

La genomica della singola cellula, prospettive storiche e attuali

CarloAlberto Redi

Accademia del Lincei Accademico dei Lincei, Presidente Comitato Etica Fondazione Umberto Veronesi, Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Lazzaro Spallanzani, European Center for Law, Science and New Technologies, Università degli Studi di Pavia.

Tre grandi rivoluzioni segnano lo sviluppo delle scienze della vita negli ultimi cent'anni, tutte legate alla biologia del DNA:

- 1953: la definizione della struttura del DNA;
- 1983: l'invenzione della reazione a catena della polimerasi (PCR);
- nelle ultime decadi degli anni recenti, la capacità di sequenziare sempre più velocemente grandi quantità di acidi nucleici.

La Biologia, verso il finire del secolo scorso, e sempre più rapidamente da quel momento, è stata in grado di far proprie tutte le innovazioni tecnologiche rilevanti di tante e diverse discipline quali la chimica, la fisica e l'ingegneria (*sensu lato*) ed in particolare dell'informatica determinando una capacità esponenzialmente aumentata di dissezionare le strutture e funzioni del vivente: è questa l'epoca delle tecnologie convergenti!

Quella di cui ci occupiamo quest'anno nel XXI corso di formazione è conosciuta con l'acronimo SCG (Single Cell Genomics) e si riferisce ormai genericamente allo studio della genomica a livello della singola cellula; genericamente, poiché ormai si è in grado di studiare a livello della singola cellula (grazie alle tecnologie convergenti) tante e diverse omiche: proteomica (Marx, 2023), trascrittomica (Lin et al., 2022), sinaptomica (Niu et al., 2023), etc. sino alle SCG di organuli cellulari (Eberwine, 2023) aprendo campi di indagine innovativi ove pare che solo la fantasia del ricercatore costituisca il limite per studiare e conoscere:

- la diversità di funzione e comportamento di singole cellule
- la dinamica di popolazioni cellulari nello spazio e nel tempo (cell differentiation)
- la fisiologia di singole cellule in condizioni normali e patologiche

Apprendo le lezioni del corso, a beneficio dei corsisti, corre dunque l'obbligo di rimarcare sia gli aspetti storici, per delineare la cornice intellettuale degli interventi, sia inquadrare i loro risvolti applicativi. È di interesse particolare segnalare che ricerche a livello di singola cellula si sono sempre svolte, e che la SCG è il frutto delle tecnologie convergenti. Anche i grandi del passato conducevano ricerche a livello di singola cellula: basterà ricordare Camillo Golgi e Giovanni Battista Grassi, con descrizioni

degne di opere d'arte della struttura interna di singoli neuroni e di svariate tipologie di cellule del sangue per chiarire la struttura anatomica del sistema nervoso e la storia del ciclo vitale del plasmodio della malaria.

In epoca più recente la citometria, statica e a flusso, si è avvalsa di sempre migliorate soluzioni tecnico-ingegneristiche per precisare aspetti qualitativi e quantitativi di componenti cellulari (contenuto di acidi nucleici, di proteine, quantità dei più svariati fluorofori marcatori di epitopi di membrana, etc.) sino alla possibilità di effettuare selezione di gruppi di cellule (*cell sorting* della citofluorimetria a flusso).

Queste precisazioni fanno ormai parte del bagaglio culturale di biologi, biotecnologi, medici e veterinari, mentre i più recenti avanzamenti dello studio di singole cellule (che riguardano quelli delle *omiche*, in particolare della genomica) è bene siano presentati ad un pubblico di scienziati della vita più ampio; questo perché sono stati in grado di portare ad applicazioni di rilievo per l'avanzamento delle conoscenze e per rispondere a bisogni terapeutici sino a pochi anni fa rimasti inevasi.

Prima di analizzare alcuni esempi tratti dalla recente letteratura e che permettono di capire la portata di questi avanzamenti è di fondamentale importanza fare un esercizio di epistemologia genetica (le trappole del linguaggio sono sempre in azione!): stabilire un'ontogenesi condivisa per definire, nominare e organizzare tipologie cellulari (Domcke e Shendure, 2023). Questo aspetto non è un esercizio di filosofia ermeneutica! È invece di capitale importanza per il lavoro degli specialisti della SCG: si stanno infatti generando vaste collezioni di profili molecolari di singole cellule, raggruppate (clustered) e definite (annotated). Sono questi tutti i più recenti lavori pubblicati di SCG che si presentano come studi *ad hoc* senza costituire però un sistema univoco e unificato per catalogare e organizzare fenotipi cellulari.

Un buon esempio del problema ora esposto è la profilazione immunologica di singoli linfociti T (analizzando il trascrittoma dei linfociti T infiltranti il tumore) per valutare la risposta terapeutica di alcuni farmaci nel carcinoma renale a cellule chiare (il più comune tumore del rene). La SCG ha identificato significative differenze tra pazienti che hanno mostrato risposta al *nivolumab* rispetto a quelli che non hanno tratto alcun beneficio (au et al., 2021): i responders avevano un più alto numero di linfociti T CD8+legati al *nivolumab* ed esprimenti PD-1 (l'espressione del ligando di *programmed death-1* (PD-1) permette alle cellule tumorali di sfuggire la sorveglianza immunologica). È questo uno studio importante ed innovativo (*ad hoc*) e che potrebbe portare ancora più benefici (culturali, di ricerca, terapeutici) se inserito con altri (*ad hoc*) di questo eccellente livello in un esercizio di catalogazione uniforme dei risultati. Per analogia, nel campo delle ricerche della SCG è come se ancora ci trovassimo al tempo precedente Linneo per la catalogazione delle specie: ciascuno studioso descriveva le specie in studio (con lavori eccellenti), ma poi non era possibile andare oltre il

riconoscimento delle specie. Il metodo linneano ha permesso di identificare senza errore le specie e di andare ben oltre quella singola conoscenza.

È certamente di aiuto aver allestito degli atlanti cellulari (cell atlas), e dunque la strada è stata imboccata (Domcke e Shendure, 2023).

Un secondo aspetto di rilievo è legato alla possibilità di poter fare sequenziamenti su lunghe regioni di DNA così da poter evidenziare rare varianti legate a patologie in regioni di DNA ripetitivo. Ciò implica però di poter disporre di quantitativi di DNA che eccedono il contenuto che è oggi possibile estrarre dalla singola cellula (nell'intorno dei 6 – 6.5 pg). Li e collaboratori (2022) sono riusciti a sviluppare una tecnica che permette di svolgere multi-omiche a livello di SCG: coniugando procedure di amplificazione ad altissima resa (capaci di evitare errori di amplificazione ove alcune sequenze sono sovra-rappresentate a spese di altre) con procedure di lettura di lunghi frammenti (capaci di evitare errori causati dall'abbondanza di Citosina e Guanina in alcune regioni). È stato così possibile mettere in evidenza differenze tra due linfociti T della medesima persona.

Diverse società commerciali già propongono la possibilità di effettuare più omiche sulla stessa cellula, ad esempio epigenetica e trascrittomica da parte della MultiVelo Lu et al., 2022; Preissl et al., 2022).

Bibliografia

- 1) Au L. et al.: Determinants of anti-PD-1 response and resistance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 39:1497–1518, 2021.
- 2) Eberwine J.: Subcellular omics: a new frontier pushing the limits of resolution, complexity and throughput. *Nat. Methods* 20:331–335, 2023.
- 3) Domcke S. and Shendure J.: A reference cell tree will serve science better than a reference cell atlas. *Cell* 186:1103-1114, 2023.
- 4) Li C., Virgilio, M. C., Collins, K. L. & Welch: J. D. Multi-omic single-cell velocity models epigenome–transcriptome interactions and improves cell fate prediction. *Nat. Biotechnol.*
- 5) <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01476-y> (2022).
- 6) Lin C. et al.: Single-cell discovery of the scene and potential immunotherapeutic target in hypopharyngeal tumor environment. *Cancer Gene Therapy* 30:462–471, 2023.
- 7) Lu T. et al.: Spatially resolved epigenomic profiling of single cells in complex tissues. *Cell* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.035> (2022).
- 8) Marx V.: Proteomics sets up single-cell and single-molecule solutions. *Nat. Methods* 20:350–354, 2023.

- 9) Niu M. et al.: Droplet-based transcriptome profiling of individual synapses. Nature Biotechnology
- 10) <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01635-1> (2023).
- 11) Preissl S. et al. Characterizing cis-regulatory elements using single-cell epigenomics. Nat. Rev. Genet.
- 12) <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00509-1> (2022).

Lo studio delle "omiche" nel campo della biologia dello sviluppo: strumenti, progressi e approcci futuri

Manuela Monti

Unità di istologia e embriologia, Dipartimento di sanità pubblica, medicina sperimentale e forense, Università degli studi di Pavia, Centro ricerche di medicina rigenerativa, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

Gli approcci "omici" propongono una caratterizzazione globale di classi specifiche di biomolecole in sistemi uni o multicellulari come strategia per ottenere una comprensione completa delle funzioni biologiche. La genomica, finalizzata a eseguire l'intero sequenziamento genomico, ha rappresentato il passo fondamentale verso la conoscenza della complessa logica che orchestra la funzione di tutti gli organismi o i difetti che portano all'insorgenza di determinate malattie [1,2]. In particolare, con il termine trascrittomica [3,4], si intende l'analisi dell'intero profilo degli RNA trascritti in una singola cellula o organismo per lo studio di diversi profili di espressione. La tecnica principale utilizzata per affrontare questo approccio è il microarray di RNA e DNA. Con il termine proteomica [5], invece, si intende lo studio su larga scala delle proteine e l'impiego di software bioinformatici e database per l'analisi delle reti di interazioni proteiche ed il loro comportamento dinamico in funzione del tempo o delle condizioni sperimentali. A questi approcci, forse più conosciuti, se ne aggiungono molti altri, come ad esempio: le analisi di glicomica [6,7] e lipidomica [8,9] finalizzate, rispettivamente, allo studio del profilo completo di zuccheri e lipidi prodotti in un sistema biologico, e delle vie e delle reti coinvolte in ogni specifica classe di composti e la fluxomica e la metabolomica [10,11] che mirano a studiare le reazioni metaboliche all'interno di un'entità biologica ed i metaboliti di un campione biologico nel tempo.

Sulla base di queste definizioni, risulta chiaro come queste metodologie siano, oggi, essenziali non solo per le scienze di base, ma anche per la clinica. La medicina traslazionale, infatti, si avvarrà sempre più dello studio delle "omiche" per mettere a punto terapie calibrate sul singolo paziente, partendo da una conoscenza sempre più specifica della patologia e della risposta clinica a livello cellulare e molecolare [12].

Un interessante campo di applicazione di queste nuove tecnologie è la biologia dello sviluppo e lo studio dei fattori che portano alla formazione di gameti funzionali, cellule uovo e spermatozoi, alla loro eventuale fusione nella formazione dello zigote e della sua divisione sino allo stadio di blastocisti. I due eventi più importanti che si verificano durante lo sviluppo preimpianto sono l'attivazione del genoma zigotico e la prima differenziazione cellulare per generare cellule della massa cellulare interna (i.e. il futuro embrione) e del trofoblasto (i.e. gli annessi extraembrionali). Affinché questi

eventi si effettuino con successo, l'espressione genica deve essere strettamente regolata a diversi livelli ed una delle regolazioni più studiate, in queste fasi, è a livello trascrizionale. Analisi di microarrays, trascrittomica e metabolomica sono state condotte in anni recenti con lo scopo di mettere in luce i fattori responsabili della ripresa della meiosi del gamete femminile [13]. È noto che nel compartimento antrale dell'ovario di molti mammiferi, vi sono due tipi di oociti caratterizzati da una differente capacità a sostenere un completo sviluppo embrionale sino allo stadio di blastocisti [14]. Questi oociti sono identificabili grazie alla presenza o assenza, attorno al nucleolo, di un anello di eterocromatina Hoechst-positivo [14]. Il tipo SN (Surrounded Nucleolus) se correttamente maturato e fecondato in vitro è in grado di completare lo sviluppo embrionale fino allo stadio di blastocisti; il tipo NSN (Not Surrounded Nucleolus) arresta lo sviluppo allo stadio di 2/4-cellule [13,14]. L'ampia diffusione di questo fenomeno nei Mammiferi (topi, ratti, scimmie, cani, maiali, pecore, mucche e cavalli) e la sua presenza anche nella nostra specie [15,16] stimolano la ricerca di metodi utili alla individuazione e selezione (pre-fecondazione) dei due tipi di oociti al fine di evitare l'arresto allo stadio di 2/4 cellule dello zigote derivante dalla fecondazione del tipo NSN: fatto questo capace di innalzare di un fattore attorno al 30% la resa delle fecondazioni assistite. Lo studio delle "omiche" su questo modello cellulare ha permesso di identificare geni e proteine differenzialmente espressi nei due tipi di oociti. In particolare, grazie ai microarrays è stato possibile evidenziare che su 44000 geni analizzati, 459 sono over-espressi negli oociti di tipo SN e solo 19 negli NSN (figura 1). Mentre, grazie ad analisi di proteomica tramite MudPIT (multidimensional protein identification technology, figura 2), è stato dimostrato che solo 19 proteine sono up regolate negli NSN rispetto agli SN. Questo risultato ha svelato i possibili fattori e meccanismi responsabili dell'incapacità degli oociti NSN di completare il prospettico sviluppo embrionale via una ridotta attività o espressione delle proteine materne.

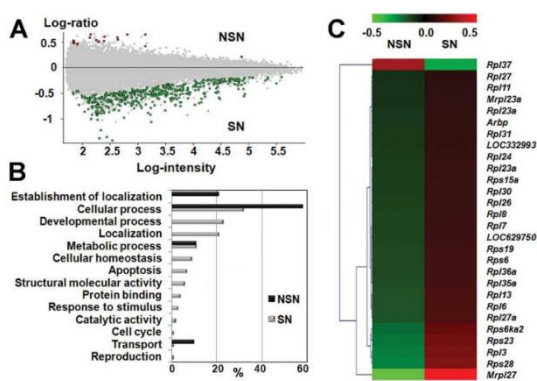


Figura 1: microarray analisi di oociti SN e NSN.

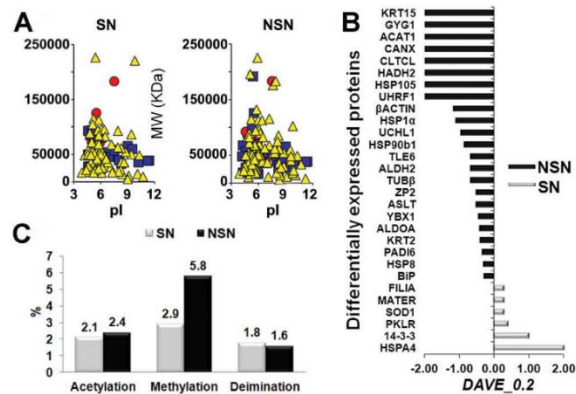


Figura 2: profilo proteomico degli oociti SN e NSN

Come già sottolineato, l'ottenimento di dati su larga scala, per quanto di laboriosa interpretazione, consente di caratterizzare ad altissima risoluzione i sistemi biologici per comprendere i meccanismi sottesi all'insorgenza di determinate patologie o l'identificazione di approcci terapeutici basati sull'esigenza di ogni singolo paziente. In medicina della riproduzione consentono di far sempre più luce sull'affascinante piccolo laboratorio di biologia molecolare che è l'oocita.

Bibliografia:

- 1) Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*, 458:719-724, 2009.
- 2) Shuldiner AR, Pollin TI. Genomics: variations in blood lipids. *Nature*, 466:703-704, 2010.
- 3) Blow N. Transcriptomics: the digital generation. *Nature*, 458:239-242, 2009.
- 4) Transcriptomics: rethinking junk DNA. *Nature*, 458:240-241, 2009.
- 5) Cravatt BF, Simon GM, Yates JR 3rd. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature*, 450:991-1000, 2007.
- 6) Blow N. Glycobiology: a spoonful of sugar. *Nature*, 457:617-620, 2009.
- 7) Ly M, Laremore TN, Linhardt RJ. 2010. Proteoglycomics: recent progress and future challenges. *OMICS*. doi:10.1089/omi.2009.0123, 2010.
- 8) Blanksby SJ, Mitchell TW. Advances in mass spectrometry for lipidomics. *Annu Rev Anal Chem*, 3:433-465, 2010.
- 9) Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res*. doi:10.1194/jlr.M009449, 2010.
- 10) Tang YJ, Martin HG, Myers S, Rodriguez S, Baidoo EE, Keasling JD. Advances in analysis of microbial metabolic fluxes via (13)C isotopic labeling. *Mass Spectrom Rev*, 28:362-375, 2009.
- 11) Zhang W LF, Nie L. Integrating multiple 'omics' analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology*, 156:14, 2010.
- 12) Collotta M. Le scienze "omiche", ovvero: dal dogma centrale della biologia alle scienze omiche. La biologia molecolare al servizio del clinico. *Rivista società italiana di medicina generale*, 25:1-7, 2018.
- 13) Monti M, Zanoni M, Calligaro A, Ko, MSH, Mauri PL, Redi, CA. Developmental arrest and mouse antral not surrounded nucleolus oocytes. *Biol reprod*, 88:1-7, 2013.

- 14) Debey P, Szollosi MS, Szollosi D, Vautier D, Girousse A, Besombes D. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. *Mol Reprod Dev* 36:59–74, 1993.
- 15) Parfenov V, Potchukalina G, Dudina L, Kostyuchek D, Gruzova M. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). *Gamete Research* 22219–22231, 1989.
- 16) Monti M, Calligaro A, Behr B, Reijo Pera R, Redi CA, Woosidlo M. Functional topography of the fully grown human oocyte. *European J Histochem* 61:2769, 2017.

Sketching Open and Closed Chromatin, One Cell at a Time

Giovanni Tonon

Professor, Vita-Salute San Raffaele University, Medical School, Director, Center for Omics Sciences, Head, Functional Genomics of Cancer Unit, Division of Experimental Oncology, San Raffaele Scientific Institute, Milan.

Cancers are characterized by extensive inter-patient and intra-tumour heterogeneity, down to the single cell level¹. This fuels clonal evolution, leading to treatment resistance, both primary and acquired², which is the leading cause of death for cancer patients. Surprisingly, notwithstanding extensive studies during the past decades, the mechanisms underlying this resistance are still largely unknown, in particular for standard chemotherapeutic regimens, or even in the case of the recently introduced immunotherapies. Increasingly detailed analysis of cancer genomes, before and after treatment, have so far failed to identify genetic causes which could explain the ensuing refractoriness to therapeutic regimens. Recently, the role of epigenetic changes has emerged as key contributors of drug resistance in cancer³⁻⁸, suggesting that only a comprehensive assessment of both components, that is, genetic changes of the cancer genome, including somatic mutations and copy number changes, alongside a detailed description of the concomitant chromatin remodeling events ensuing after treatment, could finally provide the insights required to tackle this pressing unmet clinical need.

As for single-cell epigenetics, the recent introduction of transposases, such as Tn5, which allow for the fragmenting and then sequencing of native accessible chromatin in bulk (ATAC-seq,⁹), as well as at the single-cell level (scATAC-seq,¹⁰) is providing key insights on the cellular status of open chromatin. However, the epigenetic modifications of large portions of the genome which exert essential roles in cellular physiology are excluded from this analysis. For instance, to our knowledge, there are no single-cell methods reported that are able to probe compacted chromatin, that is, heterochromatin, which encompasses up to half of the entire genome¹¹, and harbors and regulate a large array of transposable elements and ncRNAs¹¹⁻¹³. Heterochromatin is assembled and maintained through the tri-methylation of the histone residue H3K9^{12,14} and its accurate regulation is essential for the cells, for example towards the definition of cell identity^{12,13} and the maintenance of genomic integrity¹⁵.

While single-cell transcriptomic analysis has fostered ground-breaking insights on the biology of healthy and diseased tissues, including cancer^{16,17}, a tool which comprehensively audits, at the single cell level, both the genomic and the epigenetic landscape to our knowledge has not been reported previously.

In this study¹⁸, we have devised a single-cell genomic and epigenetic approach, which we named scGET-seq, that exploits the dual role of H3K9me3 as a platform covering large portion of the genome inaccessible to approaches surveying accessible chromatin, as well as its engagement in critical paths driving the physiology of healthy and disease tissues, to obtain a comprehensive and dynamic perspective on the epigenetic and genomic landscape of single cells. We engineered a hybrid transposase including the chromodomain (CD) of the heterochromatin protein-1 α (HP-1 α), which is involved in heterochromatin assembly and maintenance through its binding to trimethylation of the lysine 9 on histone 3 (H3K9me3), and developed a single-cell method, single-cell genome and epigenome by transposases sequencing (scGET-seq), that, unlike single-cell assay for transposase-accessible chromatin with sequencing (scATAC-seq), comprehensively probes both open and closed chromatin and concomitantly records the underlying genomic sequences. We tested scGET-seq in cancer-derived organoids and human-derived xenograft (PDX) models and identified genetic events and plasticity-driven mechanisms contributing to cancer drug resistance. Next, building upon the differential enrichment of closed and open chromatin, we devised a method, Chromatin Velocity, that identifies the trajectories of epigenetic modifications at the single-cell level. Chromatin Velocity uncovered paths of epigenetic reorganization during stem cell reprogramming and identified key transcription factors driving these developmental processes. scGET-seq reveals the dynamics of genomic and epigenetic landscapes underlying any cellular processes.

Bibliografia

1. McGranahan, N. & Swanton, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* **168**, 613–628 (2017).
2. Greaves, M. Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discovery* **5**, 806–821 (2015).
3. Liao, B. B. *et al.* Adaptive Chromatin Remodeling Drives Glioblastoma Stem Cell Plasticity and Drug Tolerance. *Cell Stem Cell* **20**, 233-246.e7 (2017).
4. Hangauer, M. J. *et al.* Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* **551**, 247–250 (2017).
5. Brock, A., Chang, H. & Huang, S. Non-genetic heterogeneity--a mutation-independent driving force for the somatic evolution of tumours. *Nature reviews. Genetics* **10**, 336–42 (2009).
6. Shaffer, S. M. *et al.* Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* **546**, 431–435 (2017).

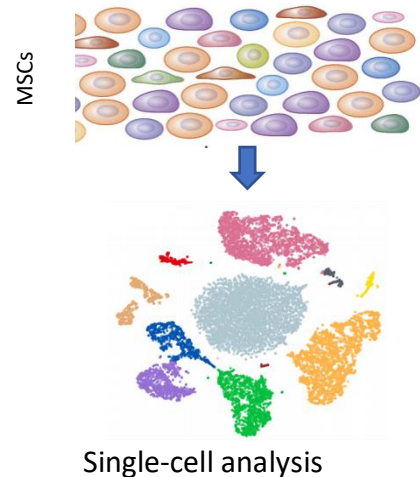
7. Sharma, S. V *et al.* A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell* **141**, 69–80 (2010).
8. Flavahan, W. A., Gaskell, E. & Bernstein, B. E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science* **357**, eaal2380 (2017).
9. Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y. & Greenleaf, W. J. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature methods* **10**, 1213–8 (2013).
10. Buenrostro, J. D. *et al.* Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature* **523**, 486–490 (2015).
11. Tatarakis, A., Behrouzi, R. & Moazed, D. Evolving Models of Heterochromatin: From Foci to Liquid Droplets. *Molecular Cell* **67**, 725–727 (2017).
12. Ninova, M., Fejes Tóth, K. & Aravin, A. A. The control of gene expression and cell identity by H3K9 trimethylation. *Development (Cambridge, England)* **146**, dev181180 (2019).
13. Nicetto, D. *et al.* H3K9me3-heterochromatin loss at protein-coding genes enables developmental lineage specification. *Science (New York, N.Y.)* **363**, 294–297 (2019).
14. Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. & Grewal, S. I. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science (New York, N.Y.)* **292**, 110–3 (2001).
15. Peters, A., O’Carroll, D. & Scherthan, H. Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability. *Cell* **107**, 323–37 (2001).
16. Patel, A. P. *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science (New York, N.Y.)* **344**, 1396–401 (2014).
17. Aldridge, S. & Teichmann, S. A. Single cell transcriptomics comes of age. *Nature Communications* **11**, 9–12 (2020).
18. Tedesco, M. *et al.* Chromatin Velocity reveals epigenetic dynamics by single-cell profiling of heterochromatin and euchromatin. *Nat Biotechnol* **40**, 235–244 (2022).

