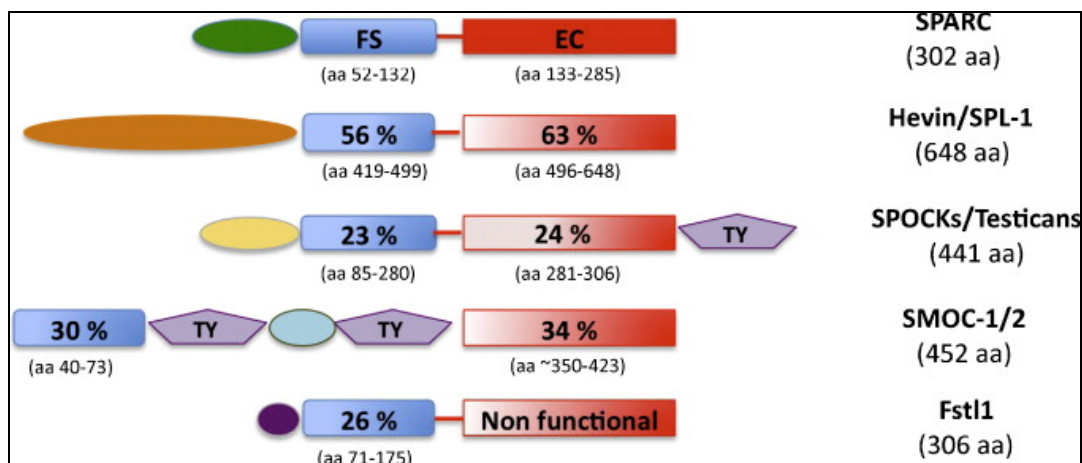


Figura 6: Rappresentazione schematica dei domini strutturali della famiglia di proteine SPARC. Bradshaw AD. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012

### 3.1 SPARC: STRUTTURA E FUNZIONE

SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine), denominata anche osteonectina o BM-40, è il prototipo di un sottogruppo di glicoproteine leganti il  $\text{Ca}^{2+}$  appartenente alla famiglia di proteine matricellulari; la proteina è espressa da differenti tipi cellulari e i suoi livelli sono elevati nei tessuti in rimodellamento, nei quali è stato ipotizzato influenzare l'omeostasi tissutale [48]. SPARC è codificata da un singolo gene localizzato sul cromosoma 5 (5q31-33), la proteina è costituita da 298- 304 aminoacidi e i primi 17 costituiscono la sequenza segnale che viene clivata prima che la proteina venga secreta. Dopo il clivaggio della sequenza segnale il suo peso molecolare è di 32-kD, e la forma secreta migra, in saggi di SDS PAGE, a 43 kD, evento determinato dall'aggiunta di carboidarati operata durante i processi di glicosilazione. Nell'uomo la proteina consta di 286 residui aa ed è divisa in tre distinti domini [48,49]. Il dominio I N-terminale (residui 1–52 dopo la sequenza segnale di 17aa) regione ricca in aa acidi, contiene i maggiori epitopi immunologici di SPARC, lega ioni  $\text{Ca}^{2+}$  a bassa affinità e interagisce con l'idrossiapatite. Tale caratteristica implica il suo coinvolgimento nei processi di mineralizzazione della cartilagine e dell'osso.

Il dominio II *follistatin-like* (FS) (residui 52–132), è omologo alla follistatina, una proteina che lega membri della superfamiglia del TGF- $\beta$ , e agli inibitori di proteasi *Kazal-type*, contiene due siti leganti il rame, uno di questi, la sequenza KGHK (residui 119–132), stimola la proliferazione cellulare e l'angiogenesi.

Il dominio III (*EC domain*) (dominio extracellulare legante il calcio, residui 133–286) è in gran parte costituito da strutture ad  $\alpha$  elica, contiene una coppia canonica di *EF-hands* (*helix-loop-helix*), con alta affinità per il  $\text{Ca}^{2+}$ , capacità di legame al collagene IV e alle cellule endoteliali e un sito responsabile del clivaggio ad opera delle metallo proteinasi (MMP) (Figura 7) [48-50].

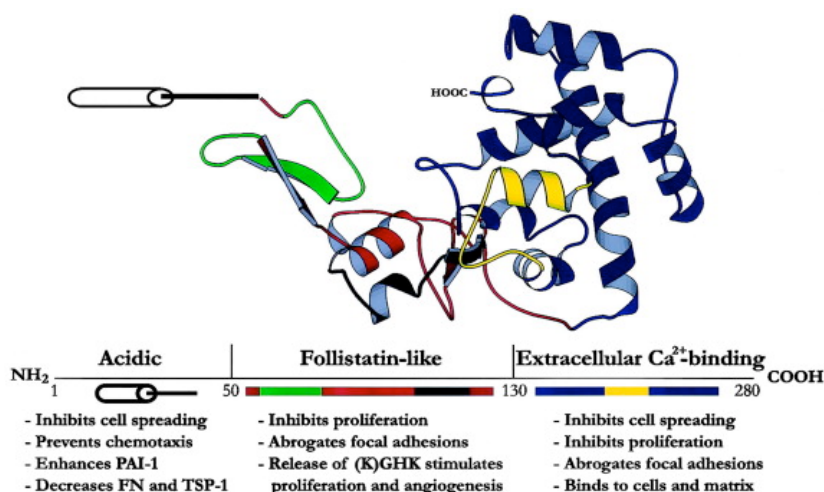


Figura 7: Struttura della proteina SPARC. Yan Q et al. J Histochem Cytochem. 1999

SPARC è espresso durante processi fisiologici quali l'embriogenesi, il wound healing, il rimodellamento tissutale [49-51]; ad esempio elevati livelli di SPARC inibiscono l'adipogenesi e sono sintetizzati dagli osteoblasti durante il processo di osteoblastogenesi [52,53]. Il suo ruolo nelle patologie non è ancora stato chiarito. Nell'ambito delle neoplasie assume funzioni variabili in quanto, tale proteina agisce sia come oncogene che come oncosoppressore; tale variabilità è tuttavia dipendente sia dall'istotipo sia dal microambiente tumorale. Interviene anche a processi patologici come la stromatogenesi tumorale e la transizione epitelio mesenchimale (EMT) [42,43] e nelle lesioni aterosclerotiche le cellule muscolari e i macrofagi sembrano essere una fonte di SPARC [48]. Tutte queste patologie hanno un comune denominatore che include il rimodellamento tissutale, la sintesi di matrice e il suo *turnover*, e alterati livelli di proliferazione cellulare, tutti meccanismi legati alla variabile espressione di SPARC.

La proteina SPARC ha il potenziale per contribuire all'organizzazione della matrice extracellulare (ECM) sia nel tessuto connettivo che nella membrana basale. E' noto, infatti,

il suo coinvolgimento nel legame a differenti componenti della ECM quali: la trombospodina 1, la vitronectina, entactina/nidogeno, ma le interazioni meglio caratterizzate sono quelle con i collagene fibrillari (tipo I, II, III e V), e il collagene di tipo IV, maggiormente rappresentato nella membrana basale [48-51,54].

Il legame di SPARC al collagene dipende dalla concentrazione di  $Ca^{2+}$  e dal grado di glicosilazione della proteina. Ad esempio, SPARC espresso nel colletto osseo durante i processi di osteogenesi è caratterizzato da una struttura ad alto mannosio ed esibisce una più elevata affinità di legame per il collagene I rispetto a SPARC prodotto da altre componenti cellulari che mancano di tale struttura [55].

L'evidenza che SPARC lega i collagene suggerisce un suo ruolo nell'assemblaggio della ECM e la caratterizzazione fenotipica di topi *null* per SPARC ha rilevato un numero di patologie aberranti nella composizione e assemblaggio della matrice extracellulare [54].

Tali dati dimostrano come nel tessuto connettivo di topi SPARC *null* siano state riscontrate alterazioni sia nel contenuto di collagene fibrillare che nella loro morfologia rispetto ai topi WT; inoltre, l'analisi della membrana basale del cristallino dei topi SPARC *null* mostra espressione aberrante del collagene IV rispetto alla controparte normale [54].

SPARC può intervenire anche nella regolazione dei *pathway* attivati in seguito al legame del collagene ai suoi recettori [56]; infatti, uno studio identifica nella regione che lega il collagene sequenze di omologia con il recettore del collagene *discoidin domain receptor* (DDR) 2. Vista la forte analogia strutturale, queste due molecole potrebbero competere per il legame al collagene; pertanto quando SPARC lega il collagene ne limita il legame al recettore DDR2 diminuendo il pathway a valle indotto dall'attività TK di DDR2. Se SPARC compete con DDR2 per il legame al collagene l'espressione di SPARC potrebbe regolare l'attività di DDR2 e gli eventi successivi alla trasduzione del segnale [47].

Esperimenti *in vitro* e *in vivo* hanno evidenziato come l'affinità di legame di SPARC per il collagene aumenta in seguito al clivaggio ad opera di metallo proteinasi (MMP), una famiglia di enzimi considerati i mediatori della proteolisi e del turnover della matrice, che a loro volta sono regolati da SPARC suggerendo il suo coinvolgimento in un *loop* positivo paracrino o autocrino [47,49,50].

Nei fibroblasti sinoviali SPARC induce l'attivazione delle MMP-1, -3 e -9 e processi neoplastici è stato visto incrementare l'attività di MT1-MMP e MMP2 nelle cellule di glioma e l'attività della MMP2 nel carcinoma mammario [47].

La funzione regolatoria di SPARC si espleta anche mediante la sua capacità di legare a fattori di crescita quali il *platelet-derived growth factor* (PDGF), il *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), il *basic fibroblast growth factor* (bFGF) e il *transforming growth factor beta 1* (TGF- $\beta$ 1). Studi hanno provato una stretta associazione tra SPARC e i dimeri del PDGF AB e BB ma non con quello AA. L'affinità di SPARC a questo importante fattore di crescita può regolare la disponibilità dei dimeri di PDGF e influenzare la sua attività biologica.

Il VEGF ha basse ma significative, sequenze di omologia con il PDGF (20% di analogia nella sequenza amminoacidica) ed è stato dimostrato che l'interazione di SPARC e il VEGF interferisce con il legame del fattore di crescita vascolare al recettore Flt1 inibendo la proliferazione endoteliale e quindi l'attivazione dell'angiogenesi.

Quindi, SPARC influenza l'attività di tali fattori di crescita attraverso un legame diretto con le proteine ma, può agire anche in modo indiretto, come avviene per il bFGF con il quale non ha un contatto fisico che impedisce il legame al suo recettore, ma interviene inibendo la fosforilazione del recettore del bFGF, interrompendone il *signaling*. Un altro importante, e ampiamente distribuito, fattore di crescita è il TGF- $\beta$ 1, proteina associata al rimodellamento del tessuto connettivo e alla regolazione dell'espressione delle proteine di matrice extracellulare, incluso SPARC, attraverso la regolazione di meccanismi post-traccrizionali. Altri dati indicano che lo stesso SPARC può aumentare l'espressione del TGF $\beta$ 1 in colture di cellule mesangiali murine suggerendo l'esistenza di un *loop* autocrino positivo tra le due proteine [47-50].

Quindi, sono stati proposti vari meccanismi messi in atto da SPARC nella regolazione dei fattori di crescita nello spazio extracellulare che modulano l'attività dei recettori dei fattori di crescita sia attraverso l'interazione con i ligandi che con gli stessi recettori.

### 3.2 SPARC NELLE NEOPLASIE MIELOIDI E NEI PROCESSI FIBROTICI

SPARC gioca un ruolo chiave nel mantenimento e ripristino dell'omeostasi tissutale [39]. L'Alterazione nell'espressione di SPARC è associata sia a condizioni fisiologiche come l'embriogenesi, il rimodellamento tissutale, il *wound healing* ma anche a processi patologici come la stromatogenesi tumorale e la transizione epitelio mesenchimale (EMT) [39,40]. Studi condotti su neoplasie mieloidi hanno individuato nella perdita di espressione

di SPARC un fattore decisivo per l'insorgenza di AML e MDS [57-60]. Infatti, l'espressione bassa o assente di SPARC, sembra coinvolta in un subset di leucemie con riarrangiamento del gene MLL, dimostrata dall'evidenza che la somministrazione della proteina esogena comportava una riduzione nella crescita neoplastica attraverso il blocco della progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 a quella S. Tale dato indica che SPARC potrebbe funzionare come un soppressore tumorale e quindi potrebbe essere considerato una valida opzione terapeutica in questi pazienti [57].

La delezione di SPARC sembra essere associata alla sindrome MDS 5q-, in quanto il gene, locato all'interno della comune regione di delezione (CRD) del cromosoma 5q (5q31-q32), oltre ad possedere un ruolo antitumorale potrebbe essere importante nel mantenimento dell'omeostasi emopoietica [58-60].

Di contro l'overespressione di SPARC, che caratterizza una linea cellulare di CML resistente all'Imatinib, causata dall'attivazione costitutiva del *pathway* di ERK, conferisce a SPARC un ruolo antiapoptotico e di sopravvivenza e quindi potrebbe essere responsabile di un possibile meccanismo di resistenza alla terapia [61].

E' noto che SPARC regola l'assemblaggio e la composizione della matrice extracellulare [16] ed è costantemente coinvolto nella patogenesi delle patologie fibrotiche, processo in cui la deposizione di fibre reticolari e collageniche avviene in seguito all'attivazione di processi infiammatori dei tessuti offesi e da rigenerazione imperfetta degli stessi.

Noto è il coinvolgimento di SPARC nella fibrosi polmonare indotta da bleomicina [62]. Particolarmente interessante è come la diversa fonte cellulare di SPARC regoli in modo differente il processo infiammatorio e la deposizione di collagene, dato dimostrato grazie all'uso di reciproche chimere midollari Sparc (-/-) e *wild-type* (WT). La sintesi di SPARC da parte dei fibroblasti è necessaria all'induzione di collagene in ambiente infiammatorio, di conseguenza, le chimere Sparc (-/-)>WT mostrano infiammazione e fibrosi, esacerbata dall'incapacità dei macrofagi Sparc (-/-) di *down-regolare* la produzione di *tumor necrosis factor* (TNF) in seguito ad una risposta ridotta al fattore di crescita tumorale- $\beta$  [63]. Il ruolo patogenetico di SPARC è stato identificato anche in patologie epatiche come la cirrosi e la fibrosi epatica. L'overespressione di tale proteina nelle cellule stellate attivate epatiche (aHSCs), analoghe delle cellule staminali mesenchimali del midollo, è implicata nell'induzione dell'attività pro fibrogenica di TGF- $\beta$  1 e del PDGF-BB, identificando, quindi, in SPARC come un potenziale bersaglio terapeutico per la cura della fibrosi epatica [64]. Sebbene sia noto che il TGF- $\beta$ 1 induce SPARC e il collagene di tipo I, è stato

recentemente dimostrato un loop autocrino tra SPARC e TGF- $\beta$ 1, nel quale, attraverso la fosforilazione di Smad2, SPARC è direttamente coinvolto nella regolazione della cascata di segnali del pathway del TGF- $\beta$ 1 e del collagene di tipo I in cellule renali mesangiali. L'effetto di SPARC sul pathway del TGF- $\beta$ 1 sembra essere mediata dall'interazione con suo recettore di tipo II ma solo in presenza di TGF- $\beta$ 1 [65,66]. Oltre che regolare l'espressione di collagene di tipo I e TGF- $\beta$ 1 SPARC è over espresso durante i processi di fibrosi tubulo-interstiziale, in seguito ad infusione di ANG II. La perdita di funzione SPARC fornisce un effetto protettivo sul danno renale associato a fibrosi suggerendo che SPARC è un effettore a valle dell'ANG II [67]. Numerosi studi, indicano che l'inibizione specifica di SPARC mediante siRNA, riduce efficacemente la fibrosi *in vitro* e *in vivo*, quindi è ipotizzabile che l'inibizione di SPARC possa rappresentare un potenziale approccio terapeutico alle malattie fibrotiche [68,69].

#### 4. SCOPO DELLA TESI

Lo studio ha come oggetto quello indagare il ruolo funzionale del microambiente nelle MPN. Tali patologie hanno il potenziale di andare incontro ad alterazioni stromali aberranti (fibrosi midollare e osteosclerosi), indotte dal clone neoplastico mediante la secrezione di citochine pro-angiogeniche e pro-fibrotiche, e da una graduale progressione clonale che culmina nel fallimento midollare. Il riscontro di tali modifiche nella nicchia emopoietica indica una prognosi sfavorevole ed esercita un'influenza negativa sull'“*outcome*”. Sebbene le alterazioni nello stroma midollare siano considerate secondarie a effetti delle citochine, lo stroma non è uno “spettatore innocente” ma ha un ruolo attivo nella patogenesi e nella progressione della malattia modificando sia il decorso clinico che la risposta alla terapia. I processi implicati nella patogenesi delle MPN sono quindi conseguenza dell'alterazione nel cross-talk tra le cellule emopoietiche e stromali che, condizionate dal clone neoplastico, acquisiscono nuove proprietà e partecipano alla creazione di un microambiente atipico che favorisce il mantenimento del clone e compromette la normale emopoiesi. Secondo questa ipotesi, l'instabilità tra la nicchia endosteale e vascolare all'interno del midollo osseo prenderebbe parte alla patogenesi della malattia.

