

Programma Short Term Mobility STM- 2016

Assegnataria STM-2016:

Prot. AMMCNT-CNR n.57873 del 02/09/2016

Dr.ssa Anna De Vincenzo

Istituto dei Genetica e Biofisica "A.B.T.",

CNR, Napoli

Supervisore Istituto di afferenza:

Dr.ssa Maria Patrizia Stoppelli

Istituto dei Genetica e Biofisica "A.B.T.",

CNR, Napoli

Supervisore Istituzione ospitante:

Prof. Marie Ranson

Illawarra Health and Medical Research Institute (IHMRI)

University of Wollongong (UOW), Australia

Titolo del Programma di Ricerca

Italiano: Interazione epitelio-stroma nel carcinoma mammario: validazione di mediatori solubili e peptidi anti-metastatici in sistemi organotipici tridimensionali.

Inglese: Epithelium-stroma interaction in mammary carcinoma: validation of soluble mediators and anti-metastatic peptides in tridimensional organotypic systems.

Relazione Scientifica

Premessa

Il mio programma di ricerca si articola nell'ambito dell'Oncologia molecolare e si concentra sullo studio del carcinoma mammario. Obiettivo della mia missione STM presso il laboratorio di *Cancer Cell Biology* della Prof. Marie Ranson, IHMRI Università di Wollongong (AU) è stato quello di apprendere la tecnologia del saggio 3-D organotipico per studiare il complesso e articolato *cross-talk* che intercorre tra tumore e stroma nelle neoplasie della mammella. Lo studio del microambiente tumorale, e dei fibroblasti associati al cancro o CAFs nella patogenesi dei carcinomi mammari è centrale per lo sviluppo di nuovi e più efficaci farmaci antitumorali, contribuendo a identificare nuovi *target* molecolari coinvolti nel mantenimento, nella progressione e nella metastatizzazione tumorale (Hanahan et al., 2011). In particolare l'aspetto veramente innovativo del saggio 3-D organotipico è quello di offrire un sistema sperimentale che mima *in vitro* non solo la struttura tridimensionale del tumore, ma riproduce anche la complessità dei differenti tipi cellulari che lo compongono (Timpson et al., 2011). Sono proprio questi due aspetti, struttura 3-D ed eterogeneità cellulare, che rendono questa nuova tecnica ideale per investigare i meccanismi

molecolari dello sviluppo neoplastico, e testare *drugs* di ultima generazione, tenendo conto di tutte quelle caratteristiche chimico-fisiche determinanti la farmaco-resistenza tumorale (Hickman et al., 2014).

È in questo contesto che il progetto scientifico da me proposto si colloca: nel corso della mia missione presso la *School of Biological Sciences* dell'istituto IHMRI, (UOW), ho innanzitutto seguito un *training* per imparare il saggio 3-D organotipico. Contemporaneamente, ho potuto iniziare la validazione del ruolo dei fattori di crescita insulino-simili (IGFs) nell'interazione epitelio mammario - stroma in coltura. Come precedentemente da me determinato nella Tesi di Dottorato, i fattori IGF-1 ed IGF-2 sono responsabili del reclutamento e dell'attivazione dei fibroblasti stromali (linee cellulari e fibroblasti primari) da parte delle cellule epiteliali iperesprimenti il proto-oncogene c-Myc (De Vincenzo A. et al., 2016).

