

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute “Vincenzo Tiberio”



Dottorato in
MEDICINA TRASLAZIONALE E CLINICA
XXXII ciclo

MED/46 Scienze Tecniche di Medicina di Laboratorio

MED/04 Patologia Generale

Tesi di Dottorato

**POSSIBILE USO DELLE CELLULE STAMINALI
MESENCHIMALI AMNIOTICHE COME TERAPIA NELLA
FIBROSI CISTICA**

Tutor

Chiar.ma Prof.ssa

Antonella Angiolillo

Co-Tutor

Chiar.mo Prof.

Massimo Conese

Dottoranda

Elisa Beccia

157785

Coordinatore

Chiar.mo Prof.

Marco Sarchiapone

ANNO ACCADEMICO 2019/20

A Miriam ed Emma.

Sia la curiosità che vi spinga a provare, anche sbagliando, per scoprire e imparare cose nuove!

INDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	5
1.1. LA FIBROSI CISTICA	6
1.1.1. <i>Cenni sulla malattia e manifestazioni cliniche</i>	6
1.1.2. <i>Fisiopatologia della Fibrosi Cistica</i>	11
1.1.3. <i>Il danno dell'epitelio respiratorio nella Fibrosi Cistica</i>	13
1.1.4. <i>La proteina CFTR e la genetica della Fibrosi Cistica</i>	15
1.1.5. <i>Diagnosi della Fibrosi Cistica</i>	20
1.1.6. <i>Trattamenti terapeutici attuali e futuri</i>	22
1.2. LE CELLULE STAMINALI.....	27
1.2.1. <i>Definizione e caratteristiche generali</i>	27
1.3. COMUNICAZIONE INTERCELLULARE E GAP JUNCTIONS	42
1.3.1. <i>Gap junctions e Fibrosi Cistica</i>	46
1.4. MICRO RNA E FIBROSI CISTICA	48
2. SCOPO DELLO STUDIO	50
3. MATERIALI E METODI	52
3.1. ISOLAMENTO E COLTURA DELLE hAMSC	53
3.2. CINETICA DI CRESCITA, MORFOLOGIA E FENOTIPO DELLE hAMSC	55
3.3. CO-COLTURE DI CELLULE hAMSC E CFBE41o-.....	56
3.4. TRASFEZIONE CON siRNA GAPDH FLUORESCENTE.....	57
3.5. TRASFEZIONE CON siRNA CONTRO Cx43.....	59
3.5.1. <i>Analisi dell'espressione di Cx43 con Real-Time PCR</i>	60
3.5.2. <i>Immunofluorescenza ed analisi confocale per valutare la localizzazione della Cx43</i>	61
3.5.3. <i>Luciferase Yellow Assay</i>	62
3.5.4. <i>Misure spettrofluorimetriche di Efflusso di Cloro</i>	62
3.5.5. <i>Misure di resistenza elettrica trans-epiteliale e permeabilità paracellulare</i>	65
3.5.6. <i>Apoptosi e necrosi</i>	65
3.6. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI MICRO RNA 138	66
3.7. STUDIO DELLA RIPARAZIONE EPITELIALE.....	68
3.7.1. <i>Blocco della proliferazione delle CFBE14o-</i>	69
3.7.2. <i>Analisi della migrazione delle cellule CFBE14o- e hAMSC con medium condizionato</i>	71
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	73
4.1. ISOLAMENTO, CINETICA DI CRESCITA, MORFOLOGIA E FENOTIPO DELLE hAMSC .	74
4.2. ESPRESSIONE DI Cx43: mRNA E PROTEINA	77
4.3. EFFICIENZA DELLA INTERNALIZZAZIONE DI siRNA	80
4.4. EFFICACIA DEL siRNA SUI LIVELLI DI Cx43 mRNA	82
4.5. VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL siRNA Cx43 SULLA FORMAZIONE DELLE GAP JUNCTIONS.....	85
4.6. RUOLO DELLE GAP JUNCTIONS NELLA CORREZIONE DEI DIFETTI DI BASE DELLA FIBROSI CISTICA	86
4.7. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DEL miRNA-138	91
4.8. RIPARAZIONE DELL'EPITELIO RESPIRATORIO.....	94
4.9. VALUTAZIONE DELLA MIGRAZIONE DELLE CELLULE CFBE14o- E hAMSC CON MEDIUM CONDIZIONATO.....	104
5. CONCLUSIONI	106
BIBLIOGRAFIA	110
PUBBLICAZIONI	128
COMUNICAZIONI A CONGRESSO	129

ABSTRACT

La fibrosi cistica è una malattia genetica letale, a trasmissione autosomica recessiva, causata dalla mutazione del gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) che codifica per una proteina canale che regola la conduzione transmembrana di cloro, cAMP- dipendente, espressa sul lato apicale delle cellule epiteliali.

Il difetto di base dell'epitelio respiratorio nei pazienti è dovuto ad un duplice difetto nella secrezione di cloro e nell'assorbimento di sodio, il primo è il risultato della disfunzione del canale CFTR, il secondo è dovuto all'iperattività del canale epiteliale del sodio, causata dalla mancata inibizione da parte della CFTR. Tutto ciò porta ad un alterato flusso di ioni e fluidi attraverso l'epitelio delle vie aeree, risultando in un'alterazione della clearance mucociliare respiratoria, infezioni batteriche opportunistiche, infiammazione ed infine grave danno polmonare.

Sebbene la fibrosi cistica coinvolga molti organi con proprietà di secrezione/assorbimento, la principale causa di morbilità e mortalità è l'infiammazione cronica che colpisce il polmone.

Il trattamento della patologia ha visto una rivoluzione nella scoperta e implementazione nella clinica di farmaci ad azione eziologica, in quanto agenti direttamente sulla CFTR. Eppure, tali molecole non riescono a risolvere il difetto associato a tutte le mutazioni responsabili della patologia, e non possono quindi essere utilizzate in tutti i pazienti. La terapia cellulare, che ha come scopo la sostituzione dell'epitelio mutato e danneggiato con cellule che esprimono la CFTR *wild-type*, essendo agnostica per la mutazione, ha quindi la possibilità di poter curare ogni paziente. Essa si potrebbe basare sul trasferimento di normali cellule staminali allogeniche (come quelle derivate dal midollo osseo) o di cellule autologhe ingegnerizzate per esprimere la CFTR *wild-type*. Quest'ultimo caso prevede, però, la manipolazione di cellule con vettori di terapia genica, trattamento la cui sicurezza non è stata ancora del tutto accertata.

Oltre al midollo osseo, che presenta dei problemi legati alla complessità della procedura ed alla mancanza di donatori, sono state investigate negli ultimi anni nuove fonti di cellule staminali, eticamente più valide e con maggior numero di donatori. Tra queste, quelle derivate dalla membrana amniotica, le cellule stromali mesenchimali amniotiche umane, sembrano molto promettenti. Esse esprimono marcatori di staminalità e possono differenziare in cellule epiteliali respiratorie quando sono co-coltivate con cellule epiteliali bronchiali umane immortalizzate, omozigoti per l'allele *F508del*, la mutazione più frequente nella fibrosi cistica. Le co-culture mostrano, inoltre, un'aumentata espressione e funzionalità della proteina CFTR e una parziale correzione di altri difetti di base associati alla malattia. Poiché tali risultati vengono ottenuti solo nelle co-culture, è stato supposto che un contatto diretto tra le cellule stromali mesenchimali amniotiche umane e le cellule epiteliali bronchiali umane sia necessario per il recupero di questi difetti.

Uno degli obiettivi di questo lavoro di tesi è stato quello di comprendere il ruolo della comunicazione intercellulare, mediata dalle *gap junctions*, nelle co-culture. Nello specifico, le co-culture sono state studiate per l'espressione e la funzionalità della proteina Cx43, una delle principali componenti delle *gap junctions*, prima e dopo silenziamento delle stesse, ottenuto utilizzando un *siRNA* diretto contro l'mRNA di interesse. I risultati ottenuti hanno evidenziato il ruolo fondamentale delle *gap junctions* nella correzione dei difetti di base associati alla fibrosi cistica da parte delle cellule stromali mesenchimali amniotiche umane. A concludere questa parte dello studio, si è indagato quale messaggero molecolare potesse essere trasmesso tra le cellule attraverso le giunzioni ed, eventualmente, mediare l'effetto terapeutico delle cellule staminali mesenchimali amniotiche. Anche i microRNA (miRNA) vengono trasferiti attraverso le *gap junctions* ed è stato dimostrato il loro coinvolgimento nei livelli di espressione della proteina CFTR.

In modo particolare, il *miRNA-138* aumenta l'espressione della proteina CFTR attraverso le sue interazioni con la proteina regolatrice della trascrizione SIN3A. Sono stati quindi studiati i livelli di *miRNA-138* mediante *droplet digital* PCR. I dati preliminari mostrano come le cellule *wild-type* abbiano dei livelli più alti di *miRNA-138* rispetto alle cellule che presentano la mutazione e che vi è un trend all'aumento nelle co-culture.

In parallelo, un ulteriore obiettivo dello studio è stato quello di studiare se le cellule mesenchimali amniotiche possano velocizzare la rigenerazione dell'epitelio respiratorio bronchiale e la chiusura delle lesioni che continuamente si formano sotto lo stimolo infiammatorio cronico nei polmoni dei pazienti con fibrosi cistica. I risultati dimostrano che le cellule stromali mesenchimali amniotiche aggiunte ad una ferita indotta su un monostrato di cellule epiteliali bronchiali con la mutazione, sono in grado di riparare il danno con la stessa tempistica richiesta ad una ferita simulata su monostrato di cellule epiteliali bronchiali *wild type*.

Questi studi indicano la possibile utilità terapeutica delle cellule stromali mesenchimali amniotiche nella malattia polmonare associata alla fibrosi cistica, sebbene ulteriori studi sul loro meccanismo d'azione e in modelli più vicini alla patologia umana siano necessari.

1. INTRODUZIONE

1.1. LA FIBROSI CISTICA

1.1.1. Cenni sulla malattia e manifestazioni cliniche

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica, autosomica recessiva, multisistemica ad andamento cronicamente evolutivo. Nel mondo ne sono colpite circa 100.000 persone. In Italia vengono diagnosticati circa 200 nuovi casi all'anno, l'incidenza della malattia è di 1 neonato su 2.500-3.000 nati sani (RIFC, <http://www.registroitalianofibrosicistica.it/>).

È causata dalla mutazione di un gene che codifica per una proteina di membrana, la CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), il cui ruolo principale è la regolazione della secrezione del cloro e l'assorbimento del sodio/bicarbonato a livello della membrana apicale delle cellule epiteliali delle vie aeree, del pancreas, delle vie biliari, dell'intestino, delle ghiandole sudoripare e dei vasi deferenti. La proteina CFTR è stata così denominata, poiché, sulla base della sua sequenza nucleotidica, si pensava fosse un regolatore di altri canali. In effetti, si è poi dimostrato che essa si identifica con il canale transmembrana di trasporto degli ioni cloro, cAMP-dipendente, localizzato sulla membrana apicale delle cellule epiteliali con caratteristiche molecolari esclusive (Southern, 2007).

La FC si manifesta secondo le leggi mendeliane della trasmissione autosomica recessiva monogenica, perciò esistono individui eterozigoti senza sintomi o segni clinici ed individui omozigoti o eterozigoti composti malati. Si tratta della malattia letale autosomica recessiva più frequente nella popolazione caucasica, che può manifestarsi precocemente in età neonatale nelle prime settimane o mesi di vita, con gravità diversa. I progressi nella diagnostica, sempre più precoce, e l'innovazione delle cure (intese come introduzione di nuovi antibiotici, somministrazione di enzimi pancreatici sostitutivi, trapianti di polmone e fegato, introduzione di farmaci modulatori e potenziatori della

CFTR), hanno spostato la sua maggiore incidenza nell'età adulta, per cui è stato calcolato che metà dei bambini nati oggi potrebbero sopravvivere fino alla quinta decade (Høiby, 2011; Scotet *et al.*, 2020).

Le manifestazioni cliniche della malattia sono caratterizzate dalla presenza di secrezioni mucose dense del tratto respiratorio, dell'intestino, del pancreas, delle vie biliari e dei vasi deferenti che, ostruendo canali e dotti ghiandolari, compromettono tali organi (Fig. 1).

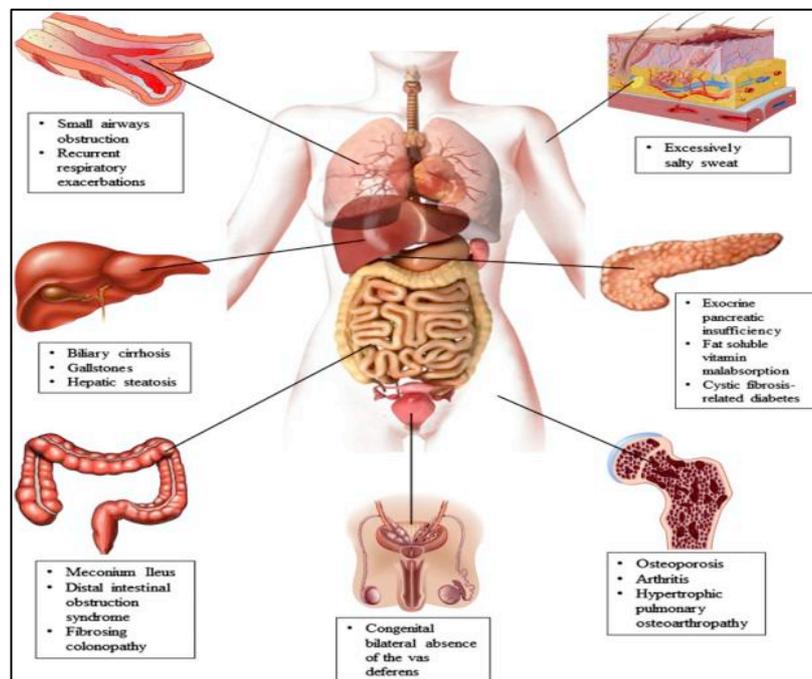


Figura 1. Manifestazioni cliniche della malattia

Le secrezioni sierose, invece, possiedono una concentrazione di sali più alta, come quella di cloruro di sodio del sudore, che è cinque volte superiore alla norma.

La malattia polmonare è stata ed è, attualmente, la principale causa di morbilità e mortalità.

In condizioni normali, a livello delle cellule epiteliali dell'apparato respiratorio, il cloro viene escreto nel lume e il sodio ne è rimosso in maniera ridotta, il muco risulta quindi idratato e poco denso ed è in grado di intrappolare le particelle inalate allo scopo di farle poi eliminare dalle ciglia verso le prime vie aeree (Fig. 2). Nei pazienti affetti da FC il cloro non può essere rimosso dalla cellula e l'assorbimento di sodio risulta aumentato, ne consegue, per ragioni osmotiche, un maggiore riassorbimento di acqua, per cui il muco risulta denso e di difficile rimozione (Boucher, 2007). La rottura dell'equilibrio omeostatico di sodio, cloro ed acqua sulla superficie epiteliale comporta il collasso della *clearance mucociliare* e i batteri inalati sono meno efficacemente eliminati dalle vie aeree dei pazienti FC: ciò si traduce in un ciclo di infezione e infiammazione cronica polmonare, con un concomitante calo delle funzioni polmonari, punteggiato da occasionali esacerbazioni infettive con sintomi quali tosse, dispnea ed una maggiore produzione di espettorato (Brugha *et al.*, 2011).

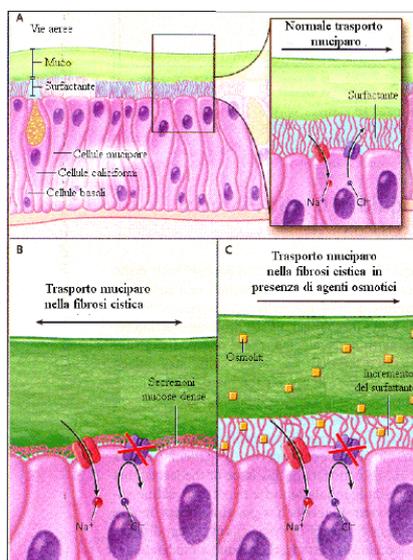


Figura 2. Trasporto del cloro e del sodio transmembrana a livello della membrana apicale delle cellule epiteliali delle vie aeree in A) soggetti sani, e B) pazienti affetti da fibrosi cistica. In C) viene raffigurata la situazione in cui agenti osmotici (come il mannitolo) aumentando l'idratazione del muco, possono ripristinare la *clearance* mucociliare dei pazienti fibrocistici. Da Ratjen, 2006.

Dati recenti hanno svelato che la proteina CFTR ha delle funzioni più complesse a livello dell'epitelio delle vie aeree per quanto riguarda la permeabilità ed il trasporto di ioni e fluidi (Saint-Criq *and* Gray, 2017). A parte la secrezione di ioni cloro, la CFTR è coinvolta nella secrezione di ioni bicarbonato. La mancanza di tali ioni comporta un'acidificazione del fluido di superficie (*Airway Surface Fluid: ASL*) e conseguenze fisiopatologiche quali la diminuzione dell'attività antibatterica, iper-assorbimento del sodio e alterazione della reologia del muco. La CFTR regola positivamente i canali del cloro ANO1 e SLC26A9, aumentando così la secrezione di ioni cloro e bicarbonato e pertanto aumentando l'idratazione dell'ASL e il pH (Fig. 3). Gli ioni sodio e l'acqua seguono il gradiente elettrochimico attraverso la via paracellulare. Sulla superficie basolaterale, il canale NKCC1 accumula ioni cloro intracellulari in questo coadiuvato dall'ATPasi Na^+/K^+ .

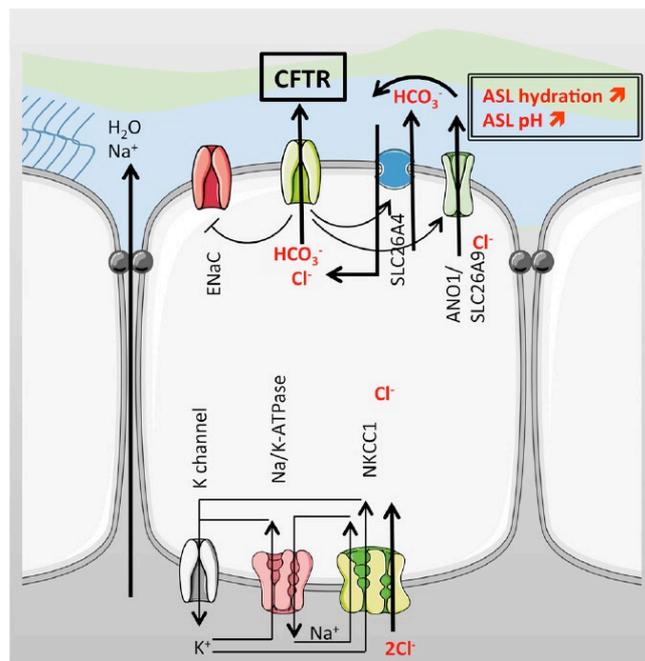


Figura 3. Trasporto ionico e di fluidi attraverso l'epitelio delle vie aeree. Si veda il testo per i dettagli. Da Saint-Criq and Gray, 2017.

La compromissione dell'apparato digerente, invece, è dovuta ad un'alta densità delle secrezioni enzimatiche del pancreas, che provocano l'ostruzione dei dotti pancreatici che si traduce nel malassorbimento di proteine e lipidi assunti con gli alimenti, con conseguente riduzione dell'accrescimento ponderale. Anche le secrezioni mucose intestinali sono più dense del normale, con conseguente *ileo da meconio* nel neonato e casi di occlusione intestinale nel paziente adulto.

Nel pancreas, a livello tubulare, il difetto di trasporto di ioni bicarbonato provoca un aumento del volume di fluido alcalino, con conseguente stasi mucosa, precipitazione intraduttale degli enzimi digestivi secreti dagli acini con una loro inappropriata attivazione, danno progressivo del parenchima pancreatico ed atrofia (Wilschanski e Novak, 2013).

Nelle vie biliari, sono i colangiociti e non gli epatociti ad esprimere la CFTR. A questo livello, la proteina è implicata indirettamente nella secrezione di ioni bicarbonato (come nel pancreas), per cui un suo difetto porta all'accumulo di una secrezione biliare viscosa con ridotta alcalinità (Ooi e Durie, 2016). Ciò porta alla ritenzione di acidi biliari tossici che, a loro volta, inducono l'espressione di citochine fibrogeniche e infiammatorie, l'attivazione delle cellule epatiche stellate ed, infine, alla fibrogenesi peribiliare. Il risultato finale è la progressione da una forma biliare focale ad una cirrosi multi-lobulare.

Come precedentemente detto, la malattia compromette più organi, infatti, oltre all'apparato respiratorio e a quello digerente, viene colpito anche l'apparato riproduttivo comportando, come manifestazioni cliniche più frequenti nell'uomo, l'atresia dei dotti deferenti e l'azoospermia che portano sterilità nel 98% dei fibrocistici, mentre il 25% delle donne affette da FC risulta sterile a causa dell'aumentata viscosità del muco cervicale (Phillipson, 1998).

1.1.2. Fisiopatologia della Fibrosi Cistica

Benché la proteina CFTR sia stata inizialmente caratterizzata come un canale del cloro, si riconosce oggi che essa può regolare molti altri canali e processi cellulari, tra questi i canali del potassio Kir6.1, il canale epiteliale del sodio (ENaC), i canali delle *gap junctions (GJ)*. Tra i processi cellulari in cui si pensa sia coinvolta la CFTR vi sono il trasporto di bicarbonato, di ATP, di glutazione ridotto e la secrezione del muco. Di tutti questi, l'interazione della CFTR con l'ENaC sembra avere una grande rilevanza fisiopatologica per la FC. L'ENaC è situato sulla superficie apicale delle cellule epiteliali esocrine ed è responsabile dell'assorbimento di sodio dal fluido luminale, rendendolo ipotonico. A livello delle vie respiratorie, l'ENaC è normalmente inibito da una CFTR funzionante; nella FC, l'attività dell'ENaC è maggiore con il conseguente aumento dell'*uptake* di sodio attraverso la membrana apicale, e dell'assorbimento di fluidi per ragioni osmotiche dal contenuto luminale (Fig. 4). D'altro canto, a livello delle ghiandole sudoripare, l'attività dell'ENaC diminuisce come risultato della mancanza o perdita di funzione della proteina CFTR; con formazione di un sudore ipertonico con alte concentrazioni di sodio cloruro (Fig. 4), una delle manifestazioni della FC classica. Questa è la base del sudore "salato" che le madri possono spesso rilevare nei loro figli affetti.

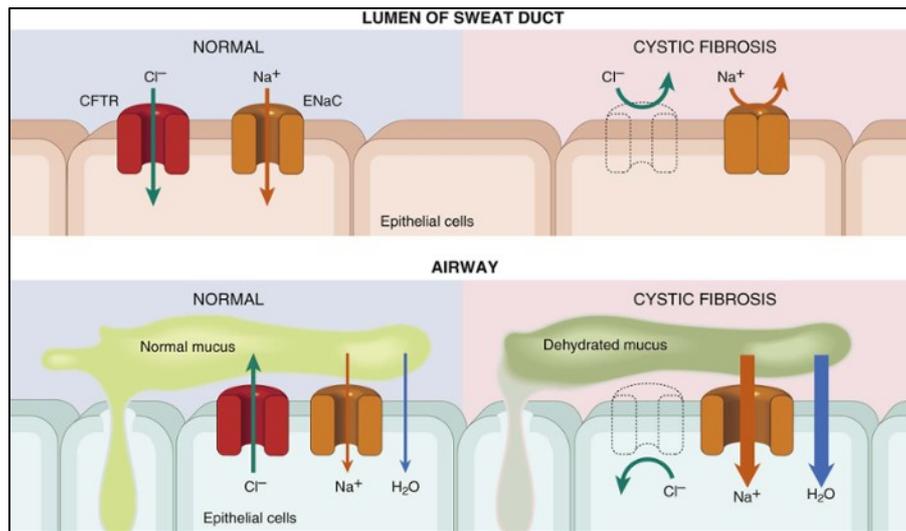


Figura 4. Difetto di base nella fibrosi cistica. Nel dotto escretore delle ghiandole sudoripare, un'attività ridotta sia della CFTR che dell'ENaC causa un aumento delle concentrazioni di sodio cloruro nel sudore (pannello superiore), mentre nelle vie respiratorie il difetto della CFTR determina ridotta escrezione di cloro ed aumento del riassorbimento di sodio e di fluidi determinando la disidratazione del muco (pannello inferiore). Da *Robbins e Cotran*, Elsevier, 2015.

