

Titolo: Il trasferimento preferenziale dei mitocondri dalle cellule endoteliali alle cellule tumorali attraverso nanotubi a tunnel modula la chemioresistenza - Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance

Codice: MUT009

Autore: Pasquier et al.

Data: 2013

Rivista: Journal of Translational Medicine, 11: 94

Argomento: mutagenesi

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-94>

URL: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-11-94>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2022/03/30/MUT009>

Parole chiave: tunnel nanotubi, trasferimento intercellulare, cellule endoteliali, cellule tumorali, chemioresistenza

Tumore: colture cellulari di tumore al seno e cancro ovarico

Traduzione: Tradotte in modo fedele le sezioni “Riassunto”, “Contesto” e “Discussione”. Della sezione “Risultati” presentati solo i titoli dei tre paragrafi.

Punti di interesse

In questo studio in vitro è stata investigata la formazione di tunnel di nanotubi (TnT) in colture cellulari di cancro al seno, cancro ovarico, e cellule tipiche dello stroma tumorale ovvero di cellule mesenchimali e cellule endoteliali.

Lo stroma tumorale è tutto ciò che è presente all'interno di un tumore e non è una cellula tumorale. Lo stroma comprende quindi il tessuto connettivo, i vasi sanguigni, la matrice extracellulare e la componente cellulare. Le cellule mesenchimali (MSC) derivate dal midollo osseo sono attratte dai siti tumorali e supportano la crescita del tumore. Le cellule endoteliali (EC) svolgono un ruolo importante nell'angiogenesi. Sebbene la letteratura documenti il dialogo incrociato tra cellule stromali e cellule cancerose, il ruolo del contatto eterocellulare fisico diretto non è chiaramente stabilito. Questo studio invece si concentra proprio su questo, ovvero sul contatto diretto tra cellule endoteliali e mesenchimali e cellule tumorali, tramite la formazione di tunnel di nanotubi grazie ai quali poi avvengono scambi di molti componenti cellulari, come componenti della membrana plasmatica, molecole citosoliche e organelli.

Gli esperimenti eseguiti da questo team di ricerca hanno dimostrato che

1) Tunnel di nanotubi omocellulari (tra cellule simili) ed eterocellulari (tra cellule diverse) si verificano spontaneamente in varie colture di cellule tumorali

- 2) I tunnel di nanotubi mediano il trasferimento preferenziale dei componenti citoplasmatici dalle cellule stromali alle cellule tumorali, inclusi i mitocondri
- 3) L'acquisizione dei mitocondri porta all'emergere di un fenotipo chemioresistente

Questo studio non solo dimostra quindi il trasferimento di mitocondri tra cellule stromali e cellule tumorali, ma dimostra anche un guadagno funzionale da parte delle cellule tumorali che acquisiscono i mitocondri tramite nanotubi. Infatti sono stati documentati benefici funzionali come un'aumentata sopravvivenza e resistenza allo stress, derivante dall'acquisizione dei mitocondri. Questo studio è la prima segnalazione di chemioresistenza legata all'assorbimento dei mitocondri in un contesto eterocellulare (passaggio di mitocondri tra cellule diverse che determina un beneficio funzionale nella cellula ricevente).

La chemioterapia mira principalmente a dirigere le cellule tumorali all'apoptosi. Gli agenti antitumorali classici causano permeabilità mitocondriale indiretta e innescano l'apoptosi. La nostra scoperta del trasferimento mitocondriale dalle cellule del microambiente tumorale alle cellule tumorali stesse solleva interrogativi sulla risposta delle cellule tumorali ai farmaci antitumorali che danneggiano il DNA.

Molti studi sottolineano l'importanza del contatto cellulare nella determinazione del fenotipo tumorale. Ci sono evidenze in letteratura che indicano che la posizione di una cellula nel suo contesto multicellulare modula il suo fenotipo. Sicuramente un ruolo molto importante lo svolgono molti fattori locali (citochine, legame di membrana etc), ma in contesti specifici è il contatto diretto tra cellule nello stesso microambiente che è fondamentale per la modulazione fenotipica di una determinata cellula.