Progenitori mesenchimali da liquido follicolare ovarico umano: stato dell'arte e prospettive future in medicina rigenerativa

Federica Riva

Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Unità di Istologia e Embriologia, Università degli Studi di Pavia.

Le ricerche relative alle cellule somatiche adulte con staminalità multipotente sono in continua evoluzione, con la caratterizzazione di molteplici tipi cellulari e con lo studio delle loro potenziali applicazioni sperimentali e cliniche. Nei tessuti adulti, la riserva di cellule staminali rappresenta una fonte di progenitori cellulari che operano *in vivo* nella riparazione tissutale e nel rinnovamento cellulare. Tra le cellule adulte multipotenti, quelle mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells o MSC) presentano una notevole capacità di proliferazione e generazione clonogenica *in vitro* e un elevato potenziale di



Single-cell analysis

differenziamento multilineage, principalmente in senso osteogenico, condrogenico, adipogenico. *In vitro*, le MSC possono migrare ed aderire alla superficie plastica, esprimere un pattern di marcatori specifici di staminalità, secernere fattori solubili immunomodulanti e svolgere funzioni trofiche. Grazie a queste peculiarità morfo-funzionali, le MSC espanse *ex vivo* hanno mostrato risultati promettenti nelle applicazioni di terapia cellulare e di medicina rigenerativa.

Identificate per la prima volta nel midollo osseo adulto, cellule mesenchimali multipotenti sono state successivamente individuate in numerosi altri distretti istoanatomici, tra cui tessuto adiposo, derma, polpa dentaria, sangue periferico, liquido sinoviale, cordone ombelicale, placenta. Alla luce di ricerche sulla localizzazione di cellule staminali anche a livello ovarico, è emerso l'interesse di analizzare il liquido follicolare di ovaio umano maturo (FF), essenziale per lo sviluppo dei follicoli contenenti gli ovociti. Durante le procedure di pick-up ovocitario di donne sottoposte a tecniche di fecondazione *in vitro*, questo liquido biologico viene aspirato ma normalmente eliminato in seguito al recupero degli ovociti. Studi morfologici ed immunofenotipici condotti analizzando questo fluido follicolare come materiale biologico "di scarto" hanno rivelato la presenza di una popolazione cellulare eterogenea, contenente anche cellule mesenchimali che, in condizioni di coltura *in vitro*, presentano caratteristiche sovrapponibili alle MSC derivate da midollo osseo, tanto da considerare questo liquido biologico una fonte di cellule mesenchimali adulte.

Analisi biochimiche, in citometria a flusso, di separazione immunomagnetica e di screening molecolari per la caratterizzazione di queste cellule hanno evidenziato l'espressione di un pannello di marcatori di staminalità mesenchimale che comprendono gli antigeni CD73, CD44, CD90 e CD105 (ma non CD34, CD45, CD 66). Queste MSC derivate da fluido follicolare presentano inoltre proprietà differenziative in senso osteogenico, condrogeno e adipogenico in seguito ad opportuna stimolazione *in vitro* e manifestano una capacità innata, mediata dalla proteina BMP15, di differenziarsi in cellule germinali primordiali formando corpi embrionali, contenenti cellule morfologicamente simili a ovociti. Ricerche in ambito di ingegneria tissutale hanno favorito ulteriori analisi dimostrando la capacità di queste cellule mesenchimali multipotenti da FF di aderire a biomateriali di varia natura, in alcuni casi differenziandosi spontaneamente in senso osteogenico.

Considerato l'aspetto eterogeneo della componente cellulare presente nel liquido prelevato, non si può tuttavia escludere che specifiche sottopopolazioni cellulari in esso presenti possano influenzare il potenziale clonogenico e differenziativo delle stesse cellule staminali mesenchimali. Pertanto, le analisi di fenotipizzazione finora eseguite risultano non sufficienti per evidenziare eventuali cambiamenti critici che si verificano nelle singole cellule e che possono modulare le proprietà delle cellule multipotenti.

È a questo livello che subentra la cosiddetta "biologia dei sistemi complessi", ovvero l'integrazione tra le scienze e le tecnologie omiche, che permette di migliorare la conoscenza del sistema, considerato come insieme delle molecole biologiche che lo compongono.

Analisi di sequenziamento di RNA a singola cellula (scRNA-seq) sono state recentemente effettuate su più di 130.000 trascrittomi di cellule stromali mesenchimali raccolte da più fonti tissutali (midollo osseo, adiposo, cordone ombelicale e derma), per la costruzione di un atlante utile per studiarne l'eterogenicità associata ai diversi tessuti e donatori.

Single-cell analyses (eseguite a livello genomico, trascrittomico, proteomico e metabolomico) potrebbero pertanto migliorare la comprensione del profilo di espressione genica di una singola cellula anche tra la popolazione cellulare eterogenea presente nel liquido follicolare ovarico, consentendo di ottenere ulteriori informazioni per rivelare aspetti e meccanismi biologici non emersi con altri metodi di indagine.

Bibliografia:

- 1) Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*. 2018;22(6):824–833.

- 2) Hass R., Kasper C., Bohm S., Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
- 3) Trapnell C. Defining cell types and states with single-cell genomics. *Genome Res*. 2015;25(10):1491–1498.
- 4) Zhang C., Han X., Liu J. Chen L., Lei Y., Chen K., Si J., Wang T-Y., Zhou H., Zhao X., Zhang X., An Y., Li Y., Wang Q-F. Single-cell transcriptomic analysis reveals the cellular heterogeneity of mesenchymal stem cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2022; 20: 70–86.
- 5) Wang Z., Chai C., Wang R., Feng Y., Huang, L., Zhang Y., Xiao X., Yang S., Zhang Y., Zhang X. Single-cell transcriptome atlas of human mesenchymal stem cells exploring cellular heterogeneity. *Clin Transl Med*. 2021; Dec;11(12):e650. doi: 10.1002/ctm2.650.
- 6) Roos K., Rooda I., Keif R-F., Liivrand M., Smolander O-P., Salumets A., Velthut-Meikas A. Single-cell RNA-seq analysis and cell-cluster deconvolution of the human preovulatory follicular fluid cells provide insights into the pathophysiology of ovarian hyporesponse. *Front Endocrinol*. 2022; Oct 21;13:945347. doi: 10.3389/fendo.2022.945347. eCollection 2022.
- 7) Brown, C.; McKee, C.; Bakshi, S.; Walker, K.; Hakman, E.; Halassy, S.; Svinarich, D.; Dodds, R.; Govind, C.K.; Chaudhry, G.R. Mesenchymal stem cells: cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med* 2019, 13, 1738–1755, doi:10.1002/term.2914.
- 8) Bukovsky, A. Ovarian stem cell niche and follicular renewal in mammals. *Anat Rec (Hoboken)* 2011, 294, 1284–1306, doi:10.1002/ar.21422.
- 9) Riva, F.; Omes, C.; Bassani, R.; Nappi, R.E.; Mazzini, G.; Icaro Cornaglia, A.; Casasco, A. In-vitro culture system for mesenchymal progenitor cells derived from waste human ovarian follicular fluid. *Reprod Biomed Online* 2014, 29, 457–469, doi:10.1016/j.rbmo.2014.06.006.
- 10) Rungsiwiwut, R.; Numchaisrika, P.; Thuwanut, P.; Pruksananonda, K. Characterization of Stem Cells from human ovarian follicular fluid; a potential source of autologous stem cell for cell-based therapy. *Hum Cell* 2021, 34, 300–309, doi:10.1007/s13577-020-00439-2.
- 11) Lai, D.; Xu, M.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Li, T.; Wang, Q.; Gao, Y.; Wei, C. Identification and characterization of epithelial cells derived from human ovarian follicular fluid. *Stem Cell Res Ther* 2015, 6, 13, doi:10.1186/s13287-015-0004-6.
- 12) Wang Z., Li X., Yang J., Gong Y., Zhang H., Qiu X., Liu Y., Zhou C., Chen Y., Greenbaum J., Cheng L., Hu Y., Xie J., Yang X., Li Y., Schiller M.R., Chen Y., Tan L., Tang S.Y., Shen H., Xiao H.M., Deng H.W. Single-cell RNA sequencing deconvolutes the in vivo

- heterogeneity of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biol Sci.* 2021; Oct 11;17(15):4192-4206.
- 13) Shen F., Shi Y. Recent Advances in Single-Cell view of mesenchymal stem cell in osteogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Jan 5;9:809918. doi: 10.3389/fcell.2021.809918. eCollection 2021.
 - 14) Hwang B, Lee J.H., Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med.* 2018; Aug 7;50(8):1-14. doi: 10.1038/s12276-018-0071-8.
 - 15) Grün D, van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell.* 2015; Nov 5;163(4):799-810. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.039.
 - 16) Zhang S., Wang J.Y., Li B., YiN F., Liu H. Single-cell transcriptome analysis of uncultured human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2021; Jan 7;12(1):25. doi: 10.1186/s13287-020-02055-1.
 - 17) Medrano-Trochez C., Chatterjee P., Pradhan P., Stevens H.Y., Ogle M.E., Botchwey E.A., Kurtzberg J., Yeago C., Gibson G., Roy K. Single-cell RNA-seq of out-of-thaw mesenchymal stromal cells shows tissue-of-origin differences and inter-donor cell-cycle variations. *Stem Cell Res Ther.* 2021; Nov 4;12(1):565. doi: 10.1186/s13287-021-02627-9.

Clonal and sub-clonal heterogeneity in multiple myeloma: what we can learn from single cell analysis

Niccolò Bolli

Professore Associato di Ematologia Dipartimento di Oncologia ed Emato-Oncologia Università degli Studi di Milano

Multiple myeloma (MM) is a type of B-cell cancer that develops in the post-germinal center stage¹. It is characterized by the accumulation of clonal plasma cells in the bone marrow (BM) and by the production of a monoclonal antibody. MM needs treatment as plasma cell accumulation and monoclonal protein production can cause damage to vital organs. However, in almost all cases, MM is preceded by asymptomatic stages of the disease. These stages include monoclonal gammopathy of unknown significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM). MGUS is a stable condition and typically progresses at a slow rate of around 1% per year². In contrast, SMM patients have a much higher risk of transforming into MM. However, this risk is not constant and varies over time. On average, the risk of progression is around 25% per year for the first two years after diagnosis, but it declines afterward and reaches levels similar to MGUS in patients who do not progress ten years after diagnosis³. Understanding the different stages of MM is crucial for diagnosis and treatment planning.

Multiple myeloma is a highly heterogeneous tumor, and this heterogeneity is present across disease stages⁴ and at the same time across multiple disease sites in the same patient⁵. Such heterogeneity has important implications for both spontaneous progression in asymptomatic stages^{6–8} and for drug resistance and relapse after treatment^{9,10}. Furthermore, myeloma cells shape the microenvironment to their advantage, and several studies have implicated the immune microenvironment in spontaneous progression and relapse after treatment^{11–14}. Understanding the complexity and diversity of multiple myeloma is essential for developing effective clinical management strategies.

Single-cell technologies are powerful tools that allows researchers to analyze the genetic and/or transcriptomic makeup of individual cells. By analyzing the genomes of individual cells, researchers can gain insights into the genetic heterogeneity of tumors, identify rare cell populations that may be driving cancer progression and interrogate the tumor microenvironment at an unprecedented resolution to derive insights on disease biology and clinical correlates.

Recent advances in single-cell transcriptomics have led to several important discoveries in multiple myeloma. Few examples are cited below and will be discussed during the presentation.

Clonal evolution and subclonal architecture of asymptomatic individuals: by sequencing individual cells from patients with MGUS or SMM, researchers have identified transcriptomic programs that can differentiate normal plasma cells from clonal ones. Indeed, MGUS, SMM and MM are made by an admixture of monoclonal and polyclonal cells, and the relative ratio of each seems to be more predictive of disease progression than the absolute number of bone marrow plasma cells. Also, within individual tumor cells, different transcriptomic profiles can be identified that may be enriched for or depleted at relapse^{6,8,15}.

Immune profiling: While the role of microenvironment in fostering, but also controlling tumor evolution has been known for years also thanks to animal models¹¹, single cell approaches are rapidly improving our knowledge of immune subset associated with disease progression. Indeed, the immune microenvironment is already altered at the MGUS stage as compared to healthy controls, and upon disease progression an enrichment for inflammatory cells and for a suppressive environment is noted. This is associated with loss of cytotoxic cells and increase of MHC-deficient CD14+ monocytes¹³. Importantly, profiling of the tumor environment can also be used to predict response to treatment. In particular, patients whose BM subpopulations show decreased pro-inflammatory myeloid signaling, long-lived GZMK+ effector memory cells of increased potency, and clonally expanded, exhausted GZMB+ terminal effectors were more likely to respond to treatment and benefit of longer progression-free survival. Interestingly, researchers also showed the PB leukocyte analysis can be as informative as BM, thus suggesting a potential translational implication of this finding¹⁴.

Drug resistance: Single-cell genomics has also been used to study drug resistance in multiple myeloma. Researchers have identified transcriptomic signatures in individual cells that confer resistance to certain therapies, and this knowledge could be used to individualize treatments. Signatures pertaining to endoplasmic reticulum stress, immune regulation, proteasome activity could identify patients more likely to respond. Importantly, this shows that resistance is at least in some cases pre-determined in a fraction of cancer cells present at diagnosis, instead of representing adaptive changes of the tumor cells induced by the treatment¹⁰.

In conclusion, while single-cell techniques have certainly raised the bar of MM “omics” analysis by increasing the complexity of analysis and its interpretation, their potential is very high and likely they will bring us one step closer to understanding the true nature of MM evolution. Going forward, the

challenge will be to identify a reductionist and unifying message that could be translated into clinical-grade diagnostic tools for treatment decisions.

Bibliografia

1. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(5):335–348.
2. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, et al. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med*. 2018;378(3):241–249.
3. Rajkumar SV, Landgren O, Mateos M-V. Smoldering multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3069–3075.
4. Bolli N, Avet-Loiseau H, Wedge DC, et al. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature Communications*. 2014;5:2997.
5. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nature Communications*. 2017;8(1):100.
6. Ledergor G, Weiner A, Zada M, et al. Single cell dissection of plasma cell heterogeneity in symptomatic and asymptomatic myeloma. *Nat Med*. 2018;24(12):1867–1876.
7. Oben B, Froyen G, Maclachlan KH, et al. Whole-genome sequencing reveals progressive versus stable myeloma precursor conditions as two distinct entities. *Nat Commun*. 2021;12(1):1861.
8. Boiarsky R, Haradhvala NJ, Alberge J-B, et al. Single cell characterization of myeloma and its precursor conditions reveals transcriptional signatures of early tumorigenesis. *Nat Commun*. 2022;13(1):7040.
9. Ziccheddu B, Biancon G, Bagnoli F, et al. Integrative analysis of the genomic and transcriptomic landscape of double-refractory multiple myeloma. *Blood Advances*. 2020;4(5):830–844.
10. Cohen YC, Zada M, Wang S-Y, et al. Identification of resistance pathways and therapeutic targets in relapsed multiple myeloma patients through single-cell sequencing. *Nat Med*. 2021;27(3):491–503.
11. Das R, Strowig T, Verma R, et al. Microenvironment-dependent growth of preneoplastic and malignant plasma cells in humanized mice. *Nat Med*. 2016;22(11):1351–1357.
12. de Jong MME, Kellermayer Z, Papazian N, et al. The multiple myeloma microenvironment is defined by an inflammatory stromal cell landscape. *Nat Immunol*. 2021;

13. Zavidij O, Haradhvala NJ, Mouhieddine TH, et al. Single-cell RNA sequencing reveals compromised immune microenvironment in precursor stages of multiple myeloma. *Nature Cancer*. 2020;1(5):493–506.
14. Sklavenitis-Pistofidis R, Aranha MP, Redd RA, et al. Immune biomarkers of response to immunotherapy in patients with high-risk smoldering myeloma. *Cancer Cell*. 2022;40(11):1358-1373.e8.
15. Liu R, Gao Q, Foltz SM, et al. Co-evolution of tumor and immune cells during progression of multiple myeloma. *Nat Commun*. 2021;12(1):2559.

Terapie personalizzate per patologie neurologiche associate a canalopatie del potassio: dallo stato dell'arte alle prospettive future

Maurizio Tagliatela

Ordinario di Farmacologia Dipartimento di Neuroscienze Scuola di Medicina, Università di Napoli Federico II.

Le canalopatie sono patologie causate da malfunzionamenti di proteine di membrana responsabili della regolazione del passaggio di specifiche specie ioniche (canali ionici). Sebbene diversi meccanismi possano essere responsabili di canalopatie, tra cui alterazioni trascrizionali, auto-anticorpi, ed altri, una quota rilevante di queste è causata da varianti nei geni codificanti per specifiche subunità di canali ionici (le cosiddette canalopatie genetiche).

Negli ultimi anni, sono stati compiuti progressi sostanziali nell'identificazione delle varianti che causano malattie nei canali ionici del sistema nervoso centrale (SNC), che spesso causano disturbi convulsivi ad espressione prevalente nell'età pediatrica. In particolare, dato il ruolo determinante svolto dei canali del potassio (K) nella regolazione dell'eccitabilità neuronale, non sorprende che molte di queste rare sindromi segregano con mutazioni de novo o ereditarie nei canali del potassio (canalopatie del potassio) (1).

Lo spettro fenotipico di molte di tali patologie è estremamente eterogeneo, spaziando da forme convulsive auto-limitanti a forme estremamente severe di encefalopatie epilettiche e dello sviluppo, con quadri gravi di deficit neurocognitivi con epilessie farmaco-resistenti. Mutazioni diverse nello stesso gene possono essere responsabili di patologie molto diverse, con ovvie implicazioni prognostico-terapeutiche, nonché di counseling genetico. Per tale ragione, lo studio delle correlazioni genotipo-fenotipo assume un interesse particolare, dal momento che l'identificazione precoce di varianti a decorso severo consentirebbe di anticipare interventi che potrebbero aiutare a migliorare la prognosi di malattie altrimenti molto severe, e talora fatali.

Un esempio paradigmatico di quanto sopra descritto è rappresentato dalle mutazioni nel gene *KCNQ2*, codificante per una delle subunità di un canale del K voltaggio-dipendente (Kv7.2) responsabile di una corrente neuronale definita come corrente M in quanto soppressa dall'attivazione del recettore muscarinico (2,3,4). Mutazioni in *KCNQ2* furono descritte per la prima volta nel 1998 come responsabili di una patologia convulsiva a trasmissione autosomica denominata "convulsioni neonatali familiari benigne o autolimitanti" (5); in tale condizione clinica, le convulsioni spesso

svaniscono nella tarda infanzia, sebbene i pazienti abbiano una maggiore penetranza dei disturbi convulsivi durante l'età adulta. Circa 15 anni dopo, furono riscontrate mutazioni de novo nello stesso gene in casistiche di pazienti con encefalopatie epilettiche dello sviluppo ad insorgenza neonatale (6). Le basi cellulari e molecolari di tale eterogenicità fenotipica sono solo in parte chiarite, e saranno oggetto della presentazione. In particolare, verranno descritti i fenotipi associati a diverse tipologie di varianti (loss-of-function, LoF; gain-of-function, GoF), e verranno inoltre illustrate le possibili strategie di trattamento mediante farmaci tradizionali di nuova sintesi (7) o di riposizionamento, nonché quelle che sfruttano nuovi approcci basati su RNA (tipo oligonucleotidi antisenso-specifici o ASOs).

Infine, verrà descritta un'altra canalopatia del potassio neuronale ovvero l'epilessia dell'infanzia con crisi focali migratorie (EIMFS), indicata anche come crisi parziali migratorie dell'infanzia (MMPSI), caratterizzata da crisi focali in gran parte refrattarie ai farmaci antiepilettici che si verificano tipicamente durante il primo anno di vita e migrano da una regione corticale ad un'altra (8). Tra i molti geni/mutazioni responsabili di EIMFS, il più comunemente identificato è KCNT1 o SLACK (KNa1.1), uno dei 2 membri della famiglia Slo2 dei canali K dipendenti dal sodio (Na) (9). Anche per tali patologie e per le mutazioni di KCNT1 verranno descritte l'eterogeneità fenotipica, le basi molecolari e funzionali e le prospettive di intervento terapeutico (10).

Bibliografia

1. Gribkoff VK, Winkler DJ. Potassium channelopathies associated with epilepsy-related syndromes and directions for therapeutic intervention. *Biochem Pharmacol.* 2023 Feb;208:115413. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115413. Epub 2023 Jan 13. PMID: 36646291.
2. <https://www.cambridge.org/core/elements/kcnq2-and-kcnq3-associated-epilepsy/FD084E10AFE0ECB833ECBDE6579C2664>
3. Nappi P, Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, Barrese V, Taglialatela M. Epileptic channelopathies caused by neuronal Kv7 (KCNQ) channel dysfunction. *Pflugers Arch.* 2020 Jul;472(7):881-898. doi: 10.1007/s00424-020-02404-2. Epub 2020 Jun 6. PMID: 32506321.
4. Miceli F, Soldovieri MV, Weckhuysen S, Cooper E, Taglialatela M. KCNQ2-Related Disorders. 2010 Apr 27 [updated 2022 May 19]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023. PMID: 20437616.

5. Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279: 403-406, 1998.
6. Weckhuysen S, et al. KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann Neurol* 71: 15-25, 2012.
7. Musella S, Carotenuto L, Iraci N, Baroli G, Ciaglia T, Nappi P, Basilicata MG, Salviati E, Barrese V, Vestuto V, Pignataro G, Pepe G, Sommella E, Di Sarno V, Manfra M, Campiglia P, Gomez-Monterrey I, Bertamino A, Taglialatela M, Ostacolo C, Miceli F. Beyond Retigabine: Design, Synthesis, and Pharmacological Characterization of a Potent and Chemically Stable Neuronal Kv7 Channel Activator with Anticonvulsant Activity. *J Med Chem*. 2022 Aug 25;65(16):11340-11364. doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c00911. Epub 2022 Aug 16. PMID: 35972998; PMCID: PMC9421656.
8. Coppola G, Plouin P, Chiron C, Robain O, Dulac O. Migrating partial seizures in infancy: a malignant disorder with developmental arrest. *Epilepsia*. 1995 Oct;36(10):1017-24. doi: 10.1111/j.1528-1157.1995.tb00961.x. PMID: 7555952.
9. Barcia G, Fleming MR, Deligniere A, Gazula VR, Brown MR, Langouet M, Chen H, Kronengold J, Abhyankar A, Cilio R, Nitschke P, Kaminska A, Boddaert N, Casanova JL, Desguerre I, Munnich A, Dulac O, Kaczmarek LK, Colleaux L, Nabbout R. De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet*. 2012 Nov;44(11):1255-9. doi: 10.1038/ng.2441. Epub 2012 Oct 21. PMID: 23086397; PMCID: PMC3687547.
10. Dilena R, DiFrancesco JC, Soldovieri MV, Giacobbe A, Ambrosino P, Mosca I, Galli MA, Guez S, Fumagalli M, Miceli F, Cattaneo D, Darra F, Gennaro E, Zara F, Striano P, Castellotti B, Gellera C, Varesio C, Veggiotti P, Taglialatela M. Early Treatment with Quinidine in 2 Patients with Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures (EIMFS) Due to Gain-of-Function KCNT1 Mutations: Functional Studies, Clinical Responses, and Critical Issues for Personalized Therapy. *Neurotherapeutics*. 2018 Oct;15(4):1112-1126. doi: 10.1007/s13311-018-0657-9. PMID: 30112700; PMCID: PMC6277296.

Development and optimisation of advanced cell therapy products by omics data integration

Ignazio Caruana

Department of Paediatric Haematology, Oncology and Stem Cell Transplantation, University Hospital of Würzburg, Germany.