Non è ancora nota la natura dei fattori intrinseci allo stroma e il loro ruolo nell'orchestrare i cambiamenti nel midollo e la progressione del clone mieloide e al fine di individuare un potenziale agente è stato studiato il ruolo delle BM-MSc CD146+, che incrementano in modo proporzionale all'entità del danno stromale, e l'espressione di SPARC una proteina matricellulare, importante nel mantenimento e nel ripristino dell'omeostasi tissutale. Tale proteina regola l'assemblaggio e la composizione della matrice extracellulare e un suo coinvolgimento nei processi fibrotici è stato dimostrato in altri *setting* patologici. Inoltre, nelle neoplasie mieloidi l'espressione bassa o assente di SPARC è implicata nella patogenesi della AML e la sua delezione sia associata alla sindrome mielodisplastica 5q-, comprovando una sua possibile funzione nel mantenimento dell'omeostasi emopoietica. Di contro, la sua elevata espressione nelle cellule di CML conferisce resistenza farmacologica all'Imatinib favorendo la progressione della neoplasia.

Nella presente tesi è stato analizzato, quindi, il ruolo di SPARC come possibile candidato responsabile delle alterazioni stromali associate a mielofibrosi al fine di individuare nel microambiente un possibile marcatore diagnostico con significato prognostico.



## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 Selezione dei casi

Le biopsie osteomidollari di pazienti affetti da MPN sono state selezionate dagli archivi della sezione di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute del Policlinico Universitario P. Giaccone di Palermo. Per lo studio sono stati selezionati:

- 10 casi di trombocitemia reattiva,
- 6 casi con linfoma di Hodgkin senza coinvolgimento midollare,

utilizzati come controllo.

- 10 casi di AML,
- 10 casi di MDS,
- 12 di ET,
- 10 casi PV,
- 56 casi di PMF.

Tutti i campioni sono stati diagnosticati tra dicembre 2008 e gennaio 2011 e valutati secondo i criteri di classificazione WHO. Nello studio sono state incluse solo le biopsie osteomidollari dei pazienti che, al tempo della diagnosi, non avevano iniziato il trattamento. I dati istologici sono stati corroborati dai parametri clinici: età, sesso, livelli di emoglobina (Hb), conta leucocitaria (WBC) e conta piastrinica (PLT). Tutte le procedure sono conformi alla Dichiarazione di Helsinki.

### 5.2 Modello murino

Topi BALB/cAnNCrI, da 8 a 10 settimane di età, sono stati acquistati dai laboratori Charles River (Calco, Italia). I topi CNCr.129S(B6)-Sparctm1Hwe sono stati sviluppati nei laboratori dell'Istituto Tumori di Milano come descritto in letteratura [63]. I topi *Apc<sup>min</sup>* (B6, Ly5b) sono un gentile omaggio del Dr. Antonio Sica (Fondazione Istituto Clinico Humanitas, Milan, Italy). Le chimere murine Sparc<sup>-/-</sup>>wild type (WT)(Thy-1b>Thy-1a), WT>Sparc<sup>-/-</sup>(Thy-1a>Thy-1b), WT>WT(Thy-1a>Thy-1b), Sparc<sup>-/-</sup>>Sparc<sup>-/-</sup>(Thy-1b>Thy-

1b),  $Apc^{min}>WT$  (Ly5b>Ly5a), e  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  (Ly5b>Ly5a) sono ottenute dal trapianto di midollo (BMT) come riportato in letteratura [63]. L'avvenuto trapianto è stato verificato da 6 a 8 settimane tramite analisi citofluorimetrica (FACS) delle cellule mononucleate del sangue periferico in base all'espressione dei marcatori Thy-1a (Becton Dickinson, USA) e Thy-1b (Becton Dickinson) o Ly5a (Becton Dickinson) e Ly5b (Becton Dickinson). Gli esperimenti animali sono stati autorizzati dal Comitato Etico Istituzionale per la Regolamentazione sulla Sperimentazione Animale.

### 5.3 *Trattamento in vivo con trombopoiteina ricombinante (TPO)*

La TPO ricombinante murina (Peprotech, Italy) e la soluzione salina, sono state iniettate per via intraperitoneale sia nelle chimere che in topi WT e  $Sparc^{-/-}$  alla dose giornaliera di 500µg/Kg per 10 e 14 giorni [70]. Dopo il trattamento, il sangue periferico è stato prelevato ed analizzato per determinare i valori di Hb, PLT e le cellule mieloidi  $Gr1^{+}Mac-1^{+}$  mediante FACS. Allo stesso *endpoint*, i topi sono stati sacrificati e le milze, i femori e le tibie sono state prelevate per eseguire le indagini istomorfologiche/immunofenotipiche, citofluorimetriche e per i saggi di formazione delle colonie midollari.

### 5.4 *Analisi istologica ed immunoistochimica*

L'analisi istologica su tessuto umano e murino è stata effettuata previa fissazione dei campioni in formalina neutra tamponata al 10%. Sulle sezioni, dello spessore di 4µm sono state eseguite le colorazioni istochimiche di routine Ematossilina & Eosina, Gomori, Tricromica di Masson. Il grado di fibrosi, su sezioni umane e murine, è stato stimato mediante valutazione semiquantitativa secondo le indicazioni fornite dall'*European Consensus Grading System* [18] che fissa un *range* da 0 (normale contenuto di fibre midollari) a 3 (aumento diffuso e denso in reticolina, con ampie intersezioni di grossolani fasci di collagene, associata osteosclerosi). L'immunoistochimica, su sezioni umane e murine, è stata eseguita su sezioni dello spessore 4µm, preventivamente deparaffinate, e idratate. I vetrini sono stati poi trattati al calore in tampone pH6 o pH9, in base alle indicazioni fornite dalla ditta fornitrice, e incubati con  $H_2O_2$  per inibire le perossidasi endogene del tessuto. Per prevenire eventuali legami aspecifici, i campioni sono stati

trattati con uno specifico blocco proteico e incubate con l'anticorpo primario a 4°C *overnight*.

Gli anticorpi, utilizzati per lo studio immunohistochimico, sono i seguenti: mouse anti-human SPARC (clone ON1-1, Takara, Japan), rat anti-mouse SPARC (clone 124413, R&D, USA) mouse anti-human CD146 (clone N1238, Novocastra, UK), mouse anti-human Collagen type-I (clone I-8H5, Acris, Germany), rabbit anti-mouse Collagen type-I (Abcam, UK) rabbit anti-human Fibronectin (clone F1, AbCam), mouse anti-human CD34 (clone Qbend/10, Novocastra) mouse anti-human CD56 (clone 1B6, Novocastra). Un controllo negativo è stato eseguito per ciascuno dei marcatori testati utilizzando sieri immuni di topo, ratto o coniglio in sostituzione agli anticorpi primari.

Dopo l'incubazione, la rivelazione dell'antigene è stata effettuata mediante kit polimerico-HRP coniugato (NOVOCASTRA,UK) e come cromogeni sono stati utilizzati l'Aminoethyl-carbazole (AEC) e la 3-3'-Diaminobenzidina (DAB). Le sezioni sono state poi contrastate con ematossilina, disidratate e montate.

I vetrini sono stati analizzati al microscopio ottico Leica-DM2000 (Leica Microsystems, Germany), e le immagini fotografiche sono state collezionate utilizzando una camera digitale Leica-DFC320 e un software Leica-IM50 (versione 4.0, Leica Microsystems).

Il numero di cellule SPARC+ E CD146+ è stato determinato contando il numero assoluto di cellule reattive con morfologia stromale in 10 campi differenti ad alto ingrandimento (HPF, ingrandimento x400) e effettuata, poi, la media della conta dei 10 campi; similmente, è stata determinata la densità microvascolare (MVD) attraverso la conta delle strutture vascolari CD34+. La conta delle differenti popolazioni midollari sul tessuto murino è stata eseguita contando il numero assoluto di neutrofili, eosinofili, precursori eritroidi, cellule linfoidi, megacariociti e precursori mieloidi immaturi alla morfologia in 10 campi HPF e effettuata, poi, la media della conta. Per valutare il numero di cellule mieloidi Ki67+ sulle chimere murine è stata utilizzata la stessa procedura ed eseguita la media.

### *5.5 Isolamento, coltura e trattamento di BM-MSC umane e murine*

Le BM-MSC sono state isolate da aspirati midollari di pazienti soggetti a stadiazione per linfoma di Hodgkin dopo consenso informato. Per l'isolamento delle BM-MSC, gli aspirati midollari sono stati diluiti in PBS e centrifugati in gradiente di Ficoll-Hypaque (Sigma,

USA) per 30 minuti a 400g. Le cellule ottenute sono state risospese, lavate e trattate con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in ghiaccio (StemCell Technologies, Canada) per 10 minuti al fine di rimuovere i globuli rossi residui. Le cellule sono state poste in fiasca e coltivate in terreno in  $\alpha$ -MEM (LiStarFish, Italy) (Sigma Aldrich, Italy) contenente il 20% FBS (Sigma Aldrich), 100 U/mL di penicillina, 100 mg/mL streptomina (Sigma Aldrich), e 2 mmol/L glutammmina (Invitrogen, USA). Le cellule, giunte a confluenza, sono state staccate dal supporto in plastica mediante tripsina/EDTA e seminate alla densità 1:3. Le colture cellulari sono mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C e 5%  $\text{CO}_2$ . Prima del loro utilizzo, le cellule sono state fenotipizzate mediante analisi citofluorimetrica. Le BM-MSC murine sono state ottenute dalla frazione trabecolare della tibia e del femore di topi WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> dopo trattamento di 3-4 h con una soluzione di collagenase di tipo IV /dispasi (1 mg/ml) e poi selezionate attraverso un filtro cellulare (70m, Becton Dickinson, USA). Le cellule raccolte sono state contate e la frazione *lineage negative* ( $\text{Lin}^-$ ) è stata ottenuta attraverso separazione magnetica (Miltenyi, Germany). Le cellule  $\text{Lin}^-$  sono state poi seminate alla concentrazione di  $1-2 \times 10^6$  cellule/ml in piastre da 6 pozzetti (Becton Dickinson) in MesenCult® Proliferation Kit (Stem Cell Technologies, USA). Dopo 72h, le cellule non aderenti sono rimosse e il terreno di coltura sostituito ogni 3-4 giorni. Le cellule sono state separate per primo passaggio tra il 14° e 21° giorno, e fenotipizzate mediante analisi FACS. Gli esperimenti in vitro su BM-MSC umano e murino sono eseguite utilizzando le cellule tra il 2° e 8° passaggio.

Per l'induzione del differenziamento osteogenico e adipogenico, le BM-MSC umane sono state seminate in multiwell da sei pozzetti (Becton Dickinson) in terreno completo al 70% di confluenza. Dopo 24 h, i mezzi di coltura sono stati sostituiti con un terreno specifico per la differenziazione osteogenica e adipogenica (StemCell Technologies), e coltivate per 28 giorni. L'acquisizione del fenotipo osteoblastico e adipocitico è stata valutata mediante analisi morfologica su cellule colorate con von Kossa o alizarina Red, e Oil Red O, rispettivamente (tutti da Sigma Aldrich, USA). I lisati, in condizioni basali (T0) e a diversi tempi di differenziazione (T 7, T 14, T 21 e T 28 giorni) sono stati raccolti per l'analisi western blot (WB).

La stimolazione con TGF- $\beta$ 1 ricombinante (rTGF- $\beta$ 1) è stata eseguita su BM-MSC murine ottenute da topi WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> seminate in piastra multiwell da 6 pozzetti in medium completo al 70-80% di confluenza, successivamente sono state trattate per 24h con terreno

serum-free (Invitrogen,USA), e trattate con rTGF- $\beta$ 1 10ng/ml (R&D,USA) per 48h prima dei saggi di WB.

### *5.6 Condizione di coltura e analisi delle cellule emopoietiche murine Lineage negative*

Le cellule Lineage negative (Lin<sup>-</sup>) sono state isolate dal midollo mediante selezione negativa utilizzando il Lineage Cell Depletion Kit (Miltenyi, Germany). Per I saggi di co-cultura, 10<sup>4</sup> cellule Lin<sup>-</sup> cells sono state seminate in piastre da 24 pozzetti in un terreno StemSpan serum-free (Stem Cell Technologies) supplementato con una combinazione di 10ng/mL di SCF (PeproTech) e 20ng/mL TPO (PeproTech). Le cellule sono poi coltivate da sole o in presenza di monostrato confluyente di BM-MSc WT e Sparc<sup>-/-</sup>. Dopo sette giorni di coltura le cellule sono fenotipizzate mediante FACS per l'espressione del CD45.2 e per l'espressione dei marcatori mieloidi Gr-1 e F4/80.

### *5.7 Saggi di Western Blotting*

L'analisi WB è stata eseguita su BM-MSc umane e murine, lisate in piastra mediante RIPA buffer (Roche, Italy). Il supernatante, ottenuto da una centrifugazione a 13000rpm per 15 min a 4°C, è stato valutato nel contenuto proteico grazie al il kit BCA protein assay (Thermo Scientific, USA). I campioni (30 $\mu$ g) sono poi analizzati in minigel pre-casted 4 - 12% Nu PAGE (Invitrogen), trasferiti su membrana di Nitrocellulosa (GE Healthcare,UK) e saturati con blocco proteico (soluzione al 5% di latte a basso contenuto lipidico, Merck, Germany). L'immunoreazione con gli anticorpi primari è stata effettuata overnight at 4°C. Per lo studio sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: mouse anti-human SPARC (clone ON1-1, Takara), mouse anti-human CD146 (clone N1238, Novocastra), mouse anti-human CD44 (clone DF1485, Novocastra), mouse anti-human Vimentin (clone V9, Novocastra), rabbit anti-human PDGFR- $\beta$ , mouse anti-human Adipsin (clone D10/4), mouse anti-PPAR $\gamma$  (clone E8), mouse anti-human  $\beta$ -catenin (clone E5), goat anti-human Osterix (tutti della Santa Cruz, USA), goat anti mouse SPARC (R&D), rabbit anti-mouse Collagen type-I (Millipore, USA), rabbit anti-mouse TGF- $\beta$ 1 (R&D). Per normalizzare il contenuto proteico sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: rabbit anti-human e anti-mouse beta-actin (Sigma). L'incubazione con i rispettivi anticorpi secondari anti-mouse, anti-goat and anti-rabbit antibodies della Zymed (Invitrogen) è stata effettuata per un tempo di 30min a

temperatura ambiente e la reazione sviluppata utilizzando con kit ECL plus (GE Healthcare).

### *5.8 Immunofluorescenza e microscopia confocale*

La microscopia confocale in vitro su BM-MSCs umane e murine è stata eseguita con i seguenti anticorpi primari: mouse anti-human SPARC (clone ON1-1, Takara), mouse anti-human CD146 (clone N1238, Novocastra), mouse anti-human CD44 (clone DF1485, Novocastra), mouse anti-human  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA, clone ASM-1, Novocastra), rabbit anti-human PDGFR- $\beta$  (Santa Cruz), rat anti-mouse SPARC (clone 124413, R&D), e rabbit anti-mouse Collagen type-I (Millipore).

Il legame agli anticorpi primari è stato rilevato usando anticorpi secondari specifici coniugati a fluorocromi Alexa-488- e Alexa-568- (Invitrogen).

La doppia immunofluorescenza su tessuto umano, acquisita mediante microscopio confocale presso il Dipartimento di Fisica e Scienze Astronomiche, dell'Università degli Studi di Palermo, è stata eseguita mediante due reazioni d'immunoistochimica sequenziali. Le sezioni sono state prima incubate con l'anticorpo rabbit anti-human SPARC (Acris) il cui legame è stato rilevato utilizzando sia un anticorpo fluoresceinato goat anti-rabbit Alexa-488 che Alexa-568 (Invitrogen). Dopo la prima immunoreazione, le sezioni sono state incubate con l'anticorpo primario mouse-anti CD146 umano (clone N1238, Novocastra) o mouse anti-human-collagene di tipo I (clone I-8H5, Acris) e il legame anticorpale è stato rivelato utilizzando specifici anticorpi secondari Alexa-568 e Alexa-488, rispettivamente. La colorazione nucleare è stata eseguita utilizzando il marcatore TOTO3 (Invitrogen).

### *5.9 Analisi citofluorimetrica*

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita per stabilire il fenotipo delle BM-MSC umane e murine, per determinare l'origine delle cellule stromali del donatore e del ricevente nelle chimere murine e per valutare la frazione dei precursori mieloidi ( $\text{lin}^- \text{c-kit}^+$ , CMP, GMP, MEP) e delle cellule mieloidi circolanti  $\text{Gr1}^+ \text{Mac-1}^+$  nei topi controllo e trattati con TPO. Il fenotipo delle BM-MSC umane è stato stabilito utilizzando i seguenti anticorpi: mouse anti-human CD45 (clone HI30), mouse anti human CD34 (clone 4H11), mouse anti human

CD166 (clone eBioALC48), mouse anti human CD105 (clone SN6), rat anti human/mouse CD44 (clone IM7), mouse anti human CD90 (clone 5E10) (tutti della ditta eBiosciences, USA) e mouse anti human CD146 (clone SHM-57 Biolegend, USA).

Gli anticorpi primari fluoresceinati sono stati acquistati dalla Immunotech S.A. (France). Il fenotipo delle BM-MSC murine è stato rilevato con i seguenti anticorpi: mouse anti-mouse CD45.2 (clone 104), rat anti human/mouse CD44 (clone IM7), rat anti mouse CD90.2 (clone 30-H12), rat anti mouse CD105 (clone MJ7/18), armenian hamster anti mouse/rat CD29 (clone eBioHMb1-1), mouse anti mouse CD11b (CBRM1/5), rat anti mouse CD34 (clone RAM 34), rat anti mouse Sca-1 (clone D7) tutti coniugati FITC (tutti della ditta eBioscience).

