

Programma di ricerca Short Term Mobility 2016

Fruitrice: Francesca Romana Bertani, Istituto di Fotonica e Nanotecnologie

Istituzione Ospitante: Medicine Department, Duke University, Durham NC, USA

Periodo di soggiorno: 10 settembre - 1 ottobre 2016

Titolo del programma: Immunoterapia su Chip

Relazione Scientifica

La rilevanza clinica dello studio del microambiente tumorale, e della capacità di questo di modulare la risposta immunitaria di un organismo è oggi assolutamente evidente. La collaborazione che si sta sviluppando tra l'Istituto di Fotonica e Nanotecnologie e il gruppo del Dott. Racioppi che afferisce alla divisione di Terapie Cellulari e Neoplasie Ematologiche infatti punta a far convergere le competenze di micro fabbricazione nello sviluppo di dispositivi microfluidici a disposizione presso il CNR, e le competenze di immunologia presenti nel gruppo americano per sviluppare modelli cellulari Tumore-Sistema Immunitario su Chip. La presenza presso il Campus dell'università di una facility di micro fabbricazione per la funzionalizzazione dei dispositivi ideati e prodotti dal CNR- IFN, e la possibilità di accesso alla facility di microscopia ottica (in particolare alla stazione di microscopia a fluorescenza e contrasto di fase per acquisizioni a tempi lunghi) ha permesso di mettere a punto l'intero flusso di lavoro, dall'isolamento delle cellule al primo trattamento delle immagini.

L'obiettivo del soggiorno era la messa a punto di protocolli avanzati di cocoltura di cellule di tumore e sistema immunitario attraverso:

- 1) Protocollo di isolamento e purificazione delle popolazioni cellulari di interesse a partire da campioni di tessuto ex-vivo (organi linfoidi, tumori sperimentali murini)
- 2) Test di caricamento delle cellule su chip
- 3) Ottimizzazione delle procedure di acquisizione ed analisi di immagini 2D e 3D

Nel corso delle tre settimane di lavoro sono quindi state testate diverse condizioni sperimentali e diversi modelli biologici, con l'obiettivo di ricreare le condizioni di una risposta immunitaria efficace verso le cellule tumorali, per poi estrarre dalle analisi delle immagini parametri quantitativi che potessero descrivere la risposta stessa.

La struttura del chip utilizzato è illustrato in fig. 1 e prevede la possibilità di inserire nelle camere laterali (in grigio in figura) cellule immerse in una matrice tridimensionale, e nella camera centrale cellule effettrici in sospensione, secondo protocolli precedentemente elaborati dal gruppo (1).

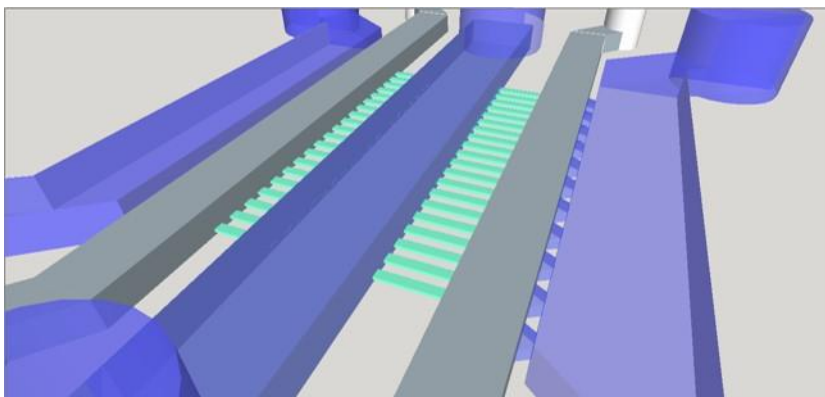


Fig.1 Design del chip microfluidico utilizzato per le colture

Nel caso in studio, le cellule di linfoma immerse, in questo caso collagene I, e nella camera centrale popolazioni cellulari rappresentative di un organo linfoide secondario, ovvero splenociti primari derivati da milza murina, arricchiti di cellule T (fig 2).