Paediatric haematology and oncology are a prime example of the success of translational interdisciplinary research that has dramatically improved the outcome for children with cancer. Today the 5-year survival rates of these children have risen to ~80%, in most high-income countries, and only ~30% in lower-to-middle-income countries^{1,2,3}. This progress reflects the optimized use of conventional therapies through better risk stratification and the introduction of innovative immunotherapeutic approaches. Although selected patient groups require less invasive procedures and abbreviated courses of chemotherapy, most paediatric patients need intensive systemic and multimodal interventions that may cause unavoidable long-term toxicity and an increased secondary malignancy rate⁴. Moreover, subsets of paediatric malignancies, including brain tumours, metastatic neuroblastoma (NB), relapsed sarcomas, refractory lymphomas and acute myeloid or T cell leukaemias still carry a very poor prognosis. As a paradigm, the dismal prognosis for advanced-stage NB has not changed much for decades⁵. Thus, the development of new effective and less toxic therapies is an urgent clinical need. In this last decade, it has been clearly shown that both haematological malignancies and oncological diseases are susceptible to immunotherapy. Recently, Advanced Cellular Products (ACPs), have revolutionized biomedicine with new treatments for diseases for which there is currently no cure. In particular, Chimeric Antigen Receptor (CAR) immunotherapies have been an especially active area of research. CARs are synthetic fusion receptors designed to redirect T or NK cells to recognize and eliminate cancer cells that express a specific antigen. To achieve this aim, CARs have typically been constructed using antibody-based moieties targeting specific tumour associated antigens, which are linked via a hinge and transmembrane domain to intracellular signalling motifs derived from both the T cell receptor (TCR) CD3 ζ chain and a co-stimulatory receptor^{6,7}. Transgenes encoding these constructs are introduced into autologous (patient-derived) or allogeneic (healthy donor derived) T or NK cells *ex vivo*, followed an *in vitro* expansion before they are infused into the patient.

Despite the health impact that some of CAR T cell treatments have shown on patients refractory to more traditional treatments, only 5 adoptive cell therapies targeting CD19 and BCMA antigens have been so far approved by FDA and EMA⁸. Challenges to achieve similar responses in patients

harbouring solid or other haematological malignancies including acute myeloid leukaemia, NK and T cell malignancies are still considerable^{9,10}.

These challenges are due to several factors that are currently under intense investigation:

- i) Tumour heterogeneity and different tumour-antigen expression^{11,12}
- ii) composition and characteristic of tumour microenvironment (TME)^{13,14, 15}
- iii) development of immune-escape mechanisms during treatment^{16,17}
- iv) invasion, persistence and fitness of the CAR T cells^{18,19}
- v) loss of metabolic plasticity of CAR T cells^{20,21}
- vi) CAR-T cell design^{22,23}.

Furthermore, current approaches to develop and manufacture autologous immune cell products are limited by poor scalability, low clinical impact for patients in need of urgent therapeutical intervention due to long manufacturing times, excessive cost, limited efficacy resulting from impaired patient immune cell fitness, significant toxicity and the intrinsic complexity and variability of the biological environment in which the cells must operate. Then, it must also be considered that for some diseases, the generation of a CAR T cell product is even more difficult, as for example for T cell malignancies, since the surface marker profile of malignant T cells largely overlaps with that of activated T lymphocytes, leading to a self-elimination of the CAR T cells²⁴. Longevity, persistence and functionality are critical determinants for the efficacy of T and NK cell-based immunotherapies^{10,11}. Preclinical and clinical studies have shown that less differentiated lymphocytes, like naïve and central memory T/NK cells, display better expansion, persistence and anti-tumour activity *in vivo* when compared to fully differentiated cells^{12,13}. In addition, continuous stimulation, typically induced by chronic antigen exposure such as persistent tumour burden, progressively induces a dysfunctional state related to exhaustion. The development of T and NK cell exhaustion is paralleled by upregulation of several co-inhibitory receptors and it gradually restricts the proliferative capacity of these lymphocytes as well as their ability to recall the expression of effector cytokines and cytolytic molecules¹⁴⁻¹⁶. Recently, the role of specific metabolic pathways in fine tuning memory T cell formation and maintenance has gained increasing relevance. In this regard, several approaches for targeted-delivery of metabolism-modulating compounds have been investigated^{17,18}. Indeed, adoptive transfer of T cells with improved metabolic fitness and plasticity allows them to better adapt to a nutrient- and oxygen-deprived TME^{18,19} and, along with improved persistence and a stronger ability to secrete effector cytokines, may yield better anti-tumour protection.

Multi-omics data including genomics, epigenomics, transcriptomics and proteomics can provide deep insights into the variation of biological processes in various tissues or cells²⁵. The rapid development of multidimensional profiling strategies and approaches for their integration has facilitated the use of multi-omics data to characterize the complex molecular features of diverse cellular processes in broad research fields, including CAR T cell therapy^{26,27}. CAR T/NK cells are living cells that can actively sense and respond to a wide variety of extrinsic and intrinsic factors²⁸. Therefore, identification of phenotype heterogeneity and pathway regulation of pre-manufacturing autologous T and NK cells through bulk and single-cell profiling might contribute to the quality control of CAR T/NK cell products or inform strategies for CAR targeting and logical CAR designs or product manufacture that improve their functionality. Furthermore, multi-omics strategies can be used to monitor the temporally dynamic expansion of functional and/or dysfunctional CAR T/NK cell subpopulations^{26,29}, characterize CAR T cell transcriptomic³⁰, epigenomic³¹ and metabolic dynamics³², delineate TME features that restrict CAR T cell infiltration and suppress CAR T cell cytotoxicity³³, determine the origins and functional consequences of key cytokines³⁴, and predict on-target off-tumour toxicities³⁵ facilitating biomarker discovery and improve mechanistic understanding of CAR T cell therapy responses and toxicities.

From all above-mentioned studies however, the need to develop and optimize spatial profiling technologies for different omics studies, as well as their integration, also from multiple studies³⁶, and generation of reliable predictive models is representing our new frontier of study.

Bibliografia

- 1) Allemani, C., *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* 391, 1023-1075 (2018).
- 2) Howard, S.C., *et al.* Childhood cancer epidemiology in low-income countries. *Cancer* 112, 461-472 (2008).
- 3) Pritchard-Jones, K., *et al.* Sustaining innovation and improvement in the treatment of childhood cancer: lessons from high-income countries. *Lancet Oncol* 14, e95-e103 (2013).
- 4) Armstrong, G.T., *et al.* Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 27, 2328-2338 (2009).
- 5) Schramm A, *et al.* Mutational dynamics between primary and relapse neuroblastomas. *Nature Genetics*:2015;47(8):872-7.

- 6) Caruana, I., et al. From monoclonal antibodies to chimeric antigen receptors for the treatment of human malignancies. *Semin. Oncology*, 41(5): 661-666 (2014).
- 7) Finck, A.V., et al. Engineered cellular immunotherapies in cancer and beyond. *Nat. Med.* 28(4):678-689 (2022).
- 8) Mueller, K.T., et al. Clinical Pharmacology of Tisagenlecleucel in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res* 24, 6175-6184 (2018).
- 9) Hou, B., et al. Efficiency of CAR-T Therapy for Treatment of Solid Tumor in Clinical Trials: A Meta-Analysis. *Dis Markers* 2019, 3425291 (2019).
- 10) Yu, W.L. & Hua, Z.C. Chimeric Antigen Receptor T-cell (CAR T) Therapy for Hematologic and Solid Malignancies: Efficacy and Safety-A Systematic Review with Meta-Analysis. *Cancers (Basel)* 11(2019).
- 11) Vinci, M et al. Functional diversity and cooperativity between subclonal populations of pediatric glioblastoma and diffuse intrinsic pontine glioma cells. *Nature Medicine*, 24(8): 1204-1215 (2018).
- 12) Calandrini, C et al. An organoid biobank for childhood kidney cancers that captures disease and tissue heterogeneity. *Nature Communication*, 11(1):1310 (2020).
- 13) Pelizzo, G. et al. Microenvironment in neuroblastoma: isolation and characterization of tumor-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Cancer*, 18(1):1176 (2018).
- 14) Yi, X. et al. Multi-Omics Profiling Reveals Distinct Microenvironment Characterization and Suggests Immune Escape Mechanisms of Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 25(16):5002-5014 (2019).
- 15) Canzonetta, C. et al. Identification of neuroblastoma cell lines with uncommon TAZ⁺/Mesenchymal Stromal Cell phenotype with strong suppressive activity on Natural Killer cells. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, e001313(2021)
- 16) Tumino, N. et al. Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells impair the anti-tumor efficacy of GD2.CAR T-cells in patients with neuroblastoma. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1):191 (2021).
- 17) Caforio, M. et al. GD2 redirected CAR T and activated NK-cell-mediated secretion of IFN γ overcomes MYCN- dependent IDO1 inhibition, contributing to Neuroblastoma cell immune escape. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 9(3):e001502 (2021).
- 18) Caruana, I. et al. Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirectioned T lymphocytes. *Nature Medicine*, 21(5):524-9 (2015).

- 19) Caruana, I. et al. K562-derived whole-cell vaccine enhances antitumor responses of CAR-redIRECTED virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Clinical Cancer Research*, 21(13):2952-62 (2015).
- 20) Manzo, T. et al. Accumulation of long-chain fatty acids in the tumor microenvironment drives dysfunction in intrapancreatic CD8⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 217(8):e20191920 (2020).
- 21) Weber, E.W. et al. Transient rest restores functionality in exhausted CAR-T cells through epigenetic remodeling. *Science*, 372(6537):eaba1786 (2021)
- 22) Long, AH et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nature Medicine* 21(6):581-590 (2015).
- 23) Quintarelli, C et al. Choice of costimulatory domains and of cytokines determines CAR T-cell activity in neuroblastoma. *Oncoimmunology* 7(6):e1433518
- 24) Coustan-Smith, E., et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2009;10(2):147-156.
- 25) Hasin, Y., et al. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol.* 18; 83 (2017)
- 26) Haradhvala, N., et al. Distinct cellular dynamic associated with response to CAR-T therapy for refractory B cell lymphoma. *Nat. Med.* 28: 1848-1859 (2022).
- 27) Good, Z., et al. Post-infusion CAR Treg cells identify patients resistant to CD19-CAR therapy. *Nat. Med.* 28: 1860-1871 (2022).
- 28) Young, R., et al. Next generation CAR T-cell therapies. *Cancer Discov.* 12: 1615-1633 (2022).
- 29) Xhangolli, I, et al. Single-cell analysis of CAR-T cell activation reveals a mixed TH1/TH2 response independent of differentiation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 17: 129-139 (2019).
- 30) Lynn, R.C., et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induced exhaustion resistance. *Nature*, 576: 293-300 (2019).
- 31) Garcia-Prieto, C.A., et al. Epigenetic profiling and response to CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy in B-cell malignancies. *J. Nat. Cancer Inst.*, 114: 436-445 (2022).
- 32) Ye, L., et al. A genome-scale gain-of-function CRISPR screen in CD8 T cells identifies proline metabolism as a means to enhance CAR-T therapy. *Cell Metab.*, 34: 595-614.e14 (2022).
- 33) Ma, W., et al. Targeting PAK4 to reprogram the vascular microenvironment and improve CAR-T immunotherapy for glioblastoma. *Nat. Cancer*, 2: 83-97 (2021).

- 34) Norelli, M., et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR-T cells. *Nat. Med.*, 24: 739-748 (2018).
- 35) MacKay, M., et al. The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors. *Nat. Biot.*, 38: 233-244 (2020).
- 36) Jing, Y., et al. Harnessing big data to characterize immune-related adverse events. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 19:269-280 (2022).

Calcium imaging *in vivo* using genetically encoded calcium indicators (GECI): from molecular biology to fluorescence microscopy.

Alex Costa

Department of Biosciences, University of Milan, 20133 Milano, Italy

Calcium (Ca^{2+}) is a well-known second messenger in both unicellular and multicellular organisms (Berridge et al., 2000; Carafoli and Krebs, 2016). Calcium plays a role in signalling events in response to a multitude of developmental and environmental stimuli. Biotic and abiotic challenges affect the cellular Ca^{2+} homeostasis by triggering transient changes of Ca^{2+} concentrations in the cytosol as well as in subcellular compartments.

The basis of calcium's role as a signalling component lies in its peculiar chemistry and the existence of a large electrochemical gradient across the cell's membranes, maintained by the activity of the proton- and calcium-ATPases (H^+ -ATPases and Ca^{2+} -ATPases). The main evolutionary reason for evolving mechanisms that generate and maintain this large gradient, is based on the need to keep the cytosolic Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) low, to prevent the precipitation of organic and inorganic molecules (e.g. phosphates including Adenosine triphosphate (ATP)) (Clapham, 2007). Under resting conditions, the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ is in the range of hundreds of nanomolar (100-200 nM) whereas in the external spaces and subcellular compartments it can reach up to millimolar range. This steep concentration gradient implies that the opening of a limited number of calcium permeable channels, located on the plasma membrane, is sufficient to rapidly increase the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ with a 10-fold increase compared to the resting concentration.

The change in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ is sensed by Ca^{2+} binding proteins acting as primary responders (e.g. calcium dependent kinases) or sensor relays. Calmodulin (CaM), binds cytosolic calcium, which triggers a conformational change of the protein enabling it to interact with different targets modulating their activities. When the Ca^{2+} sensors are stimulated they become primed to regulate downstream processes, which include ion fluxes, enzymatic activities, transcription, etc. Importantly, after the perception of a stimulus and the occurrence of the Ca^{2+} transient, resting $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ needs to be quickly reestablished to prevent cell death (Clapham, 2007). The molecular mechanisms that are responsible for the recovery of the resting $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ are Ca^{2+} buffers and Ca^{2+} active transporters, such as Ca^{2+} -ATPases and Ca^{2+} /cation exchangers (CAX) that are localized in the plasma membrane and membranes of intracellular compartments.

The intertwined and coordinated activities of influx and efflux Ca^{2+} transport systems in the plasma membrane and internal stores jointly shape the characteristic cellular Ca^{2+} dynamics, also called Ca^{2+} signatures.

The possibility of visualizing and studying Ca^{2+} signatures is based on the exploitation of “calcium imaging techniques” that, thanks to continuous improvement, have allowed us to study Ca^{2+} dynamics with increasing resolution and sensitivity with minimal invasiveness in different organisms, including plants. An important boost for the progression of the calcium imaging techniques is the possibility to extend the use of valuable and innovative tools across the different Kingdoms of life. In such a scenario, one driver of innovation is neuroscience studies. In neurons, action potentials (APs) or the activation of ionotropic glutamate receptors trigger large and rapid changes in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Tian et al., 2009). This has led neuroscientists to develop new innovative technologies to study Ca^{2+} dynamics, which are historically based on the simultaneous and continuous improvement of Ca^{2+} indicators, and the development and the implementation of the appropriate microscopy instrumentation.

Genetically encoded calcium indicators (GECIs)

Aequorin

Aequorin is a bioluminescent protein that was discovered and isolated from the jellyfish *Aequorea victoria* by Osamu Shimomura in 1962 (Shimomura et al., 1962). Shimomura was awarded the Nobel Prize in 2008 together with Martin Chalfie and Roger Tsien for the discovery and exploitation of the green fluorescent protein (GFP). Without the work done by these three visionary scientists the field of bio-imaging would not exist.

Aequorin is a 22 kDa holoprotein that contains bound oxygen, a prosthetic group, the coelenterazine, and three Ca^{2+} -binding sites. When aequorin binds Ca^{2+} ions (Shimomura, 1995), it undergoes a conformational change, converting itself into a luciferase, which then catalyzes the luminescence reaction of coelenterazine. Coelenterazine is oxidized to coelenteramide with the emission of CO_2 and blue light (at 465 nm) which is caused by the decay of the coelenteramide from an excited state (Ohmiya and Hirano, 1996). This property offered a useful tool for detecting the concentration of Ca^{2+} ions in real time. However, the aequorin quantum yield is very low, requiring the simultaneous reactions of hundreds or thousands of proteins to collect enough photons to a level detectable by photon emission measurements (Mithöfer and Mazars, 2002). Nevertheless, identification of the aequorin gene and of its coding sequence (Prasher et al., 1985) allowed the protein to be expressed recombinantly in cells and tissues from different organisms. In the 1980s, the injection of recombinant aequorin in *Chara* allowed the detection of a transient increase in light emission when the cell

generated an action potential (Williamson and Ashley, 1982). A real revolution then occurred in 1991 when Marc Knight and colleagues generated the very first transgenic multicellular organism, *Nicotiana plumbaginifolia* plants, stably expressing aequorin (Knight et al., 1991). The authors reported that in response to touch, cold-shock, and elicitors, the plants showed clear photon emission determined by cytosolic Ca^{2+} increase. This demonstration opened *de facto* the modern *era* of Ca^{2+} imaging. Indeed, the low quantum yield of aequorin hinders high-resolution imaging and, as a matter of fact, its detection was usually carried out with the use of a luminometer, collecting the emitted photons without creating an image (Mithöfer and Mazars, 2002). However, modern ultrasensitive cameras now allow the detecting of the photons emitted by a single whole plant, providing low-resolution images and averaged responses from different tissues or cells. Therefore, the recent technological advances in camera sensitivity have revitalized the use of aequorin imaging, posing the basis for the design of powerful and successful genetic.

Even if aequorin is the oldest GEI, it still represents a reliable tool to study Ca^{2+} dynamics, in particular, to determine quantitatively the magnitude of the responses. In fact, for every single experiment, the measurement of the light expressed as RLUs (Relative Luminescence Units) can be converted into absolute $[\text{Ca}^{2+}]$ thanks to a calibration curve that considers the total amount of aequorin molecules present in the sample. This can be done by discharging the reconstituted aequorin with a solution containing Ca^{2+} and ethanol (100 mM CaCl_2 , 10% ethanol (v/v)) (Mithöfer and Mazars, 2002). Specifically, the formula used to perform the conversion is the one reported in Mithöfer and Mazars (2002):

$$[\text{Ca}^{2+}] = \{(L_0/L_{\max})^{1/3} + [\text{KTR}(L_0/L_{\max})^{1/3}] - 1\} / \{\text{KR} - [\text{KR}(L_0/L_{\max})^{1/3}]\},$$

Where L_0 is the aequorin luminescence intensity per second and L_{\max} is the total amount of luminescence present in the sample over the experiment. KR and KTR are the dissociation constants for the first and second Ca^{2+} ions bound by aequorin, respectively (Mithöfer and Mazars, 2002).

As with every technique, aequorin-based Ca^{2+} analysis presents both advantages and disadvantages. An advantage of aequorin is that it does not need to be excited with fluorescent light, which helps when the measurement of Ca^{2+} levels for long time intervals is required. Among the disadvantages, besides the already cited low quantum yield efficiency, is its requirement for the external provision of coelenterazine (Knight et al., 1991; Mithöfer and Mazars, 2002) which foresees the incubation of the specimen with the prosthetic group before starting the experiment. Moreover, after its oxidation, coelenterazine is irreversibly consumed, with the consequent decrease of the active aequorin pool. Another disadvantage of aequorin is the non-linearity of light emission rate as a function of the Ca^{2+} concentration (Robert et al., 2000). Within the physiological range of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (10^{-7} - 10^{-5} M) the

photon emission rate increases by more than 100-fold for a 10-fold change in $[Ca^{2+}]$. In practical terms, this means that for a change in $[Ca^{2+}]$ from 0.1 μM (at resting) to 3-4 μM (in response to a stimulus), the rate of aequorin photon emission increases over 1000-fold. As a consequence, the signal coming from 1 activated cell will be the same as that of 1000 cells at resting $[Ca^{2+}]$. If Ca^{2+} is not homogeneous in the population of cells, the overall aequorin light emission is dominated by the most responding cells subpopulation, leading to an averaging of the response.

Aequorin being a GECI could also be targeted to different subcellular compartments, such as the tonoplast, the nucleus, the Golgi apparatus, mitochondria, and in plants in plastids/chloroplasts (Sello et al., 2016), chloroplast subcompartments like the outer and inner envelope membranes, and the thylakoid lumen and membrane (Sello et al., 2018).

FRET-based fluorescent sensors

To overcome aequorin limitations, in the late 1990s scientists started to exploit fluorescent proteins (i.e. Green Fluorescent Protein (GFP)) and its spectral variants) to develop a new generation of GECIs. The first ever fluorescence-based GECI, named Yellow Cameleon (YC), was developed by Roger Tsien in 1997 (Miyawaki et al., 1997) quickly followed by the development of the YC2.1 version (Miyawaki et al., 1999) which was shortly after expressed in plants. This sensor is based on the Ca^{2+} induced protein-protein interaction between calmodulin (CaM) and the CaM binding peptide M13, a fragment from the myosin light chain kinase (Miyawaki et al., 1997). Both components are fused by a flexible linker and are sandwiched between a fluorescent protein pair with partial overlap between the emission spectrum of the donor and the absorption spectrum of the acceptor. Upon Ca^{2+} binding, CaM interacts with M13, bringing the donor and acceptor fluorescent proteins into sufficiently proximity to allow for Förster resonance energy transfer (FRET) between them through a nonradiative dipole-dipole coupling. This phenomenon can be measured via fluorescence microscopy. At the level of the acceptor molecule, it results in the emission of fluorescence upon excitation of the donor, allowing the estimation of Ca^{2+} -induced FRET by the ratio of donor and acceptor emission upon excitation of the donor using relatively simple microscopy setups (Miyawaki et al., 1997; Rudolf et al., 2003).

A wide variety of FRET-based GECI has been developed based on FRET pairs with different spectral properties and in combination with a variety of Ca^{2+} regulated protein-protein interactions (Greenwald et al., 2018). The spectral range of the FRET-pairs is usually cyan/yellow, green/red occupying a wide spectrum, reducing the options for dual imaging with other sensors or reporters.

The most popular FRET-based GECIs are based on cyan and yellow FRET-pairs linked together by the Ca²⁺-binding protein CaM and the CaM-binding peptide M13, as in the original Yellow Cameleon configuration by Roger Tsien. FRET, and thus [Ca²⁺] increases, can be conveniently measured by the increase in the ratio between the emission intensity of Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP) and Enhanced Cyan Fluorescent Protein (ECFP) upon ECFP excitation. The Cameleon indicators can go back and forth from the bound and unbound Ca²⁺ state. However, this is limited by the bleaching of the sensor by the excitation light especially when high magnifications are used, which may cause photo-oxidative cellular stress (Laissue et al., 2017). One of the most important properties of Cameleon is its pure ratiometric nature: a single wavelength excitation and a dual emission (Miyawaki et al., 1997). The Cameleon's reliability brought, in the first years of the 2000s, an "explosion" of different variants, with different Ca²⁺ affinities, different linkers, and different fluorescent protein pairs (Palmer and Tsien, 2006). In 2004 the Miyawaki group developed the Cameleon YC3.60 where the EYFP was replaced with a circularly permuted variant of the Venus fluorescent protein (cpVenus) (Nagai et al., 2002). The use of the cpVenus as a FRET acceptor greatly increased the energy transfer efficiency from the donor (ECFP), which in practical terms allowed the very reliable performance of *in vivo* measurements. In fact, in living cells, the simultaneous decrease in ECFP and increase in cpVenus fluorescence emissions, due to FRET, were almost identical to the *in vitro* analyses (Nagai et al., 2004). This property is of great relevance because it permits ascertaining with high confidence that a change of cpVenus/ECFP ratio, even if small, corresponds to actual FRET levels, thus, a real [Ca²⁺] change. This latter aspect gains importance when a single cell or single organelle imaging is performed. Moreover, whereas both ECFP and cpVenus might show a pH sensitivity, the FRET ratio is almost unaffected, at least in a narrow change of physiological cytosolic pHs (around pH 7-7.5) (Nagai et al., 2004).