A livello respiratorio, questi eventi comportano un aumento della viscosità del muco respiratorio con conseguente abbattimento della *clearance* muco-ciliare e un corrispondente aumento della colonizzazione ed infezione da parte di batteri patogeni opportunisti. Le più frequenti specie batteriche riscontrate nei polmoni dei pazienti con FC sono *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, e *Pseudomonas aeruginosa*. Quest'ultima può essere presente nella forma mucoide (che produce a livello della capsula un esopolisaccaride chiamato alginato) che esita frequentemente in infezione cronica. Recentemente, è stato osservato un aumento di un altro patogeno la *Burkholderia cepacia*, che dà luogo ad una forma particolarmente invalidante per i polmoni e che può esitare anche in un quadro di sepsi. A queste infezioni ricorrenti si oppone il sistema immunitario, dapprima con la risposta innata, dominata da un influsso di polimorfonucleati neutrofili, i quali non riescono ad eliminare le specie batteriche, in

particolare la forma mucoide di *P. aeruginosa*, la quale si oppone alla fagocitosi grazie alla produzione dell'alginato. I neutrofili attratti ed attivati producono una serie di mediatori, tra i quali l'elastasi, che degradano le strutture della parete bronchiolare, producendo infine bronchiectasie (Conese *et al.*, 2017). A questo punto si produce un circolo vizioso di ristagno del muco → infezioni → infiammazione cronica, che in ultima analisi, è responsabile dell'insufficienza polmonare (Fig. 5).

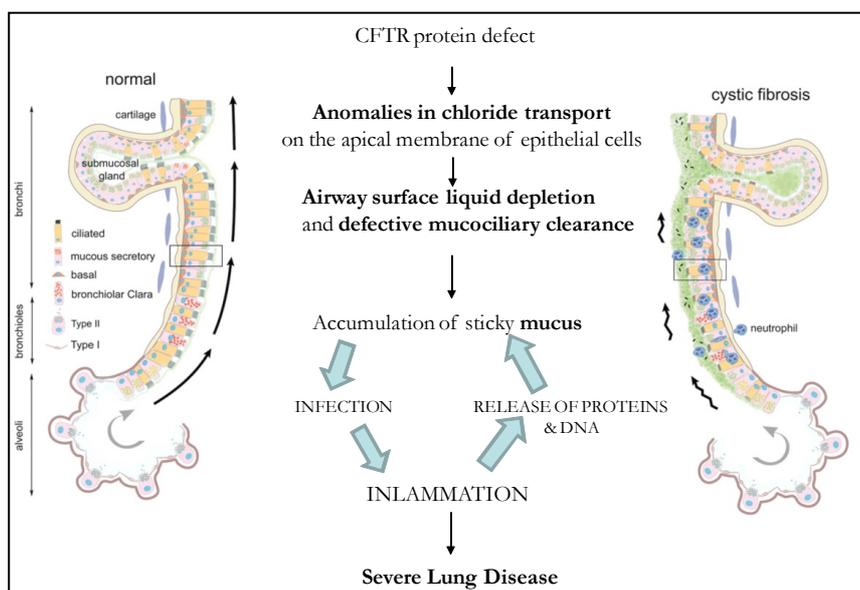


Figura 5. Fisiopatologia della malattia polmonare in fibrosi cistica.

1.1.3. Il danno dell'epitelio respiratorio nella Fibrosi Cistica

Le bronchiectasie croniche sono le più comuni anomalie strutturali osservate in pazienti FC. L'analisi del polmone di un paziente affetto rivela la presenza, inizialmente, di alterazioni delle piccole vie aeree, mentre, in seguito, si verificano infiammazione ed ostruzione delle grandi vie aeree da parte del muco. Gli studi ultrastrutturali rivelano aspecifiche anomalie ciliari, iperplasia delle cellule caliciformi e metaplasia a cellule squamose nelle vie aeree (Fig.6).

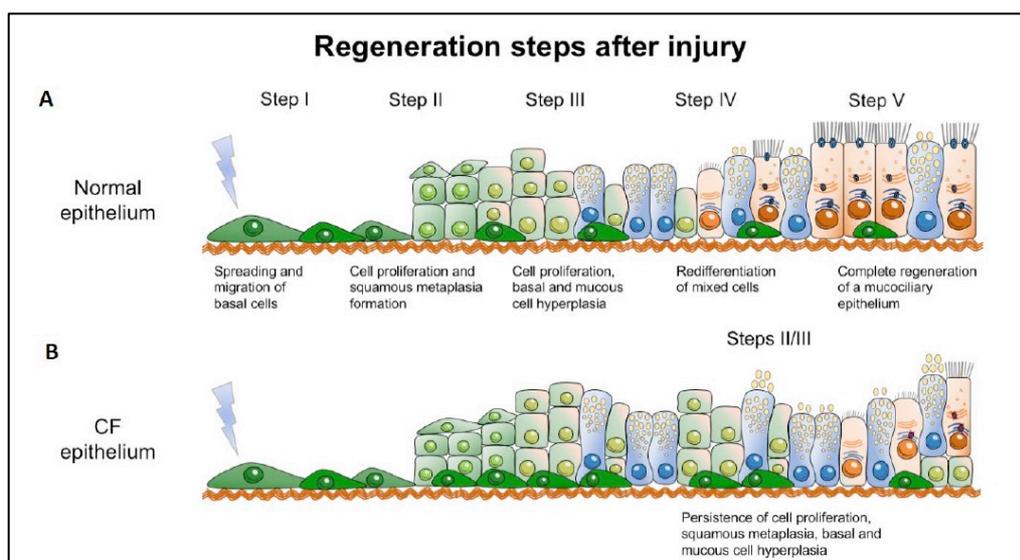


Figura 6. Riparazione dell'epitelio delle vie aeree dopo danno. Stadi del processo di riparazione nell'epitelio normale (A) e in quello con FC (B). Da Amaral *et al.*, 2020.

La maggior parte di questi cambiamenti morfologici sembrano essere secondari a infezione batterica cronica e infiammazione. In effetti, il rilascio di proteasi da parte dei neutrofili o di alcuni batteri, come *P. aeruginosa*, contribuisce al danno tissutale. Anche la sovrapproduzione di citochine pro-infiammatorie da parte di cellule dell'immunità innata (macrofagi, neutrofili) e delle cellule epiteliali respiratorie, gioca un ruolo nelle lesioni e nel rimodellamento degli epitelii delle vie aeree. Dopo la lesione, le cellule epiteliali, i macrofagi e i fibroblasti rilasciano fattori di crescita come HGF, EGF, KGF e TGF- β . Questi fattori, legandosi ai recettori presenti sulle cellule epiteliali respiratorie, inducono mitosi, migrazione e variazione del fenotipo, tutti eventi che dovrebbero facilitare la riparazione. Si instaura così un complesso equilibrio tra fattori lesivi e fattori riparatori, che nella FC è a vantaggio dei primi (Trinh *et al.*, 2008).

In particolare, nella riparazione delle lesioni epiteliali, sono stati descritti diversi stadi che possono essere così riassunti (Fig.6): 1) copertura dell'area denudata dalle cellule basali circostanti che si appiattiscono e avanzano migrando mediante alterazioni del loro

citoscheletro (stadio I); 2) proliferazione con formazione di metaplasia squamosa (stadio II); 3) proliferazione con formazione di metaplasia basale e mucosa (stadio III); 4) ri-differenziamento cellulare (stadio IV); 5) completa differenziazione di queste cellule e rigenerazione di un epitelio polarizzato (stadio V) (Crosby *et al.*, 2010; Amaral *et al.*, 2020).

Studi *in vitro* hanno rivelato che la proteina CFTR è coinvolta in alcuni di questi processi, tra cui la protrusione dei lamellipodi, strutture coinvolte nella migrazione cellulare (Schiller *et al.*, 2010), mentre la proliferazione cellulare non sembra alterata nelle cellule con FC rispetto a cellule *wild-type* (Trinh *et al.*, 2008). In un modello quanto più vicino alla situazione *in vivo*, creato con espianti di cellule umane in topi nudi immunodeficienti (chiamati “*xenograft*”), si è potuto dimostrare che la rigenerazione di espianti ottenuti da cellule nasali fibrocistiche era dilazionata nel tempo e mostrava un’alterata differenziazione nonché una modificazione nella risposta di rimodellamento (Hijj *et al.*, 2007).

In generale, queste osservazioni indicano fortemente che la rigenerazione e la riparazione dell’epitelio respiratorio fibrocistico sono difettivi e che la mancanza o disfunzione della proteina CFTR è coinvolta in queste alterazioni (O’Grady, 2017).

1.1.4. La proteina CFTR e la genetica della Fibrosi Cistica

La CFTR, come tutte le proteine di membrana, è sintetizzata nel reticolo endoplasmatico, subisce una glicosilazione post-traduzionale nell’apparato di Golgi e si localizza sulla membrana apicale delle cellule epiteliali dove svolge una funzione fisiologica di secrezione e riassorbimento del cloro e di secrezione del bicarbonato.

È costituita da sei domini (Fig. 7):

- due domini transmembrana costituiti ciascuno da sei alfa eliche;
- due domini citoplasmatici: *Nucleotide Binding Domain* (NBD) deputati al legame non covalente di nucleotidi trifosfato idrolizzabili (ATP, UTP, GTP, CTP) che favoriscono la sua attivazione;
- un dominio citoplasmatico globulare “R” che ha numerosi siti aminoacidici (serine e treonine) che possono essere fosforilati da Protein-Kinasi A (PKA, 9 siti) o Protein-Kinasi C (PKC, 7 siti) cAMP dipendenti.
- un dominio citoplasmatico, che consiste di treonina, arginina e leucina (TRL), ancorato al citoscheletro e tenuto in connessione con numerose altre proteine coinvolte nella trasduzione del segnale e nella regolazione di altri canali e trasportatori.

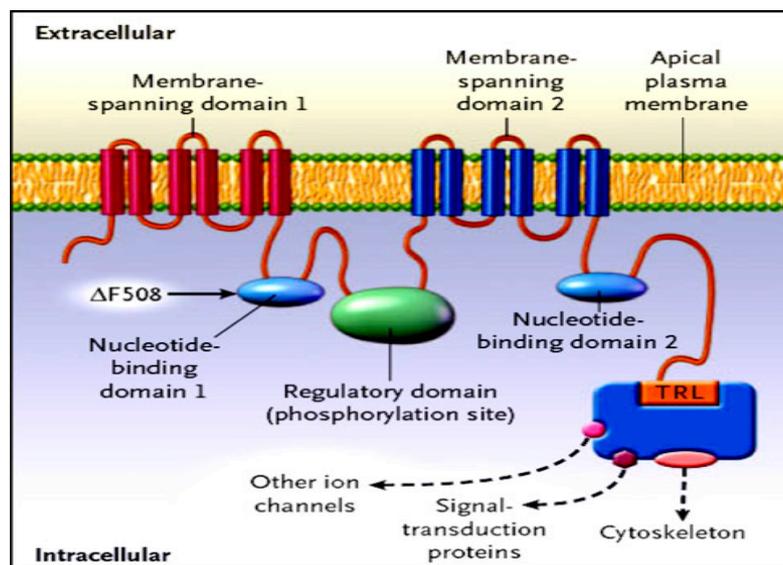


Figura 7. Struttura della proteina CFTR. Da Prasad et al., 2010.

L'attivazione del canale CFTR inizia con la fosforilazione del dominio R tramite la PKA. Questa fosforilazione parziale rende possibile il legame dell'ATP al dominio NBD1 e la sua successiva idrolisi consente l'apertura per breve tempo del canale. Solo quando il

dominio R è completamente fosforilato, l'ATP viene legato anche dal dominio NBD2, stabilizzando l'apertura del canale. Quando, in uno *step* successivo, l'ATP viene idrolizzato anche dal dominio NBD2 il canale viene chiuso.

Come precedentemente detto, la FC è determinata dal difetto del gene *CFTR*, identificato nel 1989 da Francis S. Collins, dell'Università del Michigan, e Lap-Chee Tsui e John R. Riordan, dell'Università di Toronto (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989).

Il gene è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7, nella regione q31.2, contiene 27 esoni e si estende per oltre 250.000 paia di basi, codificando la proteina CFTR di 1480 aminoacidi.

Ad oggi sono state individuate più di 2000 mutazioni del gene (per la precisione 2102, <http://www.genet.sikkids.on.ca/cftr>, ultimo accesso 2 Dicembre 2020), non tutte responsabili della malattia, differenziate in:

- *missense*, con sostituzione di un nucleotide con un altro in un codone;
- *nonsense*, con sostituzione di un nucleotide con un nucleotide che crea un segnale di stop;
- *frameshift*, con inserimento o delezione di uno o più nucleotidi che causano lo scivolamento del modulo di lettura;
- *delezione non frameshift*, con delezione di 3 paia di basi nella sequenza, quindi di un amminoacido, senza alterazione del modulo di lettura;
- *splicing*, con alterazione delle sequenze consenso per il processamento dell'mRNA (De Boeck *et al.*, 2006).

In base alle alterazioni di struttura o di funzione che le mutazioni provocano nella proteina CFTR, esse sono state suddivise in 6 classi (Fig. 8):

- ✓ Classe I: comprende mutazioni *nonsense* e *frameshift* che causano la formazione di un codone di stop con la mancata produzione della proteina CFTR, che non è presente sulla superficie cellulare;
- ✓ Classe II: tali mutazioni determinano l'anomalo processamento della proteina impedendo che arrivi e possa funzionare normalmente sulla membrana della cellula (es. *F508del*);
- ✓ Classe III: queste mutazioni comportano che la proteina è prodotta e assemblata, ma non è attiva in quanto sono assenti i fattori che regolano l'apertura e la chiusura del canale per il cloro; riguardano difetti di *binding* con l'ATP a livello dei domini NBD, nonché difetti di fosforilazione a livello del dominio R, risultando in un'attività ridotta del canale (difetti di *gating*);
- ✓ Classe IV: tali mutazioni, a carico dei domini transmembrana, determinano una diminuita funzionalità della proteina CFTR associata a difetti nella conduttanza del canale;
- ✓ Classe V: mutazioni che determinano un alterato *splicing* provocando una ridotta sintesi della proteina, il cloro passa attraverso il canale, come per le mutazioni di classe IV, ma in maniera ridotta;
- ✓ Classe VI: mutazioni che coinvolgono l'estremità carbossi-terminale della proteina e ne determinano un'instabilità sulla membrana (Amaral, 2015).

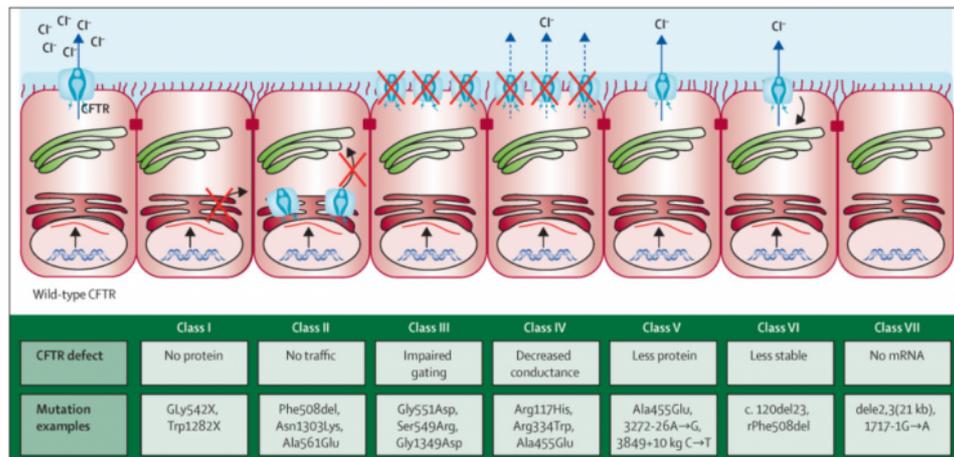


Figura 8. Classi di mutazioni ed effetti sulla proteina CFTR. (<https://www.fibrosicisticaricerca.it>)

Le mutazioni sono ulteriormente classificate in gravi o lievi in base alle conseguenze che producono sulla funzionalità della proteina. Le mutazioni gravi sono quelle in cui è presente un difetto di sintesi o blocco nel processo di maturazione (principalmente classi I, II e III) mentre le mutazioni lievi mostrano una ridotta funzione del canale o soltanto una ridotta sintesi della proteina, con conseguente diminuita funzionalità del canale del cloro (principalmente classi IV, V e VI).

La mutazione più frequentemente riscontrata è la *F508del*, che costituisce il 70-80% delle mutazioni che causano FC presenti nelle popolazioni del Nord-Europa e dell'America. Essa consiste nella delezione di tre paia di basi (CTT) nell'esone 10, che comporta l'assenza del residuo fenilalaninico a livello del codone 508 (Fig.9). Il motivo per cui questa mutazione sia la più frequente ancora non è del tutto chiaro, ma si pensa ad un vantaggio dell'eterozigote in tempi neolitici, quando venne introdotta la pastorizia, con le conseguenti infezioni intestinali diarroiche che ne conseguirono (Alfonso-Sánchez *et al.*, 2010). La prevalenza delle mutazioni è differente in relazione all'area geografica e alle diverse popolazioni.

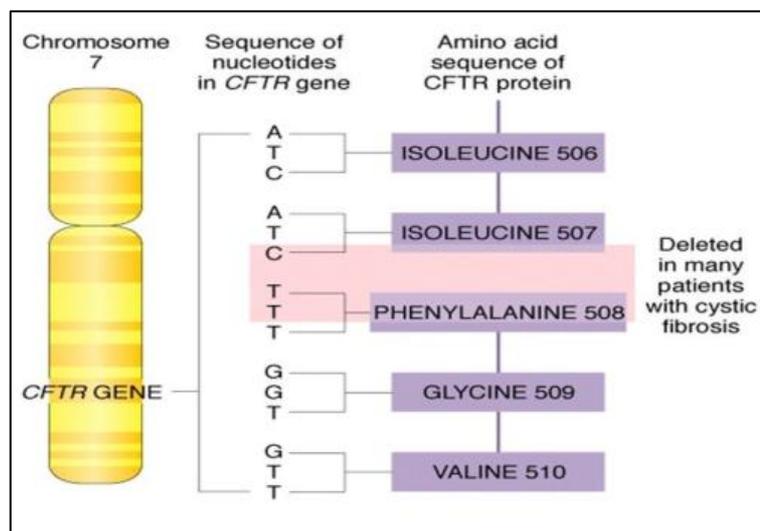


Figura 9. Localizzazione del gene CFTR sul cromosoma e delezione della fenilalanina in posizione 508 (*F508del*) all'interno della sequenza amminoacidica.

1.1.5. Diagnosi della Fibrosi Cistica

L'identificazione precoce della malattia è molto importante per mettere in atto un'adeguata terapia mirata ad evitare danni permanenti. La diagnosi precoce si effettua con lo *screening* neonatale, che si basa sul dosaggio del tripsinogeno immunoreattivo (IRT) nel sangue prelevato durante la terza giornata di vita, seguito da un secondo prelievo nel caso si rilevassero valori superiori al limite di riferimento nel primo. La seconda positività dell'IRT non determina in maniera certa lo stato di malattia ed è seguita da un successivo accertamento diagnostico costituito dal "Test del sudore", che consiste nel determinare la concentrazione di cloro nel sudore ed è attualmente ancora il "gold standard" per la diagnosi. Il metodo di riferimento è quello di Gibson e Cooke che si effettua attraverso la stimolazione ionoforetica della parte volare dell'avambraccio con la pilocarpina e la successiva misurazione della concentrazione di cloro nel sudore raccolto. Normalmente la sua quantità nel sudore è inferiore a 30 mEq/L (40 sopra i sei mesi), il test è positivo se i valori di cloro sono superiori a 60 mEq/L (Southern, 2007). Valori

intermedi non sono conclusivi per emettere diagnosi ed è quindi necessario ricorrere all'analisi genetica.

Nel bambino o nell'adulto il test del sudore viene prescritto dal medico che sospetta la malattia in base ai sintomi (tosse ricorrente, infezioni respiratorie ripetute, diarrea, crescita scarsa, perdita di sali).

Dal punto di vista genetico, per la diagnosi, è importante dimostrare la presenza di due alleli mutati. In caso di test del sudore positivo l'analisi molecolare ha un ruolo di conferma; in caso di risultato negativo o di dubbia interpretazione del test del sudore, ma in presenza di un sospetto clinico, l'analisi molecolare del gene CFTR diventa fondamentale per una corretta diagnosi.

Si possono distinguere quattro livelli di indagini molecolari, che utilizzano DNA genomico (I-II-III livello) o RNA (IV livello) estratti da diversi campioni biologici (prelievo di sangue periferico, tampone buccale, brushing nasale, ecc..) e permettono di distinguere la condizione di omozigosi o eterozigosi composta per le mutazioni analizzate.

Il test genetico per la FC può essere eseguito per mezzo di indagini diverse, che si caratterizzano per diversi tempi di esecuzione, tecnologie utilizzate, costi. L'indagine di I livello consiste nella ricerca delle mutazioni del gene CFTR più frequenti nella popolazione. L'indagine di II livello indaga la sequenza di tutti gli esoni, delle zone introniche adiacenti, del promotore, e delle regioni introniche sedi di varianti patogenetiche di *splicing*. I test di III livello indagano riarrangiamenti molto vasti e complessi del gene CFTR. Le indagini di IV livello, invece, interessano varianti patogenetiche non conosciute che interferiscono con la funzione di *splicing* dell'mRNA del gene CFTR (Lucarelli M. *et al.*; Analisi genetica in Fibrosi Cistica, Consensus 2019).

La scelta di usare tecniche di I, II, III o IV livello dipende dallo scopo per cui il test

genetico viene eseguito, ad esempio se serve per *screening* (sia come *screening* della malattia alla nascita, sia come *screening* del portatore nelle coppie che vogliono avere figli) si usa una tecnica di I livello perché più rapida, meno costosa e di più facile interpretazione, rispetto ad indagini di II, III e IV livello che permettono di identificare un maggior numero di mutazioni, accettando però tempi più lunghi, costi più elevati e possibilità di individuazione di varianti con conseguenze cliniche incerte. Diventa, quindi, importante che il test genetico sia accompagnato da una adeguata consulenza genetica, pre e post-test.

1.1.6. Trattamenti terapeutici attuali e futuri

Ad oggi numerosi progressi hanno portato a un miglioramento della sopravvivenza dei malati, grazie agli avanzamenti che sono stati fatti nell'antibioticoterapia, sviluppo di mucolitici, supplementazione enzimatica e farmaci anti-infiammatori (Prayle *et al.*, 2013; Turnbull *et al.*, 2016).

Le gravi problematiche respiratorie dei pazienti FC rendono indispensabile l'assunzione di antibiotici, sia per prevenire che per curare l'insulto batterico. Le terapie antibiotiche si basano sull'uso di farmaci quali azitromicina, amikacina, aztreonam, tobramicina utili per trattare le infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* e da altri agenti batterici.

I farmaci decongestionanti nasali, così come i farmaci broncodilatatori e mucolitici (es. acetilcisteina) sono utili per aiutare il paziente a respirare meglio; se ciò non fosse sufficiente, i malati di FC potrebbero aver bisogno di un supplemento di ossigeno, attraverso una mascherina apposita posizionata sopra il naso e la bocca.

