



UNIVERSITÀ DI PARMA

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXXVIII

**Le alterazioni del metabolismo della glutamina nella  
nicchia midollare del mieloma multiplo modificano il  
differenziamento delle cellule mesenchimali stromali**

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Prisco Mirandola

Tutore:  
Chiar.mo Prof. Ovidio Bussolati

Dottorando: Erika Griffini

Anni Accademici 2022/2023 – 2024/2025



# Indice

<b>Riassunto</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduzione</b>	<b>7</b>
1.1 Il mieloma multiplo	7
1.2 Le alterazioni metaboliche dei tumori	9
1.2.1 Il ruolo della Gln nel metabolismo tumorale	10
1.2.2 La sintesi della Gln	12
1.2.3 I trasportatori della Gln	13
1.3 I trasportatori del Glu	15
1.4 Le cellule stromali mesenchimali (MSC)	15
1.4.1 Gli osteoblasti	16
1.4.2 Gli adipociti	18
1.5 Le nanoplastiche	20
<b>2. Scopo della tesi</b>	<b>23</b>
<b>3. Materiali e Metodi</b>	<b>24</b>
3.1 Reagenti	24
3.2 Colture cellulari	24
3.3 Co-colture	24
3.4 Vitalità: il metodo della Resazurina	25
3.5 Differenziamento cellulare	26
3.5.1 Differenziamento osteoblastico	26
3.5.2 Differenziamento adipocitario	26
3.6 Silenziamento genico	27
3.7 Determinazioni di aminoacidi	27
3.7.1 Glu intracellulare	27
3.7.2 Secrezione di Glu	28
3.7.3 Secrezione di Gln	29
3.7.4 Valutazione del contenuto aminoacidico intracellulare	29
3.8 Determinazione dell'attività dei trasportatori EAATs	30
3.9 Determinazione dell'attività del trasportatore xCT	30
3.10 Immunofluorescenza	31

3.11 Terreni di coltura condizionati da cellule di MM	32
3.12 Colorazione con Oil Red O	33
3.13 Internalizzazione delle nanoplastiche	33
3.14 Estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e Real-Time PCR	34
3.15 Estrazione proteica	37
3.16 Western Blot	38
3.17 Analisi statistica	40
<b>4. Risultati</b>	<b>41</b>
4.1 Le cellule mesenchimali stromali e il metabolismo della glutamina nel mieloma multiplo: supporto metabolico alle cellule neoplastiche e differenziamento adipocitario	41
4.1.1 Nelle cellule di mieloma il glutamato deriva dalla deamidazione della glutamina	41
4.1.2 Le cellule di mieloma secernono glutamato	42
4.1.3 Il differenziamento osteogenico reprime l'espressione del trasportatore EAAT3 per il glutamato	43
4.1.4 Le cellule mesenchimali ma non gli osteoblasti secernono glutamina	46
4.1.5 Le MSC supportano la crescita delle cellule di MM grazie all'attività di GS e di EAAT3	47
4.1.6 La deprivazione di Gln, causata dalle cellule di MM, stimola l'adipogenesi	48
4.1.7 La deprivazione di Gln favorisce l'upregolazione dei marker adipocitari e la lipogenesi	50
4.1.8 Il differenziamento adipocitario riduce il catabolismo della Gln	51
4.1.9 L'adipogenesi correla con lo stress nutrizionale	53
4.1.10 Il metabolismo delle MSC viene riprogrammato durante l'adipogenesi	54
4.1.11 L'asparagina ostacola il differenziamento adipocitario delle MSC	56
4.2 Nanoplastiche e cellule mesenchimali stromali: alterazioni metaboliche e differenziative	58
4.2.1 Le NPs vengono internalizzate dalle hTERT-MS	

ma non ne alterano la vitalità	58
4.2.2 Le NPs inducono stress ossidativo nelle hTERT-MSC	59
4.2.3 Le NPs modulano l'espressione di enzimi coinvolti nel metabolismo della Gln nelle hTERT-MSC	62
4.2.4 Le NPs inibiscono l'osteogenesi e stimolano l'adipogenesi	63
<b>5. Discussione e Conclusioni</b>	<b>65</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>76</b>

## Riassunto

Il mieloma multiplo (MM) è un tumore ematologico maligno caratterizzato dalla proliferazione incontrollata di una popolazione monoclonale di plasmacellule nel midollo osseo. Il MM si sviluppa da una condizione pre-maligna (MGUS, gammopatia monoclonale di significato indeterminato) passando attraverso uno stadio intermedio asintomatico (SMM, Smouldering Multiple Myeloma) che, in circa il 10% dei pazienti, evolve a MM attivo. Le manifestazioni cliniche dell'insufficienza d'organo tipiche del MM attivo sono riassunte nell'acronimo CRAB: ipercalcemia (C), insufficienza renale (R), anemia (A) e malattia ossea (B).

Come noto, le cellule tumorali alterano le vie metaboliche allo scopo di garantire la disponibilità di una quantità di energia e di precursori sufficiente alla proliferazione cellulare, favorendo nel contempo la crescita del tumore e l'evasione dal controllo del sistema immunitario. In questo contesto la glicolisi aerobia, che converte il glucosio in acido lattico anche in presenza di ossigeno, e la glutaminolisi, che produce prima glutamato (Glu) e poi  $\alpha$ -chetoglutarato ( $\alpha$ -KG) a partire dalla glutamina (Gln), sono tra le principali vie metaboliche attivate nei tumori maligni. La Gln è un aminoacido importante per molti tipi di cellule neoplastiche, tra cui le plasmacellule di MM, che vengono definite "glutamine addicted" in quanto sviluppano una forte dipendenza da Gln e ne consumano grandi quantità. Un modo che le cellule hanno per aumentare la disponibilità di Gln è sintetizzarla *de novo* grazie all'enzima Glutamina Sintetasi (GS) a partire da Glu e ammonio; tale enzima però non è espresso nelle plasmacellule maligne, che risultano quindi totalmente dipendenti dalla disponibilità di Gln extracellulare. Infatti, diversi sistemi di trasporto, come i carriers  $\text{Na}^+$ -dipendenti ASCT2 e SNAT1, e lo scambiatore  $\text{Na}^+$ -indipendente LAT1, risultano sovraespressi durante la progressione del MM.

Fondamentali nel microambiente del MM sono le cellule mesenchimali stromali (MSC) che, in condizioni normali, sono in grado di differenziarsi in osteoblasti, adipociti e condrociti. Nel midollo osseo di MM, viene stimolato il differenziamento in senso adipocitario delle MSC, un'alterazione funzionale a favorire la crescita del tumore grazie agli acidi grassi secreti dagli adipociti. Al contrario, il differenziamento in senso osteoblastico delle MSC risulta compromesso dalla deplezione di Gln, consumata dalle cellule di MM, evento

che determina un mancato equilibrio tra riassorbimento e sintesi di matrice ossea. Non sono invece ancora chiariti gli eventuali rapporti tra deplezione di Gln e differenziamento adipocitario delle MSC, così come non è stato indagato se alterazioni del metabolismo dell'aminoacido possano essere coinvolte in altri disordini del tessuto osseo. Ad esempio, recenti studi hanno indicato che l'integrità ossea può essere compromessa anche da una sovrapproduzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) mediata da nanoplastiche (NPs), microscopici inquinanti ambientali in grado di raggiungere, tra i vari tessuti, anche il midollo osseo.

Questa tesi studia il ruolo delle cellule mesenchimali stromali nel metabolismo della glutamina del mieloma multiplo, caratterizzando i meccanismi attraverso cui queste cellule sostengono il metabolismo delle cellule neoplastiche e sono indotte a un differenziamento in senso adipocitario. L'interesse per le capacità differenziative delle cellule mesenchimali stromali del midollo osseo mi ha inoltre portata ad indagare se le nanoplastiche di polistirene possano modificarle e se, in questo caso, alterazioni del metabolismo della glutamina possano essere coinvolte.

Nello studio sono state impiegate le linee cellulari di MM umano (HMCL) MM1.S, RPMI8226, JJN3 e U266 e cellule mesenchimali stromali umane primarie (MSC), o immortalizzate (hTERT-MSC). Le cellule sono state coltivate in monocultura o in co-cultura utilizzando sistemi a doppia camera (transwell) con le cellule di MM nel compartimento superiore e le MSC nel compartimento inferiore. La vitalità cellulare è stata determinata tramite il saggio della Resazurina. Il differenziamento delle MSC è stato promosso tramite incubazione per 14 giorni in medium contenente acido ascorbico (ASC, 50 µg/mL), desametasone (Dex,  $10^{-8}$  M) e 10% di siero fetale bovino (FBS) per il differenziamento osteogenico o 10% di FBS, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 500 µM), indometacina (INDO, 5 µM), Dex (50 µM) e insulina ricombinante umana (10 µg/mL) per il differenziamento adipogenico. Per evidenziare e quantificare la presenza delle gocce lipidiche all'interno delle MSC in seguito al differenziamento adipocitario è stata utilizzata la colorazione Oil Red O. L'attività dei trasportatori EAATs (trasportatori Na<sup>+</sup>-dipendenti in grado di concentrare attivamente Glu all'interno delle cellule) e xCT (scambiatore Na<sup>+</sup>-indipendente cistina/Glu) è stata valutata utilizzando substrati radioattivi

marcati. Per quanto riguarda EAATs, abbiamo valutato l'uptake di L-[3,4-<sup>3</sup>H]-Glu (10  $\mu$ M, 10  $\mu$ Ci/ml, 1 minuto) in EBSS (soluzione salina di Earle) o in EBSS privo di Na<sup>+</sup> e abbiamo misurato la radioattività contenuta negli estratti cellulari tramite uno spettrometro a scintillazione liquida. Abbiamo eseguito il medesimo procedimento anche per misurare l'uptake di <sup>3</sup>H-Glu (50  $\mu$ M, 10  $\mu$ Ci/ml, 1 minuto) attraverso il trasportatore xCT in EBSS privo di Na<sup>+</sup>, in assenza o in presenza di sulfasalazina (SSZ, 500  $\mu$ M), un inibitore specifico del trasportatore. L'espressione genica è stata valutata tramite RT-PCR, dopo estrazione e retrotrascrizione dell'RNA, mentre l'espressione proteica è stata valutata mediante Western Blot o immunofluorescenza. Gli effetti delle NPs sono stati valutati incubando le cellule con nanoparticelle di polistirene (PS).

Gli aminoacidi sono stati valutati tramite spettrometria di massa, avvalendosi della collaborazione del dott. Saverio Tardito e della prof. Roberta Andreoli.

Abbiamo preliminarmente riscontrato, attraverso l'utilizzo di Gln marcata con l'isotopo stabile del C <sup>13</sup>C, che le cellule di MM internalizzano la Gln che viene in misura significativa deamidata dalla Glutaminasi (GLS) a Glu, il quale viene poi secreto tramite l'attività del trasportatore xCT.

Valutando l'uptake di Glu in hTERT-MSK e in osteoblasti, abbiamo riscontrato che nelle cellule non differenziate il trasporto è per la maggior parte sodio-dipendente, quindi ascrivibile ai trasportatori EAATs. Dalla successiva analisi dei livelli di espressione dei trasportatori *SLC1A1* (codificante per EAAT3), *SLC1A2* (codificante per EAAT2) e *SLC1A3* (codificante per EAAT1), abbiamo rilevato un aumento dell'espressione del solo EAAT3 nelle MSC indifferenziate ma non negli osteoblasti.

Valutando la secrezione di Gln da MSC e osteoblasti, abbiamo dimostrato che le MSC secernono una quantità doppia di aminoacido rispetto agli osteoblasti e che tale fenomeno è potenziato dall'aggiunta di Glu extracellulare, ma inibito sia dall'MSO, inibitore irreversibile di GS, sia da D-Asp, inibitore competitivo degli EAATs.

Infine, abbiamo dimostrato che le MSC sostengono la crescita e la vitalità delle cellule di MM attraverso la secrezione di Gln; infatti, co-coltivando le cellule di MM con le MSC, abbiamo osservato che la co-coltura consente alle cellule di

MM di adattarsi meglio alla mancanza di Gln nell'ambiente extracellulare; il sostegno metabolico è compromesso sia dall'inibizione di GS e di EAAT3 che dal silenziamento di *GLUL* e di *SLC1A1*.

In merito allo studio dell'induzione del differenziamento adipocitario delle MSC nel contesto tumorale del MM, tramite l'utilizzo di medium condizionati da HMCL abbiamo riscontrato che la deprivazione di Gln stimola l'adipogenesi. In particolare, l'espressione di geni coinvolti nella lipogenesi (*PPARG*, *ADIPOQ*, *FABP4* e *FASN*) aumenta significativamente; risultato che suggerisce che il microambiente tumorale, caratterizzato da un'alterata disponibilità dei nutrienti, possa promuovere l'adipogenesi.

A conferma di questa ipotesi, valutando direttamente l'effetto della deprivazione di Gln sul differenziamento adipocitario tramite un'incubazione di 14 giorni in medium adipogenico in presenza o in assenza di Gln, l'analisi dell'espressione genica ha rivelato un aumento significativo dei principali markers adipocitari e di enzimi coinvolti nella lipogenesi nelle cellule coltivate in carenza dell'aminoacido, risultato successivamente confermato dall'aumento di positività al colorante lipofilo Oil Red O.

Successivamente, abbiamo valutato l'espressione di geni chiave nel metabolismo della Gln ed è emerso un calo di espressione di *GLS* e un aumento di *GLUL* nelle cellule incubate in medium adipogenico, risultato che evidenzia da un lato la diminuzione del catabolismo della Gln e dall'altro una minor dipendenza dalla Gln extracellulare. Inoltre, il medium adipogenico privo di Gln ha determinato l'aumento a livello proteico di markers adipogenici (*ADIPOQ* e *FABP4*), l'attivazione di risposte cellulari a stress nutrizionale (aumento di eIF2 $\alpha$ ) e la riduzione dell'espressione del prodotto di mTOR fosfo-p70 S6K, risultati che suggeriscono che la Gln possa agire come sensore modulando il comportamento metabolico delle MSC e favorendo l'accumulo di acidi grassi.

Dall'analisi del profilo aminoacidico abbiamo riscontrato infatti una significativa riprogrammazione metabolica delle MSC durante l'adipogenesi; in particolare, abbiamo osservato che il contenuto cellulare di Glu triplica nelle cellule incubate in medium adipogenico in presenza di Gln mentre subisce una riduzione del 90% in quelle incubate in assenza dell'aminoacido. Nelle stesse condizioni, il contenuto di Gln diminuisce solo del 50% nelle MSC incubate in

assenza di Gln suggerendo che il Glu possa essere utilizzato per la produzione di Gln. Parallelamente, l'incubazione in medium adipogenico, indipendentemente dalla presenza o dall'assenza di Gln, ha determinato l'attivazione di percorsi anabolici alternativi nelle MSC, evidenziabili dal significativo aumento dei livelli degli aminoacidi a catena ramificata (BCAA) leucina (Leu) e isoleucina (Ile). Al contrario, la concentrazione dell'asparagina (Asn), noto aminoacido osteogenico (Chiu et al., Cancers, 2020), è diminuita nelle MSC differenziate, in particolare in quelle incubate in assenza di Gln.

Infine, abbiamo dimostrato che l'aggiunta di Asn nel medium adipogenico modula negativamente l'adipogenesi, suggerendo un ruolo inibitorio di tale aminoacido nel processo di differenziamento, un dato coerente con l'attività pro-osteogenica di Asn.

Per quanto riguarda gli effetti delle NPs di PS sulle hTERT-MS, abbiamo preliminarmente dimostrato tramite microscopia confocale che le NPs vengono internalizzate dalle cellule senza alterarne la vitalità. Tuttavia, abbiamo osservato che l'incubazione in DMEM in presenza di NPs determina un'up-regolazione dei markers di stress ossidativo *HO-1* (codificante per l'enzima eme ossigenasi 1) e *xCT*, la cui attività è risultata più elevata nelle cellule trattate con NPs rispetto al controllo.

Valutando l'espressione a livello proteico di enzimi coinvolti nel metabolismo della Gln, dopo 48h di incubazione in presenza di NPs abbiamo riscontrato una diminuzione di asparagina sintetasi (ASNS) e un aumento di GS, risultato che suggerisce una possibile interferenza delle NPs sul differenziamento osteoblastico delle MSC tramite la modulazione dell'espressione di tali enzimi (Chiu et al., Cancers, 2020).

In ultimo, inducendo il differenziamento delle MSC in presenza o assenza di NPs, abbiamo riscontrato che l'espressione dei markers osteogenici dimezza mentre quella dei markers adipocitari presenta una tendenza in aumento.

Alla luce dei risultati ottenuti, è possibile ipotizzare un modello secondo cui la glutamine addiction delle cellule di MM è funzionale a produrre un ambiente midollare low Gln/high Glu che determina un calo della disponibilità di Asn manipolando in senso pro-tumorale il metabolismo e il differenziamento delle

MSC. In particolare, viene inibito il differenziamento osteogenico mentre viene promosso quello adipogenico, funzionale a sostenere la vitalità e la proliferazione delle cellule neoplastiche attraverso la secrezione di acidi grassi. Inoltre, anche le NPs, attraverso l'induzione di un'iperproduzione di ROS, potrebbero rappresentare una nuova fonte di stress ossidativo che impatta sul microambiente osseo alterando il processo di differenziamento delle MSC. In tale contesto, la supplementazione con Asn potrebbe essere un approccio terapeutico efficace a inibire il differenziamento adipocitario delle MSC ripristinando quello osteoblastico e rallentando la progressione delle lesioni ossee.

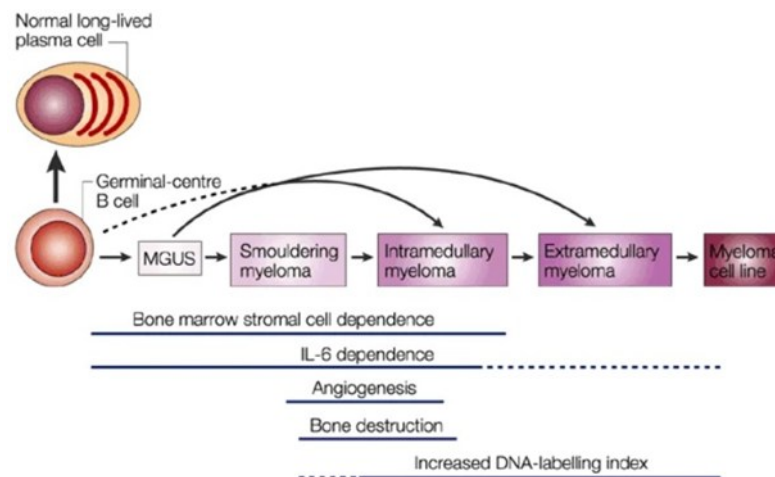
# 1. Introduzione

## 1.1 Il mieloma multiplo

Il mieloma multiplo (MM) è un tumore maligno ematologico caratterizzato dalla proliferazione incontrollata di plasmacellule monoclonali nel midollo osseo ed è tipicamente accompagnato dalla secrezione di un'immunoglobulina (Ig) monoclonale, nota come proteina M, che viene prodotta dal clone plasmacellulare anomalo e che è rilevabile nel siero o nelle urine dei pazienti (Kumar et al. 2017). Il MM rappresenta lo 0,9% di tutti i tumori e il 10% di tutte le neoplasie ematologiche (Abramson 2018, Hou et al. 2025), è la seconda neoplasia ematologica più frequente al mondo dopo il linfoma non-Hodgkin e colpisce prevalentemente la popolazione anziana, con maggiore incidenza nella fascia di età compresa tra 70 e 74 anni. Nel mondo occidentale ha un'incidenza di 4,3 casi ogni 100.000 abitanti e si verifica più frequentemente negli uomini che nelle donne (Hou et al. 2025, Zhuge et al. 2025).

Il MM si sviluppa da una condizione pre-maligna definita gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS). Il termine "gammopatia" indica un'eccessiva produzione di anticorpi mentre il termine "monoclonale" evidenzia la produzione di un'unica molecola anticorpale in quanto prodotta da un solo clone di plasmacellule. Il MM passa spesso attraverso uno stadio intermedio chiamato mieloma multiplo smouldering (SMM) che, al contrario del mieloma attivo, è asintomatico e non presenta danno d'organo (Bianchi et al. 2014). MGUS è caratterizzata dalla presenza di una Ig monoclonale sierica (non IgM) a concentrazione inferiore di 30 g/L, infiltrazione di plasmacellule tumorali nel midollo osseo inferiore al 10% e assenza di danno d'organo. Invece, qualora la proteina M (IgG o IgA) abbia una concentrazione sierica maggiore o uguale a 30 g/L e/o si abbia una percentuale di plasmacellule clonali intramidollari del 10-60% rispetto alle plasmacellule totali presenti in assenza di danno d'organo, si parla di SMM e in circa il 10% dei pazienti tale condizione ha un'elevata probabilità di evolvere a MM attivo (International Myeloma Foundation, Kaur et al. 2023).

La proteina M determina le manifestazioni cliniche dell'insufficienza d'organo che sono racchiudibili nell'acronimo CRAB: ipercalcemia (C), insufficienza renale (R), anemia (A) e malattia ossea (B) sottoforma di lesioni osteolitiche, fratture patologiche e osteopenia diffusa (Neumeister et al. 2022). La progressione del mieloma intramidollare è associata al CRAB e in una frazione di pazienti anche all'insorgenza di tumori in siti extramidollari quali il sangue, il liquido pleurico e la pelle. Quando il MM coinvolge il sangue viene chiamato leucemia plasmacellulare primaria o secondaria a seconda che precedentemente sia stato riconosciuto un mieloma intramidollare (Kuehl et al. 2002).



**Figura 1. Progressione da MGUS a MM** (Kuehl et al. 2002).

Si ritiene che il MM derivi dalla trasformazione di plasmacellule a vita lunga che popolano e sopravvivono negli organi linfoidi contribuendo alla memoria immunologica. In particolare, le mutazioni genetiche iniziali interessano il centro germinale e avvengono durante il processo di ipermutazione somatica e switch isotipico, meccanismi che migliorano la qualità anticorpale e che determinano l'isotipo delle Ig prodotte (Bianchi et al. 2014). Nel 45% dei pazienti l'evento iniziale è una traslocazione tra il locus della catena pesante delle Ig (IgH) presente sul cromosoma 14q32 e uno tra gli oncogeni FGFR3 (gene che codifica per il recettore 3 del fattore di crescita dei fibroblasti), MMSET (gene che codifica per il dominio SET di una proteina nucleare), CCND1 (gene che codifica per la ciclina D1), CCND2 (gene che codifica per la ciclina D2), CCND3 (gene che codifica per la ciclina D3), e c-MAF (fattore

di trascrizione che iper trascrive la ciclina D2), determinando la sovraespressione dell'oncogene. Nel restante 55% dei casi, invece, si osservano trisomie di due o più dei cromosomi dispari 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21 che portano a un quadro di iperdiploidia. Tuttavia, durante l'evoluzione da MGUS a MM si verifica un accumulo di mutazioni secondarie riguardanti la proliferazione, la resistenza all'apoptosi e l'immortalizzazione e tra esse si evidenzia la traslocazione riguardante i cromosomi 8 e 14 con coinvolgimento dell'oncogene MYC che viene così iperespresso (Walker et al. 2013). Altri eventi genici secondari sono delezioni in regioni che codificano per oncosoppressori, come p53 (17p13) e l'inibitore delle cicline CDKN2C (1p32), mutazioni attivanti K-Ras o N-Ras, che sembra possano segnare, se non addirittura mediare, la transizione da MGUS a MM e l'inattivazione di geni che regolano la via di segnalazione di NF- $\kappa$ B (Bolli et. al 2014, Chng et al. 2007).

## **1.2 Le alterazioni metaboliche dei tumori**

I tumori sono malattie caratterizzate da molteplici alterazioni che si verificano a livello genomico, epigenomico, trascrittomico, proteomico e metabolico. Nelle cellule tumorali, incluse le cellule di MM, la regolazione di vie metaboliche è alterata per garantire la disponibilità di una quantità di energia sufficiente alla proliferazione e alla sopravvivenza cellulare, alla crescita del tumore e alla possibilità di sfuggire al sistema immunitario. In questo contesto la glicolisi aerobia, anche chiamata "effetto Warburg", che converte il glucosio in acido lattico anche in presenza di ossigeno, e la glutaminolisi, che produce prima glutamato (Glu, E) e poi  $\alpha$ -chetoglutarato ( $\alpha$ -KG) a partire dalla glutamina (Gln, Q), sono le principali vie metaboliche coinvolte (Gavriatopoulou et al. 2021, Hanahan et al. 2011).

La glicolisi è il processo che converte il glucosio internalizzato tramite i trasportatori della famiglia GLUT in piruvato passando attraverso una serie di intermedi. Successivamente, nelle cellule eucariotiche il piruvato può essere metabolizzato attraverso due vie: la respirazione aerobia, per la quale il piruvato viene trasportato all'interno dei mitocondri e decarbossilato per produrre acetil Co-A, e la fermentazione anaerobica, in cui il piruvato accetta

un idrogeno dal NADH per produrre lattato e NAD<sup>+</sup>. Il rendimento energetico della glicolisi anaerobia è molto inferiore rispetto a quello della controparte che si verifica in presenza di ossigeno ma è stato dimostrato che numerosi tipi di cellule maligne sfruttano preferenzialmente la via anaerobica anche in presenza delle condizioni ottimali per la respirazione aerobia e tale processo è noto come “effetto Warburg” o glicolisi aerobia (Rizzieri et al. 2019, Campbell et al. 2012). La glicolisi aerobia è up-regolata nelle cellule tumorali attraverso cambiamenti genetici o epigenetici stabili in quanto è stato osservato che, quando le cellule vengono coltivate, mantengono i loro fenotipi metabolici anche in presenza di normali concentrazioni di ossigeno o, addirittura, in condizioni iperossiche (Gatenby et al. 2004).

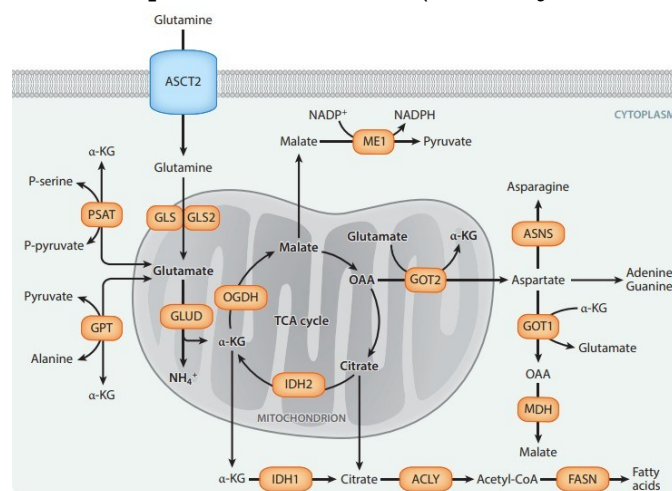
Tuttavia, *in vivo*, il microambiente di numerosi tumori è effettivamente ipossico. L'ipossia determina l'attivazione del fattore di trascrizione inducibile dall'ipossia (HIF-1) che determina l'aumento dell'espressione dei trasportatori e del metabolismo del glucosio, degli enzimi coinvolti nel metabolismo del piruvato e la produzione di lattato, che viene esportato dalla cellula. In ipossia la subunità  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) non viene degradata ma trasloca nel nucleo, si associa alla subunità  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ), costitutivamente presente a livello nucleare, e si lega alle sequenze HRE (Hypoxia Responsive Elements) che si trovano a monte di una serie di geni coinvolti nell'apoptosi, nell'angiogenesi e nel metabolismo (Chowdhury et al. 2009). È stato dimostrato che le cellule di MM sovraesprimono HIF-1 $\alpha$  e che l'ipossia gioca un ruolo fondamentale nella resistenza ai farmaci (Storti et al. 2013). È importante sottolineare che HIF-1 viene indotto non solo dall'ambiente ipossico ma anche dall'espressione degli oncogeni RAS e MYC, che ricordiamo essere coinvolti negli eventi secondari tipici del MM (Denko 2008).