Aspetti tecnici della metodica appresa

Gli aspetti tecnici di questa metodica, riassunti nello schema riportato in Fig.1, prevedono in prima istanza, la generazione di una matrice 3-D che include collagene di tipo I, estratto da tendini murini, e fibroblasti. Questi ultimi, attraverso un rimodellamento meccanico e proteolitico delle fibrille di collagene, processo definito *contraction*, sono in grado di ricostituire *in vitro* una matrice, definita *plug*, che mima le caratteristiche 3-D dello stroma extracellulare. Inizialmente, per la messa a punto della tecnica, ho impiegato una linea di fibroblasti fetali umani derivanti da tessuto polmonare, i fibroblasti WI-38, esprimenti bassi livelli di alfa-actina della muscolatura liscia (α -SMA), noto marcatore molecolare del fenotipo CAF. Le matrici 3-D organotipiche vengono preparate come descritto qui di seguito. Il protocollo prevede che $7,5 \times 10^5$ fibroblasti WI-38 siano cresciuti in piastre da 100 mm per tre giorni in DMEM 10% FBS fino al raggiungimento della confluenza cellulare. Nelle successive 24 ore, i fibroblasti sono tenuti in coltura in condizioni di iperconfluenza al fine di indurne uno stato di senescenza cellulare. È necessario, infatti, che i fibroblasti si trovino in uno stato “metabolicamente inattivo” al momento di unirli al collagene-I per ottenere un rimodellamento ottimale della matrice di collagene stessa. Negli esperimenti presentati di seguito, sono stati utilizzati $1,6 \times 10^6$ fibroblasti WI-38 per produrre una singola matrice. È importante evidenziare che il numero di cellule necessario per ottenere il corretto rimodellamento della matrice di collagene, cioè ottenere una *plug* con diametro di circa 1,5 cm, è variabile e dipende dal tipo di fibroblasti impiegati nel saggio. Una volta contati, i fibroblasti sono poi risospesi in un volume di 300 μ L di 100% FBS e uniti, in ghiaccio, a una soluzione contenente 300 μ L MEM 1 X; 2,1 ml di Collagene di tipo I (diluito 1:7 con Acido Acetico 17,5 mM) e NaOH 1M, aggiunto fino a neutralizzare il pH. Una volta che il collagene è polimerizzato, un'ora a 37°C in un incubatore, le

matrici appaiono di colore giallo. A questo punto viene aggiunto del mezzo completo alle matrici, e poi queste sono lasciate contrarre fino a raggiungere un diametro di circa 1,5 cm (7-12 giorni).