Benché la FC sia essenzialmente, a livello polmonare, una malattia infiammatoria,

pochi sono gli agenti anti-infiammatori che si sono rilevati efficaci e che sono stati utilizzati in clinica. Infatti, molti dei farmaci corticosteroidi e FANS (farmaci anti-infiammatori non steroidei) hanno un meccanismo d'azione aspecifico e sono gravati da consistenti effetti collaterali. Lo sviluppo di nuovi farmaci anti-infiammatori dipenderà dalla sempre maggiore comprensione del processo infiammatorio delle vie aeree FC.

Spesso è necessario anche un trattamento mirato a migliorare l'assorbimento di nutrienti e vitamine, pesantemente ostacolato nei malati FC, soprattutto in quelli in cui la forma pancreatica è predominante. L'assunzione di enzimi digestivi, come la pancreatina, può favorire l'assorbimento e la digestione di molecole più o meno complesse (lipidi, proteine, amidi), così come integrare l'alimentazione con supplementi vitaminici, quali vitamine E, D, K, A permette di combattere la marcata malnutrizione associata a carenza di vitamine che si osserva nei malati.

Come già detto precedentemente, però, l'uso di farmaci così come di altri sussidi terapeutici hanno il solo scopo di ridurre i sintomi e prevenire le complicanze. Diventa necessario trovare una terapia che sia in grado di compensare in buona parte i difetti della proteina mutata agendo direttamente sulla causa della patologia.

Recentemente, sono stati sviluppati dei farmaci che mirano a correggere il difetto di base della malattia, intervenendo direttamente sui difetti della proteina CFTR, e propugnando l'idea attuale della cosiddetta *medicina personalizzata* (Amaral, 2015). Per le mutazioni di classe I, sono stati sviluppati dei farmaci che permettono il superamento del codone di stop permettendo alla proteina di essere sintetizzata e trasportata in membrana. Per le mutazioni di classe II e III, i principali farmaci attualmente in uso appartengono a due categorie: i *correttori*, che nel caso delle mutazioni di classe II, aumentano la capacità della proteina nascente di superare il blocco maturativo ed arrivare in membrana; ed i *potenziatori*, che nel caso di mutazioni di classe III, aumentano la

capacità della proteina, correttamente posizionata in membrana, di funzionare in maniera appropriata superando il difetto di *gating*. Poiché la proteina mutata *F508del* è caratterizzata da una serie di difetti (trasporto intracellulare e continua degradazione, ma anche difetti di *gating*) la cosiddetta tripla terapia, con due correttori ed un potenziatore, è oggi la terapia d'elezione nei pazienti sia omozigoti, sia eterozigoti composti per *F508del* e una delle numerose mutazioni con funzione minima, rappresentanti circa il 90% dei pazienti FC (Taylor-Cousar *et al.*, 2019). I farmaci potenziatori sono indicati oggi in clinica per i pazienti con mutazione di classe III e classe IV. Per la classe V, determinata da mutazioni che riducono l'espressione della proteina CFTR, sono stati introdotti recentemente dei farmaci che ne aumentano la presenza in membrana, chiamati *amplificatori*. Infine, per la classe VI, con riduzione della vita media della proteina sulla membrana, vengono utilizzati i cosiddetti *stabilizzatori* (Fig.10) (Pranke *et al.*, 2019). La sfida per questi farmaci modulatori della CFTR è quella che riguarda gli effetti collaterali e la loro tolleranza a lungo termine, visto che dovranno essere assunti per tutta la vita del paziente. Di conseguenza, un'altra problematica riguarda l'alto costo di questi farmaci per i pazienti e per la società.

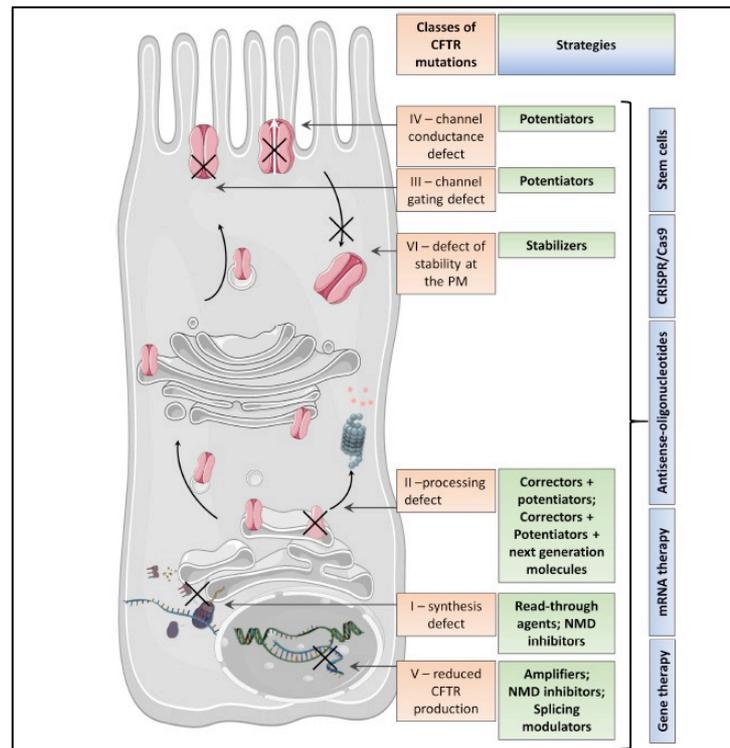


Figura 10. Le sei classi di mutazioni del gene CFTR, conseguenti difetti a livello proteico e modulatori della CFTR. Tratto da Pranke *et al.*, 2019.

La terapia genica, introdotta fin dal 1990 nei modelli animali di FC, non ha esaudito la promessa di curare tutti i pazienti affetti da questa malattia. Benché il suo utilizzo fosse razionale, e cioè introdurre un gene *wild type* nel genoma delle cellule bersaglio e sovra-esprimere così una proteina corretta curando i pazienti indipendentemente dalla classe di mutazione, molti ostacoli hanno impedito la sua realizzazione clinica, in particolare la presenza, nelle vie aeree e gastrointestinali, del muco altamente viscoso e disidratato che impedisce l'arrivo dei vettori alle cellule bersaglio (Conese *et al.*, 2011). Inoltre, i vettori di terapia genica presentano una certa immunogenicità che ne limita l'utilizzo in individui già sensibilizzati. Negli ultimi anni si è assistito all'introduzione di strategie di terapia genica più mirate al trattamento di singole classi di mutazione, basate su editing del DNA (come CRISPR/Cas9), sull'utilizzo di oligonucleotidi antisense, oppure sull'introduzione di mRNA riparanti l'mRNA difettoso (Pranke *et al.*, 2019; Cooney *et al.*, 2018). Benché

promettenti, si tratta ancora di comprendere quale sia la strategia migliore per far veicolare il materiale genetico nell'epitelio delle vie aeree dei pazienti FC senza indurre reazioni immuni.

La medicina rigenerativa si sta attualmente orientando sulla sperimentazione e il successivo utilizzo, di una terapia cellulare che sembrerebbe essere un trattamento più efficace rispetto alla terapia genica, che ha dato esiti non soddisfacenti in termini di efficienza di trasferimento genico e di efficacia del risultato. A tal fine, diversi tipi di cellule sono stati utilizzati per il trattamento della FC, (Carbone *et al.*, 2014) ponendo particolare attenzione sulle cellule staminali e progenitrici delle vie aeree. Il razionale per il loro utilizzo risiede in primo luogo nella loro multipotenza/pluripotenza, potendo differenziarsi nei molti tipi cellulari dell'epitelio pseudostratificato delle vie aeree. In secondo luogo, nel fatto che potrebbero dare una risoluzione del quadro patologico una volta introdotte nelle vie aeree in tutti i pazienti con FC, indipendentemente dalla mutazione. Infine, e a differenza della terapia genica, la terapia cellulare potrebbe anche apportare una componente anti-infiammatoria, se viene considerato il tipo cellulare corretto.

1.2. LE CELLULE STAMINALI

1.2.1. Definizione e caratteristiche generali

Un sottotipo di cellule presenti nel nostro corpo è rappresentato dalle cellule staminali: cellule non specializzate caratterizzate dall'abilità di autorinnovamento (*self-renewal*) e di differenziamento multilineare.

La prima viene esplicitata grazie all'abilità di queste cellule di andare incontro a molteplici e sequenziali divisioni cellulari mantenendo lo stato indifferenziato (Menon *et al.*, 2016). secondo due modalità. La divisione simmetrica genera due cellule figlie uguali alla cellula madre e permette di espandere il *pool* di cellule staminali quando necessario (per es. in corso di sviluppo e in seguito a processi degenerativi conseguenti a danno tissutale). Nella divisione asimmetrica, invece, ogni singola cellula genera una cellula figlia, con identiche proprietà staminali per non alterare il numero di cellule staminali (autorigenerazione), e una cellula figlia che andrà incontro a differenziamento che, dividendosi ulteriormente, darà origine a cellule mature che formeranno i tessuti. (Cai *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda le loro potenzialità differenziative (Fig.11), le cellule staminali sono classicamente suddivise in (Hima Bindu *et al.*, 2011):

- **Cellule Staminali Totipotenti:** cellule staminali in grado di differenziare in ogni tessuto embrionale ed extraembrionale, derivano da embrioni allo stadio di 4-8 cellule (morula), dopo 1-3 giorni dalla fecondazione. L'unica cellula totipotente è lo zigote, originato dalla fusione del gamete maschile con il gamete femminile. Dopo diversi cicli di divisioni cellulari, le cellule che derivano dallo zigote, all'inizio tutte uguali, differenziano nel trofoblasto, da cui origineranno placenta e tessuti extraembrionali e nella massa cellulare interna, che formerà l'embrione.

- **Cellule Staminali Pluripotenti:** cellule embrionali allo stadio di blastocisti, dopo 4-14 giorni dalla fecondazione. Queste cellule sono capaci di differenziare in tessuti di origine embrionale organizzati nei tre diversi foglietti germinali (ectoderma, mesoderma ed endoderma), ma non nei tessuti extraembrionali.
- **Cellule Staminali Germinali:** sono cellule staminali pluripotenti (cellule riproduttive progenitrici). Nell'embrione post-impianto e poi nel feto sono ancora molte le cellule staminali presenti, esse rappresentano lo stadio di differenziamento che precede la formazione delle gonadi e compaiono nell'embrione di topo e umano, alla I e III settimana di sviluppo, rispettivamente. Se isolate, queste cellule sono in grado, come le cellule staminali embrionali, di replicarsi illimitatamente in vitro mantenendo capacità differenziative pluripotenti.
- **Cellule Staminali Multipotenti:** sono cellule che hanno la capacità di moltiplicarsi e di mantenersi in coltura, ma non quella di rinnovarsi in modo illimitato. Differenziano in tessuti diversi, ma appartenenti allo stesso foglietto embrionale. Appartengono a tale categoria le cellule staminali adulte che si trovano in diversi tessuti adulti, tra cui le BMSC (*Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*), le ASC (*Adipose-derived Stem Cells*), e le HSC (*Hematopoietic Stem Cells*).
- **Cellule Staminali Unipotenti:** presenti nei tessuti adulti, potenzialmente più limitate nonché organo-specifiche, sono in grado di auto-rinnovarsi e di differenziare nel tipo cellulare del tessuto di appartenenza, assicurandone la riparazione ed il mantenimento dell'omeostasi.

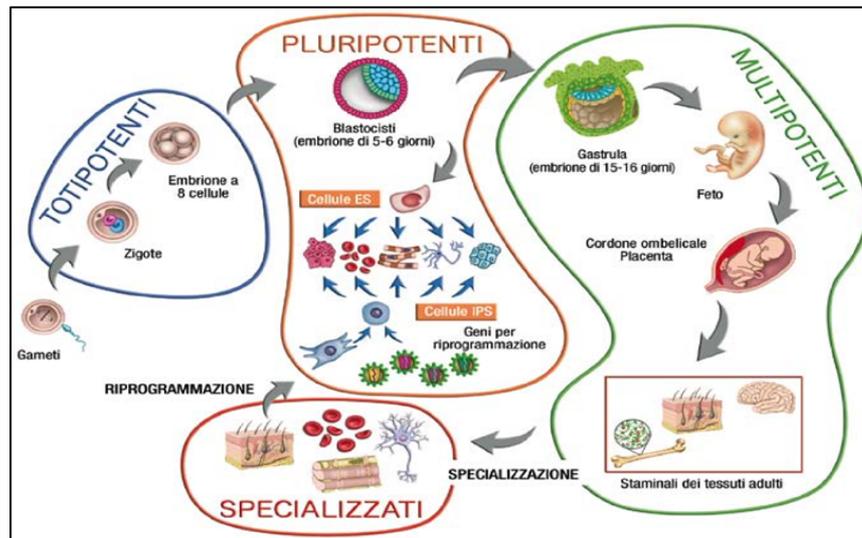


Figura 11. Cellule staminali suddivise in base alle loro capacità differenziative. Da Conti e Cattaneo, 2011.

L'elevato potenziale differenziativo *in vitro*, necessario per l'ottenimento di un numero di cellule sufficienti per un'eventuale terapia e, soprattutto, le prospettive sul differenziamento verso linee cellulari diverse, fanno delle cellule staminali un interessante candidato per il trattamento di un vasto spettro di patologie per le quali gli approcci tradizionali sono inefficaci.

Le cellule staminali possono anche essere suddivise in due categorie in base al tipo di tessuto di derivazione: le cellule staminali embrionali, che vengono isolate dalla massa cellulare interna della blastocisti prima dell'impianto in utero e le cellule staminali adulte ottenute da qualsiasi tessuto di un organismo dopo la nascita. Dal 2006, grazie agli studi di Takahashi e Yamanaka, sono state introdotte le cellule staminali pluripotenti indotte, le quali sono dotate di potenzialità plurilineare comparabile a quella delle cellule staminali embrionali con, inoltre, i vantaggi di essere meno immunoreattive e di evitare le controversie etiche legate all'utilizzo di materiale embrionale.

- **Le cellule staminali embrionali (ESC):** derivano da cellule che si trovano nella blastocisti nella fase di sviluppo embrionale che precede l'impianto in utero. La blastocisti si presenta come una sfera che può essere suddivisa in due parti: uno strato esterno di cellule, o trofoectoderma, che andrà a formare la placenta che supporta l'embrione nella sua crescita all'interno dell'utero e una massa cellulare interna, composta da 10–20 cellule. Queste ultime sono indifferenziate e in grado di proliferare indefinitamente senza andare incontro a processi di differenziazione, mantenendo un cariotipo normale e diploide. Le cellule della massa cellulare interna sono cellule pluripotenti nel breve periodo che precede la gastrulazione e, se prelevate in tempo, disgregate e coltivate in presenza di fibroblasti, citochine e LIF (*leukemia inhibitory factor*) (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988), possono moltiplicarsi sino a formare colonie di cellule ES. Dopo alcuni giorni di coltura da poco più di una decina di cellule isolate dalla singola blastocisti se ne possono ottenere migliaia. Queste cellule, se mantenute in condizioni ottimali, continueranno a proliferare rimanendo indifferenziate ed in uno stato diploide, se invece le condizioni di coltura verranno modificate, tenderanno a differenziarsi spontaneamente.

Individualmente le ESC sono in grado di dare origine a cellule germinali e a tipi cellulari appartenenti ai tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma), sia *in vivo* che *in vitro* mediante appropriate condizioni di coltura (Pain *et al.*, 1998).

Le colture di ESC umane sono ottenute da blastocisti originate in seguito a pratiche di fecondazione assistita inutilizzate e congelate, oppure da cellule germinali primordiali provenienti da embrioni di 5-9 settimane (Thomson *et al.*, 1998; Shambloott *et al.*, 1998).

L'utilizzo delle ESC risulta essere di fondamentale interesse per la comprensione dei geni coinvolti durante lo sviluppo embrionale: tramite il loro impiego si possono

identificare gli eventi genetici, molecolari e cellulari che stanno alla base di molte patologie congenite e malformazioni placentari che causano aborti spontanei e studiare anomalie cromosomiche responsabili dello sviluppo di tumori nei bambini. Due sono i problemi più rilevanti collegati all'uso delle ESC, il primo è legato alla loro straordinaria capacità proliferativa infatti, *in vivo*, possono formare tumori o differenziarsi in tipi cellulari non desiderati, il secondo, di natura etica e legislativa (Legge del 19 febbraio 2004, n°40 Art. 13), relativo al processo di estrazione di queste cellule che necessita della distruzione dell'embrione. In Italia, e in molti altri Paesi, è vietata la sperimentazione su embrioni umani, per questo motivo è necessario, ai fini della ricerca, usare fonti alternative di cellule staminali, come sono le cellule staminali da tessuto adulto.

- **Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC):** sono cellule originariamente non-pluripotenti (per es., fibroblasti) che sono state ingegnerizzate (“indotte”) per diventare pluripotenti, cioè in grado di formare tutti i tipi di cellule dell'organismo adulto. Nel 2006 un gruppo di scienziati giapponesi guidato da Shinya Yamanaka è riuscito a ottenere cellule iPSC da fibroblasti di topo e alla fine dell'anno successivo da fibroblasti umani. Anche se le cellule iPSC e le cellule staminali embrionali hanno molte caratteristiche in comune, esse non sono identiche. Le iPSC, infatti, non danno problemi di rigetto perché sono ottenute in modo innocuo dal paziente stesso mediante una biopsia cutanea e non sollevano problemi di tipo etico perché non si distrugge un embrione. Inoltre, si possono ottenere da cellule di ogni età: in Giappone sono state ottenute da persone dai 6 agli 81 anni senza differenza di potenzialità.

Le cellule iPSC sono state ottenute introducendo 4 particolari geni (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, e *c-Myc*) nelle cellule somatiche tramite retrovirus, che trasportano il DNA che codifica questi fattori, integrato nel loro genoma. Dopo qualche settimana in coltura,

si è osservato che esse potevano essere riprogrammate fino a tornare pluripotenti in uno stato simile a quello delle cellule staminali embrionali e ri-differenziate in cellule nervose, del cuore, del fegato e del pancreas. Il “metodo Yamanaka” per generare iPSC richiede, tuttavia, l’utilizzo di vettori virali per indurre l’espressione dei fattori di trascrizione indispensabili per risvegliare la staminalità delle cellule. L’utilizzo di virus, così come la manipolazione genetica delle cellule, rappresenta un grosso limite alla conversione delle cellule iPSC in uno strumento affidabile per la medicina rigenerativa, per questo si è cercato di implementare l’utilizzo di metodi non integrativi, che comprendono quelli che usano DNA, inclusi plasmidi, episomi, adenovirus, e Sendai virus, e quelli non a base di DNA, come mRNA, microRNA, piccole molecole e proteine bioattive (Fig. 12).

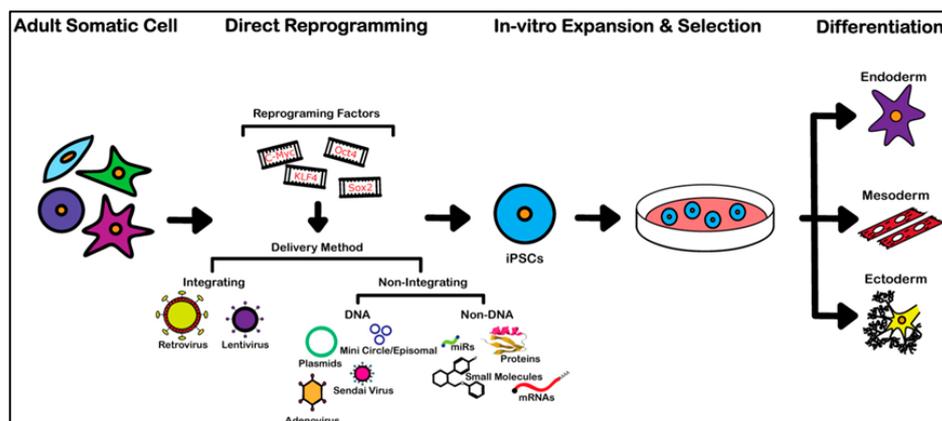


Figura 12. Riprogrammazione di cellule somatiche adulte in iPSC e diversi metodi per ottenere la riprogrammazione. Da Menon *et al.*, 2016.S.,

La scoperta delle iPSC e dei vantaggi nel loro utilizzo, quali facilità di ottenimento, capacità di rapida ed efficiente espansione *in vitro*, caratteristiche simili alle ESC, minima risposta immunoreattiva, esenzione da controversie etiche, rende le iPSC candidate ideali nella medicina rigenerativa. Durante la riprogrammazione, però, possono avvenire aberrazioni cromosomali legate alla delezione di geni

oncosoppressori e alla duplicazione di oncogeni per cui il trapianto di queste cellule in pazienti potrebbe portare allo sviluppo di tumori e questo limita profondamente la loro applicazione alla medicina rigenerativa.

Ulteriori studi, condotti sempre da scienziati giapponesi guidati da Haruko Obokata (2014), hanno identificato un sistema completamente nuovo per generare *in vitro* cellule staminali pluripotenti. Esponendo linfociti già maturi a potenti stimoli ambientali, come per esempio livelli di pH molto bassi, i ricercatori sono stati in grado di riprogrammare le cellule ad uno stadio più immaturo: sono nate così quelle che Obokata ha battezzato “cellule pluripotenti indotte da uno stress” o, per usare l’acronimo inglese, cellule STAP (*Stimulus-Triggered Acquisition of Pluripotency*).

- **Le cellule staminali adulte (ASC):** sono cellule caratterizzate da un ridotto potenziale proliferativo e differenziativo rispetto alle cellule staminali embrionali e, per questo, definite cellule multipotenti. Esse sono localizzate in specifici microambienti detti nicchie tissutali (Spradling *et al.*, 2001), dove sono in uno stato di quiescenza o di limitata attività fino a quando non vengono riattivate in risposta a diversi stimoli. La loro principale funzione è il mantenimento dell’integrità strutturale e funzionale del tessuto di appartenenza, promuovendo la riparazione tissutale in risposta ad eventi traumatici o al naturale *turnover* cellulare (Wabik *et al.*, 2015). Nel corso degli anni sono stati individuati diversi tipi di cellule staminali adulte nei differenti tessuti: midollo osseo, sangue periferico, cervello, fegato, milza, cute, muscolo scheletrico, tratto gastrointestinale, pancreas, occhio, polpa dentale, tessuto adiposo, placenta, cordone ombelicale, sangue cordonale e liquido amniotico (De Coppi *et al.*, 2007; Markov *et al.*, 2007).

Inizialmente, gli studi sulle cellule staminali adulte avevano portato a considerare che i precursori immaturi vadano incontro a una differenziazione progressiva che segue

lo schema della filiera di derivazione embrionale a cui una cellula appartiene. L'introduzione, per le cellule staminali adulte, del concetto di plasticità fenotipica o trans-differenziamento indica la loro capacità di differenziare in tipi cellulari diversi non solo da quelli del tessuto nel quale risiedono, ma anche di diversa derivazione embrionale (Karaoz *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012). Questa caratteristica potrebbe rivelarsi utile per la ricostruzione di tessuti specifici per la loro capacità rigenerativa, l'eventuale assenza di una risposta immunitaria in caso di trapianto (essendo cellule autologhe) ed il superamento di questioni di natura etica. Una popolazione di cellule staminali adulte, non ematopoietiche presenti in differenti tessuti adulti, è costituita dalle cellule staminali mesenchimali (*Mesenchymal Stem Cells*, MSC) Esse sono dotate di capacità di autorinnovamento, presentano caratteristiche di multipotenzialità e sono presenti in maggiore percentuale nello stroma del midollo osseo (Ullah *et al.*, 2015). Le MSC derivano dal mesoderma, il foglietto embrionale intermedio da cui originano i tessuti connettivi di tutto l'organismo, che si differenzia intorno al terzo mese di gestazione e differisce notevolmente dagli altri foglietti embrionali, costituiti quasi esclusivamente di cellule, in quanto è composto da un'abbondante matrice extracellulare in cui sono immerse le cellule mesenchimali. Il tessuto mesenchimale si ritrova in tutti gli organi, per garantire supporto strutturale. Le MSC possono originare anche da alcune porzioni degli altri due foglietti embrionali: l'ectoderma della cresta neurale e l'endoderma della placca precordale (Ambrosi *et al.*, 2001). Le MSC poste in coltura sono facilmente identificabili, in quanto formano colonie di cellule aderenti caratterizzate dalla tipica morfologia fibroblastoide. Esse possono essere isolate ed espanse *in vitro* senza apparente modificazione del fenotipo e/o perdita di funzione. Infatti, le MSC sono prive di *marker* distintivi unici, vengono individuate attraverso l'analisi di un complesso immunofenotipo, che comprende la

mancanza di antigeni tipici delle cellule staminali emopoietiche (CD45, CD34, CD14) e l'espressione di una serie di molecole di superficie (CD90, CD105, CD29, CD44, CD73) la cui espressione si evidenzia anche dopo espansione *in vitro* di queste cellule.

