

RIASSUNTO IN ITALIANO

I tumori della testa e del collo (tumori testa-collo) rappresentano il settimo tipo di neoplasia più diffuso a livello mondiale. Circa il 40% dei pazienti affetti da tumori testa-collo trattati con radioterapia sviluppa xerostomia, a causa dell'irradiazione involontaria delle ghiandole salivari. Questi organi esocrini, situati nelle regioni orali e faringee, sono responsabili della produzione di saliva, essenziale per mantenere la salute orale, facilitare la deglutizione e la fonazione. Il danno causato dalla radioterapia alle cellule acinose delle ghiandole salivari, insieme alla perdita delle cellule staminali, fondamentali per il ricambio e la rigenerazione del tessuto, compromette la corretta funzione e riparazione di questi organi. Ciò può portare a una disfunzione ghiandolare a lungo termine, influenzando gravemente la qualità della vita dei pazienti.

Negli ultimi anni, per ridurre gli effetti collaterali della radioterapia, sono stati compiuti notevoli progressi nelle tecniche di irradiazione. Un esempio importante è la terapia con protoni, che offre una maggiore precisione nel colpire il bersaglio tumorale e riduce l'esposizione dei tessuti sani circostanti. Tuttavia, nonostante questi avanzamenti, i danni ai tessuti adiacenti al tumore possono comunque verificarsi e persistere per tutta la vita.

Modelli di ricerca avanzati, come gli organoidi delle ghiandole salivari, rappresentano una piattaforma promettente per lo studio delle risposte tissutali alla radiazione. Questi organoidi, arricchiti con cellule staminali e contenenti diverse popolazioni cellulari, permettono di indagare in dettaglio i meccanismi molecolari attivati dall'irradiazione. Le conoscenze ottenute da questi modelli potrebbero guidare lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, mirate a preservare l'integrità dei tessuti sani, massimizzando al contempo l'efficacia dei trattamenti oncologici.

Le cellule staminali adulte sono essenziali per il mantenimento dell'omeostasi e per promuovere la rigenerazione dei tessuti. Tuttavia, lo stress genotossico (danno al DNA) può compromettere significativamente la loro longevità e funzione. Il **Capitolo 2** fornisce una panoramica delle principali vie di segnalazione e degli eventi molecolari attivati dal danno al DNA, evidenziando la loro influenza sul microambiente e sulla funzione delle cellule staminali e progenitrici. Negli ultimi anni, i sensori del DNA a doppio filamento (dsDNA), come cGAS, sono stati identificati come componenti chiave nell'attivazione delle risposte immunitarie e infiammatorie, sia nei tessuti sani che in quelli tumorali. Più recentemente, altri sensori, come i recettori per RNA a doppio filamento (dsRNA) RIG-I e MDA5, così come il sensore ZBP1, sono emersi come regolatori complementari nell'attivazione delle risposte infiammatorie.

Il danno al DNA può anche indurre senescenza cellulare, un processo caratterizzato da un arresto permanente del ciclo cellulare e da un fenotipo infiammatorio. La senescenza indotta da radiazioni è particolarmente rilevante per

la degenerazione tissutale e la perdita del potenziale di rigenerazione delle cellule staminali. Durante questo processo, la secrezione di citochine può reclutare cellule immunitarie, contribuendo a una risposta infiammatoria locale nel tessuto. Nel complesso, queste risposte immunomodulatorie mediate dal danno al DNA possono alterare l'omeostasi delle cellule staminali adulte, portando a condizioni degenerative nei tessuti in cui risiedono. Allo stesso tempo, il rilascio di specifiche citochine può migliorare la plasticità e la capacità rigenerativa di queste cellule e, in alcuni casi, stimolare l'attività delle cellule staminali tumorali, potenzialmente favorendo la progressione del tumore.

I mitocondri sono organelli dinamici essenziali per il mantenimento del metabolismo e della funzione cellulare. La disfunzione mitocondriale è stata associata all'insorgenza della senescenza cellulare e alla compromissione della funzione delle cellule staminali adulte, contribuendo allo sviluppo di numerose patologie. Il **Capitolo 3** analizza come l'irradiazione influenzi la funzione mitocondriale e il suo impatto sulla senescenza e sulla capacità di autorinnovamento delle cellule staminali e progenitrici. Dopo l'irradiazione con fotoni (raggi gamma), gli organoidi delle ghiandole salivari hanno mostrato una compromissione dei processi di mitofagia e della dinamica mitocondriale, processi essenziali per garantire la corretta rimozione e ricambio dei mitocondri danneggiati. Infatti, gli organoidi irradiati hanno mostrato un accumulo marcato di mitocondri allungati e disfunzionali, associati a senescenza cellulare ed esaurimento delle cellule staminali e progenitrici. Interventi farmacologici con induttori della fissione mitocondriale o della mitofagia hanno ripristinato questi processi, migliorando significativamente la funzione mitocondriale, riducendo la senescenza e potenziando le capacità rigenerative degli organoidi. Questi risultati suggeriscono una potenziale strategia per ripristinare la funzione delle cellule staminali dopo irradiazione, intervenendo sulla disfunzione mitocondriale e sulla senescenza.