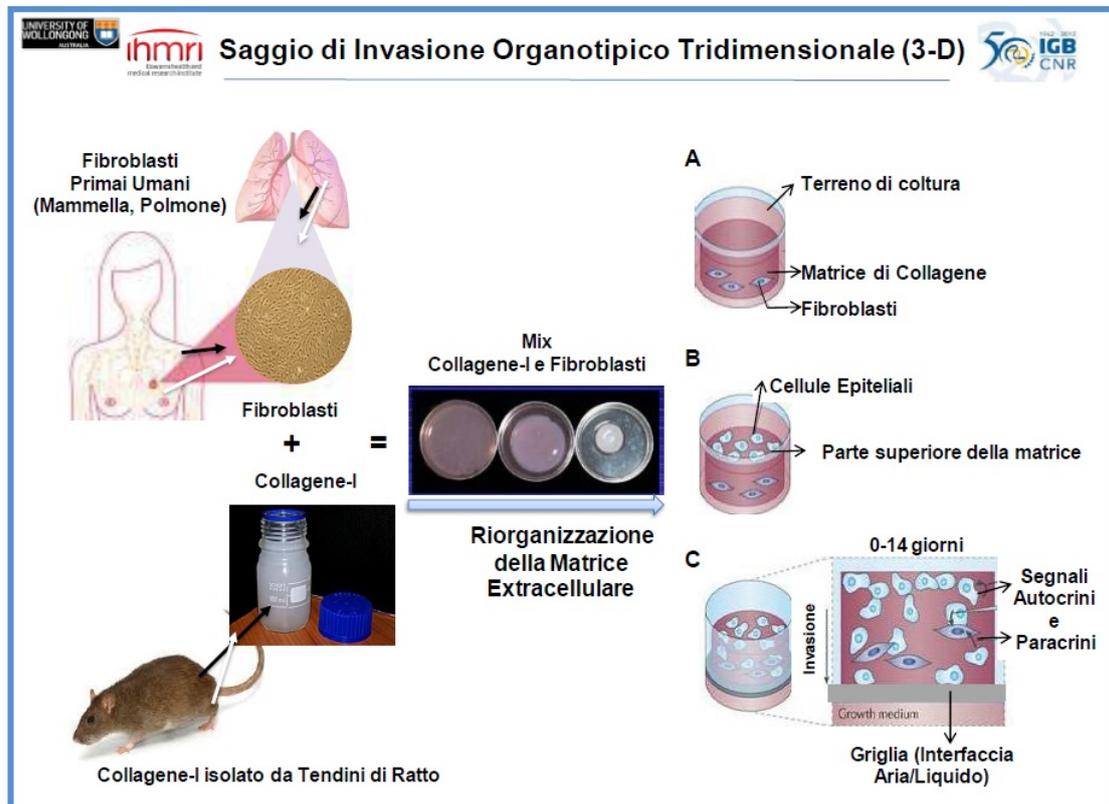


Figura 1: Schema del saggio di invasione organotipico tridimensionale. La matrice 3-D è generata unendo al collagene-I, estratto da tendini di code di ratto, fibroblasti umani primari (isolati da mammella o polmone). I fibroblasti, attraverso un complesso processo di riorganizzazione delle fibrille di collagene, generano una struttura 3-D, detta matrice o *plug*, dopo circa 6-12 giorni. Una volta ottenute matrici con un diametro di circa 1,5 cm, cellule epiteliali tumorali sono seminate sulla parte superiore della matrice stessa e dunque lasciate migrare ed invadere per circa 14 giorni. Durante la fase d'invasione, le matrici sono poste su di una griglia metallica che separa le matrici dal terreno di coltura al fine di generare un gradiente chemotattico che favorisce la migrazione delle cellule epiteliali stesse.

Al termine della fase di *contraction*, sulle matrici, trasferite in piastre multi-pozzetto da 24, vengono seminate le cellule epiteliali. Per la fase d'invasione, gli organoidi vengono trasferiti su apposite griglie di metallo (in piastre da 60 mm) che generando un gradiente chemotattico (interfaccia aria- liquido), favoriscono la migrazione e l'invasione delle cellule epiteliali nella matrice stessa. La durata della fase d'invasione dipende dalla linea cellulare in esame. In generale, maggiore è il grado di trasformazione tumorale della linea epiteliale, più veloce è la fase d'invasione. Infine, gli organoidi sono fissati in 4% paraformaldeide, tagliati al microtomo, e le sezioni ottenute, colorate con ematossilina-eosina per determinare il grado d'invasione cellulare. Per i saggi d'invasione nelle matrici 3D-organotipiche presentati di seguito, ho utilizzato come sistema cellulare sperimentale una linea cellulare umana non trasformata derivante dall'epitelio mammario, le MCF10A, e i fibroblasti umani normali WI-38. In breve, 5×10^4 MCF10A sono state seminate su ciascuna matrice di fibroblasti WI-38, e lasciate invadere per 14 giorni.