Le MSC hanno quindi attirato l'attenzione per sviluppare terapie cellulari e geniche per diversi motivi:

- 1) sono facilmente ottenibili da tessuti adulti e, quindi, il loro utilizzo non presenta problematiche di carattere etico, a differenza delle staminali embrionali;
- 2) possono essere rapidamente espanse, senza perdere il fenotipo o la capacità differenziativa;
- 3) sono in possesso di un fenotipo di membrana scarsamente riconosciuto da cellule di tipo T (per assenza di molecole MHC di tipo II) (Gotherstrom *et al.*, 2004);
- 4) la loro natura ipo-immunogenica ne consente l'uso nel trapianto allogenico che viene ben tollerato (Liechty *et al.*, 2000; Grinnemo *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2005; Mansilla *et al.*, 2005; Caplan, 2007).

Inoltre la plasticità mostrata da tali cellule, ossia la loro capacità di differenziarsi, può essere sfruttata nell'ambito della medicina rigenerativa per lo sviluppo di protocolli clinici applicativi di terapia cellulare e, in particolare, per la completa rigenerazione di tessuti danneggiati. Studi del 2004 condotti da Wang e colleghi, infatti, evidenziano che le cellule staminali adulte del midollo osseo possiedono la capacità di differenziarsi in cellule epiteliali delle vie aeree fornendo, così, una potenziale terapia per la FC e, in generale, per il trattamento delle malattie polmonari. In particolare, questi lavori hanno dimostrato che le MSC provenienti da pazienti, isolate, espanse e corrette geneticamente *ex vivo* per il gene CFTR, quando co-coltivate con cellule epiteliali respiratorie FC, sono in grado di contribuire alla secrezione apicale di cloro

in risposta a stimoli da parte di agonisti di cAMP, suggerendo la possibilità di sviluppare una terapia cellulare per la patologia.

Le MSC, quando usate in protocolli clinici, si sono rivelate efficaci nell'incrementare la funzione polmonare e la sopravvivenza di pazienti con malattie croniche infiammatorie polmonari, quali l'asma, la broncopneumopatia cronica ostruttiva, la fibrosi polmonare idiopatica, l'ipertensione arteriosa polmonare e la silicosi (Cruz *et al.*, 2020). Inoltre, la loro somministrazione si è dimostrata sicura, con pochi effetti avversi. Gli studi in corso stanno cercando di ottimizzare i tempi e le dosi, nonché la via di somministrazione.

Nonostante la maggior parte dei dati pubblicati si riferiscano a colture cellulari ottenute da midollo osseo, si sta raccogliendo un sempre maggior numero di informazioni sulle MSC ottenute da fonti alternative. L'utilizzo di MSC da midollo osseo, infatti, è limitato da due principali problematiche: la procedura invasiva del prelievo di midollo e l'esiguo numero di cellule staminali che si ottengono da ogni prelievo. Per questo vengono ricercate nuove fonti, tra cui le più studiate sono i tessuti fetali, il tessuto adiposo, il sangue periferico, il cordone ombelicale, la placenta. Le cellule derivanti da questi tessuti condividono, *in vitro*, molte delle caratteristiche delle MSC da midollo osseo: l'aderenza alla plastica, la morfologia fibroblastoide, alcuni *marker* di membrana ed il potenziale differenziativo in senso osteogenico, adipogenico e condrogenico in seguito ad appropriati stimoli.

- **Le cellule staminali mesenchimali amniotiche umane (hAMSC):** vengono isolate dalla placenta, che presenta i vantaggi di essere ricca di cellule staminali e una fonte etica in quanto è normalmente scartata dopo il parto.

La placenta umana è una struttura discoidale formata da una parte fetale (la placca coriale) e da una parte materna (decidua basale). Si definisce strutturalmente nella

quarta settimana di gestazione. Essa si forma mediante l'unione di una parte del corion con quella parte della mucosa uterina, con la quale il corion stabilisce delle strette connessioni. Il suo processo di formazione è chiamato placentazione. La placenta è costituita da cellule specializzate che tendono a formarsi precocemente (servono per ancorare l'embrione all'utero, formando connessioni vascolari che trasportano i nutrienti all'embrione) e che, attraverso funzioni endocrine, immunitarie e metaboliche, garantiscono la sopravvivenza dell'embrione. L'amnio (o amnios) è la sottile membrana avascolare che rappresenta lo strato più esterno della parte fetale della placenta, la quale è bagnata dal fluido amniotico e contigua, attraverso il cordone ombelicale, alla pelle del feto. Tale membrana è composta da un singolo strato di cellule epiteliali (*Human Amniotic Epithelial Stem Cells*, hAEC) che poggiano su una membrana basale, sotto cui vi è uno stroma contenente cellule di natura mesenchimale, le hAMSC (Fig. 13).

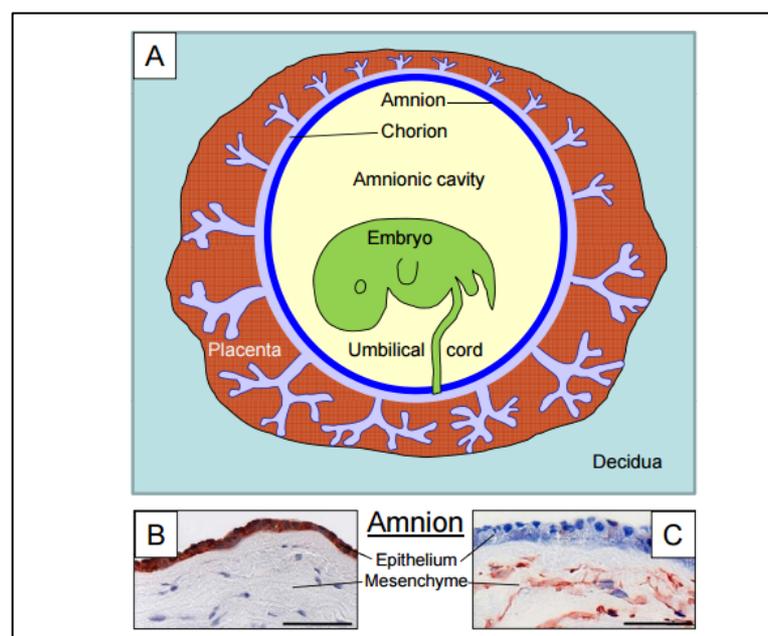


Figura 13. Overview della placenta e delle membrane fetali (A). L'amnios consiste di uno strato epiteliale che esprime la citocheratina 7 (B) e di uno strato mesenchimale contenente cellule marcate con un anticorpo anti-vimentina (C). Barra= 50µm. Tratto da Silini *et al.*, 2013.

L'epitelio amniotico (ectoderma amniotico) deriva dall'epiblasto (ectoderma embrionico) mentre le cellule mesenchimali (mesenchima amniotico) dal mesoderma extraembrionico dello strato primitivo.

Diversi studi hanno dimostrato che, sia le hAESC sia le hAMSC, esprimono i caratteristici *marker* di staminalità, quali: il fattore di trascrizione *octamer-binding* (OCT-4), il quale viene specificatamente espresso nelle ESC e nelle cellule germinali; il GATA-4, che è un *marker* presente a livello dell'endoderma embrionico e viscerale (extraembrionico); il fattore nucleare epatocitario 3β (HNF- 3β) il quale viene espresso a livello dell'endoderma completo; la nestina, ossia una proteina intermediaria e un *marker* specifico per le cellule staminali neuronali; NANOG, un fattore di trascrizione coinvolto nell'auto-rinnovamento delle cellule indifferenziate staminali embrionali (Miki and Strom, 2006). Queste evidenze scientifiche suggeriscono che sia le hAEC sia le hAMSC sono caratterizzate da pluripotenza.

Le hAEC e hAMSC sono conosciute quindi per avere caratteristiche uniche, come il fatto di derivare da una fase precoce dello sviluppo embrionale, presentare bassi livelli di espressione degli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità e avere un potenziale di differenziazione meno limitato rispetto alle ASC.

In coltura, possono differenziare in linee mesodermali "classiche" (osteogenica, condrogenica e adipogenica), così come possono differenziare nei tipi cellulari dei tre foglietti embrionali - ectoderma, mesoderma ed endoderma.

Le hAMSC posseggono, inoltre, delle proprietà biologiche che ne fanno una delle sorgenti più promettenti in vari campi della medicina rigenerativa (Lim *et al.*, 2017). In primo luogo, vi sono alcune evidenze che riguardano la

immunomodulazione e la soppressione dell'infiammazione. A tal riguardo, è molto interessante che, in esperimenti *in vitro* in co-cultura con cellule T allogeiche, le hAMSC abbiano dimostrato una capacità immunosoppressiva in termini di riduzione della proliferazione e di produzione di citochine pro-infiammatorie (interferone- γ e IL-17), nonché di promozione di secrezione della citochina anti-infiammatoria IL-10 (Karlsson *et al.*, 2012). Altri studi hanno dimostrato le proprietà anti-infiammatorie delle hAMSC nei confronti della microglia (Yan *et al.*, 2014), rendendole così delle fonti interessanti per il trattamento di malattie infiammatorie neurodegenerative, come la sclerosi multipla (Abbasi-Kangevari *et al.*, 2019).

Un ruolo delle hAMSC nella medicina rigenerativa riguarda la loro capacità di secernere esse stesse dei fattori immunomodulanti e anti-infiammatori. Le hAMSC, e il medium condizionato (MC) da esse derivato, hanno l'abilità di inibire le cellule T, ridurre l'espressione di *marker* associati alle cellule Th1 e Th17, promuovere la produzione di cellule T regolatorie, inibire la differenziazione delle cellule dendritiche e ridurre la citotossicità delle cellule NK (Li *et al.*, 2015; Pianta *et al.*, 2015; Wolbank *et al.*, 2007; Magatti *et al.*, 2009). Inoltre, le hAMSC presentano l'abilità di partecipare alla riparazione tissutale inibendo il processo della fibrosi e promuovendo la ri-epitelizzazione. È stato dimostrato che il MC da esse derivato aveva un effetto positivo in modelli di riparazione della ferita *in vitro* (*scratch wound assay*) e *in vivo* (modello murino di diabete) inducendo la polarizzazione macrofagica da un fenotipo M1 pro-infiammatorio ad uno M2, anti-infiammatorio e pro-risolutivo (Magatti *et al.*, 2016). Un altro recente lavoro ha dimostrato che le tali cellule e il loro MC risolvono efficientemente un danno termico cutaneo indotto *in vivo* mediante

l'inibizione dell'apoptosi dei chondroblasti e promuovendone la proliferazione attraverso la via di PI3K/Akt (Li *et al.*, 2019). Questi studi indicano che fattori solubili sintetizzati e secreti dalle hAMSC sono in parte responsabili delle loro proprietà. Sebbene non siano stati completamente identificati, tra questi fattori sono stati studiati la prostaglandina E2, che inibisce la proliferazione delle cellule T (Rossi *et al.*, 2012), e la proteina TSG-6, che sopprime la produzione delle *neutrophil-extracellular traps*, le quali, se prodotte in eccesso, fanno parte della patogenesi di molte malattie infiammatorie locali e sistemiche (Magaña-Guerrero *et al.*, 2017).

A livello delle patologie dell'apparato respiratorio, le hAMSC si sono rivelate molto interessanti nei confronti di malattie infiammatorie croniche quali la fibrosi polmonare in modelli *in vivo* (Carbone *et al.*, 2014). Gli studi del gruppo della dott.ssa Parolini (2009) hanno evidenziato chiaramente una diminuzione dell'infiltrato neutrofilico polmonare ed una drastica riduzione della deposizione di collagene in un modello di fibrosi polmonare indotta dalla belomicina. Più recentemente, lo stesso gruppo ha mostrato come la somministrazione intratracheale di hAMSC nel modello della fibrosi indotta dalla belomicina abbia aumentato la produzione di cellule T regolatorie e la polarizzazione di macrofagi verso il fenotipo anti-infiammatorio M2, ridotto l'attività di presentazione dell'antigene dei macrofagi e delle cellule dendritiche, nonché dell'infiltrazione polmonare di cellule B, riducendo anche la formazione ed espansione di aggregati linfoidi intrapolmonari (Cargnoni *et al.*, 2020).

Poiché la membrana amniotica viene scartata dopo il parto, è facile ottenerla senza danneggiare la madre o il bambino e in tal modo si superano i problemi etici connessi all'uso delle cellule staminali embrionali. Basandosi su queste

considerazioni e le evidenze sperimentali prima citate, sulle proprietà immunomodulanti, anti-infiammatorie, anti-fibrotiche e di aumento delle capacità riparative delle ferite, le hAMSC appaiono una fonte molto promettente di terapia cellulare nei riguardi della FC.

1.3. COMUNICAZIONE INTERCELLULARE E GAP JUNCTIONS

In un organismo multicellulare, le diverse cellule comunicano continuamente e rapidamente tra loro mediante segnali fisiologici o messaggi che permettono di armonizzare la loro attività, al fine di garantire e di coordinare tutte le funzioni dell'intero organismo. La possibilità di scambiare segnali è relativamente semplice negli organismi costituiti solo da poche unità cellulari, poiché esse si trovano in contiguità oppure in vicinanza tra loro; diviene, però, sempre più difficile e tale da richiedere meccanismi gradualmente più complessi, negli organismi più evoluti, in cui, accanto alla dimensione corporea, si accresce anche la specializzazione funzionale delle cellule, che si organizzano in sistemi ed apparati.

Gli organismi hanno evoluto diverse strategie che permettono la comunicazione tra cellule fondamentalmente riconducibili a due modalità generali:

1. Comunicazione Elettrica: mediante variazione del potenziale di membrana;
2. Comunicazione Chimica: mediante molecole chimiche secrete nel fluido extracellulare.

Al fine di rendere la comunicazione intercellulare il più possibile rapida ed efficace spesso vengono usati contemporaneamente segnali elettrici e chimici per trasferire l'informazione da una cellula all'altra, anche se i segnali chimici sono maggiormente responsabili della comunicazione fra le cellule dell'organismo.

Tra questi ci sono interazioni a lunga distanza, mediate da meccanismi endocrini o neurali e interazioni a breve distanza, che includono segnali paracrini e contatti fisici diretti o contatti cellula-cellula. La comunicazione diretta coinvolge la trasmissione da

cellula a cellula di molecole attraverso canali che formano una struttura specializzata sulla superficie di membrana, le *gap junctions (GJ)* o giunzioni comunicanti.

La comunicazione intercellulare mediata da GJ gioca un ruolo importante in una varietà di processi cellulari inclusi l'omeostasi, la morfogenesi, la proliferazione e il differenziamento cellulare, lo sviluppo embriogenico.

Si tratta di canali proteici transmembrana che servono per connettere in modo diretto i citoplasmi di cellule vicine (Fig. 14): differiscono da altri canali di membrana in quanto sono presenti tra due cellule, sono relativamente non specifici e il movimento delle molecole si verifica per diffusione passiva (Kumar and Gilula, 1996).

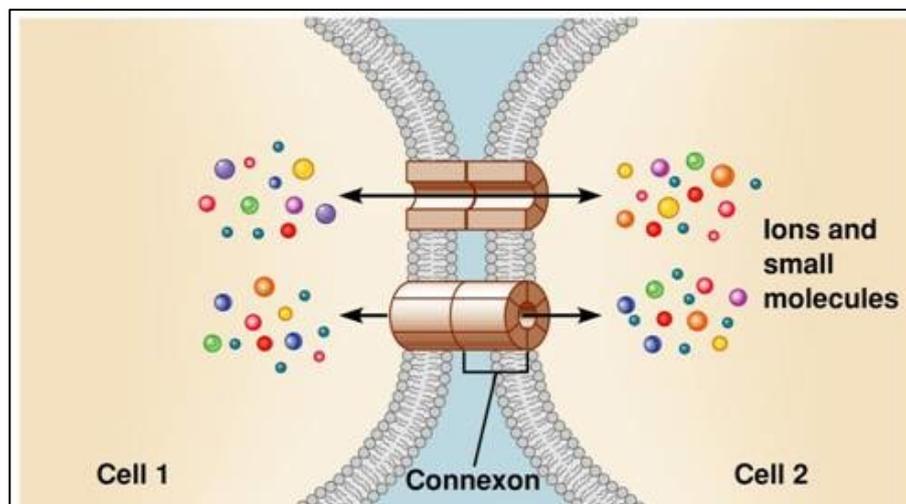


Figura 14. Giunzioni comunicanti tra due cellule vicine consentono il passaggio di ioni e piccole molecole. Da Pearson Education, Inc 2011.

Le GJ rappresentano l'unico modo tramite il quale i segnali possono passare direttamente da una cellula all'altra, non sono canali permanenti e neppure di lunga durata, ma sono costantemente smontati e ricostituiti.

Quando questi canali proteici sono "aperti" le cellule adiacenti sono connesse tra loro mediante un ponte citoplasmatico che consente un "accoppiamento elettrico e

metabolico”: per questa ragione, gli aggregati cellulari si comportano come un “sincizio funzionale”, cioè come una singola cellula che contiene molteplici nuclei.

Nei mammiferi, le GJ sono presenti praticamente in tutti i tipi cellulari, fra cui le cellule muscolari cardiache, le cellule muscolari lisce dell'apparato gastro-enterico, le cellule polmonari, le cellule epatiche, le cellule epiteliali, le cellule nervose. I canali hanno diametro di 1,5nm e presentano un'apparente selettività, basata principalmente sulle dimensioni molecolari. È consentito lo scambio di metaboliti a basso peso molecolare, più piccoli di 100Da, tra cui ioni, aminoacidi, nucleotidi, ma anche secondi messaggeri, come calcio, cAMP, glucosio, ATP, IP3. È invece escluso il passaggio di macromolecole sebbene piccoli RNA possano passare (Solanand Lampe, 2014).

Le GJ mostrano una gerarchia nell'assemblaggio. La principale componente strutturale è costituita dalle connessine. Sei di queste proteine si uniscono a formare unità strutturali di base, i connessioni, che presentano una struttura a ciambella, detta emicanale. Tale struttura esamerica è, poi, inserita nella membrana esterna della cellula, dove può interagire con un emicanale di una cellula adiacente. Quando le connessine dei due emicanali accostati interagiscono, formano un poro continuo che collega le due cellule mettendo il citoplasma dell'una in comunicazione con quello dell'altra (Fig. 15). Le proprietà delle GJ sono, quindi, definiti dalle connessine.

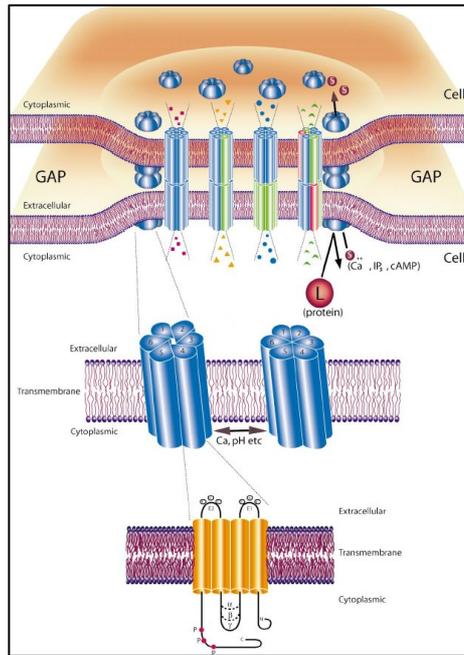


Figura 15. Assemblaggio delle 6 connesine a formare emicanali, i connessioni, che sono alla base della formazione di *gap junctions* tra cellule adiacenti. Da Marwan E El-Sabban *et al.*, 2003.

Queste proteine sono altamente omologhe e mostrano caratteristiche strutturali simili, come la regione amino terminale citoplasmatica, quattro domini transmembrana (M1-M4), due *loop* extracellulari (E1 ed E2) e una coda citoplasmatica carbossiterminale di lunghezza variabile. (Fig. 16).

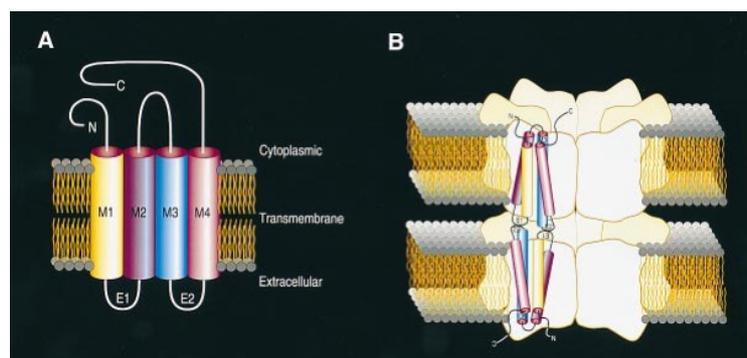


Figura 16. (A) Modello topologico molecolare per le connesine. I cilindri rappresentano i domini transmembrana (M1-M4). I loop tra il primo e il secondo dominio transmembrana, così come quelli tra il terzo e quarto, sono extracellulari (E1 ed E2, rispettivamente). (B) Modello di domini transmembrana di sei subunità di connessina in un arrangiamento oligomero per formare lo spazio idrofobico (poro) del canale della GJ. Tratto da Nalin *et al.*, 1996.

Uno dei domini transmembrana, M3, ha un carattere anfipatico, suggerendo che esso contribuisce al rivestimento del canale. I due *loop* extracellulari E1 ed E2 sembra siano coinvolti nell'avvio delle interazioni tra connessioni in cellule adiacenti. In ognuno è presente un set di tre residui di cisteina con un caratteristico riarrangiamento tipico delle connessine che aiuta a mantenere una rigida struttura terziaria che abilita due connessioni opposti ad ancorarsi l'uno all'altro.

Comparazioni tra sequenze amminoacidiche di diversi membri della famiglia delle connessine evidenziano che le due aree di maggiore divergenza sono i *loop* intracellulari che connettono il secondo e il terzo segmento trans membrana, M2 ed M3 e l'estremità C-terminale. Per questo motivo si pensa che siano questi domini a mediare proprietà specifiche per il tipo di connessina, quali fosforilazione, risposta a stimoli di apertura, così come assemblaggio e *turnover* di membrana.

La connessina 43, Cx43, è la più diffusa della famiglia delle connessine e si trova in molti organi e tessuti tra cui pelle, cuore, cervello, polmoni ed ossa. Come le altre connessine, è composta da quattro segmenti transmembrana che ancorano la proteina alla membrana cellulare. La coda della proteina, situata all'interno della cellula, contiene vari elementi che sono coinvolti nella regolazione dell'attività della proteina e del suo assemblaggio in canali e giunzioni. Due porzioni curve, formate dalla catena proteica che attraversa più volte la membrana, sporgono nello spazio tra le cellule. Gli anticorpi che riconoscono la Cx43 si legano alle porzioni curve.

