

*Riassunto*

**RIASSUNTO**

# **Il recettore Kit nella regolazione delle MSCs : analisi della proteina durante la differenziazione adipogenica.**

Le Mesenchymal Stem Cells o Marrow Stromal Cells (MSCs) sono cellule stromali multipotenti che possono differenziare, sia *in vivo* che *in vitro*, verso lineages diversi (osteogenico, condrogenico, adipogenico, miogenico), hanno capacità migratorie e secernono un ampio spettro di molecole trofiche e/o immunoregolatorie. La loro fonte principale è il midollo osseo, dove rappresentano approssimativamente lo 0.01%-0.001% delle cellule nucleate, ma sono presenti anche in molti altri tessuti adulti. Queste caratteristiche, associate alla facile reperibilità e maneggevolezza, le hanno poste al centro dell'attenzione per il loro potenziale impiego terapeutico. Un'applicazione clinica ottimale richiede però una completa conoscenza, ancora non raggiunta, dei meccanismi biologici alla base del self-renewal e dei processi differenziativi delle MSCs.

Dati recenti sottolineano l'importanza di geni chiave coinvolti nella regolazione di tessuti anche molto diversi fra loro. Uno di questi è *Kit*, che codifica il recettore tirosina-chinasico dello Stem Cell Factor (SCF) e che ha un ruolo fondamentale in diversi tipi di cellule staminali. *Kit* è, infatti, attivo nelle Primordial Germ Cells (PGCs), nelle cellule staminali cardiache, nelle cellule staminali e nei precursori ematopoietici, nelle cellule staminali neurali, nei melanoblasti e nei mesangioblasti, mentre risulta ancora controverso il suo coinvolgimento nelle MSCs.

Nel laboratorio presso il quale ho svolto il mio lavoro di tesi, sono in corso studi volti a chiarire il possibile ruolo di *Kit* nelle MSCs. In primo luogo, è stata analizzata l'attività trascrizionale di *Kit* sia in MSCs umane che murine, riscontrando un'espressione a bassi livelli nelle MSCs indifferenziate e una modulazione

dell'espressione durante la loro differenziazione. In particolare, durante le prime fasi della differenziazione adipogenica l'mRNA di *Kit* è maggiormente espresso, mentre durante quella osteogenica il gene è down-regolato.

Scopo del mio lavoro di tesi è stato analizzare l'espressione della proteina Kit, per confermarne il coinvolgimento anche nella regolazione delle MSCs, focalizzandomi soprattutto sulla differenziazione adipogenica di MSCs murine. A tale scopo ho effettuato saggi di immunocitochimica e analisi al FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), usando anticorpi diretti contro il dominio extra-citoplasmatico di *Kit*. I risultati hanno evidenziato un'espressione bassa in MSCs allo stato indifferenziato e un aumento del prodotto genico nelle prime fasi della differenziazione adipogenica, seguito da un ritorno ai livelli basali nelle fasi terminali. Nel nostro laboratorio è stata caratterizzata una linea di topi transgenici *Kit*-GFP, in cui il gene codificante per la Green Fluorescent Protein (GFP) si trova sotto il controllo trascrizionale di alcuni elementi regolatori del gene *Kit*. Esperimenti precedenti hanno evidenziato che il transgene è attivo nei diversi tipi cellulari in cui è attivo *Kit* endogeno e ne ricapitola in maniera fedele l'espressione. Questo topo transgenico si rivela quindi un ottimo modello per studiare *Kit* in diversi tessuti. Pertanto ho analizzato al FACS MSCs di topi *Kit*-GFP indotte a differenziare in senso adipogenico, evidenziando una corrispondenza fra l'aumento della fluorescenza dovuta al transgene e il comportamento del *Kit* endogeno. Inoltre ho monitorato la differenziazione adipogenica e osteogenica di MSCs di topi *Kit*-GFP attraverso microscopio a fluorescenza, riscontrando un'analogia con i dati ottenuti tramite l'analisi al FACS.

In conclusione, i risultati suggeriscono che *Kit* è attivo anche nelle MSCs, in particolare nelle fasi precoci della differenziazione adipogenica. Inoltre i dati dimostrano che nel transgene *Kit*-GFP sono contenuti gli elementi regolatori necessari per la sua corretta espressione anche nelle MSCs. Questo nuovo ruolo di *Kit* può avere interessanti implicazioni anche nelle patologie del tessuto adiposo.