Risultati ottenuti

Stabilite le condizioni sperimentali del saggio d'invasione 3-D organotipico, impiegando i fibroblasti WI-38 e le cellule epiteliali MCF10A, ho analizzato se i fattori IGF-1 e IGF-2, promuovono il *cross-talk* tumore-stroma. Infatti, ho precedentemente dimostrato che i fattori IGFs sono tra i fattori secreti maggiormente regolati da c-Myc, presenti nei mezzi condizionati (MC) delle cellule epiteliali. La diminuzione dei livelli di espressione delle *IGF-binding protein-6* e *7* (IGFBP-6 e IGFBP-7) nei MC delle cellule epiteliali in cui c-Myc è attivo, contribuisce ad aumentare la biodisponibilità dei fattori IGFs (Pocsfalvi et al., 2011). Inoltre, nel corso della mia Tesi di dottorato presso l'IGB, ho dimostrato che i fattori IGFs stimolano la migrazione e l'aumento dei livelli di espressione di α -SMA nei fibroblasti WI-38 in seguito all'attivazione di c-Myc. Nell laboratorio della Prof Ranson, ho valutato se il pre-trattamento dei fibroblasti WI-38 con i fattori IGFs potesse modulare la capacità invasiva delle cellule epiteliali MCF10A. In breve, a quattro giorni dall'inizio della fase di *contraction*, le matrici di collagene-I contenenti fibroblasti WI-38 sono state incubate con 100 ng/ml di IGF-1 o IGF-2 per 48 ore. Come è possibile osservare in Fig.2, prima coppia di sezioni istologiche a sinistra, le cellule MCF10A non hanno la capacità di invadere le matrici rimodellate da fibroblasti WI-38 trattati con mezzo privo di siero. Le immagini, infatti, mostrano che il fronte delle cellule epiteliali è sostanzialmente localizzato sul margine superiore delle matrici 3-D. Questo dato è atteso, in quanto le MCF10A sono cellule epiteliali umane mammarie non trasformate. Diversamente, nelle matrici in cui sono stati inclusi i fibroblasti WI-38 pretrattati con i fattori IGF-1 o IGF-2 (ultime due coppie di sezioni istologiche a sinistra in Fig.2), si osserva un forte aumento dell'invasione delle cellule MCF10A. In questo caso si riscontra un marcato fronte di cellule epiteliali che ha invaso la matrice di collagene rimodellata dai fibroblasti. Questi nuovi dati, ottenuti in sistemi 3-D, supportano le mie precedenti osservazioni. Tali dati suggeriscono che i fibroblasti WI-38, se pre-trattati con i fattori IGFs, favoriscono la capacità di invadere delle cellule epiteliali MCF10A.

Nell'ultima parte del mio soggiorno presso l'UOW ho cercato di ottimizzare le condizioni sperimentali per adoperare nei saggi 3D fibroblasti primari umani isolati da pazienti affette da carcinoma della mammella. L'obiettivo è quello di ricostruire il "cross-talk" epitelio-stroma in condizioni il più possibile simili a quelle presenti in vivo. Nel corso del 2016, in collaborazione con l'Istituto Nazionale Tumori, IRCCS Fondazione G. Pascale di Napoli, ho raccolto, coltivato e congelato dei fibroblasti primari derivanti da biopsie di pazienti affette da carcinoma mammario.