1.3.1. *Gap junctions* e Fibrosi Cistica

La proteina CFTR fa parte di un complesso macromolecolare in cui sono presenti proteine *scaffold* (tra cui NHERF1) e proteine coinvolte nella trasduzione del segnale (Guggino *and* Stanton, 2006). Tale complesso è necessario per mantenerla nella sua

appropriata localizzazione di membrana e per garantire la sua funzionalità, in quanto sono reclutate a questo livello anche le protein chinasi coinvolte nella sua attivazione. La sovraespressione di NHERF1 in cellule epiteliali respiratorie immortalizzate omozigoti per la mutazione *F508del* (CFBE14o-) determina un recupero della corretta riorganizzazione del citoscheletro di actina (Favia *et al.*, 2010).

Nelle cellule epiteliali respiratorie FC, alcuni studi hanno anche riportato un'alterazione delle giunzioni strette (*tight junctions*, TJ), ovvero una perdita dell'integrità epiteliale. La corretta espressione di NHERF1 e/o di CFTR sulla membrana porta anche ad un recupero della formazione delle giunzioni strette (Castellani *et al.*, 2012), indicando il ruolo della CFTR e delle proteine associate nel mantenimento di una normale fisiologia cellulare.

Alcuni studi hanno suggerito, inoltre, che la proteina CFTR possa regolare le giunzioni comunicanti nell'ambito degli epitelii (Chanson *et al.*, 2007). Anche se il quadro completo non è completamente chiaro, è stato ipotizzato che CFTR possa influenzare indirettamente la funzionalità delle GJ attraverso il complesso macromolecolare di cui fa parte e, quindi, attraverso l'attivazione del proto-oncogene *Src*. È noto, del resto, che *Src* è difettivo nelle cellule con fibrosi cistica (Huang *et al.*, 2003).

È stato, inoltre, dimostrato che Cx43 non è appropriatamente trasportato in membrana in cellule epiteliali respiratorie omozigoti per la mutazione *F508del* e che l'alterato *trafficking* può essere recuperato mediante trattamento con 4-fenilbutirrato (4-PBA), un attivatore della trascrizione. Le cellule trattate con 4-PBA mostrano anche un aumento della corrente del cloro legata alla proteina CFTR (Molina *et al.*, 2015).

1.4. micro RNA E FIBROSI CISTICA

I micro RNA (*miRNA*) rappresentano una classe di biomolecole regolatorie, si tratta di un gruppo di piccoli RNA non codificanti a singolo filamento identificati in molti microrganismi. Sono formati da 18-22 nucleotidi ed hanno origine da un gene che trascrive un *miRNA* primario (*pri-miRNA*), il quale viene processato a formare un *pre-miRNA* composto da un singolo filamento di RNA con una struttura secondaria ad ansa. Dopo che il *pre-miRNA* viene esportato dal nucleo nel citoplasma, l'enzima *Dicer* lo taglia per formare i *miRNA* maturi a doppio filamento. Successivamente, i due filamenti si separano e vengono incorporati in un complesso multiproteico chiamato *RISC* (*RNA-induced silencing complex*). Nel *RISC*, l'*mRNA target* viene degradato o viene repressa la sua traduzione, in entrambi i casi si ha un silenziamento post-trascrizionale (Fig. 17).

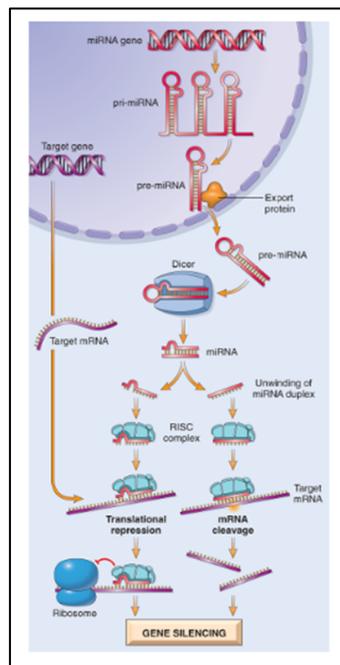


Figura 17. Generazione dei *miRNA* e loro meccanismo d'azione. Da Robbins e Cotran, Elsevier, 2014.

Sebbene il loro meccanismo d'azione sia abbastanza conosciuto, la funzione di molti *miRNA* non è ancora nota, per alcuni è stata provata la partecipazione a processi

fisiologici come proliferazione cellulare, differenziamento, apoptosi, o patologici come l'oncogenesi (Peltier *and* Latham, 2008). Essi possono essere deregolati in molte malattie umane, tra cui il cancro, il diabete, le infezioni virali, malattie legate al sistema immunitario, malattie cardiovascolari e malattie neurodegenerative (Li Y *et al.*, 2012; Huang, 2017).

I *miRNA* possono essere scambiati tra le cellule attraverso le GJ (Lemcke *et al.*, 2015). Questo è stato dimostrato, per esempio, nella comunicazione tra astrociti e cellule di glioma con trasferimento di *miR-4519* and *miR-5096* (Hong *et al.*, 2015). Anche le MSC possono trasferire i *miR-124* and *miR-145 mimics* alle cellule di glioma U87 in co-cultura attraverso le GJ (Lee *et al.*, 2013).

È dimostrato che i *miRNA* svolgono un ruolo importante nello sviluppo polmonare e in diversi aspetti della biologia polmonare, ma la loro azione negli epitelii delle vie aeree e nella regolazione del trasporto dei fluidi e degli elettroliti non è ben compresa, così come ancora tanto resta da chiarire relativamente al ruolo che i *miRNA* possano svolgere nella FC, anche se alcuni dati mostrano una loro disregolazione nella FC polmonare ed un loro legame con l'infiammazione e le infezioni respiratorie (McKiernan *et al.*, 2015).

Nel 2012 studi condotti da Ramachandran e colleghi hanno evidenziato che *miRNA-138* regola l'espressione di CFTR attraverso le sue interazioni con la proteina regolatrice *SIN3A*. Inoltre il trattamento degli epitelii delle vie aeree con un *mimic* del *miRNA-138* aumentava l'mRNA di CFTR e i livelli di espressione della proteina, migliorando anche la permeabilità transepiteliale del cloro, mentre effetti opposti si notavano usando un anti-*miR* *miR-138*, sottolineando, in modo importante, che *miR-138* altera l'espressione di molti geni codificanti proteine associate con CFTR che possono influenzarne la biosintesi.

2. SCOPO DELLO STUDIO

La disponibilità di hAMSC e il venir meno delle preoccupazioni etiche legate a questa sorgente di cellule staminali ne favoriscono l'accettazione e l'ampio utilizzo, soprattutto in malattie come la FC in cui non esiste una cura unica e definitiva a disposizione dei pazienti, ci sono diverse opzioni terapeutiche ma non valide per tutti.

Il grande potenziale di queste cellule per il trattamento della FC è dovuto alle loro numerose proprietà, tra cui la più importante è sicuramente la capacità di transdifferenziazione in cellule epiteliali.

Cellule bronchiali immortalizzate omozigoti per la mutazione *F508del* (CFBE14o-), in co-coltura con le hAMSC, possono acquisire l'espressione del CFTR a livello dell'mRNA e della proteina, un effetto probabilmente indotto dal contatto con le cellule FC (Conese *et al.*, 2014; Paracchini *et al.*, 2012). Inoltre possono recuperare difetti di base legati alla patologia quali l'aumento dell'attività del canale CFTR, la riorganizzazione del citoscheletro di actina e delle giunzioni strette (Carbone *et al.*, 2014).

Alla luce di quanto detto, scopo di questa tesi è stato quello di dimostrare che le hAMSC favoriscono la correzione dei sopra citati difetti di base della FC, quando coltivate insieme a cellule CFBE14o- grazie al determinante ruolo svolto dalla comunicazione intercellulare mediata dalle GJ.

Dal momento che la rigenerazione e la riparazione dell'epitelio respiratorio fibrocistico sono difettivi, ulteriore scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di dimostrare che le cellule hAMSC, aggiunte su una ferita simulata su cellule CFBE (così da ricreare in modo verosimile ciò che avviene sull'epitelio respiratorio in un paziente con FC), sono in grado di velocizzare la riparazione delle ferite stesse.

3. MATERIALI E METODI

3.1. ISOLAMENTO E COLTURA DELLE hAMSC

Le hAMSC sono state isolate da placenta a termine previo consenso informato della madre. Sono state escluse dallo studio le placente delle partorienti risultate positive ad infezioni patogene, incluse le infezioni da HBV, HCV e HIV. Tutte le procedure sono state eseguite secondo i protocolli della Dichiarazione di Helsinki.

La placenta, collezionata in sala parto, è stata trasportata in laboratorio all'interno di un contenitore sterile e appoggiata con la faccia materna (quella ruvida) su un foglio di carta, e la superficie liscia e lucida (parte fetale), dalla quale si diparte il cordone ombelicale, rivolta verso l'alto (Fig. 18A). Dopo aver staccato il cordone ombelicale, partendo dal punto in cui era inserito, è stata praticata un'incisione a forma di X al fine di separare la membrana amniotica dal corion sottostante, e quindi dalla placenta, sollevandola con una pinza dal punto centrale dell'incisione (Fig. 18B).

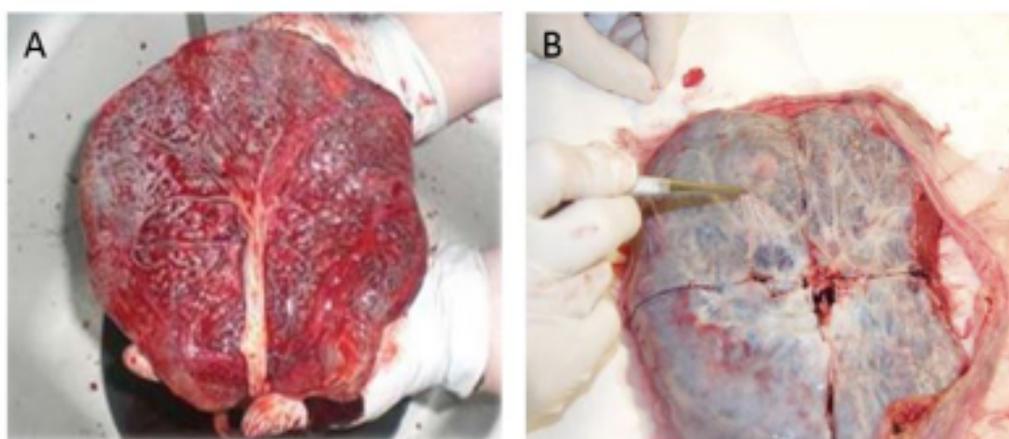


Figura 18. Prelievo della membrana amniotica: parte fetale della placenta rivolta verso l'alto (A); incisione a X per facilitare il distacco dell'amnios dal corion sottostante (B).

Una volta prelevato, l'amnios è stato posto in un contenitore sterile contenente *Hank's Balanced Salt Solution* senza calcio e magnesio (CMF-HBSS, Lonza) e processato sotto una cappa biologica a flusso laminare in condizioni di sterilità, per rimuovere prima lo strato di cellule epiteliali e poi per digerire e raccogliere le hAMSC.

Nello specifico, la membrana amniotica è stata tagliata in pezzi e lavata diverse volte passandola in tubi puliti da centrifuga da 50 ml contenenti HBSS fresco, per rimuovere gli accumuli di sangue più grossolani ed ottenere, così, una membrana amniotica il più possibile priva di coaguli di sangue. Successivamente, la membrana è stata trasferita in un nuovo tubo da 50 ml e incubata in una soluzione preriscaldata di 0.05% Tripsina/0.01% *Ethylen Diamine Tetracetic Acid* (Tripsina-EDTA Sigma), in continua agitazione. Dopo 5 minuti, la membrana è stata sgocciolata e trasferita in un nuovo tubo contenente una soluzione di tripsina/EDTA ed è stata incubata per 10 minuti a 37°C-5% CO₂. Successivamente sono state effettuate altre due incubazioni della membrana, della durata di 40 minuti ciascuna, utilizzando sempre tripsina/EDTA fresca e tubi nuovi, agitando dopo i primi 20-30 minuti. La membrana sgocciolata è stata trasferita in un nuovo tubo da centrifuga da 50 ml in cui è stata aggiunta, fino a riempimento del tubo, la *Digestion Solution* costituita da 100 ml di *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Invitrogen), 1 mg/ml di Collagenasi IV e 25 µg/ml DNase I (Sigma) ed è poi stata incubata a 37 °C-5% CO₂, in agitazione e sotto controllo costante, fino a completa dissoluzione della membrana (circa 1 ora). Infine, il digerito è stato diviso in due nuovi tubi e, dopo aver aggiunto HBSS freddo in ugual volume rispetto al digerito, è stato centrifugato per 5 minuti a 200 x g, a 4°C. Dopo aver scartato il surnatante, il *pellet*, costituito dalle hAMSC, è stato lavato con HBSS fresco, centrifugato nuovamente per 5 minuti a 200 x g a 4°C, risospeso in terreno di coltura per poi contare le cellule utilizzando una camera di Burkner.

Le cellule sono state piastrate alla densità di 1×10^5 cellule/cm² in un terreno di coltura composto da ADVANCED DMEM con l'aggiunta di 10% (v/v) di siero fetale bovino inattivato al calore (FBS), 55 µM di β- mercaptoetanolo, 1% di L-glutamina, 1% soluzione antibiotica penicillina/streptomicina e 10 ng/ml di *epidermal growth factor*

(EGF) (tutto da Invitrogen). Il terreno di coltura è stato cambiato poche ore dopo aver piastrato le cellule, in modo da rimuovere un'eventuale contaminazione da cellule epiteliali e, successivamente, ogni due giorni.

3.2. CINETICA DI CRESCITA, MORFOLOGIA E FENOTIPO DELLE hAMSC

La cinetica di crescita delle hAMSC è stata valutata calcolando il tempo di duplicazione delle cellule dal Tempo zero (T0) al IV passaggio, partendo da una concentrazione iniziale di 1×10^5 cellule piastrate, corrispondente al T0 e, ogni volta che le cellule raggiungevano l'80% di confluenza, staccandole e contandole. Tutti i dati sono stati elaborati utilizzando il sito <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

Per determinare il fenotipo di linea mesenchimale è stata utilizzata la citometria a flusso, per fenotipizzare le cellule ad ogni passaggio (T0-V) in base agli antigeni di membrana da queste espressi. Le cellule isolate sono state staccate dalle *flask*, usando una soluzione di *Accutase* (Invitrogen), lavate e incubate per 20 minuti a 4°C in *Phosphate Buffer Saline* (PBS) contenente FBS al 4%; questo passaggio consente di bloccare i siti aspecifici sulla membrana delle cellule. Ogni campione contenente circa 10^5 cellule è stato poi marcato, incubandolo per 30 minuti a 4°C, con anticorpi monoclonali diretti contro CD14, CD29, CD34, CD45, CD73 e CD105, tutti coniugati a loro volta ad un fluorocromo, la fluoresceina isotiocianato (FITC), tranne l'anticorpo CD73, per il quale è stata effettuata una seconda marcatura dei campioni, incubandoli per 30 minuti con un anticorpo secondario coniugato ad un fluoroforo FITC (FITC *goat anti-mouse*; Sigma-Aldrich). In parallelo, sono stati inoltre preparati diversi controlli negativi, costituiti dagli stessi campioni di cellule ai vari passaggi, non marcati con gli anticorpi. I campioni

cellulari non sono stati lisati e/o fissati al fine di evitare alterazioni cellulari e, quindi, cambiamenti del fenotipo di linea. Dopo la marcatura, le cellule sono state analizzate al citofluorimetro *Amnis FlowsightIS100* (Millipore), supportato da un software per l'analisi dei parametri citofluorimetrici. La percentuale di cellule positive, così come l'intensità di fluorescenza media, è stata determinata dopo aver sottratto la fluorescenza delle cellule controllo non marcate oppure, nel caso dell'anticorpo contro CD73, marcate utilizzando solo l'anticorpo secondario.

3.3. CO-COLTURE DI CELLULE hAMSC E CFBE41o-

16HBE14o- e CFBE41o- sono linee cellulari epiteliali bronchiali umane immortalizzate, rispettivamente *wild type* ed omozigoti per l'allele *F508del*, cresciute in *Minimum Essential Medium* (MEM), 10% FBS, 1% di penicillina, 1% di streptomina e 1% di L-glutamina (tutto da Invitrogen).

Le cellule hAMSC al secondo passaggio sono state co-coltivate con le cellule CFBE in rapporto 1:5 nel numero di 1×10^5 cellule finali, di cui 2×10^4 hAMSC e 8×10^4 CFBE. Per ottenere co-culture polarizzate e mimare così la crescita delle cellule dell'epitelio respiratorio, le cellule sono state seminate su filtri *transwell* del diametro di 6.5 mm e pori di dimensione di $0.4 \mu\text{m}$ (Corning) (Fig. 19).

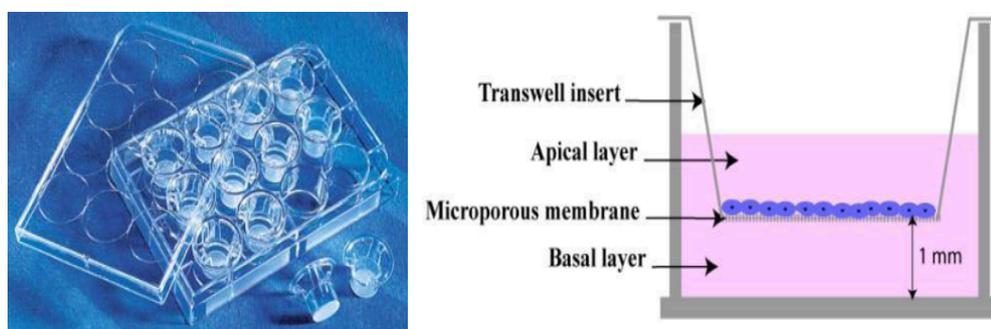


Figura 19. *Transwell* utilizzati per le co-culture (a sinistra) e schema riguardante la polarizzazione delle cellule cresciute sui *transwell* (a destra).

Prima della semina delle cellule, i filtri sono stati trattati, per almeno 30 minuti a 37°C-5% CO₂, con circa 100µl di una soluzione di *coating* così costituita:

- ✓ 10 µg/mL di fibronectina (BD Biosciences);
- ✓ 10 µg/mL di collagene bovino di tipo I (BD Biosciences);
- ✓ 100 µg/mL di albumina da siero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich);
- ✓ MEM, a un volume finale di 10 ml (Sigma-Aldrich).

La soluzione di *coating* serve a creare un rivestimento sul fondo del filtro che facilita l'adesione delle cellule.

Ogni esperimento è stato affiancato da pozzetti di cellule controllo, quali le hAMSC e le CFBE seminate sul filtro da sole alla concentrazione di 2.5×10^4 e 1×10^5 per filtro, rispettivamente. Le cellule seminate in co-coltura sul filtro del *transwell* sono state mantenute nel terreno di coltura cellulare delle CFBE e incubate a 37°C-5% CO₂ per 6 giorni, cambiando il terreno di coltura tutti i giorni sia sul lato apicale che sul lato basale.

3.4. TRASFEZIONE CON *si*RNA GAPDH FLUORESCENTE

Per valutare preliminarmente l'efficienza d'internalizzazione di *si*RNA, le linee cellulari hAMSC e CFBE, da sole e in co-coltura (in rapporto 1:5), sono state transfettate con *si*RNA GAPDH fluorescente alla concentrazione di 30 nM. Per favorire la trasfezione, il *si*RNA è stato complessato con un polimero cationico, la polietilenimina (PEI) 25 K 10 nM (rapporto N/P uguale a 7). Dopo 30 minuti a 37°C, ai complessi *si*RNA/PEI è stato aggiunto l'Opti-MEM (Life Technologies, Milano, Italia), un terreno specifico per la trasfezione perché povero di FBS.

In particolare, la soluzione PEI 10 nM (1,5 µl)-H₂O (23,5 µl) è stata aggiunta alla

soluzione *siRNA* 10 μM (1,5 μl)- H_2O (23,5 μl) e incubata per almeno 20 minuti a temperatura ambiente. Il complesso *siRNA*-PEI è stato poi portato al volume di 250 μl con Opti-MEM contenente soluzione antibiotica penicillina/streptomicina all'1%; infine, la soluzione di trasfezione ottenuta è stata utilizzata per risospendere e piastrare le cellule sui *transwell*, trattati con la soluzione di *coating*. Dopo una incubazione a 37°C -5% CO_2 *overnight* delle piastre è stato rimosso il terreno di trasfezione per procedere con l'analisi citofluorimetrica, al fine di rilevare l'emissione di fluorescenza associata al *siRNA* GAPDH.

Prima dell'analisi citofluorimetrica, le cellule transfettate con *siRNA*-PEI sono state lavate per due volte con circa 200 μl di PBS (Invitrogen), per il secondo lavaggio è stato utilizzato PBS 0,04% *Trypan Blue* (Invitrogen) che permette di spegnere la fluorescenza esterna alla cellula e valutare solo quella interna ad essa, direttamente riconducibile alla fluorescenza emessa dal *siRNA* che è stato internalizzato dalle cellule. Infine, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200 μl di Tripsina-EDTA (Sigma) e la piastra è stata incubata per qualche minuto a 37°C per staccare le cellule. Successivamente sono stati aggiunti 300 μl di MEM completo per bloccare l'azione della tripsina, sono state raccolte le sospensioni cellulari da ogni pozzetto, messe in tubi *ependorf* e centrifugate a 1300 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo la centrifugazione è stato scartato il surnatante e il *pellet* è stato risospeso in 500 μl di PBS. Le sospensioni, mantenute in ghiaccio, sono state analizzate al citofluorimetro *Amnis FlowsightIS100* (Millipore), supportato da un software per l'analisi dei parametri citofluorimetrici.

La percentuale di cellule positive, così come l'intensità di fluorescenza media, sono state determinate dopo aver sottratto la fluorescenza delle cellule controllo non trattate con *Trypan Blue*.

3.5. TRASFUZIONE CON *siRNA* CONTRO Cx43

Le colture cellulari (hAMSC e CFBE) e le co-culture in rapporto 1:5 sono state trasfettate con *siRNA*Cx43, ossia un *siRNA* in grado di inibire l'espressione della Cx43 a livello dell'mRNA. La trasfezione è stata condotta come descritto precedentemente per l'esperimento preliminare con il *siRNA* GAPDH fluorescente.

I complessi *siRNA* Cx43/PEI, preparati utilizzando gli stessi volumi riportati sopra, sono stati incubati per almeno 20 minuti a temperatura ambiente e poi portati a volume di 250 µl con Opti-MEM+P/S. Prima della semina delle cellule, i *transwell* sono stati trattati con 100 µl della soluzione di *coating* (per almeno 30 minuti a 37 °C-5% CO₂) in modo da favorire l'adesione delle cellule al filtro.

Infine, le cellule hAMSC (2,5x10⁴ cellule finali), le cellule CFBE (1x10⁵ cellule finali) e le co-culture in rapporto 1:5 (1x10⁵ cellule finali di cui 2x10⁴ cellule hAMSC e 8x10⁴ cellule CFBE) sono state piastrate sui rispettivi *transwell* da cui è stata rimossa la soluzione di *coating* e sostituita con 250 µl di soluzione di trasfezione (complesso *siRNA*/PEI con Opti-MEM+P/S). Nei pozzetti controllo, invece, sono stati aliquotati 250 µl di Opti-MEM+P/S senza *siRNA*. Nella parte basale del pozzetto su cui è alloggiato il *transwell* sono stati aggiunti 500 µl di MEM completo. La piastra è stata incubata a 37°C -5% CO₂ *overnight*. Il giorno successivo è stato rimosso il terreno di trasfezione e sostituito con 250 µl di terreno MEM completo. Infine la piastra è stata incubata a 37°C-5% CO₂ per sei giorni.