Il contatto tra cellule stromali e tumorali, il passaggio dei mitocondri dalle prime alle seconde, determina nelle cellule tumorali un fenotipo chemioresistente, e quindi una eterogeneità fenotipica anche tra le cellule tumorali, che porta all'emergere di una malattia microscopica residua e resistente. Ciò sottolinea il ruolo della nicchia metastatica in cui l'interazione endoteliale-tumore dipendente dal contatto, tra gli altri meccanismi, potrebbe proteggere alcune cellule tumorali dalla citotossicità chemioterapica. Gli esperimenti di co-cultura riportati in questo studio hanno rivelato proprio la presenza di eterogeneità fenotipica basata sull'interazione tra cellule tumorali e cellule stromali.

Nel complesso, questo lavoro sottolinea l'importanza dei tunnel di nanotubi nel dialogo incrociato tra cellule tumorali e cellule stromali e sottolinea la specificità di tale processo fisiologico. Il ruolo della comunicazione mediata da TnT deve essere considerato nel contesto di altre interazioni cellula-cellula (fattori secreti, microparticelle, contatto cellulare diretto). Capire l'importanza di questa modalità diretta di comunicazione cellulare, e della modulazione fenotipica che ne consegue, porterà a una migliore comprensione della dinamica del tumore e a progettare nuovi approcci terapeutici.

Riassunto

La nostra visione del cancro è cambiata negli ultimi decenni. Infatti i tumori sono ora percepiti come entità complesse in cui le componenti tumorali e stromali interagiscono strettamente. Tra i diversi elementi dello stroma tumorale la componente cellulare gioca un ruolo primordiale. Le cellule mesenchimali (MSC) derivate dal midollo osseo sono attratte dai siti tumorali e supportano la crescita del tumore. Le cellule endoteliali (EC) svolgono un ruolo importante nell'angiogenesi. Sebbene la letteratura documenti molti aspetti del dialogo incrociato tra cellule stromali e cellule cancerose, il ruolo del contatto eterocellulare diretto non è chiaramente stabilito. Recentemente, è stato dimostrato che i tunnel di nanotubi (TnT)

supportano i trasferimenti da cellula a cellula di componenti della membrana plasmatica, molecole citosoliche e organelli all'interno delle linee cellulari. Qui, abbiamo studiato la formazione di TnT eterocellulari tra cellule stromali (MSC e EC) e cellule tumorali. Dimostriamo che i TnT si formano tra diverse cellule tumorali, cellule stromali e linee cellulari cancerose-stromali. Abbiamo mostrato che la struttura simile a TnT si verificava negli sferoidi indipendenti dall'ancoraggio 3D e anche nelle colture di espianto del tumore. Nella nostra condizione di coltura, la formazione di TnT si è verificata dopo un'ampia adesione della membrana. Abbiamo dimostrato che i trasferimenti intercellulari del contenuto citoplasmatico avvenivano in modo simile tra cellule tumorali e MSC o EC, ma abbiamo evidenziato che lo scambio di mitocondri avveniva preferenzialmente tra cellule endoteliali e cellule tumorali. Abbiamo illustrato che le cellule tumorali che acquisiscono i mitocondri hanno mostrato chemioresistenza. I nostri risultati illustrano il ruolo indipendente dalla perfusione dell'endotelio mostrando uno scambio mitocondriale endoteliale diretto con le cellule tumorali associato alla modulazione fenotipica. Ciò supporta un altro ruolo dell'endotelio nella costituzione della nicchia metastatica.

Contesto

I tessuti sono costituiti da diversi tipi cellulari che comunicano per mantenere l'omeostasi [1]. Mentre il numero cellulare e l'identità posizionale dei tessuti normali vengono persi nei tumori, le cellule tumorali mantengono molte interazioni con le cellule non maligne circostanti e la matrice extracellulare [2]. Infatti, i tumori primari e metastatici contengono una varietà di tipi di cellule stromali come cellule endoteliali (EC), fibroblasti e varie cellule derivate dal midollo osseo, inclusi macrofagi, mastociti e cellule staminali mesenchimali (MSC) [3]. Questi vari tipi cellulari vengono reclutati nel sito del tumore e attraverso la modulazione di diversi percorsi contribuiscono alla crescita e alla metastasi del tumore [4-10]. L'interazione tra cancro e cellule stromali è primordiale per la biologia dei tumori. Sono state fornite diverse linee di prova. Il dialogo incrociato tra cellule tumorali e fibroblasti induce una modificazione fenotipica delle cellule stromali verso un fenotipo dei fibroblasti associati al cancro (CAF) che promuove in cambio le cellule tumorali [11]. Nel contesto metastatico, le cellule derivate dal midollo osseo possono essere attratte nel sito della metastasi e preparare la nicchia metastatica [12]. Confortando questi risultati, il gruppo Park ha dimostrato che una firma dello stroma può predire l'esito nei pazienti con cancro al seno [13]. La comprensione dei meccanismi implicati nella relazione tra le cellule tumorali e le cellule stromali è quindi essenziale per mirare alla progressione del tumore.