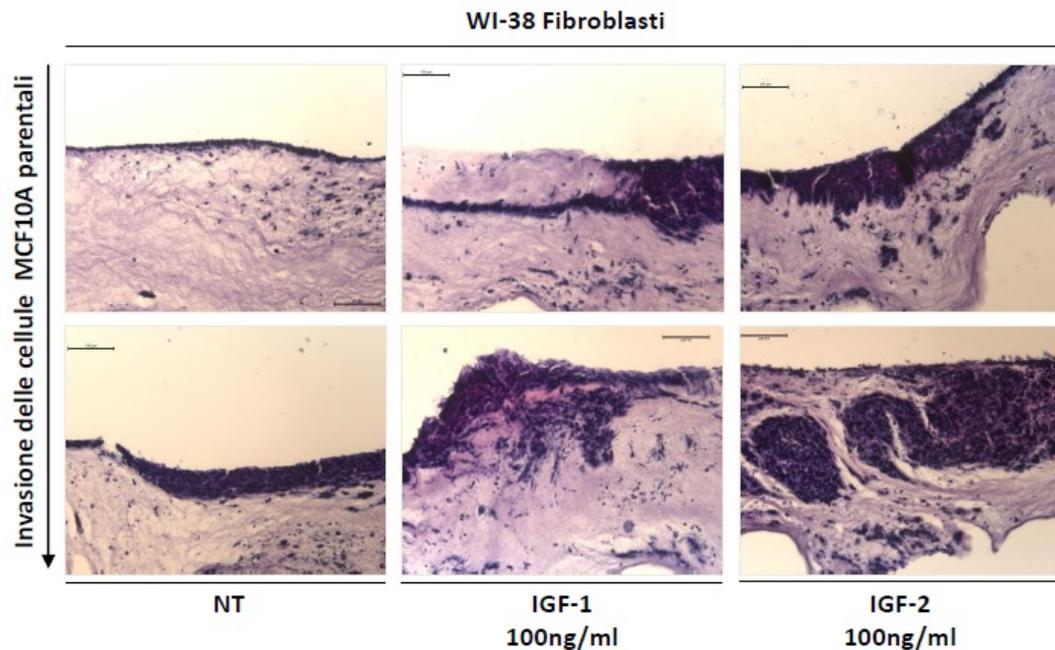


Figura 2: I fibroblasti WI-38 pretrattati con i fattori IGFs favoriscono capacità di invadere delle MCF10A parentali in saggi d'invasione 3-D organotipici. $1,6 \times 10^6$ fibroblasti WI-38 sono inclusi in matrici 3-D di collagene-I, dopo 4 giorni di *contraction*, le matrici sono trattate con 100ng/ml di IGF-1 o IGF-2, o con mezzo privo di siero per le successive 48 ore. Successivamente, 1×10^5 cellule epiteliali MCF10A sono piastrate sulla parte superiore delle matrici, e lasciate invadere per 14 giorni in mezzo completo. Al termine della fase di invasione, le matrici fissate in paraformaldeide sono colorate con ematossilina e eosina. Le immagini mostrate sono rappresentative delle sezioni istologiche (spessore $20\mu\text{m}$) analizzate per ciascuno dei triplicati delle tre condizioni in esame. Le immagini sono state acquisite in campo chiaro al microscopio ottico invertito con un ingrandimento 10X.

In particolare, per ogni paziente, seguendo una mappa di attivazione stromale (Gao et al., 2010), ho isolato:

- fibroblasti intra-tumorali (Fbs_{IT}), o CAFs, isolati dalla massa tumorale;
- fibroblasti peri-tumorali (Fbs_{PT}), distanti max 1 cm dalla lesione neoplastica;
- fibroblasti normai (Fbs_{NAF}), provenienti dai margini indenni dal residuo cellulare canceroso (oltre 5 cm).

Nell'esperimento mostrato di seguito, ho analizzato i fibroblasti della paziente M, affetta da carcinoma invasivo lobulare. Come mostrato in Fig.3A, tutti i fibroblasti adoperati ($\text{Fbs-M}_{\text{NAF}}$, Fbs-M_{PT} , Fbs-M_{IT}) hanno la capacità di essere vitali per settimane e rimodellare le matrici di collagene-I. Ho anche osservato che il processo di *contraction* è tempo-dipendente. Ho poi verificato se il trattamento con i fattori secreti da epiteliali esprimenti c-Myc potesse modificarne la loro capacità di sostenere l'invasione delle cellule MCF10A parentali. I dati ottenuti dimostrano che le matrici riorganizzate dai Fbs_{PT} pretrattati con i MC MCF10A-Myc^{ON} favoriscono l'invasione delle MCF10A (Fig 3B). Tali dati preliminari suggeriscono che i fattori ad espressione c-Myc dipendente presente nei MC delle MCF10-MycER stimolano la capacità dei fibroblasti di favorire l'invasione delle cellule epiteliali.