3.5.1. Analisi dell'espressione di Cx43 con *Real-Time* PCR

Per valutare se la Cx43, componente fondamentale delle GJ, viene espressa a livello di RNA messaggero, è stata messa a punto una *Real Time* PCR basata su *SYBR*[®] *Green* usando un metodo comparativo (su Mx3005P Stratagene).

La β - actina, gene *house-keeping*, è stata usata come controllo endogeno (normalizzatore).

L'RNA totale è stato estratto da cellule appena isolate e cellule in coltura con Reagente TRIzol[®] (Invitrogen), seguendo il protocollo del produttore. Ogni μ g di RNA è stato retro-trascritto in un primo filamento di cDNA con un kit di retrotrascrizione di cDNA ad alta capacità (Applied Biosystem) usando *primer random* seguendo le istruzioni del produttore.

La PCR è stata impostata in triplicato su un volume totale di 25 μ l per pozzetto.

Ogni miscela di reazione contiene:

- 12,5 μ l di *Brilliant SYBR*[®] *Green QPCR Master Mix* da Stratagene, incluso *Sure Start Taq* DNA polimerasi, una miscela di dNTP e *SYBR Green*, MgCl₂ (2,5 mM);
- 0,1 μ l di *primer reverse e forward* (concentrazione finale: 200 nM);
- 0,375 μ l di colorante di riferimento diluito (concentrazione finale: 30 nM);
- 1 μ l di cDNA;
- 10,925 μ l di H₂O.

Il ciclo di reazioni comprende uno *step* di attivazione iniziale a 95°C per 10 minuti seguito da 40 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi, *annealing* a 57°C per 1 minuto ed allungamento a 72°C per 30 secondi. Le sequenze dei primer di amplificazione (Invitrogen) sono di seguito riportate:

Cx43 F: TCGGGTTAAGGGAAAGAG

Cx43 R: GCTCACTTGCTTGCTTGT

3.5.2. Immunofluorescenza ed analisi confocale per valutare la localizzazione della Cx43

Le cellule cresciute sui filtri, in co-cultura e non, sono state lavate tre volte in PBS e poi fissate 5 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di fissaggio costituita da PBS con l'aggiunta di PFA (Paraformaldeide) al 3% e saccarosio al 2%. Dopo ulteriori tre lavaggi in PBS, le cellule sono state permeabilizzate, 5 minuti a temperatura ambiente, con *HEPES TRITON BUFFER* costituito da:

- HEPES pH 7.4 (20 mM)
- Saccarosio (300 mM)
- NaCl (50 mM)
- MgCl₂ (3mM)
- Triton X-100 (0.5 %)

portati al volume di 10 ml con H₂O distillata.

Le cellule sono state lavate tre volte in PBS 0,2% BSA e poi incubate in PBS 2% BSA 2% FBS per 15 minuti a 37°C per bloccare i siti aspecifici. Per la marcatura, le cellule sono state incubate per 30 minuti a 37°C con anticorpo anti- *Cx43* coniugato a FITC, diluito 1:100 in PBS 2% BSA. Infine i filtri sono stati lavati per due volte con PBS 0,2% BSA, marcati con DAPI per evidenziare i nuclei, lavati ulteriormente con PBS 0,2% BSA, staccati e posizionati su un vetrino, con la parte del filtro su cui sono presenti le cellule disposta verso l'alto e coperta da un vetrino copri oggetto. Le cellule sono state analizzate usando un microscopio Nikon TE2000 accoppiato ad un sistema di microscopia confocale

dual-laser Radiance 2100 (Bio-Rad). I campioni sono stati osservati con un obiettivo 60x ad immersione in olio. Le immagini digitali sono state processate usando il programma *Laser Sharp2000* (Bio-Rad).

3.5.3. Luciferase Yellow Assay

Il *Luciferase Yellow (LY) Assay* è stato condotto sulle cellule hAMSC, CFBE e sulle co-culture 1:5, trasfettate con e senza *siRNACx43*, e consiste in iniezioni intracellulari, per mezzo di microiniettori, del colorante fluorescente giallo LY.

Tale saggio è stato condotto sei giorni dopo la trasfezione con *siRNACx43*. Dopo rimozione del terreno e lavaggio con PBS, i filtri sono stati opportunamente staccati dal *transwell* e posizionati su una piastra Petri con la parte del filtro su cui sono cresciute le cellule rivolta verso l'alto. Le microiniezioni di LY (Life Technologies) sono state effettuate utilizzando il micromanipolatore 5171 e il trans-iniettore 5246 (Eppendorf) in condizioni di lavoro il più possibile prive di luce. Per ogni filtro sono state effettuate un numero pari a 4 microiniezioni e dopo dieci minuti al buio, per favorire l'azione della LY, le cellule sul filtro sono state lavate con PBS e fissate con PFA al 4% in PBS per essere osservate al microscopio a fluorescenza.

3.5.4. Misure spettrofluorimetriche di Efflusso di Cloro

L'attività della proteina canale CFTR PKA-dipendente è stata analizzata mediante misure spettrofluorimetriche di efflusso di cloro cAMP-dipendente in presenza di un indicatore di fluorescenza sensibile alla concentrazione di cloro intracellulare, il MQAE [1-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxy-quinolinium bromide]; tale indicatore lega gli ioni cloro e induce un certo grado di *quenching* (o smorzamento) della fluorescenza; di

conseguenza l'intensità di fluorescenza emessa da MQAE aumenta al diminuire della concentrazione di ioni cloro.

Dopo sei giorni di co-coltura su filtri permeabili, le cellule sono state incubate *overnight* a 37°C - 5% di CO₂ in medium contenente MQAE 5mM.

Il giorno seguente il filtro è stato tagliato e posto in una cuvetta che permette la perfusione indipendente dal lato apicale e basolaterale delle cellule; le soluzioni perfondenti, mantenute a 37°C, vengono poste in alto in modo da arrivare sulle cellule per gravità; la cuvetta viene infine alloggiata nello spettrofluorimetro (Varian Cary Eclipse) che misura le variazioni di fluorescenza ogni 4 secondi. Per le misure di fluorescenza il preparato è stato eccitato alla lunghezza d'onda di 360 nm, mentre l'emissione era settata alla lunghezza d'onda di 450 nm.

L'esperimento è stato avviato perfondendo le cellule, sia dal lato apicale che basolaterale, con una soluzione salina a pH e concentrazioni fisiologiche di cloruro di sodio (Ringer NaCl). Raggiunto un valore stabile di fluorescenza si aggiunge basolateralmente Bumetanide 5 µM, un inibitore del cotrasportatore Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (Fan et al, 1992) che blocca l'ingresso di cloro dal lato basolaterale permettendo di osservare solo variazioni di fluorescenza a carico dell'efflusso apicale di cloro intracellulare.

In seguito, dal lato apicale il Ringer NaCl è stato sostituito con una soluzione priva di cloro, il Ringer Nitrato, che induce la fuoriuscita dalla cellula di ioni cloro secondo gradiente di concentrazione e, di conseguenza, un innalzamento dei valori di fluorescenza. Questa prima parte dell'esperimento rappresenta la misura massima raggiungibile dell'efflusso (F₀) corrispondente alla concentrazione intracellulare di cloro nulla.

Per ripristinare le condizioni basali di concentrazione di cloro intracellulare e consentire un ritorno della fluorescenza alla situazione iniziale, le cellule sono state

perfuse nuovamente con il Ringer NaCl. Successivamente, per avere la misura del *background* di fluorescenza da sottrarre alle misure di efflusso di cloro descritte di seguito, si perfondono entrambi i lati con la soluzione di isotiocianato di potassio (Ringer KSCN). Gli ioni cianuro hanno un'affinità maggiore per il fluoroforo MQAE rispetto agli ioni cloro, perciò legandosi avidamente ad esso ne schermano la fluorescenza e permettono di definire il valore minimo di fluorescenza (F_{min}), riducendo la variabilità sperimentale.

Per ottenere una misura dell'efflusso di cloro dipendente dal CFTR, le cellule in coltura sono state perfuse dal lato basolaterale con forskolin (FSK) 10 μ M, noto attivatore dell'enzima adenilato ciclasi, per 3 minuti e poi dal lato apicale con Ringer Nitrato. Alla soluzione contenente FSK è stato aggiunto Isobutil Metil Xantina (IBMX) 500 μ M, inibitore delle fosfodiesterasi, necessario per ottenere una stimolazione massimale e costante nel tempo della PKA e per evitare che l'attività fosfodiesterasica intracellulare portasse ad una variazione nel tempo dei livelli di cAMP aumentando la variabilità dell'analisi.

Dopo aver ristabilito le condizioni iniziali perfondendo ancora una volta con il Ringer NaCl e bumetanide dal lato basolaterale e Ringer NaCl dal lato apicale, le cellule sono state trattate apicalmente con un inibitore specifico della CFTR, quale la Glibenclamide 100 μ M (Sheppard et al, 1997) o CFTRinh-172 5 μ M (Ma et al, 2002), 2 minuti prima dell'aggiunta di FSK 10 μ M e IBMX 500 μ M dal lato basolaterale, a cui è seguita la sostituzione del Ringer NaCl con il Ringer Nitrato dal lato apicale. Questa fase dell'esperimento permette la misura dell'efflusso di cloro dipendente dalla CFTR in presenza di inibitori specifici del canale.

L'efflusso di cloro intracellulare è espresso in $\Delta(F/F_0)/\text{min}$, che corrisponde alla pendenza della retta ottenuta mediante l'analisi dei minimi quadrati di 20 valori di fluorescenza presi in sequenza ogni 4 secondi.

La variazione di fluorescenza viene indicata come rapporto F/F_0 dove F_0 è la massima fluorescenza corrispondente a $[Cl^-]_i=0$ e F è la fluorescenza emessa dalle cellule durante l'esperimento, sottratto della F_{min} : questo permette di ridurre il *range* in cui i valori sperimentali possono variare, in tal modo si normalizza il valore di fluorescenza.

3.5.5. Misure di resistenza elettrica trans-epiteliale e permeabilità paracellulare

La resistenza elettrica trans-epiteliale (TER) è stata misurata sulle cellule cresciute sui *transwell* da 6,5 mm, con pori di 0,4 μm (Corning), dopo sei giorni di coltura, tramite un voltmetro corredato di due elettrodi perfettamente inseribili nelle due camere del supporto *transwell*, apicale e basolaterale (Millicell-ERS; Millipore).

La permeabilità paracellulare (pAPP) è stata misurata sulle cellule CFBE e co-culture, cresciute su *transwell* per sei giorni, aggiungendo sul lato apicale un destrano coniugato con FITC (10kDa [10 s]; Sigma-Aldrich). Dopo 20, 40 e 60 minuti la pAPP è stata calcolata misurando la fluorescenza associata al destrano nel medium basale, come descritto da Castellani *et al.* (2012).

3.5.6. Apoptosi e necrosi

Le cellule CFBE e le co-culture, silenziate o meno con *siRNA* Cx43, cresciute per 6 giorni, sono state valutate per l'apoptosi e la necrosi con il kit FlowCollect® Annexin red Kit (Millipore, Billerica, MA, USA), seguendo le indicazioni del produttore e poi analizzate mediante citofluorimetria. Brevemente, le cellule sono state incubate con

Annexin V coniugata al *dye* CF647 (eccitazione: 642 nm; emissione: 670 nm) per 15 min a 37 °C, lavate in *assay* buffer e incubate con 7-aminoactinomycin (7-AAD) (eccitazione: 488 nm; emissione: 642 nm; 5 min). I singoli eventi cellulari sono stati identificati plottando *brightfield aspect ratio vs brightfield area plot*, quindi sono stati acquisiti 20.000 eventi cellulari. Infine, plottando la fluorescenza dell'*Annexin V* (canale 11) vs. la fluorescenza della 7-AAD (canale 5) sono state identificate le seguenti popolazioni: cellule sane: Annexin V (-) e 7-AAD(-); cellule necrotiche: Annexin V(-) e 7-AAD(+); cellule in apoptosi precoce: Annexin V(+) e 7-AAD(-); cellule in apoptosi tardiva; Annexin V(+) e 7-AAD (+).

3.6. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI *micro RNA 138*

Per l'analisi dei livelli di espressione di *miRNA 138*, *miRNA target*, che si suppone passare tra le cellule in co-cultura ed essere responsabile dell'aumento dei livelli di espressione della proteina CFTR, sono state messe a punto una *Real Time PCR* e una *droplet digital PCR* (ddPCR).

Per la valutazione dell'espressione genica di *miRNA-138* mediante *Real Time-PCR* è stato utilizzato un saggio Taqman Advanced *miRNA* (Thermo Fisher) costituito da *primer* e sonde pre-formulate in grado di rilevare e quantificare forme mature di *miRNA*. L'RNA totale è stato estratto dalle cellule in coltura (16HBE, CFBE, hAMSC e co-culture) utilizzando RNeasy Mini kit (Qiagen), seguendo il protocollo del produttore. Ogni ng di RNA è stato retro trascritto in cDNA utilizzando Taqman Advanced *miRNA* cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher) seguendo le istruzioni del produttore.

Il cDNA ottenuto, diluito 1:10 in RNase-free water, è stato amplificato con *Real-time PCR* impostata in triplicato su un volume totale di 20 µl per pozzetto. Ogni miscela di

reazione contiene:

- 10 µl di Taqman Fast Advanced Master Mix (2x)
- 1 µl di Taqman Advanced miRNA Assay (20x)
- 4 µl di RNase-free water.

Il ciclo di reazioni comprende uno *step* di attivazione dell'enzima a 95°C per 20 secondi seguito da 40 cicli di denaturazione (95°C per 3 secondi), *annealing* ed allungamento (60°C per 30 secondi).

I livelli di espressione relativi del *miRNA target* sono stati normalizzati rispetto al *miRNA-16*, utilizzato come *housekeeping*, e calcolati usando il metodo comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Per una quantizzazione assoluta dell'espressione di *miRNA 138*, ovviando così alla necessità di un normalizzatore, sono state eseguite anche analisi di espressione con ddPCR, una buona tecnica per quantificare *miRNA* specifici (Miotto *et al.*, 2014). L'RNA totale, contenente *miRNA*, estratto dalle cellule coltivate (16HBE, CFBE, hAMSC e co-culture) utilizzando RNeasy Mini kit (Qiagen), è stato retrotrascritto utilizzando Taqman MicroRNA RT kit (Thermo Fisher Scientific) specifico per il *miRNA-138*, seguendo le istruzioni del produttore. Il cDNA ottenuto è stato amplificato con una reazione di ddPCR condotta con lo strumento QX200™ Droplet Digital™ PCR System (ddPCR, Bio-Rad).

La mix di reazione in un volume finale di 20 µl contiene:

- 10 µl di ddPCR Supermix for Probes (2x) (Bio-Rad)
- 1 µl di Taqman miRNA Assay (20x) specifica per *miR-138*
- 1,33 µl di cDNA
- 7,67 µl di RNase-free water.

Ai 20 μl di reazione sono stati aggiunti 70 μl di olio generatore di *droplets*, caricati nella cartuccia per la generazione di goccioline ed inseriti nel QX200 *droplet* generator (Bio-Rad) all'interno del quale il campione e l'olio si combinano per formare un'emulsione costituita da circa 20.000 goccioline. L'emulsione così formata (40 μl di volume) è stata poi trasferita in una piastra da 96 pozzetti e amplificata con un ciclo di reazioni costituito da uno *step* di attivazione dell'enzima a 95°C per 20 secondi, seguito da 40 cicli di denaturazione (95°C per 3 secondi), *annealing* ed allungamento (60°C per 30 secondi). Al termine della PCR, la piastra è stata posta all'interno del lettore di *droplet* che analizza individualmente la fluorescenza di ciascuna *droplet*. Le goccioline, che contengono almeno una copia del DNA target, emettono un segnale di fluorescenza rispetto a quelle negative. I dati sono stati analizzati dal software QuantaSoft® (Bio-Rad) che misura il numero di *droplet* positive e negative in ogni campione. Le positive, che contengono i prodotti di amplificazione, sono discriminate dalle negative mediante l'applicazione di una soglia nell'ampiezza di fluorescenza dal software QuantaSoft. La determinazione della concentrazione (copie/ μl) è stata effettuata utilizzando il calcolo di Poisson sulla base del rapporto tra *droplet* positive e negative.

3.7. STUDIO DELLA RIPARAZIONE EPITELIALE

Lo studio della riparazione epiteliale è stato effettuato su cellule 16HBE, sulle CFBE, sulle co-culture in rapporto 1:5 e su cellule CFBE con l'aggiunta successiva di hAMSC, sempre mantenendo il rapporto 1:5. Le cellule sono state piastrate in numero di $7,5 \times 10^4$ per pozzetto in una *multiwell* da 24 pozzetti o 1×10^6 in piastre Petri da 60 mm e, dopo aver raggiunto la confluenza, il danno meccanico è stato effettuato con un puntale da 10 μl . La ferita è stata effettuata sui monostrati e le colture sono state osservate a diversi tempi; precisamente al tempo di partenza (tempo 0), dopo 6, 24 e 48 ore.

Le osservazioni sono state effettuate tramite microscopio Leica con ingrandimento 10X. La successiva analisi delle confluenze è stata effettuata utilizzando il programma ImageJ.

3.7.1. Blocco della proliferazione delle CFBE140-

Il primo metodo utilizzato per bloccare la proliferazione delle CFBE e garantire soltanto la proliferazione delle hAMSC, è stato un metodo chimico mediante demecolcina (più comunemente noto come colcemid). Per scegliere la concentrazione di farmaco che, con il suo effetto antimitotico, potesse essere più adatta a bloccare la proliferazione delle cellule, si è partiti dal valutare l'effetto di basse concentrazioni di colcemid (1 ng/ml, 3ng/ml e 10ng/ml). Le cellule sono state seminate in numero di 3×10^4 in pozzetti da 24 *well* e incubate per 24 h in terreno MEM completo (10% FBS). Il giorno successivo il terreno è stato sostituito con MEM contenente 0,1% di FBS per la *starvation* per altre 24h, in modo da sincronizzare tutte le cellule in coltura allo stesso stadio del ciclo cellulare. Il terreno per la *starvation* è poi stato eliminato e sostituito con MEM completo, con l'aggiunta delle diverse concentrazioni di colcemid da testare al tempo 0, dopo 24 e 48 ore. Ai tempi stabiliti le cellule sono state staccate dalla plastica con la tripsina, centrifugate a 300 g per 5 min e poi contate con la camera di Burker.

L'effetto di concentrazioni più alte di colcemid (50 ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml e 400ng/ml) è stato valutato direttamente sulla ferita. Le cellule CFBE sono state seminate in piastre da 24 *well*, in numero di $7,5 \times 10^4$ cellule per pozzetto. Raggiunta la confluenza del 90% sul monostrato di cellule è stata effettuata la ferita con un puntale da 10 μ L e le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di colcemid. A 24h dal trattamento, il terreno con colcemid è stato sostituito con MEM completo e l'ampiezza della ferita è stata valutata al tempo 0, dopo 24 e 48 ore successive.

Per valutare, invece, l'effetto di un metodo fisico (raggi gamma) sul blocco della proliferazione delle CFBE, queste ultime sono state seminate in numero di 1×10^6 cellule in piastre Petri da 60 mm e, raggiunta la confluenza, la ferita è stata effettuata con un puntale da 10 μ l. Le cellule sono state irradiate con raggi gamma utilizzando come sorgente di radiazioni l'irradiatore IBL 437 C tipo H (CIS bio international, filiale della Schering S.A.) caratterizzato da una sorgente di Cesio-137. I primi esperimenti sono stati condotti usando energia, o meglio dose assorbita e cioè gray (Gy), pari a 1 Gy, 2 Gy e 3 Gy per poi passare ad energia maggiore (10 Gy, 15 Gy e 20 Gy). Rispetto ai primi esperimenti, è stato necessario cambiare le condizioni sperimentali dal momento che lo strumento utilizzato per irradiare le cellule non consente di alloggiare al suo interno una piastra da 24 *well*. L'ampiezza della ferita è stata valutata ai tempi 0, 24 e 48 ore dopo il taglio e l'irradiazione.

Per valutare quale dose di energia utilizzare per irradiare le CFBE senza comprometterne la vitalità cellulare sono stati effettuati esperimenti preliminari, che hanno confrontato i parametri riportati di seguito, dopo irradiazione con 10 Gy, 15 Gy e 20 Gy, dal momento che le irradiazioni con Gy più bassi (1 Gy, 2 Gy e 3 Gy) non erano in grado di bloccare la proliferazione cellulare delle CFBE.

In particolare $7,5 \times 10^4$ CFBE sono state risospese in 1 ml di MEM completo, in tubi da 10 ml e così sottoposte ad irradiazione, utilizzando i Gy sopra citati. Dopo irradiazione le CFBE sono state seminate in piastre da 24 *well* e al tempo 0, dopo 24 e 48 ore sono stati valutati i parametri seguenti:

- Numero di cellule. Le CFBE sono state staccate con Tripsina 1x, centrifugate a 300 g per 5 min e contate con la camera di Burker.

- Numero e fluorescenza dei nuclei. Le cellule sono state colorate con Dapi 0,05% (Sigma) e dopo due lavaggi con PBS sono state effettuate foto con il microscopio Zoe Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Segrate (Mi), Italia) nel canale del blu (em.461 nm, ex. 358 nm). Per ogni condizione sono stati scelti tre campi, sono stati contati manualmente i nuclei ed è stata misurata la fluorescenza (*mean*) del colorante Dapi utilizzando il programma ImageJ.

Le cellule CFBE sono state seminate in numero di 1×10^6 su piastre Petri da 60 mm. Raggiunta la confluenza è stata effettuata la ferita e le cellule sono state sottoposte a irradiazione 15 Gy. Per una piastra Petri, dopo il taglio e l'irradiazione, si è proceduto a staccare le cellule CFBE dopo lavaggio con PBS (Invitrogen), usando Tripsina 1x (Sigma). Le cellule sono state centrifugate a 1300 g per 5 min e contate con contatore di cellule automatizzato (TC²⁰ Automated Cell Counter, Bio-Rad). In questo modo è stato possibile conoscere il numero preciso delle cellule CFBE e aggiungere sulla ferita un numero di hAMSC in rapporto 1:5. L'ampiezza della ferita con l'aggiunta di hAMSC è stata valutata al T0 e dopo 24 e 48 ore con il programma ImageJ che consente di misurare la distanza tra i lembi della ferita.

3.7.2. Analisi della migrazione delle cellule CFBE14o- e hAMSC con medium condizionato

Le cellule CFBE sono state seminate in numero di 1×10^6 su piastre Petri da 60 mm, raggiunta la confluenza è stata effettuata la ferita e le cellule sono state sottoposte a irradiazione a 15 Gy. Subito dopo il taglio e l'irradiazione (t.0) e dopo 24 e 48 ore sono stati raccolti i medium condizionati e utilizzati per valutare se, fattori in essi presenti, potessero favorire la migrazione delle CFBE e delle hAMSC. In particolare, sono stati

utilizzati *transwell* da 96 pozzetti costituiti da membrane semipermeabili, con pori di 8.0 μm (Corning) che consentono il passaggio delle cellule, in modo da dividere il pozzetto in una porzione apicale e una porzione basale. Sulla membrana apicale sono state seminate 3×10^4 cellule, CFBE o hAMSC, colorate o meno con calceina 2 μM (Life Technologies), un colorante fluorescente vitale. Colorare le cellule posizionate sulla porzione apicale è utile per quantizzare successivamente, mediante misure spettrofluorimetriche, il numero di cellule migrate nella porzione basale in cui sono stati alloggiati 200 μL di medium condizionato, contenente eventuali fattori con potere chemioattraente. La fluorescenza del medium presente nel pozzetto basale è stata valutata dopo 4 ore con lo spettrofluorimetro FilterMax F5 (lunghezze d'onda della calceina ecc. 495, em. 515) (Beckman Coulter) Alla fluorescenza delle cellule con calceina è stata sottratta la fluorescenza delle cellule senza calceina e il valore ottenuto è stato interpolato sulla retta di taratura della calceina per avere il numero di cellule migrate.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. ISOLAMENTO, CINETICA DI CRESCITA, MORFOLOGIA E FENOTIPO DELLE hAMSC

Le hAMSC sono state isolate da placenta a termine previo consenso informato della madre. Da ogni membrana amniotica è stato isolato un numero di cellule compreso tra $23,9 \times 10^6$ e 139×10^6 , con una media \pm E.S. di $71,60 \pm 13,27$. La vitalità cellulare era compresa in un *range* tra 72,45% e 87,23%, con una media \pm E.S. di $79,01 \pm 1,95\%$ ed è stata valutata con il test di esclusione del *trypanblu*.