### **1.2.1 Il ruolo della Gln nel metabolismo tumorale**

La Gln è l'aminoacido più abbondante nel plasma umano, con una concentrazione che varia da 450 a 800  $\mu$ M, ed è cruciale non solo per il mantenimento e la promozione delle normali funzioni cellulari ma anche per la stimolazione della produzione di citochine e della proliferazione e differenziazione delle cellule tumorali (Yang et al. 2017, El Ansari et al.

2018). La Gln fornisce l'azoto per la biosintesi di basi azotate, nicotinammide adenin dinucleotide (NAD), asparagina (Asn, N) ed esosamine e il carbonio per il ciclo di Krebs (anaplerosi), la sintesi dei lipidi e dei nucleotidi (Hirshey et al. 2015).

Nonostante la Gln non sia considerata un aminoacido essenziale, lo diventa per alcuni tipi di cellule neoplastiche in attiva proliferazione al punto da poterle definire "glutamine addicted" in quanto sviluppano una forte dipendenza da tale aminoacido che viene consumato in elevata quantità (El Ansari et al. 2018). L'uso di Gln come fonte di energia e substrato anaplerotico da parte delle cellule tumorali è in linea con il fatto che la sua concentrazione all'interno di tali cellule (2-20 mM) è maggiore rispetto a quella degli altri aminoacidi (Scalise et al. 2020). La sovraespressione dell'oncogene c-MYC è sufficiente per indurre la dipendenza da Gln in quanto tale mutazione provoca un'alterazione del metabolismo mitocondriale portando le cellule a utilizzare Gln nonostante il glucosio sia disponibile. c-MYC si lega alle regioni promotrici dei trasportatori di Gln ad alta affinità, tra cui ASCT2 (trasportatore di aminoacidi neutri sodio-dipendente di tipo 2, codificato dal gene *SLC1A5*) e SN2 (isoforma del sistema N, codificato da *SLC38A5*), determinando un maggiore assorbimento di Gln (Yang et al. 2017). Inoltre, promuove l'espressione dell'enzima glutaminasi (GLS) che è responsabile del catabolismo della Gln ad ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) e Glu (glutaminolisi), il quale viene poi ossidato dalla glutamato deidrogenasi (GDH o GLUD) a  $\alpha$ -KG che può entrare nel ciclo di Krebs, la principale via catabolica che media la produzione di ATP (Hirshey et al. 2015).



**Figura 2. Anaplerosi da Gln nel ciclo di Krebs** (Yang et al.2017)

## 1.2.2 La sintesi della Gln

Le cellule possono acquisire Gln dal compartimento extracellulare attraverso diversi sistemi di trasporto oppure sintetizzarla *de novo* grazie all'enzima Glutamina Sintetasi (GS) a partire da Glu e ammonio, utilizzando l'energia derivante dall'idrolisi di una molecola di ATP (Kim et al. 2021). GS, codificata dal gene *GLUL* localizzato sul cromosoma 1q23, è un decamero composto da due anelli pentamerici identici tenuti insieme da interazioni di van der Waals e legami a idrogeno che presenta dieci siti attivi situati all'interfaccia tra le subunità adiacenti che compongono il pentamero (Krajewski et al. 2008). In alcuni tessuti GS è regolata attraverso cambiamenti di espressione del gene codificante *GLUL* mentre, a livello proteico, l'abbondanza dell'enzima è regolata in modo inversamente proporzionale alla disponibilità di aminoacido.



**Figura 3. Modelli della struttura di GS cristallizzata.**

(Immagine tratta da NCBI, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/2QC8>).

Alcuni anni fa il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che nelle cellule di MM GS è espressa a livelli trascurabili o è addirittura assente per cui soddisfano il loro fabbisogno dell'aminoacido esclusivamente grazie alla Gln extracellulare e, conseguentemente, possono essere considerate auxotrofe per la Gln. Tuttavia, le cellule di MM sono anche “glutamine addicted” in quanto internalizzano grandi quantità di tale aminoacido a scopo anaplerotico e, contrariamente a quanto evidenziato per l'espressione di GS, presentano un'elevata espressione di GLS la quale determina il catabolismo della Gln a Glu e  $\text{NH}_4^+$  che vengono

rilasciati a livello extracellulare determinando, da un lato, iperammonemia e alti livelli di Glu e, dall'altro, un abbassamento significativo dei livelli di Gln nel midollo osseo dei pazienti (Bolzoni et al. 2016).

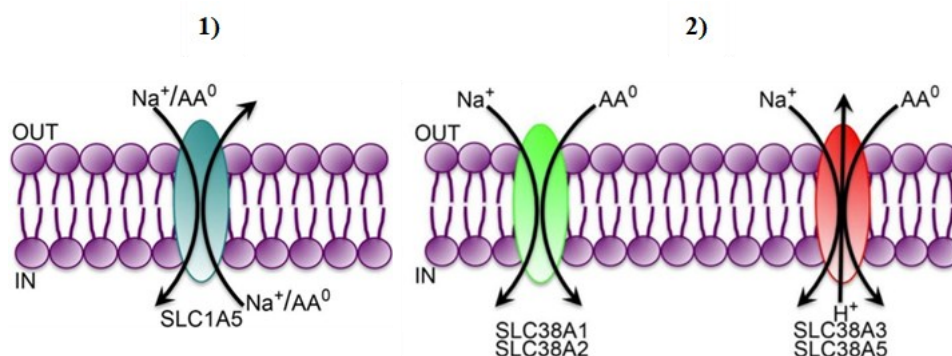
### **1.2.3 I trasportatori della Gln**

Vista l'idrofilia della Gln, tale aminoacido non è in grado di attraversare per diffusione semplice la membrana plasmatica delle cellule ma richiede l'attività di trasportatori. Attualmente sono stati identificati quattordici trasportatori di membrana appartenenti a quattro famiglie distinte di SLC (SoLuteCarrier), SLC1, SLC6, SLC7 e SLC38, aventi tra i loro possibili substrati la Gln. È possibile distinguerli in Na<sup>+</sup>-dipendenti e Na<sup>+</sup>-indipendenti (Bhutia et al. 2016) a seconda delle loro caratteristiche bioenergetiche e operative. I simporti Na<sup>+</sup>-dipendenti hanno la funzione di importare Gln nelle cellule grazie al gradiente di potenziale elettrochimico del catione, e ciò consente l'accumulo dell'aminoacido contro gradiente, mentre gli antiporti consentono l'efflusso o l'ingresso di Gln da specifici tessuti. In particolare, tra i sistemi che effettuano un co-trasporto Na<sup>+</sup>-Gln, e quindi considerabili trasportatori attivi secondari, si evidenziano SNAT1 e SNAT2 mentre, tra gli antiporti, SNAT5 e l'omologo SNAT3 catalizzano flussi Na<sup>+</sup>-Gln accoppiati a un flusso di H<sup>+</sup> in direzione opposta. Uno scambiatore obbligato Na<sup>+</sup>-indipendente è rappresentato da LAT1 (Pochini et al. 2014) che media un flusso in ingresso di un aminoacido in scambio con un altro (o lo stesso) aminoacido.

ASCT2 (*SLC1A5*) è un trasportatore avente come substrati gli aminoacidi neutri alanina, serina, cisteina, treonina e Gln ed è in grado di mediare sia l'ingresso che l'efflusso di Gln a seconda del gradiente di concentrazione dei substrati. Lo scambio mediato da tale trasportatore prevede l'ingresso di Na<sup>+</sup> accoppiato a un aminoacido e l'efflusso obbligato di Na<sup>+</sup> accoppiato a un altro substrato aminoacidico. ASCT2 è iperespresso nella quasi totalità dei tumori umani sostenendo evidentemente la proliferazione delle cellule tumorali anche in modo accoppiato con i trasportatori sodio-indipendenti LAT1 (*SLC7A5*), che media flussi di Gln in cambio di leucina, e xCT (*SLC7A11*), che, in condizioni fisiologiche, media l'efflusso di Glu (derivato da Gln) in scambio di cistina (dimero ossidato della cisteina) (Bhutia et al. 2016). Considerando la

collaborazione tra ASCT2 e xCT, è interessante evidenziare che l'oncogene c-MYC, che induce nelle cellule tumorali ASCT2 e xCT, determina anche l'espressione di GLS massimizzando l'accoppiamento tra i due trasportatori in quanto la Gln internalizzata viene convertita a  $\text{NH}_4^+$  e Glu, il quale alimenterebbe l'ingresso di cistina mediato da xCT (Bhutia et al. 2015). Tuttavia, tale modello richiede comunque un accumulo aminoacidico che può essere giustificato solamente dal funzionamento dei sistemi attivi, quali SNAT1 e SNAT2. Questi trasportatori, codificati rispettivamente dai geni *SLC38A1* e *SLC38A2*, sono espressi ubiquitariamente, anche se a livelli variabili, nei tessuti dei mammiferi e riferibili al cosiddetto sistema "A" in quanto sono  $\text{Na}^+$ -dipendenti, selettivi per gli aminoacidi neutri e inibiti quando il pH extracellulare è basico. I trasportatori del sistema "A" co-transportano  $\text{Na}^+$  e un aminoacido con stechiometria 1:1; in particolare, SNAT1 mostra una preferenza relativa per la Gln e l'alanina mentre SNAT2 per la prolina (Mackenzie et al. 2004).

SNAT5 (*SLC38A5*) è uno dei sottotipi del sistema "N" aventi come substrati la Gln, l'istidina e l'Asn (tutti aminoacidi con azoto ("N") nella catena laterale) e anch'esso è sensibile al pH extracellulare. I trasportatori del sistema "N" mediano il passaggio di  $\text{Na}^+$  e di un aminoacido in una direzione accoppiato al trasferimento di  $\text{H}^+$  nella direzione opposta, fenomeno che impatta sul pH intracellulare e ne è a sua volta influenzato (Mackenzie et al. 2004). Le cellule tumorali sono maggiormente a rischio di acidificazione intracellulare a causa della loro spiccata attività glicolitica che determina la produzione di acido lattico, per cui può essere vantaggioso per tali cellule prevenire questo fenomeno up-regolando SNAT5 e importando Gln (Sniegowski et al. 2021) in "scambio" con  $\text{H}^+$ .



**Figura 4. 1) Trasportatore ASCT2. 2) Trasportatori della famiglia di geni SLC38 (SNAT1, SNAT2 e SNAT5) (Bhutia et al. 2016).**

### **1.3 I trasportatori del Glu**

Il Glu è un aminoacido carico negativamente, è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale (SNC) e, una volta che è stato internalizzato dalle cellule, può essere utilizzato per scopi metabolici, come la sintesi proteica, oppure come trasmettitore attraverso il ciclo Glu/Gln (Olivares-Bañuelos et al. 2019). I trasportatori sodio-dipendenti del Glu, anche chiamati EAAT (Excitatory Amino Acid Transporter), appartengono alla famiglia SLC1 e nel proteoma umano ne sono stati individuati cinque sottotipi (EAAT1-5). Essi trasportano Glu insieme a 3 molecole di Na<sup>+</sup> e un H<sup>+</sup> seguito dal trasporto in direzione opposta di uno ione K<sup>+</sup> (Vandenberg et al. 2013), rappresentando i carrier attivi secondari più energizzati tra quelli conosciuti.

È stato scoperto dal nostro gruppo di ricerca che il Glu è uno degli aminoacidi maggiormente consumati dalle cellule stromali mesenchimali (MSC) del midollo osseo, soprattutto in condizioni di ipossia, ed è stato dimostrato che tale condizione, caratteristica del microambiente midollare anche nel contesto tumorale del MM, determina l'iper-espressione di EAAT3 (*SLC1A1*) nelle MSC. Coerentemente con tale scoperta, anche i livelli intracellulari di Glu sono risultati aumentati a bassa pressione di O<sub>2</sub> (Taurino et al. 2022).

### **1.4 Le cellule stromali mesenchimali**

Per “nicchia” si intende un microambiente tissutale locale e specializzato costituito da componenti che regolano il destino delle cellule staminali progenitrici e ne consentono lo sviluppo fornendo i fattori necessari. La nicchia del midollo osseo ha un'architettura ben definita ed è composta da cellule immunitarie, osteoblasti, osteoclasti, cellule endoteliali, cellule stromali, adipociti e proteine della matrice extracellulare (ECM) (Basak et al. 2009).

Le MSC sono cellule staminali multipotenti che sono state identificate per la prima volta nello stroma del midollo osseo alla fine degli anni '60 da Friedenstein e ulteriormente caratterizzate nei primi anni '90 (Friedenstein et al. 1970, Caplan 1991). Esse possono essere isolate da diversi tessuti, tra cui il midollo osseo, il cordone ombelicale e il tessuto adiposo (Taurino et al. 2022). La

procedura di isolamento delle MSC comprende la digestione del tessuto mediante collagenasi, la rimozione dei detriti mediante filtrazione della sospensione cellulare e la centrifugazione in gradiente di densità per ottenere la frazione di cellule mononucleate che vengono poi coltivate in piastre di coltura con aggiunta di siero (FBS) o di fattori di crescita (Seo et al. 2005).

Secondo l'International Society for Cellular Therapy (ISCT), le MSC umane, per essere definite tali, devono possedere i marcatori di superficie CD105, CD73 e CD90 e in un medium di coltura convenzionale devono crescere aderenti alla plastica (Dominici et al. 2006). Esse sono in grado di differenziarsi in osteoblasti, adipociti e condrociti. Per consentire il differenziamento osteogenico vengono utilizzati medium supplementati con desametasone (Dex),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP) e acido ascorbico (ASC), mentre per quello adipogenico sono necessari Dex, insulina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) e indometacina (INDO) (Ding et al. 2011).

Nel contesto del MM è stato scoperto che le MSC del midollo osseo supportano fortemente la crescita delle cellule di MM, producendo un alto livello di interleuchina 6 (IL-6, principale fattore di crescita per le cellule di MM), ma anche l'osteoclastogenesi e l'angiogenesi. Inoltre, possono determinare l'aumento dell'adesione delle cellule di MM alla matrice del midollo osseo proteggendole dalla chemioterapia e favorendo il loro accumulo (Corre et al. 2007, Reagan et al. 2012).

### **1.4.1 Gli osteoblasti**

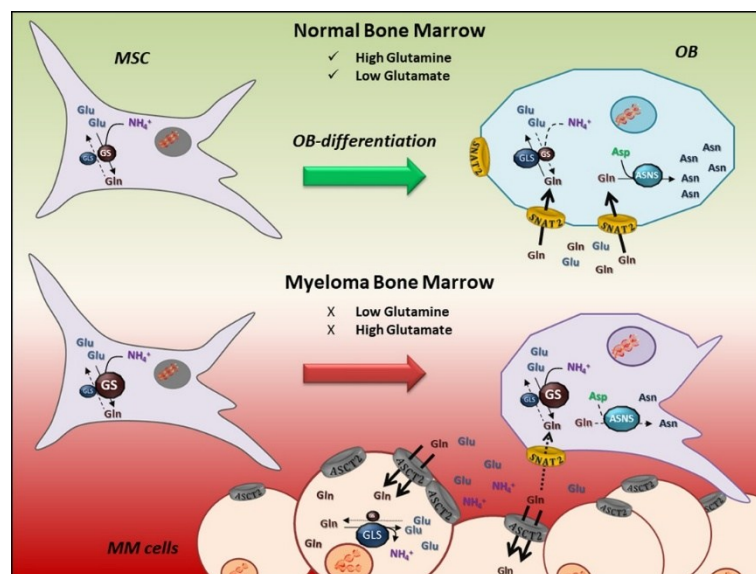
Gli osteoblasti sono cellule mononucleate di forma cubica che derivano da MSC pluripotenti, rispondono a stimoli locali e sistemici e hanno un ruolo centrale nella mineralizzazione e nel rimodellamento osseo (Roodman 2004). Gli osteoblasti secernono proteine della matrice ossea, tra cui collagene di tipo 1 $\alpha$ 1 (COL1 $\alpha$ 1), osteocalcina (OC) e fosfatasi alcalina (Alp), e, una volta terminato il loro lavoro di deposizione ossea, possono avere tre possibili destini che consistono nell'andare incontro ad apoptosi, nel diventare cellule del rivestimento osseo o nel diventare osteociti (Hadjidakis et al. 2007). In particolare, è la via Wnt/ $\beta$ -catenina a determinare il destino della cellula, la

proliferazione e la sopravvivenza attraverso l'aumento dei livelli di  $\beta$ -catenina e la conseguente regolazione dell'espressione genica mediata dal fattore di trascrizione Lef/Tcf. L'attivazione di questa via avviene in seguito al legame di Wnt con i recettori transmembrana Frizzled (Fz) e con il recettore delle lipoproteine a bassa densità 5/6 (LPR5/6). In assenza del ligando il livello di  $\beta$ -catenina viene mantenuto basso dalla sua fosforilazione e degradazione (Caetano-Lopes et al. 2007). La mancanza di  $\beta$ -catenina inibisce l'espressione di Osterix (Osx), un fattore di trascrizione espresso negli osteoblasti necessario per la formazione ossea in quanto media la produzione di COL1 $\alpha$ 1 (Hartmann 2006). Tuttavia, tale via è inibita da DKK1, una proteina che viene iper-espressa e secreta anche dalle cellule di MM che ha l'effetto di inibire la differenziazione osteoblastica legandosi al recettore LPR5/6 (Xu et al. 2021). I livelli di espressione genica e i livelli sierici di DKK1 sono correlati con l'entità della malattia ossea (Terpos et al. 2017).

Anche le alterazioni metaboliche associate al MM possono influenzare le cellule del microambiente midollare alterando il processo di differenziamento delle MSC ad osteoblasti (Chiu et al. 2020, Raimondi et al. 2022). Le lesioni osteolitiche tipiche del MM derivano da un aumento del riassorbimento osseo dovuto alla stimolazione della formazione e dell'attività degli osteoclasti che si verifica in stretta prossimità delle cellule di MM. Quindi, nei pazienti che presentano lesioni ossee il processo di rimodellamento osseo è gravemente sbilanciato a favore del riassorbimento osseo mentre la formazione ossea è ridotta o addirittura assente (Giuliani et al. 2006).

Inoltre, è stato dimostrato che la Gln contribuisce alla produzione dell'energia necessaria per la biosintesi della matrice osteogenica nei precursori degli osteoblasti in quanto viene convertita in citrato e utilizzata per produrre energia a livello mitocondriale (Karner et al. 2015). Quindi, alterazioni del metabolismo energetico delle cellule ossee causate dalla diversa disponibilità di metaboliti nel microambiente del MM compromettono la loro differenziazione e funzione. Infatti, è stato osservato dal nostro gruppo di ricerca che il differenziamento delle MSC in senso osteoblastico è compromesso dalla deplezione di Gln nel midollo osseo che, inoltre, causa una progressiva espressione di GS, fattore che inibisce il differenziamento osteogenico. I marcatori osteoblastici vengono invece indotti quando GS viene silenziata. Inoltre, il differenziamento delle MSC ad

osteoblasti è associato a un aumento dell'espressione di GLS, di SNAT2 e di asparagina sintetasi (ASNS), l'enzima in grado di sintetizzare da Gln e aspartato (Asp) l'Asn. Questo aminoacido è in grado di ripristinare il differenziamento osteoblastico delle MSC in carenza di Gln; fenomeno che suggerisce un possibile ruolo di Asn nella prevenzione delle malattie ossee nei pazienti con MM (Chiu et al. 2020).



**Figura 5. La deplezione di Gln nel midollo osseo compromette il differenziamento delle MSC in senso osteoblastico (Chiu et al. 2020).**

### 1.4.2 Gli adipociti

Gli adipociti sono i principali componenti cellulari del tessuto adiposo bianco che è implicato non solo nel controllo dell'equilibrio energetico, ma anche in numerosi processi fisiologici e patologici secernendo fattori che controllano il metabolismo del glucosio, l'appetito, le risposte immunologiche e infiammatorie e l'angiogenesi (Ali et al. 2013). Per adipogenesi si intende il processo di differenziazione dei precursori mesenchimali in preadipociti con arresto della crescita dovuto all'inibizione da contatto. Successivamente rientrano nel ciclo cellulare grazie a una stimolazione ormonale alla quale seguono vari cicli di divisione cellulare (espansione clonale mitotica) e infine si ha la differenziazione terminale con la formazione di adipociti maturi che sono ricchi di trigliceridi e reattivi all'insulina (Lefterova et al. 2009). Il recettore nucleare  $\gamma$  attivato dal

proliferatore del perossisoma (PPAR $\gamma$ ) ha un ruolo centrale nella cascata trascrizionale che regola l'adipogenesi ed è essenziale per il mantenimento dello stato differenziato (Rosen et al. 2006).

Il tessuto adiposo del midollo osseo (BMAT) è una componente importante del microambiente midollare che, sebbene considerato tradizionalmente un riempitivo passivo della cavità del midollo osseo, è oggi riconosciuto come fattore attivo con interazioni dinamiche con altre componenti cellulari. Infatti, gli adipociti del midollo osseo coesistono insieme alle popolazioni di cellule ematopoietiche e stromali all'interno del midollo influenzandone il comportamento e la funzione (El-Masri et al. 2024).

In un paziente con MM gli adipociti occupano il 70% del volume cellulare all'interno del midollo osseo. Gli adipociti associati al cancro (CAA) supportano la progressione del tumore tramite la secrezione di citochine e adipochine le quali contribuiscono a originare uno stato di infiammazione sistemica cronica di basso grado contribuendo alla perdita ossea mediata dall'infiammazione (Panaroni et al. 2022). Nel MM adipochine come la leptina, l'IL-6 e l'adiponectina sono attori chiave nella progressione. L'adiponectina, nota per le sue proprietà antiinfiammatorie e antiossidanti, viene sintetizzata principalmente dal tessuto adiposo ed è coinvolta nella regolazione del metabolismo del glucosio e dei lipidi e nella modulazione della sensibilità all'insulina (China et al. 2018, Patané et al, 2013). Inoltre, promuove la proliferazione e il differenziamento osteoblastico mentre inibisce l'osteoclastogenesi (Oshima et al. 2005); livelli ridotti di adiponectina sierica sono correlati non solo a un aumentato rischio di sviluppare la malattia, ma anche a una maggiore possibilità di progressione da MGUS a MM attivo (Dalamaga et al. 2008, Hofmann et al. 2017). Invece, la leptina e l'IL-6 inducono la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali. La leptina è responsabile della riduzione degli effetti antitumorali della chemioterapia tramite l'attivazione dei percorsi AKT e JAK/STAT3 mentre l'IL-6 determina la resistenza ai farmaci attraverso proteine di modulazione epigenetica (Marques-Mourlet et al. 2023). Inoltre, gli adipociti del midollo osseo sono in grado di attivare percorsi autofagici e di iper-esprimere proteine autofagiche mitigando l'apoptosi indotta dalla chemioterapia nelle cellule di MM (Liu et al. 2015).

Inoltre, è noto che le cellule di MM inibiscono la differenziazione e la funzione degli osteoblasti ma al contempo stimolano le MSC a differenziarsi in adipociti. A loro volta i preadipociti e gli adipociti maturi originatisi in tale contesto reclutano direttamente le cellule di MM attraverso chemochine, tra cui MCP1 (proteina chemiotattica dei monociti) e SDF1 $\alpha$  (fattore derivato dalle cellule stromali), e altre citochine, mentre secernono molecole che supportano le cellule tumorali. È stato inoltre evidenziato che co-coltivando i preadipociti e le cellule di MM, queste ultime hanno una maggiore capacità di migrazione rispetto a quando vengono coltivate in monocultura o co-coltivate con adipociti maturi (Trotter et al. 2016).

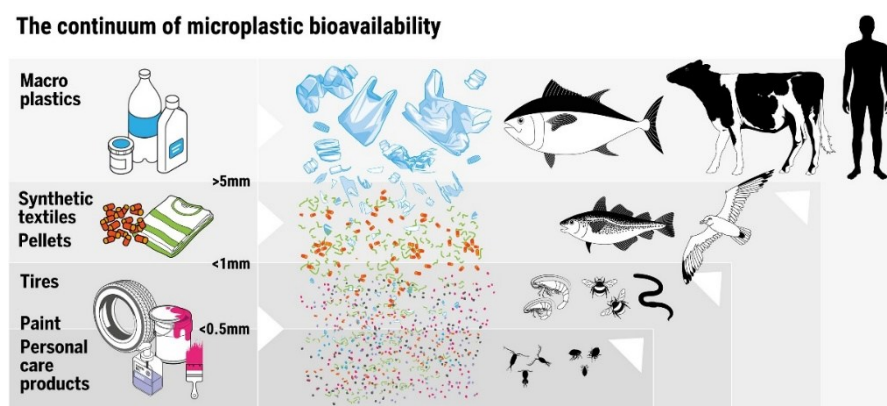
Infine, sempre grazie a saggi di co-coltura, è stato osservato un aumento della proliferazione delle cellule di MM indotto dagli adipociti in MGUS e SMM rispetto al MM di nuova diagnosi (Panaroni et al. 2022).

## **1.5 Le nanoplastiche**

Il termine “plastica” si riferisce a qualsiasi materiale contenente un polimero ad alto grado di polimerizzazione come componente principale, il quale può essere rappresentato da polietilene (PE), polipropilene (PP), polistirene (PS), cloruro di polivinile (PVC), polietilene tereftalato (PET), policarbonato (PC), poliuretano (PU) o polimetilmetacrilato (PMMA). Dalla degradazione (inevitabilmente associata a fattori ambientali come i raggi UV) delle plastiche possono derivare le microplastiche (MPs) e le nanoplastiche (NPs) che vengono definite come particelle aventi almeno una dimensione inferiore a 5 mm nel caso delle MPs o a 100 nm nel caso delle NPs (Hirt et al. 2020).

MPs e NPs sono microscopici inquinanti ambientali derivanti dalle attività umane ormai ampiamente presenti nell'aria e nell'acqua i quali entrano nella catena alimentare tramite inalazione e ingestione rappresentando una potenziale minaccia per la salute umana. Tali contaminanti sono già stati rilevati nei tessuti di più di 1300 specie acquatiche e terrestri comprendenti sia gli invertebrati che i predatori più evoluti (Thompson et al. 2024). NPs di PET, PS o PE sono state rilevate nel sangue di donatori umani a una concentrazione

media di 1,6 µg/ml di sangue, mentre le MPs sono state individuate in campioni di placenta umana (Leslie et al. 2022, Ragusa et al. 2021).