Based on the original work from Nagai et al. (2004) the *in vitro* K_d of the YC3.6 is 250 nM with a Hill coefficient of 1.7. The knowledge of these two parameters allows the rough conversion of the cpVenus/ECFP ratio into an [Ca²⁺] if the ratio minimum and ratio maximum are experimentally measured (Palmer and Tsien, 2006). One formula that can be used to perform the conversion is the following:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R_{\min})^{1/n}$$

where R represents the cpVenus/ECFP ratio measured at any given time during the experiment, n represents the Hill coefficient and the K_d the *in vitro* affinity for Ca²⁺. However, since both the K_d and the Hill coefficients are usually measured *in vitro* and not *in vivo*, the ratio conversion into concentration values must be taken with caution. As a matter of fact, a recent work reported for the

YC3.6 an *in vitro* K_d of 719 nM and a Hill coefficient of 2.12, values that are quite distant from those reported in the original work by Nagai and colleagues (250 nM and 1.7, respectively) (Nagai et al., 2004), therefore, pointing out the need for prudence when the conversion is applied (Palmer and Tsien, 2006). Nonetheless, the YC3.60 is indeed a sensor suitable for the analysis of Ca^{2+} dynamics when a given stimulus can induce an increase that is around and above its K_d value. It is also true that in response to stimuli that induce small Ca^{2+} increases, YC3.60 shows some limitations in comparison to the new generation of ultrasensitive GECIs, being in fact not efficient at detecting very subtle changes of $[Ca^{2+}]$. However, the beauty of any genetically encoded sensor is that by following rational and random mutagenesis approaches they can be modified to address specific needs. In 2010 the group of Nagai generated a series of Cameleon variants with higher affinity for Ca^{2+} that were dubbed YC-Nano (Horikawa et al., 2010).

An important aspect that needs to be considered is that plants expressing the Cameleon YC3.60 in the cytosol do not show any obvious gross phenotypes, pointing out that the sensor *per se* does not alter the Ca^{2+} homeostasis and the plant physiology in stable mature plants. However, possible effects of Ca^{2+} buffering should be considered in every biological process of interest.

Besides Cameleon and its variants, there are other FRET-based sensors that have been successfully generated. We can cite here the CerTN-L15 (Heim et al., 2007; Denninger et al., 2014) and the Twitch 2B and 3 (Thestrup et al., 2014) that are alternative FRET-based Ca^{2+} sensors which instead of having the CaM domain, use troponin C, a protein exclusively found in myocytes, to sense and bind Ca^{2+} . The substitution of the CaM domain with troponin C prevents any interference due to the endogenous CaM when present at high concentrations such as in the subplasmalemmal region (Miyawaki et al., 1999; Palmer et al., 2006). An alternative to the FRET-based sensors might be represented by the use of dimerization-dependent fluorescent proteins (ddFPs), which is a technology involving the reversible binding of two dark FP monomers to form a fluorescent heterodimeric complex (Alford et al., 2012).

Single fluorescent protein GECIs

Single fluorophore-based Ca^{2+} indicators GECIs are intensimetric Ca^{2+} sensors, based on a circularly permuted fluorescent protein (e.g. GFP, YFP or mApple) (Baird et al., 1999; Nakay et al., 2001) fused at its C- and N-termini with the components of a Ca^{2+} sensing module (i.e. CaM domain and the M13 peptide). In the presence of Ca^{2+} , this causes a tightening of the interaction between C- and N-termini of the fluorophore, protecting the chromophore from the environment and leading to increased brightness. In simple words, this interaction induces a dramatic alteration of the spectral properties of

the fluorescent protein with a strong increase in the fluorescence emitted, thus, making these GECIs suitable to indicate Ca^{2+} levels in real time (Nakai et al., 2001). Currently, this principle has been also exploited for the development of different types of biosensors, including kinase activity reporters (e.g. ExRAI) (Greenwald et al., 2018).

Similarly, to Cameleon for single fluorescent protein (FP) sensors there was a strong development that yielded a family of GECIs with different colors, different Ca^{2+} affinities, different Hill coefficients, less pH sensitivity, and with improved signal to noise ratio (Zhao et al., 2011). Just to cite an example, from 2001 to 2019 there has been an evolution that has led from the GCaMP to the jGCaMP7 (Nakai et al., 2001; Tian et al., 2009; Akerboom et al., 2012; Chen et al., 2013; Greenwald et al., 2018; Dana et al., 2019). The aim to improve GCaMPs was driven by the necessity to increase the sensitivity and kinetics of the sensors, trying to make them closer, in terms of properties, to the synthetic Ca^{2+} dyes that for the needs of neuroscience are still among the most sensitive and rapid Ca^{2+} indicators. The ease of use and the sensitivity of single FP GECIs are good properties that have pushed the plant community to move towards their use. The fact that single FP GECIs rely on a single excitation and a single emission makes them particularly suitable to be combined with other fluorescent markers or sensors, and for their use with simple and accessible microscope equipment. The single red-shifted FP GECI R-GECO1 is a red fluorescent GECI derived from the GCaMP3 (Tian et al., 2009), where the circularly permuted GFP (cpGFP) was substituted with the cpmApple (Zhao et al., 2011). Importantly, R-GECO1 is excited with green light (e.g. 561 nm) which offers a greater tissue penetration. The *in vitro* K_d of R-GECO1 of 482 nM with a Hill coefficient of 2.06 (Zhao et al., 2011) makes this sensor suitable to efficiently detect cytosolic Ca^{2+} variations. The GCaMP3 is a relatively old GCaMP version (Tian et al., 2009), and neuroscientists have now moved to the use of the newest versions (GCaMP6 and jGCaMP7).

Such a wealth of available tools might, however, generate some confusion in choosing one version over another. Indeed, the different GCaMP variants have different colors, different K_d for Ca^{2+} which make them suitable for use in different compartments or, similarly to the use of the YC-Nano 65, to report subtle changes of $[\text{Ca}^{2+}]$. As an example, when subtle changes of $[\text{Ca}^{2+}]$ are expected, the high affinity for Ca^{2+} of GCaMP6s (K_d of 144 nM) is more suitable than GCaMP3 (K_d of 542 nM) or GCaMP6f (K_d of 375 nM).

The new generation of single FP GECIs are continuously improving to increase the sensitivity and the signal-to-noise ratio to perform imaging in neuronal tissues. As a matter of fact, all the single FP GECIs exploit an OFF/ON response with a negligible fluorescent signal in the Ca^{2+} unbound state and strong fluorescence with even relatively small changes in $[\text{Ca}^{2+}]$.

In conclusion, the use of different single FP GECIs provides reliable data and offers the chance to capture dynamic processes in multicellular adult organisms, opening new opportunities to explore new hypotheses. Also, Cameleon sensors allow the performance of large imaging experiments, but for their use, a piece of more sophisticated and expensive equipment is required, whereas single FP GECIs need a simple single excitation, single emission fluorescence microscope equipped with a good camera.

A notable disadvantage of the single FP GECI is that the obtained intensities are not only determined by Ca^{2+} levels but are also dependent on local expression levels and can be quenched at low pH.

Microscopy techniques for plant calcium imaging

Traditionally, Ca^{2+} imaging has been carried out by using standard wide field and confocal fluorescence microscopy, while imaging of aequorin has been usually performed with back-illuminated charge-coupled device (CCD) cameras equipped with a light-tight box. The first Ca^{2+} analyses performed in single cells, were carried out with microscopes using high magnification objectives.

To perform Cameleon-based Ca^{2+} imaging, a wide field microscope with one filter for the excitation and one for the emission is not sufficient, whereas this configuration is suitable for a single FP GECI. The use of Cameleon requires the detection of the emissions from two fluorescent proteins obtained by performing a quick change of filters with a filter wheel that therefore needs repetition of the excitation step. An alternative configuration exploits a beam splitter coupled to one or two cameras to simultaneously acquire the two fluorescence signals (e.g. cpVenus and ECFP). With the wide field microscope, single cell resolution can be obtained when imaging cultured cells, but the lack of optical sectioning hinders the analysis of Ca^{2+} dynamics at single cell level in an entire organ or even tissue. However, in cases where the sensor is ubiquitously expressed, to obtain single cell resolution an optical sectioning microscope is needed. The most widely used optical sectioning technique is the confocal microscope, which makes use of a pinhole to reject the light coming from sample positions that are not in focus. In this configuration, a single laser (445 nm or 458 nm to excite the acceptor) and two photomultipliers are sufficient for FRET imaging, allowing many laboratories to perform Ca^{2+} imaging experiments at high spatial resolution. When required to perform Ca^{2+} imaging analysis at a high temporal resolution, the laser scanning confocal microscope shows some limitations in terms of acquisition speed. The sampling is in the order of 1 second, with a traditional galvo scanner. As an example, with a pixel number of 1024 x 1024, a typical acquisition frequency is 0.5 Hz, whereas with a half resolution of 512 x 512 it is 1 Hz. For a higher sampling rate, a spinning disk confocal is a

possible choice, as it essentially parallelizes the confocal pinhole detection. However, in this case, the need for simultaneous acquisition of both fluorescent ECFP and cpVenus emissions as well as the need for a dedicated laser (i.e. 445 nm) increases the complexity and the price of the microscope setup.

To perform experiments with single FP GECIs, the same microscopes described above can be used with standard configurations for a single excitation and a single emission, *de facto* expanding the audience of possible users. The new generation of single FP GECIs has largely facilitated Ca^{2+} imaging analyses since relatively low-cost cameras with good sensitivity exist, which can provide reliable measurements. This is shown in recent papers demonstrating that stereomicroscopes equipped with standard CCD or complementary metal–oxide–semiconductor (CMOS) cameras and common light sources like fluorescent lamps or LED illumination systems, are suitable to perform analyses of Ca^{2+} dynamics in entire small organisms whereas, traditionally, the Ca^{2+} analyses were mainly confined to cultured cells.

Bibliografia

- 1) Akerboom J, Chen TW, Wardill TJ, Tian L, Marvin JS, Mutlu S, Calderon NC, Esposti F, Borghuis BG, Sun XR, Gordus A, Orger MB, Portugues R, Engert F, Macklin JJ, Filosa A, Aggarwal A, Kerr RA, Takagi R, Kracun S, Shigetomi E, Khakh BS, Baier H, Lagnado L, Wang SSH, Bargmann CI, Kimmel BE, Jayaraman V, Svoboda K, Kim DS, Schreiter ER, Looger LL (2012) Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci* 32: 13819-13840
- 2) Ast C, Foret J, Oltrogge LM, De Michele R, Kleist TJ, Ho CH, Frommer WB (2017) Ratiometric Matryoshka biosensors from a nested cassette of green- and orange-emitting fluorescent proteins. *Nat Commun* 8, 431
- 3) Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11241-11246
- 4) Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 11-21
- 5) Carafoli E, Krebs J (2016) Why calcium? How calcium became the best communicator. *J Biol Chem* 291: 20849-20857
- 6) Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499: 295-300

- 7) Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 14: 1047-1058
- 8) Dana H, Mohar B, Sun Y, Narayan S, Gordus A, Hasseman JP, Tsegaye G, Holt GT, Hu A, Walpita D, Patel R, Macklin JJ, Bargmann CI, Ahrens MB, Schreiter ER, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2016) Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *Elife*. Mar 24;5:e12727
- 9) Dana H, Sun Y, Mohar B, Hulse BK, Kerlin AM, Hasseman JP, Tsegaye G, Tsang A, Wong A, Patel R, Macklin JJ, Chen Y, Konnerth A, Jayaraman V, Looger LL, Schreiter ER, Svoboda K, Kim DS (2019) High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. *Nat Methods* 16: 649-657
- 10) Dana N, Fowler RA, Allen A, Zoldan J, Suggs L, Emelianov S (2016) *In vitro* photoacoustic sensing of calcium dynamics with arsenazo III. *Laser Phys Lett* 13:075603.
- 11) de Juan-Sanz J, Holt GT, Schreiter ER, de Juan F, Kim DS, Ryan TA (2017) Axonal endoplasmic reticulum Ca²⁺ content controls release probability in CNS nerve terminals. *Neuron* 93:867-881.e6.
- 12) Goedhart J, van Weeren L, Hink MA, Vischer NO, Jalink K, Gadella TW Jr (2010) Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat Methods* 7: 137-139
- 13) Greenwald EC, Mehta S, Zhang J (2018) Genetically encoded fluorescent biosensors illuminate the spatiotemporal regulation of signaling networks. *Chem Rev* 118:11707-11794
- 14) Heim N, Garaschuk O, Friedrich MW, Mank M, Milos RI, Kovalchuk Y, Konnerth A, Griesbeck O (2007) Improved calcium imaging in transgenic mice expressing a troponin C-based biosensor. *Nat Methods* 4: 127-129
- 15) Horikawa K, Yamada Y, Matsuda T, Kobayashi K, Hashimoto M, Matsu-ura T, Miyawaki A, Michikawa T, Mikoshiba K, Nagai T (2010) Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca²⁺ indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods* 7: 729-732
- 16) Klejchova M, Silva-Alvim FAL, Blatt MR, Alvim JC (2021) Membrane voltage as a dynamic platform for spatio-temporal signalling, physiological and developmental regulation. *Plant Physiol* doi.org/10.1093/plphys/kiab032
- 17) Knight MR, Campbell AK, Smith SM, Trewavas AJ (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352: 524-526
- 18) Laissue PP, Alghamdi RA, Tomancak P, Reynaud EG, Shroff H (2017) Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nat Methods* 14: 657-661
- 19) Lakowicz JR (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Ed.; Springer US: Boston, MA.

DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4

- 20) Mehta S, Zhang Y, Roth RH, Zhang JF, Mo A, Tenner B, Haganir RL, Zhang J (2018) Single-fluorophore biosensors for sensitive and multiplexed detection of signalling activities. *Nat Cell Biol* 20: 1215-1225
- 21) Mithöfer A, Mazars C (2002) Aequorin-based measurements of intracellular Ca^{2+} -signatures in plant cells. *Biological Procedures Online* 4: 105-118
- 22) Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY (1999) Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved Cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2135-2140
- 23) Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997). Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388: 882-887
- 24) Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20: 87-90
- 25) Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10554-10559
- 26) Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19: 137-141
- 27) Ohmiya Y, Hirano T (1996) Shining the light: the mechanism of the bioluminescence reaction of calcium-binding photoproteins. *Chem Biol* 3: 337-347
- 28) Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, Tsien RY (2006) Ca^{2+} indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol* 13: 521-530
- 29) Palmer AE, Jin C, Reed JC, Tsien RY (2004) Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca^{2+} analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17404-17409
- 30) Palmer AE, Tsien RY (2006) Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat Protoc* 1: 1057-1065
- 31) Perez Koldenkova V, Nagai T (2013) Genetically encoded Ca^{2+} indicators: properties and evaluation. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1787-1797
- 32) Prasher D, McCann RO, Cormier MJ (1985) Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 126: 1259-1268

- 33) Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233
- 34) Robert V, Pinton P, Tosello V, Rizzuto R, Pozzan T (2000) Recombinant aequorin as tool for monitoring calcium concentration in subcellular compartments. *Methods Enzymol* 327: 440-456
- 35) Rogers KL, Stinnakre J, Agulhon C, Jublot D, Shorte SL, Kremer EJ, Brulet P (2005) Visualization of local Ca^{2+} dynamics with genetically encoded bioluminescent reporters. *Eur J Neurosci* 21: 597-610
- 36) Rudolf R, Mongillo M, Rizzuto R, Pozzan T (2003) Looking forward to seeing calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 579-586.
- 37) Sello S, Moscatiello R, Mehlmer N, Leonardelli M, Carraretto L, Cortese E, Zanella FG, Baldan B, Szabo I, Vothknecht UC, Navazio L (2018) Chloroplast Ca^{2+} fluxes into and across thylakoids revealed by thylakoid-targeted aequorin probes. *Plant Physiol* 177: 38-51
- 38) Sello S, Perotto J, Carraretto L, Szabo I, Vothknecht UC, Navazio L (2016) Dissecting stimulus-specific Ca^{2+} signals in amyloplasts and chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. *J Exp Bot* 67: 3965-3974
- 39) Shao Q, Gao Q, Lhamo D, Zhang H, Luan S (2020) Two glutamate- and pH-regulated Ca^{2+} channels are required for systemic wound signaling in *Arabidopsis*. *Sci Signal* 14;13(640):eaba1453
- 40) Shaw SL, Thoms D, Powers J (2019) Structured illumination approaches for super-resolution in plant cells. *Microscopy* 68: 37-44
- 41) Shen Y, Dana H, Abdelfattah AS, Patel R, Shea J, Molina RS, Rawal B, Rancic V, Chang YF, Wu L, Chen Y, Qian Y, Wiens MD, Hambleton N, Ballanyi K, Hughes TE, Drobizhev M, Kim DS, Koyama M, Schreiter ER, Campbell RE (2018) A genetically encoded Ca^{2+} indicator based on circularly permuted sea anemone red fluorescent protein eqFP578. *BMC Biol* 16;16(1):9
- 42) Shimomura O (1995) A short story of aequorin. *Biol Bull* 189: 1-5
- 43) Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-239
- 44) Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, Ohkura M, Okubo Y, Iino M (2014) Imaging intraorganellar Ca^{2+} at subcellular resolution using CEPIA. *Nat Commun* 13;5:4153
- 45) Thestrup T, Litzlbauer J, Bartholomäus I, Mues M, Russo L, Dana H, Kovalchuk Y, Liang Y, Kalamakis G, Laukat Y, Becker S, Witte G, Geiger A, Allen T, Rome LC, Chen TW, Kim

- DS, Garaschuk O, Griesinger C, Griesbeck O (2014) Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nat Methods* 11: 175-182
- 46) Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods* 6: 875-881
- 47) Tsien RY (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*. 27: 2396-2404
- 48) Williamson RE, Ashley CC (1982) Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature* 296: 647-650
- 49) Wu J, Abdelfattah AS, Mirauccourt LS, Kutsarova E, Ruangkittisakul A, Zhou H, Ballanyi K, Wicks G, Drobizhev M, Rebane A, Ruthazer ES, Campbell RE (2014) A long Stokes shift red fluorescent Ca^{2+} indicator protein for two-photon and ratiometric imaging. *Nat Commun* 31;5:5262
- 50) Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang YF, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science* 333: 1888-1891
- 51) Zhu X, Feng Y, Liang G, Liu N, Zhu JK (2013) Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus- and tissue-specific Ca^{2+} dynamics in *Arabidopsis* plants. *Mol Plant* 6: 444-455

L'impero delle luci dove i fotoni incontrano le cellule: un percorso dal microscopio ottico a quello artificiale

Alberto Diaspro

Dipartimento di Fisica, Università di Genova, Center for Human Technologies, IIT, Genova, Istituto di Biofisica, CNR, Genova

Nella magica Venezia tra il Caffè Florian in Piazza San Marco e il Museo della Collezione Peggy Guggenheim in Dorsoduro trovate l'essenza della microscopia ottica moderna. Il caffè al modo Florian richiede tempo prima di essere sorseggiato come l'immagine che si forma nei moderni microscopi ottici a scansione di luce, e "L'impero delle Luci" di René Magritte (Collezione Peggy Guggenheim, Venezia, Fondazione Solomon R. Guggenheim, New York), un olio su tela di 1954x1312 mm² realizzato a metà degli anni 50, dove si combinano la luce naturale proveniente dal cielo affollato da nubi cumuliformi, la luce artificiale di un lampione e quella delle stanze illuminate per svelare ciò che è nell'oscurità, richiama la microscopia multimodale sviluppata tra marcature in fluorescenza e contrasto "label-free". L'osservatore in questo scenario è l'elemento intelligente così come i più recenti sviluppi dell'intelligenza artificiale che a pieno titolo diventano il nuovo elemento del microscopio ottico [1]. I meccanismi della fluorescenza [2, 3, 4] e della diffusione della luce [5, 6, 7] permettono di ottenere con il microscopio ottico l'accesso ad informazioni molecolari nelle 4 dimensioni dello spazio e del tempo (x,y,z,t) e la moderna sensoristica permette di aggiungere la dimensione spettroscopica offrendo immagini super risolte in tempo reale [8, 9, 10]. Lo scenario odierno è costituito da una intricata foresta di metodi e relativi acronimi sviluppati negli ultimi 10 anni e portati ad un livello tecnologico decisamente avanzato [11]. La risoluzione spaziale di un microscopio ottico, utilizzando luce visibile, si colloca intorno a 200 nm determinata in modo inappellabile dalle leggi della diffrazione [12]. Tuttavia, come previsto negli anni 50 da Giuliano Toraldo di Francia [13,14], è possibile andare oltre questo limite in modo illimitato [15, 16, 17]. Mentre la formula di Abbe [12] non contiene parametri che possano abbattere la risoluzione spaziale a valori infinitesimi, le relazioni che regolano l'implementazione dei metodi a super risoluzione, sia a singola molecola [18, 19, 20, 21] che a confinamento da emissione stimolata [22, 23, 24, 25], sono scalati per quantità che possono tendere ad infinito azzerando il limite di risoluzione. Il condizionamento maggiore, al di là di dimostrazioni sempre più spinte sulla scala sub-nanometrica [26], viene dalle condizioni ambientali al contorno e dalle modalità di marcatura in fluorescenza.

La fluorescenza offre al microscopista due importanti vantaggi: disporre di un segnale brillante contro uno sfondo nero, tecnicamente essere in una condizione di ottimo rapporto segnale-rumore, e, in relazione alla cura messa nella preparazione del campione, mappare segnali specifici per diversi

distretti cellulari e molecole. Tuttavia vi sono altrettanti aspetti che orientano verso le modalità label-free, ad esempio: uno di questi riguarda la prospettiva di formare immagini al microscopio in vivo senza necessità di marcatura e un altro prende in considerazione l'affollamento molecolare che in condizioni di alta densità macromolecolare, si pensi al compattamento del DNA nel nucleo, può influire sulla organizzazione spaziale a sua volta correlata ad aspetti funzionali.

Tra i metodi label-free, oltre alla fluorescenza intrinseca con eccitazione lineare e non lineare [4, 11], tra gli approcci notevoli vale la pena di citare il contrasto di fase quantitativo [5], la microscopia di Brillouin [27, 28], i metodi non lineari come la generazione di seconda armonica [29], l'olografia 3D [30], la nanoscopia pum-probe [31] e la microscopia a matrice di Mueller o polarimetrica [32].

Proprio la microscopia a matrice di Mueller offre una chiave importante di formazione di immagini senza marcatura da sistemi biologici basata sulla risposta differenziale alla modulazione degli stati di polarizzazione e al controllo delle relative variazioni sia da un punto di vista computazionale [33] che sperimentale [34]. La microscopia a matrice di Mueller nei suoi sviluppi moderni si candida ad essere un importante meccanismo di contrasto in biofisica alla nanoscala [35].

La super risoluzione ottica nelle sue implementazioni più recenti ha effettivamente trasformato la microscopia ottica in nanoscopia ottica in uno scenario dove la microscopia confocale e a multifotone avevano fatto fare un salto in avanti importante [9, 11]. Tra i metodi label-free quelli polarimetrici hanno permesso di ottenere informazioni strutturali integrabili con le immagini in fluorescenza. Il futuro immediato unisce le modalità in fluorescenza e label-free proiettando la microscopia verso l'integrazione con i metodi più avanzati di intelligenza artificiale [36]. La prossima sfida si chiama "liquidopy", microscopia liquida sintonizzabile in termini di risoluzione spaziale, risoluzione temporale e intelligenza computazionale multimediale [36]. Il microscopio ottico del futuro, che chiamo "microscopio artificiale", permetterà di trasformare informazioni label-free in immagini a contrasto specifico nella prospettiva di offrire al medico una alternativa alla classica biopsia.

Bibliografia

- [1] A.Diaspro, Quello che gli occhi non vedono, Hoepli 2020.
- [2] G. Weber, Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 1, 553, 1972.
- [3] D.M. Jameson, "Introduction to Fluorescence", CRC Press, Boca Raton, 2014.
- [4] P.P. Mondal, A. Diaspro, Fundamentals of Fluorescence Microscopy, Springer Netherlands, Dordrecht, 2014.