Fig 2. Popolazioni cellulari presenti nel chip microfluidico

Come modello tumorale è stata utilizzata la linea transgenica di linfoma murino EG7-OVA, trattata o non trattata con un farmaco sperimentale disponibile presso il laboratorio, e spontaneamente fluorescente perché ingegnerizzata con E-GFP (green fluorescent protein). Insieme al tumore, come primo esempio di microambiente, a partire dal secondo set di esperimenti sono state inserite popolazioni CD11b+ isolate da milza murina (macrofagi, monociti, granulociti e Natural Killer) e legate ad un tracciante fluorescente per esposizioni lunghe. Nella camera centrale, connessa alla camera tumorale da un sistema di micro canali che mima i processi di extravasazione e intravasazione, sono state inseriti splenociti primari e cellule T (in particolare estratte dal modello transgenico murino OT-I che presenta TCR contro ovalbumina) a loro volta identificate mediante colorazione fluorescente. Sono state prese in esame diverse condizioni di stimolazione delle cellule T: nessuna stimolazione, stimolazione in vitro, stimolazione in vivo. Sono state anche testate condizioni di adesione diverse nella camera linfoide: in assenza di coating e in presenza di fibronectina. Il chip è stato quindi posto sullo stativo del microscopio equipaggiato per lunghe osservazioni mantenendo la coltura cellulare in condizioni di vitalità (ovvero dotato di sistemi di termoregolazione, controllo della pressione di CO₂ e umidità). L'acquisizione di immagini, sia in contrasto di fase che in fluorescenza è durato almeno 42 ore. Un esempio dei processi osservati in questo intervallo di tempo è mostrato in figura 3.

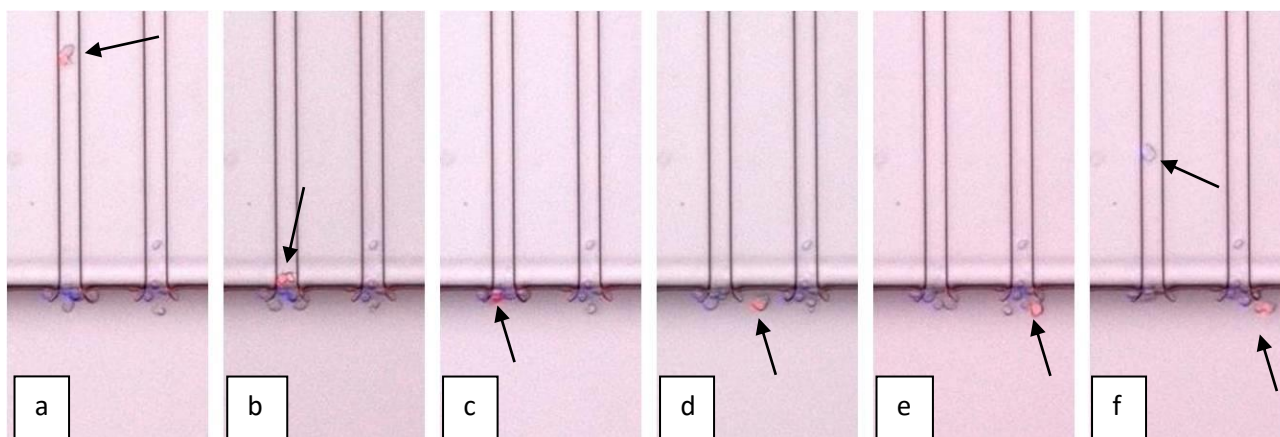


Fig.3 Particolare della sequenza (della durata di circa 5 ore, le immagini mostrate non sono equidistanti temporalmente) di immagini che evidenzia una delle interazioni di interesse. Da a) ad f) la cellula rossa (CD11b+) che migra dal compartimento tumorale verso quello linfoide, interagisce con le cellule T (blu) presenti e a seguito del contatto una cellula T effettua la migrazione inversa verso il compartimento tumorale.

Risultati

Grazie all'analisi preliminare dei video (analisi che è tuttora in corso) è stato possibile osservare gli effetti del trattamento sulle cellule tumorali: effetto di rallentamento della proliferazione, differenziamento e richiamo della popolazione linfoide. Il dato è stato confermato dall'analisi per citometria a flusso. E' stata osservata una netta tendenza alla migrazione al di fuori della camera tumorale da parte delle cellule di linfoma nelle cellule non trattate rispetto a quelle trattate. Sono state inoltre osservate dinamiche di migrazione a seguito di presentazione dell'antigene (sequenza in fig 3). Le caratteristiche quantitative di migrazione di ciascun tipo cellulare, nonché di interazione tra le diverse popolazioni sono in via di elaborazione quantitativa. Il protocollo verrà presentato come modello di partenza in progetti comuni in fase di presentazione, nonché in una pubblicazione in preparazione.

- 1) Combining Type I Interferons and 5-Aza-2'-Deoxycytidine to improve anti-tumor response against melanoma. J Invest Dermatol. 2016 Sep 10. pii: S0022-202X(16)32368-5. doi: 10.1016/j.jid.2016.08.024