**Figura 6. Inquinamento da microplastiche e nanoplastiche: fonti e impatti.**  
(Thompson et al. 2024)

Conformemente al comportamento di altri materiali, è stato dimostrato che le NPs hanno effetti più severi in termini di infiammazione, di alterazione degli acidi biliari e del metabolismo dei carboidrati e di inibizione della motilità intestinale rispetto a MPs (Kuai et al. 2024). La causa più probabile della maggiore pericolosità delle NPs potrebbe risiedere nella loro capacità di penetrare la membrana plasmatica cellulare mentre le MPs di dimensioni maggiori resterebbero soltanto adese ad essa. Inoltre, è noto che le NPs, grazie alla loro elevata SSA (Area Superficiale Specifica) possono adsorbire proteine e altri composti che originano la cosiddetta “corona”, la quale è in grado di influenzare il destino della particella e l’interazione con altre cellule, come i macrofagi, i quali possono internalizzare una varietà di MPs e NPs (Bianchi et al. 2025).

È stato dimostrato che le NPs sono in grado di penetrare nel midollo osseo inducendo tossicità sui tessuti ematopoietici che si manifesta in termini di disordine nell’organizzazione delle cellule del midollo osseo, riduzione della capacità di formazione delle colonie, auto-rinnovamento e differenziamento e aumento della percentuale di linfociti (Jing et al. 2022). Inoltre, esse determinano un’over-produzione di specie reattive dell’ossigeno (ROS) in modelli animali, tra cui zebrafish, in cellule ossee murine e in linee cellulari umane.

L'aumento della produzione di ROS e/o la diminuzione delle difese antiossidanti possono causare danni alle strutture cellulari al punto da generare una situazione di stress ossidativo. Uno degli impatti più rilevanti dell'overproduzione di ROS è la distruzione dell'integrità ossea, poiché essi sono coinvolti nel rimodellamento osseo rallentando la deposizione e accelerando il riassorbimento. In colture di cellule ossee murine è stato osservato che le NPs di PS ostacolano la capacità migratoria dei pre-osteoblasti, influenzano l'espressione genica delle vie osteogeniche e stimolano l'osteoclastogenesi nei precursori dei pre-osteoclasti (Giannandrea et al. 2024). Inoltre, in modelli murini è stato osservato che l'ablazione genetica di *Sod1*, l'isoforma citoplasmatica della superossido dismutasi (CuZn-SOD), ha un ruolo soppressivo sulla proliferazione, sopravvivenza e funzione osteoblastica determinando al contempo anche la riduzione del numero di osteoclasti e dell'area superficiale erosa, indicando che la carenza di tale enzima compromette anche il riassorbimento osseo originando, quindi, un rimodellamento osseo a basso turnover (Nojiri et al. 2011).

## **2. Scopo della tesi**

Sviluppando le ricerche sul mieloma compiute negli anni scorsi dal gruppo di ricerca in cui ho svolto il Dottorato, ho studiato il ruolo delle cellule mesenchimali stromali nel metabolismo della glutamina del mieloma multiplo, caratterizzando i meccanismi attraverso cui queste cellule sostengono il metabolismo delle cellule neoplastiche e sono indotte a un differenziamento in senso adipocitario.

L'interesse per le cellule mesenchimali stromali del midollo osseo e, in particolare, per le loro capacità differenziative, mi ha poi portato ad indagare se le nanoplastiche di polistirene possano modificarle e se, in questo caso, alterazioni del metabolismo della glutamina possano essere coinvolte.

## **3. Materiali e metodi**

### **3.1 Reagenti**

Le NPs di PS (Fluoro-Max™ Green Fluorescent Polymer Microspheres, 100 µg/ml), aventi forma sferica e diametro di 50 nm, utilizzate per gli esperimenti sono state acquistate da Thermo Fisher Scientific, il siero fetale bovino (FBS) da Lonza, Basel, Svizzera, mentre tutti gli altri reagenti dalla Sigma-Aldrich dove non specificato altrimenti.

### **3.2 Colture cellulari**

Per gli esperimenti sono state usate le linee cellulari di mieloma multiplo umano (HMCL), MM1.S, RPMI8226, JLN3 e U266, tutte ottenute dalla European Collection of Cell Cultures, e cellule staminali mesenchimali primarie (MSC), acquistate presso CliniSciences, o immortalizzate (hTERT-MSC), fornite dal dott. Dario Campana (S. Jude Hospital, Memphis, TN, USA). Le HMCL sono state coltivate in medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Euroclone) 1640 a cui sono stati aggiunti gli antibiotici penicillina (100 U/mL) e streptomicina (100 µg/mL), FBS al 10% e Gln (4 mM). Le MSC e le hTERT-MSC sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Euroclone) a bassa concentrazione di glucosio (1.0 g/L) a cui sono stati aggiunti gli antibiotici penicillina (100 U/mL) e streptomicina (100 µg/mL), FBS al 10% e Gln (4 mM). Dopo lo scongelamento le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>, il 20% di O<sub>2</sub>. Le MSC sono state utilizzate fino al 6° passaggio.

### **3.3 Co-culture**

Per valutare gli effetti delle MSC sulla vitalità delle cellule di mieloma, le HMCL RPMI8226, MM1.S e JLN3 sono state co-coltivate con le MSC in piastre da 24 pozzetti tramite l'utilizzo di transwell (dimensioni dei pori 0.4 µm; Corning, Life Sciences, Amsterdam, The Netherlands), membrane porose che permettono alle cellule tumorali di trovarsi nello stesso ambiente in cui si trovano le MSC senza venire a contatto con esse ma consentendo uno scambio di soluti. In particolare,

nel compartimento basale sono state seminate 50.000 MSC/pozzetto e incubate per 24h. Successivamente, il medium di coltura è stato sostituito con medium addizionato solo di antibiotici e FBS a cui sono stati aggiunti ulteriori fattori a seconda dei protocolli sperimentali. Dopo aver posizionato i transwell in ogni pozzetto della piastra, sono state seminate al loro interno (compartimento apicale) le cellule di MM (250.000 cellule/pozzetto) e le co-culture sono state incubate a 37°C per 72h.

### 3.4 Vitalità: il metodo della Resazurina

La vitalità delle HMCL è stata misurata utilizzando la Resazurina, un colorante blu non fluorescente che dopo essere stato ridotto dalle cellule metabolicamente attive diventa fluorescente e di colore rosa (Neha Mehlawat et al. 2024). In particolare, i transwell contenenti le cellule di MM sono stati spostati in una nuova piastra da 24 pozzetti ed è stata aggiunta al loro interno una soluzione costituita da Resazurina (44 µM) e DMEM a bassa concentrazione di glucosio addizionato solo di antibiotici. La piastra è stata, quindi, incubata per 3h a 37°C e al termine dell'incubazione è stata misurata la fluorescenza a una lunghezza d'onda di emissione  $\lambda = 572$  nm. L'intensità della fluorescenza, proporzionale al numero di cellule vive, è stata determinata grazie a un fluorimetro (Enspire® Multimode Plate Reader, Perkin Elmer, Boston MA, USA) e l'indice di protezione (PI) è stato calcolato secondo la seguente formula:

$$PI = \text{Log}_2 \frac{\text{Diminuzione \% della vitalità delle cellule MM in assenza di MSC}}{\text{Diminuzione \% della vitalità delle cellule MM in presenza di MSC}}$$

Dove PI = 0 indica l'assenza di protezione.

Per la determinazione della vitalità delle hTERT-MSC, sono state seminate in una piastra da 24 pozzetti 6.000 cellule/pozzetto che sono state mantenute per 24h a 37°C in DMEM addizionato di Gln (4 mM) e 10% di FBS. Successivamente, sono state incubate per 72h in DMEM addizionato di Gln e FBS in assenza o in presenza di concentrazioni crescenti di NPs (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL). Al termine dell'incubazione è stata preparata e aggiunta in ciascun pozzetto una soluzione costituita da Resazurina (concentrazione finale 44 µM) in DMEM a bassa concentrazione di glucosio addizionato solo di antibiotici e la

piastra è stata incubata per 3h a 37°C. Successivamente, è stata misurata la fluorescenza e la vitalità cellulare, espressa in percentuale rispetto al controllo non trattato (CV%), è stata ottenuta dal rapporto tra la fluorescenza emessa dalle cellule trattate e non trattate secondo la seguente formula:

$$CV\% = \frac{\text{Fluorescenza (cellule trattate)}}{\text{Fluorescenza (cellule di controllo)}} \times 100$$

### **3.5 Differenziamento cellulare**

#### **3.5.1 Differenziamento osteoblastico**

Per indurre il differenziamento in senso osteoblastico sia delle MSC che delle hTERT-MSC le cellule sono state seminate in piastra da 6 pozzetti (20.000 cellule/pozzetto) e incubate per 14 giorni in medium “osteogenico”, consistente in DMEM addizionato di ASC (50 µg/mL), Dex (10<sup>-8</sup> M), 10% FBS e Gln (2 mM). Ogni tre giorni, metà del terreno è stato sostituito con terreno fresco. Dopo 14 giorni, è stata valutata l’espressione dei marker di differenziamento osteoblastico *ALPL*, *COL1A1* e *SPARC* tramite RT-PCR.

#### **3.5.2 Differenziamento adipocitario**

Per indurre il differenziamento in senso adipocitario delle MSC sono state seminate in una piastra da 6 pozzetti 70.000 cellule/pozzetto che sono state incubate per 14 giorni in medium addizionato di 10% di FBS, IBMX (500 µM), INDO (5 µM), Dex (50 µM) e insulina ricombinante umana (10 µg/mL). Ogni tre giorni metà del terreno contenuto in ogni pozzetto è stato sostituito con terreno fresco e al 14esimo giorno è stata valutata l’espressione dei marker di differenziamento adipocitario *PPARG*, *LEP* e *ADIPOQ* tramite RT-PCR.

## 3.6 Silenziamento genico

Per effettuare gli esperimenti di silenziamento genico è stata utilizzata una miscela di quattro siRNA (small interfering RNA), piccole molecole di RNA non codificante composte da 20-30 nucleotidi in grado di sopprimere l'espressione di specifici geni bersaglio tramite un meccanismo noto come RNA interference (RNAi). A tale scopo le MSC sono state seminate in piastra da 24 pozzetti (50.000 cellule/pozzetto) e incubate per 48h a 37°C. Successivamente è stato sostituito il terreno presente in ciascun pozzetto con 300 µL di terreno contenente Gln ma privo di FBS e antibiotici ai quali sono poi stati aggiunti 50 µL di terreno contenente i siRNA e il reagente di trasfezione (2.3 µL/pozzetto, HiPerFect Transfection Reagent, Quiagen) necessario per veicolare i siRNA all'interno delle cellule. A tal punto, metà piastra è stata destinata al trattamento con siRNA aventi come target *SLC1A1* (25 nM, ON-TARGETplus Human *SLC1A1* siRNA-SMARTpool™) o *GLUL* (25 nM, ON-TARGETplus Human *GLUL* siRNA-SMARTpool™) mentre nella restante parte, utilizzata come controllo, sono stati utilizzati RNA scramble (25 nM, ON-TARGETplus Non-targeting Pool™) che non hanno un gene target. Tutte le procedure sono state eseguite secondo le istruzioni del produttore e l'efficacia del silenziamento genico è stata verificata tramite valutazione dell'espressione di *GLUL* e *SLC1A1* con RT-PCR (come descritto nel paragrafo 3.14).

## 3.7 Determinazioni di aminoacidi

### 3.7.1 Glu intracellulare

Le HMCL sono state seminate in capsule Petri da 10 cm<sup>2</sup> e incubate per 24h in medium integrato con FBS dializzato al 10% e antibiotici in presenza dell'isotopo pesante della Gln (<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-glutamina 2 mM, Cambridge Isotopes Laboratories, MA, USA) per valutare il destino metabolico dell'aminoacido nelle linee di MM. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti, è stato effettuato un lavaggio con PBS (soluzione salina con tampone fosfato) freddo ed è stato estratto il contenuto intracellulare utilizzando una soluzione costituita da metanolo, acetonitrile ed acqua (5:3:1), necessaria per rompere le membrane e consentire la precipitazione delle proteine e l'estrazione

degli aminoacidi che sono stati successivamente analizzati tramite spettrometria di massa nel laboratorio del dr. Saverio Tardito (The Beatson Institute, Glasgow, UK).

### 3.7.2 Secrezione di Glu

Le HMCL MM1.S, U266, RPMI8226 e JLN3 sono state seminate (250.000 cellule/pozzetto) e incubate per 72h in RPMI addizionato con FBS dializzato (10%), Gln (2 mM) e antibiotici. Successivamente le cellule sono state centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti ed è stato prelevato il surnatante che è stato aggiunto alla soluzione utilizzata per misurare il Glu seguendo le istruzioni di un kit commerciale (Glutamate Assay Kit, Abcam, Cambridge, UK). Le cellule sono state contate all'inizio e al termine dell'esperimento e tramite la curva standard è stato possibile rapportare le nmol di Glu al numero di cellule/giorno. In breve, si è proceduto seminando i campioni e gli standard ai pozzetti di una piastra da 96 pozzetti, aggiungendo la Mix di reazione, costituita dalla soluzione madre di NADP (200X) e dalla miscela di reazione, incubando a temperatura ambiente e al buio per 30 minuti – 2h e misurando l'aumento della fluorescenza utilizzando il lettore di micro-piastre. Per ottenere il valore corretto di fluorescenza è stato sottratto il valore medio di fluorescenza del bianco dalle letture dello standard e dei campioni. La concentrazione di Glu nei campioni in esame è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Concentrazione di glutamato} = \left(\frac{B}{V}\right) \cdot D$$

Dove:

- B = quantità di Glu presente nel pozzetto del campione calcolata dalla curva standard ( $\mu\text{M}$ );
- V = volume di campione aggiunto nei pozzetti ( $\mu\text{L}$ );
- D = fattore di diluizione del campione.

### **3.7.3 Secrezione di Gln**

Per valutare la secrezione di Gln, le hTERT-MSC sono state seminate in una piastra da 12 pozzetti (10.000 cellule/pozzetto) e incubate in DMEM addizionato di Gln e FBS o in medium osteogenico. Dopo 14 giorni di differenziamento, le cellule sono state incubate per 24h con un medium privo di Gln contenente solamente gli antibiotici e per 72h con un medium integrato con FBS dializzato al 10% in presenza e in assenza di Glu (1 mM) al quale sono stati inoltre aggiunti MSO (1 mM) o D-Asp (10 mM), rispettivamente inibitori di GS e del trasportatore di aminoacidi anionici EAAT3. Al termine dell'incubazione è stato raccolto il medium da ogni pozzetto, effettuato un lavaggio con PBS freddo ed estratto il contenuto intracellulare utilizzando una soluzione costituita da metanolo, acetonitrile ed acqua (5:3:1) per essere poi sottoposto ad analisi mediante spettrometria di massa (Prof. Roberta Andreoli, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma).

### **3.7.4 Valutazione del contenuto aminoacidico intracellulare**

Per valutare il contenuto aminoacidico intracellulare, le MSC sono state seminate in una piastra da 6 pozzetti (25.000 cellule/pozzetto per l'incubazione in DMEM addizionato con Gln e FBS e 70.000 cellule/pozzetto per l'incubazione in medium adipogenico) e incubate in DMEM addizionato con Gln e FBS o in medium adipogenico. Dopo 14 giorni di differenziamento, è stato aspirato il medium da ciascun pozzetto, sono stati effettuati due lavaggi con PBS freddo ed è stato estratto il contenuto intracellulare utilizzando una soluzione costituita da metanolo, acetonitrile ed acqua (5:3:1) per essere poi sottoposto ad analisi mediante spettrometria di massa (Prof. Roberta Andreoli, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma).

### **3.8 Determinazione dell'attività dei trasportatori EAAT**

Per caratterizzare l'attività dei trasportatori EAAT (trasportatori Na<sup>+</sup>-dipendente di Glu, responsabili dell'accumulo di aminoacidi anionici all'interno delle cellule), sono stati condotti esperimenti che prevedono l'utilizzo di un substrato radioattivo marcato. In particolare, le hTERT-MSC sono state seminate in piastra da 96 pozzetti (1000 cellule/pozzetto) e incubate per 14 giorni in DMEM addizionato di Gln e FBS o in medium osteogenico. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate con soluzione di Earle (Earle's Balanced Salt Solution, EBSS: glucosio 5.5 mM, N-metilglucamina-Cl 117 mM, Tris-HCl 20 mM, rosso fenolo 2 mL, KCl 5.3 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.8 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM, ColinaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 mM) priva di Na<sup>+</sup> ed è stato valutato l'uptake dopo 1 minuto di incubazione a pH = 7.4 in EBSS (in cui NaCl e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> rimpiazzavano, rispettivamente, i corrispondenti sali di N-metilglucamina e colina) o in EBSS privo di Na<sup>+</sup>. Le soluzioni di trasporto contenevano Glu "freddo" (10 μM) e L-[3,4-<sup>3</sup>H]-Glu (10 μCi/ml) (Perkin-Elmer). I flussi transmembrana degli aminoacidi sono stati poi bloccati immergendo la piastra in urea isotonica fredda (300 mM) e il contenuto intracellulare è stato estratto con 50 μl di etanolo assoluto freddo. La radioattività di Glu contenuta negli estratti cellulari è stata misurata, previa l'aggiunta di 200 μl di liquido di scintillazione, tramite uno spettrometro a scintillazione liquida (MicroBeta2, Perkin-Elmer, Milano, Italia). Successivamente le proteine rimaste nei pozzetti sono state quantificate con un saggio di Lowry modificato permettendo di normalizzare l'uptake di Glu alle proteine cellulari di ogni singolo pozzetto e di esprimere i risultati come pmol/mg di proteine/min. La quota di trasporto sodio-dipendente, riconducibile all'attività dei trasportatori EAAT, è stata ottenuta sottraendo il trasporto misurato in EBSS privo di sodio al trasporto misurato in EBSS con sodio.

### **3.9 Determinazione dell'attività del trasportatore xCT**

Per la misurazione dell'attività del trasportatore xCT (il quale in condizioni fisiologiche importa cistina ed espelle Glu, ma è in grado di mediare anche i flussi opposti) le hTERT-MSC sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (50.000 cellule/pozzetto) e incubate inizialmente per 48h a 37°C in DMEM

addizionato di Gln (4 mM) e 10% di FBS. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate con EBSS privo di Na<sup>+</sup> ed è stato valutato l'ingresso di Glu dopo 1 minuto di incubazione a pH = 7.4 in EBSS privo di Na<sup>+</sup> addizionato di Glu (50 µM) e <sup>3</sup>H-Glu (10 µCi/ml) in assenza o in presenza di sulfasalazina (SSZ, 500 µM), un inibitore specifico di questo sistema di trasporto. Il trasporto di Glu è stato misurato in EBSS privo di Na<sup>+</sup> in quanto il sodio non è necessario per il funzionamento di tale trasportatore e in queste condizioni sono inibiti i trasportatori sodio-dipendenti. Come precedentemente descritto, i flussi transmembrana degli amminoacidi sono stati bloccati immergendo la piastra in urea isotonica fredda (300 mM), è stato estratto il contenuto intracellulare con etanolo assoluto freddo e la radioattività contenuta negli estratti cellulari è stata misurata con la tecnica innanzi descritta.

### **3.10 Immunofluorescenza**

Per valutare l'espressione del trasportatore EAAT3 sulla membrana delle hTERT-MSC non differenziate o differenziate a osteoblasti, le cellule sono state seminate su vetrini a quattro camere (Falcon) alla densità di 4000 cellule/camera e coltivate in DMEM addizionato di Gln e FBS o in medium osteogenico per 14 giorni. Al termine del differenziamento le cellule sono state lavate due volte con PBS freddo, fissate per 15 minuti con paraformaldeide al 3.7% e, dopo due lavaggi con PBS, permeabilizzate con un'incubazione di 7 minuti con 0.1% di Triton X-100 in PBS. Successivamente sono stati effettuati un lavaggio rapido e due lenti (5 minuti ciascuno) e le cellule sono state incubate inizialmente per un'ora con una soluzione costituita da PBS contenente BSA al 5% e siero fetale di capra al 10% (DAKO SpA) con lo scopo di bloccare i siti di legame aspecifici e, successivamente, overnight con un anticorpo monoclonale di coniglio anti-EAAT3 (Alpha Diagnostic International, 1:200) diluito in PBS con il 5% di BSA. Il giorno seguente, dopo aver recuperato l'anticorpo primario, sono stati fatti tre lavaggi rapidi con PBS e due lenti da 10 minuti ciascuno e le cellule sono state incubate per un'ora con l'anticorpo secondario anti-coniglio Alexa Flour™ 488 (Thermo Fisher Scientific) diluito 1:300 nella soluzione bloccante alla quale è stata anche aggiunta falloidina fluorescente (Alexa Flour™ 633 phalloidin, 4 U/ml, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) con lo scopo di

evidenziare il citoscheletro. Negli ultimi 10 minuti di incubazione è stato aggiunto inoltre il colorante nucleare Hoechst 33342 (1 µg/ml, Thermo Fisher Scientific) che emette fluorescenza blu quando legato al dsDNA. Dopo aver effettuato due lavaggi rapidi e due lenti da 10 minuti ciascuno, sono stati montati i vetrini coprioggetto e le cellule sono state osservate con un microscopio confocale CLSM system Stellaris (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), utilizzando un obiettivo a immersione in olio (Plan-Apo 40X). Sono state ottenute sezioni confocali singole utilizzando configurazioni specifiche per i fluorescenti utilizzati: la prima prevede un'eccitazione a 405 nm UVLL (UV laser line) con un intervallo di emissione compreso tra 420 e 504 nm per la rilevazione dei nuclei (visualizzati in pseudocolore blu) mentre la seconda prevede un'eccitazione a 499 nm e a 631 nm WLL (white laser line) con un range di rilevamento spettrale da 420 a 504 nm per l'acquisizione del segnale corrispondente a EAAT3 (visualizzato in pseudocolore verde) e da 641 a 773 nm per la rilevazione del segnale corrispondente all'actina (visualizzato in pseudocolore rosso).

### **3.11 Terreni di coltura condizionati da cellule di MM**

Per valutare l'effetto del metabolismo delle cellule di MM sul differenziamento adipocitario delle MSC sono stati utilizzati terreni di coltura condizionati da HMCL. Il medium condizionato è stato ottenuto coltivando le HMCL per 24h in DMEM addizionato di FBS al 5% e Gln (0.6 mM) a una densità di 250.000 cellule/ml. Al termine dell'incubazione il terreno è stato prelevato e centrifugato a 300 *g* per 10 minuti per rimuovere le cellule di MM e il sovrantante è stato congelato a -20°C. Per condurre gli esperimenti di differenziamento adipocitario il terreno è stato diluito 1:1 in DMEM integrato con FBS al 5% e Gln a una concentrazione di 0,3 mM (la concentrazione media di Gln nel terreno condizionato da cellule di MM, determinata in precedenza) o di 2 mM, per il ripristino della concentrazione di Gln. Tale approccio è stato adottato per simulare in vitro il microambiente del midollo osseo dei pazienti di MM.

### **3.12 Colorazione con Oil Red O**

Per la colorazione delle gocce lipidiche presenti nelle cellule in seguito al differenziamento adipocitario delle MSC, è stato utilizzato Oil Red O, un colorante appartenente alla categoria dei lisocromi, sostanze liposolubili in grado di sciogliersi nei lipidi e di conferire loro la propria colorazione rossa. Al termine dell'incubazione delle cellule in medium adipogenico è stato aspirato il medium e sono stati fatti due lavaggi con PBS. Successivamente è stata aggiunta paraformaldeide (4% in PBS) per fissare le cellule tramite un'incubazione di 15 minuti. Al termine dell'incubazione, è stata rimossa la paraformaldeide lavando due volte le cellule con acqua distillata ed è stato aggiunto isopropanolo al 60%. Trascorsi 5 minuti di incubazione è stato rimosso l'isopropanolo ed è stata aggiunta alle cellule una Oil Red O Working Solution costituita dal 60% di Oil Red O in isopropanolo. Si è, quindi, proceduto incubando le cellule per 10-20 minuti al termine dei quali è stata rimossa la Oil Red O Working Solution e sono stati effettuati lavaggi con acqua con lo scopo di rimuovere l'eccesso di colorante. Infine, alle cellule è stata aggiunta acqua per evitarne l'essiccamento e sono state osservate al microscopio. Al termine dell'osservazione microscopica, la colorazione è stata estratta con isopropanolo assoluto e l'assorbanza è stata letta allo spettrofotometro a 492 nm (Enspire, PerkinElmer).

### **3.13 Internalizzazione delle nanoplastiche**

Per valutare l'internalizzazione delle NPs ad opera dalle hTERT-MS, le cellule sono state seminate su vetrini a quattro camere (Lab-Tek® Chambered #1.0 Borosilicate Coverglass System, Thermo Fisher Scientific) alla densità di 6000 cellule/camera e coltivate in DMEM addizionato di Gln (4 mM) e 10% FBS per 24h a 37°C. Successivamente, le cellule sono state coltivate per 48h a 37°C in DMEM addizionato di Gln e FBS in assenza e in presenza di NPs (100 µg/mL). Al termine del trattamento le cellule sono state lavate con PBS e incubate per 1h a 37°C con una soluzione costituita da DMEM addizionato di antibiotici, Gln (4 mM) e LysoTracker® Red DND-99 (70 nM, Thermo Fisher Scientific), un colorante fluorescente rosso in grado di colorare selettivamente i lisosomi. Negli

ultimi 15 minuti di incubazione è stato inoltre aggiunto il marcatore nucleare Hoechst 33342 (1 µg/ml, Thermo Fisher Scientific) e le cellule sono state poi osservate con il microscopio confocale CLSM system Stellaris utilizzando un obiettivo a immersione in olio (Plan-Apo 40X). In dettaglio, i nuclei sono stati visualizzati in pseudocolore blu, i lisosomi in pseudocolore rosso e le NPs in pseudocolore verde.

### **3.14 Estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e Real-Time PCR**

L'RNA è stato isolato mediante GeneJET RNA Purification Kit™ (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB) seguendo le indicazioni del produttore. A tale scopo il medium in cui sono state coltivate le cellule è stato aspirato e sostituito con buffer di lisi e β-mercaptoetanolo (20 µL/mL), un agente riducente che riduce i ponti disolfuro delle ribonucleasi, rendendole inattive. Il lisato è stato poi prelevato e trasferito in eppendorf nucleasi-free ed è stato aggiunto etanolo assoluto con lo scopo di consentire l'adesione dell'RNA ai filtri delle colonne di estrazione. Successivamente i campioni sono stati spostati all'interno di colonne di estrazione e si è proceduto con una serie di centrifugazioni intervallate da tre passaggi di lavaggio. Infine, sono stati aggiunti 30 µl di acqua DNAsi/RNAsi-free per eluire l'RNA ed è stata fatta un'ulteriore centrifugazione.