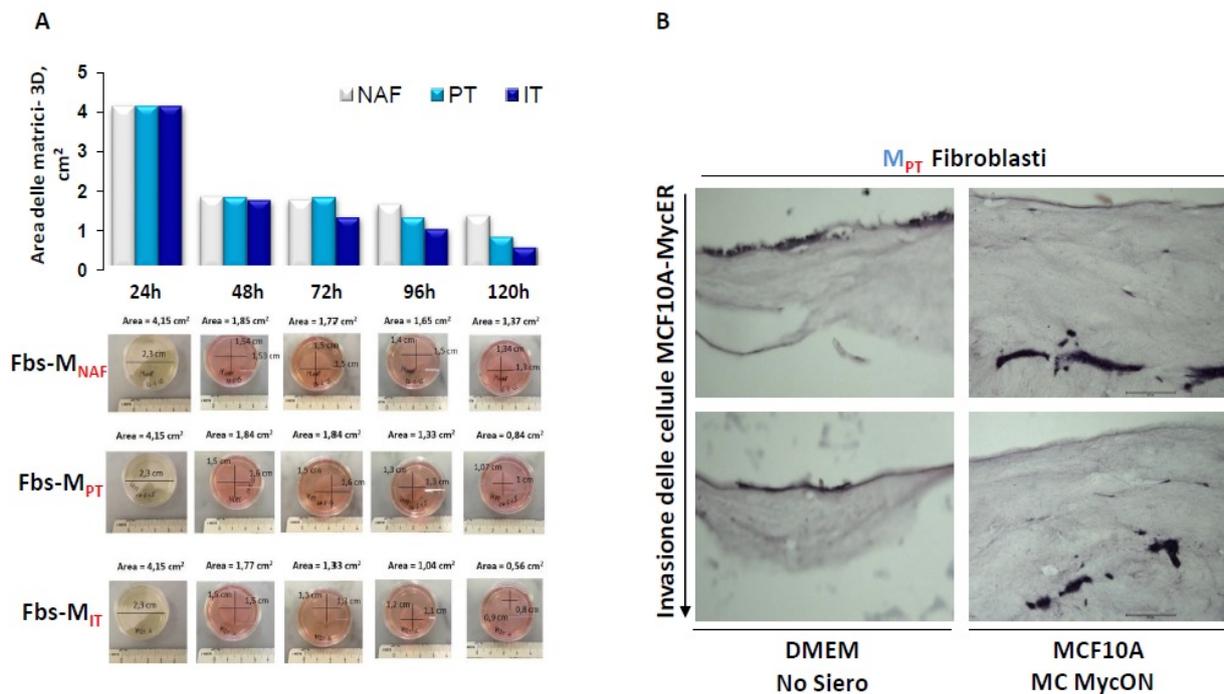


Figura 3: (A) Generazione di matrici-3D di collagene-I da parte dei fibroblasti primari mammari umani, isolati dalla paziente M, normali (Fbs-M_{NAF}), peri-tumorali(Fbs-M_{PT}), e intra-tumorali (Fbs-M_{IT}). **(B)** I Fbs-M_{PT} pretrattati con i MC MCF10A-Myc^{ON} stimolano l'invasione delle MCF10A parentali in saggi d'invasione 3-D organotipici. In breve, 5×10^4 fibroblasti Fbs-M_{PT} sono inclusi in collagene-I e, dopo 4 giorni di *contraction*, le matrici sono trattate con MC MCF10A-Myc^{ON} o mezzo privo di siero per le successive 48 ore. Successivamente, 1×10^5 cellule epiteliali MCF10A sono piastrate sulla parte superiore delle matrici, e lasciate invadere per 14 giorni in mezzo completo. Al termine della fase di invasione, le matrici fissate in paraformaldeide sono colorate con ematossilina e eosina. Le immagini mostrate sono rappresentative delle sezioni istologiche (spessore 20 μ m) analizzate per ciascuno dei triplicati delle tre condizioni in esame. Le immagini sono state acquisite in campo chiaro al microscopio ottico invertito con un ingrandimento 10X.