- [5] G. Popescu, Y. Park Quantitative phase imaging in biomedicine. *J Biomed Opt.* 2015 Nov;20(11):111201.)
- [6] A. Le Gratiet, et al., *Applied Sciences* 11(4), 1632, 2021.
- [7] D. Gottlieb, O. Arteaga, *Opt. Express* 29, 34723-34734, 2021.
- [8] X. Su (ed.), Special Issue: Multidisciplinary Single-Cell Optical Cytometry, *Cytometry A*, 19(11): 1059-1161, 2021.
- [9] A. Diaspro, P. Bianchini, *Riv. Nuovo Cim.* 43, 385–455, 2020.
- [10] M. Castello et al, *Nat Methods*, 16(2), 175-178, 2019.
- [11] A. Diaspro (ed) *Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy*. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, 2010.
- [12] C.J.R. Sheppard, *Microsc. Res. Tech.* 80, 590, 2017.
- [13] G. Toraldo di Francia, *JOSA* 45(7), 497–501, 1955.
- [14] A. Diaspro, *Il Nuovo Saggiatore* 30, 45, 2014.
- [15] The Royal Swedish Academy Of Sciences, 2014,
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/
- [16] S.W. Hell, *Science* 316, 1153, 2007.
- [17] C. Eggeling, et al. *Q. Rev. Biophys.* 48, 178, 2015.
- [18] H. Deschout, et al. *Nature Methods* 11, 253–266, 2014.
- [19] E. Betzig, et al. *Science* 313, 1642–1645, 2006.
- [20] S.T. Hess, et al. *Biophysical Journal* 91, 4258–4272, 2006.
- [21] M.J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, X. *Nature Methods* 3, 793–796, 2006.
- [22] S.W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* 19, 780, 1994.
- [23] T.A. Klar, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8206, 2000.
- [24] B. Harke, et al. *Opt. Express* 16, 4154, 2008.
- [25] G. Vicidomini, P. Bianchini, A. Diaspro, *Nat. Methods* 15, 173, 2018.
- [26] M. Weber, et al. *Nature Photonics* 15, 361–366, 2021.
- [27] G. Scarcelli, S.H. Yun, *Nat. Phot.* 2, 39–43 (2008).;
- [28] R. Prevedel et al. *Nat Methods* 16, 969–977, 2019.
- [29] P. Bianchini, A. Diaspro, *J. Biophotonics* 1, 443, 2008.
- [30] P. Memmolo, et al. *Adv. Opt. Photonics*, 7, 713–755, 2015.
- [31] V. Astratov (eds) *Label-Free Super-Resolution Microscopy*. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Springer, Cham., 2021.
- [32] A. Le Gratiet, et al., *Applied Sciences* 11(4), 1632, 2021.
- [33] M.W. Ashraf, R. Ranjan, A. Diaspro, *JOSA B: Optical Physics*. 38 (5), 1702-1709, 2021.

- [34] F. Callegari, et al. *Frontiers in Physics*. 9: 758880, 2022.
- [35] A. Gratiè, et al. *Polymers*. 12(10), 1-21, 2020.
- [36] H. Wang, et al. *Nat Methods* 16, 103–110, 2019.
- [37] A. Diaspro, et al. *Microscopy and Microanalysis*,24(S1), 1368-1369, 2018.

Tecniche di separazione cellulare: dalla centrifuga ai microchip di silicio

Giuliano Mazzini

Istituto di Genetica Molecolare CNR e Dip. Biol&Biotec “L.Spallanzani” UniPV

Breve “Amarcord”

La separazione di sottopopolazioni cellulari è stata per decenni basata sull'utilizzo della centrifuga quale strumento essenziale di ogni laboratorio di area biomedica. La semplice “sedimentazione gravimetrica” per separare le cellule dal liquido in cui si trovano è stata poi affinata dalla cosiddetta separazione in gradiente per ottenere sottopopolazioni cellulari caratterizzate da peculiari caratteristiche morfo/dimensionali. Sono nate così le varie tecniche di interesse ematologico per ottenere le varie componenti di interesse sia sperimentale che clinico a partire da sangue intero. Numerosi sono i preparati commerciali (“Ficoll” fra tanti) che popolano i laboratori clinici (e non solo). Sempre rimanendo nel campo della separazione gravimetrica una sua successiva implementazione tecnologica ha portato alla realizzazione delle ultracentrifughe per la separazione di componenti sub-cellulari che ovviamente ricadono nei campi della biochimica e/o della biologia molecolare.

Un primo salto epocale nel settore dell'analisi e della separazione cellulare è stato condizionato dall'avvento delle tecniche di Citometria a Flusso (CF) intorno agli anni Sessanta del secolo scorso. Obiettivo di questo rivoluzionario approccio tecnologico è stato quello di riuscire ad analizzare migliaia di cellule in pochi secondi in modo completamente automatizzato. Grazie alla evoluzione metodologica delle tecniche di marcatura cellulare e soprattutto grazie all'avvento della immunocitochimica la CF ha reso poi possibile (una decina di anni più tardi) il cosiddetto “sorting elettrostatico” realizzato con particolari strumenti inizialmente denominati FACS (Fluorescence Activated CellSorter). Certamente il conteggio, l'analisi e la caratterizzazione di sottopopolazioni a bassa o bassissima numerosità (nel sangue o in altri fluidi biologici) è una delle sfide tecnologiche più affascinanti dei nostri giorni.

Ancora a proposito di “sorting”, fondamentale è stato il contributo della separazione basata su microparticelle ferromagnetiche che consentono una grandissima versatilità applicativa. La strumentazione commercialmente disponibile (e la relativa metodologia di separazione basata su anticorpi legati a micro o nano-particelle magnetiche), ad oggi, è totalmente dedicata alle problematiche cliniche basate rispettivamente sull'arricchimento (detto anche separazione “positiva”) o sulla deplezione cellulare (o separazione negativa). La prima tecnica consente di

ottenere una frazione arricchita degli elementi cellulari di interesse (es CD34+ da donatore, da trasfondere in paziente o da espandere in vitro) mentre la seconda consente invece di eliminare elementi cellulari indesiderati (es. CD14+ prima di procedere alla conta dei CD4+). In entrambi i casi le cellule, “separate” grazie al campo magnetico, rimangono legate ad un supporto (ovvero, colonne “disposable” macro o micro) che viene eliminato nel caso della deplezione (infatti contiene le cellule indesiderate) e dal quale invece devono essere “eluite” (con resa più o meno elevata) le cellule di interesse nel caso della separazione “positiva”.

Nuove metodologie.

Nei laboratori IGM-CNR Sez Istoch/Citometria sono in corso da alcuni anni ricerche di sviluppo tecnologico e metodologico mirate alla realizzazione di dispositivi di separazione e conta cellulare finalizzati a portare le cellule separate direttamente su un “supporto” (tipo vetrino) da microscopia per essere direttamente contate e/o analizzate con metodiche immunocitochimiche.

Recentemente tali ricerche hanno portato alla realizzazione pratica di un dispositivo (“Micro-count”) per separazione immunomagnetica di elementi cellulari presenti a bassa frequenza in liquidi biologici. Il sistema è stato sviluppato per trattare microvolumi di campione (50 µl) che potrà contenere un numero di cellule (da separare “positivamente”) di 100-200 elementi. A fine procedimento le cellule separate rimangono adese alla superficie di un vetrino copri-oggetto, in aree predefinite, per una immediata osservazione/conta al microscopio (Fig. 1)

Sempre in tema di identificazione e conteggio di “eventi rari” a livello clinico, sono diventate attuali numerose problematiche che hanno appunto come denominatore comune quello di coinvolgere pochissimi elementi cellulari cui però è legata un grande valenza analitica. L’ambito clinico è vasto e va dal trasfusionale (leucociti residui nelle sacche di emo-derivati) al trapiantologico (caratterizzazione delle cellule staminali) alla ricerca degli eritroblasti fetali nel circolo della madre fino ad emergenti problematiche di oncologia solida ed ematologica. Proprio in questi ultimi due distretti sono in atto grandi sfide tecnologiche e metodologiche per arrivare al miglior approccio possibile (che come spesso accade non è sempre facilmente raggiungibile). Anche su questi temi ci siamo attivati all’ IGM-CNR e sulla base dell’esperienza fatta con la tecnica “Micro-count” abbiamo messo a punto un secondo sistema di separazione immunomagnetica che ha dovuto tener conto del diverso contesto di tipologia e di preparazione del campione. Sul tema specifico della ricerca delle cellule tumorali circolanti (CTC), nel sangue periferico di pazienti oncologici, abbiamo fatto riferimento ad un approccio analitico commerciale (“Cell Search” della Veridex) che, nonostante varie validazioni (inclusa FDA-USA), per una serie di ragioni (costi principalmente, ma non solo) non ha trovato ad oggi larga diffusione. Dai dati disponibili in letteratura sulla frequenza di CTC nel

periferico in varie tipologie e stadi di malattie oncologiche risulta un range di valori da poche unità (2-5) a centinaia (100-200) valutati in 7.5ml di sangue periferico. Il sistema Veridex gestisce questo volume di sangue in due fasi ed in modo semiautomatico mediante l'impiego di appositi "disposable" e reagenti dedicati per arrivare o al numero di cellule contate o a un supporto che contiene le cellule separate, per la loro successiva osservazione/controllo al microscopio. Con questa premessa abbiamo sperimentato una implementazione del sistema "Micro-count" per realizzare una strategia di separazione adatta a questa tipologia di campione e sempre con l'obiettivo finale di recuperare direttamente le cellule su vetrino da microscopio. Poiché è necessario partire da grandi volumi di sangue è indispensabile lavorare sulla frazione di cellule mononucleate ottenute da separazione in Ficoll del campione di sangue di partenza. E' comunque noto dalla letteratura che le CTC si vanno a raccogliere in questa frazione di cellule. Altro punto critico è il marcatore di elezione che si decide di utilizzare: inizialmente il sistema Veridex era basato su selezione positiva realizzata mediante monoclonale anti-EpCam e successiva ulteriore caratterizzazione delle cellule con altre marcature specifiche (positività a DNA/nucleo e citocheratine ed assenza di marcatura CD45). Nel recente passato però una serie di lavori hanno dimostrato che la ben nota eterogeneità di espressione delle molecole di superficie delle cellule tumorali ha messo in discussione la "robustezza" del parametro EpCam quale cardine della immuno-cattura delle CTC. Nel nostro caso abbiamo utilizzato come marcatura primaria un mix di anticorpi (mouse) anti-EpCam e anti-PanCitocheratina (8-18-19) seguita da una marcatura secondaria con microparticelle magnetiche (Dynabeads® Goat anti-Mouse IgG , 4.5micron). Il sistema utilizzato è mostrato in Figura 2a, ed è stato realizzato per operare con piastre multiwell standard da 6 pozzetti. Il blocco portamagneti (sul quale si appoggia la piastra a pozzetti) monta sei magneti al neodimio (intercambiabili) due dei quali grandi (circa un terzo del fondo del pozzetto) e quattro piccoli di 3mm di diametro. Il campione incubato con i reagenti di cui sopra (volume di circa 2ml) è posto in uno dei pozzetti sovrastanti i magneti grandi e quindi il tutto è posto per 30min su un piano basculante (planetario). In questo modo le cellule "positive" (epiteliali/tumorali) avranno legato le microsferiche e quindi saranno trattenute (dal campo magnetico) al fondo del pozzetto, mentre le "negative" (tutti i leucociti ed i rossi residui, essendo il campione non lisato) saranno flottanti nel mezzo liquido. Con una serie di lavaggi/agitazioni sarà possibile rimuovere tutte le cellule non marcate lasciando infine le cellule trattenute al fondo del pozzetto. Si può quindi togliere la piastra dal contatto dei magneti e aspirare con un po' di terreno/PBS le cellule separate per trasferirle in un pozzetto adiacente che porta sul fondo un vetrino coprioggetto in corrispondenza di uno dei magneti piccoli. Un successivo passaggio per 15 min sul piano basculante farà in modo che le poche cellule catturate si vadano a localizzare al centro del vetrino

dove è concentrata l'azione del magnete piccolo. Il vetrino potrà poi essere processato al microscopio (Fig 2b) come precedentemente descritto nel sistema "Microcount".

La frazione di cellule recuperata sarà quindi disponibile per ogni ulteriore caratterizzazione immunocitochimica così come per ogni parallela indagine di biologia molecolare. Se la quantità di cellule recuperate dovesse essere consistente (dell'ordine delle migliaia di elementi) questa frazione di campione potrà essere normalmente analizzata come "frazione arricchita" mediante citometria a flusso. Una ultima nota riguarda la possibilità di separare le cellule in condizioni di sterilità se ulteriori indagini di biologia molecolare richiedessero la necessità di espandere in vitro la sottopopolazione separata.

Nuovi orizzonti biotecnologici

L'evento biologico di "generazione di metastasi tumorale" è costituito da una complessa cascata, non ancora perfettamente chiarita, di fattori genetici ed ambientali che concorrono insieme ad eventi biofisici a stimolare determinate cellule ad abbandonare il tumore primario per dirigersi in sedi distali ove potranno dare luogo ad un tumore secondario. Dati recenti della letteratura testimoniano che gli aspetti biofisici, ovvero le proprietà bio-meccaniche della cellula (struttura più o meno rigida del suo citoscheletro, elasticità più o meno spiccata della sua membrana plasmatica) e la capacità del microambiente del tumore di modularle (nel senso di stimolarle) verso un comportamento più o meno "metastatico" sono punti chiave, al centro dell'attenzione di molti ricercatori di area biomedica. In un recente Progetto di ricerca ci siamo posti l'obiettivo di investigare le proprietà biofisiche e specificamente la "plasticità della membrana cellulare" per arrivare a definire (o potremmo dire prevedere) quello che potrà essere il comportamento di queste cellule in termini di mobilità e/o migrazione, fattori questi che sono strettamente connessi alla "capacità metastatica". E' noto che le cellule del tumore primario, per generare metastasi, devono subire una trasformazione morfologica nota come transizione epitelio-mesenchimale (EMT), ovvero devono acquisire una maggior plasticità, tipica di cellule mesenchimali, per riuscire a migrare, attraversando membrane basali e/o endoteli. E' stato già sottolineato in letteratura che la differente plasticità cellulare può essere influenzata dal microambiente tridimensionale che circonda le cellule. Da qui l'esigenza di esplorare la coltura in 3D, anziché su supporti planari, per studiare gli effetti che questa può indurre sul citoscheletro e sugli aspetti morfofunzionali delle cellule.

Nell'ambito di una collaborazione interdisciplinare fra Dipartimenti diversi (IGM-CNR, Oncologia Osp. Vigevano, Mario Negri MI, Dip. Ing. Industriale & Informazione UniPV e Ing. Informazione UniPI) stiamo investigando l'applicazione di microchip in silicio quali microincubatori 3D per applicazioni biomediche. (Fig.3)

In questo progetto proponiamo l'utilizzo di microstrutture in silicio per la coltura di cellule tumorali umane in un microambiente tridimensionale, al fine di caratterizzarne il potenziale metastatico, che è ritenuto, oggi con grande consenso, un fattore prognostico (negativo) importante nell'evoluzione della malattia oncologica.

Le microstrutture che proponiamo di utilizzare consistono in schiere periodiche di muri di silicio alternati ad intercapedini vuote con dimensioni dell'ordine di pochi micrometri e con elevato rapporto d'aspetto, ricavate tramite microlavorazione di tessere di circa 1cm^2 . Il nostro gruppo di ricerca ha già ottenuto risultati significativi nell'impiego di queste microstrutture in campo biomedico, dimostrando che esse possono svolgere la duplice funzione di incubatori e trasduttori ottici per lo studio del comportamento di biomolecole e cellule in ambiente tridimensionale. In particolare, abbiamo dimostrato la possibilità di usare questi supporti per differenziare linee cellulari con comportamento epiteliale da quelle mesenchimali, dato che solo queste ultime sono in grado di popolare attivamente le strette intercapedini tra i muri (Fig.4). Nella fase iniziale abbiamo studiato varie linee cellulari stabilizzate derivate da tumori umani con differenti capacità metastatiche. Queste cellule sono state coltivate con tecniche standard sia su vetrini tradizionali che su tessere di silicio microlavorato. Per valutare il comportamento delle cellule su silicio 3D (non trasparente nel visibile, come i vetrini classici) è stato necessario ricorrere a procedimenti di marcatura citochimica e immunocitochimica con utilizzo di varie tecniche microscopiche, in particolare basate su rivelazione in fluorescenza in luce incidente in riflessione.

Utilizzando tecniche software di elaborazione delle immagini, acquisite al microscopio, abbiamo valutato la diversa capacità delle cellule di popolare attivamente le strette intercapedini della microstruttura in silicio e con analisi statistica abbiamo quantificato questa capacità e quindi la sua correlazione con il potenziale metastatico.

Abbiamo quindi verificato la validità di questo nuovo approccio analitico (che si pone come alternativa al test di Boiden) in un modello di tumore sperimentale quale il "Lewis lung" del topo (Fig.5). I risultati dell'analisi quantitativa dimostrano l'efficienza della microstruttura come microincubatore selettivo in grado di monitorare il grado di aggressività biologica delle cellule che vi crescono, siano esse rappresentate da linee cellulari tumorali di varia origine sia cellule derivate da tumori sperimentali (nel nostro caso carcinoma Lewis lung). Dal confronto fra il comportamento su silicio delle cellule del tumore primario, rispetto a quello delle cellule derivate dalla metastasi, abbiamo avuto la conferma della validità del metodo e siamo quindi passati alla valutazione di alcuni campioni clinici, ovvero il sangue periferico di pazienti oncologici. La soluzione che abbiamo sperimentato è quella della coltura a tempi lunghi (5 giorni) che vede il deperimento/morte delle cellule normali, verso la sopravvivenza delle sole cellule tumorali che rimangono vitali dentro/sopra il

silicio. Con una metodica di rivelazione con anticorpo anti Citocheratina (CK) marcato con FITC in una serie di tre pazienti oncologici ed un controllo normale, abbiamo verificato in un paziente (in stadio clinico avanzato e con metastasi) la presenza (Fig.6) di una quota significativa di cellule positive a CK, verosimilmente riferibili a CTC.

Sebbene questi dati siano ancora preliminari essi rappresentano un primo passo verso una caratterizzazione cellulare non solo basata su parametri fenotipici o genotipici, ma che include anche il comportamento funzionale.

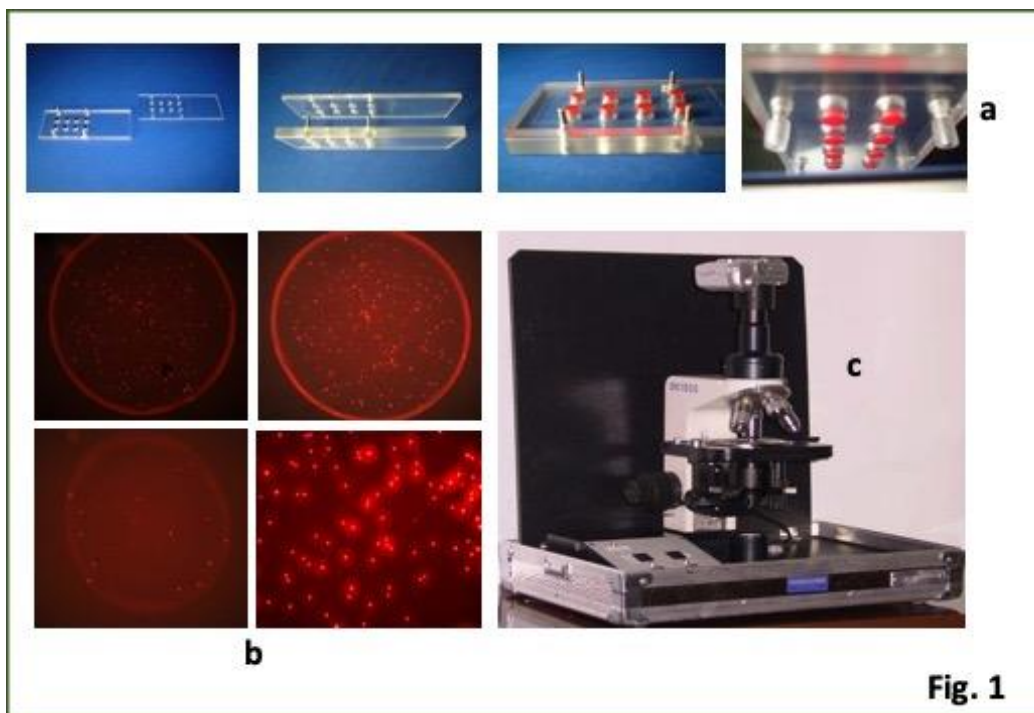


Fig. 1

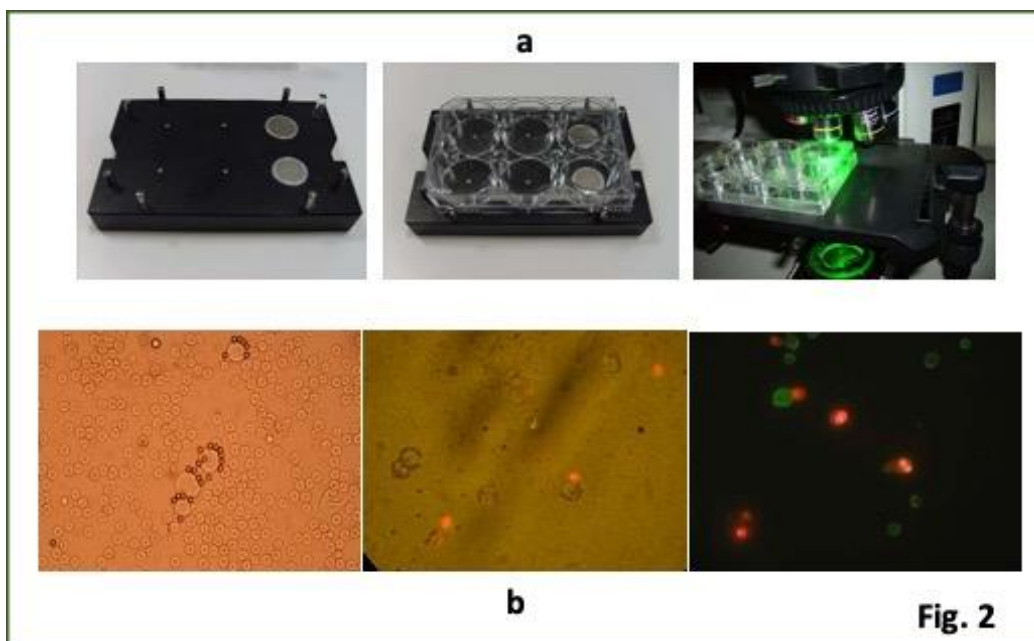
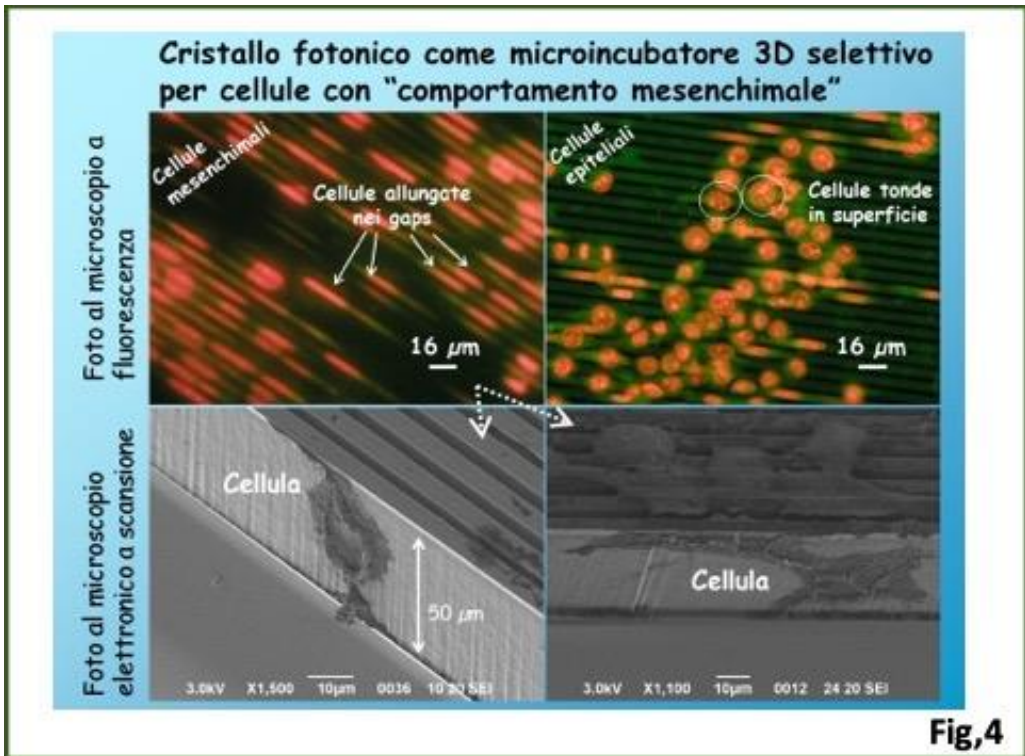
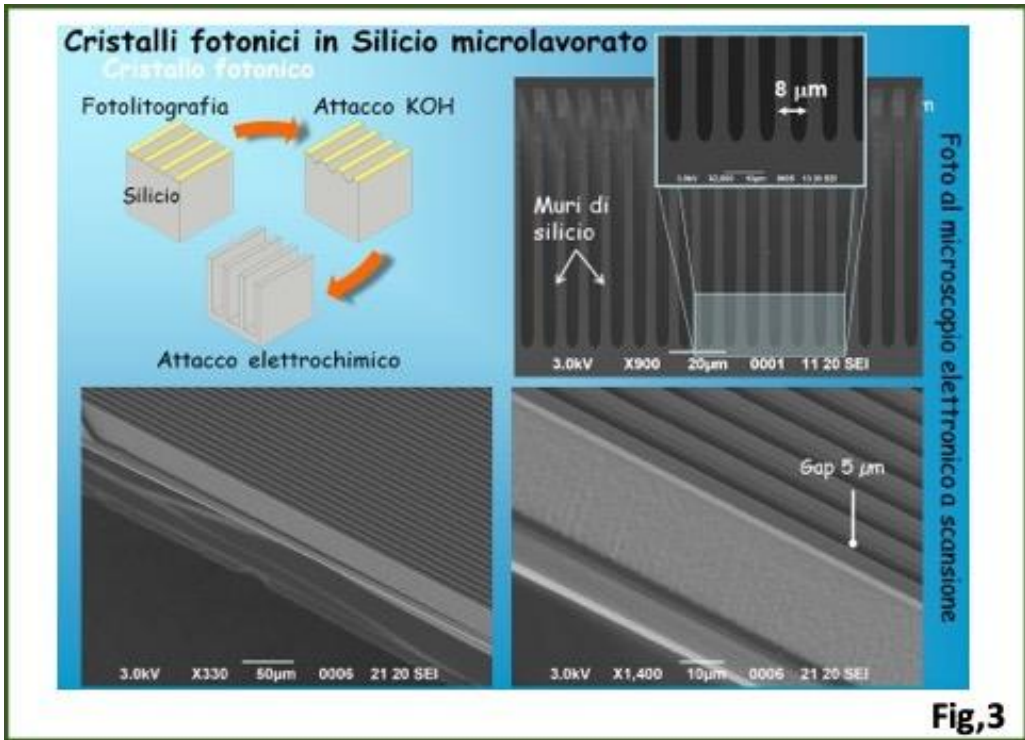