L'origine cellule stromali midollari del donatore e del ricevente, dopo gli esperimenti di BMT, è stata analizzata mediante FACS con i seguenti marcatori: CD45.2, CD44, mouse anti-mouse H 2K<sup>d</sup> (clone SF1-1.1.1), mouse anti-mouse H-2K<sup>b</sup> (clone AF6-88.5.5.3) (tutti della eBioscience) e mouse anti mouse CD146 (clone P1H12, Millipore). La percentuale di cellule doppie positive CD11b/Gr-1 nel sangue periferico delle chimere è stata valutata utilizzando gli anticorpi rat anti-mouse Gr-1 FITC (clone RB6-8C5) e rat anti mouse CD11b-PE (clone M1/70) e i relativi controlli della ditta eBioscience. Le frazioni LK, CMP, GMP e i precursori mieloidi midollari sono stati ottenuti dalla colorazione delle cellule midollari con un cocktail di marcatori PE-coniugati (CD3, B220, CD11b, CD11c, Gr-1, Ter119), cKit-PE Cy7-, CD34-FITC e CD16/32-PerCP-Cy5.5. Il numero assoluto di cellule di ciascuna frazione mieloidi è stata calcolata moltiplicando la percentuale relativa per il numero totale di cellule midollari.

#### *5.10 Saggio di formazione di colonie midollari*

Le cellule midollari sono state ottenute mediante lavaggio del femore e tibia delle chimere, con 1 ml di medium Iscove modificato Dulbecco (IMDM, Invitrogen) addizionato con 2% FCS inattivato al calore (Bio Whittaker, USA). Le sospensioni cellulari sono state diluite alla concentrazione cellulare di  $2 \times 10^5$  cellule/ml in IMDM FCS 2%, poi, 0.3 mL di cellule sono state poste in 3 ml di medium MethoCult GF M3434 metilcellulosa (StemCell Technologies) piastrate in duplicato su dischi di 35 mm, alla concentrazione di  $2-2.5 \times 10^4$  cellule/disco, e incubate per 13 giorni a 37 ° C in incubatore umidificato al 5% CO<sub>2</sub>.

### *5.11 Analisi statistica*

Le variabili continue e categoriche sono state comparate utilizzando il test Mann-Whitney U. La correlazione tra le variabili è stata eseguita usando i coefficienti di correlazione di Pearson e Spearman correlation coefficients. L'analisi degli effetti dei trattamenti con TPO e l'emopoiesi midollare sui modelli murini è stata effettuata mediante Test t di Student a due code (ANOVA). I dati sono stati analizzati con il software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versione 13.0 (IBM, USA).



## 6. RISULTATI

### 6.1 L'espressione stromale di SPARC caratterizza le neoplasie mieloidi con alterazioni nello stroma midollare e correla con segni di fallimento midollare

Visto il ruolo pleiotropico di SPARC nel rimodellamento tissutale, abbiamo indagato se l'espressione di tale proteina potesse avere un ruolo funzionale nelle alterazioni stromali associate a MPN. Inizialmente è stata saggiata, mediante indagini immunoistochimica, l'espressione di SPARC in 66 biopsie osteomidollari di pazienti affetti da differenti tipi di neoplasie mieloidi che mostravano alla diagnosi grado variabile di fibrosi. Come controlli sono stati selezionati i midolli di 16 pazienti con trombocitosi reattiva e con linfoma di Hodgkin senza coinvolgimento midollare. Le caratteristiche cliniche dei pazienti selezionati sono riportate in tabella 1.

VARIABILE	AML	MDS	ET	PV	PMF	CTRL
Numero di casi	10	10	12	10	24	16
Età	56,1 (31-77)	60,8 (36-80)	64,3 (30-80)	58,5 (34-85)	65,5 (40-86)	52,5 (21-85)
Sesso (%)	M 27,2 F 72,8	M 50 F 50	M 83,3 F 16,67	M 30 F 70	M 58,3 F 41,7	M 43,7 F 56,3
cellularità (%)*	80 (10-100)	68 (60-90)	43 (35-60)	83 (40-100)	75 (50-100)	48 (25-85)
Grado di fibrosi**	1 grado 0 0 grado 1 70 grado 2 20 grado 3 10	2 grado 0 0 grado 1 40 grado 2 50 grado 3 10	1 grado 0 33.3 grado 1 66.6 grado 2 0 grado 3 0	1 grado 0 0 grado 1 60 grado 2 20 grado 3 20	1 grado 0 8.4 grado 1 45.8 grado 2 20.8 grado 3 25	0 grado 0 50 grado 1 50 grado 2 0 grado 3 0
WBC* (x10 <sup>9</sup> /L)	63,8 (1.6-420)	3,2 (1.2-5.2)	8,2 (4.1-13.2)	11,4 (4.9-22.6)	12 (2.3-51.5)	9,1 (2.2-14.6)
HB* (g/dL)	8,36 (6,4-9,5)	8,8 (6,2-14.2)	13,06 (10,2-14,6)	16 (10-21)	12,2 (8,1-15)	12,8 (8,8-15,9)
PLT* (x10 <sup>9</sup> /L)	52,1 (16-146)	107,8 (19-264)	737,8 (411-942)	292,9 (126-494)	463,5 (13-1218)	305,9 (143-762)

\*la variabile è riportata sia come percentuale che come range.

\*\* Il grado di fibrosi è riportato come mediana e % di ogni grado. La fibrosi è valutata secondo Thiele J et al.

Tabella 1: presentazione clinica e dati laboratoristici delle MPN e dei casi controllo

Nei casi controllo e nelle neoplasie mieloidi non associate a cambiamenti stromali, come ET, PV e PMF allo stadio pre-fibrotico, l'espressione di SPARC è confinata ai megacariociti. Di contro, nei casi con significative alterazioni stromali (PMF, MDS con fibrosi e panmielosi acuta), la sua espressione è identificata oltre nei megacariociti atipici

anche nelle cellule stellate e fusate dello stroma che si ramificano attorno ai vasi e formano un intricato *meshwork* (Figura 8).

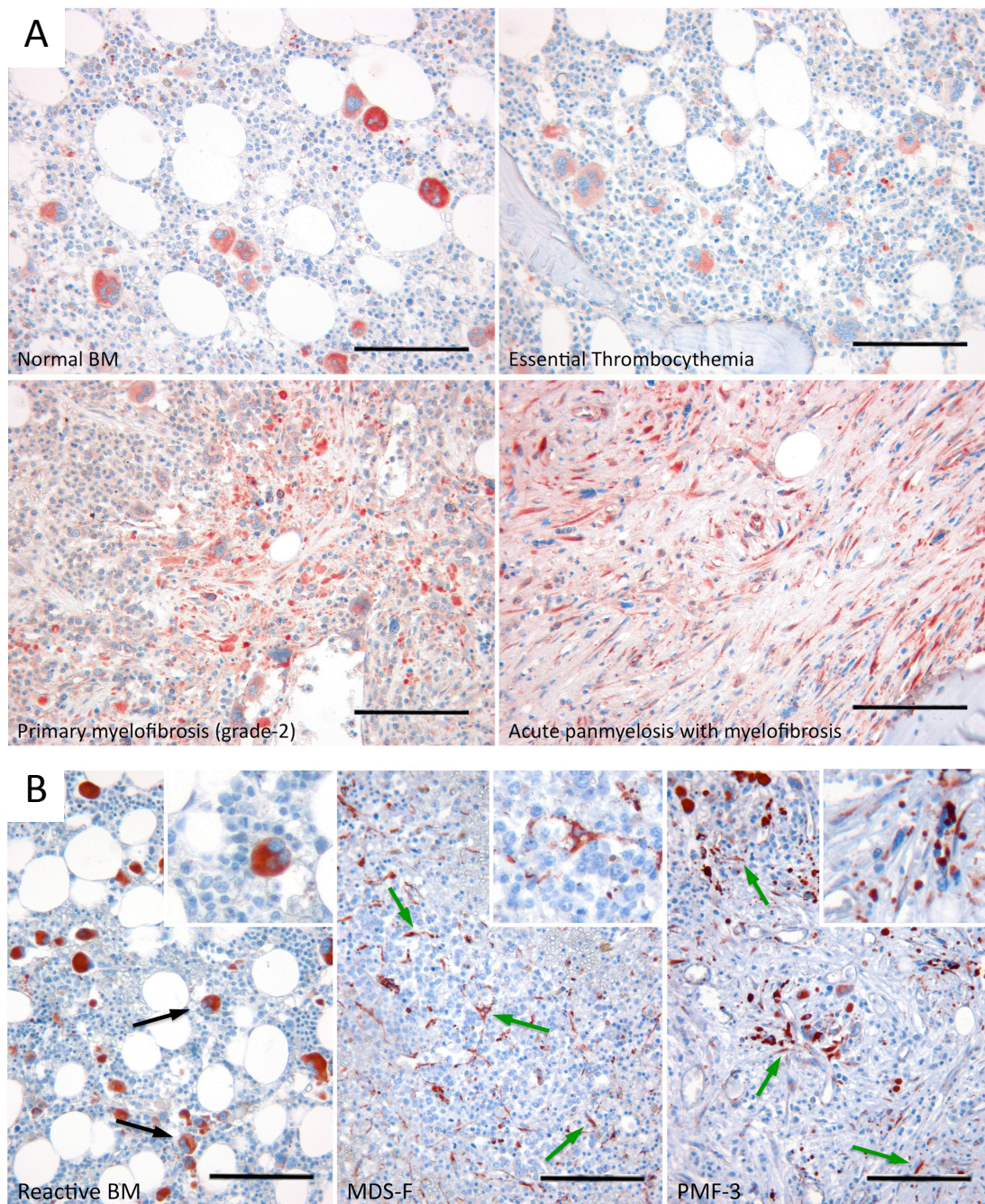


Figura 8. A. Analisi immunoistochimica dell'espressione di SPARC (segnali rossi) su sezioni di midollo di casi controllo (midollo reattivo) e neoplasie mieloidi (ET, PMF-2, e pan mielosi acuta con mielofibrosi). Si osserva che SPARC è espressa nei MK nei casi controllo e marca le cellule stromali nelle MPN con alterazioni stromali. B. Analisi immunoistochimica dell'espressione di SPARC (segnali rossi) su sezioni di midollo di casi controllo (midollo reattivo) e neoplasie mieloidi (MDS-F; PMF-3) con grado variabile di alterazioni stromali dove si apprezza l'espressione di SPARC in cellule dalla morfologia stellata e fusata.

Avendo osservato l'espressione di SPARC nello stroma aberrante di pazienti con MPN e, ipotizzando un suo possibile coinvolgimento nella patogenesi fibrotica, lo studio è stato esteso a un numero maggiore di casi di PMF, prototipo di MPN con fibrosi. A tal fine, il numero di cellule stromali esprimenti SPARC è stato valutato in 56 casi consecutivi di PMF e sono state correlate ai principali parametri istologici e laboratoristici con significato clinico quali: grado di fibrosi, MVD, Hb e lo *score* prognostico secondo Cervantes. Inoltre è stata eseguita una correlazione con il numero di cellule staminali mesenchimali CD146, che il nostro gruppo, recentemente, ha riportato incrementare in modo proporzionale al grado di fibrosi nelle fasi di progressione della malattia.

I dati istologico/laboratoristici sono riportati in tabella 2.

VARIABILE	Rischio basso/ Intermedio-1****	Rischio Intermedio- 2/ alto ****	<i>p value</i> ***
Sesso	M 14 (30.4%) F 32 (69.6%)	M 9 (90%) F 1 (10%)	
Età alla diagnosi*	62 (25-88)	71 (57-79)	0.1
Hb (g/L)*	127,7 (87-172)	98 (80-127)	0.0004
WBC (x10 <sup>9</sup> /L)*	10,3 (3,8-22,1)	12,1 (2,8-51,5)	0.2
PLT (x10 <sup>9</sup> /L)*	605 (121-1218)	304 (490-753)	0.01
Cellularità* (%)	62,9 (20-100)	78 (50-90)	0.008
Cellule stromali SPARC+ x HPF*	4,7 (0,5-15,9)	7,3 (1,4-15,7)	0.004
Cellule stromali CD146+ x HPF*	7,5 (1-23,5)	9,3 (3-21)	0.4
Densità microvascolare x HPF*	6,5 (1,6-18,6)	8,5 (3-14,8)	0.1

\*la variabile è riportata come media e come range. HPF: High Power Field (x400) \*\* La fibrosi è stata valutata secondo Thiele J, et al.

\*\*\* secondo il test Mann-Whitney U \*\*\*\* Secondo Cervantes F et al

Tabella 2. Presentazione clinica e dati laboratoristici di 56 casi consecutivi di PMF.

I risultati indicano che il numero di cellule stromali SPARC+ correla in modo significativo con il grado di fibrosi ( $\rho=0.583$ ,  $p=0.01$ ), con la densità micro vascolare ( $\rho=0.550$ ,  $p<0.0001$ ), e con il numero di cellule CD146+ ( $\rho=0.632$ ,  $p<0.00001$ ), riflettendo l'entità del danno stromale. Inoltre, il numero di cellule SPARC+ è dimostrato essere più elevato

nei pazienti con un rischio prognostico più elevato (rischio basso/intermedio-1 risk vs intermedio-2/elevato,  $p=0.04$ ) (Figura 9 A-D).

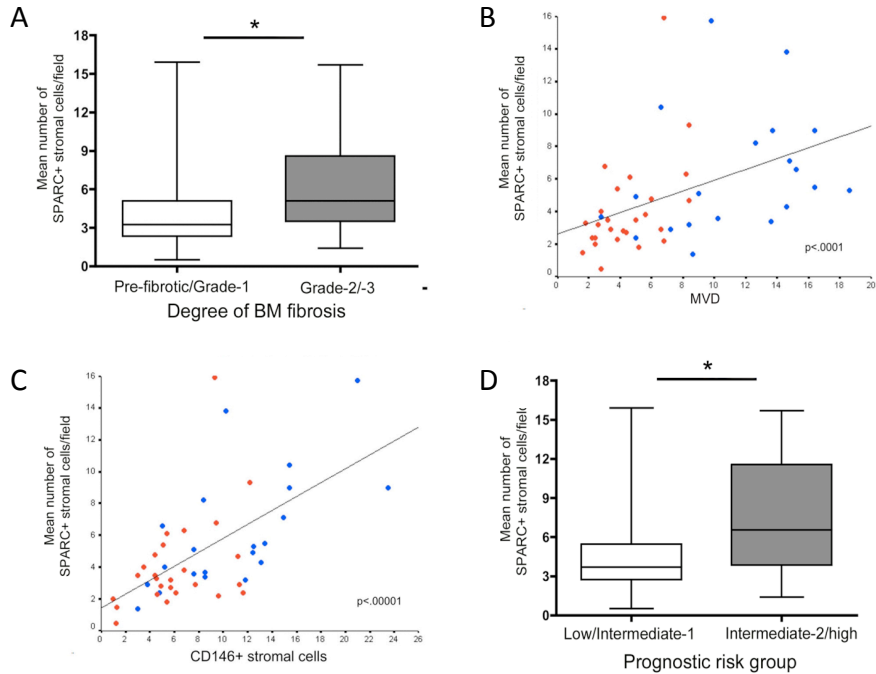


Figura 9: Correlazione tra il numero di cellule stromali SPARC+ e il grado di fibrosi (A), la MVD (B), il numero di cellule CD146+ (C), fattore di rischio prognostico (D).

SPARC è invece inversamente correlato ai livelli di Hb ( $\rho=0.42$ ,  $p=0.002$ ) e piatrine ( $\rho=0.539$ ,  $p<0.00001$ ), i cui valori rappresentano i segni di fallimento midollare (Figura 10).

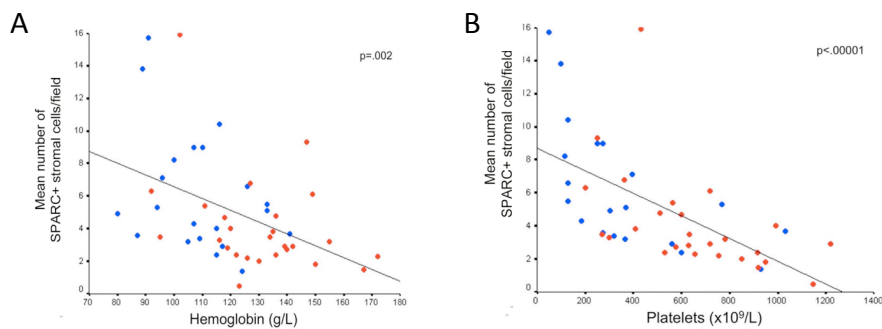


Figura 10: Correlazione tra il numero di cellule stromali SPARC+ e i valori di Hb (A), la conta piastrinica (B).

La correlazione tra SPARC e il grado di fibrosi è stata confermata anche in altre neoplasie mieloidi quali: AML, MDS, e PV (Figura 11).

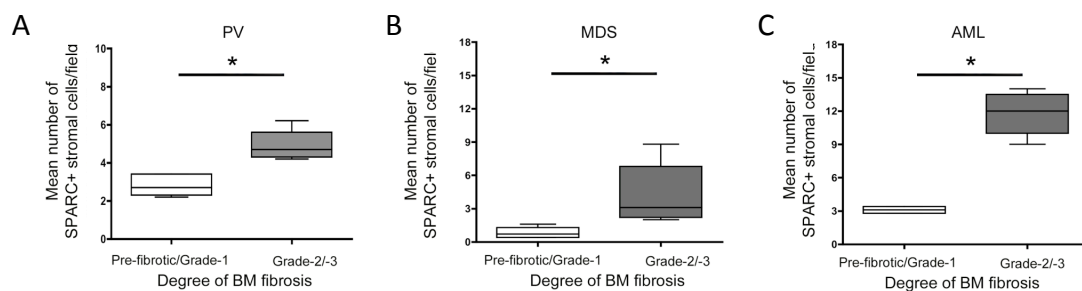


Figura 11: Correlazione tra il numero di cellule stromali SPARC+ e il grado di fibrosi nelle neoplasie mieloidi PV (A), MDS (B), AML (C).