Diversi meccanismi sono coinvolti nel dialogo incrociato tra cancro e cellule stromali: (i) interazione citochina/recettore [8, 14] (ii) contatto cellulare diretto e scambio di materiale [15-17] (iii) comunicazione cellulare mediata da microparticelle [15-17] 18]. Recentemente è stato enfatizzato il ruolo delle interazioni dipendenti dal contatto tra cancro e cellule stromali. Questi sono mediati da sinapsi, giunzione GAP e comunicazione cellula-cellula attraverso tunnel di nanotubi (TnT) [19]. Descritti per la prima volta in cellule PC12 di feocromocitoma di ratto in coltura [20], i TnT sono stati osservati in più tipi cellulari in vitro [21] e più recentemente in vivo [22, 23]. Queste sottili strutture della membrana plasmatica che connettono le cellule consentono trasferimenti intercellulari di organelli, vari componenti della membrana plasmatica e molecole citoplasmatiche [24]; ioni calcio, proteine di maggiore istocompatibilità (MHC classe I), agenti patogeni, piccoli organelli del sistema endosomiale/lisosomiale, mitocondri e trasportatore ATP-Binding Cassette (P-glicoproteina) hanno tutti dimostrato di essere trasferiti tra diverse cellule da TnTs [19, 25–29]. Mentre l'importanza dell'interazione mediata da TnTs in vivo è ancora dibattuta in letteratura a causa della mancanza di un inibitore specifico per studiare il loro ruolo, ci sono ora evidenze che dimostrano il ruolo funzionale del trasferimento intercellulare mediato da TnTs [30]. Diversi studi dimostrano l'esistenza di trasferimenti mediati da TnT tra le cellule tumorali [31].

Pertanto la presenza di TnT è stata stabilita utilizzando cellule derivate da campioni di pazienti e da linee cellulari cancerose stabilite. Diversi componenti vengono trasferiti tramite TnTs. Tuttavia, resta da stabilire il ruolo dei TnT nella formazione di connessioni citoplasmatiche dirette tra cancro e cellule stromali e le loro conseguenze.

In questo studio, abbiamo ipotizzato che i TnT potrebbero mediare lo scambio citoplasmatico e il trasferimento del fenotipo tra le cellule stromali e tumorali. Nelle nostre condizioni di coltura abbiamo osservato TnT, stabiliti tra diverse cellule tumorali (linee cellulari di cancro al seno e ovarico) e cellule stromali (cellule staminali mesenchimali e cellule endoteliali). Abbiamo descritto lo scambio spontaneo di materiale citoplasmatico tra EC o MSC e più linee cellulari tumorali. Abbiamo mostrato un trasferimento preferenziale dei mitocondri dalle cellule endoteliali alle cellule tumorali con conseguente acquisizione della chemioresistenza. Pertanto, i nostri risultati sollevano la possibilità di scambio intercellulare diretto come modulatore del fenotipo tumorale da parte della componente stromale.