1 µg di campione è stato retrotrascritto a cDNA (RevertAid RT Kit™, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB) il quale è stato successivamente amplificato tramite Real-Time PCR (QuantStudio3, Thermo Fisher) utilizzando il fluoroforo SYBR Green (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), che, intercalandosi nel dsDNA, emette fluorescenza, e i primers riportati in Tabella 1.

Ogni ciclo di reazione comprende una fase di denaturazione a 95°C di 15s, una fase di annealing a 59°C di 15s e una fase di allungamento a 72°C di 30s. Insieme ai campioni, utilizzati in duplicato, ad ogni reazione è stato aggiunto un controllo negativo non contenente il template. I dati sono stati infine analizzati seguendo il metodo della quantificazione relativa a partire da una curva

standard e i risultati ottenuti normalizzati per l'espressione dell'mRNA di *RPL-15*, utilizzato come housekeeping.

Per valutare l'espressione dei geni *HO-1* e *SLC7A11*, codificanti rispettivamente per gli enzimi eme ossigenasi 1 e per il trasportatore xCT, le hTERT-MSC sono state seminate in una piastra da 6 pozzetti (150.000 cellule/pozzetto) e incubate a 37°C in DMEM addizionato di Gln (4 mM) e 10% di FBS in assenza o in presenza di NPs per 6h e 24h. Al termine dell'incubazione è stato estratto l'RNA, retrotrascritto e amplificato mediante Real-Time PCR seguendo i medesimi protocolli precedentemente descritti. L'espressione dei geni in esame è stata valutata utilizzando i primers riportati nella Tabella 1 e normalizzata per l'espressione dell'mRNA di *RPL-15*.

Per valutare l'espressione dei marker osteogenici *ALPL*, *COL1A1* e *SPARC*, che codificano rispettivamente per la fosfatasi alcalina, per il collagene di tipo 1 $\alpha$ 1 e per l'osteonectina, una proteina necessaria per la calcificazione del collagene della matrice ossea, le hTERT-MSC sono state seminate in una piastra da 12 pozzetti (10.000 cellule/pozzetto) e incubate per 14 giorni in DMEM addizionato di Gln e FBS o in medium osteogenico in assenza e in presenza di NPs (100  $\mu$ g/mL). Terminata l'incubazione l'RNA è stato estratto, quantificato tramite spettrofotometro e 1  $\mu$ g di cDNA retrotrascritto e amplificato mediante Real-Time PCR tramite Saggio Taqman (Life Technologies, ThermoFisherScientific, Waltham, MA). L'espressione dei geni *ALPL*, *COL1A1* e *SPARC* è stata valutata utilizzando rispettivamente le sonde *hs01029144\_m1*, *hs01076777\_m1* e *hs00234160\_m1* e i risultati ottenuti sono stati normalizzati per l'espressione dell'mRNA del gene *GAPDH* (*hs02786624\_g1*), codificante per la gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi.

Per valutare l'espressione dei marker adipocitari *ADIPOQ*, *PPARG* e *LEP*, che codificano rispettivamente per l'adiponectina, per l'isoforma  $\gamma$  del recettore PPAR e per la leptina, le MSC sono state incubate in medium adipogenico in presenza e assenza di Gln, Asn o NPs (100  $\mu$ g/mL) o in DMEM addizionato di Gln e FBS come controllo. Dopo 14 giorni, l'RNA è stato estratto, quantificato tramite spettrofotometro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) e 1  $\mu$ g di campione è stato retrotrascritto a cDNA per poi essere amplificato mediante Real-Time PCR seguendo i medesimi protocolli precedentemente descritti. L'espressione dei

geni *ADIPOQ*, *PPARG* e *LEP* è stata valutata tramite saggio Taqman utilizzando rispettivamente le sonde *hs00977214\_m1*, *hs01115513\_m1* e *hs00174877\_m1*. Ogni ciclo comprendeva una fase di denaturazione a 95°C per 20 secondi, una fase di annealing ed allungamento a 60°C per 30 secondi. Invece, l'espressione dei geni *FASN*, *FABP4*, *CES1* e *ACSL1* è stata valutata tramite Real-Time PCR utilizzando il fluoroforo SYBR Green tramite i primers riportati in Tabella 1 e normalizzando i risultati ottenuti per l'espressione dell'mRNA di *RPL-15*. In particolare, *FASN* codifica per la sintasi degli acidi grassi, un enzima in grado di sintetizzare il palmitato a partire da acetil-CoA e malonil-CoA in presenza di NADPH, *FABP4* per la proteina legante gli acidi grassi 4, avente un ruolo centrale nella regolazione della lipolisi, *CES1* per la carbossilesterasi 1, un enzima in grado di idrolizzare gli esteri aromatici e alifatici e di regolare i livelli di esterificazione del colesterolo, e *ACSL1* per un isoenzima in grado di convertire gli acidi grassi a lunga catena in Acil-CoA.

I profili di espressione delle MSC umane primarie non differenziate e degli osteoblasti umani primari derivati da biopsie del midollo osseo di donatori sani (HD;  $n = 7$ ) o pazienti con MM ( $n = 16$ ), precedentemente generati su array Affymetrix GeneChip HG-U133A (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), sono stati estratti dai file CEL utilizzando la procedura di normalizzazione RMA e il pacchetto di annotazione CDF personalizzato (GeneAnnot v2.2.1, Rehovot, Israele), come descritto (Todoerti et al. 2009).

**Tabella 1 - Primers**

<b>Gene</b>	<b>Primers</b>
<i>ACSL1</i> (Acil-CoA sintetasi a lunga catena di tipo 1)	for 5'-CCATGAGCTGTTCCGGTATTT-3' rev 5'- CCGAAGCCCATAAGCGTGTT-3'
<i>CES1</i> (Carbossilesterasi 1)	for 5'-ACCCCTGAGGTTTACTCCACC-3' rev 5'-TGCACATAGGAGGGTACGAGG-3'
<i>FABP4</i> (Proteina legante gli acidi grassi)	for 5'-GCGAACTTCAGTCCAGGTCAAC-3' rev 5'-ACGAGAGGATGATAAACTGGTGG-3'
<i>FASN</i> (Sintasi degli acidi grassi)	for 5'-CTTCCGAGATTCATCCTACGC-3' rev 5'-TGGCAGTCAGGCTCACAAACG-3'
<i>GLS</i> (Glutaminasi, GLS1)	for 5'-TGGTGGCCTCAGGTGAAAAT-3' rev 5'-CCAAGCTAGGTAACAGACCCTGTTT-3'
<i>GLUL</i> (Glutamina Sintetasi, GS)	for 5'- TCATCTTGCATCGTGTGTGTG-3' rev 5'- CTTCAGACCATTCTCCTCCCG
<i>HO-1</i> (Eme-ossigenasi 1)	for 5'-CTTTCAGAAGGGTCAGGTGTC-3' rev 5'-TGCTTGTTTCGCTCTATCTCC-3'
<i>RPL-15</i> (Proteina ribosomiale 15)	for 5'- GCAGCCATCAGGTAAGCCAAG-3' rev 5'- AGCGGACCCTCAGAAGAAGC-3'
<i>SLC1A1</i> (trasportatore EAAT3)	for 5'- CAGAAAGTGGGTGAAATTGCG-3' rev 5'-TCACGCTTAGTTTTGTACTGCTG-3'
<i>SLC7A11</i> (trasportatore xCT)	for 5'- TCCTGCTTTGGCTCCATGAACG-3' rev 5'-AGAGGAGTGTGCTTGCGGACAT-3'

### 3.15 Estrazione proteica

Per effettuare l'estrazione proteica le MSC sono state incubate in medium adipogenico in presenza e assenza di Gln o in DMEM addizionato di Gln e FBS come controllo. Ai tempi indicati nei risultati, le cellule sono state lisate in buffer RIPA (Cell Signaling Technologies) che, previa l'aggiunta degli inibitori delle proteasi e delle fosfatasi (Complete Mini, EDTA-free, Roche), è in grado di solubilizzare una vasta gamma di proteine, incluse le proteine di membrana e i complessi proteici. Inizialmente è stato effettuato un lavaggio con 4 ml di PBS freddo per rimuovere eventuali residui di terreno di coltura e, successivamente,

sono stati aggiunti 120  $\mu$ L di buffer RIPA. Tramite uno scraper è stato raccolto il lisato che è stato sonicato per 5 secondi a potenza 5 (Misonix Sonicator XL2020 Ultrasonic Liquid Processor) e centrifugato per 10 minuti a 12.000 *g* e a 4°C per isolare le proteine solubilizzate che, al termine della centrifugazione, saranno contenute nel sovrinatante e quantificate mediante saggio Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Per effettuare l'estrazione proteica delle hTERT-MSK, le cellule sono state seminate in quattro capsule Petri (1.000.000 cellule/Petri) e incubate in DMEM addizionato di Gln (4 mM) e 10% di FBS in assenza o in presenza di NPs (100  $\mu$ g/mL) per 6h, 24h o 48h. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lisate con la metodica precedentemente descritta.

### **3.16 Western Blot**

Dai lisati cellulari ottenuti dalle MSK non differenziate o differenziate in senso adipocitario è stata valutata tramite Western Blot l'espressione a livello proteico di marker adipogenici e di stress nutrizionale. Per l'analisi sono stati utilizzati 25  $\mu$ L di campione a cui sono stati aggiunti 3,5  $\mu$ L di agente riducente (10x, Thermo Fisher Scientific) e 9  $\mu$ L di sample buffer (4x, 988 mM Tris-HCl, 2.04 mM EDTA, 8% LDS, 40% glicerolo, 0.88% Coomassie blue, 0.7 mM rosso fenolo, 8% mercaptoetanolo, pH 7.5, Thermo Fisher Scientific). Successivamente, i campioni sono stati sottoposti a denaturazione termica utilizzando una piastra calda a 70°C per 10 minuti. Seguendo il protocollo Invitrogen, Mini Gel Tank, le proteine sono state caricate su un gel continuo di Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) al 4-12% (Thermo Fisher Scientific) e, grazie a una corsa a 160 V per 1h, sono state separate in base al loro peso molecolare. Più specificatamente, è stata effettuata una separazione elettroforetica su gel ottimale per la risoluzione di un ampio range di dimensioni proteiche, dove la porosità del gel è inversamente proporzionale alla percentuale di acrilammide e, pertanto, gel a bassa percentuale sono adatti alla separazione di proteine ad alto peso molecolare. Come running buffer è stato utilizzato il MOPS (3-N-morfolinopropansolfonico), un tampone che fornisce un ambiente stabile controllando il pH adatto per separare le proteine da 185-115 a 80-75 kDa.

Per il trasferimento è stato utilizzato il protocollo del Mini Blot Module (Thermo Fisher Scientific) secondo il quale le proteine vengono trasferite a 30 V per 1h su una membrana idrofobica di PVDF (polivinilidene difluoruro, Cytiva Life Sciences Amersham™ Hybond™) previa immersione in metanolo con lo scopo di idratarla per favorire l'adsorbimento delle proteine. Al termine del trasferimento delle proteine sulla membrana, quest'ultima è stata prima immersa in una soluzione bloccante (Roche) diluita in TBS Tween per 1h, con lo scopo di bloccare i siti di legame non specifici, e poi incubata overnight a 4°C con l'anticorpo primario (Tabella 2) diluito 1:1000 in TBS-Tween contenente il 5% di BSA. La mattina seguente, la membrana è stata sottoposta a due lavaggi rapidi e a due di 10 minuti ciascuno con TBS-Tween per rimuovere l'anticorpo primario in eccesso. Successivamente la membrana è stata incubata a temperatura ambiente per 1h in agitazione lenta con l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (Cell Signaling Technology), diluito 1:10.000 in soluzione bloccante. Al termine dell'incubazione, sono stati effettuati ulteriori lavaggi al fine di eliminare l'anticorpo secondario non legato e la chemiluminescenza è stata rilevata mediante l'utilizzo di Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore), utilizzando il sistema di immagine Invitrogen™ iBright™ FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific). L'espressione proteica è stata normalizzata per la  $\beta$ -actina e quantificata mediante analisi densitometrica utilizzando iBright Analysis Software (Thermo Fisher Scientific).

In lisati cellulari delle hTERT-MSC coltivate in DMEM addizionato di Gln (4 mM) e 10% di FBS in presenza o assenza di NPs (100  $\mu$ g/mL) per 6h, 24h 48h è stata valutata tramite Western Blot l'espressione di enzimi e trasportatori coinvolti nel metabolismo della Gln (GLS1, GS, ASNS e xCT) utilizzando le metodiche precedentemente descritte.

**Tabella 2.**

Anti-adiponectina	coniglio, monoclonale, 1:1000, Cell Signaling Technology
Anti-ASNS	topo, policlonale, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology
Anti- $\beta$ -actina	coniglio, policlonale, 1:5000, Sigma-Aldrich
Anti-EAAT3	coniglio, monoclonale, 1:500, Alpha Diagnostics
Anti- eIF2 $\alpha$ phospho-S51	coniglio, policlonale, 1:1000, Cell Signaling Technology
Anti-FABP4	coniglio, policlonale, 1:1000, Cell Signaling Technology
Anti-GLS1	coniglio, policlonale, 1:1000, Abcam
Anti-GS	topo, policlonale, 1:1000, BD
Anti- p70 S6 Kinase	coniglio, monoclonale, 1:10.000, Cell Signaling Technology
Anti-PPAR $\gamma$	coniglio, monoclonale, 1:1000, Cell Signaling Technology
Anti-xCT	coniglio, policlonale, 1:1000, Abcam

### 3.17 Analisi statistica

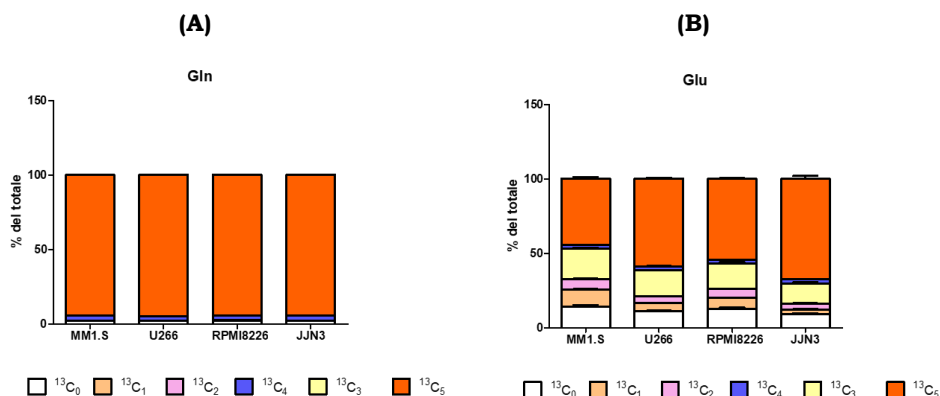
Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test t di Student per dati non appaiati o lo one-sample t-test, come specificato per i singoli esperimenti. Per tutte le analisi statistiche è stato usato il software GraphPad Prism™ e valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

## **4. Risultati**

### **4.1 Le cellule mesenchimali stromali e il metabolismo della glutamina nel mieloma multiplo: supporto metabolico alle cellule neoplastiche e differenziamento adipocitario**

#### **4.1.1 Nelle cellule di mieloma il glutamato deriva dalla deamidazione della glutamina**

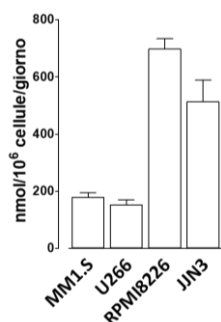
Le HMCL, MM1.S, U266, RPMI8226 e JJN3, sono state incubate 24h in medium integrato con FBS dializzato al 10% e antibiotici in presenza di  $^{13}\text{C}_5$ -glutamina (2 mM). In questo modo è stato possibile determinare la percentuale di Glu avente almeno un atomo di carbonio marcato e, quindi, derivante da Gln marcata. Successivamente, si è proceduto estraendo gli aminoacidi e analizzandoli mediante spettrometria di massa. Come si osserva nella Figura 6 (A), in tutte le linee cellulari esaminate almeno il 95% della Gln presente a livello intracellulare è  $^{13}\text{C}_5$ -glutamina per cui la Gln è stata efficacemente internalizzata dalle cellule e, come atteso dai risultati precedentemente pubblicati dal nostro gruppo, la sintesi intracellulare di Gln è praticamente trascurabile. La percentuale di Glu avente almeno un atomo di carbonio marcato ( $^{13}\text{C}_1$ ), derivante dalla deaminazione della  $^{13}\text{C}_5$ -glutamina operata da GLS, rappresenta più del 90% del Glu totale presente a livello intracellulare (Fig. 6 (B)).



**Figura 6. Valutazione del destino metabolico della Gln in HMCL.** Le cellule MM1.S, U266, RPMI8226 e JLN3 sono state incubate per 24h in medium integrato con FBS dializzato e antibiotici in presenza di  $^{13}\text{C}_5$ -glutamina (2 mM), come descritto in Materiali e Metodi. Distribuzione % degli isotopomeri della Gln (A) e Glu (B). I dati sono le medie  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti.

#### 4.1.2 Le cellule di mieloma secernono glutamato

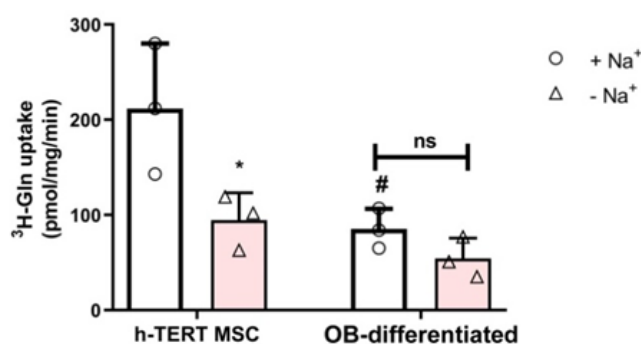
Le HMCL, MM1.S, U266, RPMI8226 e JLN3, sono state incubate per 72h in RPMI1640 addizionato con FBS dializzato, Gln e antibiotici. Successivamente le cellule sono state centrifugate e il Glu nel sovrinatante è stato misurato seguendo le istruzioni di un kit commerciale. Come è mostrato in Figura 7, le HMCL secernono notevoli quantità di Glu; in particolare, le cellule RPMI8226 e le JLN3 ne secernono una quantità che è 3-4 volte maggiore rispetto a quella secreta dalle MM1.S e U266.



**Figura 7. Le cellule di MM secernono Glu.** Le HMCL sono state incubate in RPMI1640 addizionato con FBS dializzato (10%), Gln (2 mM) e antibiotici per 72h al termine delle quali il Glu è stato misurato mediante Glutamate Assay Kit (vedi Materiali e Metodi). I dati sono espressi come nmol di Glu secreto/  $10^6$  cellule/giorno e rappresentano la media  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti.

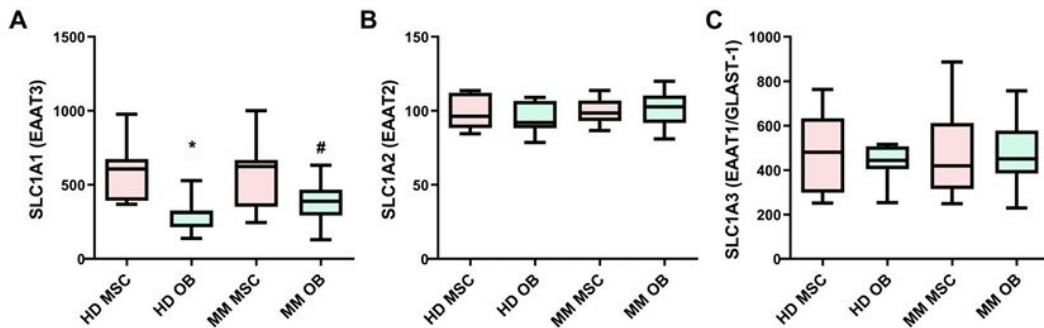
### 4.1.3 Il differenziamento osteogenico reprime l'espressione del trasportatore EAAT3 per il glutamato

Le hTERT-MSC sono state incubate per 14 giorni in DMEM addizionato con FBS, Gln e antibiotici o in medium "osteogenico", contenente fattori che promuovono la loro differenziazione in osteoblasti. Al termine dell'incubazione le cellule sono state incubate per 1 minuto a pH = 7.4 in EBSS contenente o privo di Na<sup>+</sup> addizionato di Glu 10 μM e <sup>3</sup>H-Glu 10 μCi/ml, come descritto in Materiali e Metodi. Come si osserva dalla Figura 8, le cellule non differenziate presentano un trasporto di Glu maggiore rispetto a quelle incubate in medium osteogenico. Inoltre, l'uptake nelle cellule non differenziate è per la maggior parte sodio-dipendente, quindi ascrivibile ai trasportatori attivi della famiglia EAAT, mentre nelle cellule differenziate non vi è differenza tra l'uptake misurato in presenza e in assenza di sodio, suggerendo che il differenziamento osteoblastico reprime l'espressione di trasportatori sodio-dipendenti.



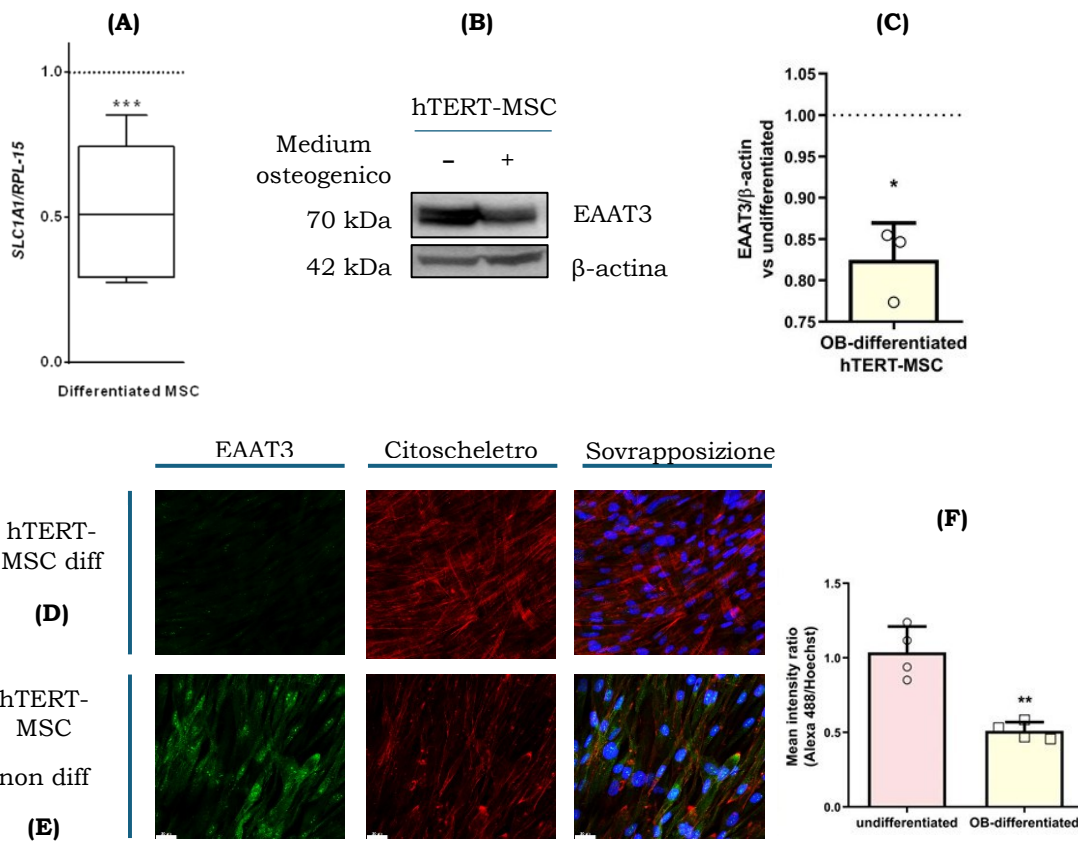
**Figura 8. Le hTERT-MSC differenziate reprimono l'attività dei trasportatori EAAT.** Le hTERT-MSC sono state incubate per 1 minuto a pH = 7.4 in EBSS contenente o privo di Na<sup>+</sup> addizionato di Glu 10 μM e <sup>3</sup>H-Glu 10 μCi/ml, come descritto in Materiali e Metodi. I dati rappresentano l'uptake di Glu in presenza o in assenza di Na<sup>+</sup>. I dati rappresentano le medie ± SD di 3 determinazioni indipendenti. \*p<0,05, ns non significativo EBSS + Na<sup>+</sup> vs EBSS - Na<sup>+</sup>. #p<0,05 vs hTERT MSC non differenziate incubate in EBSS +Na<sup>+</sup>. Test t di Student per dati non appaiati.

Successivamente, sono stati confrontati i livelli di espressione dei trasportatori EAAT in MSC primarie non differenziate e in osteoblasti primari ottenuti da biopsie midollari di soggetti sani o di pazienti affetti da MM. In particolare, è stata valutata l'espressione di *SLC1A1*, codificante per il trasportatore EAAT3, di *SLC1A2*, codificante per il trasportatore EAAT2, e di *SLC1A3*, codificante per il trasportatore EAAT1. Come è possibile osservare in Figura 9, l'espressione del gene *SLC1A1* è aumentata significativamente nelle MSC non differenziate rispetto agli osteoblasti, sia considerando i soggetti sani che i pazienti con MM (Fig. 9 (A)). Invece, non è stato riscontrato alcun cambiamento d'espressione dei geni *SLC1A2* e *SLC1A3* (Fig. 9 (B-C)).



**Figura 9. Profili di espressione genica dei trasportatori EAAT in MSC e osteoblasti (OB).** Distribuzione in box plot dei livelli di espressione di *SLC1A1* (EAAT3) (A), *SLC1A2* (EAAT2) (B), *SLC1A3* (EAAT1) (C) in un dataset di 7 donatori sani (HD) e 18 pazienti con MM (MM). \* $p < 0,05$  vs. HD MSC; # $p < 0,05$  vs. MM MSC. Test di Kruskal-Wallis.

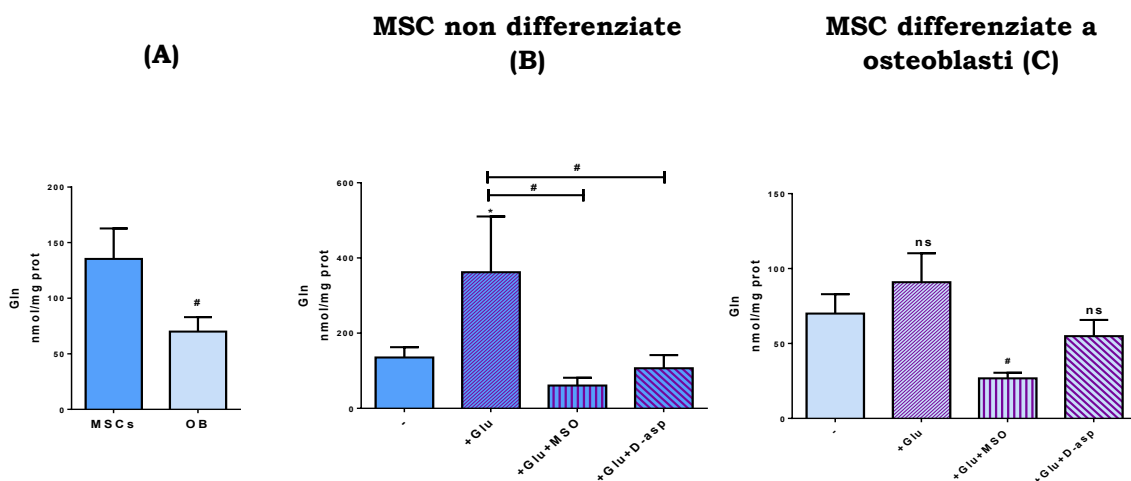
In linea con questi risultati, al termine dei 14 giorni di differenziamento osteoblastico delle hTERT-MSC, mediante Real-Time PCR è stato osservato che l'espressione del gene *SLC1A1* viene significativamente ridotta nelle cellule differenziate rispetto alla controparte non differenziata (Fig. 10 (A)). Anche per quanto riguarda l'espressione a livello proteico di EAAT3, sia tramite Western Blot che tramite analisi di microscopia confocale, è emerso che il trasportatore è maggiormente espresso nelle cellule non differenziate rispetto alla controparte differenziata ad osteoblasti (Fig. 10 (B-F)).