Questi dati indicano una correlazione tra l'espressione di SPARC nello stroma e la fibrosi nello stroma midollare segue parallelamente il progressivo fallimento dell'emopoiesi nella PMF.

*6.2 L'espressione di SPARC contraddistingue le cellule BM-MSC CD146+ e si associa all'espansione degli osteoblasti alla base della progressione osteosclerotica*

Le BM-MSC CD146+ sono i precursori mesenchimali delle cellule stromali del midollo, inclusi fibroblasti, cellule reticolari midollari, adipociti e osteoblasti. Nel midollo umano tali cellule mostrano morfologia stellata e distribuzione sub-endoteliale. L'osservazione dei cambiamenti paralleli tra SPARC e le cellule CD146+ nei casi di PMF insieme all'evidenza che, la morfologia e la distribuzione che numerose cellule stromali SPARC + rispecchiano quella delle BM-MSC (Figura 12), ha indotto a verificare se le cellule midollari CD146+ potessero essere una fonte di SPARC.

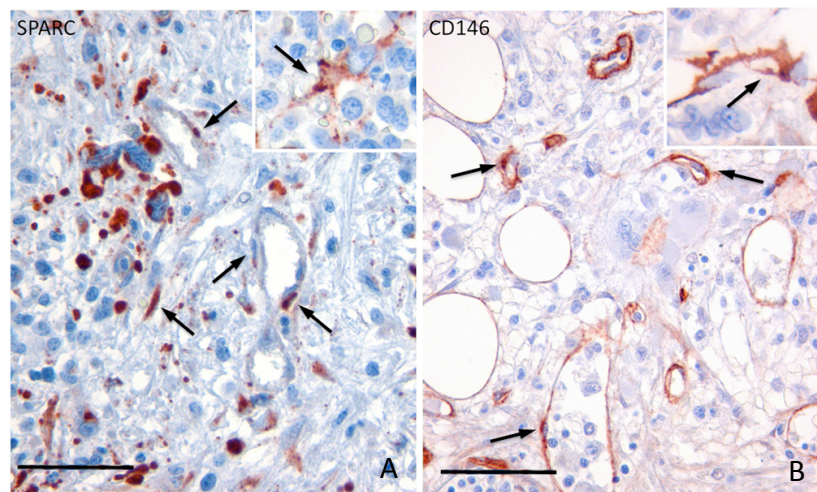


Figura 12: Analisi immunohistochimica dell'espressione di SPARC (A) e CD146 (B) su sezioni di midollo dove l'espressione di SPARC è sovrapponibile, per pattern e morfologia, a quella del CD146.

La doppia immunofluorescenza per SPARC e CD146 (Figura 13), visualizzata al microscopio confocale, ha dimostrato che oltre ai megacariociti e alcune cellule stromali che erano marcate da SPARC ma non da CD146, l'espressione di SPARC era sovrapponibile alle cellule CD146 con localizzazione sub endoteliale.

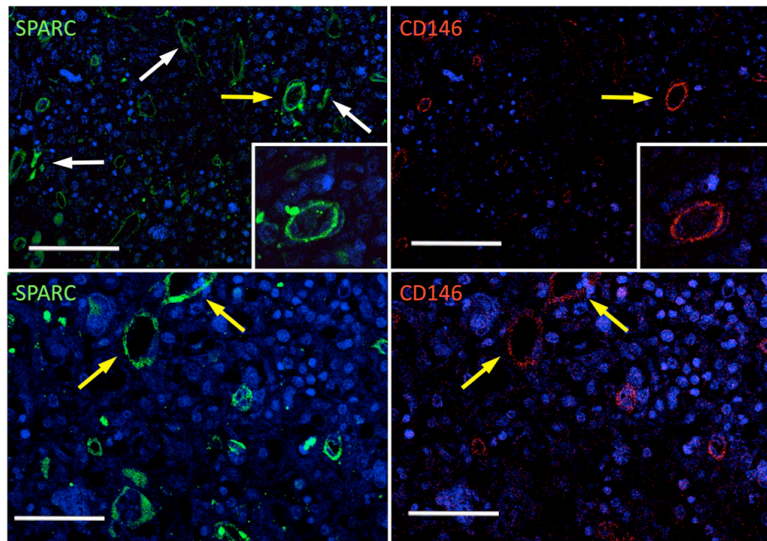


Figura 13: L'immunofluorescenza visualizzata con microscopia confocale per SPARC (segnali verdi) e CD146 (segnali rossi) nelle PMF mostra che, oltre ai MK e alle cellule stromali (freccie bianche), un subset di cellule stromali, in posizione sub-endoteliale co-esprimono SPARC e CD146 (freccie gialle).

Le alterazioni stromali midollari associate a neoplasie mielodi con mielofibrosi possono progredire verso l'osteosclerosi che può riflettere uno sbilanciamento del fato differenziativo delle cellule staminali alla biforcazione tra differenziazione osteoblastica e adipocitica (Figura 14).

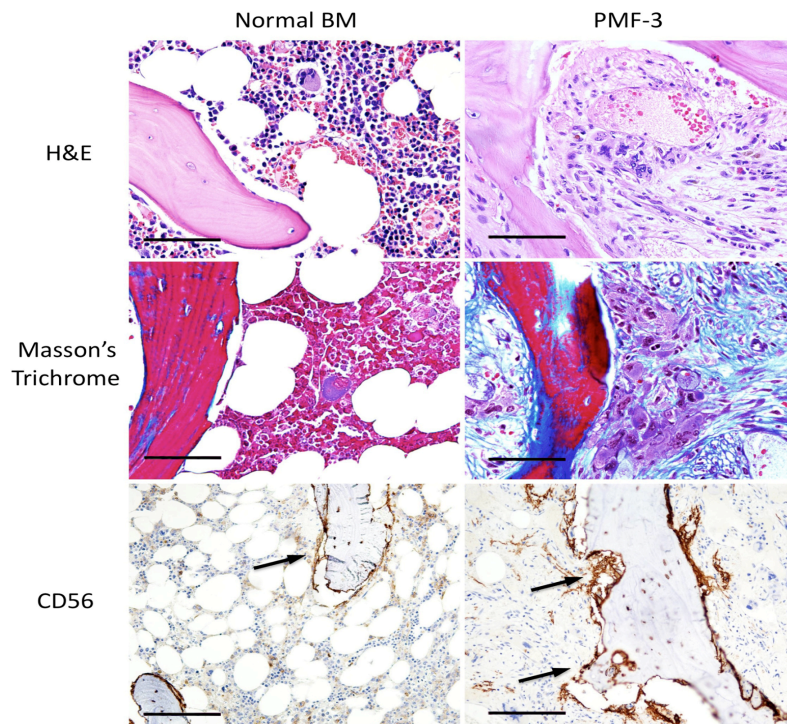


Figura 14: Caratteristiche istopatologiche e immunofenotipiche della progressione osteosclerotica nelle MPN.

Un check-point nel quale SPARC è coinvolto, come dimostrano i dati *in vitro* su cellule staminali mesenchimali isolate da sangue midollare. Le cellule sono state prima caratterizzate sotto il profilo di espressione di marker di staminalità mesenchimale (CD146, CD44, Vimentina,  $\alpha$ -SMA, PDGFR- $\beta$ ) sia mediante citofluorimetria sia in immunocitochimica e *western blotting*, e successivamente indotte al differenziamento adipocitario e osteogenico. Le colorazioni Oil red O e Von Kossa permettono di visualizzare l'avvenuto differenziamento e i saggi di WB evidenziano come SPARC incrementi in seguito a induzione osteogenica e di contro diminuisca al trattamento con terreni specifici per il differenziamento adipocitario (Figura 15).

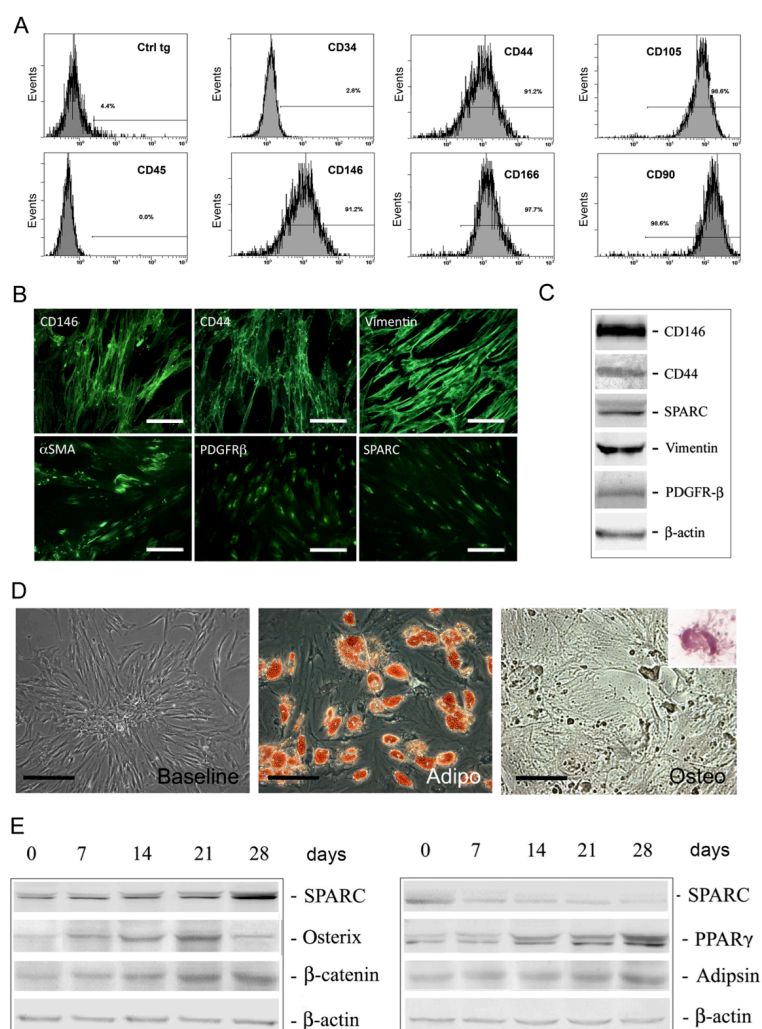


Figura 15: Immunofenotipo e potenziale differenziativo delle BM-MSC umane. Analisi citofluorimetrica che dimostra la presenza di marker mesenchimali (CD146, CD44, CD166, CD90, e CD105) e l'assenza di marcatori emopoietici (CD34 e CD45) (A).



Immunofluorescenza che mostra l'espressione basale di CD146, CD44, vimentina,  $\alpha$ -SMA, PDGFR- $\beta$  e SPARC (B). Analisi WB dei marker mesenchimali su lisati di BM-MSC (C). Immunocitochimica su cellule BM-MSC indotte al differenziamento adipocitario (colorazione oil red O, immagine centrale) e osteogenico (colorazione Von Kossa, immagine a destra) (D) Analisi WB dei lisati cellulari delle BM-MSC indotte al differenziamento osteoblastico (pannello a sinistra) e adipocitico (pannello a destra) (E).

Sulla base dei risultati ottenuti si è testata l'espressione di SPARC e di componenti chiave della matrice extracellulare della nicchia osteoblastica, quali il collagene di tipo I e fibronectina, in casi di PMF avanzata che progrediscono verso l'osteosclerosi. Nella figura 16 è possibile osservare, nei casi di PMF senza alterazioni stromali rilevanti, la presenza del collagene tipo I e della fibronectina sulla superficie endostea del parenchima emopoietico, di contro si diffonde alle aree intertrabecolari nei casi con fibrosi severa ed osteosclerosi.

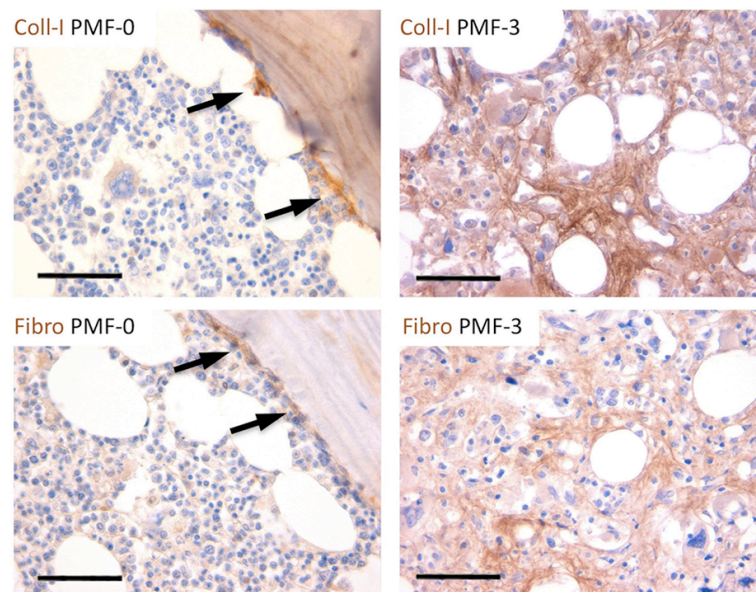


Figura 16: Analisi immunoistochimica per il collagene di tipo I (Coll-I) e la fibronectina (Fibro) in sezioni di PMF in fase pre-fibrotica (PMF-0) e avanzata PMF (PMF-3). E' possibile osservare come le due componenti della ECM mostrino distribuzione endostea nelle trabecole ossee, nei casi senza alterazioni stromali di rilievo, di contro diffondono negli spazi intertrabecolari nei casi con fibrosi severa.

Nei casi progrediti verso l'osteosclerosi, SPARC si localizza con il collagene tipo I in foci sclerotici come evidenzia la doppia immunofluorescenza a microscopia confocale,

ed esibisce una forte espressione negli osteoblasti ai siti di nuova formazione ossea (Figura 17).

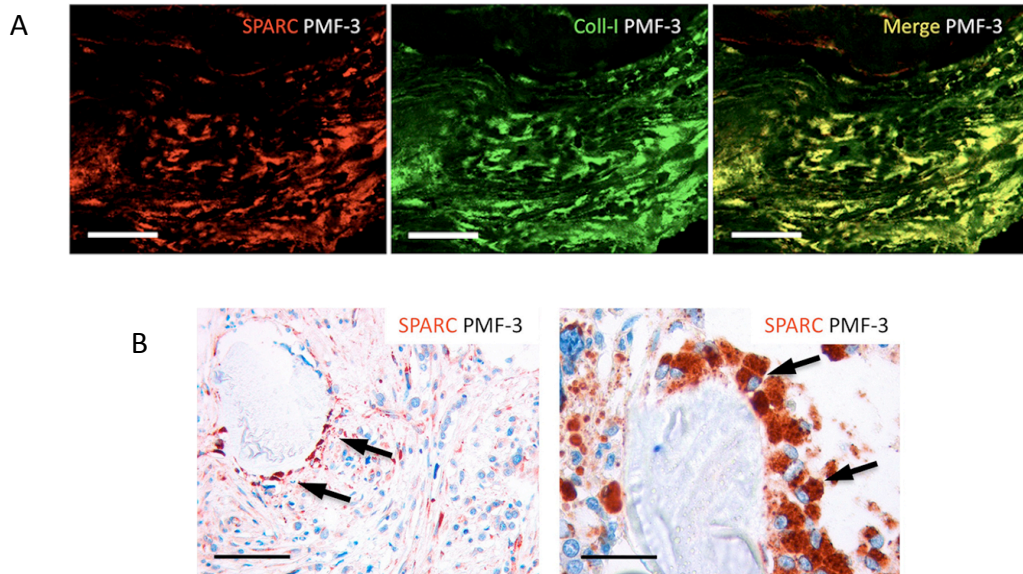


Figura 17: Immunofluorescenza visualizzata a microscopia confocale per SPARC (segnale rosso) e Coll-I (segnale verde) che mostra la co-localizzazione delle due proteine nei foci di sclerosi in pazienti con PMF-3 (A). Analisi immunoistochimica di SPARC che mostra la sua espressione negli osteoblasti nei siti di nuova formazione ossea in casi di PMF-3 (B).

Questi risultati associano, quindi, SPARC alle modifiche osteosclerotiche, che potrebbero svilupparsi nelle MPN come sbilanciamento nelle dinamiche di differenziazione delle BM-MSK.

6.3 La proteina SPARC sintetizzata dallo stroma è necessaria all'induzione dei cambiamenti fibrotici che si accompagnano alla mieloproliferazione reattiva indotta dalla TPO.

Per indagare la rilevanza di SPARC nei processi fibrotici midollari associati a mieloproliferazione è stato adottato un modello murino sperimentale di mielofibrosi. In topi WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> è stata indotta, mediante ripetute iniezioni intraperitoneali di TPO, mieloproliferazione reattiva non maligna e fibrosi stromale. L'esame istologico e la conta differenziale delle cellule emopoietiche del midollo evidenzia come nei topi WT si sviluppa sia mieloproliferazione che fibrosi contrariamente a quanto accade in quelli *Sparc*<sup>-/-</sup> che sviluppano soltanto mieloproliferazione senza alcun segno di fibrosi o di osteosclerosi. La proliferazione mieloide è caratterizzata da espansione della linea granulocitaria e della quota immatura, da iperplasia e pleomorfismo dei megacariociti che si aggregano in cluster. Il grado della fibrosi midollare, eseguito secondo le linee guida, varia da 0 a 3, lo score medio nei topi WT trattati con TPO è 2.2 (SD,0.76), 0.8 dei topi *Sparc*<sup>-/-</sup> (SD, 0.84) (p=0.013), 0 nei topi WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> trattati con soluzione salina (Figura 18).