Fig. 2



Confronto fra le cellule del tumore primario e quelle delle metastasi

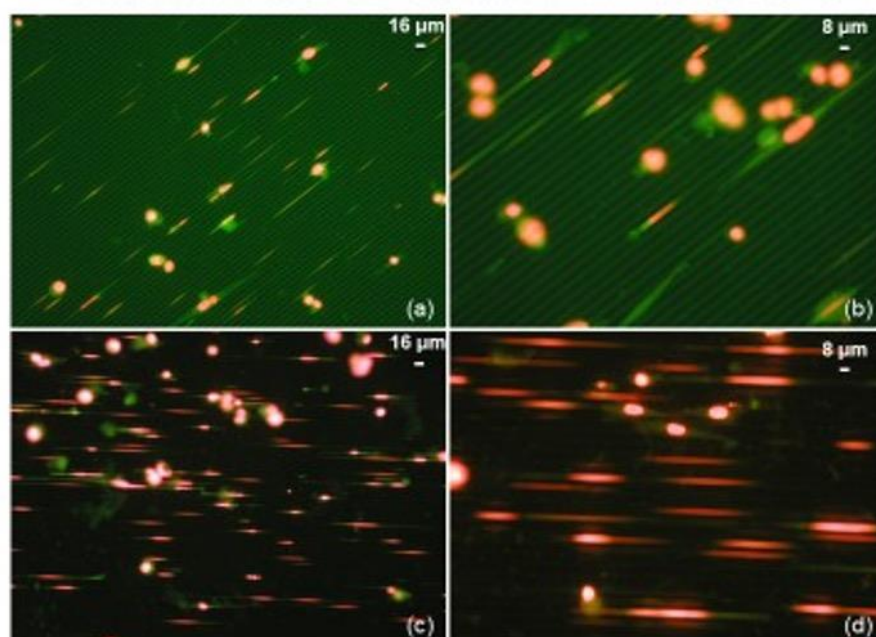
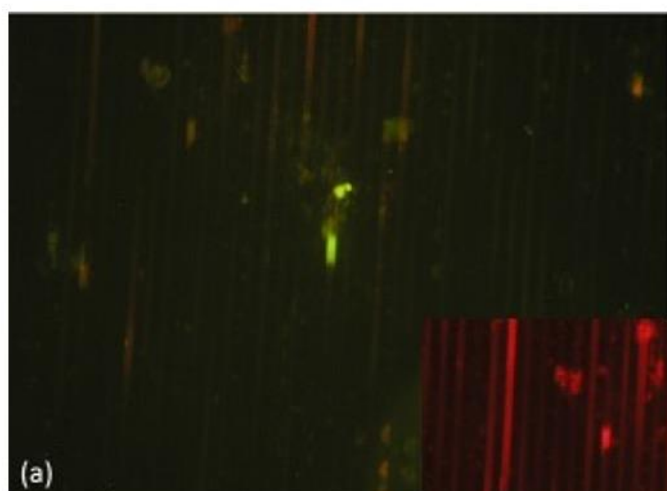


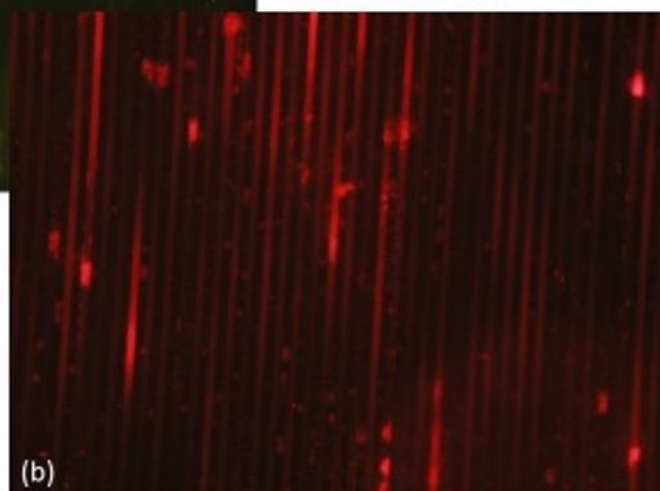
Fig 5. Cellule di Lewis Lung isolate dal tumore primario (a, b) e da una metastasi (c, d) e coltivate per 48 h su MS8, fissate e colorate con miscela FITC/PI. L'osservazione in fluorescenza con eccitazione blu mostra la distribuzione delle cellule sopra e dentro il silicio.

CONCLUSIONE Si può notare come la maggior parte delle cellule sia dentro le intercapedini e questo fenomeno si osserva in percentuale maggiore nel caso delle cellule provenienti da metastasi.



CONCLUSIONE La cellula CK-positiva trovata inserita fra i muri di silicio testimonia che la microstruttura MS8 può funzionare da microincubatore tridimensionale selettivo per catturare le CTC nel sangue periferico di pazienti oncologici.

Fig 6. Particolare dello stesso campione CMP a maggiore ingrandimento (40x). Campioni fissati e marcati con anticorpo anti citocheratina-FITC (a) e con PI (b). E' evidente la fluorescenza verde specifica di una sola cellula positiva a citocheratina mentre le altre mostrano solo fluorescenza aspecifica di fondo.



Bibliografia

Label-free optical detection of cells grown in 3D silicon microstructures.

Merlo S, Carpignano F, Silva G, Aredia F, Scovassi AI, Mazzini G, Surdo S, Barillaro G.

Lab Chip. 2013 Aug 21;13(16):3284-92. doi: 10.1039/c3lc50317h. Epub 2013 Jul 1.

A new cell-selective three-dimensional microincubator based on silicon photonic crystals.

Carpignano F, Silva G, Surdo S, Leva V, Montecucco A, Aredia F, Scovassi AI, Merlo S, Barillaro G, Mazzini G.

PLoS One. 2012;7(11):e48556. doi: 10.1371/journal.pone.0048556. Epub 2012 Nov 6. Erratum in:

PLoS One. 2012;7(11). doi:10.1371/annotation/30b05d2d-7b79-458b-88f7-5d06aaab95b7.

Fibrillogenesis of human $\beta 2$ -microglobulin in three-dimensional silicon microstructures.

Merlo S, Barillaro G, Carpignano F, Silva G, Surdo S, Strambini LM, Giorgetti S, Nichino D, Relini A, Mazzini G, Stoppini M, Bellotti V.

J Biophotonics. 2012 Oct;5(10):785-92. doi: 10.1002/jbio.201100132. Epub 2012 Jan 23.

Isolation of rare circulating tumor cells in cancer patients: technical aspects and clinical implications.

Danova M, Torchio M, Mazzini G.

Expert Rev Mol Diagn. 2011 Jun;11(5):473-85. doi: 10.1586/ERM.11.33. Review.

Single cell sequencing of acute leukemias: new molecular insights and clinical implications

Ilaria Iacobucci

St. Jude Children's Research Hospital, Memphis (TN), USA

In the past decade the application of genomic and transcriptomic sequencing to study large cohorts of patients with acute leukemia (AL) has led to the identification of key genetic drivers and has proven that genomics is needed to understand disease biology, accurately classify patients, determine risk factors and identify novel therapeutic targets^{1,2}. However, despite these progresses, prognosis remains poor for most patients with AL with the exception of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) who do not experience disease recurrence. This is partly attributable to the dynamic and complex genetic heterogeneity of leukemic cells which promotes expansion of resistant clones hampering disease eradication. The successful development and availability of single-cell sequencing (sc-seq) technologies and related computational tools to profile the transcriptome, genome, epigenome, proteome and metabolome of individual normal and malignant cells, have led to unprecedented characterization of cellular heterogeneity paving the way to studies in leukemia.

Compared to bulk sequencing, sc-seq studies enable to explore rare cell populations, dissect inter- and intra-heterogeneity of tumor cells and microenvironment (e.g. by spatial transcriptomic analysis) and track clonal evolution^{3,4}. There are multiple single-cell platforms that depending on the desired output allow to profile a single modality (e.g., RNA, DNA, open chromatin and methylation) or multiomic approaches that enable simultaneous analysis of more than one modality within the same cells, such as multiome assay for transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC) and gene expression⁵, cellular indexing of transcriptomes and epitopes by sequencing (CITE-seq)⁶ and multiome cell surface protein expression and DNA sequencing (proteogenomic)⁷. The application of sc-seq to the study of AL has contributed to define cellular developmental states and infer leukemia cell of origin⁸⁻¹⁰, dissect leukemia lineage plasticity⁵ and clonal heterogeneity, improve patient risk stratification and early detection of relapse^{3,11} for example in response to ALL-directed immunotherapies¹² and define the cellular composition and transcriptional programs of the tumor microenvironment (TME)^{13,14}.

Dissection of developmental states and cell of origin – scRNA-seq studies in acute myeloid leukemia (AML) dissected cellular hierarchy and showed evidence of association between cell-states, genomic features and prognosis with primitive stem cell signatures being associated with worse survival^{8,10}. In

B-ALL the correlation between single-cell transcriptional signatures of ALL blasts with normal B-cell precursors have determined various degree of differentiation across different molecular subtypes and inferred the putative “cell of origin”. For example, by scRNA-seq *KMT2A*-rearranged infant ALL which has dismal outcome exhibited a gene expression profile similar to early lymphocyte precursors, which are fetal-specific oligopotent early lymphoid progenitors. In contrast, *NUTM1*-rearranged infant ALL, which has a favorable outcome, was characterized by transcriptional programs of later developing B cells⁹.

Dissection of clonal heterogeneity – Single-cell proteogenomic studies have provided insights into ordering of acquisition of mutations and interplay between genetic and phenotypic evolution demonstrating that in AML mutations in epigenetic regulators commonly co-occur early in stem/progenitor cells, whereas mutations in signaling pathways are secondary events occurring in distinct subclones^{15,16}; similarly in B-cell ALL⁷ lineage-related mutations (e.g *ETV6*, *IKZF1*, and *PAX5*) occur early, while kinase-related mutations are frequently mutually exclusive and occur later. The ability to dissect clonal architecture at the single-cell level has enabled the identification of early resistant clones to tyrosine kinase inhibitors which showed variable evolution patterns not always predictable by bulk sequencing⁴.

Dissection of TME - The dynamic interactions between leukemic cells and infiltrating immune cells constitutes a critical balance between immune evasion and immune rejection of malignant cells. For example, tumor neoepitope expression may induce an antigen-specific adaptive immune response capable of clearing tumor cells^{17,18}. Several sc-seq studies of the tumor microenvironment have highlighted tumor-specific T cell activity against tumor-derived neoepitopes resulting from somatic nonsynonymous and gene fusions in B-ALL¹². Moreover, an effective anti-tumor adaptive immune response may rely on a permissive cellular microenvironment, for example the presence of non-classical monocytes in B-ALL has been demonstrated to correlate with non-responsiveness to blinatumomab infusion¹².

In conclusion, although there are still challenges, including high cost and throughput, the promising results so far generated suggest that moving forward sc-seq will become an integral part of the genetic workup of AL and will implement current approaches for monitoring measurable residual disease and detect early relapse clones.

Bibliografia

- 1 Arber, D. A. *et al.* International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* **140**, 1200-1228, doi:10.1182/blood.2022015850 (2022).
- 2 Duncavage, E. J. *et al.* Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **140**, 2228-2247, doi:10.1182/blood.2022015853 (2022).
- 3 Iacobucci, I., Witkowski, M. T. & Mullighan, C. G. Single-cell analysis of acute lymphoblastic and lineage-ambiguous leukemia: approaches and molecular insights. *Blood* **141**, 356-368, doi:10.1182/blood.2022016954 (2023).
- 4 Ediriwickrema, A., Gentles, A. J. & Majeti, R. Single-cell genomics in AML: extending the frontiers of AML research. *Blood* **141**, 345-355, doi:10.1182/blood.2021014670 (2023).
- 5 Montefiori, L. E. *et al.* Enhancer Hijacking Drives Oncogenic BCL11B Expression in Lineage-Ambiguous Stem Cell Leukemia. *Cancer Discov* **11**, 2846-2867, doi:10.1158/2159-8290.CD-21-0145 (2021).
- 6 Stoeckius, M. *et al.* Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods* **14**, 865-868, doi:10.1038/nmeth.4380 (2017).
- 7 Brady, S. W., Roberts, K. G. & Gu, Z. The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **In press** (2022).
- 8 van Galen, P. *et al.* Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity. *Cell* **176**, 1265-1281 e1224, doi:10.1016/j.cell.2019.01.031 (2019).
- 9 Khabirova, E. *et al.* Single-cell transcriptomics reveals a distinct developmental state of KMT2A-rearranged infant B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*, doi:10.1038/s41591-022-01720-7 (2022).
- 10 Zeng, A. G. X. *et al.* A cellular hierarchy framework for understanding heterogeneity and predicting drug response in acute myeloid leukemia. *Nat Med* **28**, 1212-1223, doi:10.1038/s41591-022-01819-x (2022).
- 11 Meyers, S. *et al.* Monitoring of Leukemia Clones in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia at Diagnosis and During Treatment by Single-cell DNA Amplicon Sequencing. *Hemasphere* **6**, e700, doi:10.1097/HS9.0000000000000700 (2022).
- 12 Zhao, Y. *et al.* Tumor-intrinsic and -extrinsic determinants of response to blinatumomab in adults with B-ALL. *Blood* **137**, 471-484, doi:10.1182/blood.2020006287 (2021).

- 13 Lasry, A. *et al.* An inflammatory state remodels the immune microenvironment and improves risk stratification in acute myeloid leukemia. *Nat Cancer* **4**, 27-42, doi:10.1038/s43018-022-00480-0 (2023).
- 14 Witkowski, M. T. *et al.* Extensive Remodeling of the Immune Microenvironment in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **37**, 867-882 e812, doi:10.1016/j.ccell.2020.04.015 (2020).
- 15 Morita, K. *et al.* Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. *Nat Commun* **11**, 5327, doi:10.1038/s41467-020-19119-8 (2020).
- 16 Miles, L. A. *et al.* Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2864-x (2020).
- 17 Ward, J. P., Gubin, M. M. & Schreiber, R. D. The Role of Neoantigens in Naturally Occurring and Therapeutically Induced Immune Responses to Cancer. *Adv Immunol* **130**, 25-74, doi:10.1016/bs.ai.2016.01.001 (2016).
- 18 Blass, E. & Ott, P. A. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Clin Oncol* **18**, 215-229, doi:10.1038/s41571-020-00460-2 (2021).

La malattia residua minima: alla ricerca della singola cellula leucemica

Marco Zecca

SC Ematologia 2 - Oncoematologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

La moderna polichemioterapia e l'adozione di protocolli personalizzati e adattati al rischio di recidiva di ciascun singolo paziente hanno rivoluzionato la gestione della leucemia linfoblastica acuta (LLA) del bambino, trasformando questa malattia storicamente fatale in una patologia curabile in oltre l'85% dei bambini.

Sebbene negli adulti affetti dal LLA i risultati continuano a essere inferiori rispetto ai bambini, l'adozione di una chemioterapia intensiva di ispirazione pediatrica nel trattamento dei giovani adulti (< 40 anni di età) affetti da LLA ha migliorato in modo significativo anche in questo gruppo di pazienti la sopravvivenza globale, con tassi di sopravvivenza che si avvicinano al 65-75%. Inoltre, le nuove immunoterapie, come il blinatumomab, un engager bi-specifico per i linfociti T ed i blasti leucemici CD19+, l'impiego di anticorpi monoclonali coniugati con tossine (ad esempio l'anticorpo anti-CD22 inotuzumab ozogamicin) e le terapie con recettori chimerici (CAR-T), offrono nuove opzioni terapeutiche per i pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta a precursori B.

In parallelo con l'espansione dell'armamentario terapeutico, un'accurata stratificazione del rischio in momenti predefiniti è importante per fornire un trattamento ottimale e migliorare l'outcome nei pazienti affetti da leucemia.

Al termine della polichemioterapia di induzione la maggior parte dei pazienti raggiunge una remissione morfologica completa di malattia. Tuttavia, la valutazione della risposta deve essere ulteriormente precisata dalla valutazione della malattia minima misurabile, non rilevata morfologicamente (nota anche come malattia residua minima, MRD). Questa valutazione laboratoristica si associa in modo forte e indipendente al rischio di recidiva e all'outcome clinico nei pazienti affetti da LLA.

La MRD è inserita nei protocolli di trattamento della LLA in età pediatrica ormai da oltre 15 anni e viene inclusa sempre più spesso anche nei protocolli di chemioterapia per LLA, adattati al rischio, nelle popolazioni adulte, dove può indirizzare utilmente le scelte terapeutiche, andando ad identificare i pazienti a più alto rischio di ricaduta, che potrebbero beneficiare di nuovi approcci terapeutici e/o del trapianto allogenico di cellule ematopoietiche (TCSE), o i pazienti con malattia chemiosensibile a basso rischio di ricaduta che non hanno necessità di un trapianto o che potrebbero ricevere trattamenti meno intensi e con una minore tossicità. L'importanza prognostica della MRD nella LLA

dell'adulto è stata ora dimostrata sia negli adulti più giovani (< 40 anni), sia in quelli più anziani (> 40 anni).

La MRD può essere definita come leucemia misurabile in un campione che è privo di cellule leucemiche alla valutazione morfologica al microscopio ottico.

Si stima che alla diagnosi un paziente presenti 10^{12} blasti leucemici (un trilione) nel midollo osseo. La valutazione morfologica al microscopio ottico ha un potere di risoluzione che raggiunge al massimo l'1% di blasti. Pertanto, la MRD rappresenta teoricamente tutto ciò che è inferiore all'1% di blasti leucemici nel midollo osseo. In realtà, nella normale pratica clinica, la MRD viene utilizzata per descrivere qualsiasi leucemia rilevabile al di sotto della definizione tradizionale di remissione morfologica del 5% di blasti (valutazione mediante microscopia ottica). Tuttavia, poiché i test di rilevamento della MRD sono diventati, nel corso del tempo, sempre più sensibili, è generalmente riconosciuto che un test appropriato per il rilevamento della MRD, in particolare nella leucemia linfoblastica acuta, dovrebbe essere validato e riproducibile a una soglia di sensibilità di almeno 1×10^{-4} , ovvero di almeno lo 0,01% di cellule leucemiche nel midollo osseo.

Il concetto fondamentale alla base dell'interpretazione della MRD è semplice: la rapidità di riduzione del carico di malattia e di scomparsa delle cellule leucemiche dal midollo osseo, in risposta alla chemioterapia somministrata, ha un valore prognostico estremamente importante e rappresenta una misura del rischio di ricaduta di ciascun singolo paziente.

La MRD è quindi il più affidabile parametro per predire il rischio di recidiva e la probabilità di sopravvivenza a lungo termine negli adulti e nei bambini affetti LLA.

Per quasi tutti i pazienti affetti da LLA esiste un metodo affidabile per valutare la MRD, che può essere misurata utilizzando la citometria a flusso, la PCR quantitativa per rilevare specifici trascritti di fusione o riarrangiamenti del gene del recettore delle immunoglobuline o, più recentemente, metodiche basate sul *next generation sequencing* (NGS).

Sebbene negli ultimi anni, grazie alla sua elevata sensibilità, rapidità e riproducibilità, si sia iniziato ad impiegare le tecnologie NGS non solo a scopo di ricerca, ma anche nella pratica clinica quotidiana, in realtà il significato clinico di livelli di MRD molto bassi determinabili con NGS (< 1×10^{-4}) non è stato ancora completamente definito.

Con l'aumento della sensibilità, riproducibilità e facilità di utilizzo dei test di rilevamento della MRD e l'ingresso nello sviluppo clinico di nuove terapie, il futuro della terapia delle leucemie utilizzerà sempre più la MRD come criterio per intensificare o modificare la terapia per prevenire le ricadute o per ridurre la morbilità e la mortalità legate al trattamento.

Bibliografia

1. Pui CH, Evans WE. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2013;50(3):185-196.
2. Sive JI, Buck G, Fielding A, et al. Outcomes in older adults with acute lymphoblastic leukaemia (ALL): results from the international MRC UKALL XII/ECOG2993 trial. *Br J Haematol.* 2012;157(4):463-471.
3. Bartram J, Wade R, Vora A, et al. Excellent outcome of minimal residual disease-defined low-risk patients is sustained with more than 10 years follow-up: results of UK paediatric acute lymphoblastic leukaemia trials 1997-2003. *Arch Dis Child.* 2016;101(5):449-454.
4. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood.* 2008;111(12):5477-5485.
5. Vora A, Goulden N, Wade R, et al. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(3):199-209.
6. Bassan R, Bruggemann M, Radcliffe HS, Hartfield E, Kreuzbauer G, Wetten S. A systematic literature review and meta-analysis of minimal residual disease as a prognostic indicator in adult B- cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2019;104(10):2028-2039.
7. van Dongen JJ, van der Velden VH, Bruggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood.* 2015;125(26):3996-4009.
8. Chen X, Wood BL. How do we measure MRD in ALL and how should measurements affect decisions. Re: ireatment and prognosis? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2017;30(3):237-248.
9. Ladetto M, Bruggemann M, Monitillo L, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia.* 2014;28(6):1299-1307.
10. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2017;129(3):347-357.
11. Shaver AC, Seegmiller AC. B lymphoblastic leukemia minimal residual disease assessment by flow cytometric analysis. *Clin Lab Med.* 2017;37(4):771-785.
12. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26(9):1908-1975.

13. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26(9):1986-2010.
14. van der Velden VH, Hoogeveen PG, Pieters R, van Dongen JJ. Impact of two independent bone marrow samples on minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2006;133(4):382-388.
15. Pedreira CE, Costa ES, Lecrevisse Q, van Dongen JJ, Orfao A, EuroFlow Consortium. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):415-425.
16. Ansuinelli M, Della Starza I, Lauretti A, et al. Applicability of droplet digital polymerase chain reaction for minimal residual disease monitoring in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Hematol Oncol*. 2021;39(5):680-686.
17. Coccaro N, Anelli L, Zagaria A, et al. Droplet digital PCR is a robust tool for monitoring minimal residual disease in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Diagn*. 2018;20(4):474-482.
18. van der Velden VH, van Dongen JJ. MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2009;538:115-150.
19. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21(4):604-611.
20. Muffly L, Sundaram V, Chen C, et al. Concordance of peripheral blood and bone marrow measurable residual disease in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv*. 2021;5(16):3147-3151.
21. Sala Torra O, Othus M, Williamson DW, et al. Next-generation sequencing in adult B cell acute lymphoblastic leukemia patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(4):691-696.
22. Holowiecki J, Krawczyk-Kulis M, Giebel S, et al. Status of minimal residual disease after induction predicts outcome in both standard and high-risk Ph-negative adult acute lymphoblastic leukaemia. The Polish Adult Leukemia Group ALL 4-2002 MRD study. *Br J Haematol*. 2008;142(2):227-237.
23. Bruggemann M, Raff T, Flohr T, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;107(3):1116-1123.

24. Berry DA, Zhou S, Higley H, et al. Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2017;3(7):e170580.
25. Brown PA, Shah B, Advani A, et al. Acute lymphoblastic leukemia, Version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2021;19(9):1079-1109.
26. Raff T, Gokbuget N, Luschen S, et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. *Blood.* 2007;109(3):910-915.
27. Stock W, Johnson JL, Stone RM, et al. Dose intensification of daunorubicin and cytarabine during treatment of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Cancer and Leukemia Group B study 19802. *Cancer.* 2013;119(1):90-98.
28. Gokbuget N, Dombret H, Bonifacio M, et al. Blinatumomab for minimal residual disease in adults with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2018;131(14):1522-1531.
29. Kotrova M, Koopmann J, Trautmann H, et al. Prognostic value of low-level MRD in adult acute lymphoblastic leukemia detected by low- and high-throughput methods. *Blood Adv.* 2022;6(10):3006-3010.
30. Short NJ, Kantarjian HM, Patel K, et al. Ultrasensitive next-generation sequencing-based measurable residual disease assessment in Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia after frontline therapy: correlation with flow cytometry and impact on clinical outcomes. *Blood.* 2020;136(Suppl 1):26-28.
31. Short NJ, Jabbour E, Sasaki K, et al. Impact of complete molecular response on survival in patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2016;128(4):504-507.
32. Bader P, Salzmann-Manrique E, Balduzzi A, et al. More precisely defining risk peri-HCT in pediatric ALL: pre- vs post-MRD measures, serial positivity, and risk modeling. *Blood Adv.* 2019;3(21):3393-3405.
33. Logan AC, Vashi N, Faham M, et al. Immunoglobulin and T cell receptor gene high-throughput sequencing quantifies minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia and predicts post-transplantation relapse and survival. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(9):1307-1313.
34. Baron F, Labopin M, Ruggeri A, et al. Impact of detectable measurable residual disease on umbilical cord blood transplantation. *Am J Hematol.* 2020;95(9):1057-1065.

35. Yoon JH, Min GJ, Park SS, et al. Minimal residual disease- based long-term efficacy of reduced-intensity conditioning versus myeloablative conditioning for adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2019;125(6):873-883.

Studi omici nelle neuroscienze: dalla trascrittomico tissutale al single cell

Cristina Cereda

Head of Center of Functional Genomics and Rare diseases
Dept. of Pediatrics Buzzi Children's Hospital, Milan, Italy

Nell'ultimo decennio, l'RNA sequencing (RNA-Seq) è diventato uno strumento fondamentale e indispensabile per l'analisi del trascrittoma cellulare, per rilevare la presenza e la quantità di RNA in un campione biologico in un dato momento. La comprensione del trascrittoma, a partire da un tessuto o una popolazione cellulare, risulta essenziale per definire il profilo di espressione genica, per interpretare gli elementi funzionali e regolatori del genoma, per chiarire la determinazione del destino cellulare, per analizzare le differenti specie di trascritti tra cui gli RNA regolatori (piccole e lunghe molecole di RNA non codificante). Inoltre, come viene spiegato in dettaglio nella review di R. Stark et al., l'RNA-Seq consente sia di rivelare fusioni geniche e modifiche post-trascrizionali tra cui lo splicing alternativo, sia di quantificare i livelli di espressione di ciascun trascritto durante lo sviluppo e/o in condizioni patologiche [1]. L'RNA-Seq, dunque, rappresenta uno strumento efficace per comprendere i meccanismi molecolari delle malattie che coinvolgono il sistema nervoso, e non solo, aprendo la strada allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

Lo sviluppo della trascrittomico tissutale è stato guidato sia da innovazioni nelle tecniche di laboratorio che computazionali, consentendo una visione più ricca dell'analisi del trascrittoma rispetto a quanto era possibile fare in precedenza con metodi basati sul microarray. Ad oggi, sono quasi 100 le metodiche che sono state implementate a partire dal protocollo standard di sequenziamento dell'RNA, incluse le più recenti single celle spatial RNA Sequencing.

Come viene ampiamente descritto nella review di X. Li e C.-Y. Wang, l'RNA-Seq, definito bulk RNA-Seq, prevede il sequenziamento del solo RNA codificante o dell'intero trascrittoma, il quale include tutte le specie di RNA (codificante e non codificante, con deplezione del ribosomiale). La tecnica più frequentemente utilizzata è il sequenziamento in single-end che si focalizza sui geni differenzialmente espressi per comprendere i meccanismi molecolari implicati nei vari stadi di malattia. Si tratta di una metodica, che consente un'analisi rapida e concentrata in gran parte solo sull'RNA messaggero. Al contrario, il paired-end è meno utilizzato, ma è finalizzato all'ottenimento di ulteriori conoscenze come lo splicing alternativo, mutazioni puntiformi, trascritti nascenti e l'analisi di RNA non codificanti [2].

A causa dell'elevato tasso di falsi positivi e della bassa sensibilità di rilevare determinati trascritti, il potenziale diagnostico di queste scoperte non è stato ancora pienamente applicato in ambito clinico. Sebbene recentemente siano stati fatti notevoli progressi per oltrepassare questi limiti mediante nuovi algoritmi computazionali come il cosiddetto Data enriched Precise Statistical fusion detection (DEEPEST), i dati di RNA-Seq rappresentano una media dell'espressione genica di un insieme di popolazioni cellulari e per questo motivo possono mascherare le tendenze trascrizionali di singole sottopopolazioni. Infatti, i campioni di RNA sono spesso derivati da una popolazione di cellule diverse, isolate dall'intero cervello o da una specifica regione del sistema nervoso centrale, rendendo difficile l'identificazione dei cambiamenti trascrittomici [3]. In questo contesto, il sequenziamento dell'RNA su singola cellula o scRNA-Seq ha dimostrato di oltrepassare questo limite, offrendo opportunità senza precedenti per l'esplorazione dei profili di espressione genica con una risoluzione su singola cellula. Ogni cellula è infatti unica con alterazioni distinte, regolazioni trascrizionali e modificazioni epigenetiche, cambiamenti che si riflettono a livello di RNA.

Sin dalla sua introduzione nel 2009, il scRNA-Seq ha aperto nuovi orizzonti per indagare la diversità trascrizionale a livello di singola cellula e dunque l'eterogeneità cellulare, attraverso l'implementazione di nuove tecnologie efficienti. Tali progressi tecnici hanno permesso la scoperta di nuovi tipi cellulari, la caratterizzazione di variazioni all'interno delle cellule come interazione genica, espressione allelica e nuovi RNA. La grande quantità delle nuove informazioni ottenute ha permesso di incrementare la nostra comprensione della regolazione genica e dell'eterogeneità cellulare in contesti sia fisiologici che patologici[4].

Ad oggi, tutti i metodi di scRNA-Seq si basano sulla preparazione cellulare e delle librerie di sequenziamento, suddivise in sei fasi principali: 1) preparazione di una sospensione a singola cellula, 2) valutazione della vitalità cellulare, 3) rimozione delle cellule non vitali (gradiente di densità o FACS), 4) isolamento e cattura delle singole cellule, 5) retrotrascrizione in cDNA, e 6) sequenziamento.

Dunque, come riportato da A. A. Kolodziejczyk et al., lo step chiave del scRNA-Seq è l'isolamento e la cattura, che a seconda della tecnica scelta può avvenire in modo diverso, delle singole cellule [5]. Le tecnologie basate sulla microfluidica, come Chromium o inDrop, incapsulano singole cellule all'interno di goccioline di acqua in olio insieme a primer unici attaccati alla superficie delle microparticelle e al tampone di lisi. Quindi, il contenuto di mRNA di ciascuna cellula lisata viene catturato dal dominio di coda poli-A di un singolo primer ed etichettato con UMI e barcode specifici della cellula.

Il sistema 10X Genomics Chromium ha innescato una rapida adozione di questa tecnologia che è ora ampiamente applicata alla ricerca traslazionale e clinica. Questa metodica offre infatti una soluzione

integrata e completa per l'analisi rapida dei profili di espressione genica fino a 20.000 cellule in un unico saggio. È costituito da un Chromium controller o Chromium X per la partizione delle singole cellule, un Chromium connect per la preparazione in automazione delle librerie, e da diversi software e tools per l'analisi dei dati. La tecnologia di base della piattaforma 10X su single cell, citata in precedenza, consiste nella capacità di generare centinaia di migliaia di microgocce di cellule singole, chiamate GEM, su un chip microfluidico. Ogni microgoccia contiene una singola cellula, una miscela per la trascrizione inversa e una microsfera di gel coniugata con milioni di sequenze di oligonucleotidi da 80 coppie di basi. Ogni sequenza di oligo comprende (1) un adattatore i7 per il sequenziamento su piattaforma Illumina®, (2) un barcode specifico per la singola cellula con lo scopo di identificare tutti i trascritti appartenenti alla stessa cellula, (3) un tag molecolare univoco (UMI) specifico del trascritto per identificare i duplicati di PCR, e (4) una coda poli-T utilizzata per la cattura e l'amplificazione del 3'di ciascun trascritto. Durante la preparazione della libreria di sequenziamento, le molecole di cDNA vengono anche contrassegnate con indici specifici del campione che consentono il multiplexing, e dunque il sequenziamento di un pool di campioni nella stessa corsa.

Bibliografia

- [1]R. Stark, M. Grzelak, e J. Hadfield, «RNA sequencing: the teenage years», *Nat Rev Genet*, vol. 20, fasc. 11, pp. 631–656, nov. 2019, doi: 10.1038/s41576-019-0150-2.
- [2]X. Li e C.-Y. Wang, «From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing», *Int J Oral Sci*, vol. 13, fasc. 1, p. 36, dic. 2021, doi: 10.1038/s41368-021-00146-0.
- [3]A. Kulkarni, A. G. Anderson, D. P. Merullo, e G. Konopka, «Beyond bulk: a review of single cell transcriptomics methodologies and applications», *Curr Opin Biotechnol*, vol. 58, pp. 129–136, ago. 2019, doi: 10.1016/j.copbio.2019.03.001.
- [4]Y. H. Choi e J. K. Kim, «Dissecting Cellular Heterogeneity Using Single-Cell RNA Sequencing», *Mol Cells*, vol. 42, fasc. 3, pp. 189–199, mar. 2019, doi: 10.14348/molcells.2019.2446.
- [5]A. A. Kolodziejczyk, J. K. Kim, V. Svensson, J. C. Marioni, e S. A. Teichmann, «The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing», *Molecular Cell*, vol. 58, fasc. 4, pp. 610–620, mag. 2015, doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.005.

Identificazione di nuovi meccanismi molecolari alla base dell'evoluzione leucemica delle neoplasie mieloidi mediante approcci di single-cell multiomics

Rossella Manfredini

Centro di Medicina Rigenerativa "S. Ferrari", Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze.

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) sono disordini clonali originati dall'acquisizione seriale di mutazioni somatiche nelle cellule staminali/progenitori ematopoietici.

Le principali entità cliniche delle MPN Philadelphia-negative¹ sono rappresentate dalla policitemia vera (PV), dalla trombocitemia essenziale (ET) e dalla mielofibrosi primaria (PMF), che sono causate da mutazioni driver che interessano i geni JAK2, MPL o CALR².

La progressione della malattia è correlata all'evoluzione molecolare e clonale. PV ed ET possono progredire in mielofibrosi secondaria (sMF), ma possono anche evolvere in leucemiamieloide acuta secondaria (sAML). La PMF è associata alla più alta frequenza di trasformazione leucemica, che rappresenta la principale causa di morte³. La sAML è associata a una prognosi infausta e a caratteristiche cliniche e molecolari che differiscono da quelle della LMA de novo⁴.

Gli studi genomici a singola cellula forniscono informazioni nuove e accurate sull'architettura clonale e sull'ordine di acquisizione delle mutazioni, consentendo la ricostruzione delle dinamiche clonali e degli eventi molecolari che accompagnano la trasformazione leucemica. La genomica single-cell è stata ampiamente utilizzata per descrivere l'eterogeneità molecolare all'interno delle popolazioni di cellule neoplastiche, poiché è in grado di rilevare mutazioni specifiche all'interno di ciascuna cellula. Data la natura clonale delle neoplasie ematologiche, le tecnologie single-cell rappresentano potenti mezzi per descrivere l'eterogeneità molecolare delle singole cellule e per ottenere un quadro dettagliato dei meccanismi molecolari coinvolti nell'insorgenza e nella progressione della malattia⁵.

L'analisi genomica single-cell è uno strumento fondamentale per rilevare alterazioni geniche che portano alla trasformazione leucemica in una piccolissima frazione cellulare della fase cronica di malattia, che non possono essere rilevate dall'NGS diagnostico in bulk⁶.

In un lavoro recentemente pubblicato dal nostro gruppo siamo stati in grado di identificare mediante l'analisi genomica di singole cellule CD34+ un piccolo clone recante la mutazione FLT3-TKD nella fase cronica della malattia, che non era stata rivelata dall'NGS diagnostico in bulk nello stesso

paziente. L'espansione di questo clone durante la progressione della malattia è stata responsabile della trasformazione leucemica e quindi il suo rilevamento precoce avrebbe potuto essere di grande rilievo per il management clinico⁷. In linea con le nostre osservazioni, Guess e colleghi hanno confermato l'alta risoluzione della genomica a singola cellula definendo gli eventi molecolari associati all'evoluzione leucemica in una coorte ristretta di pazienti affetti da Sindrome Mielodisplastica (MDS). In 3/18 pazienti studiati, la trasformazione leucemica è stata associata all'espansione di un clone il cui profilo molecolare è stato identificato solo in poche cellule nella fase cronica della malattia⁸.

Nel complesso, l'analisi genomica single-cell consente di ricostruire l'ordine di acquisizione mutazionale, definire l'architettura clonale della popolazione neoplastica e identificare le dinamiche clonali associate alla trasformazione leucemica.

Ordine di Acquisizione delle mutazioni

Le mutazioni patogenetiche che colpiscono i rimodellatori epigenetici DNMT3A, TET2, ASXL1 e IDH1/2 (definite collettivamente mutazioni DTAI) sono tra le varianti più frequentemente rilevate e sono state spesso identificate come l'evento mutazionale iniziale⁶. Questa osservazione implica che le mutazioni DTAI sono spesso responsabili dell'insorgenza dell'ematopoiesi clonale (Clonal Hematopoiesis, CH), come suggerito dal fatto che sono gli eventi più frequenti negli individui anziani sani che presentano questa condizione⁹.

Le mutazioni nei geni coinvolti nella trasduzione del segnale o le varianti di TP53 sono invece molto frequenti nei pazienti MPN e MDS che subiscono l'evoluzione sAML.

L'analisi genomica single-cell di campioni accoppiati di 18 pazienti con MDS evoluti in sAML ha dimostrato che le mutazioni di TP53 sono state rilevate sia nel clone fondatore che nel clone dominante. Ciò era in linea con il sequenziamento dell'intero genoma in bulk, che è in grado di rilevare varianti di TP53 in entrambi i campioni MDS e AML^{8,10}. Pertanto, la mutazione di TP53 può rappresentare un evento mutazionale precoce nei pazienti affetti da MDS.

Studi single-cell che coinvolgono sia MPN che MDS hanno dimostrato che le mutazioni che interessano i geni di segnalazione sono subclonali, vengono acquisite in uno stadio successivo della malattia e sono solitamente rilevate nei cloni responsabili della trasformazione leucemica^{6,7}.

Inoltre, le mutazioni dei fattori di splicing e delle coesine sono frequentemente associate a sAML e spesso si verificano come eventi secondari in cloni che già portano varianti dei rimodellatori della cromatina^{7,10}.

Architettura Clonale

L'architettura clonale è l'immagine statica dei sottoclone neoplastici in un dato momento ed è definita dalla loro gerarchia e relativa abbondanza.

L'architettura clonale non può essere prevista sulla base della Variant Allele Frequency (VAF) proveniente dall'analisi in bulk, ma deve essere definita da tecniche genomiche a singola cellula.

La genomica a singola cellula discrimina tra cloni geneticamente diversi in una popolazione eterogenea, come dimostrato da Miles e colleghi, che hanno studiato 146 campioni di 123 pazienti tra cui CH, MPN e AML. Gli autori hanno osservato una maggiore complessità clonale nei campioni AML, in particolare in pazienti con mutazione FLT3 o RAS, rispetto a CH e MPN, in linea con i risultati di altri autori ^{6,7}.

Sono stati descritti due modelli di architettura clonale: 1. lineare, quando le mutazioni vengono acquisite da un comune antenato mutato in modo graduale, o 2. ramificata, quando le cellule subiscono un'evoluzione divergente parallela rispetto al capostipite mutato.

Le mutazioni dei rimodellatori della cromatina e modificatori epigenetici si verificano spesso contemporaneamente all'interno del clone dominante, suggerendo un loro coinvolgimento nella definizione della fitness del clone.

Viceversa le mutazioni in geni del pathway di RAS possono essere trovate nello stesso paziente ma raramente nello stesso clone, generando così un'architettura clonale ramificata ^{6,10}.

Dinamica clonale

L'approccio genomico a singola cellula è principalmente impiegato per studiare complesse gerarchie clonali e caratterizzare rare alterazioni genetiche che portano alla resistenza ai trattamenti farmacologici e alla progressione della malattia. In particolare, le dinamiche clonali sono definite dall'evoluzione clonale, cioè dal cambiamento dell'architettura clonale nel tempo. L'analisi dei modelli di evoluzione clonale è la chiave per comprendere la progressione a sAML, poiché il clone dominante che guida la trasformazione leucemica è solitamente molto piccolo o assente nella fase cronica della malattia. Le mutazioni dei modificatori epigenetici sono principalmente associate a un'evoluzione statica nella transizione tra MPN e sAML. Al contrario, le mutazioni nei signaling genes e le varianti patogenetiche di TP53 sono frequentemente associate a un'evoluzione dinamica, in accordo con il ruolo fondamentale che svolgono nell'insorgere della trasformazione leucemica ^{8,10}. Come descritto in precedenza, le mutazioni della via RAS insorgono per lo più in modo

indipendente, generando così diversi cloni maligni con vari gradi di fitness ^{6,8,10}.

L'evoluzione dinamica può anche essere provocata da un trattamento terapeutico. Ad esempio, il trattamento con inibitori FLT3 su pazienti affetti da AML può indurre l'eradicazione del clone mutato FLT3, aprendo la strada ad altri cloni resistenti alla terapia che otterranno un vantaggio proliferativo dopo la selezione clonale ⁶.

Trascrittomica single-cell

Negli ultimi decenni, l'analisi trascrittomica in bulk ha permesso l'identificazione di meccanismi molecolari che concorrono all'insorgenza e all'evoluzione della MPN, inclusa l'espressione alterata di RNA non codificanti ¹¹.

È ora chiaro che le cellule neoplastiche nelle MPN comprendono numerosi cloni con diverse signatures di mutazione. L'elevata eterogeneità genomica all'interno della popolazione di cellule neoplastiche correlata con le modificazioni funzionali delle cellule.

La trascrittomica single-cell consente di districare questa complessità mediante l'individuazione di clusters cellulari distinti in base al loro profilo di espressione genica. Questo approccio può descrivere i meccanismi molecolari responsabili dell'insorgenza e dell'evoluzione della malattia che potrebbero essere provocati da specifici eventi mutazionali. Il single-cell RNA-sequencing di cellule staminali/progenitori di pazienti con MF (JAK2V617F o CALR mutati) e donatori sani (HD) ha permesso l'identificazione di clusters composti da cellule staminali e progenitrici appartenenti ai vari lineages ematopoietici. Rispetto alle cellule HD, i progenitori dei megacariociti MF (MKP) mostrano una maggiore espressione di geni megacariocitari, di geni correlati alla fibrosi e infiammazione, e geni del pathway dell'interferone ¹². Per mezzo della tecnica di TARGET-seq, Meira e colleghi hanno potuto identificare le correlazioni tra la firma molecolare di una singola cellula e il suo genotipo. Hanno analizzato il profilo trascrizionale di cellule staminali/progenitori di 8 pazienti con MF e 2 HD, dimostrando che le cellule JAK2V617F positive, sia omozigoti che eterozigoti, mostrano un'upregolazione dei geni coinvolti in pathways pro- infiammatori come TNF- α e TGF β , ma anche TP53, Wnt/ β -catenina, e segnalazione di hedgehog. ¹³.

In un lavoro recentemente pubblicato abbiamo studiato i meccanismi molecolari che guidano la trasformazione leucemica in un paziente con PMF che è evoluto in sAML mentre era in terapia con Ruxolitinib. L'analisi genomica ha rivelato che la trasformazione leucemica è stata sostenuta dall'espansione di cloni con mutazioni di TP53 e FLT3. Questo risultato è stato confermato dalla trascrittomica a singola cellula, che ha rivelato l'aumentata espressione di FLT3 e dei geni FLT3-

indotti nelle cellule della fase blastica. L'analisi delle trajectories ha rivelato che le cellule della fase blastica mostrano un fenotipo più primitivo rispetto alle cellule della fase cronica, arricchite in clusters cellulari più differenziati ⁷.

Nel loro complesso, questi studi hanno dimostrato che la trascrittomica single-cell consente l'identificazione di meccanismi molecolari responsabili dell'insorgenza e dell'evoluzione della malattia, che possono essere diversi da un paziente all'altro in base alla loro eterogeneità mutazionale.

Conclusioni

Lo sviluppo delle tecnologie NGS ha permesso di identificare un numero crescente di varianti genetiche all'interno dello stesso campione, consentendo di correlare l'evoluzione della malattia a specifiche mutazioni. Il principale svantaggio di questo approccio risiede nel fatto che viene eseguito in bulk, e quindi non permette di distinguere tra i diversi sottoclone che compongono la popolazione neoplastica.

Gli approcci single-cell offrono l'opportunità di districare questa complessità. Questo è di primaria importanza per comprendere i meccanismi molecolari che alla base dell'insorgenza e dell'evoluzione della malattia. Come dimostrato dai primi studi su singola cellula applicati ai casi di MPN evoluti in sAML, il contributo di ciascun sottoclone alla patogenesi e alla progressione della malattia è strettamente correlato alla sua signature molecolare. Gli approcci di sequenziamento in bulk che valutano la VAF di ciascuna mutazione non possono ricostruire con precisione l'architettura clonale della popolazione neoplastica e non riescono a rilevare piccoli clusters di cellule di rilevanza prognostica.

Gli studi genomici single-cell sono in grado di ricostruire con precisione l'ordine di acquisizione delle mutazioni e l'evoluzione clonale, consentendo l'identificazione di varianti geniche che eventualmente coesistono all'interno delle stesse cellule. Le informazioni fornite dagli studi genomici su singola cellula sono utili per chiarire come l'ordine di acquisizione delle mutazioni influisca sulle diverse manifestazioni fenotipiche delle MPNs, mentre saranno necessari studi funzionali per rivelare gli effetti fenotipici dell'acquisizione delle varianti.

