

Giorgia Maroni n° matricola: 291769

Relatore: Dott.ssa Maria Cristina Magli

Tutor accademico: Prof.ssa Renata Batistoni

Tesi di laurea specialistica in scienze e tecnologie biomolecolari

STUDIO DELL'ESPRESSIONE DELLO STEM CELL GENE *Kit* IN PRECURSORI MESENCHIMALI UMANI E MURINI

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono cellule clonogeniche multipotenti, capaci di differenziare in tipi cellulari di origine mesodermica come osteoblasti, condrociti, miociti, adipociti e cellule stromali. Principalmente presenti nel midollo osseo, sono state isolate anche da altri tessuti, quali muscolo scheletrico, tessuto adiposo, fluido amniotico, denti, cordone ombelicale. Le MSCs hanno suscitato grande interesse per la loro facile reperibilità e capacità di espandersi e differenziare *in vitro*. Inoltre, grazie alle loro proprietà biologiche, le MSCs rappresentano un potenziale valido strumento terapeutico per un ampio spettro di malattie, attraverso interventi di terapia genica e medicina rigenerativa. Tuttavia, il loro impiego ottimale richiede un'approfondita conoscenza dei meccanismi che ne regolano l'espansione e la differenziazione, ma a tutt'oggi molti aspetti della loro biologia sono ancora sconosciuti.

Kit è un gene che codifica il recettore per lo Stem Cell Factor (SCF). È espresso da diversi tipi di cellule staminali e progenitori come cellule primordiali germinali, cellule staminali e precursori ematopoietici, melanoblasti, cellule staminali cardiache. Ancora controverso risulta il ruolo di *Kit* nelle MSCs e il mio lavoro di tesi è volto allo studio dell'espressione del recettore *Kit* in MSCs murine e umane, mantenute in coltura sia in uno stato indifferenziato sia indotte a differenziare in senso osteogenico e adipogenico.

Colture primarie di MSCs murine e umane, prelevate da midollo osseo, sono state espanse e differenziate *in vitro* in presenza di agenti inducenti, quali β -Glicerofosfato, Acido Ascorbico e Dexametasone per la differenziazione osteogenica e Dexametasone, Isobutilmetilxantina, Indometacina e Insulina per la differenziazione adipogenica. Lo stadio differenziativo delle cellule è stato esaminato mediante PCR quantitativa (Real Time qPCR) attraverso l'analisi di espressione dei marcatori *RUNX2* e *ALP* per l'osteogenesi e *PPAR γ* , *c/EBP α* e *aP2* per l'adipogenesi. Inoltre per valutare la percentuale di differenziazione è stata effettuata una colorazione istochimica *Alizarin Red* che mette in evidenza la formazione di matrice di fosfati di calcio tipica degli osteoblasti maturi e una colorazione *Oil Red*, che mette invece in evidenza la presenza delle gocce lipidiche all'interno degli adipociti. L'espressione di *Kit* è stata valutata mediante PCR (Real Time qPCR) in cellule indifferenziate e a tempi diversi della differenziazione osteogenica e adipogenica.

I risultati mostrano che nelle MSCs indifferenziate murine e umane *Kit* risulta espresso a bassi livelli e durante la differenziazione osteogenica il gene viene completamente inattivato. Al contrario, nella differenziazione adipogenica, l'espressione di *Kit* aumenta negli stadi precoci della differenziazione e diminuisce in quelli più tardivi, suggerendo un probabile coinvolgimento del gene nell'attivazione del programma adipogenico. Per confermare questa ipotesi, l'espressione di *Kit* sarà analizzata in topi transgenici *Kit/GFP*, in cui il gene per la Green Fluorescent Protein (GFP) è posto sotto il controllo trascrizionale di regioni promotrici di *Kit*. Studi già condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che l'espressione del transgene ricapitola in maniera fedele l'espressione del gene endogeno. Saranno quindi allestite colture di MSCs, prelevate da midollo osseo di topi transgenici *Kit/GFP*, indifferenziate e indotte a differenziare per valutare l'espressione del transgene attraverso l'analisi della fluorescenza emessa dalla GFP.

In conclusione, i risultati finora ottenuti indicano una notevole analogia tra MSCs umane e murine. Inoltre forniscono la prima evidenza sperimentale per un possibile ruolo di *Kit* nell'adipogenesi. La comprensione dei meccanismi molecolari che regolano l'adipogenesi può avere importanti implicazioni per la diagnosi e la cura di patologie del tessuto adiposo.