Le cellule sono quindi state piastrate: una volta aderita alla plastica, la frazione stromale mesenchimale dell'amnios presenta una morfologia allungata, denominata "*Fibroblast-Like*", molto simile a quella descritta per le cellule mesenchimali stromali isolate e ben caratterizzate dal midollo osseo. La cinetica di crescita è stata valutata calcolando il tempo di duplicazione delle cellule dal T0 al IV passaggio. La Figura 20A mostra la morfologia fusata simil-fibroblastica della maggior parte delle cellule al passaggio I. Si può notare che poche cellule presentano una morfologia di tipo poligonale, indice di una seppur minima contaminazione da parte di hAESC (evidenziate da una freccia). Al passaggio II si osserva la presenza delle sole cellule di morfologia mesenchimale (Fig. 21B), indice della scomparsa delle hAESC.

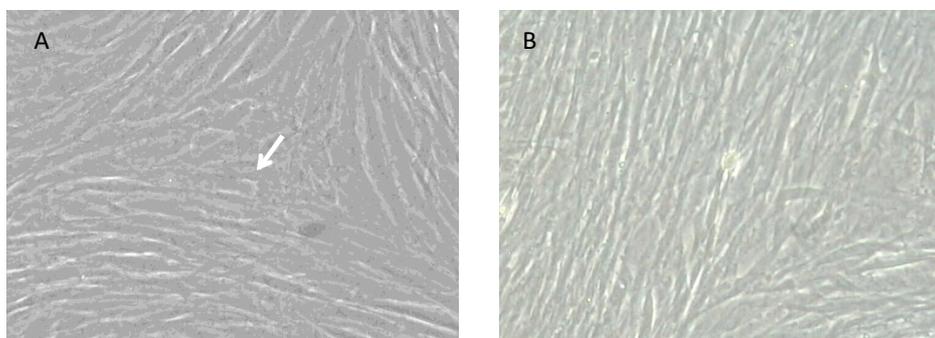


Figura 20. Morfologia delle hAMSC al passaggio I (A) e II (B). In A, una cellula epiteliale, identificabile dalla sua morfologia poligonale, è indicata da una freccia bianca. Ingrandimento originale: 10X.

La proliferazione delle hAMSC è stata valutata mediante calcolo della curva di crescita dall'isolamento al passaggio IV. Come si può vedere dalla Fig. 21, la proliferazione rallenta dopo il passaggio II. Nella fase esponenziale di crescita si osservano, all'incirca, due raddoppiamenti del numero di cellule nell'arco di 15 giorni, determinando in media un tempo di raddoppiamento di $16,58 \pm 0,45$ giorni, calcolato durante i circa 40 giorni di coltura.

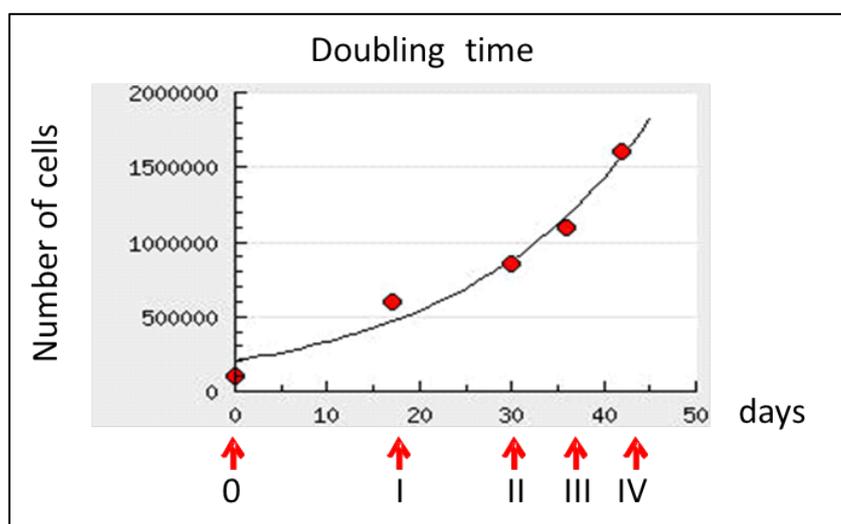


Figura 21. Curva di crescita rappresentativa delle hAMSC. In basso sono indicati i passaggi, dall'isolamento (0) al passaggio IV.

Le hAMSC così ottenute sono state tipizzate per marcatori di membrana mediante citometria a flusso, a partire dall'isolamento fino al V passaggio di coltura. Come per le MSC ottenute dal midollo osseo, che rappresentano il *gold standard* per questo tipo di valutazioni e in accordo con i dati della letteratura, le hAMSC hanno mostrato una percentuale positiva di cellule per i marcatori della linea ematopoietica (CD14, CD34 e CD45) molto bassa (3-4% delle cellule totali) (Fig. 22, colonna di sinistra). Al contrario, la marcatura per CD29, CD105 e CD73, marcatori di superficie tipici della linea mesenchimale, ha evidenziato una positività che, da circa il 50% al tempo 0, è aumentata fino a raggiungere quasi il 100% al passaggio V (Fig. 22, colonna di destra). In generale,

i livelli dei tre marcatori di superficie tipici della linea mesenchimale sono significativamente più alti nei passaggi II, III, IV e V, rispetto ai passaggi 0 e I. Nella legenda della Figura 22 sono riportate le differenze statisticamente significative.

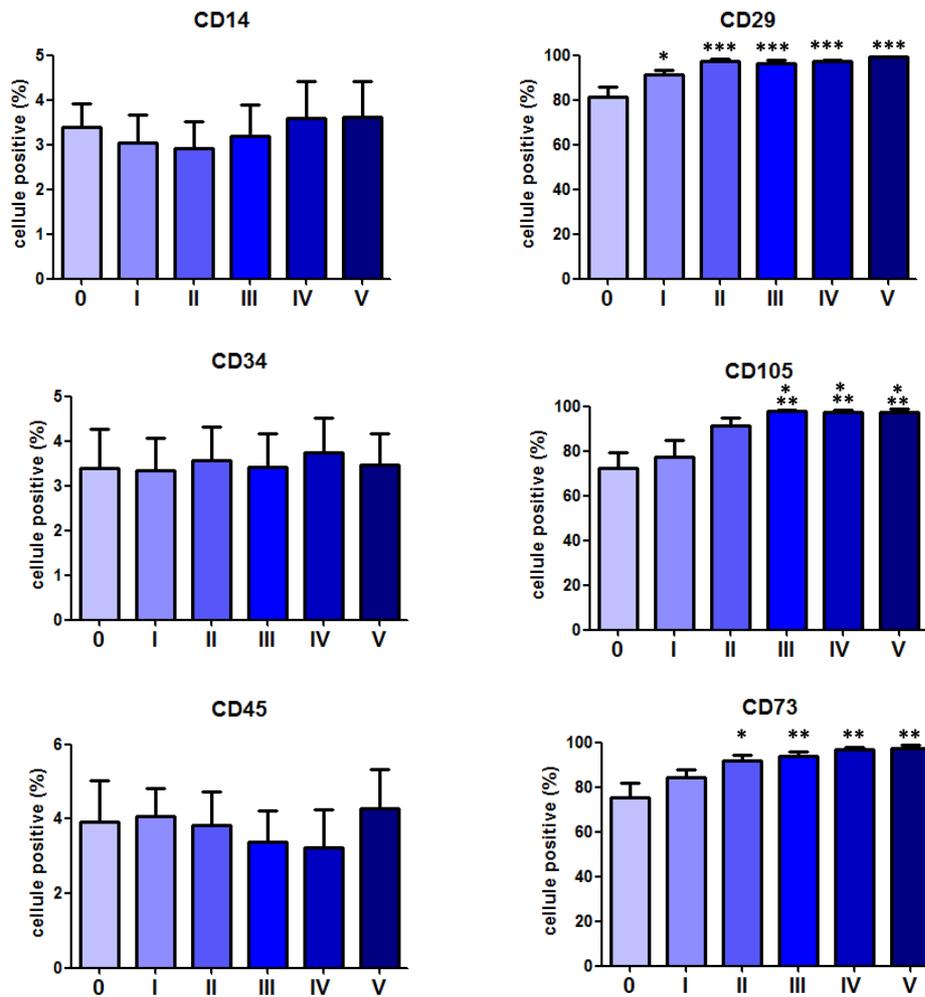


Figura 22. Fenotipo delle hAMSC. Le hAMSC sono state coltivate dall'isolamento (0) fino al passaggio V. Ad ogni passaggio, esse sono state staccate dal substrato ed analizzate per i vari CD mediante citometria a flusso. I dati sono mostrati come *mean* ± S.D. delle percentuali di cellule positive ottenute da 8 individui. **CD29:** * $p < 0.05$, 0 vs. Passaggio I; *** $p < 0.0001$, 0 vs. Passaggio II, III, IV e V. **CD105:** * $p < 0.05$, Passaggio I vs. Passaggio III, IV e V. ** $p < 0.001$, 0 vs. Passaggio III, IV e V; **CD75:** $p < 0.05$, 0 vs. Passaggio II; ** $p < 0.001$, 0 vs. Passaggio III, IV e V.

4.2. ESPRESSIONE DI Cx43: mRNA E PROTEINA

Come precedentemente detto, le cellule CFBE, coltivate in monostrato insieme alle hAMSC, presentano una correzione di alcuni dei difetti epiteliali associati alla FC, ovvero l'espressione alterata della proteina CFTR e il basso efflusso di cloro CFTR-dipendente, l'aumentato riassorbimento di fluido apicale ENaC-dipendente, nonché la disorganizzazione del citoscheletro di actina e delle giunzioni strette (Carbone *et al.*, 2014). Questa capacità potrebbe essere ricondotta alla secrezione di fattori da parte delle hAMSC, oppure alla formazione di GJ tra le cellule epiteliali e quelle mesenchimali. Al fine di valutare il ruolo delle GJ, è stata analizzata, in primo luogo, l'espressione della Cx43, una delle principali connessine coinvolta nella loro formazione. L'analisi dell'espressione della Cx43 è stata condotta mediante:

- Real-time RT-PCR per i livelli di mRNA;
- epifluorescenza e microscopia confocale per la proteina.

La *Real-time* RT-PCR è stata effettuata sull'RNA estratto dalle cellule (hAMSC, CFBE e 16HBE), sia cresciute su plastica (*flask*) che su *transwell*. Il grafico rappresentato nella Figura 23 mostra che le CFBE su *flask* presentano una espressione maggiore di mRNA per Cx43 rispetto alle 16HBE, mentre le hAMSC mostrano una espressione molto più elevata rispetto ad entrambe le linee epiteliali. Considerando la condizione di crescita su *transwell*, è possibile notare che l'espressione nelle CFBE, 16HBE e hAMSC aumenta rispetto alle stesse cellule cresciute su *flask*.

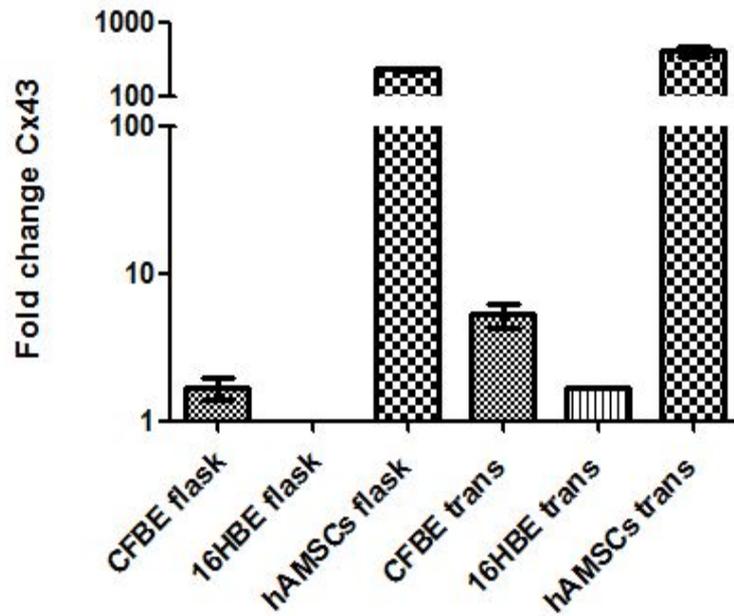


Figura 23. Espressione basale dell'mRNA per la Cx43 nelle cellule 16HBE, CFBE e hAMSC cresciute su *flask* e su *transwell*. I valori sono rapportati a quelli delle cellule 16HBE-*flask* considerati uguali a 1. I dati sono mostrati come media \pm S.D. di due esperimenti, ciascuno condotto in triplicato.

Dopo aver analizzato i livelli di mRNA, l'espressione e la localizzazione della proteina Cx43 sono state investigate mediante epifluorescenza e microscopia confocale, in seguito alla crescita delle cellule (16HBE, CFBE e hAMSC) e delle co-culture (hAMSC: CFBE) su *transwell* per 6 giorni. I risultati mostrano che nelle CFBE e nelle 16HBE il segnale specifico presenta un tipico *chicken wire fence pattern*, ovvero lungo i bordi cellulari. D'altro canto è possibile osservare che, in linea con i dati della *Real-time* PCR, il livello di espressione della Cx43 è più alto nelle CFBE rispetto alle 16HBE. Le hAMSC mostrano un alto segnale specifico rispetto alle 16HBE, con un *pattern* di espressione sia diffuso che puntinato (Fig. 24), come riportato in studi su cellule mesenchimali ottenute da midollo osseo (Valiunas *et al.*, 2004).

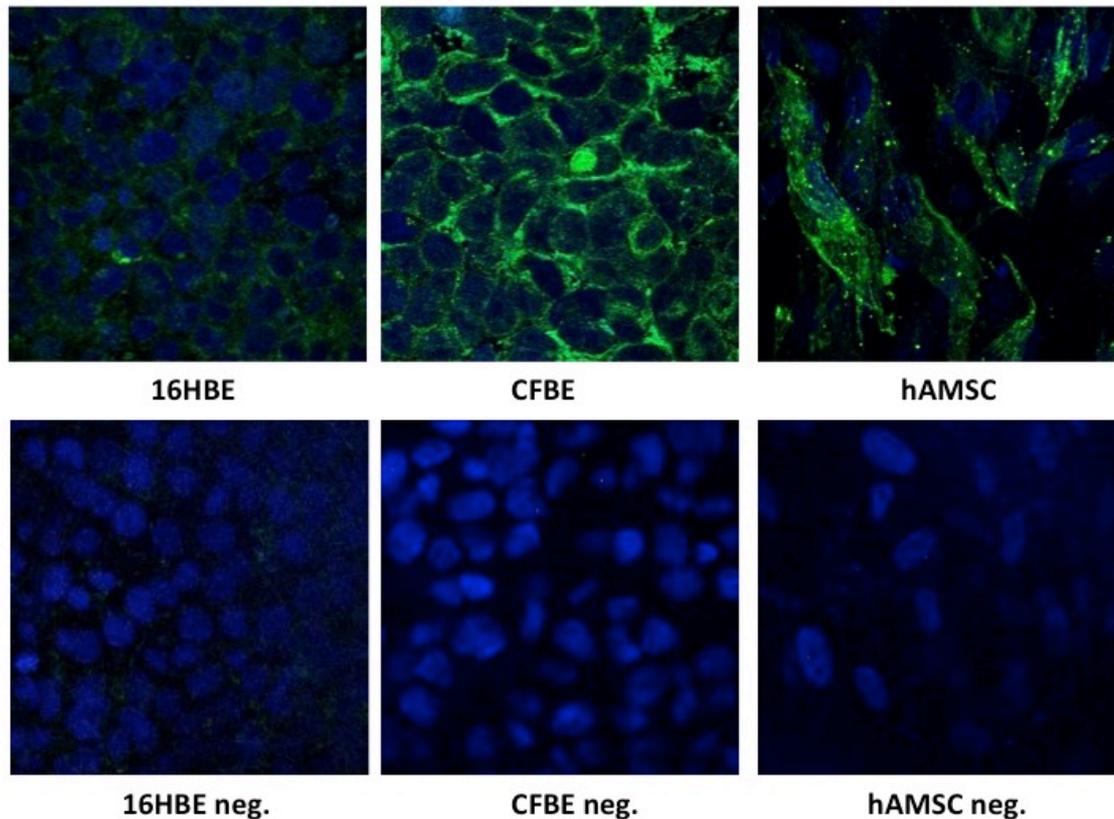


Figura 24. Espressione e localizzazione della proteina Cx43. Nella parte superiore del pannello le immagini si riferiscono alle cellule 16HBE, CFBE e hAMSC cresciute sui *transwell* per 6 giorni e trattate con l'anticorpo (in verde) e un colorante nucleare vitale, dapi (in blu); nella parte inferiore sono relative alle stesse cellule non trattate con l'anticorpo ma solo con dapi (controlli negativi). Immagini ottenute al microscopio confocale. Ingrandimento iniziale: 60X.

In conclusione, questi risultati mostrano che le cellule epiteliali respiratorie, sia *wild-type* che recanti la mutazione *F508del* della fibrosi cistica, esprimono la Cx43, a livello di mRNA e proteina, in linea con quanto dimostrato precedentemente dal gruppo di Marc Chanson (2001). Sempre dallo stesso gruppo, è stato dimostrato che l'accoppiamento mediante *dye* fluorescente (*LY*) non è diverso tra le linee non FC e quelle FC in condizioni basali. D'altro canto, le hAMSC mostrano, invece, una espressione più alta di Cx43 mRNA rispetto alle cellule epiteliali, un risultato corroborato dalla microscopia confocale. In lavori precedenti è stata dimostrata l'espressione di Cx43 in cellule staminali mesenchimali ottenute da midollo osseo, a livello dei bordi intercellulari e nel

citoplasma, quando cresciute come monostrato su plastica (Valiunas *et al.*, 2004). È stato anche osservato che Cx43 è espressa da hAMSC fetali, le quali possono instaurare efficienti *GJ* con cardiomiociti ventricolari di ratto (Ramkisoensing *et al.*, 2012). La presenza di *GJ* tra hAMSC e CFBE è stata già dimostrata sia *in vitro* che *in vivo* (Badri *et al.*, 2011), ma il presente lavoro è il primo che documenta la formazione di *GJ* tra cellule epiteliali con FC e hAMSC.

4.3. EFFICIENZA DELLA INTERNALIZZAZIONE DI *siRNA*

Un metodo efficace e molto utilizzato per studiare la funzione di un gene consiste nell'inibire l'espressione di quel gene a livello dell'mRNA e valutarne gli effetti sulle funzioni cellulari. La tecnica ampiamente utilizzata è il silenziamento basato sull'interferenza da RNA (RNAi), meccanismo scoperto per la prima volta nel 1998 da Fire e colleghi i quali osservarono che, in *C. elegans*, l'iniezione di molecole a doppio filamento di RNA inibiva l'espressione di un gene mediante una sequenza complementare all'mRNA.

Il meccanismo di azione dei *siRNA* è molto simile a quello dei *miRNA*, con la differenza che i *miRNA* sono prodotti endogeni, mentre i *siRNA* vengono introdotti nella cellula mediante trasfezione. Le molecole che causano RNAi sono corti oligonucleotidi di RNA a doppio filamento, lunghi circa 20 nucleotidi, che, una volta entrati nella cellula, vengono tagliati da una nucleasi citoplasmatica chiamata *Dicer* e maturati a *siRNA*, in grado di appaiarsi all'mRNA *target* complementare. In questo processo il doppio filamento di *siRNA* si separa e il filamento antisenso diventa parte di un complesso multiproteico detto *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) che appaia il *siRNA* all'mRNA *target* complementare introducendo un taglio nell'mRNA. Il trascritto viene

quindi degradato e la proteina non viene espressa

Per indurre RNAi si possono utilizzare molecole di *siRNA* sintetizzate *in vitro* o vettori plasmidici che codificano uno *short hairpin RNA (shRNA)*, cioè un doppio filamento di RNA con struttura a forcina, che viene poi processato dall'enzima *Dicer*.

Esistono, però, degli ostacoli al silenziamento genico mediato da *siRNA*; essendo, infatti, le molecole di *siRNA* idrofiliche, cariche negativamente e molto suscettibili alla degradazione da parte delle nucleasi, sono incapaci di attraversare da sole le membrane biologiche per raggiungere il sito d'azione e necessitano di vettori che ne facilitino l'*uptake* e il rilascio all'interno della cellula. Possono essere utilizzati vettori virali e non virali per favorire l'ingresso del *siRNA* nella cellula, i primi sono poco utilizzati perché possono creare grandi problemi di sicurezza, i vettori non virali invece sono maggiormente usati e sono rappresentati, generalmente da lipidi, polimeri e peptidi.

Tra i vettori non virali particolare importanza rivestono i cationi polimerici tra cui la polietilenimina (PEI) che è stata ampiamente usata per il *delivery* di *siRNA* (Geet *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2005). La PEI è considerata il *gold standard* per il *gene delivery in vitro* e la sua efficienza di trasfezione dipende dal peso molecolare e dal grado di ramificazione.

Al fine di verificare il ruolo delle GJ nell'effetto di correzione dei difetti di base della FC osservato in co-culture tra cellule hAMSC e cellule epiteliali CFBE sono stati effettuati esperimenti di down-regolazione di Cx43 mediante *siRNA*.

Per prima cosa è stato verificato se il *siRNA* diretto contro Cx43 viene internalizzato dalle cellule. Per determinare l'efficienza di internalizzazione, le linee cellulari hAMSC e CFBE in co-cultura (in rapporto 1:5), sono state incubate con *siRNA* GAPDH fluorescente complessato con PEI. Il giorno seguente, le cellule sono state trattate o meno con *Trypan blue*, un colorante che spegne la fluorescenza extracellulare non inficiando la

fluorescenza intracellulare (Conese *et al*, 2011), permettendo di valutare il segnale relativo al solo *siRNA* internalizzato. I risultati ottenuti mediante il saggio di citofluorimetria mostrano che i complessi formati dal *siRNA* sono internalizzati quasi dal 100% delle cellule, dal momento che non sono state rilevate differenze tra le co-culture trattate o meno con il colorante (Fig. 25).

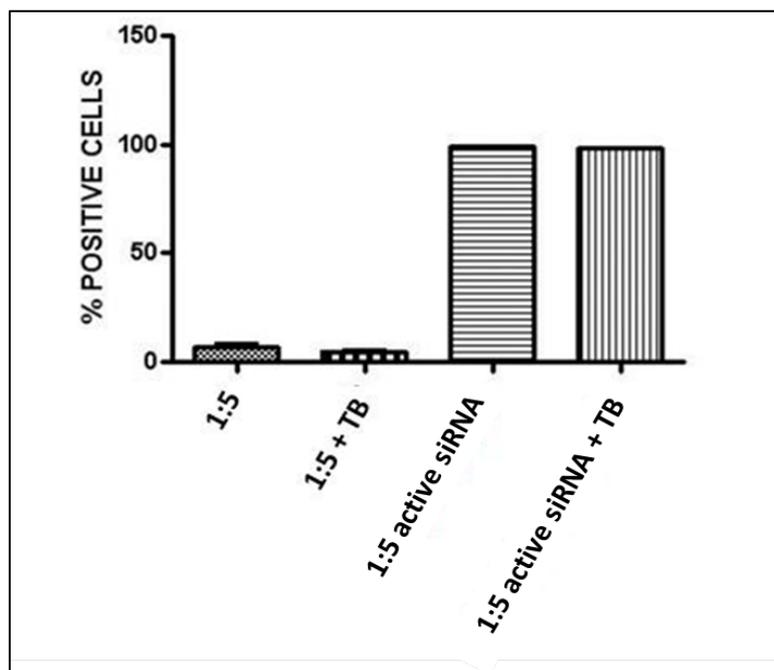


Figura 25. Internalizzazione di *siRNA*, coniugato a FITC e complessato con PEI 25K, da parte delle co-culture hAMSC: CFBE (in rapporto 1:5). Le cellule sono state trattate o meno con *Trypan Blue* (TB) prima dell'analisi citofluorimetria. I dati sono mostrati come media \pm S.D. ottenuti da $n=2$ esperimenti, ciascuno condotto in triplicato.