**Figura 10. Le hTERT-MSC differenziate reprimono l'espressione del trasportatore EAAT3.** Le hTERT-MSC sono state incubate per 14 giorni in DMEM addizionato di antibiotici, Gln e FBS o in medium "osteogenico". Al termine dell'incubazione l'espressione di SLC1A1 è stata analizzata mediante Real-Time PCR **(A)**, Western blot **(B-C)** e microscopia confocale **(D-F)**. **(A)** L'espressione del gene SLC1A1 è stata analizzata mediante Real-Time PCR ed è stata normalizzata rispetto all'espressione del gene housekeeping RPL-15. I primer utilizzati sono riportati in Materiali e Metodi. I dati rappresentano medie  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti. \*\*\* $p < 0,001$  vs hTERT-MSC non differenziate. Mann-Whitney. **(B)** Western blot rappresentativo di EAAT3 in lisati di hTERT-MSC incubate per 14 giorni in DMEM addizionato di antibiotici, Gln e FBS o in medium "osteogenico". La  $\beta$ -actina è mostrata come controllo di caricamento dei campioni. **(C)** Densitometria del rapporto di espressione EAAT3/ $\beta$ -actina. I dati rappresentano medie  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti. \* $p < 0,05$  vs hTERT-MSC non differenziate. One sample  $t$  test. **(D-E)** Sono mostrate sezioni confocali singole di campi rappresentativi. Il trasportatore EAAT3 è rappresentato in verde, il citoscheletro in rosso e i nuclei in blu. Le dimensioni della barra sono 20  $\mu$ m. **(F)** Rapporto di intensità media di EAAT3. I dati rappresentano medie  $\pm$  SD di singole sezioni confocali di quattro campi diversi. \*\* $p < 0,01$  vs hTERT-MSC non differenziate. Test  $t$  di Student a due code per dati non appaiati.

#### 4.1.4 Le cellule mesenchimali ma non gli osteoblasti secernono glutamina

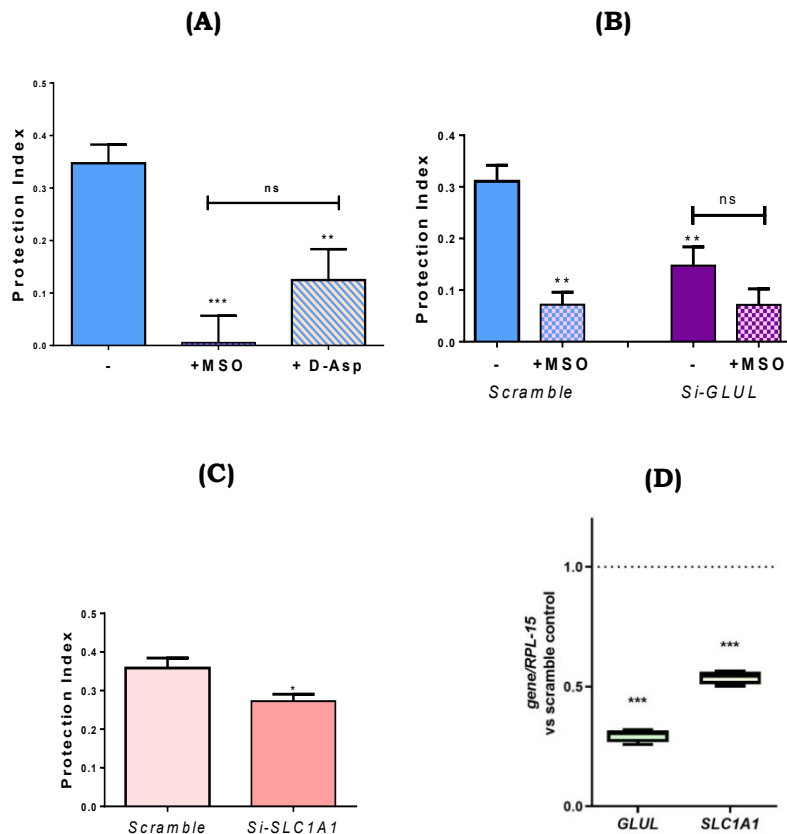
Le hTERT-MSc sono state incubate in DMEM addizionato di Gln e FBS o in medium osteogenico per 14 giorni. Al termine del differenziamento, sono state incubate per 24h con un medium privo di Gln e per 72h in presenza e in assenza di Glu, MSO (un inibitore di GS) o D-Asp (un inibitore competitivo di EAAT3). È stato infine estratto il contenuto intracellulare e sottoposto ad analisi mediante spettrometria di massa. Come è possibile osservare in Figura 11 (A) le hTERT-MSc producono e secernono una quantità doppia di Gln rispetto agli osteoblasti. Tale processo è potenziato dal Glu extracellulare e inibito sia dall'MSO che dal D-Asp (B). Invece, il Glu extracellulare non incrementa significativamente la secrezione di Gln dagli osteoblasti al contrario di MSO, che determina un calo di circa la metà della secrezione di Gln (C).



**Figura 11. Le hTERT-MSc non differenziate secernono più Gln degli osteoblasti.** Le hTERT-MSc sono state incubate per 14 giorni in DMEM addizionato di antibiotici, Gln e FBS o in medium osteogenico, come descritto in Materiali e Metodi. Le cellule sono state poi incubate per 24h con un medium privo di Gln e per 72h in presenza e in assenza di Glu al quale sono stati aggiunti MSO o D-Asp. Il contenuto intracellulare di Gln è stato analizzato mediante spettrometria di massa. I dati rappresentano medie  $\pm$  SD di 4 esperimenti indipendenti. **(A)** # $p < 0,05$  vs hTERT-MSc non differenziate **(B)** \* $p < 0,05$  vs controllo, # $p < 0,05$  vs + Glu **(C)** ns, # $p < 0,05$  vs controllo. Test t di Student per dati non appaiati.

#### 4.1.5 Le cellule mesenchimali supportano la crescita delle cellule di mieloma grazie all'attività di GS e di EAAT3

Le cellule di MM RPMI8226 sono state coltivate in monocultura o co-cultura con MSC per 72h in medium RPMI1640 addizionato con 10% di FBS in assenza di Gln con o senza inibitori di GS e EAAT3, quali MSO (1 mM) e D-Asp (5 mM). In altri esperimenti, le RPMI8226 sono state co-cultivate con MSC transfettate con siRNA scramble o con siRNA aventi come target *SLC1A1* (siRNA-*SLC1A1*) o *GLUL* (siRNA-*GLUL*), come descritto in Materiali e Metodi. Al termine dell'incubazione è stata misurata la vitalità cellulare delle cellule RPMI8226 tramite il saggio della Resazurina ed è stato calcolato l'indice di protezione (vedi Materiali e Metodi). Come è possibile osservare nella Figura 12 (A-C), in carenza di Gln le MSC sostengono la vitalità delle cellule di MM; tuttavia, tale supporto è ridotto sia dall'inibizione di GS e di EAAT3 che dal silenziamento di *GLUL* e di *SLC1A1*. In Figura 12 (D) si osserva che l'espressione dei geni *GLUL* e *SLC1A1*, valutata mediante Real-Time PCR, risulta dimezzata nelle cellule transfettate con siRNA aventi come target i geni in esame rispetto all'espressione misurata nelle cellule transfettate con siRNA scramble.

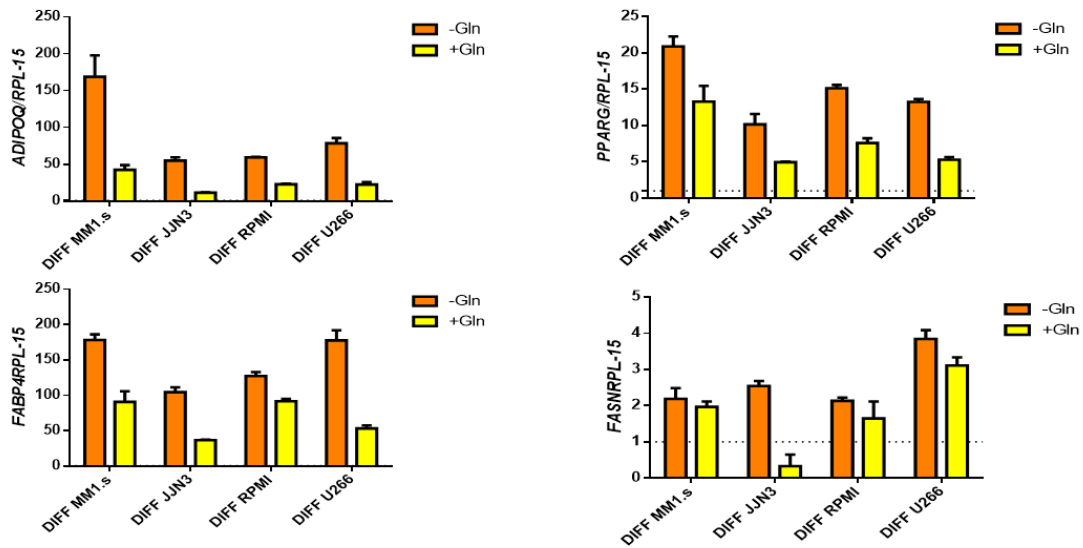


**Figura 12. Le MSC supportano la crescita delle cellule di MM. (A-D)** Le cellule RPMI8226 sono state seminate su transwell e coltivate in monocultura o co-coltivate per 72h con le MSC in medium RPMI1640 addizionato con 10% di FBS in assenza di Gln e in assenza o in presenza di MSO e D-Asp (A) o con MSC trasfettate con siRNA scramble o con siRNA aventi come target SLC1A1 o GLUL (B-C). Al termine dell'incubazione la vitalità è stata determinata con il saggio della Resazurina e il Protection Index calcolato come descritto in Materiali e Metodi. I dati rappresentano medie  $\pm$  SD di 5 (per A) o 3 (per B e C) esperimenti indipendenti realizzati con MSC ottenute rispettivamente da 5 e 3 donatori differenti. **(A)**  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  vs Indice di Protezione ottenuto in assenza di inibitori. **(B)**  $**p < 0,01$  vs. Scramble; ns, non significativo Si-GLUL vs. Si-GLUL+MSO. **(C)**  $*p < 0,05$  vs. Scramble. Test t di Student per dati non appaiati. **(D)** L'espressione dei geni GLUL e SLC1A1 nelle cellule trasfettate con siRNA aventi come target i geni in esame e nelle cellule trasfettate con siRNA scramble, rappresentanti il controllo, è stata analizzata mediante Real-Time PCR. L'espressione genica è stata normalizzata rispetto all'espressione del gene housekeeping RPL-15. I dati rappresentano medie  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti.  $***p < 0,001$  vs. scramble control. One sample t test.

#### **4.1.6 La deprivazione di glutamina, causata dalle cellule di mieloma, stimola l'adipogenesi**

Per valutare l'effetto del metabolismo delle cellule di MM sul differenziamento adipocitario delle MSC sono stati utilizzati terreni di coltura condizionati da HMCL. Il medium condizionato è stato prodotto come descritto in Materiali e Metodi e la concentrazione di Gln risultava ridotta a circa 0.3 mM. L'induzione del differenziamento in senso adipocitario delle MSC è stata ottenuta tramite l'incubazione di 14 giorni in medium condizionato (diluito con medium fresco contenente 0.3 mM Gln in rapporto 1:1) addizionato di fattori adipogenici (IBMX, INDO, Dex e insulina ricombinante umana) con o senza aggiunta di Gln (2 mM). Al termine del differenziamento è stata valutata l'espressione dei marker adipocitari *ADIPOQ*, *PPARG*, *FABP4* e *FASN* che codificano, rispettivamente, per l'adiponectina, un ormone proteico secreto dal tessuto adiposo che regola il catabolismo degli acidi grassi, per l'isoforma gamma del recettore attivato dai proliferatori dei perossisomi, che regola il deposito degli acidi grassi e il metabolismo del glucosio, per la fatty acid binding protein 4, la quale lega gli acidi grassi per trasportarli all'interno della cellula e per un complesso

enzimatico che catalizza le reazioni chiave della sintesi degli acidi grassi. Come è possibile osservare in Figura 13, l'espressione di tutti i marker di differenziamento adipocitario analizzati aumenta quando le cellule vengono incubate in medium condizionati in assenza di reintegro di Gln. Inoltre, il reintegro di Gln determina un'induzione minore di tutti i marker analizzati indipendentemente dalla linea cellulare di mieloma.

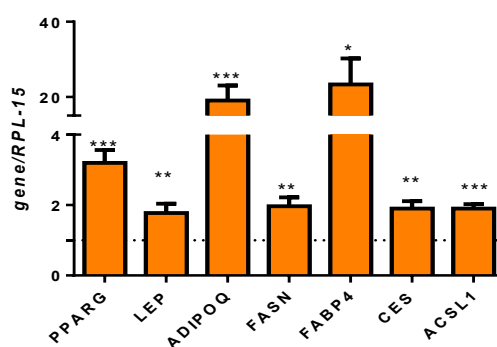


**Figura 13. La deprivazione di Gln indotta da cellule di MM stimola l'adipogenesi.**

Le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico condizionato dalla crescita di HMCL (MM1.S, JLN3, RPMI8226 e U266) in assenza o in presenza di Gln (2 mM). L'espressione dei marker di differenziamento adipocitario, ADIPOQ, PPARG, FABP4 e FASN, è stata analizzata mediante Real-Time PCR ed è stata normalizzata rispetto all'espressione del gene housekeeping RPL-15. I dati derivano da un esperimento ripetuto due volte con risultati analoghi.

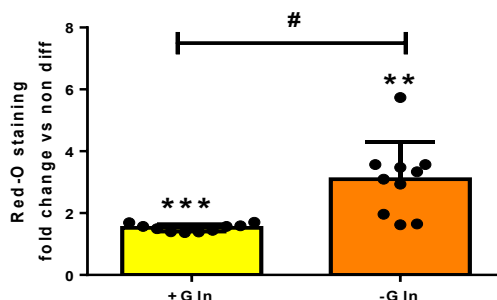
#### 4.1.7 La deprivazione di glutamina favorisce l'upregolazione dei marker adipocitari e la lipogenesi

Per meglio comprendere l'effettivo ruolo della Gln nel differenziamento adipocitario, le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in presenza (controllo) o in assenza di Gln. Successivamente è stata valutata l'espressione dei principali marker adipocitari, *ADIPOQ*, *LEP* e *PPARG*, e di geni codificanti per enzimi coinvolti nella lipogenesi quali *FABP4*, *FASN*, *CES* e *ACSL1*. Come è possibile osservare in Figura 14, l'espressione del gene *FABP4* aumenta di 20 volte quando le cellule vengono incubate in medium adipogenico in assenza di Gln mentre raddoppia quella di *FASN*, *CES* e *ACSL1*, rispetto alle cellule incubate in medium adipogenico in presenza di Gln. L'induzione di tali geni può indicare un aumento dell'attività metabolica delle cellule adipose finalizzata all'accumulo di lipidi. Inoltre, l'espressione del marker di differenziamento *PPARG* aumenta di circa 3 volte nelle cellule differenziate in medium adipogenico in assenza di Gln, quella di *LEP* raddoppia mentre quella di *ADIPOQ* aumenta di circa 20 volte, rispetto alle cellule incubate in medium adipogenico in presenza di Gln, suggerendo che la carenza di Gln stimoli il differenziamento delle MSC in senso adipocitario.



**Figura 14. Espressione dei geni coinvolti nella lipogenesi e nell'adipogenesi.** Le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in assenza e in presenza di Gln (controllo posto pari a 1). L'espressione dei marker di differenziamento adipocitario, *PPARG*, *LEP*, *ADIPOQ*, *FASN*, *FABP4*, *CES* e *ACSL1*, è stata analizzata mediante Real-Time PCR e normalizzata rispetto all'espressione del gene housekeeping *RPL-15*. I dati rappresentano le medie  $\pm$  SD di 10 esperimenti indipendenti, con MSC ottenute da donatori differenti. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs diff +Gln, One Sample t test.

In parallelo, si è proceduto alla colorazione delle gocce lipidiche tramite Oil Red O e, come è possibile osservare nella Figura 15, l'analisi spettrofotometrica ha evidenziato un aumento dell'assorbanza nelle cellule incubate in medium adipogenico rispetto al controllo, rappresentato dalle MSC non differenziate ad adipociti. Inoltre, in assenza di Gln l'assorbanza risulta raddoppiata rispetto alla controparte incubata in medium adipogenico in presenza dell'aminoacido.

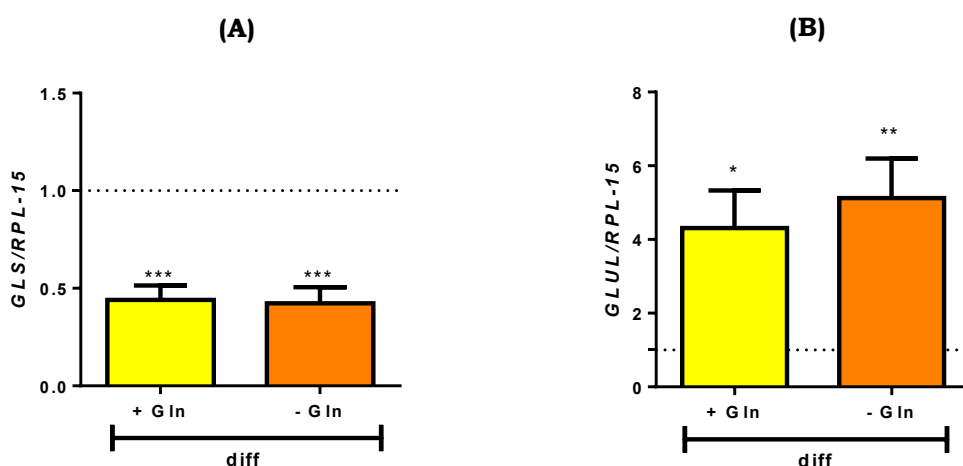


**Figura 15. L'assenza di Gln stimola la lipogenesi.** Le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in presenza (+Gln, 4 mM) o in assenza di Gln (-Gln) e in DMEM addizionato di antibiotici, FBS e Gln come controllo. Al termine dell'incubazione le gocce lipidiche sono state colorate mediante Oil Red O e l'assorbanza è stata letta allo spettrofotometro. I dati rappresentano l'assorbanza della colorazione Oil Red O espressa in rapporto all'assorbanza misurata nelle MSC non differenziate ad adipociti. I dati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs MSC non differenziate. One sample t test. # $p < 0.05$  vs diff +Gln, Test t di Student per dati non appaiati.

#### 4.1.8 Il differenziamento adipocitario riduce il catabolismo della glutamina

Per indagare il motivo per il quale la carenza di Gln stimola il differenziamento adipocitario, le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in presenza o in assenza di Gln e in DMEM addizionato di antibiotici, FBS e Gln come controllo. Al termine del differenziamento, tramite Real Time PCR è stata valutata l'espressione dei geni *GLS* e *GLUL*, coinvolti nel metabolismo della Gln in quanto codificanti rispettivamente per gli enzimi glutaminasi e glutamina sintetasi. Come è possibile osservare in Figura 16 (A), l'espressione di *GLS*

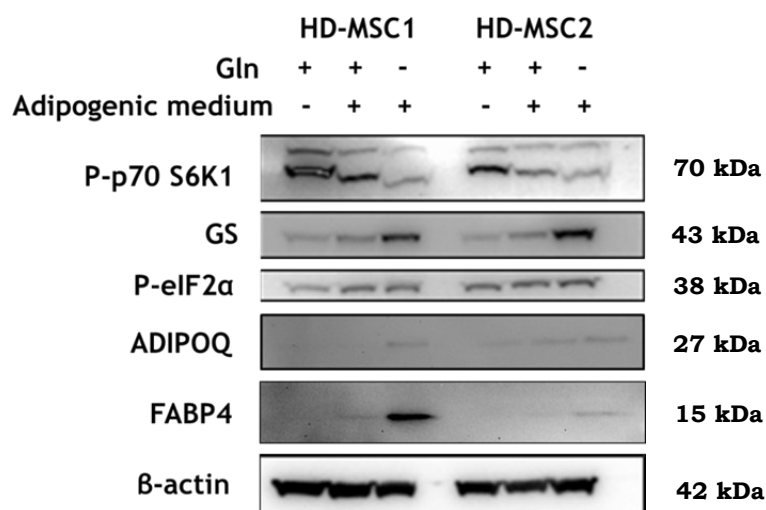
dimezza nelle cellule differenziate rispetto al controllo (posto pari a 1), indicando una diminuzione del catabolismo della Gln durante il differenziamento adipocitario. Parallelemente, in Figura 16 (B) è possibile notare un aumento di circa 4 volte dell'espressione di *GLUL* nelle cellule differenziate rispetto al controllo non differenziato indicando un aumento della capacità di sintesi *de novo* di Gln operata da GS. I cambiamenti dell'espressione dei geni in esame sono stati riscontrati in egual maniera sia nelle cellule differenziate in medium adipogenico in carenza di Gln che in presenza dell'aminoacido, suggerendo quindi si tratti di una modifica metabolica intrinseca al differenziamento e non dipendente dalla Gln addizionata al medium.



**Figura 16. Durante il differenziamento adipocitario si riduce il catabolismo della Gln.** Le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in presenza (+Gln) o in assenza di Gln (-Gln) e in DMEM addizionato di antibiotici, FBS e Gln come controllo (posto pari a 1). L'espressione di *GLS* (A) e *GLUL* (B) è stata analizzata mediante Real-Time PCR e normalizzata rispetto all'espressione del gene housekeeping *RPL-15*. I dati rappresentano le medie  $\pm$  SD di 8 esperimenti indipendenti nel caso di *GLS* e 9 nel caso di *GLUL*. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs MSC non differenziate. One sample t test.

#### 4.1.9 L'adipogenesi correla con lo stress nutrizionale

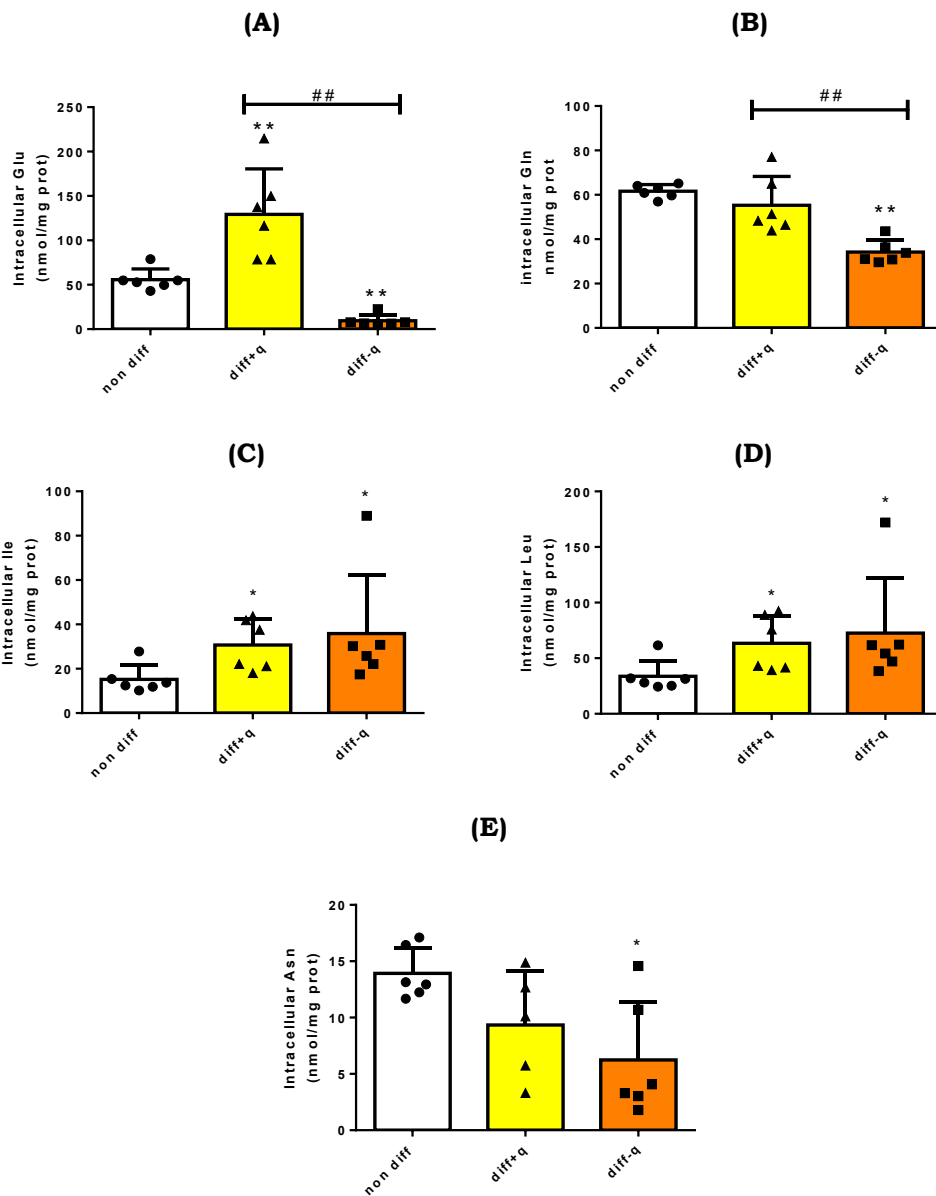
Le MSC di due donatori sani differenti, indicate in Figura 17 come HD-MSC1 e HD-MSC2, sono state incubate per 7 giorni in medium adipogenico in presenza o in assenza di Gln e in DMEM addizionato di antibiotici, FBS e Gln come controllo. Al termine del differenziamento le cellule sono state lisate in buffer RIPA e nei lisati ottenuti è stata valutata tramite Western Blot l'espressione a livello proteico di marker adipogenici e di stress nutrizionale. Come è possibile osservare in Figura 17, il medium adipogenico ha causato una riduzione dell'espressione di fosfo-p70 S6K1, una chinasi a valle di mTOR, e tale riduzione risulta più marcata nelle cellule incubate in medium adipogenico in assenza di Gln. Inoltre, l'incubazione in medium adipogenico in assenza di Gln ha evidenziato un aumento dell'espressione di GS e della fosforilazione di eIF2 $\alpha$ , un marker di stress nutrizionale. L'inibizione di mTOR e l'aumento della fosforilazione di eIF2 $\alpha$  suggeriscono il verificarsi di un'attenuazione della sintesi proteica e della crescita cellulare. Infine, è possibile notare l'induzione dei marker di differenziamento adipocitario ADIPOQ e FABP4 nelle cellule incubate in medium adipogenico.