La limitata disponibilità di studi sulle risposte dei tessuti sani all'irradiazione ha lasciato importanti lacune nella comprensione degli effetti dei fotoni e dei protoni sui tessuti non tumorali, in particolare sulle ghiandole salivari. Nel **Capitolo 4**, abbiamo utilizzato il nostro modello di organoidi di ghiandole salivari per indagare i meccanismi molecolari attivati da questi due tipi di irradiazione. Entrambi i tipi di irradiazione hanno indotto una risposta di segnalazione dell'interferone di tipo I (IFN-I), mediata principalmente dalla formazione di micronuclei e dall'attivazione di cGAS nelle fasi iniziali, e dal riconoscimento del DNA mitocondriale (mtDNA) nelle fasi successive. Questi risultati evidenziano il ruolo cruciale di tali meccanismi nel modulare la risposta infiammatoria nei tessuti sani. Un'osservazione interessante riguarda il fatto che l'irradiazione con protoni ha provocato una risposta interferonica più intensa rispetto a quella indotta dai fotoni, principalmente mediata dalla formazione di dsRNA derivato dall'espressione di elementi trasponibili (TE) e dalla

successiva attivazione di RIG-I. Questa risposta potenziata si è dimostrata essenziale per la capacità di rigenerazione e proliferazione delle cellule staminali. In particolare, il trattamento con interferone-beta (IFN- β) ha migliorato significativamente la crescita degli organoidi e la proliferazione delle cellule staminali e progenitrici nei campioni irradiati con fotoni. Esperimenti *in vivo* hanno ulteriormente confermato l'importante ruolo dell'IFN- β nel promuovere l'attività delle cellule staminali e progenitrici dopo irradiazione. Questo studio non solo chiarisce i meccanismi alla base delle risposte infiammatorie post-irradiazione, ma fornisce anche una solida base per lo sviluppo di strategie innovative per migliorare gli esiti della radioterapia e a favorire la rigenerazione dei tessuti sani.

Nel **Capitolo 5**, è stato adottato un approccio multi-omico per caratterizzare in dettaglio le popolazioni cellulari che costituiscono gli organoidi delle ghiandole salivari, analizzandone le dinamiche in diverse fasi temporali e in risposta ai danni indotti dalle radiazioni. L'analisi degli organoidi tramite "single-cell RNA-sequencing" (scRNA-seq) ha rivelato la presenza di potenziali popolazioni di cellule staminali e progenitrici, contraddistinte da marcatori tipici e da elevate proprietà staminali. In particolare, è stata identificata una nuova popolazione cellulare che potrebbe rappresentare un precursore delle cellule acinose, caratterizzata da tratti epitelio-mesenchimali e da un fenotipo migratorio. Ulteriori analisi bioinformatiche e validazioni *in vitro* hanno evidenziato che le cellule staminali e progenitrici delle ghiandole salivari dipendono dalla segnalazione di Notch per mantenere la loro capacità migratoria e il potenziale di rigenerazione dopo irradiazione. Questi risultati sono stati confermati anche in altri tessuti ghiandolari, sia murini che umani, come la tiroide e le ghiandole mammarie, sottolineando il ruolo critico di Notch nella regolazione della staminalità e del potenziale differenziativo di queste popolazioni cellulari.

Oltre alla segnalazione di Notch, anche la via di segnalazione di Hippo svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della crescita e della rigenerazione tissutale. Nel **Capitolo 6**, sono stati utilizzati modelli *in vivo* e *in vitro* per studiare il ruolo di YAP, un componente chiave di questa via, nell'omeostasi e nella rigenerazione delle ghiandole salivari adulte. Attraverso la modulazione farmacologica e genetica dell'attività di YAP, sono stati osservati cambiamenti dinamici tra condizioni omeostatiche e di danno. In condizioni omeostatiche, l'attività di YAP risultava bassa, mentre aumentava significativamente in seguito a lesione. In particolare, l'attivazione della traslocazione nucleare di YAP ha migliorato in modo significativo la rigenerazione e la proliferazione delle cellule delle ghiandole salivari. Questi risultati evidenziano il ruolo cruciale di YAP nella regolazione della plasticità e della capacità rigenerativa delle ghiandole salivari danneggiate, suggerendo potenziali strategie per ottimizzarne la riparazione, specialmente dopo danni indotti da radiazioni.

In conclusione, questa tesi dimostra come i modelli di organoidi possano essere utilizzati per svelare i meccanismi molecolari influenzati dalla radiazione con fotoni e protoni. La validazione di questi risultati in contesti (pre-)clinici è fondamentale per ottimizzare i trattamenti per il cancro della testa e del collo, migliorando la qualità della vita e il recupero dei pazienti. L'integrazione di cellule immunitarie in modelli più avanzati consentirebbe di valutare le risposte infiammatorie e immunitarie in condizioni più fisiologiche. Inoltre, una comprensione più approfondita delle popolazioni di cellule staminali e progenitrici nelle ghiandole salivari e delle loro complesse reti di regolazione, favorirebbe lo sviluppo di approcci terapeutici personalizzati più efficaci.