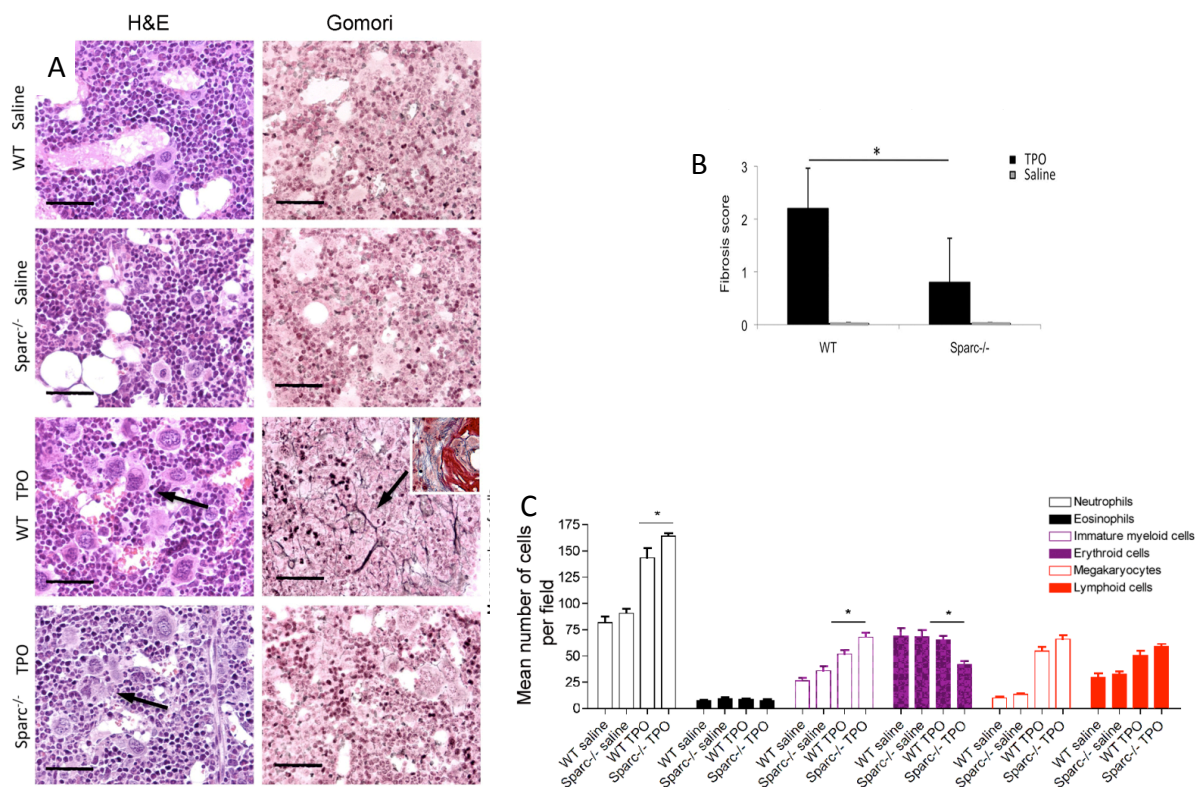


Figura 18: colorazioni istochimiche H&E e Gomori su BM di topi WT and *Sparc*<sup>-/-</sup> trattati con TPO che evidenziano un incremento nel grado di fibrosi e di foci di osteosclerosi nei

WT trattati, rispetto a quelli *Sparc*<sup>-/-</sup> che sono esenti da alterazioni stromali (A). Grading istopatologico della fibrosi di topi WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> controllo e trattati eseguito su sezioni colorate con metodo Gomori. (B). Conta differenziale delle cellule emopoietiche midollari di topi WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> controllo e trattati. Si evidenzia un incremento della componenti ematopoietiche midollari in seguito a trattamento con TPO (C).

Alla mieloproliferazione nel midollo si accompagna emopoiesi extramidollare splenica con segni di espansione della polpa rossa, trombocitosi periferica ed anemia (Figura 19).

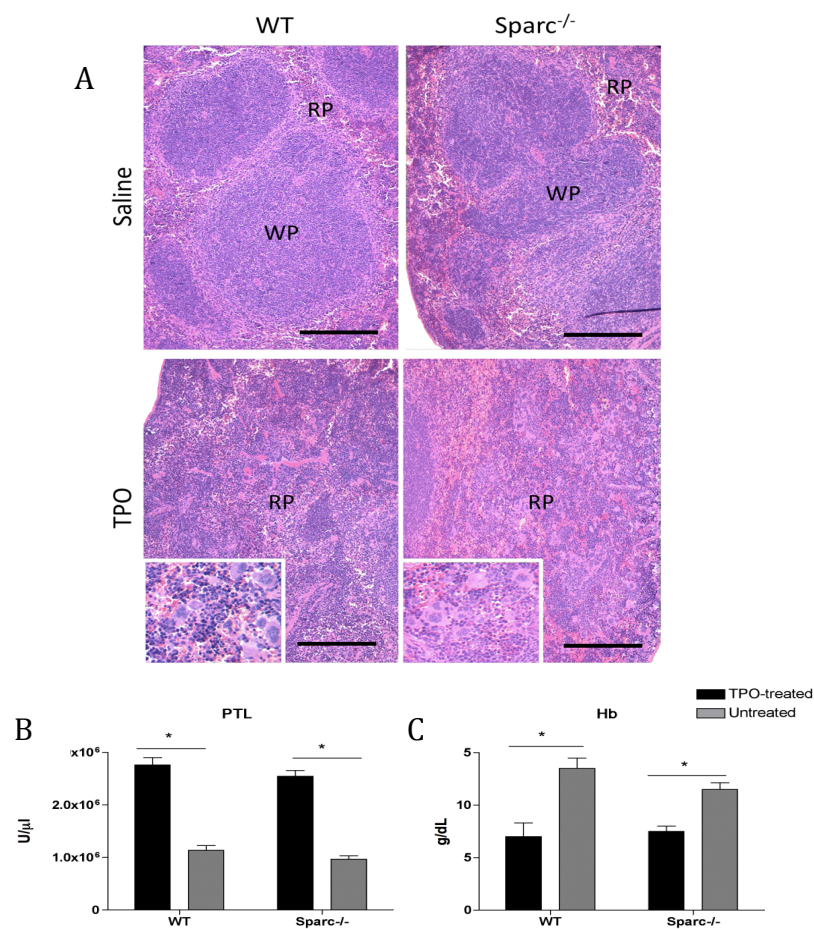


Figura 19: Analisi istopatologica dell'architettura splenica su topi WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> controllo e trattati che mostra emopoiesi extramidollare e iperplasia della polpa rossa (A). Il trattamento con TPO induce nei topi trattati in WT e *Sparc*<sup>-/-</sup>, un incremento nel numero delle PLT circolanti (B) e un concomitante decremento dei livelli di Hb (C).

I risultati *in vivo* dimostrano che l'assenza di SPARC frena lo sviluppo di fibrosi stromale associata a proliferazione reattiva mieloide indotta dal trattamento con TPO.

Per determinare se la fonte di SPARC, rilevante ai fini della patogenesi della fibrosi, fosse di origine emopoietica o stromale sono state create delle chimere midollari nei quali topi WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> sono sia donatori che riceventi. Sei settimane dopo il trapianto è stata valutata l'avvenuta ricostituzione delle cellule emopoietiche del donatore e le chimere sono state in seguito trattate con alte dosi di TPO.

Il trattamento con TPO induce una significativa mieloproliferazione midollare e il midollo delle chimere con stroma WT mostra marcata fibrosi associata a mieloproliferazioni contrariamente alle chimere con lo stroma *Sparc*<sup>-/-</sup> nelle quali si osserva un minor grado di fibrosi indipendentemente dal genotipo del donatore. Nello specifico, la media della fibrosi midollare indica per le chimere WT>WT e *Sparc*<sup>-/-</sup>>WT trattate con TPO 2.6 (SD, 0.55) e 2.8 (SD, 0.45), rispettivamente, comparate con lo 0.6 (SD, 0.55) delle chimere WT>*Sparc*<sup>-/-</sup> e lo 0.6 (SD, 0.89) delle chimere *Sparc*<sup>-/-</sup>>*Sparc*<sup>-/-</sup> (WT>WT vs. WT> *Sparc*<sup>-/-</sup>, p=0.004; *Sparc*<sup>-/-</sup>>WT vs. *Sparc*<sup>-/-</sup>>*Sparc*<sup>-/-</sup>, p=0.001) (Figura20).

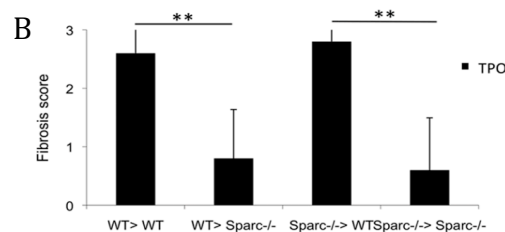
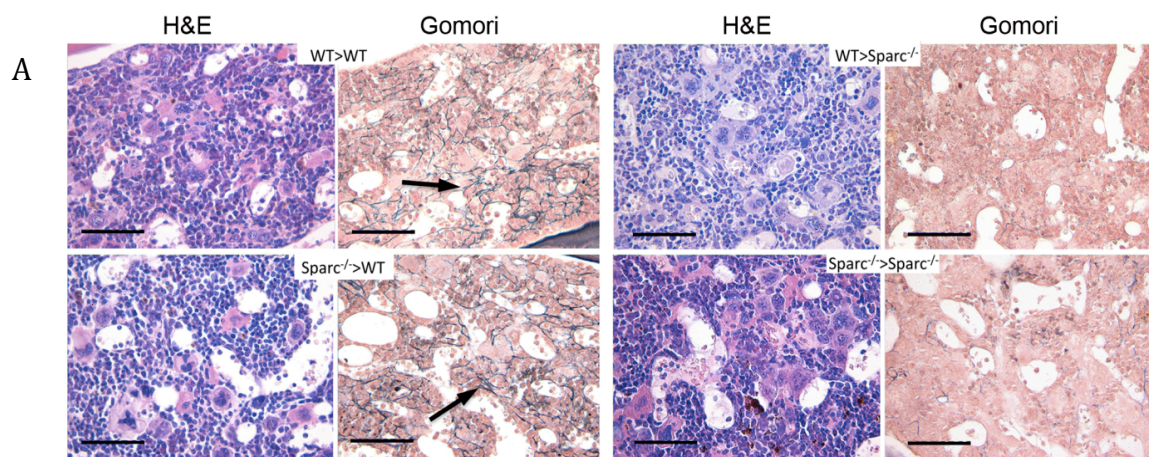


Figura 20: Analisi istopatologica del midollo delle chimere trattate con TPO. La colorazione istochimica H&E evidenzia segni di mieloproliferazione in tutte le condizioni analizzate e si osserva un notevole grado di disgranulopoisi e atipie megacariocitarie nei topi riceventi, *Sparc*<sup>-/-</sup> (WT>*Sparc*<sup>-/-</sup>, *Sparc*<sup>-/-</sup>>*Sparc*<sup>-/-</sup>). La colorazione Gomori mostra un significativo aumento del grado di fibrosi solo nel midollo delle chimere WT (WT>WT, *Sparc*<sup>-/-</sup>>WT) (A). Grading istopatologico della fibrosi nelle chimere murine trattate con TPO eseguito su sezioni colorate con metodo Gomori (B).

In tutte le chimere, inoltre, il trattamento con TPO induce mieloproliferazione anche nella milza, concomitante alla trombocitosi e all'anemia (Figura 21).

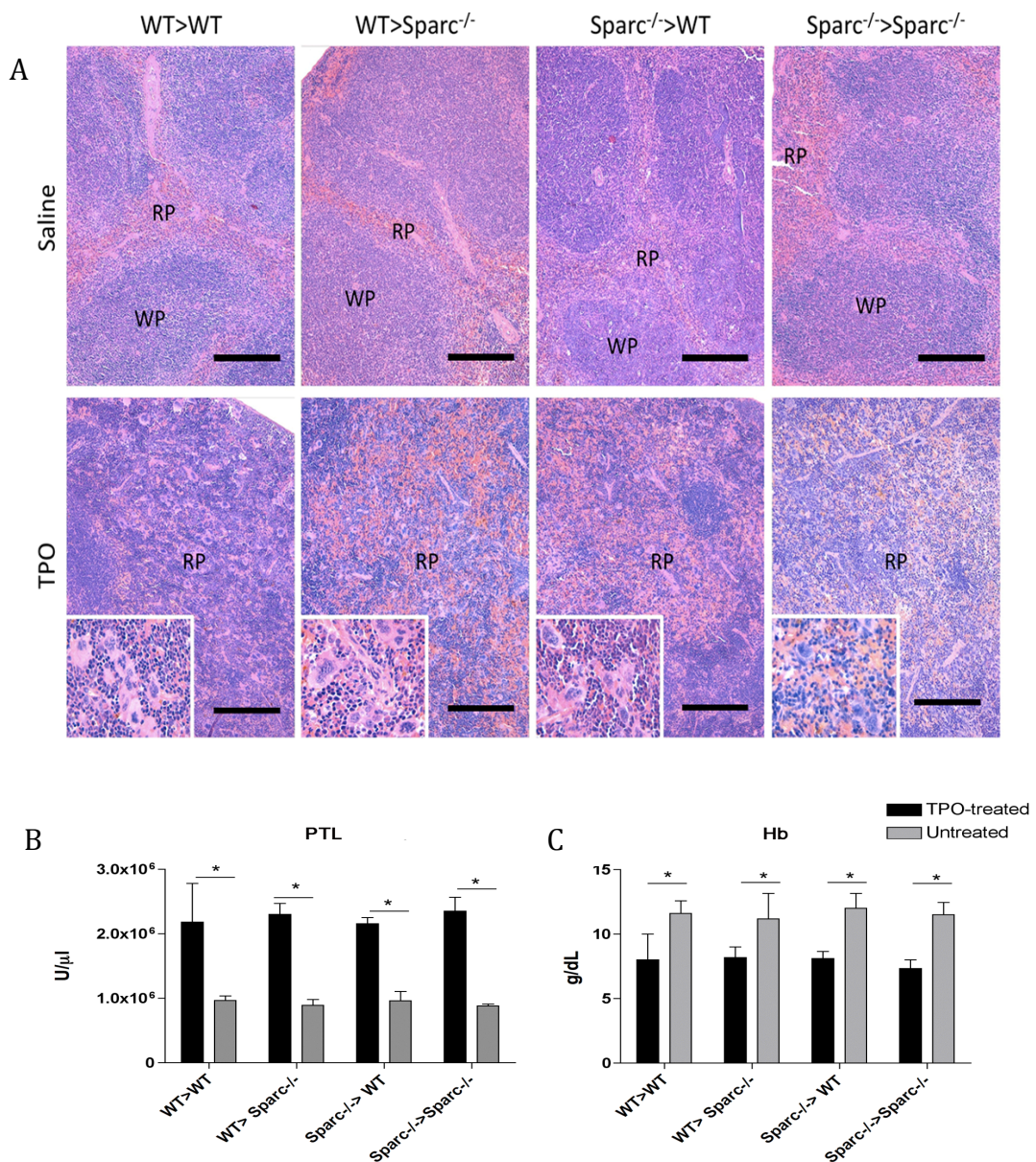


Figura 21: Analisi istopatologica dell'architettura splenica delle chimere controllo e trattate con TPO caratterizzata da iperplasia e cluster di megacariociti e iperplasia della polpa

rossa (A). Il trattamento con TPO nelle chimere induce un incremento nel numero delle PLT circolanti (B) e un concomitante decremento dei livelli di Hb (C).

I risultati ottenuti dimostrano che il midollo con genotipo *Sparc* è responsabile della mieloproliferazione correlata a cambiamenti stromali e identifica le cellule stromali come fonte rilevante di SPARC.

Poiché le chimere *Sparc*<sup>-/-</sup> non inducono alterazioni midollari, si è valutato se le cellule staminali mesenchimali, prelevate dalle chimere, rispondessero in modo differente al TGF- $\beta$ . A tal fine, le BM-MSc delle chimere WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> sono state coltivate per 24 h in un medium serum-free prima di aggiungere il TGF- $\beta$ 1 ricombinante. Dopo 48 h di incubazione, l'analisi a microscopia confocale dell'espressione di SPARC e della deposizione del collagene tipo I, dimostrano che il TGF- $\beta$ 1 induce l'*up-regulation* di SPARC e la concomitante deposizione di fibre di collagene nelle mesenchimali WT contrariamente a quelle *Sparc*<sup>-/-</sup> che si dimostrano, invece, refrattarie alla deposizione di collagene, tale dato supporta l'ipotesi che la proteina SPARC è necessaria durante la risposta fibrotica. L'analisi WB conferma che il trattamento con TGF- $\beta$ 1 nelle cellule WT induce l'*up-regulation* di SPARC e dimostra anche le cellule WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> differiscono nel contenuto e nella forma matura del collagene. Inoltre nelle cellule WT il TGF- $\beta$ 1 segue parallelamente l'espressione di SPARC, è basalmente più espresso nelle cellule *Sparc*<sup>-/-</sup> e debolmente regolato in seguito alla stimolazione con il TGF- $\beta$ 1 esogeno, suggerendo che la maturazione e deposizione difettiva del collagene tipo I è causata dall'assenza di SPARC piuttosto che dalla sintesi difettiva di TGF- $\beta$  (Figura 22).