Risultati

- 1) TnT omocellulari (tra cellule simili) ed eterocellulari (tra cellule diverse) si verificano spontaneamente in varie colture di cellule tumorali
- 2) I TnT mediano il trasferimento preferenziale dei componenti citoplasmatici dalle cellule stromali alle cellule tumorali
- 3) L'acquisizione dei mitocondri porta all'emergere di un fenotipo chemioresistente

Discussione

In questo studio, abbiamo riportato lo scambio eterocellulare (tra cellule diverse) mediato da TnT spontaneo tra cancro e cellule stromali. Abbiamo dimostrato la formazione di TnT in diversi tipi di cellule tumorali, nonché in due tipi di cellule stromali altamente coinvolte nella progressione del tumore. Questi risultati supportano che la formazione di TnT è onnipresente. La presenza di TnT negli espianti di tumore 3D è concordante con la presenza di TnT nei tumori precedentemente descritti come nel mesotelioma pleurico maligno umano [38]. In modo più interessante abbiamo mostrato, per la prima volta, i TnT negli sferoidi del cancro, che potrebbero essere un modello migliore per rappresentare la biologia del tumore e l'interazione intercellulare rispetto alle classiche colture a 2D [39].

I TnT tra le cellule tumorali e le cellule stromali avevano tutte le caratteristiche canoniche precedentemente descritte [20, 24]. Studi time-lapse hanno dimostrato che la formazione di TnT è una caratteristica comune e sembra essere un processo dinamico. Abbiamo evidenziato l'importanza di un'adesione di membrana ampia nella formazione di TnT. Pertanto la formazione di TnT potrebbe essere conseguente all'interazione recettore-ligando e lo scambio di organelli cellulari potrebbe dipendere dalla posizione e/o dalla natura dell'interazione iniziale della membrana. Nelle nostre diverse impostazioni di coltura cellulare, abbiamo dimostrato il trasferimento del contenuto citoplasmatico dalle cellule stromali a quelle cancerose. Sia le MSC che le EC hanno scambiato materiali citoplasmatici con cellule tumorali senza differenze evidenti tra i tipi cellulari. È stato descritto il trasferimento di materiale citoplasmatico tra tipi cellulari simili [30]. Recentemente alcuni gruppi hanno illustrato tali fenomeni in un contesto eterocellulare [25, 37]. In realtà abbiamo osservato anche il trasferimento di materiale citoplasmatico dal cancro alle cellule stromali, tuttavia il significato preciso di questo fenomeno non è affrontato in questo studio. Abbiamo fornito prove per il trasferimento mitocondriale tra cellule stromali e cancerose attraverso nanotubi, questo trasferimento induce la modulazione del fenotipo. Mentre lo scambio di materiali citoplasmatici sembra avvenire in modo simile per le interazioni tra cellule mesenchimali e cancerose e cellule endoteliali e cancerose, abbiamo trovato il trasferimento preferenziale dei mitocondri tra il cancro e le cellule endoteliali. Utilizzando un sistema di espianto a tre dimensioni

(3D), abbiamo dimostrato che le cellule tumorali dei noduli metastatici del cancro ovarico potrebbero assorbire i mitocondri da cellule endoteliali, suggerendo che in ambienti cellulari densi tali strutture potrebbero mediare le comunicazioni cellula-cellula.

La nostra analisi di diverse linee cellulari stromali ha evidenziato il trasferimento preferenziale dei mitocondri dalle cellule endoteliali rispetto alle MSC nelle nostre condizioni di coltura. Ciò supporta l'esistenza di un processo specifico che media tali scambi. La specificità dei carichi trasferiti è già stata illustrata senza un meccanismo preciso, tuttavia componenti strutturali, vie di segnalazione specifiche e/o condizioni colturali possono svolgere un ruolo [40].

Il trasferimento di mitocondri è già stato descritto in diversi modelli omo ed eterocellulari come nei cardiomiociti [25], astrociti [41], cellule epiteliali renali umane primarie [42], cellule lisce vascolari e MSC [37], epiteliali pigmentati retinici umani cellule [43] e tra cellule di mesotelioma pleurico maligno umano [38]. Tra questi studi, solo uno ha associato un guadagno funzionale tramite lo scambio di mitocondri dipendente da nanotubi. Infatti, Vallabhaneni et al. hanno dimostrato che le cellule muscolari lisce vascolari avviano la proliferazione delle cellule staminali mesenchimali attraverso lo scambio di mitocondri tramite TnT [37]. Qui, abbiamo illustrato il vantaggio fenotipico dell'assorbimento dei mitocondri. Utilizzando una strategia di smistamento cellulare che controlla i fattori secreti, il trasferimento citoplasmatico o il contatto cellula-cellula, abbiamo dimostrato che le cellule che acquisiscono mitocondri mostravano una chemioresistenza significativa. Sono stati documentati benefici funzionali (sopravvivenza e resistenza allo stress) derivanti dall'acquisizione dei mitocondri. Spee et al. hanno mostrato che i trasferimenti attivi di mitocondri potrebbero salvare la respirazione aerobica nelle cellule con mitocondri disfunzionali [44]. Hanno indicato che i difetti genetici nel DNA dei mitocondri potrebbero essere salvati dall'assorbimento di mitocondri normalmente funzionanti da cellule di tipo selvatico ex vivo. Oliva et al. hanno descritto il ruolo dell'aumentata attività mitocondriale con conseguente diminuzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno e nell'acquisizione della chemioresistenza nei gliomi [45]. Il nostro studio è la prima segnalazione di chemioresistenza legata all'assorbimento dei mitocondri in un contesto eterocellulare.