**Figura 17. L'adipogenesi correla con indicatori di diminuzione della sintesi proteica.** Western blot di fosfo-p70 S6K1, fosfo-eIF2 $\alpha$ , GS, ADIPOQ e FABP4 in lisati di MSC, isolate da due donatori sani differenti, incubate per 14 giorni in DMEM addizionato di antibiotici, FBS e Gln o in medium adipogenico in presenza o assenza di Gln. La  $\beta$ -actina è mostrata come controllo di caricamento dei campioni.

#### **4.1.10 Il metabolismo delle cellule mesenchimali viene riprogrammato durante l'adipogenesi**

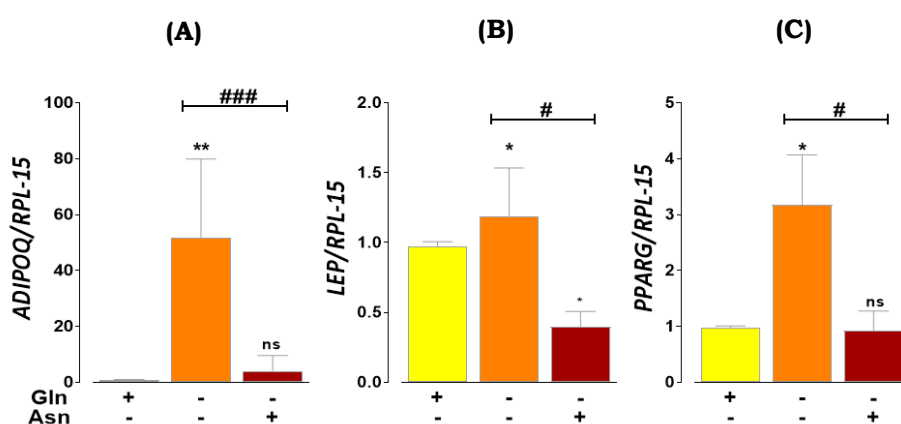
Le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in presenza o in assenza di Gln e in DMEM addizionato di antibiotici, FBS e Gln come controllo. Al termine del differenziamento è stato estratto il contenuto intracellulare di aminoacidi utilizzando una soluzione costituita da metanolo, acetonitrile ed acqua (5:3:1) ed è stata effettuata un'analisi mediante spettrometria di massa. Come è possibile osservare in Figura 18 (A) la concentrazione di Glu risulta triplicata nelle cellule incubate in medium adipogenico in presenza di Gln rispetto alle cellule non differenziate, mentre in carenza di Gln il Glu risulta ridotto del 90%. Invece, la concentrazione di Gln intracellulare (Figura 18 (B)) rimane invariata nelle cellule incubate in medium adipogenico contenente Gln rispetto al controllo non differenziato, mentre è possibile riscontrare una riduzione del 50% nelle cellule incubate in medium adipogenico in assenza di Gln. In Figura 18 (C, D) è possibile osservare un aumento della concentrazione di Leu e Ile nelle cellule differenziate sia in presenza che in assenza di Gln rispetto al controllo mentre in Figura 18 (E) è possibile notare che la concentrazione di Asn si riduce di un terzo nelle cellule incubate in medium adipogenico addizionato di Gln rispetto al controllo e della metà nelle cellule coltivate in medium adipogenico privo di Gln.



**Figura 18. L'adipogenesi altera il contenuto aminoacidico intracellulare.** Le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in presenza e in assenza di Gln e in DMEM addizionato di antibiotici, FBS e Gln come controllo. Al termine del differenziamento è stato estratto il contenuto intracellulare utilizzando una soluzione costituita da metanolo, acetonitrile e acqua (5:3:1). L'estratto è stato sottoposto ad analisi mediante spettrometria di massa. In particolare, è stata valutata la concentrazione intracellulare di Gln, Glu, Leu, Ile e Asn. I dati rappresentano le medie  $\pm$  SD di 4 esperimenti indipendenti con MSC isolate da 4 donatori sani differenti. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs non diff. ##  $p < 0.05$  vs diff+q. Test t di Student per dati non appaiati.

#### 4.1.11 L'asparagina ostacola il differenziamento adipocitario delle MSC

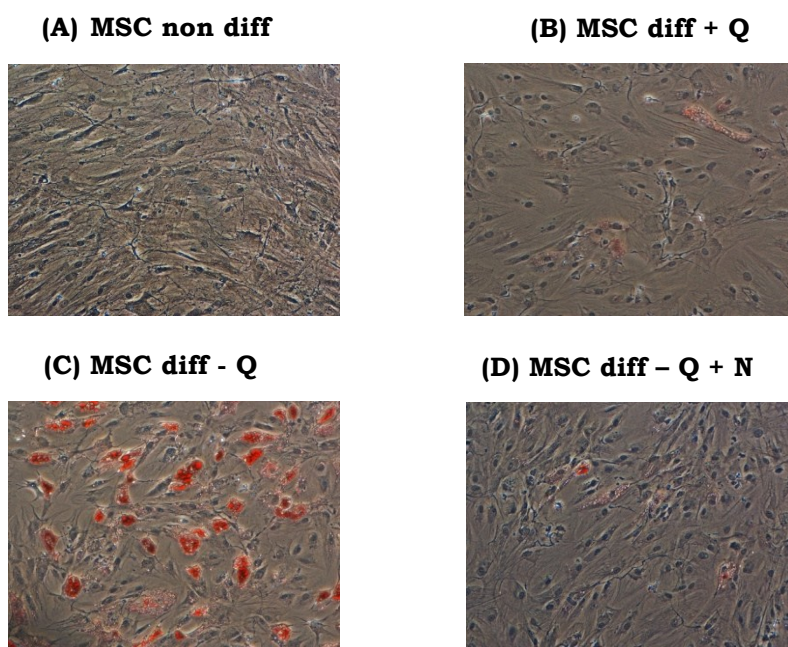
Poiché oltre la Gln anche l'Asn ha una funzione pro-osteogenica, è stato valutato l'effetto dell'Asn sul differenziamento adipocitario. Le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in presenza o in assenza di Gln o Asn e al termine del differenziamento è stata valutata tramite Real-Time PCR l'espressione dei marker adipogenici *ADIPOQ*, *LEP* e *PPARG*. Come è possibile notare in Figura 19 (A), è stata confermata la massiccia induzione del gene *ADIPOQ* nelle cellule incubate in medium adipogenico in assenza di Gln e Asn, con un aumento di 50 volte rispetto al controllo, rappresentato dalle cellule incubate in medium adipogenico in presenza di Gln e posto pari a 1. Tuttavia, tale induzione risulta drammaticamente ridotta in presenza di Asn. In Figura 19 (B) è possibile osservare un leggero aumento dell'espressione del marker adipocitario *LEP* nelle cellule incubate in medium adipogenico privo di Gln e Asn, mentre in presenza di Asn l'espressione risulta dimezzata rispetto al controllo. Infine, in Figura 19 (C) è possibile osservare che l'espressione di *PPARG* triplica nelle cellule incubate in assenza di Gln e Asn mentre rimane invariata in presenza di quest'ultima. Dai risultati ottenuti è possibile quindi concludere che l'aggiunta di Asn nel medium adipogenico ha modulato negativamente l'induzione precoce dell'adipogenesi nelle MSC, suggerendo un ruolo inibitorio di questo amminoacido nel processo di differenziamento.



**Figura 19. L'Asn attenua l'adipogenesi indotta dalla deprivazione di Gln nelle MSC.** Le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in presenza o in assenza di Gln o Asn. Al termine del trattamento è stata valutata tramite Real-Time PCR

*l'espressione dei marker adipogenici ADIPOQ, LEP e PPARG. L'espressione dei geni in esame è stata normalizzata rispetto all'espressione del gene housekeeping RPL-15. I dati rappresentano le medie  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , ns non significativo vs diff +Gln, One Sample t test. # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$  vs diff+Asn, test t di student per dati non appaiati.*

Parallelamente, si è proceduto alla colorazione delle gocce lipidiche tramite Oil Red O e l'analisi microscopica ha reso evidenti cambiamenti coerenti con i dati descritti finora. Come è possibile osservare in Figura 20 (A) le MSC non differenziate appaiono di forma allungata e al loro interno non sono presenti gocce lipidiche. Invece, dalla Figura 20 (B) si può notare che dopo 14 giorni di incubazione in medium adipogenico le MSC incubate in presenza di Gln presentano alcune gocce lipidiche che appaiono di colore rosso. Nella Figura 20 (C) si osserva che nelle MSC incubate in medium non contenente Gln le gocce lipidiche sono presenti in numero superiore rispetto a quelle presenti nelle cellule precedentemente esaminate. Infine, nella Figura 20 (D) è possibile notare un numero di gocce lipidiche confrontabili con quelle riscontrate nelle cellule differenziate in presenza di Gln, confermando l'effetto inibitorio dell'Asn sul processo di differenziamento adipocitario.

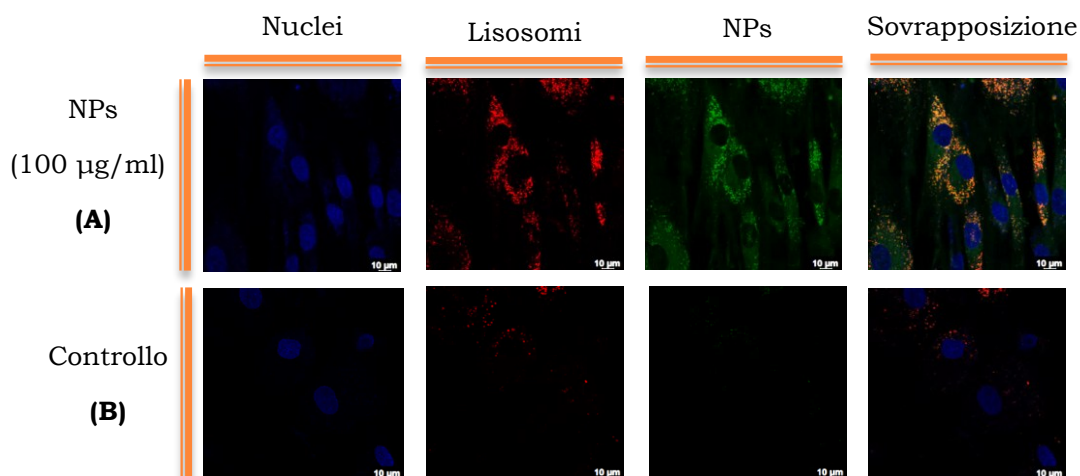


**Figura 20. Staining con Oil Red O. (A)** MSC non differenziate **(B)** MSC differenziate in medium adipogenico con Gln. **(C)** MSC differenziate in medium adipogenico senza Gln. **(D)** MSC differenziate in medium adipogenico con Asn. Ingrandimento 10x

## 4.2 Nanoplastiche e cellule mesenchimali stromali: alterazioni metaboliche e differenziative

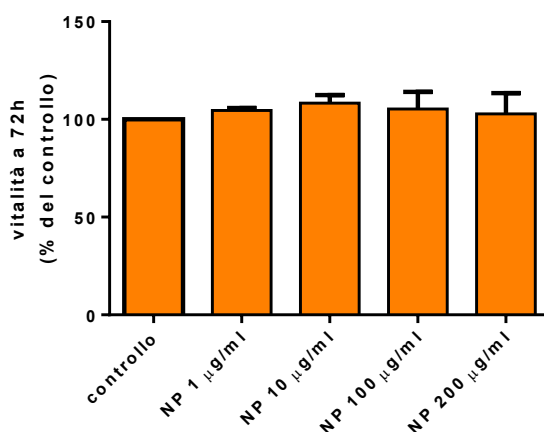
### 4.2.1 Le nanoplastiche vengono internalizzate dalle hTERT-MSC ma non ne alterano la vitalità

Per valutare l'internalizzazione delle NPs di PS nelle hTERT-MSC, le cellule sono state seminate su vetrini e coltivate per 48h in medium DMEM addizionato di Gln e FBS in assenza o in presenza di NPs. Al termine del trattamento le cellule sono state incubate con LysoTracker® Red DND-99 e con il marcatore nucleare Hoechst 33342, come descritto in Materiali e Metodi. Come è possibile osservare in Figura 21 (A), l'analisi di microscopia confocale ha reso evidente l'effettiva internalizzazione delle NPs, visualizzabili in pseudocolore verde, nelle hTERT-MSC trattate con NPs e la loro localizzazione a livello citoplasmatico e lisosomiale. Inoltre, i lisosomi delle cellule trattate, visualizzabili in pseudocolore rosso, risultano aumentati in numero e dimensioni rispetto a quelli presenti nelle cellule non trattate (Fig. 21 (B)).



**Figura 21. Le hTERT-MSC internalizzano le NPs.** Le hTERT-MSC sono state incubate per 48h in DMEM addizionato di antibiotici, Gln e FBS in presenza o in assenza di NPs. Sono mostrate sezioni confocali singole di campi rappresentativi. I nuclei, marcati con Hoechst 33342, sono rappresentati in pseudocolore blu, i lisosomi in pseudocolore rosso e le NPs in pseudocolore verde. Le dimensioni della barra sono 10 µm

Una volta verificata l'effettiva internalizzazione delle NPs, è stata valutata tramite il saggio della Resazurina la vitalità di hTERT-MSC trattate per 72h con concentrazioni crescenti di NPs (1-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Come è possibile osservare in Figura 22, non sono stati riscontrati cambiamenti significativi della vitalità delle cellule trattate con NPs rispetto al controllo che è rappresentato dalle cellule non trattate ed è stato posto pari al 100%.

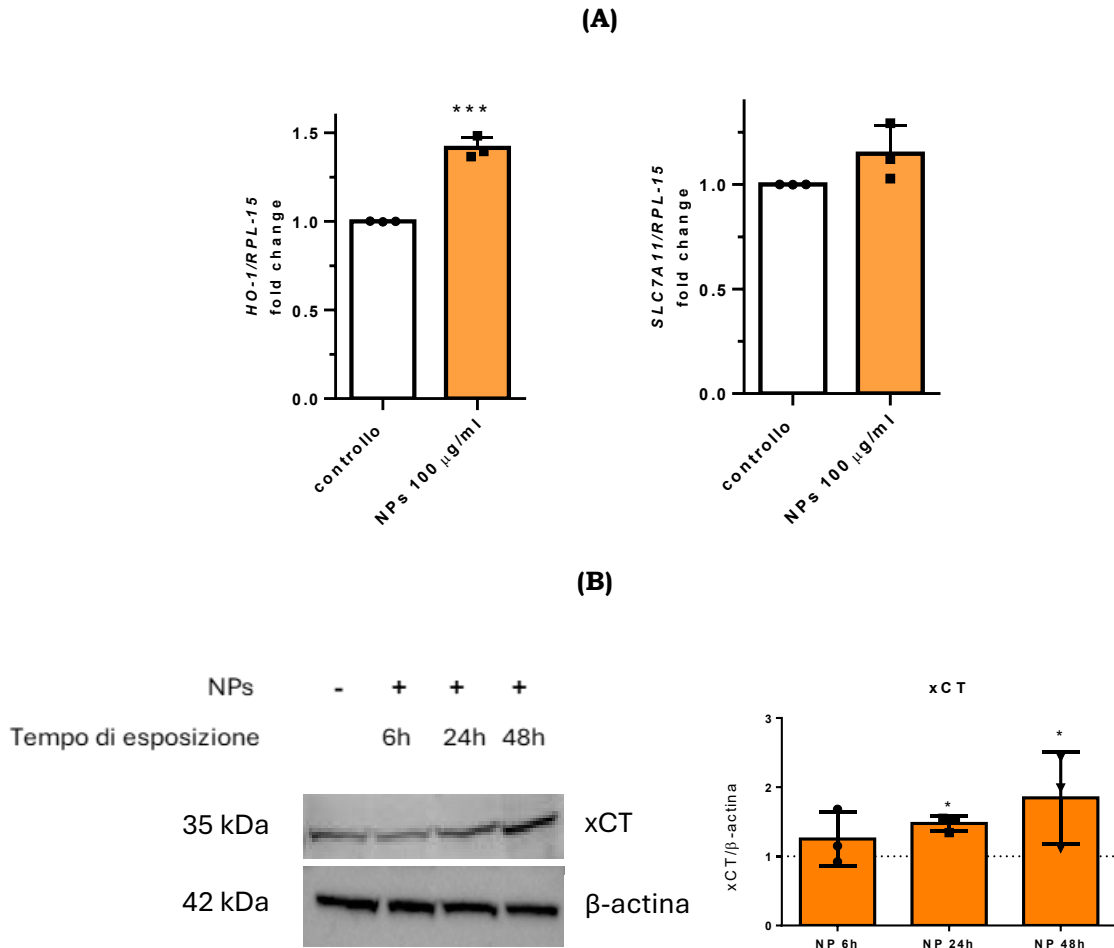


**Figura 22. La vitalità delle hTERT-MSC non viene alterata da concentrazioni crescenti di NPs.** Le hTERT-MSC sono state incubate per 72h in DMEM addizionato di Gln e FBS in assenza o in presenza di concentrazioni crescenti di NPs (1-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Al termine dell'incubazione la vitalità cellulare è stata misurata tramite il saggio della Resazurina. I dati sono espressi come % del controllo, rappresentato dalla vitalità delle cellule incubate in assenza di NPs e posto pari al 100%. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti.

#### 4.2.2 Le nanoplastiche inducono stress ossidativo nelle hTERT-MSC

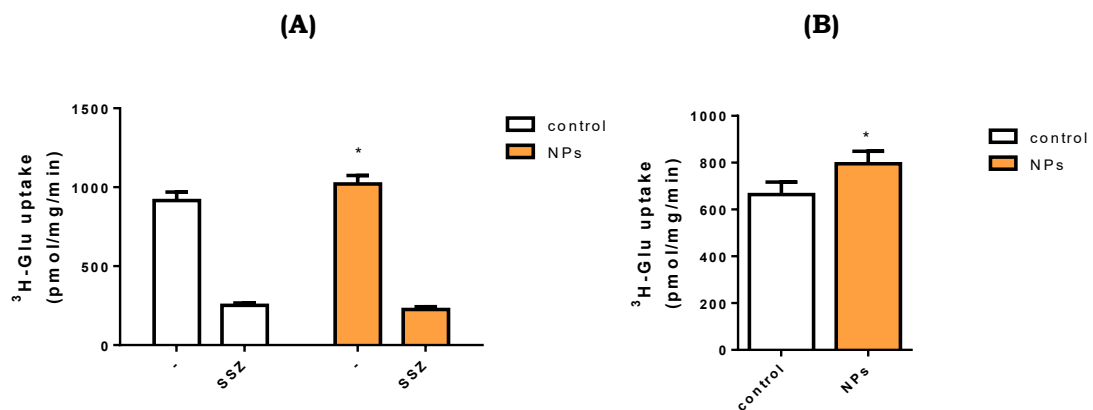
Le hTERT-MSC sono state incubate per 6h in DMEM addizionato di Gln e FBS in assenza o in presenza di 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NPs e, tramite Real-Time PCR, è stata valutata l'espressione dei marker di stress ossidativo *HO-1* e *SLC7A11*, codificanti rispettivamente per l'enzima eme ossigenasi 1 e per lo scambiatore xCT. Come è possibile osservare in Figura 23 (A), il trattamento con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di NPs ha determinato un'up-regolazione a livello genico di *HO-1* ma non di *SLC7A11*. Tuttavia, parallelamente è stata valutata tramite Western Blot

l'espressione a livello proteico del trasportatore xCT la quale, come è possibile osservare in Figura 23 (B), è aumentata all'aumentare del tempo di esposizione alle NPs.



**Figura 23. Le NPs inducono stress ossidativo nelle hTERT-MSC.** Le hTERT-MSC sono state incubate in DMEM addizionato di Gln e FBS in assenza o in presenza di NPs. **(A)** Al termine dell'incubazione (6h) è stata valutata tramite Real-Time PCR l'espressione dei marker di stress ossidativo HO-1 e SLC7A11. L'espressione dei geni in esame è stata normalizzata rispetto all'espressione del gene housekeeping RPL-15. I dati rappresentano le medie  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti. \*\*\* $p < 0.001$  vs controllo, rappresentato dalle cellule non trattate con NPs e posto pari a 1. One Sample t test. **(B)** Dopo 6h, 24h o 48h è stato effettuato un Western Blot di xCT. La  $\beta$ -actina è mostrata come controllo di caricamento dei campioni. Il controllo (cellule non esposte) è stato posto pari a 1. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti. \* $p < 0.05$  vs controllo. One sample t-test.

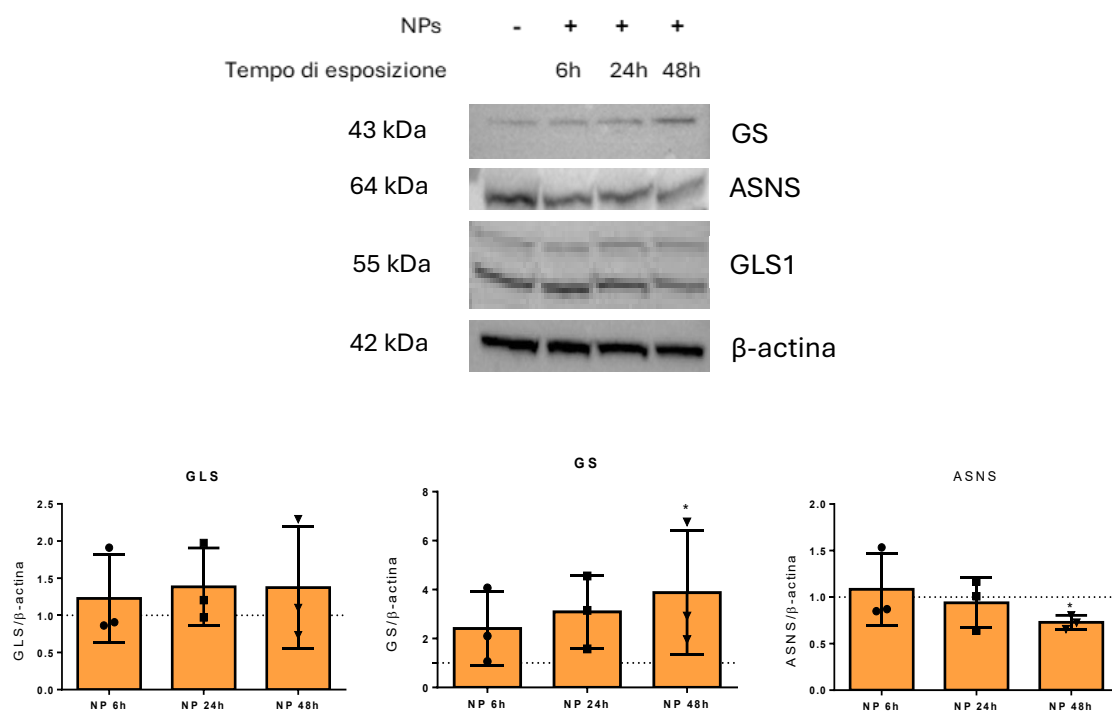
Parallelemente, è stata determinata l'attività del trasportatore xCT nelle hTERT-  
MSC incubate per 48h in DMEM addizionato di Gln e FBS in assenza o in  
presenza di NPs (100 µg/ml) utilizzando come tracciante il <sup>3</sup>H-Glu (10 µCi/ml).  
Come si osserva dalla Figura 24, sia le cellule incubate in assenza di NPs,  
rappresentanti il controllo, che le cellule incubate in loro presenza presentano  
una frazione di uptake inibita dalla sulfasalazina (SSZ), inibitore specifico del  
trasportatore xCT. Nelle hTERT-MSC incubate in presenza di NPs, che  
presentano un maggiore uptake di Glu, l'attività del sistema risulta più elevata  
rispetto a quando le cellule sono incubate in assenza di NPs in quanto la  
differenza di uptake in presenza e in assenza dell'inibitore è maggiore (Fig.  
24(B)).



**Figura 24. Efflusso di <sup>3</sup>H-Glu.** Le hTERT-MSC sono state incubate per 1 minuto a pH = 7.4 in EBSS privo di Na<sup>+</sup> addizionato di Glu 50 µM e <sup>3</sup>H-Glu 10 µCi/ml, come descritto in Materiali e Metodi. **(B)** Differenza di uptake misurato in presenza e in assenza di sulfasalazina (SSZ) nel controllo e nelle cellule incubate in presenza di NPs. I dati rappresentano la media ± SD di 2 esperimenti. \*p<0.5 vs control. Test t di student per dati non appaiati.

### 4.2.3 Le nanoplastiche modulano l'espressione di enzimi coinvolti nel metabolismo della glutamina nelle hTERT-MSC

Le hTERT-MSC sono state coltivate per 6h, 24h e 48h in DMEM addizionato di Gln e FBS in assenza o in presenza di NPs. Dai lisati cellulari è stata valutata tramite Western Blot l'espressione di enzimi coinvolti nel metabolismo della Gln quali GLS1, GS e ASNS. Come è possibile osservare in Figura 25, l'espressione di GLS1 non varia trattando le cellule con NPs rispetto al controllo, rappresentato dalle cellule non trattate. Invece, è possibile riscontrare un calo tempo-dipendente dell'espressione di ASNS nelle cellule trattate e un aumento dell'espressione di GS, la quale arriva a raddoppiare i propri livelli nelle cellule trattate per 48h con NPs.

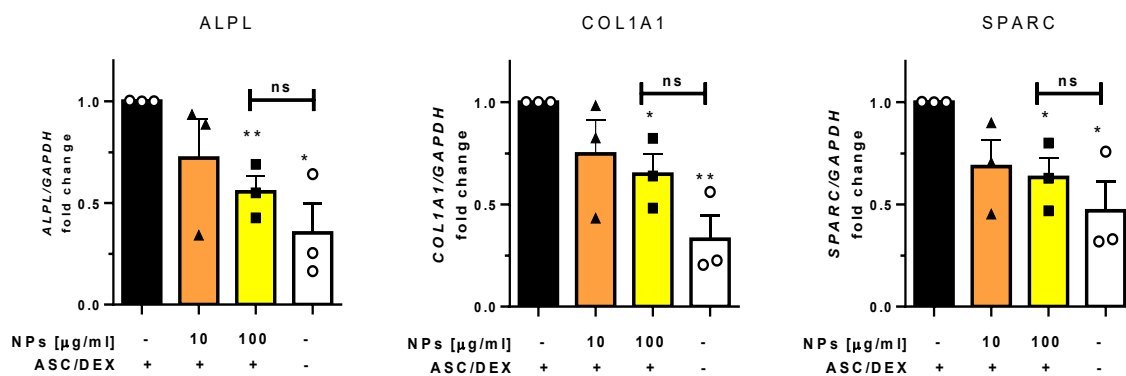


**Figura 25. Le NPs modulano gli enzimi coinvolti nel metabolismo della Gln nelle hTERT-MSC.** Le hTERT-MSC sono state incubate per 6h, 24h e 48h in DMEM addizionato di Gln e FBS in assenza o in presenza di NPs. Ai vari tempi sono stati ottenuti lisati cellulari ed è stato effettuato un Western Blot di GLS1, GS e ASNS. La  $\beta$ -actina è mostrata come controllo di caricamento dei campioni. I risultati sono espressi in relazione alle cellule non trattate con NPs che rappresentano il controllo posto pari a 1. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti. \* $p < 0.05$  vs controllo. One sample t-test.