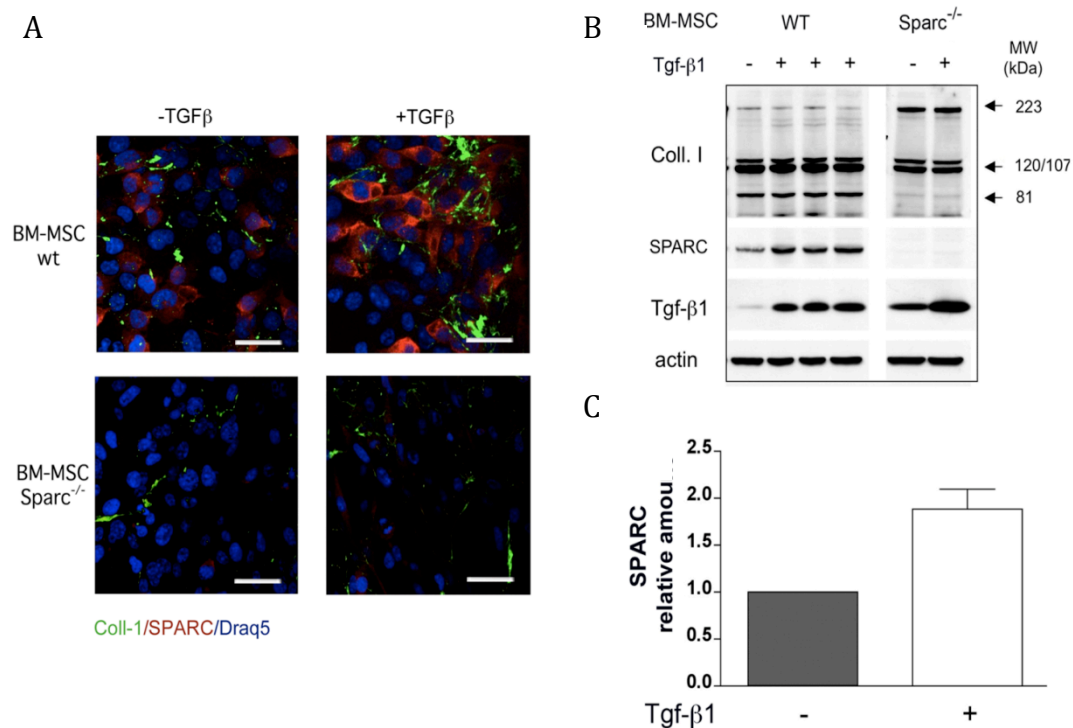


Figura 22: Immunofluorescenza *in vitro* dell'espressione coll. I (verde) e SPARC (rosso) su BM-MSCs murine isolate da topi WT e *Sparc*<sup>-/-</sup>. Le immagini evidenziano che il trattamento con rTGF-β1 induce l'upregulation di SPARC e la deposizione di fibre collageniche solo nei topi nelle BM-MSCs WT. Le cellule non trattate sono utilizzate come controllo. (A). analisi WB per coll-I, SPARC, e TGF-β1 su lisati totali di BM-MSCs trattate rTGF-β1 che mette in luce il differente pattern di produzione del collagene. Le cellule non trattate sono utilizzate come controllo. Il WB evidenzia inoltre l' upregulation di SPARC nelle BM-MSCs WT in seguito al trattamento con rTGF-β1 (B). Analisi quantitativa del WB dell'espressione di SPARC su BM-MSCs WT trattate rTGF-β1. Le cellule non trattate sono utilizzate come controllo (C).

La deposizione difettiva del collagene che caratterizza le cellule *Sparc*<sup>-/-</sup> trattate con TPO è responsabile del fenotipo “non fibrotico” come supportato dalla difettiva espressione in situ del collagene in presenza di una cospicua espressione TGF-β (Figura 23).



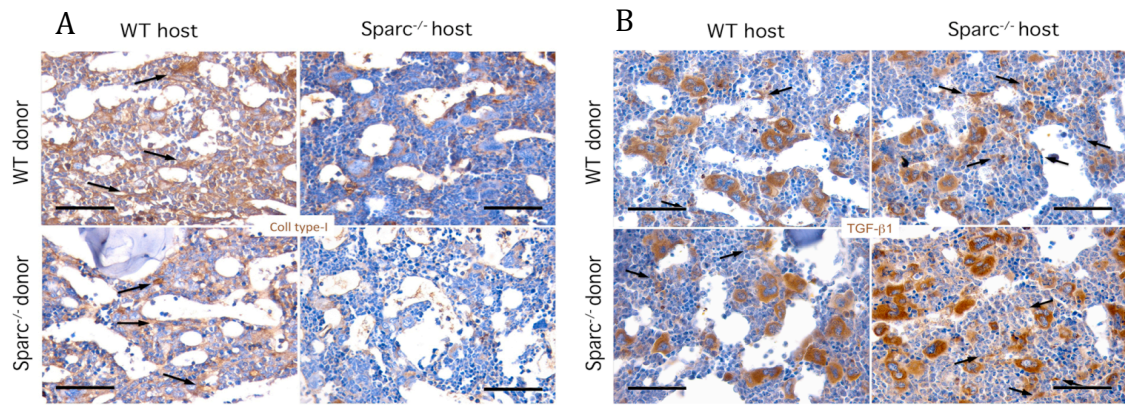


Figura 23: analisi immunoistochimica dell'espressione del coll-I su campioni midollari delle chimere trattate con TPO che mostrano come stroma WT (WT>WT, *Sparc<sup>-/-</sup>*>WT) ha un'elevata deposizione interstiziale di coll-I rispetto alle chimere con stroma *Sparc<sup>-/-</sup>* (WT>*Sparc<sup>-/-</sup>*, *Sparc<sup>-/-</sup>*>*Sparc<sup>-/-</sup>*) (A). Analisi immunoistochimica dell'espressione del TGF-β1 su campioni midollari delle chimere trattate con TPO che mostra un'elevata presenza della proteina nelle cellule stromali delle chimere con stroma *Sparc<sup>-/-</sup>* (WT>*Sparc<sup>-/-</sup>*, *Sparc<sup>-/-</sup>*>*Sparc<sup>-/-</sup>*) rispetto alla controparte WT (WT>WT, *Sparc<sup>-/-</sup>*>WT) (B).

#### 6.4 L'assenza di SPARC nello stroma midollare si associa a una maggiore risposta mielopoietica in risposta al trattamento con TPO

Gli esperimenti effettuati sulle chimere murine evidenziano che lo SPARC stromale potrebbe influenzare la mielopoiesi in quanto, topi con lo stroma *Sparc*<sup>-/-</sup> sono caratterizzati da un incremento della granulopoiesi, arricchimento dei precursori mieloidi e da un più alto grado d'iperplasia dei megacariociti con dismegacariopoiesi (Figura 24).

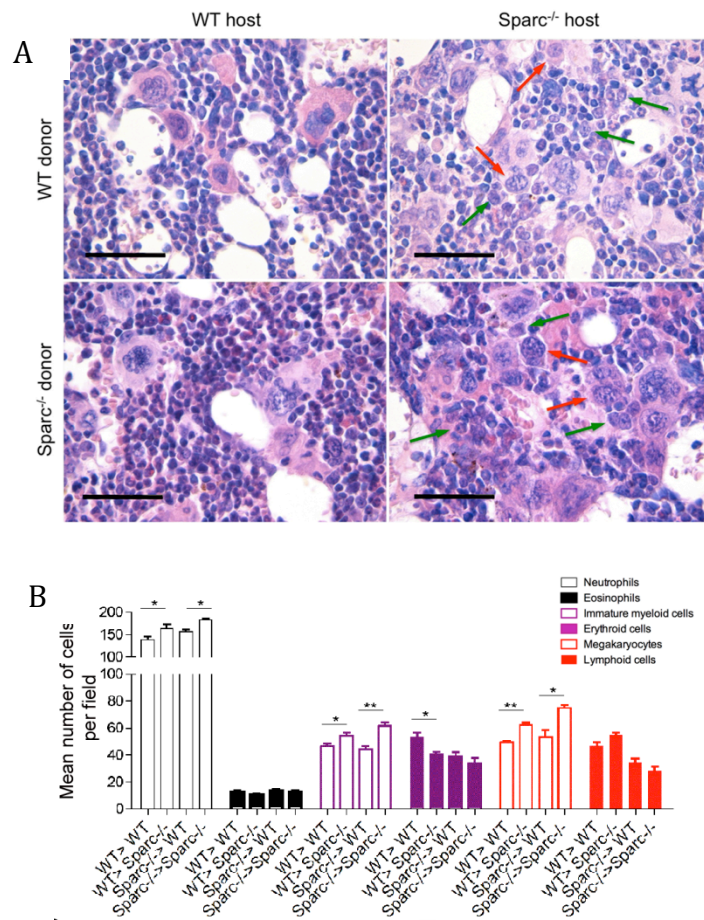


Figura 24: Analisi istomorfologica su sezioni midollari di chimere trattate con TPO colorate con H&E che mostrano come lo stroma *Sparc*<sup>-/-</sup> (WT>*Sparc*<sup>-/-</sup>, *Sparc*<sup>-/-</sup>>*Sparc*<sup>-/-</sup>) ha un numero più elevato di precursori granulocitari immaturi e MK atipici/displastici rispetto alle chimere con stroma WT (WT>WT, *Sparc*<sup>-/-</sup>>WT) (A). Conta differenziale delle cellule emopoietiche midollari su sezioni midollari di chimere trattate con TPO che evidenzia una diversa espansione delle popolazioni mieloidi nello stroma delle chimere *Sparc*<sup>-/-</sup> e WT (B).

Di conseguenza, si osserva un rilevante incremento delle unità formanti colonie mieloidi (CFU-GM) nelle chimere con lo stroma *Sparc*<sup>-/-</sup> rispetto alla controparte normale (WT>*Sparc*<sup>-/-</sup> vs. WT>WT, p=0.038; *Sparc*<sup>-/-</sup>>*Sparc*<sup>-/-</sup> vs. *Sparc*<sup>-/-</sup>>WT, p=0.020) associata ad un incremento della frazione dei precursori midollari GMP (WT>*Sparc*<sup>-/-</sup> vs. WT>WT, p=0.028; *Sparc*<sup>-/-</sup>>*Sparc*<sup>-/-</sup> vs. *Sparc*<sup>-/-</sup>>WT, p=0.029), dato che suggerisce che l'espansione della popolazione mieloida è favorita dallo stroma *Sparc*<sup>-/-</sup> (Figura 25).

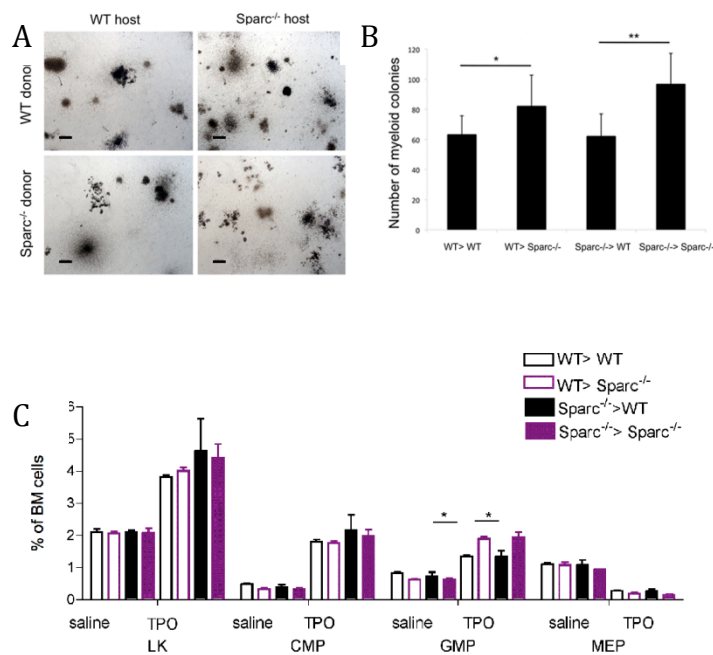


Figura 25: L'ematopoiesi nelle chimere murine è stata analizzata utilizzando un saggio clonogenico *in vitro*. Le immagini evidenziano un arricchimento nel numero delle colonie mieloidi nelle chimere con stroma *Sparc*<sup>-/-</sup> (A). Numero relativo di colonie mieloidi midollari CFU-GM che incrementa significativamente nei riceventi *Sparc*<sup>-/-</sup> rispetto ai WT (B). Il numero percentuale di progenitori emopoietici midollari mostra un incremento significativo dei precursori GMP nello stroma *Sparc*<sup>-/-</sup> dei topi trattati con TPO rispetto ai WT.

L'analisi citoflorimetrica su sangue periferico evidenzia l'incremento nella frazione delle cellule mieloidi Gr1+Mac-1+ circolanti nelle chimere *Sparc*<sup>-/-</sup> rispetto allo stroma WT, evidenziabile anche nello striscio di sangue periferico, dove si osserva un'elevata frequenza di forme immature dei granulociti (Figura 26).

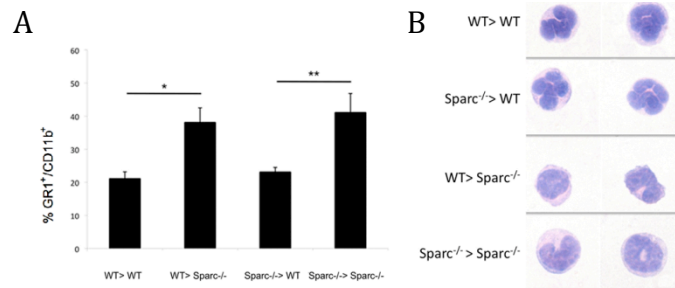


Figura 26: Analisi citofluorimetrica delle cellule mieloidi circolanti Gr-1<sup>+</sup>Mac-1<sup>+</sup> eseguita su sangue periferico delle chimere murine (A). Analisi morfologica su striscio di sangue periferico delle chimere murine che evidenzia come i granulociti delle chimere con stroma *Sparc*<sup>-/-</sup> sono arricchite nelle forme immature rispetto alla controparte WT (B).

Inoltre, il numero di cellule mieloidi Ki67<sup>+</sup> era più cospicuo nelle chimere WT> *Sparc*<sup>-/-</sup> (media 9.6 cellule/HPF; SD, 1.50) e *Sparc*<sup>-/-</sup>>*Sparc*<sup>-/-</sup> (media 10.1; SD, 1.85) rispetto alla controparte WT>WT (media 4.3; SD, 1.16) e *Sparc*<sup>-/-</sup>>WT (media 4.1; SD, 0.99) (WT>*Sparc*<sup>-/-</sup> vs. WT>WT p<0.001; *Sparc*<sup>-/-</sup>>*Sparc*<sup>-/-</sup> vs. *Sparc*<sup>-/-</sup>>WT p=0.001). Il differente supporto delle cellule mesenchimali midollari *Sparc*<sup>-/-</sup> emerge anche da esperimenti in vitro di co-culture nei quali cellule emopoietiche Lin<sup>-</sup> isolate da topi WT sono state poste in coltura con BM-MSC WT e *Sparc*<sup>-/-</sup> in presenza di TPO e SCF (stem cell factor). Dopo sette giorni di co-cultura le cellule emopoietiche sono state sottoposte a analisi citofluorimetrica per l'espressione dei marcatori Gr1 e F4-80 per determinare la frazione granulocitaria (Gr1<sup>+</sup>F4-80<sup>-</sup>), i monociti (Gr1<sup>+</sup>F4-80<sup>+</sup>) e le popolazioni doppie positive e doppie negative. I dati sperimentali indicano che le BM-MSC *Sparc*<sup>-/-</sup> guidano una frazione maggiore di cellule Lin<sup>-</sup> verso la differenziazione granulocitaria rispetto a quelle coltivate su un substrato di mesenchimali WT o da sole. I dati ottenuti indicano che l'assenza di SPARC nelle cellule mesenchimali favorisce l'espansione di specifiche popolazioni mieloidi.

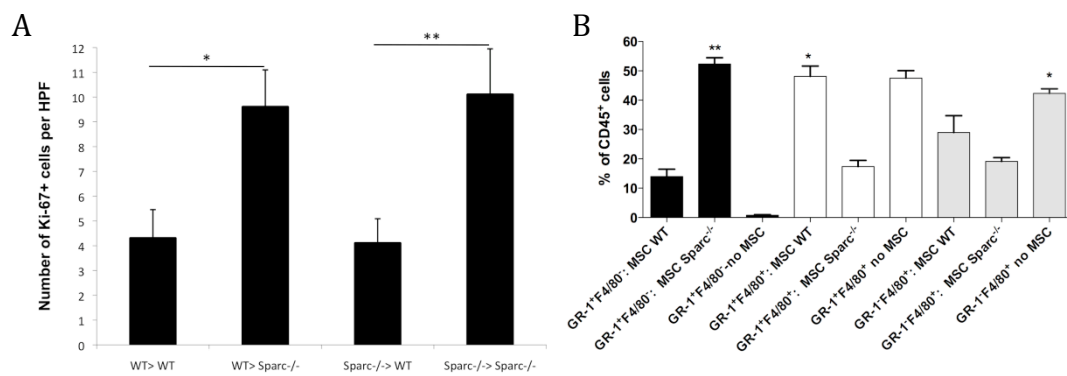


Figura 27: Numero di cellule mieloidi Ki-67+ determinate mediante conte su 10 campi ad alto ingrandimento (x400) su sezioni immunocolorate ed espresse come media. Il midollo delle chimere con stroma *Sparc*<sup>-/-</sup> (WT>*Sparc*<sup>-/-</sup> and *Sparc*<sup>-/-</sup>>*Sparc*<sup>-/-</sup>) mostrano un significativo incremento nel numero di cellule Ki-67+ rispetto alla controparte WT (WT>WT and *Sparc*<sup>-/-</sup>>WT) (A). Analisi citofluorimetrica della frazione di cellule mieloidi esprimenti CD45, F4/80, e CD11b dopo co-cultura di cellule Lin<sup>-</sup> con BM-MSCT WT e *Sparc*<sup>-/-</sup>. La popolazione mieloida granulocitaria (GR-1<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>) è significativamente incrementata nelle co-culture con BM-MSCT *Sparc*<sup>-/-</sup> (B).