La chemioterapia mira principalmente a dirigere specificamente le cellule tumorali nell'apoptosi. L'apoptosi è un complesso meccanismo a più fasi. Tuttavia, la permeabilità della membrana mitocondriale è una fase primordiale dell'apoptosi. Gli agenti antitumorali classici come etoposide, doxorubicina, cisplatino o paclitaxel (Taxol) causano permeabilità mitocondriale indiretta e innescano l'apoptosi [46, 47]. La nostra scoperta del trasferimento mitocondriale dal microambiente alle cellule tumorali solleva interrogativi sulla risposta delle cellule tumorali ai farmaci antitumorali che danneggiano il DNA.

Riconosciamo che altri meccanismi potrebbero essere implicati nel conferire chemioresistenza come il trasferimento di altri componenti citoplasmatici (proteine, materiale genetico) o modifiche del trascrittoma e questo sarà affrontato in ulteriori studi.

La presenza di TnT in vivo è stata chiaramente stabilita sia in cellule sane che nelle neoplasie [22, 48, 38]. Il loro ruolo in diverse funzioni cellulari che vanno dalla trasmissione di prioni [28, 49, 50] o particelle virali [27, 51], accoppiamento elettrico [33, 52] segnalazione di morte cellulare [53] all'acquisizione di chemioresistenza [29], sottolinea l'importanza di tale processo fisiologico negli organismi multicellulari.

Molti studi sottolineano l'importanza del contatto cellulare nella mediazione della modulazione del fenotipo tumorale [17, 29, 54, 55]. Ci sono prove in letteratura che la posizione cellulare relativa in un contesto multicellulare modula il fenotipo. Infatti abbiamo precedentemente illustrato che le cellule staminali ematopoietiche risiedono accanto a una nicchia endoteliale sinusoidale nel midollo osseo [56]. Mentre molti fattori locali (citochine, legame di membrana) svolgono certamente un

ruolo, il trasferimento fenotipico mediato dal contatto ha un ruolo in contesti specifici. La chemioresistenza fornita dal trasferimento dei mitocondri può portare all'emergere di una malattia microscopica residua attraverso la modulazione dinamica del fenotipo. Ciò sottolinea il ruolo di una nicchia metastatica in cui l'interazione endoteliale-tumore dipendente dal contatto, tra gli altri meccanismi, potrebbe proteggere poche cellule tumorali dalla citotossicità chemioterapica [57]. Il nostro esperimento di co-cultura ha rivelato la presenza di eterogeneità fenotipica basata sull'interazione tra cellule tumorali e cellule stromali. Ci sono molti aspetti che devono essere studiati: è necessario comprendere i meccanismi alla base di (i) la specificità dello scambio cellulare (ii) la costituzione dei TNT dopo l'adesione e (iii) il ruolo dei mitocondri di nuova acquisizione nella modifica del fenotipo delle cellule tumorali che potrebbero poi essere usati come bersagli terapeutici [58].

Nel complesso, il nostro approccio sottolinea l'importanza dei TnT nel dialogo incrociato tra cellule tumorali e cellule stromali e sottolinea la specificità di tale processo fisiologico. Il ruolo della comunicazione mediata da TnT deve essere considerato nel contesto di altre interazioni cellula-cellula (fattori secreti, microparticelle, contatto cellulare diretto). Adattare l'importanza di tali meccanismi porterà a una migliore comprensione della dinamica del tumore e a progettare nuovi approcci terapeutici.