

## Poster P.18.118

### REGULATION OF HEMATOPOIESIS IN NORMAL AND STRESSED CONDITIONS

**Aprile A.**<sup>[1]</sup>, Lidonnici M.R.<sup>[1]</sup>, Gulino A.<sup>[2]</sup>, Storto M.<sup>[1]</sup>, Villa I.<sup>[3]</sup>, Beretta S.<sup>[1]</sup>, Merelli I.<sup>[1]</sup>, Rubinacci A.<sup>[3]</sup>, Ponzoni M.<sup>[4]</sup>, Marktel S.<sup>[5]</sup>, Tripodo C.<sup>[2]</sup>, Ferrari G.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>San Raffaele-Telethon Institute for Gene Therapy, IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[2]</sup>Tumor Immunology Unit, Department of Health Sciences, University of Palermo ~ Palermo ~ Italy, <sup>[3]</sup>Bone Metabolism Unit, Division of Genetics and Cell Biology, IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[4]</sup>Pathology Unit, IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy, <sup>[5]</sup>Hematology and Bone Marrow Transplantation Unit, IRCCS Ospedale San Raffaele ~ Milan ~ Italy

Over decades the research on pathophysiology and therapeutic solutions for  $\beta$ -thalassemia (BT) has been mostly focused on erythropoiesis. However, ineffective erythropoiesis and secondary alterations, as abnormal regulation of bone metabolism, iron overload and hormonal factors, induce changes in the BM homeostasis, thus having an impact on the BT bone marrow (BM) microenvironment. As hematopoietic stem cells (HSC) are regulated by signals from the BM niche, we hypothesized that an altered BM milieu might affect BT HSC-niche crosstalk and potentially the outcome of therapeutic HSC transplantation.

We investigated hematopoiesis in thalassemic Hbbth3/+ (th3) mutant mice and we found lower frequency, reduced quiescence and reconstituting potential of HSC, as compared to normal controls. th3 HSC have impaired self-renewal, which is rescued upon transplantation in a normal recipient niche, proving an active role of the BM niche environment. Preliminary morphological and molecular analysis revealed that stromal and hematopoietic components of the niche are altered in th3 mice. Guided by the clinical evidence of osteoporosis in a significant proportion of patients affected by BT, we focused on the role of bone cells in supporting HSC and we found defective osteoblast (OB) activity with decreased levels of parathyroid hormone (PTH). The low PTH alters th3 OB function and reduces expression of the Notch-ligand Jag-1 by the BM stroma. This consequently impairs the activation of Notch1 by HSC, therefore affecting their activity. Administration of PTH is sufficient to restore the stromal niche and reestablish the quiescent HSC pool, with in vivo re-activation of Jag1-Notch1 signaling. Since we found in BT additional abnormalities in the hematopoietic component of the BM, as defective maturation of megakaryocytes (Mk) and reduced circulating levels of thrombopoietin (TPO), we hypothesized the contribution of other factors to the impaired hematopoiesis. As both Mk and TPO have been reported to play a key role in regulating the fate of HSC, we are currently investigating the molecular causes of BT dysmegakaryopoiesis and we will unravel the Mk-HSC crosstalk. Importantly, the reduced HSC quiescence, impaired stromal niche and defective Mk maturation were confirmed in samples from BT patients, thus highlighting the clinical relevance of our findings.

Further investigation will unravel the multiple molecular mechanisms that affect in trans BT HSC functions in the complexity of the stressed BM microenvironment. Our results uncover a defect of HSC in BT, induced by an altered BM microenvironment and unveil underexplored mechanisms in the pathophysiology of the disease, with a potential impact on improving transplantation and gene therapy approaches.

Negli ultimi decenni lo studio della patofisiologia e degli approcci terapeutici della  $\beta$ -talassemia (BT) si sono concentrati soprattutto sull'eritropoiesi. Tuttavia, l'eritropoiesi inefficace e difetti secondari della malattia, quali l'alterata regolazione del metabolismo osseo, il sovraccarico marziale e fattori ormonali, inducono cambiamenti nell'omeostasi del midollo osseo (MO) con un impatto sul microambiente. Poichè le cellule staminali ematopoietiche (CSE) sono regolate dai segnali provenienti dalla nicchia

del MO, abbiamo ipotizzato che un alterato ambiente midollare possa influenzare le interazioni tra CSE e nicchia e potenzialmente l'esito del trapianto di CSE.

Abbiamo analizzato l'ematopoiesi talassemica nel modello murino Hbbth3/+ (th3) e abbiamo osservato una minore frequenza, ridotta quiescenza e potenziale di ricostituzione delle CSE, rispetto agli animali normali di controllo. Le CSE BT presentano un'alterata capacità di automantenimento che viene recuperata dopo trapianto in una nicchia normale, dimostrando quindi un ruolo attivo dell'ambiente del MO. Analisi morfologiche e molecolari preliminari hanno rivelato che le componenti stromali ed ematopoietiche della nicchia risultano alterate nei topi th3. Guidati dall'evidenza clinica di osteoporosi in una quota significativa di pazienti BT, ci siamo concentrati sul ruolo delle cellule dell'osso nel supportare le CSE e abbiamo rilevato un'attività difettiva degli osteoblasti (OB) BT associata a livelli ridotti di ormone paratiroideo (PTH). Il basso PTH altera la funzione degli OB th3 e riduce l'espressione del ligando di Notch Jag1 da parte dello stroma del MO. Questo di conseguenza compromette l'attivazione di Notch1 nelle CSE, alterando la loro funzione. La somministrazione di PTH è sufficiente a recuperare la nicchia stromale e a ristabilire la quiescenza delle CSE BT, attraverso la riattivazione in vivo del segnale Jag1-Notch1. Poiché abbiamo trovato ulteriori anomalie nella componente ematopoietica del MO, quali un difetto nella maturazione dei megacariociti (Mk) BT e ridotti livelli di trombopoietina (TPO), abbiamo ipotizzato il contributo di altri fattori all'alterata ematopoiesi. Dal momento che sia i Mk che il TPO hanno un ruolo chiave nella regolazione delle CSE, stiamo analizzando le cause della dismegacariopoiesi BT e l'interazione tra Mk e CSE in BT. Abbiamo confermato la ridotta quiescenza delle CSE, alterazioni della nicchia stromale e difetti nella maturazione dei Mk nei campioni di pazienti talassemici, evidenziando quindi la rilevanza clinica dei nostri risultati.

Ulteriori studi sveleranno i molteplici meccanismi molecolari che agiscono in trans sulle funzioni delle CSE BT nella complessità dei segnali di stress del MO. I nostri dati rivelano un difetto delle CSE BT indotto da un alterato microambiente del MO e scoprono meccanismi sconosciuti della patofisiologia della malattia con un potenziale impatto sul miglioramento degli approcci di trapianto e di terapia genica.

No

Beta-Talassemia

Coodinator: Giuliana Ferrari

Duration (N. Years): 5

Starting year: 2016

**Telethon Project (nr):**

TGT16A03

**Disease Name:**

Beta-Thalassemia

**Keywords:**

Beta-thalassemia, Hematopoietic stem cells, Bone marrow microenvironment