Inoltre, gli studi single-cell possono rilevare rari cloni che progressivamente si espandono e guidano la trasformazione leucemica. Studi retrospettivi su piccole coorti di pazienti hanno dimostrato che questi cloni possono essere rilevati precocemente, anni prima della diagnosi di sAML, e forniscono la prima prova dei vantaggi diagnostici e prognostici dati dall'analisi single-cell.

Nei prossimi anni, l'estensione di questi risultati a coorti di pazienti più ampie rafforzerà queste

osservazioni, consentendo di discriminare il reale potere prognostico della genomica single-cell. L'identificazione precoce di piccoli subcloni caratterizzati dalla presenza di varianti patogenetiche note sarà utile in termini di stratificazione del rischio. Ad oggi, l'applicazione dell'analisi single-cell nella pratica clinica è principalmente limitata dagli alti costi dovuti alla necessità di strumenti all'avanguardia e di personale altamente qualificato, sia in wet-lab che nell'analisi dei dati.

La trascrittomica e la genomica single-cell consentono di superare i limiti dell'analisi in bulk e di descrivere eventi molecolari indotti da specifiche mutazioni geniche e combinazioni di varianti in popolazioni cellulari definite geneticamente o immunofenotipicamente.

Quando applicati allo studio di pazienti evoluti in sAML, gli studi su singola cellula hanno permesso l'identificazione di meccanismi molecolari che possono spiegare le caratteristiche biologiche del clone in espansione, come l'aumento della proliferazione, l'escape immunitario e la ridotta apoptosi o differenziazione.

Questi risultati aprono la strada a nuovi studi funzionali necessari per convalidare il ruolo della combinazione di varianti nella trasformazione leucemica. Sono state fornite anche le prime evidenze che suggeriscono una possibile selezione clonale indotta dal trattamento terapeutico, evidenziando la necessità di analizzare con più precisione i pathways responsabili della resistenza alla terapia.

La conoscenza derivante da studi single-cell sarà fondamentale per la dissezione dell'eterogeneità molecolare alla base dell'insorgenza e della progressione dell'MPN. Queste tecniche forniscono informazioni molecolari accurate e specifiche, restituendo al tempo stesso un quadro completo del cross-talk clonale.

Inoltre, l'identificazione di nuovi biomarcatori della progressione della malattia aiuterà a definire approcci terapeutici personalizzati che potrebbero contribuire a una migliore gestione delle MPNs, riducendo o prevenendo così il rischio di trasformazione leucemica.

Bibliografia

- 1 Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka H-M *et al.* International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood* 2022; **140**: 1200–1228.
- 2 Dupriez B, Morel P, Demory JL, Lai JL, Simon M, Plantier I *et al.* Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood* 1996; **88**: 1013–8.
- 3 Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and

management. *Am J Hematol* 2021; **96**: 145–162.

- 4 Granfeldt Østgård LS, Medeiros BC, Sengeløv H, Nørgaard M, Andersen MK, Dufva IH *et al.* Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. *Journal of Clinical Oncology* 2015; **33**: 3641–3649.
- 5 O’Sullivan JM, Mead AJ, Psaila B. Single-cell methods in myeloproliferative neoplasms - old questions, new technologies. *Blood* 2022. doi:10.1182/blood.2021014668.
- 6 Miles LA, Bowman RL, Merlinsky TR, Csete IS, Ooi AT, Durruthy-Durruthy R *et al.* Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature* 2020; **587**: 477–482.
- 7 Parenti S, Rontauroli S, Carretta C, Mallia S, Genovese E, Chiereghin C *et al.* Mutated clones driving leukemic transformation are already detectable at the single-cell level in CD34-positive cells in the chronic phase of primary myelofibrosis. *NPJ Precis Oncol* 2021; **5**: 4.
- 8 Guess T, Potts CR, Bhat P, Cartailier JA, Brooks A, Holt C *et al.* Distinct Patterns of Clonal Evolution Drive Myelodysplastic Syndrome Progression to Secondary Acute Myeloid Leukemia. *Blood Cancer Discov* 2022; **3**: 316–329.
- 9 Fabre MA, de Almeida JG, Fiorillo E, Mitchell E, Damaskou A, Rak J *et al.* The longitudinal dynamics and natural history of clonal haematopoiesis. *Nature* 2022; **606**: 335–342.
- 10 Messen AJ, Khanna A, Miller CA, Nonavinkere Srivatsan S, Chang GS, Shao J *et al.* Convergent Clonal Evolution of Signaling Gene Mutations Is a Hallmark of Myelodysplastic Syndrome Progression. *Blood Cancer Discov* 2022; **3**: 330–345.
- 11 Norfo R, Zini R, Pennucci V, Bianchi E, Salati S, Guglielmelli P *et al.* miRNA-mRNA integrative analysis in primary myelofibrosis CD34+ cells: role of miR-155/JARID2 axis in abnormal megakaryopoiesis. *Blood* 2014; **124**: e21–e32.
- 12 Psaila B, Wang G, Rodriguez-Meira A, Li R, Heuston EF, Murphy L *et al.* Single-Cell Analyses Reveal Megakaryocyte-Biased Hematopoiesis in Myelofibrosis and Identify Mutant Clone-Specific Targets. *Mol Cell* 2020; **78**: 477-492.e8.
- 13 Rodriguez-Meira A, Buck G, Clark S-A, Povinelli BJ, Alcolea V, Louka E *et al.* Unravelling Intratumoral Heterogeneity through High-Sensitivity Single-Cell Mutational Analysis and Parallel RNA Sequencing. *Mol Cell* 2019; **73**: 1292-1305.e8.

From single cells to single molecules: personalized medicine in AL amyloidosis

Mario Nuvolone

Department of Molecular Medicine, University of Pavia & Amyloidosis Research and Treatment Center, Foundation IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia.

Monoclonal gammopathies arise when one plasma cell or B cell, producing a specific antibody, undergoes a process of tumoral transformation, leading to the production of a population of identical cells (i.e. the plasma cell or B cell clone), all of which produce the same antibody (i.e. the monoclonal protein or M protein)¹⁻³. Each patient has a unique M protein, whose sequence can be used as a tumoral fingerprint to track the presence of the clone itself⁴.

About 5% of people aged 60 years display a circulating M protein produced by a usually small, poorly proliferating, clone^{5,6}. This figure further increases upon aging. While this condition is mostly indolent (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), every year about 1% of these subjects can become symptomatic, usually because of the development of a frankly malignant or bulky clone (multiple myeloma, MM, or Waldenström macroglobulinemia, WM)⁷. Occasionally, the cell clone remains small but its secreted M protein displays a sequence-dependent, pathologic behavior leading to often life-threatening organ damage (monoclonal gammopathies of clinical significance, MGCS)⁸⁻¹².

The prototype of MGCS is systemic immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis, where a usually small plasma cell (or B cell) clone secretes unstable light chains (most commonly of the λ isotype), which misfold and form systemic deposits of extra-cellular amyloid fibrils, exerting cytotoxicity, subverting tissue architecture, and eventually leading to potentially fatal (multi)-organ dysfunction¹³. M protein-related clinical manifestations can develop also in the context of multiple myeloma, Waldenström macroglobulinemia and other IgM-secreting monoclonal gammopathies, including light chain-driven cast nephropathy (myeloma kidney), IgM-related neuropathy, cold agglutinin disease and cryoglobulinemia⁸⁻¹².

The molecular mechanisms underlying AL amyloidosis and other M protein-driven clinical manifestations are poorly understood, mainly because of the limited number of clinically annotated, sequenced M proteins^{14,15}. Indeed, sequencing of expressed, recombined immunoglobulin genes is technically hampered by the lack of a priori knowledge of which gene fragments underwent V(D)J recombination to generate the expressed chains and by the presence of a high number of different B

cells or plasma cells producing different immunoglobulins, forming a polyclonal background within relevant biological samples^{16,17}.

Our laboratory has recently developed a novel, sensitive and accurate high-throughput methodology based on single molecule real-time DNA sequencing to unambiguously identify the full-length variable sequence of M protein genes in patients with monoclonal gammopathies. The assay, which was termed Single Molecule Real-Time Sequencing of the M protein (SMaRT M-Seq), has undergone an extensive technical validation demonstrating its accuracy, sensitivity and repeatability¹⁸. SMaRT M-Seq could identify the clonal light chain sequence from a large cohort of patients with AL amyloidosis analyzed in parallel, including also patients with negative M protein studies and very small plasma cell clonal burden¹⁸. SMaRT M-Seq could also be employed to improve amyloid typing through mass spectrometry of amyloid-laden tissues¹⁸. When used in combination with high throughput short read DNA sequencing, the assay enabled the detection of patient's specific, clonotypic sequencing with very high (10^{-7}) sensitivity, proving its potential utility for the sensitive detection of residual tumoral cells after therapy (minimal residual disease, MRD)¹⁸.

The possibility to reliably sequence large cohorts of patients with AL amyloidosis and MM enabled us to study the potential role N-glycosylation, a post-translational modification which was anecdotally reported in association with AL amyloidosis – especially in patients with a clonal light chain of the kappa isotype¹⁹⁻²¹ – and that more recently emerged as a potential risk factor for the development of AL amyloidosis in patients with a monoclonal gammopathy²²⁻²⁵.

By analyzing published and newly obtained amyloidogenic and control clonal light chain sequences and by combining bioinformatics, biochemical, proteomics, structural and genetic analyses, we identified an N-glycosylation hotspot in immunoglobulin κ light chains that is associated with AL amyloidosis²⁶. These data further support a potential role of N-glycosylation in determining the pathogenic behavior of a subset of amyloidogenic light chains and may help refine existing light chain-based prognostic assessments for patients with monoclonal gammopathies^{23,26-28}.

More recently, leveraging on the presence of circulating tumoral cells in patients with monoclonal gammopathies²⁹⁻³¹, we combined SMaRT M-Seq in the peripheral blood to sequence the circulating light chain repertoire with mass spectrometry-based analysis of the urinary proteome, enables the identification of the full-length clonal light chain sequence in most patients with monoclonal gammopathies without bone marrow studies³².

Overall, reliable, high-throughput sequencing of clonal immunoglobulin genes from large patient populations – even without the need of invasive bone marrow aspiration through a liquid biopsy approach – has the potential of deepening our mechanistic understanding of the pathophysiology of M protein-related clinical manifestations, as well as enabling the development of refined predictive

systems based on the M protein sequence. Moreover, at the individual patient level, the identification of clonotypic immunoglobulin sequences can empower personalized medicine approaches at diagnosis and during follow-up.

Bibliografia

- 1 Rajkumar, S. V., Dispenzieri, A. & Kyle, R. A. Monoclonal gammopathy of undetermined significance, Waldenstrom macroglobulinemia, AL amyloidosis, and related plasma cell disorders: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* **81**, 693-703, doi:10.4065/81.5.693 (2006).
- 2 van de Donk, N., Pawlyn, C. & Yong, K. L. Multiple myeloma. *Lancet* **397**, 410-427, doi:10.1016/S0140-6736(21)00135-5 (2021).
- 3 Castillo, J. J. & Treon, S. P. Management of Waldenstrom macroglobulinemia in 2020. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2020**, 372-379, doi:10.1182/hematology.2020000121 (2020).
- 4 Rustad, E. H. *et al.* Stability and uniqueness of clonal immunoglobulin CDR3 sequences for MRD tracking in multiple myeloma. *Am J Hematol* **94**, 1364-1373, doi:10.1002/ajh.25641 (2019).
- 5 Kyle, R. A., San-Miguel, J. F., Mateos, M. V. & Rajkumar, S. V. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* **28**, 775-790, doi:10.1016/j.hoc.2014.06.005 (2014).
- 6 Kyle, R. A. *et al.* Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* **354**, 1362-1369, doi:10.1056/NEJMoa054494 (2006).
- 7 Kyle, R. A. *et al.* Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* **378**, 241-249, doi:10.1056/NEJMoa1709974 (2018).
- 8 Merlini, G. & Stone, M. J. Dangerous small B-cell clones. *Blood* **108**, 2520-2530, doi:10.1182/blood-2006-03-001164 (2006).
- 9 Femand, J. P. *et al.* Monoclonal gammopathy of clinical significance: a novel concept with therapeutic implications. *Blood* **132**, 1478-1485, doi:10.1182/blood-2018-04-839480 (2018).
- 10 Leung, N., Bridoux, F. & Nasr, S. H. Monoclonal Gammopathy of Renal Significance. *N Engl J Med* **384**, 1931-1941, doi:10.1056/NEJMra1810907 (2021).
- 11 Castillo, J. J., Callander, N. S., Baljevic, M., Sborov, D. W. & Kumar, S. The evaluation and management of monoclonal gammopathy of renal significance and monoclonal gammopathy of neurological significance. *Am J Hematol* **96**, 846-853, doi:10.1002/ajh.26155 (2021).

- 12 Dispenzieri, A. Monoclonal gammopathies of clinical significance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2020**, 380-388, doi:10.1182/hematology.2020000122 (2020).
- 13 Merlini, G. *et al.* Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 38, doi:10.1038/s41572-018-0034-3 (2018).
- 14 Merlini, G. & Bellotti, V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med* **349**, 583-596, doi:10.1056/NEJMra023144 (2003).
- 15 Bellotti, V., Mangione, P. & Merlini, G. Review: immunoglobulin light chain amyloidosis--the archetype of structural and pathogenic variability. *J Struct Biol* **130**, 280-289, doi:10.1006/jsbi.2000.4248 (2000).
- 16 Perfetti, V. *et al.* Inverse polymerase chain reaction for cloning complete human immunoglobulin variable regions and leaders conserving the original sequence. *Anal Biochem* **239**, 107-109, doi:10.1006/abio.1996.0297 (1996).
- 17 Katoh, N. *et al.* A reappraisal of immunoglobulin variable gene primers and its impact on assessing clonal relationships between PB B cells and BM plasma cells in AL amyloidosis. *J Clin Immunol* **31**, 1029-1037, doi:10.1007/s10875-011-9582-y (2011).
- 18 Cascino, P. *et al.* Single-molecule real-time sequencing of the M protein: Toward personalized medicine in monoclonal gammopathies. *Am J Hematol* **97**, E389-E392, doi:10.1002/ajh.26684 (2022).
- 19 Dwulet, F. E., O'Connor, T. P. & Benson, M. D. Polymorphism in a kappa I primary (AL) amyloid protein (BAN). *Mol Immunol* **23**, 73-78, doi:10.1016/0161-5890(86)90173-2 (1986).
- 20 Stevens, F. J. Four structural risk factors identify most fibril-forming kappa light chains. *Amyloid* **7**, 200-211, doi:10.3109/13506120009146835 (2000).
- 21 Omtvedt, L. A. *et al.* Glycosylation of immunoglobulin light chains associated with amyloidosis. *Amyloid* **7**, 227-244, doi:10.3109/13506120009146437 (2000).
- 22 Kumar, S. *et al.* Assay to rapidly screen for immunoglobulin light chain glycosylation: a potential path to earlier AL diagnosis for a subset of patients. *Leukemia* **33**, 254-257, doi:10.1038/s41375-018-0194-x (2019).
- 23 Dispenzieri, A. *et al.* N-glycosylation of monoclonal light chains on routine MASS-FIX testing is a risk factor for MGUS progression. *Leukemia* **34**, 2749-2753, doi:10.1038/s41375-020-0940-8 (2020).
- 24 Mellors, P. W. *et al.* MASS-FIX for the detection of monoclonal proteins and light chain N-glycosylation in routine clinical practice: a cross-sectional study of 6315 patients. *Blood Cancer J* **11**, 50, doi:10.1038/s41408-021-00444-0 (2021).

- 25 Kourelis, T. *et al.* MASS-FIX may allow identification of patients at risk for light chain amyloidosis before the onset of symptoms. *Am J Hematol* **93**, E368-E370, doi:10.1002/ajh.25244 (2018).
- 26 Nevone, A. *et al.* An N-glycosylation hotspot in immunoglobulin kappa light chains is associated with AL amyloidosis. *Leukemia* **36**, 2076-2085, doi:10.1038/s41375-022-01599-w (2022).
- 27 Garofalo, M. *et al.* Machine learning analyses of antibody somatic mutations predict immunoglobulin light chain toxicity. *Nat Commun* **12**, 3532, doi:10.1038/s41467-021-23880-9 (2021).
- 28 Rawat, P., Prabakaran, R., Kumar, S. & Gromiha, M. M. Exploring the sequence features determining amyloidosis in human antibody light chains. *Sci Rep* **11**, 13785, doi:10.1038/s41598-021-93019-9 (2021).
- 29 Sidana, S. *et al.* Prognostic significance of circulating plasma cells by multi-parametric flow cytometry in light chain amyloidosis. *Leukemia* **32**, 1421-1426, doi:10.1038/s41375-018-0063-7 (2018).
- 30 Garces, J. J. *et al.* Circulating Tumor Cells for the Staging of Patients With Newly Diagnosed Transplant-Eligible Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* **40**, 3151-3161, doi:10.1200/JCO.21.01365 (2022).
- 31 Bertamini, L. *et al.* High Levels of Circulating Tumor Plasma Cells as a Key Hallmark of Aggressive Disease in Transplant-Eligible Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* **40**, 3120-3131, doi:10.1200/JCO.21.01393 (2022).
- 32 Nevone, A. *et al.* Bone marrow-free sequencing of M protein genes in monoclonal gammopathies. *Blood* **140**, 3 (2022).

Human endothelial stem/progenitor cells: past, present and future

David M. Smadja

Paris Cité University and European Georges Pompidou Hospital, Paris France

Ischemic vascular disease is a major cause of mortality and morbidity worldwide, and regeneration of blood vessels in perfusion-deficient tissues is a worthwhile therapeutic goal. The idea of delivering endothelial stem/progenitor cells to repair damaged vasculature, reperfuse hypoxic tissue, prevent cell death, and consequently diminish tissue inflammation and fibrosis has a strong scientific basis and clinical value (1). New blood vessel formation in adults was considered to result exclusively from sprouting of preexisting endothelial cells, a process referred to angiogenesis. Vasculogenesis, the formation of new blood vessels from endothelial progenitor cells, was thought to occur only during embryonic life. Discovery of adult endothelial progenitor cells (EPCs) in 1997 opened the door for cell therapy in vascular disease (2). Endothelial progenitor cells contribute to vascular repair and are now well established as postnatal vasculogenic cells in humans (3). Although preclinical studies have often been promising, results from clinical trials have been highly contradictory and served to highlight multiple challenges associated with disappointing therapeutic benefit. It is now admitted that endothelial colony-forming cells (ECFCs) are the vasculogenic subtype (4). ECFCs could be used as a cell therapy product and also as a liquid biopsy in several vascular diseases or as vector for gene therapy. However, despite a huge interest in these cells, their tissue and molecular origin is still unclear. Indeed, various labs have proposed endothelial stem/progenitor cell candidates. This has created confusion, as there are profound differences between these cell definitions based on isolation methodology, characterization, and reparative biology (5). Emerging evidence that disputes the classic view of the bone marrow as the source for these cells and supports the vascular wall as the niche for these tissue-resident endothelial stem cells is considered. We recently proposed that endothelial progenitor could come from very small embryonic-like stem cells (VSELs) isolated in human from CD133 (6) or CD34 positive cells (7). VSELs are small dormant stem cells related to migratory primordial germ cells (8,9). They have been described in bone marrow and other organs (10). This lecture discusses the reported findings from in vitro data and also preclinical studies that aimed to explore stem cells at the origin of vasculogenesis in human and then explore the potential use of ECFCs to promote newly formed vessels or serve as liquid biopsy to understand vascular pathophysiology and in particular pulmonary disease and hemostasis disorders.

Bibliografia

1. Silvestre JS, Smadja DM, Lévy BI. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiol Rev.* 2013 Oct;93(4):1743–802.
2. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997 Feb 14;275(5302):964–7.
3. Smadja DM. Vasculogenic Stem and Progenitor Cells in Human: Future Cell Therapy Product or Liquid Biopsy for Vascular Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1201:215–37.
4. Smadja DM, Melero-Martin JM, Eikenboom J, Bowman M, Sabatier F, Randi AM. Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *J Thromb Haemost JTH.* 2019 Jul;17(7):1190–4.
5. Chambers SEJ, Pathak V, Pedrini E, Soret L, Gendron N, Guerin CL, et al. Current concepts on endothelial stem cells definition, location, and markers. *Stem Cells Transl Med.* 2021 Nov;10 Suppl 2:S54–61.
6. Guerin CL, Loyer X, Vilar J, Cras A, Mirault T, Gaussem P, et al. Bone-marrow-derived very small embryonic-like stem cells in patients with critical leg ischaemia: evidence of vasculogenic potential. *Thromb Haemost.* 2015 May;113(5):1084–94.
7. Domingues A, Rossi E, Bujko K, Detriche G, Richez U, Blandinieres A, et al. Human CD34+ very small embryonic-like stem cells can give rise to endothelial colony-forming cells with a multistep differentiation strategy using UM171 and nicotinamide acid. *Leukemia.* 2022 Feb 15;
8. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Kucia M. Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs). *Circ Res.* 2019 Jan 18;124(2):208–10.
9. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Suszynska M, Miller DM, Kucia M, Shin DM. A Novel View of the Adult Stem Cell Compartment From the Perspective of a Quiescent Population of Very Small Embryonic-Like Stem Cells. *Circ Res.* 2017 Jan 6;120(1):166–78.
10. Basile DP, Yoder MC. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2014 Jan;229(1):10–6.

La biologia dei tessuti: nuovi approcci multidisciplinari

Stefano Piccolo

Università di Padova e IFOM.

Fundamental aspects of cell behaviour in living organisms - morphogenesis, collective migration and self-organization - are not genetically encoded but emergent properties of cells interconnected within a tissue network. Furthermore, most disease states either do not have a genetic origin, or, as is the case in cancer, are preceded or accompanied by a corruption of the tissue environment that fuels aberrant cell behaviour^{1,2}.

Our current knowledge on signaling pathways regulating gene expression, proliferation and fate decisions does not fully account for these emergent properties, failing to explain how these events are exquisitely localized in living tissues. Understanding the spatiotemporal control of cell behavior thus requires incorporation of information on how structural and architectural complexity of tissues is transmitted to their constituent cells.

YAP/TAZ, two highly related transcriptional regulators sense how cells, perceive themselves and their tissue environment and communicate with it. YAP/TAZ activity in a cell is under direct control of its shape and polarity, which is in turn dictated by the cytoskeletal structure³. Further, the tensional state and organization of the cytoskeleton reflect the local pattern of geometrical and mechanical strains associated with the position of the cell within the global 3D tissue architecture and surrounding stromal composition^{4,5,6}. These inputs are essentially physical, and include the pattern forces emanating from the cell's attachment to other cells and from the topology and rigidity of the extracellular matrix (ECM)⁶. YAP/TAZ convert such inputs into gene expression signatures and coherent, context-dependent biological responses^{3,7}.

YAP/TAZ shape organs during development, forge self-organization phenomena and adapt cell behavior to tissue needs, as in tissue repair or regeneration. When elements of this control fail or are imbalanced, abnormal YAP/TAZ activation causes multiple diseases. In my seminar, I will provide an emerging picture in which YAP/TAZ serve as nexus orchestrating the tissue ecosystem, allowing for cell and context-specific responses in the context of tissue regeneration, cancer and ageing. I will finally outline some exciting open issues in the burgeoning field of YAP/TAZ regulation and biology.

Technologically, integrating mechanical signals into tissue biology offers an exciting challenge, ideally addressed by the combination of new tools, including mapping ECM forces in tissue landscape, ECM organization, lineage tracing, single cell technologies, spatial transcriptomics and genetics.

Bibliografia

1. Bissell, M. J. & Hines, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* **17**, 320–329 (2011).
2. Hu, B. *et al.* Multifocal epithelial tumors and field cancerization from loss of mesenchymal CSL signaling. *Cell* **149**, 1207–1220 (2012).
3. Panciera, T., Azzolin, L., Cordenonsi, M. & Piccolo, S. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 758–770 (2017).
4. Vogel, V. & Sheetz, M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 265–275 (2006).
5. DuFort, C. C., Paszek, M. J. & Weaver, V. M. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 308–319 (2011).
6. Humphrey, J. D., Dufresne, E. R. & Schwartz, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 802–812 (2014).
7. Zanconato, F., Cordenonsi, M. & Piccolo, S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* **29**, 783–803 (2016).