6.5 L'assenza di SPARC nel microambiente midollare induce le caratteristiche di un disordine mieloproliferativo in presenza di cellule ematopoietiche  $Apc^{min}$

L'osservazione che l'assenza nello stroma di SPARC possa rappresentare uno stimolo mielopoietico ha indotto ad indagare gli effetti della sua assenza sulla mieloproliferazione. A tal fine, si è utilizzato un modello murino  $Apc^{min}$  [71,72] caratterizzato da aumentata funzione e alterata quiescenza delle HSC; i topi mutanti sviluppano un fenotipo MDS/MPD in presenza di fattori HSC estrinseci. Per lo studio, cellule emopoietiche midollari di topi  $Apc^{min}$  sono state trapiantate in topi WT e  $Sparc^{-/-}$  e otto settimane dopo il trapianto è stata valutata la ricostituzione midollare e la mielopoiesi. Le chimere  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$ , ma non quelle  $Apc^{min}>WT$ , mostravano le caratteristiche di un disordine mieloproliferativo, con iperplasia midollare, aumento della granulopoiesi e arricchimento di cluster di cellule mieloidi morfologicamente immature, come dimostrato dall'immunoistochimica per il marker Gr-1 e conta differenziale degli elementi emopoietici midollari (Figura 28).

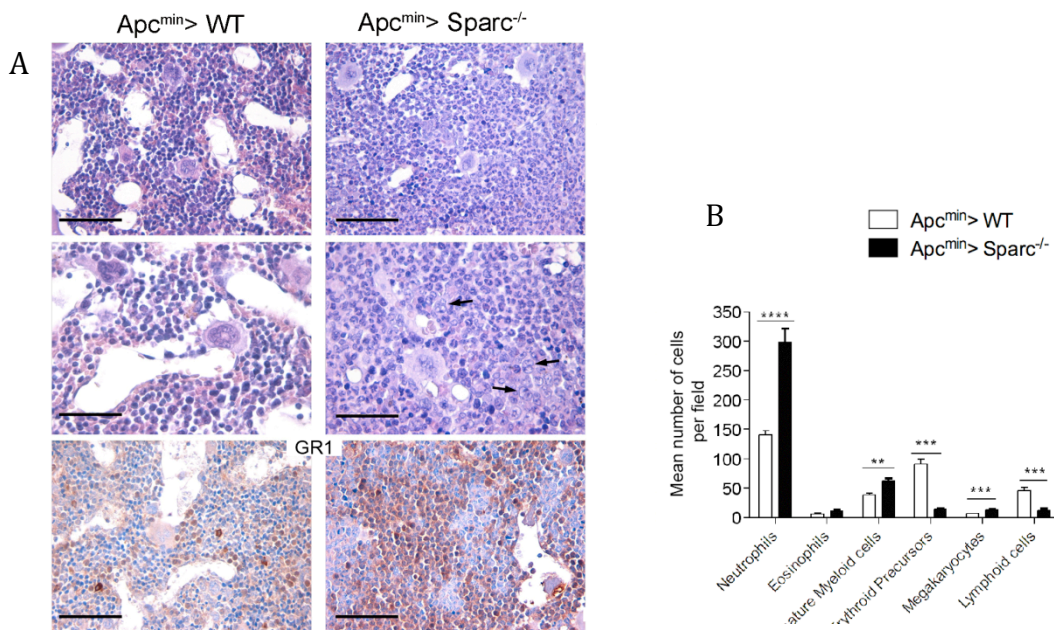


Figura 28: Analisi istomorfologica e immunoistochimica eseguita su sezioni midollari di chimere murine  $Apc^{min}>WT$  e  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  che evidenzia come il midollo delle chimere  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  è ipercellulato rispetto a quello delle chimere  $Apc^{min}>WT$  a causa della marcata espansione dei granulociti maturi (Gr1) e dei precursori mieloidi morfologicamente immaturi (A). B) Conta emopoietica differenziale eseguita su sezioni midollari di chimere  $Apc^{min}>WT$  e  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  che mostra un novole incremento nella frazione granulocitaria dei topi  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  (B).

La caratterizzazione immunofenotipica mediante citofluorimetria dei precursori  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  dimostra un significativo incremento dei precursori  $Lin^{-}GMP$  rispetto alle chimere  $Apc^{min}>WT$  ( $p<0.05$ ), dato che indica l'espansione preferenziale dei progenitori GMP in presenza di uno stroma che manca nell'espressione di SPARC. L'ipergranulopoiesi, che caratterizza i topi  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$ , è evidenziabile dall'analisi del sangue periferico in citofluorimetria, che mostra un'espansione della frazione  $Gr1^{+}Mac-1^{+}$  mieloide circolante (Figura 29).

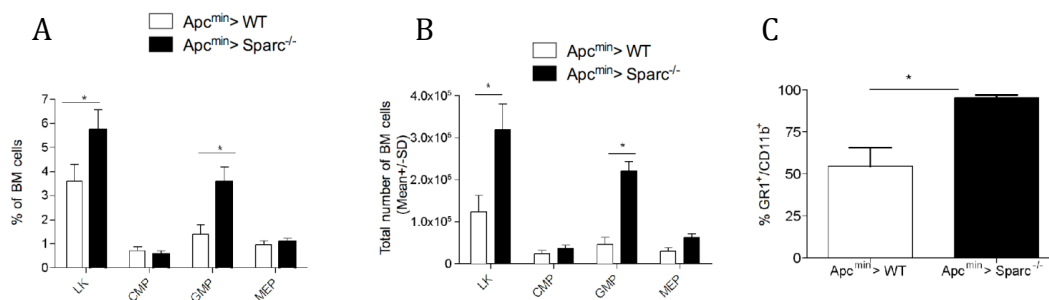


Figura 29: Frazioni (percentuale del numero totale di cellule midollari, significato e deviazione standard) e numero assoluto (significato e deviazione standard) della popolazione di cellule mieloidi [ $Lin^{-}c-kit^{+}$  (LK), CMP, GMP, MEP] che mostrano un significativo incremento dei precursori GMP nel midollo delle chimere  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  rispetto a quelle  $Apc^{min}>WT$  (A,B). Analisi citofluorimetria, da sangue periferico, delle cellule mieloidi  $Gr-1^{+}Mac-1^{+}$  delle chimere  $Apc^{min}>WT$  e  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  che mostrano una significativa espansione dei granulociti circolanti (C).

Lo striscio del sangue periferico delle chimere  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  mostra un incremento nelle forme immature e mature dei granulociti insieme alla presenza di cellule mieloidi dalla morfologia simil blastoide (Figura 30).

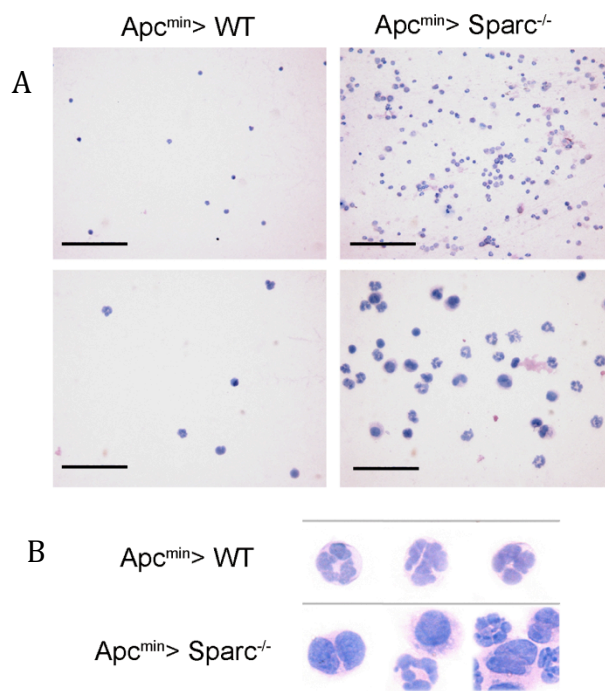


Figura 30: Colorazione H&E di strisci di sangue periferico da chimere  $Apc^{min}>WT$  e  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  che evidenzia granulocitosi associata allo stroma  $Sparc^{-/-}$  (A). Analisi morfologica di strisci di sangue periferico colorati con H&E da chimere  $Apc^{min}>WT$  e  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  che dimostra come la popolazione circolante granulocitaria dei topi  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  è ricca in forme immature e simil blastoidi rispetto allo stroma WT.

Lo stimolo mielopoietico nelle  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  non coinvolge solo il midollo ma anche la milza che presenta iperplasia della polpa rossa con rimodellamento della normale architettura splenica (Figura 31).



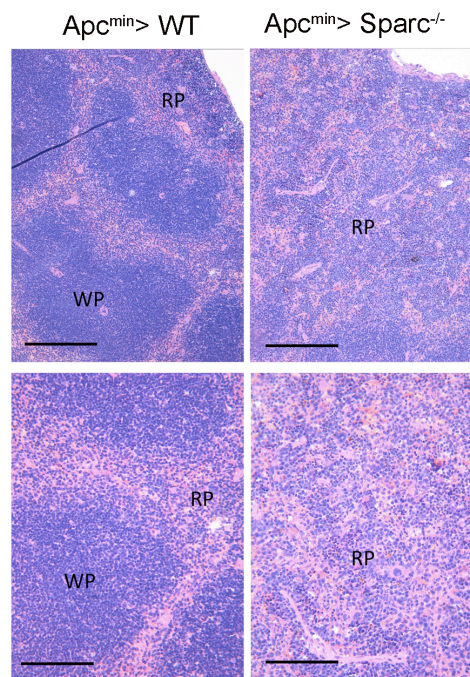


Figura 31: Analisi istologica dell'architettura splenica delle chimere  $Apc^{min}>WT$  e  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  che evidenzia come il parenchima splenico dei topi  $Apc^{min}>Sparc^{-/-}$  sia caratterizzato da espansione della polpa rossa, in seguito ad incremento dell'emopoiesi extramidollare, e da riduzione della polpa bianca.

L'insieme di questi dati supporta il coinvolgimento di SPARC nel *cross-talk* tra cellule emopoietiche e cellule suggerendo un potenziale contributo dello stroma deficitario in SPARC nell'induzione di un microambiente pronò alla mieloproliferazione.

## 8. DISCUSSIONE

Le MPN sono un gruppo eterogeneo di patologie clonali della cellula staminale emopoietica caratterizzate dalla proliferazione midollare di una o più linee mieloidi. Tali patologie hanno il potenziale di andare incontro a una graduale progressione clonale che culmina nel fallimento midollare, evento cui contribuiscono alterazioni stromali aberranti (fibrosi midollare e osteosclerosi) indotte e sostenute da numerose citochine prodotte dal clone neoplastico.

Il riscontro di tali modifiche nella nicchia emopoietica indica una prognosi sfavorevole, in quanto, il deterioramento della nicchia emopoietica inibisce la crescita degli elementi emopoietici residenti, che migrano verso organi deputati ad emopoiesi extramidollare ed esercita un' influenza negativa sull' "outcome" del trapianto allogenico, che attualmente rappresenta l'unica terapia in grado di indurre una remissione completa sia ematologica che citogenetica e molecolare [4,15,16].

Al fine di individuare nel microambiente un possibile marcatore diagnostico con significato prognostico, è stato valutato, in midolli di pazienti con MPN e su campioni controllo, il pattern e l'espressione di SPARC, proteina matricellulare pleiotropica espressa nei tessuti in rimodellamento [47-55]. Le indagini immunoistochimiche hanno evidenziato la sua estensiva espressione nello stroma di casi con aberrazioni stromali importanti oltre che nelle cellule megacariocitarie. Utilizzando come prototipo di MPN con mielofibrosi la PMF, la presenza di SPARC nello stroma mostrava, inoltre, una correlazione diretta con il grado di fibrosi, con il fattore di rischio prognostico più elevato e con la gravità del fallimento midollare. Ulteriore evidenza del possibile ruolo biologico di SPARC nel processo fibrogenetico è la sua presenza nelle cellule staminali mesenchimali midollari CD146+(BM-MSc), la co-localizzazione con il collagene tipo I nei foci di osteosclerosi, e la marcata espressione negli osteoblasti nei siti di nuova formazione ossea nelle PMF in fase avanzata. Mediante esperimenti condotti su modelli murini di mielofibrosi indotta da TPO (WT e *Sparc*<sup>-/-</sup>) e su chimere, è stato dimostrato che SPARC è richiesto nel rimodellamento stromale e identifica nelle cellule stromali una fonte rilevante della proteina. Secondo tale risultato è ipotizzabile un meccanismo secondo cui il clone neoplastico, attraverso la sintesi di citochine pro infiammatorie (TGF- $\beta$ 1, il PDGF, il VEGF, IGF e bFGF) stimola la proliferazione delle BM-MSc che a loro volta sintetizzano SPARC. Studi hanno dimostrato inoltre che SPARC interagisce direttamente con il PDGF BB e AB regolando in tal modo l'attività del recettore per PDGF e crea un *loop* autocrino

con TGF- $\beta$ 1 [47-55]. I dati ottenuti nello studio concordano con quanto presente in letteratura, poiché esperimenti di stimolazione *in vitro* di BM-MSC WT e *Sparc*<sup>-/-</sup>, prelevate dalle chimere, e trattate con rTGF- $\beta$ 1 dimostrano che la deposizione delle fibre di collagene è difettiva nelle MSC *Sparc*<sup>-/-</sup>, suggerendo, che l'espressione di SPARC nello stroma midollare di MPN potrebbe essere indotto dalla produzione di mediatori prodotti dal clone neoplastico, come il TGF- $\beta$ 1, nel tentativo di restaurare l'omeostasi (Figura 32).

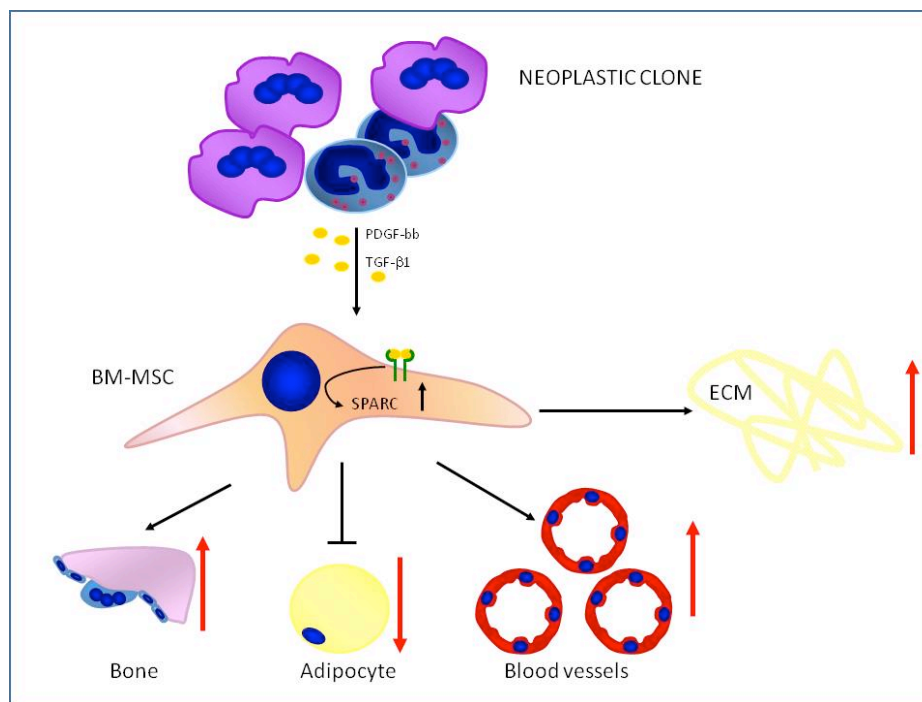


Figura 32: Ipotesi di meccanismo che regola l'overespressione di SPARC nelle MPN. Il clone neoplastico attraverso la sintesi di mediatori pro-infiammatori (TGF- $\beta$ 1, PDGF) stimola la sintesi di SPARC da parte delle cellule staminali mesenchimali, probabilmente per ricondurre il midollo verso uno stato di omeostasi. La sua eccessiva produzione induce angiogenesi, osteosclerosi e deposizione di nuova matrice extracellulare e regola, al contempo, la sintesi dello stesso TGF- $\beta$ 1.