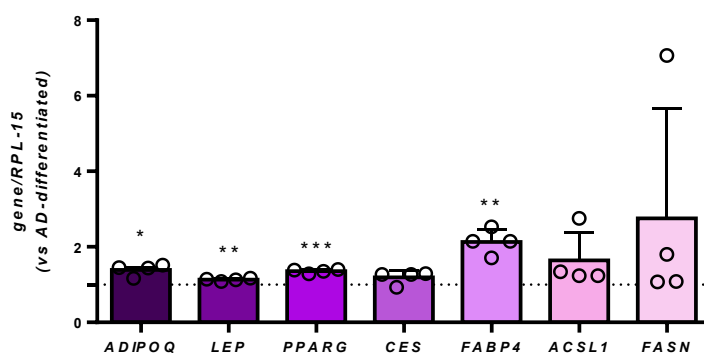
#### 4.2.4 Le nanoplastiche inibiscono l'osteogenesi e stimolano l'adipogenesi

Le hTERT-MSCs sono state incubate per 14 giorni in medium osteogenico in assenza o in presenza di due diverse concentrazioni di NPs (10 e 100 µg/ml) e in DMEM addizionato di Gln e FBS. Invece, le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in assenza o in presenza della massima concentrazione di NPs precedentemente utilizzata, quindi 100 µg/ml. Al termine dell'incubazione è stato estratto l'RNA ed è stata valutata tramite Real-Time PCR l'espressione dei rispettivi marker di differenziamento, *ALPL*, *COL1A1* e *SPARC* per quanto riguarda i marker di differenziamento osteogenico, e *ADIPOQ*, *LEP*, *PPARG*, *CES*, *FABP4*, *ACSL1* e *FASN* per quanto riguarda i marker di differenziamento adipocitario. Come è possibile osservare in Figura 26 (A), l'espressione di tutti e tre i marker di differenziamento osteogenico analizzati dimezza quando le cellule vengono incubate in medium osteogenico in presenza di 100 µg/ml di NPs mentre cala, ma non in maniera statisticamente significativa, in presenza di 10 µg/ml di NPs. I dati ottenuti sono espressi in relazione al controllo, rappresentato dalle cellule incubate in medium osteogenico in assenza di NPs che è stato posto pari a 1. Invece, in Figura 26 (B), è possibile osservare una tendenza in aumento dell'espressione di tutti i marker di differenziamento adipogenico analizzati nelle cellule incubate in medium adipogenico in presenza di 100 µg/ml di NPs.

(A)



(B)



**Figura 26. Espressione relativa dei geni coinvolti nell'osteogenesi e nell'adipogenesi. (A)** Le hTERT-MSC sono state incubate per 14 giorni in medium osteogenico in assenza o in presenza di NPs e in DMEM addizionato di Gln e FBS. Le cellule incubate in medium osteogenico in assenza di NPs rappresentano il controllo, il quale è stato posto pari a 1. Al termine del trattamento, l'espressione dei marker di differenziamento osteoblastico, ALPL, COL1A1 e SPARC, è stata valutata tramite Real-Time PCR e normalizzata rispetto all'espressione del gene housekeeping GAPDH. I dati rappresentano la media  $\pm$  SD di 3 esperimenti indipendenti. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs diff - NPs. One Sample t test. **(B)** Le MSC sono state incubate per 14 giorni in medium adipogenico in assenza o in presenza di NPs. Le cellule incubate in medium adipogenico in assenza di NPs rappresentano il controllo, il quale è stato posto pari a 1. L'espressione dei marker di differenziamento adipocitario, PPARG, LEP, ADIPOQ, FASN, FABP4, CES e ACSL1, è stata analizzata mediante Real-Time PCR e normalizzata rispetto all'espressione del gene housekeeping RPL-15. I dati rappresentano le medie  $\pm$  SD di 4 esperimenti indipendenti utilizzando MSC isolate da donatori differenti. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs diff - NPs. One Sample t test.

## 5. Discussione e conclusioni

Le cellule tumorali sono in grado di riprogrammare il metabolismo cellulare alterando l'assorbimento e il catabolismo dei nutrienti, evento che consente loro di mantenere un elevato tasso proliferativo senza subire una crisi energetica, di resistere allo stress ossidativo e di evadere dal controllo del sistema immunitario (Choi et al. 2018).

Vari studi hanno dimostrato che la glutamina (Gln) è un importante nutriente coinvolto in molteplici aspetti del metabolismo del cancro; infatti, fornisce l'azoto per la sintesi delle basi azotate e di altri aminoacidi e il carbonio per il ciclo di Krebs e per la sintesi dei lipidi e dei nucleotidi (Hirshey et al. 2015). Diversi tipi di cellule tumorali in attiva proliferazione, ad esempio quelle in cui sono stati attivati gli oncogeni K-RAS e MYC, riprogrammate per assorbire una maggior quantità di Gln extracellulare a causa della loro spiccata necessità di ottenere precursori biosintetici derivati dal metabolismo dell'aminoacido, vengono definite "glutamine addicted" (Bernfeld et al. 2019).

L'enzima chiave per l'utilizzo della Gln da parte delle cellule tumorali è la glutaminasi (GLS) che catalizza l'idrolisi della Gln ad ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) e glutamato (Glu) il quale può poi essere convertito a  $\alpha$ -chetoglutarato ( $\alpha$ -KG) dall'enzima glutamato deidrogenasi (GDH o GLUD) o da una transaminasi per entrare nel ciclo di Krebs (Hensley et al. 2013). Dall'altro lato la Gln viene sintetizzata *de novo* a partire da Glu e ammonio dall'enzima glutamina sintetasi (GS) anche se, nella maggior parte dei casi, le cellule tumorali dipendenti da Gln soddisfano il loro fabbisogno di aminoacido internalizzando la Gln presente nel compartimento extracellulare tramite trasportatori  $\text{Na}^+$ -dipendenti (SNAT1, SNAT2 e ASCT2) o  $\text{Na}^+$ -indipendenti (LAT1) (Cruzat et al. 2018, Bolzoni et al. 2016). Le plasmacellule di mieloma multiplo (MM), una neoplasia ematologica in cui si ha la proliferazione incontrollata e l'accumulo di una popolazione monoclonale di plasmacellule nel midollo osseo, non esprimono GS, sono, pertanto, auxotrofe per l'aminoacido e dipendono esclusivamente dalla Gln presente nel compartimento extracellulare. Tale caratteristica metabolica determina una riduzione significativa dei livelli di Gln nel midollo osseo dei pazienti. Inoltre, le cellule di mieloma rilasciano all'esterno una quantità notevole di Glu e di ammonio, ottenuti dal catabolismo della Gln tramite GLS

(altamente espressa nel MM), determinando iperammonemia e un aumento della concentrazione dell'aminoacido anionico (Bolzoni et al. 2016).

Coerentemente a quanto evidenziato in letteratura, attraverso l'utilizzo di  $^{13}\text{C}_5$ -glutamina abbiamo dimostrato che in tutte le linee cellulari di MM umano (HMCL) esaminate, MM1.S, RPMI8226, JJN3 e U266, almeno il 95% della Gln presente a livello intracellulare è  $^{13}\text{C}_5$ -glutamina per cui la Gln è stata efficacemente internalizzata dalle cellule mentre la sintesi intracellulare di tale aminoacido è risultata trascurabile. Inoltre, abbiamo evidenze che il Glu intracellulare deriva dalla deamidazione della  $^{13}\text{C}_5$ -glutamina operata da GLS in quanto la percentuale di Glu avente almeno un atomo di carbonio marcato ( $^{13}\text{C}_1$ ) è più del 90% del totale. Il Glu prodotto viene successivamente secreto in notevoli quantità presumibilmente dal trasportatore xCT il quale, in condizioni fisiologiche, scambia il Glu intracellulare con la cistina extracellulare, sostenendo la sintesi del glutatione (GSH). In particolare, le RPMI8226 e le JJN3 secernono una quantità di Glu che è 3-4 volte maggiore rispetto a quella secreta dalle altre linee cellulari esaminate, coerentemente con una più elevata attività del trasportatore xCT (dato non mostrato).

Qual è il destino metabolico del Glu secreto dalle cellule di MM? Abbiamo dimostrato che il Glu secreto dalle cellule di MM può essere internalizzato dalle cellule mesenchimali stromali (MSC) del midollo osseo e molto meno efficacemente dagli osteoblasti e abbiamo correlato questa differenza con un maggiore supporto trofico delle MSC indifferenziate nei confronti delle cellule di MM rispetto a quello fornito dalle MSC differenziate ad osteoblasti. Infatti, dopo un'incubazione di 14 giorni in medium standard o in medium osteogenico, l'uptake di Glu nelle MSC non differenziate è per la maggior parte  $\text{Na}^+$ -dipendente, quindi ascrivibile ai trasportatori EAAT, i quali, invece, non sono risultati attivi dopo il differenziamento in quanto nelle cellule differenziate non abbiamo notato alcuna differenza tra l'uptake in presenza e in assenza di sodio. Tale risultato suggerisce che il differenziamento osteoblastico reprime l'espressione dei trasportatori del Glu sodio-dipendenti. Per comprendere quale trasportatore fosse responsabile del trasporto del Glu, abbiamo valutato i livelli di espressione dei geni *SLC1A1*, codificante per il trasportatore EAAT3, *SLC1A2*, codificante per il trasportatore EAAT2, e *SLC1A3*, codificante per il trasportatore EAAT1, in MSC e in osteoblasti primari isolati da biopsie midollari di soggetti

sani o di pazienti affetti da MM. Di questi, l'espressione del gene *SLC1A1* è significativamente maggiore nelle MSC non differenziate rispetto agli osteoblasti, considerando sia i soggetti sani che i pazienti con MM. Per confermare tale risultato abbiamo incubato per 14 giorni MSC immortalizzate (hTERT-MS) in medium standard o in medium osteogenico e, sia mediante Real-Time PCR che tramite Western Blot e microscopia confocale, abbiamo osservato che l'espressione di EAAT3 viene repressa durante il differenziamento; tali risultati suggeriscono pertanto che le MSC, ma non gli osteoblasti, sono in grado di internalizzare il Glu secreto dalle cellule tumorali.

Una caratteristica peculiare del MM è la presenza di lesioni osteolitiche determinate da un aumento del riassorbimento osseo dovuto alla stimolazione della formazione e dell'attività degli osteoclasti e dalla compromissione del differenziamento delle MSC in senso osteoblastico (Giuliani et al. 2006). Il gruppo di ricerca con cui ho svolto il Dottorato ha dimostrato che uno dei meccanismi di inibizione del differenziamento osteoblastico è la deprivazione di Gln provocata dalle cellule di MM le quali competono con le MSC per la Gln extracellulare limitando la sintesi di asparagina (Asn), necessaria alle MSC per l'osteogenesi (Chiu et al. 2020). Il mantenimento delle MSC in uno stato indifferenziato può conferire alle cellule di MM un vantaggio metabolico attraverso la sintesi *de novo* della Gln tramite GS e la sua secrezione nel compartimento extracellulare. Grazie all'utilizzo della spettrometria di massa abbiamo riscontrato che le hTERT-MS in medium privo di Gln sono in grado di sintetizzare e secernere una quantità doppia di Gln rispetto agli osteoblasti, un fenomeno potenziato dal Glu presente nell'ambiente extracellulare e inibito sia da MSO (inibitore irreversibile di GS) che da D-Asp (inibitore competitivo di EAAT). Questi dati confermano che le MSC sono in grado di internalizzare il Glu secreto dalle cellule di MM grazie al trasportatore EAAT3 per produrre, grazie a GS, la Gln, necessaria per la crescita delle cellule tumorali auxotrofe per l'aminoacido, che può poi essere rilasciata nell'ambiente extracellulare presumibilmente tramite il trasportatore SNAT5, la cui espressione risulta aumentata nelle MSC co-coltivate con le cellule di mieloma (dato non mostrato). Infine, effettuando una co-coltura delle MSC con le RPMI8226, abbiamo osservato che in carenza di Gln le MSC sostengono la vitalità delle cellule di MM e che questo supporto nutrizionale è ridotto sia dall'inibizione di GS e EAAT3

che dal silenziamento dei rispettivi geni con una sostanziale diminuzione della vitalità delle cellule tumorali. Alla luce di questo risultato è possibile concludere che in carenza di Gln le MSC sono in grado di internalizzare Glu e produrre Gln che viene resa disponibile alle cellule tumorali supportandone la crescita e confermando il ruolo protettivo delle MSC nei confronti delle cellule di MM.

Tramite l'inibizione di EAAT3 o GS, ottenuta utilizzando rispettivamente D-Asp o MSO, o il silenziamento dei rispettivi geni (*SLC1A1* e *GLUL*), verrebbe a mancare il supporto trofico fornito dalle MSC alle cellule di MM. EAAT3 e GS costituirebbero, quindi, due nuovi bersagli molecolari che potrebbero essere sfruttati per approcci terapeutici basati sulla compromissione del rapporto metabolico esistente tra le due popolazioni cellulari.

È quindi ormai accertato che le alterazioni metaboliche associate al MM possono influenzare le cellule del microambiente midollare alterando il processo di differenziamento delle MSC (Chiu et al. 2020, Raimondi et al. 2022). Mentre in condizioni normali sono in grado di differenziarsi in osteoblasti, adipociti e condrociti, nei soggetti affetti da MM, mentre è inibita la loro differenziazione in senso osteoblastico (vedi sopra), è favorita quella in senso adipocitario (Chiu et al. 2020, Ruan et al. 2013). Il risultato è che in un paziente con MM gli adipociti occupano il 70% del volume del midollo osseo e supportano la progressione del tumore tramite la secrezione di citochine e adipochine, nonché di acidi grassi (Panaroni et al. 2022).

Ci siamo chiesti se, oltre a inibire il differenziamento osteoblastico, le peculiarità metaboliche del MM potessero influenzare il differenziamento adipocitario delle MSC. Per rispondere a questo quesito, abbiamo utilizzato terreni di coltura condizionati da HMCL in modo da mimare il microambiente tumorale, noto per essere caratterizzato da una ridotta concentrazione di Gln. In effetti, nelle MSC incubate con i medium condizionati carenti di Gln abbiamo riscontrato un aumento dell'espressione di tutti i marker di differenziamento analizzati e tale induzione risultava ridotta dalla sola aggiunta di Gln. Questo risultato suggerisce che la deprivazione di tale aminoacido, causata dal metabolismo delle cellule di MM, promuove il differenziamento adipocitario favorendo un microambiente pro-tumorale.

Per comprendere meglio l'effetto della deprivazione di Gln sul differenziamento adipocitario, abbiamo incubato le MSC in medium adipogenico in assenza o in presenza di Gln e dall'analisi dell'espressione genica abbiamo confermato una maggiore up-regolazione dei geni codificanti per enzimi coinvolti nella lipogenesi nelle cellule coltivate in assenza dell'aminoacido. L'avvenuto differenziamento è stato confermato dalla colorazione delle gocce lipidiche tramite Oil Red O e dalla successiva analisi spettrofotometrica dalla quale abbiamo riscontrato un incremento significativo nell'assorbanza nelle cellule coltivate in medium adipogenico in assenza di Gln, indicando un ruolo importante della carenza dell'aminoacido nella promozione dell'adipogenesi.

Al fine di comprendere le ragioni per cui la deprivazione di Gln favorisce il differenziamento adipocitario, abbiamo valutato l'espressione dei geni chiave nel metabolismo della Gln, *GLS*, codificante per GLS, e *GLUL*, codificante per GS. L'espressione di *GLS* è risultata dimezzata nelle MSC differenziate ad adipociti rispetto al controllo, rappresentato dalle cellule non differenziate, indipendentemente dalla presenza di Gln nel medium di coltura, indicando una riduzione del catabolismo di Gln nelle cellule adipose. D'altro lato, abbiamo riscontrato un aumento dell'espressione di *GLUL* che, mediando la sintesi *de novo* della Gln a partire da Glu e  $\text{NH}_4^+$ , determina un aumento della produzione endogena dell'aminoacido. Tuttavia, l'induzione genica di *GLUL* potrebbe essere determinata dalla presenza di desametasone (Dex) nel medium adipogenico, fattore che non ci consente di avere un quadro chiaro in merito al ruolo della Gln sulla modulazione dell'espressione di tale gene durante l'adipogenesi.

Al fine di indagare quali sono i processi molecolari che determinano l'induzione del differenziamento adipocitario delle MSC in assenza di Gln, abbiamo utilizzato i lisati cellulari ottenuti coltivando le cellule in medium standard o in medium adipogenico, in assenza o in presenza di Gln, per valutare tramite Western Blot l'espressione a livello proteico di marker adipogenici e di stress nutrizionale. La deprivazione di Gln ha determinato non solo l'aumentata induzione dei marker di differenziamento adipocitario ADIPOQ e FABP4 ma anche la riduzione dell'espressione di fosfo-p70 S6K1, una chinasi a valle di mTOR, l'aumento di espressione di GS e l'attivazione di risposte cellulari a stress nutrizionale, come l'aumento di fosforilazione di eIF2 $\alpha$ . Da letteratura è noto che l'espressione e l'attività di GS in varie linee cellulari è soggetta a down-

regolazione in presenza di Gln in quanto tale aminoacido determinerebbe la degradazione dell'enzima e cambiamenti trascrizionali e traduzionali nella maggior parte delle cellule (Wang et al. 2007). La chinasi mTOR, d'altra parte, è un importante punto di controllo del metabolismo cellulare che opera attraverso i due complessi mTORC1 e mTORC2 il primo dei quali viene modulato da fattori di crescita, dallo stato energetico della cellula e dalla disponibilità di aminoacidi, quali leucina (Leu), arginina e Gln (Sengupta et al. 2010, Fox et al. 1998, Bauchart-Thevret et al. 2010, Gleason et al. 2007). Coerentemente a quanto riscontrato sperimentalmente, il nostro gruppo di ricerca aveva precedentemente dimostrato che l'incubazione di cellule HeLa ed HepG2 in terreno privo di Gln sopprime l'attività di mTORC1 (Chiu et al. 2012). Inoltre, in condizioni di stress, quali la deplezione di Gln o glucosio, le cellule tumorali attivano l'UPR il quale può svolgere un ruolo pro-tumorale o attivare percorsi di morte cellulare a seconda della natura e dell'entità dello stress. I percorsi UPR, quali quelli innescati da PERK e IRE1, facilitano l'adattamento cellulare alterando i processi metabolici e la sintesi proteica, consentendo alle cellule tumorali di sopravvivere in ambienti ipossici o poveri di nutrienti. Tuttavia, la deplezione cronica di Gln può portare a risposte disadattive, come l'aumento dell'apoptosi, attraverso l'induzione di fattori pro-apoptotici come CHOP (Ojha et al. 2018, Khanna et al. 2021). I risultati ottenuti sperimentalmente ci consentono di formulare l'ipotesi che lo stress nutrizionale, indotto dalla carenza di Gln, possa favorire il differenziamento adipocitario e che la Gln possa agire come sensore modulando il destino delle MSC e influenzando l'accumulo di acidi grassi.

L'analisi del profilo aminoacidico effettuata mediante spettrometria di massa ha evidenziato una significativa riprogrammazione metabolica nelle MSC durante l'adipogenesi. In particolare, abbiamo riscontrato una concentrazione triplicata di Glu nelle cellule incubate in medium adipogenico in presenza di Gln e una riduzione del 90% in quelle incubate in assenza dell'aminoacido. Invece, la concentrazione di Gln si è ridotta solo del 30% nelle MSC incubate in assenza di Gln suggerendo che il Glu possa essere utilizzato per la produzione di Gln. Parallelamente, l'incubazione in medium adipogenico, indipendentemente dalla presenza o dall'assenza di Gln, ha determinato l'attivazione di percorsi anabolici alternativi nelle MSC, evidenziabili dal significativo aumento dei livelli degli

aminoacidi a catena ramificata (BCAA) Leu e isoleucina (Ile). Infine, la concentrazione dell'asparagina (Asn), noto aminoacido osteogenico (Chiu et al. 2020), è risultata diminuita nelle MSC differenziate, in particolare in quelle incubate in assenza di Gln.

La Gln non solo è il diretto precursore del Glu attraverso l'azione di GLS, ma anche dell'Asn tramite l'attività dell'enzima asparagina sintetasi (ASNS). È noto che in carenza di Gln, l'Asn è in grado di ripristinare la sopravvivenza e la crescita cellulare in diversi modelli tumorali supportando la sintesi proteica (Pavlova et al. 2017). A tal proposito, i risultati ottenuti mostrano che la differenziazione precoce delle MSC ad adipociti è influenzata dalla disponibilità di specifici aminoacidi, quali Gln e Asn. Infatti, l'aggiunta di Asn nel medium adipogenico ha modulato negativamente l'adipogenesi, suggerendo un ruolo inibitorio di tale aminoacido nel processo di differenziamento. L'analisi dell'espressione genica effettuata tramite Real-Time PCR ha evidenziato l'induzione del gene *ADIPOQ* nelle cellule differenziate in medium adipogenico in assenza di Gln e Asn mentre l'aggiunta di Asn ha soppresso questa up-regolazione, indicando un effetto inibitorio sull'adipogenesi a livello molecolare. Anche nel caso del gene *LEP* (che codifica la leptina) abbiamo riscontrato un aumento significativo della sua espressione in assenza di entrambi gli aminoacidi, mentre la presenza di Asn nel medium di coltura ha determinato una riduzione dell'espressione genica di circa la metà, confermando un possibile effetto regolatore dell'aminoacido sulla sintesi della adipochina. Infine, l'espressione del gene *PPARG* è risultata triplicata nelle cellule incubate in medium adipogenico in assenza di Gln e Asn, mentre è rimasta stabile in presenza di Asn, suggerendo che tale aminoacido non abbia un'influenza diretta sull'espressione del gene in esame. Questi risultati suggeriscono che la disponibilità di specifici metaboliti, in particolare Asn, possa modulare la risposta adipogenica. Anche in questo caso, l'avvenuto differenziamento è stato confermato dalla colorazione delle gocce lipidiche tramite Oil Red O da cui è emerso che le MSC differenziate in assenza di Gln presentano gocce lipidiche che sono maggiori in numero e dimensione rispetto a quelle presenti nelle MSC differenziate in medium contenente l'aminoacido. Inoltre, l'aggiunta di Asn al medium di differenziamento ha attenuato questo effetto confermando il suo ruolo inibitorio sulla lipogenesi.

I risultati ottenuti suggeriscono che il microambiente midollare di un paziente con MM, caratterizzato da un lato da bassi livelli di Gln e dall'altro da alti livelli di Glu, imposto dalla glutamine addiction delle cellule di MM, determina un calo della disponibilità di Asn ed è funzionale a manipolare le MSC in senso pro-tumorale. Infatti, questo ambiente metabolico inibisce il differenziamento osteoblastico mentre promuove quello adipocitario, noto per favorire la progressione tumorale attraverso la secrezione di acidi grassi (Panaroni et al. 2022). In effetti, la supplementazione con Asn potrebbe essere un approccio terapeutico efficace non solo a inibire il differenziamento delle MSC in senso adipocitario ma anche a rallentare la progressione delle lesioni ossee tramite il ripristino del differenziamento osteoblastico.

Tuttavia, è importante notare che le alterazioni metaboliche associate al MM possono influenzare non solo il comportamento delle MSC, ma anche quello delle cellule del sistema immunitario, come i macrofagi e i linfociti T. I macrofagi associati al tumore (TAM) rappresentano una componente cospicua del microambiente midollare del MM contribuendo, tramite la secrezione di IL-6, IL-10 e fattori pro-angiogenici, alla creazione di un ambiente ottimale per la crescita del tumore (Kim et al. 2012). I TAM somigliano a macrofagi con polarizzazione M2 caratterizzati da limitata citotossicità nei confronti delle cellule tumorali a causa della loro scarsa produzione di ossido nitrico, citochine pro-infiammatorie e ridotta capacità di presentare l'antigene (Berardi et al. 2013). Inoltre, è stato dimostrato un aumento significativo del numero di macrofagi M2 nel midollo osseo dei pazienti con MM rispetto a MGUS e SMM, dato che consente di ipotizzare un possibile coinvolgimento delle plasmacellule maligne nell'induzione di tale polarizzazione (Beider et al. 2014). Inoltre, l'alterazione più frequentemente descritta nei pazienti è la diminuzione del numero dei linfociti T helper che è associata a sopravvivenza inferiore e a maggiore probabilità di recidiva. Sia le cellule di MM che le MSC, tramite la produzione di TGF- $\beta$  e IL-6, indurrebbero la differenziazione delle cellule T naive in Th17, un sottogruppo di linfociti T helper aventi funzione immunosoppressiva mediata dalla secrezione di citochine in grado di stimolare la proliferazione delle cellule tumorali (Diaz-Tejedor et al. 2021). Dati i cambiamenti a livello immunitario già noti dalla letteratura, un ulteriore step della linea di ricerca esposta in questa tesi potrebbe essere rappresentato dallo studio dei possibili

effetti determinati dall'ambiente low-Gln/high-Glu, imposto dalle cellule di MM, su macrofagi e linfociti T. In quest'ottica, un approccio terapeutico ipoteticamente "vincente" considerando una popolazione cellulare presente a livello midollare (ad esempio le MSC), potrebbe non essere funzionale a livello immunitario. Ad esempio, la deplezione di Gln potrebbe ostacolare la crescita delle cellule di MM ma contemporaneamente intaccare negativamente le cellule del sistema immunitario. Tali considerazioni portano alla luce la consapevolezza che le conseguenze di ogni manipolazione metabolica dovrebbero essere valutate nel contesto più ampio del microambiente tumorale e di tutte le popolazioni cellulari che lo compongono.

In quest'ottica, abbiamo deciso di ampliare il campo delle nostre ricerche indagando il ruolo di nanoplastiche (NPs) di polistirene (PS) sul differenziamento delle MSC e su possibili alterazioni del metabolismo della Gln. Le NPs sono particelle aventi almeno una dimensione inferiore a 100 nm e da letteratura è noto che possono entrare nella catena alimentare tramite inalazione e ingestione rappresentando una potenziale minaccia per la salute umana (Hirt et al. 2020, Thompson et al. 2024). Esse sono in grado di penetrare la membrana plasmatica cellulare e adsorbire proteine e altri composti che formano la cosiddetta "corona", la quale può influenzare il destino della particella e l'interazione con altre cellule (Bianchi et al. 2025). In accordo con la letteratura, tramite microscopia confocale abbiamo confermato l'effettiva internalizzazione di NPs di PS nelle hTERT-MSC e la loro localizzazione sia a livello citoplasmatico che lisosomiale. Inoltre, i lisosomi delle cellule trattate sono risultati aumentati in numero e dimensione rispetto a quelli presenti nelle cellule non trattate, suggerendo un loro possibile blocco a livello funzionale.