Conclusioni e Prospettive

In conclusione, posso affermare che il mio programma di ricerca STM-2016 presso il laboratorio della Prof. Ranson, università di Wollongong (Au), è stato completato con successo. L'apprendimento del saggio d'invasione 3D-organotipico mi ha permesso di iniziare la validazione del ruolo "tumor promoter" dei fattori IGFs regolati positivamente dall'oncogene c-Myc. I risultati ottenuti mi permetteranno di proseguire, sfruttando tutte le potenzialità di questa metodica, per consolidare i miei risultati.

In particolare, una volta rientrata nel mio istituto di afferenza, IGB-ABT, impiegherò la tecnologia appresa per inibire crescita ed invasione tumorale bloccando l'azione di supporto dei fibroblasti stromali peri-tumorali, attraverso l'azione di nuovi peptidi anti-invasivi disponibili nel laboratorio della Dr.ssa M. Patrizia Stoppelli (Franco e t al., 2013). I miei studi daranno un contributo alla conoscenza della fitta rete di informazioni molecolari scambiate tra cellule tumorali e stromali, al fine di identificare nuovi target e strategie per nuovi approcci terapeutici anti-neoplastici.

Referenze

- **De Vincenzo A.**, Belli S., Franco P., Iaccarino I and Stoppelli MP. Tumor-stroma crosstalk: factors secreted by c-Myc expressing epithelial cells increase fibroblast mobilization and activation through IGF-1R and uPAR. "Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis" Gordon Research Conference (GRC). Ventura (CA), USA, February 14-19, 2016.
- **De Vincenzo A.**, Belli S., Franco P., Iavazzo M., Monaco P., Iaccarino I. and Stoppelli M.P. IGF-1R and uPAR are essential to stromal fibroblast activation and mobilization in early breast tumorigenesis. "The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop", Nihondaira, Shizuoka, Japan, October 17-21, 2016.
- Franco P, Carotenuto A, Marozzi C, Votta G, Sarno C, Iaccarino I, Brancaccio D, **De Vincenzo A**, Novellino E, Grieco P and Stoppelli MP. Opposite Modulation of Cell Migration by Distinct Subregions of Urokinase Connecting Peptide. *Chembiochem*. Mar 20, 2013.
- Gao MQ, Kim BG, Kang S, Choi YP, Park H, Kang KS and Cho NH. Stromal fibroblasts from the interface zone of human breast carcinomas induce an epithelial-mesenchymal transition-like state in breast cancer cells in vitro. *J Cell Sci*. 2010; 123:3507-14.
- Hanahan D, and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144:646-74.
- Herrmann D., Conway JR., Vennin C., Magenau A., Hughes WE., Morton JP. and Timpson P. Three-dimensional cancer models mimic cell-matrix interactions in the tumor microenvironment. *Carcinogenesis*. 2014 Aug; 35(8):1671-9.
- Hickman JA, Graeser R, de Hoogt R, Vidic S, Brito C, Gutekunst M, van der Kuip H; IMI PREDECT Consortium. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnol J*. 2014; Sep;9(9):1115-28.
- Pocsfalvi G, Votta G, **De Vincenzo A**, Fiume I, Raj DA, Marra G, Stoppelli MP, and Iaccarino I. Analysis of secretome changes uncovers an autocrine/paracrine component in the modulation of cell proliferation and motility by c-Myc. *J Proteome Res*. 2011; 10:5326-37.
- Shamir ER. and Ewald AJ. Three dimensional organotypic culture experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Mol Cell Biol*. 2014 Oct;15(10):647-64.
- Timpson P, Mcghee EJ, Erami Z, Nobis M, Quin JA, Edward M and Anderson KI. Organotypic Collagen I Assay: A Malleable Platform to Assess Cell Behaviour in a 3-Dimensional Context. 2011. *J. V. Exp*; 56-10.3791/3089.

Napoli, 11/10/2017

In fede,