E' stato provato che l'inibizione di SPARC mediante siRNA attenua la fibrosi in diversi setting patologici suggerendo una possibile applicazione terapeutica in tali patologie [68]. Sebbene tale proposta terapeutica possa essere utile nella cura delle alterazioni stromali in corso di MPN è necessario porre l'attenzione su un dato che emerge nello studio effettuato, secondo cui nel midollo delle chimere, l'assenza di SPARC favorisce l'espansione delle cellule mieloidi dopo trattamento con TPO. Al fine di indagare il duplice ruolo di SPARC,

è stato scelto un modello murino, nel quale le cellule HSC hanno un difetto genetico che interviene nella genesi mieloproliferativa. Utile a tale scopo è il modello murino *Ap<sup>c</sup><sup>min</sup>* nel quale la mutazione del gene *Ap<sup>c</sup>* altera la funzione e la quiescenza delle HSC in seguito ad incremento nel signaling della  $\beta$ -catenina. I topi sviluppano quindi un fenotipo MDS/MPD dipendente da fattori microambientali clone-estrinseci, rendendo questo fenotipo non trapiantabile in un ricevente singenico WT. Inoltre, la scelta di questo modello è stata guidata dall'evidenza che entrambi i geni sono coinvolti nella patogenesi della MDS 5q- [71,72]. Il trapianto di midollo *Ap<sup>c</sup><sup>min</sup>* in un recipiente *Sparc<sup>-/-</sup>* determina un disordine mieloproliferativo classificato nei topi come “mieloproliferazione – non reattiva”[73] con segni di ipergranulopoiesi midollare e incremento nel numero di granulociti maturi circolanti ed elementi immaturi, fenotipo che non si osserva nelle chimere *Ap<sup>c</sup><sup>min</sup>>WT*. Questo risultato dimostra che uno stroma midollare difettivo nella sintesi di SPARC rappresenta una condizione favorevole allo stabilirsi di uno stimolo mieloproliferativo.

I dati evidenziati nello studio indicano che SPARC gioca un ruolo chiave nello sviluppo della fibrosi midollare in risposta a mieloproliferazione e che, di contro, la sua assenza sostiene l'espansione della popolazione mieloide. La diversa influenza di SPARC nello stroma riflette due evoluzioni indipendenti dei processi mieloproliferativi con significato negativo orchestrate, possibilmente, da cloni mieloidi differenti o anche variazioni nella biologia dello stesso clone mieloide, che modulano diversamente l'espressione di SPARC nello stroma. Nella PV, CML, MDS e AML, l'evoluzione fibrotica, rispetto alla PMF, avviene solo in frazione di pazienti, suggerendo che l'eterogeneità della reazione stromale midollare potrebbe dipendere dalla variabilità genetica del clone neoplastico che detta la natura dei segnali percepiti dalle cellule stromali. Inoltre, la fibrosi midollare è stata recentemente riportata essere indipendente dalla progressione leucemica in un'ampia coorte di pazienti affetti da MPN. Quindi, la modulazione di processi che coinvolgono lo stroma, potrebbero influenzare il diverso outcome nelle MPN come dimostrato in casi di MPN nei quali alla fibrosi si associa un'elevata espressione di SPARC e l'evoluzione verso una fase accelerata vede una sua riduzione nelle aree ricche in blasti mieloidi evento che sottolinea la plasticità del microambiente midollare in risposta a stimoli che turbano l'omeostasi midollare (Figura 33).

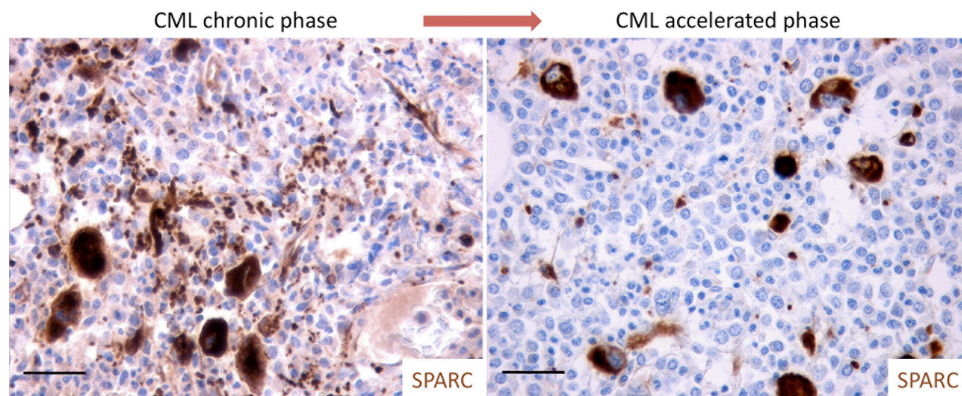


Figura 33: Analisi immunoistochimica di SPARC su sezioni di midollo di soggetti affetti da CML in fase cronica con fibrosi e in fase accelerata che dimostra come SPARC aumenti e diminuisca rispettivamente in relazione alla variabilità genetica del clone neoplastico.

Nel complesso i risultati indicano la necessità di un bilanciamento stromale nell'espressione di SPARC per il mantenimento dell'omeostasi midollare ed implicano SPARC come potenziale marcatore prognostico nelle neoplasie mieloproliferative.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France:IARC;2008
2. Campbell, P. J.; Green, A. R. The myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* 2006, 355, 2452-2466
3. Wadleigh M, Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms according to the 2008 World Health Organization criteria. *Int J Hematol.* 2010 Mar;91(2):174-9
4. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin.* 2009 May-Jun;59(3):171-91
5. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med.* 2000 Apr 27;342(17):1255-65.
6. Kralovics, R.; Skoda, R. C. Molecular pathogenesis of Philadelphia chromosome negative myeloproliferative disorders. *Blood Rev.* 2005, 19, 1-13
7. Roder, S.; Steimle, C.; Meinhardt, G.; Pahl, H. L. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp.Hematol.* 2001, 29, 694-702
8. Kralovics, R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008, 22, 1841-1848
9. Kralovics, R.; Passamonti, F.; Buser, A.; Teo, S.; Tiedt, R.; Passweg, J.; Tichelli, A.; Cazzola, M.; Skoda, R. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N.Engl. J. Med.* 2005, 352, 1779-1790
10. Baxter, E. J.; Scott, L. M.; Campbell, P. J.; East, C.; Fourouclas, N.; Swanton, S.; Vassiliou, G. S.; Bench, A. J.; Boyd, E. M.; Curtin, N.; Scott, M. A.; Erber, W. N.; Green, A. R. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005, 365, 1054-1061
11. James, C.; Ugo, V.; Le Couedic, J. P.; Staerk, J.; Delhommeau, F.; Lacout, C.; Garcon, L.; Raslova, H.; Berger, R.; Bennaceur- Griscelli, A.; Villeval, J. L.; Constantinescu, S. N.; Casadevall, N.; Vainchenker, W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutivesignalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005, 434,1144-1148
12. Levine, R. L.; Wadleigh, M.; Cools, J.; Ebert, B. L.; Wernig, G.; Huntly, B. J.; Boggon, T. J.; Wlodarska, I.; Clark, J. J.; Moore, S.; Adelsperger, J.; Koo, S.; Lee, J. C.; Gabriel, S.; Mercher, T.; D'Andrea, A.; Frohling, S.; Dohner, K.; Marynen, P.; Vandenberghe, P.; Mesa, R. A.; Tefferi, A.; Griffin, J. D.; Eck, M. J.; Sellers, W. R.;

- Meyerson, M.; Golub, T. R.; Lee, S. J.; Gilliland, D. G. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005, 7, 387-397
13. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* (2010) 24, 1128–1138
  14. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Aug 18;118(7):1723-35
  15. Tefferi A. How I treat myelofibrosis. *Blood*. 2011 Mar 31;117(13):3494-504
  16. Tefferi A, Skoda R, Vardiman JW. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Nov;6(11):627-37
  17. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2000 Nov 15;96(10):3374-80.
  18. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005 Aug;90(8):1128-32
  19. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, Rodeghiero F, d'Amore ES, Randi ML, Bertozzi I, Marino F, Vannucchi AM, Antonioli E, Carrai V, Gisslinger H, Buxhofer-Ausch V, Müllauer L, Carobbio A, Gianatti A, Gangat N, Hanson CA, Tefferi A. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 10;29(23):3179-84
  20. Thiele J, Kvasnicka HM. Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings—a clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis. *Ann Hematol*. 2006 Apr;85(4):226-32.
  21. Vener C, Fracchiolla NS, Gianelli U, Calori R, Radaelli F, Iurlo A, Caberlon S, Gerli G, Boiocchi L, Deliliers GL. Prognostic implications of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):1862-5.
  22. Thiele J, Kvasnicka HM, Dietrich H, Stein G, Hann M, Kaminski A, Rathjen N, Metz KA, Beelen DW, Ditschkowski M, Zander A, Kroeger N. Dynamics of bone marrow

changes in patients with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. *Histol Histopathol.* 2005 Jul;20(3):879-89.

23. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, Vannucchi AM, Mesa RA, Demory JL, Barosi G, Rumi E, Tefferi A. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood.* 2009 Mar 26;113(13):2895-901

24. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4(1-2):7-25

25. Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011 Dec 23;12(1):49-60

26. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005 Jul 1;121(7):1109-21

27. Porter RL, Calvi LM. Communications between bone cells and hematopoietic stem cells. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15;473(2):193-200

28. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003 Oct 23;425(6960):836-41

29. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2631-9

30. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1195-201

31. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006 Feb;6(2):93-106

32. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):301-13

33. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007 Oct 19;131(2):324-36



34. Tripodo C, Sangaletti S, Piccaluga PP, Prakash S, Franco G, Borrello I, Orazi A, Colombo MP, Pileri SA. The bone marrow stroma in hematological neoplasms—a guilty bystander. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Mar 29;8(8):456-66
35. Bianco P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood*. 2011 May 19;117(20):5281-8
36. Tripodo C, Di Bernardo A, Ternullo MP, Guarnotta C, Porcasi R, Ingrao S, Gianelli U, Boveri E, Iannitto E, Franco G, Florena AM. CD146(+) bone marrow osteoprogenitors increase in the advanced stages of primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2009 Jan;94(1):127-30
37. Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, Uzan G, Jasmin C, Martyré MC, Le Bousse-Kerdilès MC; French INSERM and the European EUMNET Networks on Myelofibrosis. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3026-35
38. Le Bousse-Kerdilès MC, Martyré MC, Samson M. Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review. *Eur Cytokine Netw*. 2008 Jun;19(2):69-80
39. Aszódi A, Legate KR, Nakchbandi I, Fässler R. What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:591-621
40. Tsang KY, Cheung MC, Chan D, Cheah KS. The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation. *Cell Tissue Res*. 2010 Jan;339(1):93-110
41. Bornstein P. Matricellular proteins: an overview. *Matrix Biol*. 2000 Dec;19(7):555-6
42. Chiodoni C, Colombo MP, Sangaletti S. Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(2):295-307
43. Clark CJ, Sage EH. A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment--where there's SPARC, there's fire. *J Cell Biochem*. 2008;104(3):721-32
44. Sangaletti S, Colombo MP. Matricellular proteins at the crossroad of inflammation and cancer. *Cancer Lett*. 2008 Aug 28;267(2):245-53.
45. Q. Yan, M. Weaver, N. Perdue, E.H. Sage, Matricellular protein SPARC is translocated to the nuclei of immortalized murine lens epithelial cells, *J. Cell. Physiol*. 203 (1) (2005)286–294
46. Perbal B. New insight into CCN3 interactions--nuclear CCN3 : fact or fantasy? *Cell Commun Signal*. 2006 Aug 8;4:6

47. Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Mar;44(3):480-8
48. Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* 1994 Feb;8(2):163-73
49. Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem.* 1999 Dec;47(12):1495-506
50. Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol.* 2001 Jan;19(8):816-27
51. Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest.* 2001 May;107(9):1049-54
52. Nie J, Sage EH. SPARC functions as an inhibitor of adipogenesis. *J Cell Commun Signal.* 2009 Dec;3(3-4):247-54
53. Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. *J Cell Commun Signal.* 2009 Dec;3(3-4):227-38
54. Bradshaw AD. The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *J Cell Commun Signal.* 2009 Dec;3(3-4):239-46
55. Kaufmann B, Müller S, Hanisch FG, Hartmann U, Paulsson M, Maurer P, Zaucke F. Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity. *Glycobiology.* 2004 Jul;14(7):609-19
56. Leitinger B, Hohenester E. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol.* 2007 Apr;26(3):146-55
57. DiMartino JF, Lacayo NJ, Varadi M, Li L, Saraiya C, Ravindranath Y, Yu R, Sikic BI, Raimondi SC, Dahl GV. Low or absent SPARC expression in acute myeloid leukemia with MLL rearrangements is associated with sensitivity to growth inhibition by exogenous SPARC protein. *Leukemia.* 2006 Mar;20(3):426-32
58. Pellagatti A, Jädersten M, Forsblom AM, Cattani H, Christensson B, Emanuelsson EK, Merup M, Nilsson L, Samuelsson J, Sander B, Wainscoat JS, Boultonwood J, Hellström-Lindberg E. Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 3;104(27):11406-11
59. Lehmann S, O'Kelly J, Raynaud S, Funk SE, Sage EH, Koeffler HP. Common deleted genes in the 5q- syndrome: thrombocytopenia and reduced erythroid colony formation in SPARC null mice. *Leukemia.* 2007 Sep;21(9):1931-6

60. K Siva, P Jaako, K Miharada, E Rörby, M Ehinger, G Karlsson and S Karlsson SPARC is dispensable for murine hematopoiesis, despite its suspected pathophysiological role in 5q-myelodysplastic syndrome *Leukemia* (5 April 2012)
61. Fenouille N, Puissant A, Dufies M, Robert G, Jacquel A, Ohanna M, Deckert M, Pasquet JM, Mahon FX, Cassuto JP, Raynaud S, Tartare-Deckert S, Auberger P. Persistent activation of the Fyn/ERK kinase signaling axis mediates imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cells through upregulation of intracellular SPARC. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9659-70
62. Strandjord TP, Madtes DK, Weiss DJ, Sage EH. Collagen accumulation is decreased in SPARC-null mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol.* 1999 Sep;277(3 Pt 1):L628-35
63. Sangaletti S, Tripodo C, Cappetti B, Casalini P, Chiodoni C, Piconese S, Santangelo A, Parenza M, Arioli I, Miotti S, Colombo MP. SPARC oppositely regulates inflammation and fibrosis in bleomycin-induced lung damage. *Am J Pathol.* 2011 Dec;179(6):3000-10. Epub 2011 Oct 11. Erratum in: *Am J Pathol.* 2012
64. Atorrasagasti C, Aquino JB, Hofman L, Alaniz L, Malvicini M, Garcia M, Benedetti L, Friedman SL, Podhajcer O, Mazzolini G. SPARC downregulation attenuates the profibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF- $\beta$ 1 and PDGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011 May;300(5):G739-48
65. Francki A, Bradshaw AD, Bassuk JA, Howe CC, Couser WG, Sage EH. SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor- $\beta$ 1 in mesangial cells. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5;274(45):32145-52
66. Francki A, McClure TD, Brekken RA, Motamed K, Murri C, Wang T, Sage EH. SPARC regulates TGF- $\beta$ 1-dependent signaling in primary glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem.* 2004 Apr 1;91(5):915-25
67. Socha MJ, Manhiani M, Said N, Imig JD, Motamed K. Secreted protein acidic and rich in cysteine deficiency ameliorates renal inflammation and fibrosis in angiotensin hypertension. *Am J Pathol.* 2007 Oct;171(4):1104-12
68. Wang JC, Lai S, Guo X, Zhang X, de Crombrughe B, Sonnylal S, Arnett FC, Zhou X. Attenuation of fibrosis in vitro and in vivo with SPARC siRNA. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):R60
69. Zhou X, Tan FK, Guo X, Wallis D, Milewicz DM, Xue S, Arnett FC. Small interfering RNA inhibition of SPARC attenuates the profibrotic effect of transforming growth factor

betal in cultured normal human fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2005 Jan;52(1):257-61. PubMed PMID: 15641096.

70. Ulich TR, del Castillo J, Senaldi G, Kinstler O, Yin S, Kaufman S, Tarpley J, Choi E, Kirley T, Hunt P, Sheridan WP. Systemic hematologic effects of PEG-rHuMGDF-induced megakaryocyte hyperplasia in mice. *Blood.* 1996 Jun 15;87(12):5006-15

71. Lane SW, Sykes SM, Al-Shahrour F, Shterental S, Paktinat M, Lo Celso C, Jesneck JL, Ebert BL, Williams DA, Gilliland DG. The *Apc*(min) mouse has altered hematopoietic stem cell function and provides a model for MPD/MDS. *Blood.* 2010 Apr 29;115(17):3489-97.

72. Wang J, Fernald AA, Anastasi J, Le Beau MM, Qian Z. Haploinsufficiency of *Apc* leads to ineffective hematopoiesis. *Blood.* 2010 Apr 29;115(17):3481-8.

73. Kogan SC, Ward JM, Anver MR, Berman JJ, Brayton C, Cardiff RD, Carter JS, de Coronado S, Downing JR, Fredrickson TN, Haines DC, Harris AW, Harris NL, Hiai H, Jaffe ES, MacLennan IC, Pandolfi PP, Pattengale PK, Perkins AS, Simpson RM, Tuttle MS, Wong JF, Morse HC 3rd; Hematopathology subcommittee of the Mouse Models of Human Cancers Consortium. Bethesda proposals for classification of nonlymphoid hematopoietic neoplasms in mice. *Blood.* 2002 Jul 1;100(1):238-45.

## *RINGRAZIAMENTI*

Lo studio presentato in questa tesi è il frutto della collaborazione tra l'Ateneo di Palermo e L'istituto tumori di Milano quindi intendo ringraziare:

Il gruppo di ricerca del quale faccio parte nelle persone del dott. Tripodo C. , dott.ssa Cacciatore M., dott. Gulino A., dott. Calvaruso M., prof. ssa Florena A.M.e dell prof. Franco V. per loro preziosissimo supporto non solo professionale, ma anche umano.

Il Dott. Colombo M.P. e la dott.ssa Sangaletti S. dell'istituto Tumori di Milano che hanno supportato lo studio con i modelli murini *Sparc*<sup>-/-</sup> e contribuendo alla pianificazione degli esperimenti

Il dott. Sica della Fondazione Istituto Clinico Humanitas di Milano per averci donato i midolli dei topi APC<sup>min</sup>