Una volta confermato il loro ingresso nelle cellule, abbiamo ipotizzato che le NPs potessero alterare la vitalità delle MSC ma, tramite il saggio della Resazurina, non abbiamo riscontrato cambiamenti significativi. Il fatto che tale risultato non sia in pieno accordo con la letteratura, in quanto in linee cellulari ossee murine le NPs hanno determinato un calo significativo della vitalità, probabilmente tramite l'induzione dell'attività della caspasi 3/7, ci ha fatto ipotizzare che le NPs possano avere altri effetti. Ad esempio, è noto che le NPs determinano un'over-produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) con stress ossidativo (Giannandrea et al. 2024). In linea con la letteratura, dopo 6h di trattamento

con NPs abbiamo riscontrato un'up-regolazione di due molecole "sentinella": a livello genico di *HO-1*, gene codificante per l'enzima eme ossigenasi 1, e a livello proteico dello scambiatore xCT, incremento sempre più evidente al prolungarsi della durata dell'esposizione alle NPs. xCT è uno scambiatore in grado di mediare l'efflusso di Glu in scambio di cistina, un aminoacido avente un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi redox cellulare. Una volta importata nel citosol la cistina viene infatti ridotta a cisteina la quale viene successivamente impiegata per la sintesi del GSH, tripeptide con proprietà antiossidanti (Yan et al. 2023).

L'effettivo funzionamento del trasportatore è stato verificato mediante la misurazione della sua attività nelle hTERT-MSC incubate in assenza o in presenza di NPs tramite l'utilizzo del tracciante <sup>3</sup>H-Glu. Abbiamo riscontrato che tutte le cellule internalizzano Glu e che una frazione di uptake è inibita dalla sulfasalazina (SSZ), inibitore specifico di questo scambiatore. Tuttavia, nelle hTERT-MSC incubate in presenza di NPs il sistema risulta essere più attivo rispetto alla controparte in quanto la differenza di uptake in presenza e in assenza dell'inibitore è maggiore. Questi risultati suggeriscono che il trattamento con NPs origina una situazione di stress ossidativo che viene fronteggiata dalle cellule mediante l'induzione dello scambiatore xCT, utile per importare la cistina necessaria per la sintesi del GSH, la cui quota ridotta in effetti risulta diminuita a seguito di esposizione a NPs (dato non mostrato).

Poiché la Gln ha una funzione antiossidante fornendo il Glu necessario per la sintesi di GSH, abbiamo valutato se le NPs modificassero l'espressione di enzimi coinvolti nel metabolismo della Gln nelle MSC. Tramite analisi Western Blot nelle cellule incubate con NPs per 6h, 24h e 48h abbiamo riscontrato un aumento dell'espressione di GS, sempre più evidente all'aumentare del tempo di esposizione alle NPs, e contemporaneamente una riduzione di ASNS. Tali risultati ci hanno consentito di ipotizzare una possibile interferenza delle NPs sul differenziamento osteoblastico delle MSC in quanto esso è associato a un aumento dell'espressione di ASNS (Chiu et al. 2020). In effetti, anche l'eccesso di ROS potrebbe compromettere l'auto-rinnovamento, la capacità di differenziazione e la proliferazione delle MSC; in particolare, da letteratura è noto che ROS inibiscono il differenziamento osteoblastico mentre inducono quello adipocitario (Denu et al. 2016). Abbiamo, quindi, deciso di incubare le

hTERT-MSC in medium osteogenico in assenza e in presenza di due diverse concentrazioni di NPs e dall'analisi dell'espressione genica dei marker di differenziamento osteoblastico analizzati, *ALPL*, *COL1A1* e *SPARC*, abbiamo riscontrato un calo significativo della loro induzione nelle cellule incubate in presenza della massima concentrazione di NPs. Parallelamente, poiché uno stimolo anti-osteogenico generalmente è pro-adipogenico, e viceversa, abbiamo incubato le MSC in medium adipogenico in assenza e in presenza di NPs e al termine dell'incubazione abbiamo riscontrato nelle cellule incubate in medium contenente le NPs una tendenza in aumento dell'espressione genica dei marker di differenziamento adipocitario analizzati (*ADIPOQ*, *LEP*, *PPARG*, *CES*, *FABP4*, *ACSL1* e *FASN*).

In conclusione, è possibile affermare che le NPs, microscopici inquinanti ambientali derivanti dalle attività umane in grado di penetrare nel midollo osseo (Jing et al. 2022), vengono efficacemente internalizzate dalle MSC senza, però, alterarne acutamente la vitalità. Tuttavia, attraverso l'induzione di un'iperproduzione di ROS, potrebbero rappresentare una nuova fonte di stress ossidativo che impatta sul microambiente osseo alterando il processo di differenziamento delle MSC, favorendo quello adipocitario e inibendo quello osteogenico. Nel contesto tumorale del MM, tale scenario potrebbe contribuire a potenziare ulteriormente in senso pro-tumorale il microambiente midollare imposto dalla "glutamine addiction" delle cellule di MM.

## Bibliografia

Abramson HN., *Monoclonal Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma: An Update*, Int J Mol Sci, 19 (12): 3924 (2018)

Ali A. T., Hochfeld W. E., Myburgh R., Pepper M. S., *Adipocyte and adipogenesis*, European Journal of Cell Biology, 92 (6-7): 229-236 (2013)

Basak G. W., Srivastava A. S., Malhotra R., Carrier E., *Multiple myeloma bone marrow niche*, Current Pharmaceutical Biotechnology, 10 (3): 345-346 (2009)

Bauchart-Thevret C., Cui L., Wu G., Burrin D. G., *Arginine-induced stimulation of protein synthesis and survival in ipec-j2 cells is mediated by mtor but not nitric oxide*, Am J Physiol Endocrinol Metab, 299: E899–E909 (2010)

Beider K., Bitner H., Leiba M., Gutwein O., Koren-Michowitz M., Ostrovsky O., Abraham M., Wald H., Galun E., Peled A., Nagler A., *Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype*, Oncotarget, 5 (22): 11283-11296 (2014)

Berardi S., Ria R., Reale A., De Luisi A., Catacchio I., Moschetta M., Vacca A., *Multiple Myeloma Macrophages: Pivotal Players in the Tumor Microenvironment*, J Oncol, 2013 (2013)

Bernfeld E., Foster D. A., *Glutamine as an Essential Amino Acid for KRas-Driven Cancer Cells*, Trends in Endocrinology & Metabolism, 30 (6): 357-368 (2019)

Bianchi G., Anderson K. C., *Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back*, CA, A Cancer Journal for Clinicians, 64 (6): 422-444 (2014)

Bianchi MG., Casati L., Sauro G., Taurino G., Griffini E., Milani C., Ventura M., Bussolati O., Chiu M., *Biological Effects of Micro-/Nano-Plastics in Macrophages*, Nanomaterials (Basel), 15 (5): 394 (2025)

Bolli N., Avet-Loiseau H., Wedge D. C., Van Loo P., Alexandrov L. B., Martincorena I., Dawson K. J., Iorio F., Nik-Zainal S., Bignell G. R., Hinton J. W., Li Y., Tubio J. M.C., McLaren S., O' Meara S., Butler A. P., Teague J. W., Mudie L., Anderson E., Rashid N., Tai Y-T., Shamma M. A., Sperling A. S.,

Fulciniti M., Richardson P. G., Parmigiani G., Magrangeas F., Minvielle S., Moreau P., Attal M., Facon T., Futreal P. A., Anderson K. C., Campbell P. J., Munshib N. C., *Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma*, Nature Communications, 5: 2997 (2014)

Bolzoni M., Chiu M., Accardi F., Vescovini R., Airoidi I., Storti P., Todoerti K., Agnelli L., Missale G., Andreoli R., Bianchi M. G., Allegri M., Barilli A., Nicolini F., Cavalli A., Costa F., Marchica V., Toscani D., Mancini C., Martella E., Dall'Asta V., Donofrio G., Aversa F., Bussolati O., Giuliani N., *Dependence on glutamine uptake and glutamine addiction characterize myeloma cells: a new attractive target*, Blood 128 (5): 667-679 (2016)

Bhutia Y. D., Babu E., Ramachandran S., Ganapathy V., *Amino Acid Transporters in Cancer and Their Relevance to "Glutamine Addiction": Novel Targets for the Design of a New Class of Anticancer Drugs*, Cancer Research, 75 (9): 1782-1788 (2015)

Bhutia Y. D., Ganapathy V., *Glutamine Transporters in Mammalian Cells and Their Functions in Physiology and Cancer*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1863 (10): 2531-2539 (2016)

Caetano-Lopes J., Canhão H., Fonseca J. E., *Osteoblasts and bone formation*, Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa De Reumatologia - acta reum port., 32: 103-110 (2007) Campbell M. K., Farrell S. O., *Biochimica*, IV edizione, 2012, Napoli, EdiSES s.r.l.

Caplan A., *Mesenchymal stem cells*, J Orthop Res, 9: 641-50 (1991)

China S.P., Sanyal S., Chattopadhyay N., *Adiponectin signaling and its role in bone metabolism*, Cytokine, 112: 116-131 (2018)

Chiu M., Tardito S., Barilli A., Bianchi M. G., Dall'Asta V., Bussolati O., *Glutamine stimulates mTORC1 independent of the cell content of essential amino acids*, Amino Acids, 43 (6): 2561-2567 (2012)

Chiu M., Toscani D., Marchica V., Taurino G., Costa F., Bianchi M. G., Andreoli R., Franceschi V., Storti P., Burroughs-Garcia J., Eufemiese R. A., Dalla Palma B., Campanini N., Martella E., Mancini C., Shan J., Kilberg M. S., D'Amico G., Dander E., Agnelli L., Pruneri G., Donofrio G., Bussolati O., Giuliani N.,

*Myeloma Cells Deplete Bone Marrow Glutamine and Inhibit Osteoblast Differentiation Limiting Asparagine Availability*, *Cancers (Basel)*, 12 (11): 3267 (2020)

Chng W.J., Glebov O., Bergsagel P.L., Kuehl W.M., *Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma*, *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 20 (4): 571-596 (2007)

Choi Y-K., Park K-G., *Targeting Glutamine Metabolism for Cancer Treatment*, *Biomolecules & Therapeutics (Seoul)*, 26 (1): 19-28 (2018)

Chowdhury R., McDonough M. A., Mecinović J., Loenarz C., Flashman E., Hewitson K. S., Domene C., Schofield C. J., *Structural Basis for Binding of Hypoxia-Inducible Factor to the Oxygen-Sensing Prolyl Hydroxylases*, *Structure*, 17 (7): 981-989 (2009)

Corre J., Mahtouk K., Attal M., Gadelorge M., Huynh A., Fleury-Cappellesso S., Danho C., Laharrague P., Klein B., Rème T., Bourin P., *Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma*, *Leukemia* 21 (5): 1079-1088 (2007)

Cruzat V., Rogero M. M., Keane K. N., Curi R., Newsholme P., *Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation*, *Nutrients*, 10 (11): 1564 (2018)

Dalamaga M., Karmaniolas K., Panagiotou A., Hsi A., Chamberland J., Dimas C., Lekka A., Mantzoros C.S., *Low circulating adiponectin and resistin, but not leptin, levels are associated with multiple myeloma risk: a case-control study*, *Cancer Causes Control*, 20 (2): 193-9 (2009)

Denu R. A., Hematti P., *Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology*, *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 2989076 (2016)

Díaz-Tejedor A., Lorenzo-Mohamed M., Puig N., García-Sanz R., Mateos M., Garayoa M., Páino T., *Immune System Alterations in Multiple Myeloma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies to Reverse Immunosuppression*, *Cancers (Basel)*, 13 (6): 1353 (2021)

Ding D-C., Shyu W-C., Lin S-Z., *Mesenchymal stem cells*, *Cell Transplant*, 20 (1): 5-14 (2011)

- Denko N. C., Hypoxia, *HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour*, Nature Reviews Cancer, 8: 705-713 (2008)
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F. C., Krause D. S., Deans R. J., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E. M., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*, Cytotherapy, 8 (4): 315-317 (2006)
- El Ansari R., McIntyre A., Craze M. L., Ellis I. O., Rakha E. A., Green A. R., *Altered glutamine metabolism in breast cancer; subtype dependencies and alternative adaptations*, Histopathology, 72 (2): 183-190 (2018)
- El-Masri BM., Leka B., Mustapha F., Gundesen MT., Hinge M., Lund T., Andersen TL., Diaz-delCastillo M., Jafari A., *Bone marrow adipocytes provide early sign for progression from MGUS to multiple myeloma*, Oncotarget, 15:20-26 (2024)
- Fox H. L., Pham P. T., Kimball S. R., Jefferson L. S., Lynch C. J., *Amino acid effects on translational repressor 4e-bp1 are mediated primarily by l-leucine in isolated adipocytes*, Am J Physiol, 275: C1232–C1238 (1998)
- Friedenstein AJ., Chailakhjan RK., Lalykina KS., *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*, Cell Tissue Kinet, 3: 393–403 (1970)
- Gatenby R. A., Gillies R. J., *Why do cancers have high aerobic glycolysis?*, Nature Reviews Cancer, 4: 891-899 (2004)
- Gavriatopoulou M., Paschou S. A., Ntanasis-Stathopoulos I., Dimopoulos M. A., *Metabolic Disorders in Multiple Myeloma*, International Journal of Molecular Sciences, 22 (21): 11430 (2021)
- Giannandrea D., Parolini M., Citro V., De Felice B., Pezzotta A., Abazari N., Platonova N., Sugni M., Chiu M., Villa A., Lema E., Chiaramonte R., Casati L., *Nanoplastic impact on bone microenvironment: A snapshot from murine bone cells*, Journal of Hazardous Materials, 462, 132717 (2024)
- Giuliani N., Rizzoli V., Roodman GD. *Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition*, Blood, 108(13):3992-6 (2006)

- Gleason C. E., Lu D., Witters L. A., Newgard C. B., Birnbaum M. J., *The role of *ampk* and *mtor* in nutrient sensing in pancreatic beta-cells*, *J Biol Chem* 282:10341–10351 (2007)
- Hadjidakis D. J., Androulakis I. I., *Bone Remodeling*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092 (1): 385-396 (2007)
- Hanahan D, RA Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*, *Cell*, 144:646-74 (2011)
- Hartmann C., *A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis*, *Trends in Cell Biology*, 16 (3): 151-158 (2006)
- Hensley C. T., Wasti A. T., DeBerardinis R. J., *Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities*, *The Journal of Clinical Investigation*, 123 (9): 3678-3684 (2013)
- Hirschey M. D., DeBerardinis R. J., Diehl A. M. E., Drew J. E., Frezza C., Green M. F., Jones L. W., Ko Y. H., Le A., Lea M. A., Locasale J. W., Longo V. D., Lyssiotis C. A., McDonnell E., Mehrmohamadi M., Michelotti G., Muralidhar V., Murphy M. P., Wellent K. E., *Dysregulated metabolism contributes to oncogenesis*, *Seminars in Cancer Biology*, 35: S129-S150 (2015)
- Hirt N., Body-Malapel M., *Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature*, *Part Fibre Toxicol.*, 17:57 (2020)
- Hofmann J.N., Mailankody S., KordeN., Wang Y., Tajeja N., Costello R., Zingone A., Hulcrantz M., Pollak M.N., Purdue M.P., Landgren O., *Circulating Adiponectin Levels Differ Between Patients with Multiple Myeloma and its Precursor Disease*, *Obesity (Silver Spring)*, 25 (8): 1317-1320 (2017)
- Hou Q., Li X., Ma H., Fu D., Liao A. *A systematic epidemiological trends analysis study in global burden of multiple myeloma and 29 years forecast*, *Nature, Scientific Reports* 15: 2204 (2025)
- Jing J., Zhang L., Han L., Wang J., Zhang W., Liu Z., Gao A., *Polystyrene micro-/nanoplastics induced hematopoietic damages via the crosstalk of gut microbiota, metabolites, and cytokines*, *Environment International*, 161, 107131 (2022)

Karner CM., Esen E., Okunade AL., Patterson BW., Long F., *Increased glutamine catabolism mediates bone anabolism in response to WNT signaling*, J Clin Invest, 125(2):551-62 (2015)

Kaur J., Valisekka S. S., Hameed M., Bandi P. S., Varma S., Onwughalu C. J., Ibrahim H., Mongia H. *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: A Comprehensive Review*, Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia, 23 (5): e195-e212 (2023)

Khanna M., Agrawal N., Chandra R., Dhawan G., *Targeting unfolded protein response: a new horizon for disease control*, Expert Reviews in Molecular Medicine, 23, e1, 1-12 (2021)

Kim J., Denu R. A., Dollar B. A., Escalante L. E., Kuether J. P., Callander N. S., Asimakopoulos F., Hematti P., *Macrophages and mesenchymal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cells*, Br J Haematol, 158 (3): 336-46 (2012)

Kim G. W., Lee D. H., Jeon Y. H., Yoo J., Kim S. Y., Lee S. W., Cho H. Y., Kwon S. H., *Glutamine Synthetase as a Therapeutic Target for Cancer Treatment*, International Journal of Molecular Sciences, 22 (4): 1701 (2021)

Krajewski W. W., Collins R., Holmberg-Schiavone L., Jones T. A., Karlberg T., Mowbray S. L., *Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design*, Journal of Molecular Biology, 375 (1): 217-228 (2008)

Kuai Y., Chen Z., Xie K., Chen J., He J., Gao J., Yu C., *Long-term exposure to polystyrene microplastics reduces macrophages and affects the microbiota-gut-brain axis in mice*, Toxicology, 509, 153951 (2024)

Kuehl W. M., Bergsagel P. L., *Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions*, Nature Reviews Cancer, 2: 175-187 (2002)

Kumar S. K., Rajkumar V., Kyle R. A., van Duin M., Sonneveld P., Mateos M. V., Gay F., Anderson K. C., *Multiple myeloma*, Nature Reviews Disease Primers, 3, Article number: 17046 (2017)

Lefterova M., Lazar M. A., *New developments in adipogenesis*, Trends in Endocrinology & Metabolism, 20 (3): 107-114 (2009)

Leslie H.A., van Velzen M.J.M., Brandsma S.H., Vethaak A.D., Garcia-Vallejo J.J., Lamoree M.H., *Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood*, *Environment International*, 163, 107199 (2022)

Liu Z., Xu J., He J., Liu H., Lin P., Wan X., Navone NM., Tong Q., Kwak LW., Orlowski RZ., Yang J., *Mature adipocytes in bone marrow protect myeloma cells against chemotherapy through autophagy activation*, *Oncotarget*, 6 (33): 34329-34341 (2015)

Lu Y., Zhang Y., Deng., Jiang., Zhao Y., Geng J., Ding L., Ren H., *Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (Danio rerio) and Toxic Effects in Liver*, *Environmental Science & Technology*, 50 (7): 4054-4060 (2016)

Mackenzie B., Erickson J. D., *Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family*, *Pflügers Archiv*, 447: 784-795 (2004)

Marques-Mourlet C., Di Iorio R., Fairfield H., Reagan MR., *Obesity, and myeloma: Clinical and mechanistic contributions to disease progression*, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14:1118691 (2023)

Neumeister P., Schulz E., Pansy K., Szmyra M., JA Deutsch A., *Targeting the Microenvironment for Treating Multiple Myeloma*, *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (14): 7627 (2022)

Nojiri H., Saita Y., Morikawa D., Kobayashi K., Tsuda C., Miyazaki T., Saito M., Marumo K., Yonezawa I., Kaneko K., Shirasawa T., Shimizu T., *Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking*, *Journal of Bone and Mineral Research*, 26 (11): 2682-2694 (2011)

Ojha R., Amaravadi R. K., *Targeting the unfolded protein response in cancer*, *Pharmacol Res.*, 120: 258-266 (2017)

Olivares-Bañuelos T. N., Chí-Castañeda D., Ortega A., *Glutamate transporters: Gene expression regulation and signaling properties*, *Neuropharmacology*, 161, 107550 (2019)

Oshima K., Nampei A., Matsuda M., Iwaki M., Fukuhara A., Hashimoto J., Yoshikawa H., Shimomura I., *Adiponectin increases bone mass by suppressing*

*osteoclast and activating osteoblast*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 331 (2): 520-526 (2005)

Panaroni C., Fulzele K., Mori T., Siu K. T., Onyewadume C., Maebius A., Raje N., *Multiple myeloma cells induce lipolysis in adipocytes and uptake fatty acids through fatty acid transporter proteins*, Blood, 139 (6): 876-888 (2022)

Patané G., Caporarello N., Marchetti P., Parrino C., Sudano D., Marselli L., Vigneri R., Frittitta L., *Adiponectin increases glucose-induced insulin secretion through the activation of lipid oxidation*, Acta Diabetologica, 50: 851-857 (2013)

Pavlova N. N., Hui S., Ghergurovich J. M., Fan J., Intlekofer A. M., White R. M., Rabinowitz J. D., Thompson C. B., Zhang J., *As Extracellular Glutamine Levels Decline, Asparagine Becomes an Essential Amino Acid.*, Cell Metab, 27 (2): 428-438.e5 (2018)

Pochini L., Scalise M., Galluccio M., Indiveri C., *Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health*, Frontiers in Chemistry, 2: 61 (2014)

Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali O., Papa F., Rongioletti M.C.A., Baiocco F., Draghi S., D'Amore E., Rinaldo D., Matta M., Giorgini E., *Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta*, Environment International, 146, 106274 (2021)

Raimondi V., Toscani D., Marchica V., Burroughs-Garcia J., Storti P., Giuliani N., *Metabolic features of myeloma cells in the context of bone microenvironment: Implication for the pathophysiology and clinic of myeloma bone disease*, Front Oncol, 12:1015402 (2022)

Rizzieri D., Paul B., Kang Y., *Metabolic alterations and the potential for targeting metabolic pathways in the treatment of multiple myeloma*, Journal of Cancer Metastasis and Treatment, 5: 26 (2019)

Roodman G. D., *Mechanisms of Bone Metastasis*, The New England Journal of Medicine, 350: 1655-1664 (2004)

Rosen E. D., MacDougald O. A., *Adipocyte differentiation from the inside out*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7: 885-896 (2006)

Ruan J., Trotter T. N., Nan L., Luo R., Javed A., Sanderson R. D., Suva L. J., Yang Y., *Heparanase inhibits osteoblastogenesis and shifts bone marrow progenitor cell fate in myeloma bone disease*, *Bone*, 57 (1): 10-17 (2013)

Scalise M., Pochini L., Galluccio M., Console L., Indiveri C., *Glutamine transporters as pharmacological targets: From function to drug design*, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15 (2): 207-219 (2020)

Sengupta S., Peterson T. R., Sabatini D.M., *Regulation of the mtor complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress*, *Mol Cell* 40: 310–322 (2010)

Seo MJ., Suh SY., Bae YC., Jung JS., *Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo*, *Biochem Biophys Res Commun*, 328 (1): 258-64 (2005)

Shajahan-Haq A. N., Cook K. L., Schwartz-Roberts J. L., Eltayeb A. E., Demas D. M., Warri A. M., Facey C. O., Hilakivi-Clarke L. A., Clarke R., *MYC regulates the unfolded protein response and glucose and glutamine uptake in endocrine resistant breast cancer*, *Mol Cancer*, 13:239 (2014)

Sniegowski T., Korac K., Bhutia Y. D., Ganapathy V., *SLC6A14 and SLC38A5 Drive the Glutaminolysis and Serine–Glycine–One-Carbon Pathways in Cancer*, *Pharmaceuticals (Basel)*, 14 (3): 216 (2021)

Taurino G., Deshmukh R., Villar V. H., Chiu M., Shaw R., Hedley A., Shokry E., Sumpton D., Dander E., D'Amico G., Bussolati O., Tardito S., *Mesenchymal stromal cells cultured in physiological conditions sustain citrate secretion with glutamate anaplerosis*, *Molecular Metabolism*, 62, 101532 (2022)

Terpos E., Christoulas D., Gavriatopoulou M., Dimopoulos M. A., *Mechanisms of bone destruction in multiple myeloma*, *European Journal of Cancer Care*, 26 (6): e12761 (2017)

Thompson R. C., Courtene-Jones W., Boucher J., Pahl S., Raubenheimer K., Koelmans AA., *Twenty years of microplastic pollution research—what have we learned?*, *Science*, 386 (6720) (2024)

Todoerti K., Barbui V., Pedrini O., Lionetti M., Fossati G., Mascagni P., Rambaldi A., Neri A., Introna M., Lombardi L., Golay J., *Pleiotropic anti-myeloma activity*

of ITF2357: inhibition of interleukin-6 receptor signaling and repression of miR-19a and miR-19b, *Haematologica*, 95 (2): 260-269 (2009)

Trotter T. N., Gibson J. T., Sherpa T. L., Gowda P. S., Peker D., Yang Y., *Adipocyte-Lineage Cells Support Growth and Dissemination of Multiple Myeloma in Bone*, *The American Journal of Pathology*, 186 (11): 3054-3063 (2016)

Vandenberg R. J., Ryan R. M., *Mechanisms of Glutamate Transport*, *Physiological Reviews*, 93 (4): 1621-1657 (2013)

Walker B. A., Wardell C. P., Ross F. M., Morgan G. J., *Identification of a novel t(7;14) translocation in multiple myeloma resulting in overexpression of EGFR*, *Genes Chromosomes & Cancer*, 52 (9): 817-822 (2013)

Wang Y., Watford M. *Glutamine, insulin and glucocorticoids regulate glutamine synthetase expression in C2C12 myotubes, Hep G2 hepatoma cells and 3T3 L1 adipocytes*, *Biochim Biophys Acta*, 1770 (4): 594-600 (2006).

Xu Y., Guo J., Liu J., Xie Y., Li X., Jiang H., Wang J., Peng Z., Wang J., Wang S., Wan C., Chen L., Zhong Y., Liu B., Liu Z., *Hypoxia-induced CREB cooperates MMSET to modify chromatin and promote DKK1 expression in multiple myeloma*, *Oncogene*, 40: 1231-1241 (2021)

Yan Y., Teng H., Hang Q., Kondiparthi L., Lei G., Horbart A., Liu X., Mao C., Wu S., Zhuang L., You M., J., Poyurovsky M., V., Ma L., Olszewski K., Gan B., *SLC7A11 expression level dictates differential responses to oxidative stress in cancer cells*, *Nature Communications*, 14: 3673 (2023)

Yang L, Venneti S, Negrath D. *Glutaminolysis, A Hallmark of Cancer Metabolism*, *Annu Rev Biomed Eng*, 19:163-194 (2017)

Zhuge L., Lin X., Fan Z., Jia M., Lin C., Zhu M., Teng H., Chen G. *Global, regional and national epidemiological trends of multiple myeloma from 1990 to 2021: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2021*, *Frontiers in Public Health*: 13:1527198 (2025)