4.4. EFFICACIA DEL *siRNA* SUI LIVELLI DI Cx43 mRNA

Dopo aver dimostrato l'internalizzazione del *siRNA* nelle co-culture, è stata studiata l'efficacia della sottoregolazione di Cx43. Gli esperimenti di *Real-time* RT-PCR sono stati quindi eseguiti dopo aver trattato le co-culture con *siRNA* attivo (*active siRNA*) o con *siRNA scrambled*, ossia *siRNA* con la stessa composizione nucleotidica dell'*active siRNA*, ma con sequenza mescolata, come controllo, per 24 h. L'estrazione dell'RNA è

stata poi effettuata dopo 6 giorni di co-cultura. La Figura 26 mostra come la transfezione con *active siRNA* determini una sottoregolazione dei livelli di mRNA Cx43, che non si osservano nelle co-culture transfettate con *siRNA scrambled*

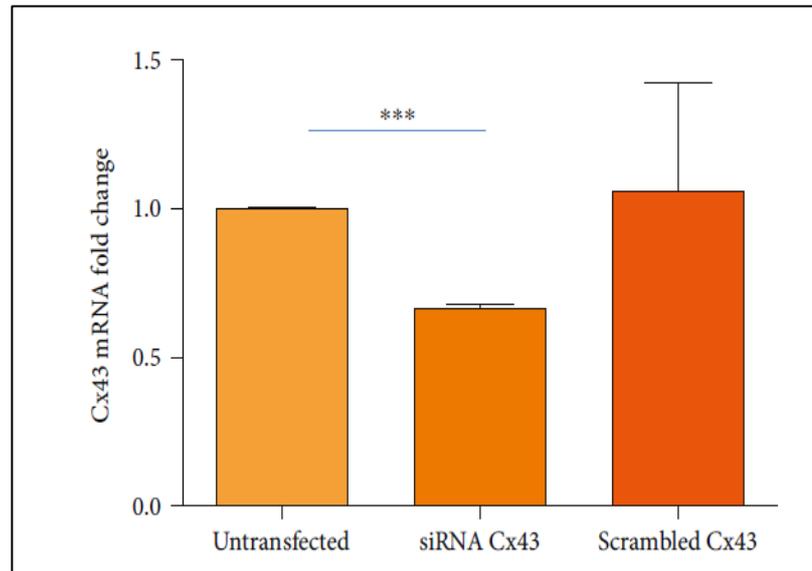


Figura 26. Espressione della Cx43 nelle co-culture in rapporto 1:5, non transfettate, transfettate con *siRNA* Cx43 e con *siRNA* di controllo (*scrambled* Cx43). I dati sono mostrati come media \pm S.D. di tre esperimenti. I livelli di Cx43 mRNA sono relativi a quelli delle 1:5 posti uguali a 1. *** $p < 0.0001$. Test di Student.

L'effetto del *siRNA* è stato poi valutato sull'espressione della proteina, nelle stesse condizioni sperimentali sopra descritte. Come si può vedere alla Figura 27, la Cx43 è espressa nelle co-culture (1:5), con una localizzazione sia intracellulare che sulla membrana plasmatica. Nelle co-culture trattate con *active siRNA* i livelli della proteina Cx43 sono notevolmente diminuiti, contrariamente alla condizione di trattamento con *siRNA scrambled*.

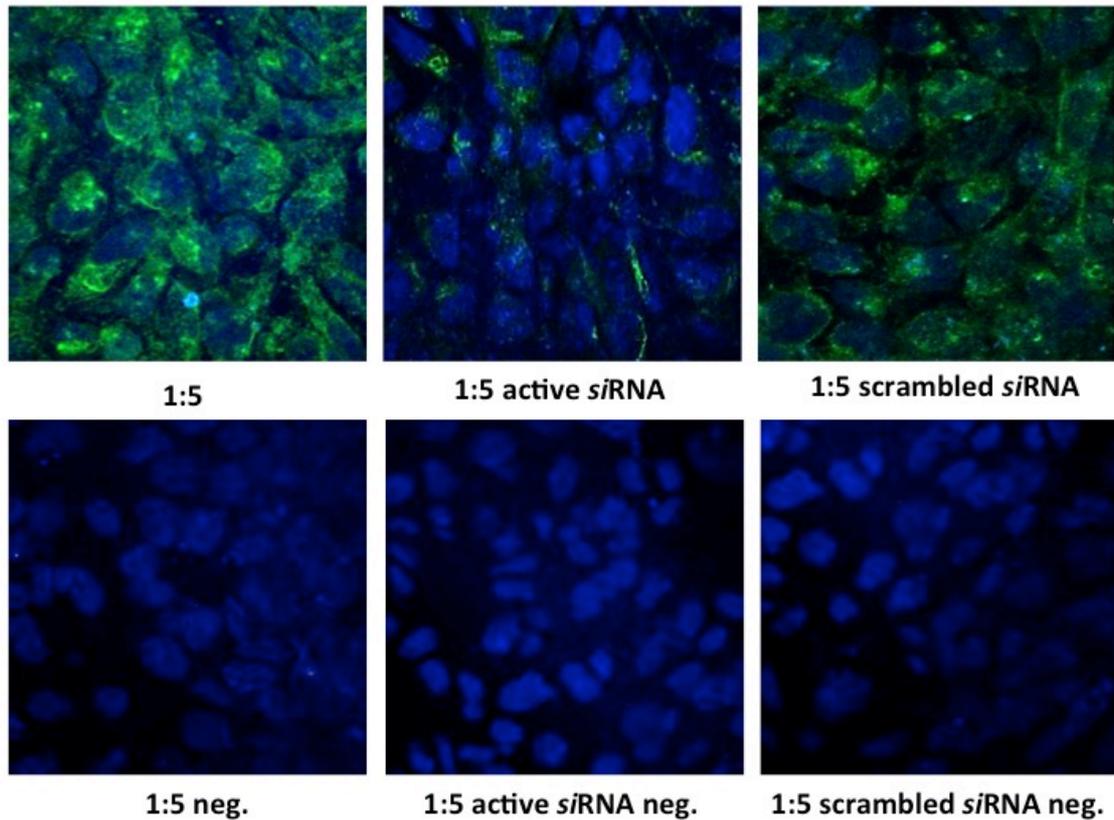


Figura 27. Nella parte superiore della figura le immagini mostrano l'espressione e la localizzazione della proteina Cx43 nelle co-culture in rapporto 1:5 (in verde), transfettate con *active siRNA* e *siRNA scrambled* per 24 h e quindi cresciute sui *transwell* per 6 giorni, mentre in blu sono evidenziati i nuclei colorati con dapi; nella parte inferiore le immagini sono rappresentative delle stesse co-culture non trattate con l'anticorpo (controlli negativi). Immagini ottenute al microscopio confocale. Ingrandimento iniziale: 60X.

Come si può osservare dal confronto tra le Figure 26 e 27, sembra che l'effetto del *siRNA* sui livelli di mRNA Cx43 sia minore rispetto a quello esercitato sulla proteina. Una possibile spiegazione potrebbe essere che l'emivita dell'mRNA per Cx43 sia breve e che quindi il nuovo mRNA possa mascherare l'effetto del *siRNA*.

I dati qui riportati, comunque, sono in linea con quanto osservato da Caci *et al.* (2007), i quali hanno dimostrato la persistenza dell'effetto di down-regolazione di un *siRNA* contro l'ENaC anche dopo 8 giorni di coltura di cellule epiteliali respiratorie primarie su *transwell*. È anche interessante notare che questi autori hanno usato lo stesso protocollo sperimentale: semina delle cellule sui filtri in sospensione in presenza della soluzione

transfettante. La ragione della persistenza dell'effetto in queste condizioni non è chiara, ma potrebbe essere imputata ad una diminuzione del metabolismo cellulare e, quindi, anche della degradazione del *siRNA*, quando le cellule sono presenti sul filtro: esse infatti si dividono poco grazie all'inibizione da contatto e formano un monostrato.

4.5. VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL *siRNA* Cx43 SULLA FORMAZIONE DELLE *GAP JUNCTIONS*

Il saggio basato sulla diffusione della LY è stato utilizzato per valutare se effettivamente il *siRNA*Cx43, silenziando il gene, agisca anche a livello funzionale della proteina Cx43 e impedisca la formazione di GJ.

Il colorante fluorescente LY, ingegnerizzato da Walter W. Stewart, introdotto per la prima volta nel 1978, è molto utilizzato per marcare le cellule ed è estremamente utile per studi sulla struttura e sulla comunicazione cellulare in quanto, una volta microiniettato, ha la capacità di diffondere da una cellula all'altra attraverso le GJ (Piccoli *et al.*, 2012; Hanani, 2012).

Si tratta di un sale di litio, solubile in acqua, con picchi di eccitazione/emissione di 428/536 nm, che emette una fluorescenza verde. La proprietà chiave della LY è di essere facilmente visualizzabile sia in cellule vive che in cellule fissate, usando un microscopio a fluorescenza.

I dati ottenuti, illustrati nella figura 28, mostrano che nelle co-culture non trasfettate (1:5) il colorante si diffonde ampiamente dal punto di microiniezione (evidenziato da una freccia rossa). Quando le co-culture sono trattate con *active siRNA* è possibile osservare una drastica inibizione del trasferimento di LY tra le cellule, mentre è interessante notare come il *siRNA scrambled* non sortisca alcun effetto.

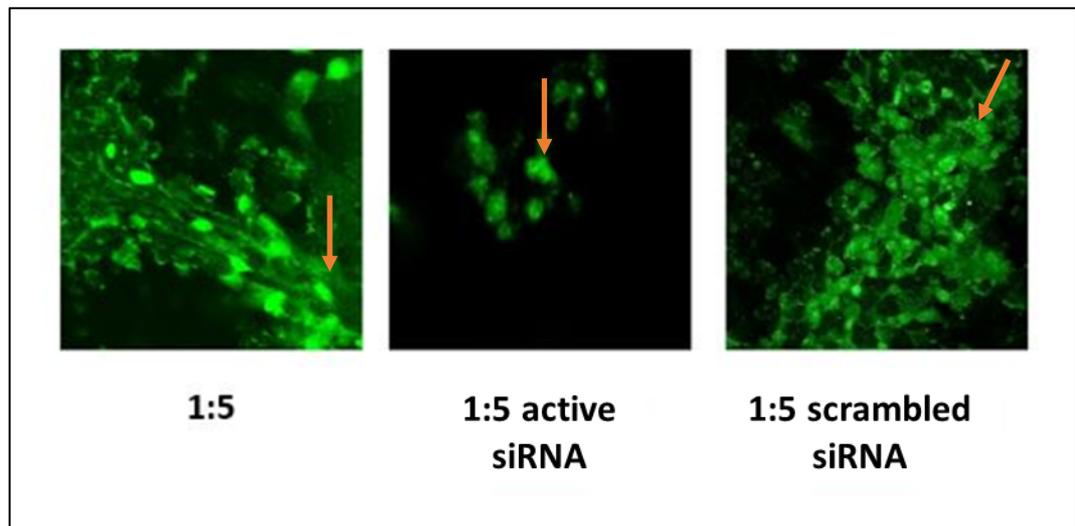


Figura 28. Immagini ottenute al microscopio a fluorescenza che mostrano le cellule in co-cultura non trasfettate (1:5), transfettate con *active siRNA* o *siRNA scrambled*, ed iniettate con il colorante *Luciferase Yellow*. Dal punto di iniezione (indicato dalla freccetta rossa) il fluoroforo si diffonde alle cellule vicine, e tale diffusione dipende dalla formazione o meno delle giunzioni comunicanti tra le cellule. Ingrandimento iniziale: 60X.

4.6. RUOLO DELLE GAP JUNCTIONS NELLA CORREZIONE DEI DIFETTI DI BASE DELLA FIBROSI CISTICA

Al fine di dimostrare che nelle co-culture la comunicazione intercellulare mediata dalle *GJ* svolga un ruolo determinante nella correzione di alcuni dei difetti di base associati alla FC, le cellule hAMSC e CFBE sono state prima transfettate con *siRNA* contro Cx43 e poi co-coltivate su filtri *transwell*. Dopo 6 giorni, sono state valutate l'espressione, la localizzazione e la funzionalità della proteina-canale CFTR, rispettivamente mediante microscopia confocale e misurazione dell'efflusso di cloro.

Per le analisi di microscopia confocale è stato utilizzato un protocollo che prevede lo *staining* delle co-culture in rapporto 1:5, silenziate e non, con un anticorpo che riconosce la porzione apicale della CFTR.

La Figura 29 mostra chiaramente che la proteina è espressa ed è correttamente localizzata sulla superficie delle co-culture non silenziate o transfettate con *siRNA* Cx43 di controllo (1:5, *siRNA scrambled*), mentre la sua espressione scompare nelle co-culture silenziate per la proteina *Cx43* (1:5, *active siRNA*).

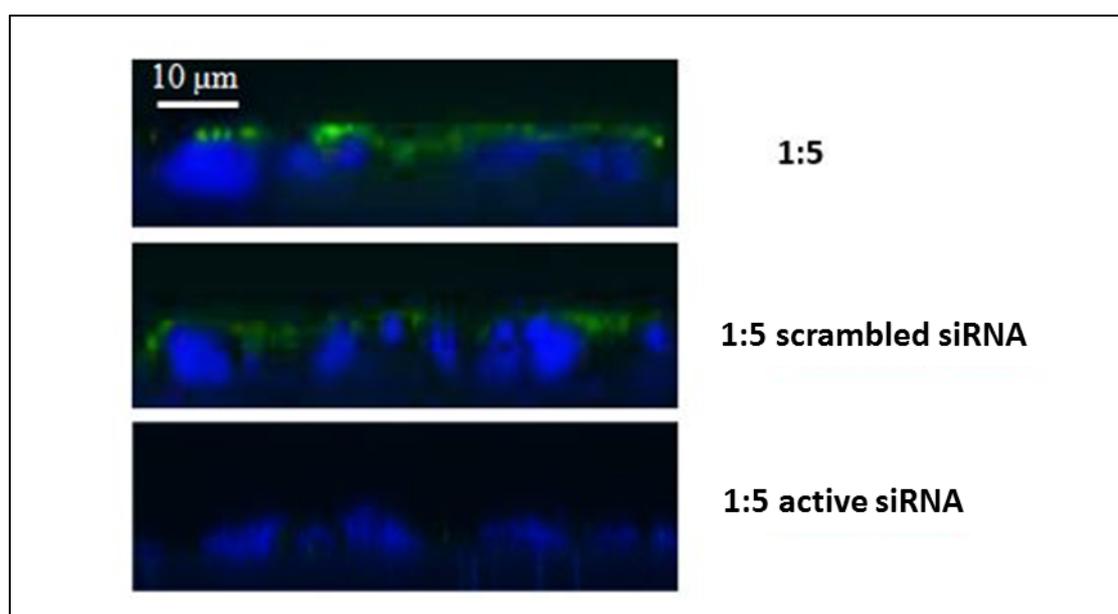


Figure 29. Espressione della proteina CFTR mediante microscopia confocale. Le scansioni confocali sono mostrate come sezioni verticali (piano xz). Le co-culture hAMSC: CFBE 1:5 sono state cresciute per 6 giorni su *transwells* e marcate con un anticorpo anti-CFTR coniugato a FITC (in verde) e con il DAPI (in blu). Ingrandimento iniziale: 60X.

La funzionalità del canale CFTR è stata analizzata mediante misure spettrofluorimetriche di efflusso di cloro. Dopo 6 giorni di co-cultura delle cellule CFBE con hAMSC su filtri permeabili, l'efflusso di cloro è stato misurato seguendo il cambiamento della fluorescenza, $\Delta(F/F_0)/\text{min}$, del colorante MQAE sensibile al cloro.

Come mostrato in Figura 30, l'efflusso di cloro CFTR-dipendente è simile nelle co-culture non silenziate (1:5) o transfettate con *siRNA scrambled* (mentre è significativamente più basso nelle co-culture trattate con *active siRNA*).

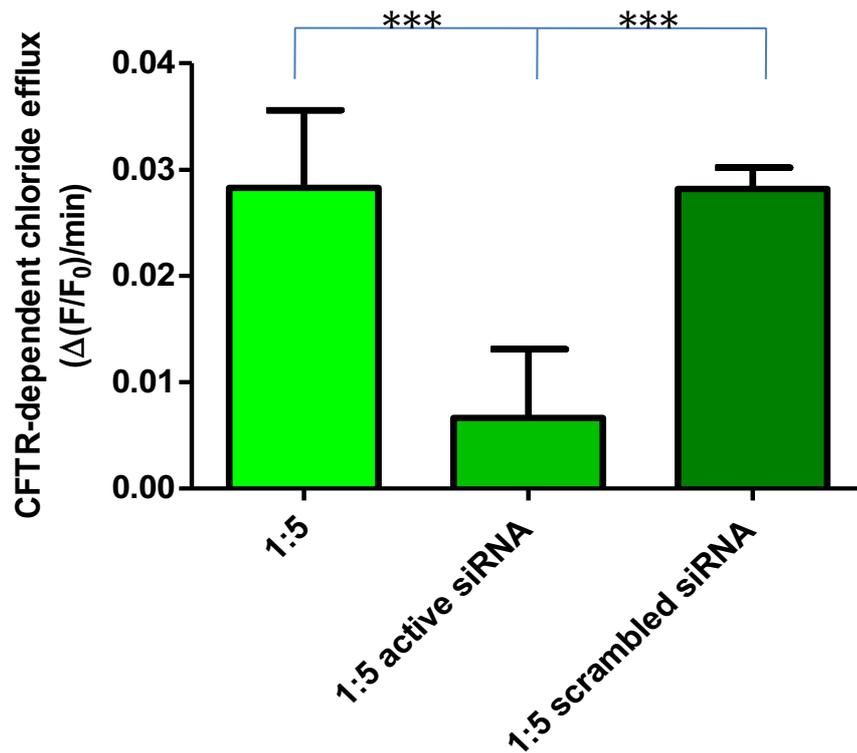


Fig. 30 Effetto del silenziamento della Cx43 sull'efflusso di cloro CFTR-dipendente. Le co-culture sono state trasfettate per 24h col *siRNA* Cx43 (active *siRNA*) o con *scrambled siRNA*, oppure non trasfettate (1:5) mantenute per 6 giorni su *transwell* e analizzate per l'efflusso di cloro. I dati sono mostrati come media \pm S.D. di tre esperimenti. *** $p < 0.0001$. Test di Student.

La TER rappresenta una misura della resistenza al flusso ionico attraverso lo strato epiteliale, riflette il grado di confluenza delle cellule e quindi la formazione di TJ. Di conseguenza, la sua misurazione fornisce precise informazioni sulle caratteristiche di barriera che il monostrato di cellule epiteliali possiede e sulla possibilità che essa possa essere attraversata in modo maggiore o minore da piccole molecole. La TER è pertanto un indicatore dell'integrità della barriera cellulare. Nelle cellule CFBE la mancanza/disfunzione della proteina CFTR sulla membrana apicale è associata con la disorganizzazione del citoscheletro di actina e con le alterazioni delle TJ (Carbone *et al.*, 2014). Per valutare il probabile ruolo della comunicazione intercellulare, mediata dalle GJ, nel recupero dei difetti di base legati all'epitelio delle vie aeree, grazie alle hAMSC,

sono state misurate la TER delle cellule, CFBE e co-culture, silenziate o meno con *active siRNA*, nonché la pAPP.

I risultati relativi alla misurazione della TER dimostrano che le co-culture hAMSC: CFBE, cresciute per sei giorni su *transwell*, presentano un significativo incremento dei valori di TER rispetto alle cellule CFBE (Fig.31 a). Come previsto, la condizione di co-cultura silenziata con *active siRNA* riduce significativamente la TER, mentre nella condizione di co-cultura trattata con *siRNA scrambled* i valori di TER risultano simili rispetto alle colture di controllo, evidenziando l'effetto specifico dell'*active siRNA*.

Per capire se i cambiamenti nella TER potessero essere biologicamente rilevanti, è stata misurata la pAPP di un destrano coniugato con FITC (10s; 10.000 Da). Come mostrato nella figura 31 (b), la pAPP è significativamente più bassa nelle co-culture controllo, parallelamente all'aumento della TER. La trasfezione di *active siRNA* porta ad un aumento significativo della pAPP sia rispetto ai controlli, sia alle co-culture trasfettate con *siRNA scrambled*.

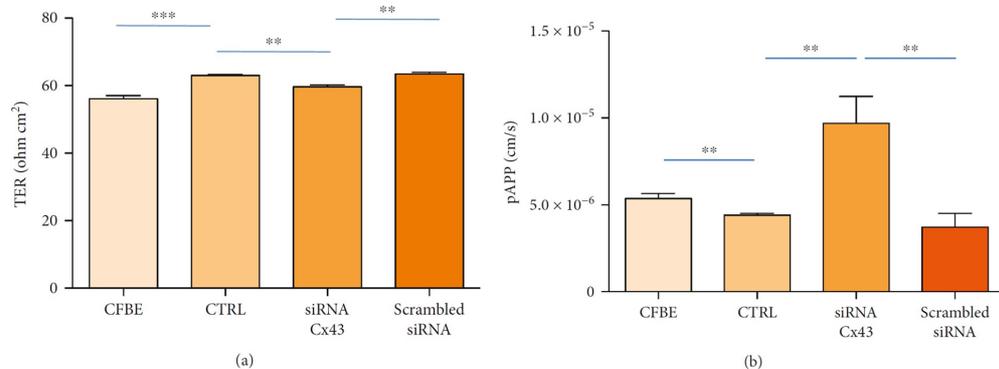


Figura 31. Effetto del siRNA Cx43 sulla resistenza trans-epiteliale e sulla permeabilità paracellulare. a) Resistenza trans-epiteliale (TER; ohm cm²) misurata dopo sei giorni dalla trasfezione delle co-culture sia con siRNA attivo contro Cx43 (siRNA Cx43) sia con *scrambled siRNA*. Sono state analizzate anche co-culture controllo, ossia non trasfettate (CTRL) e solo CFBE, tutte cresciute su *transwell*. I dati sono mostrati come media \pm S.D. di tre esperimenti. ** p<0.01 ***p<0.001. b) Permeabilità paracellulare (pAPP; cm/s), misurata dopo sei giorni nelle stesse condizioni sperimentali. I dati sono mostrati come media \pm S.D. di tre esperimenti. ** p<0.01. ANOVA test.

Per valutare se le alterazioni della TER fossero collegate ad una compromessa vitalità cellulare, sono state analizzate l'apoptosi e la necrosi mediante un saggio citofluorimetrico (Fig. 32). Sebbene si noti una diminuzione della vitalità cellulare nelle colture di controllo e nelle colture trasfettate con *siRNA scrambled* rispetto alle cellule CFBE cresciute singolarmente, le percentuali di cellule vitali [7-AAD (-) e ANXV (-)], di cellule necrotiche [7-AAD (+) e ANXV (-)], di cellule in apoptosi precoce [7-AAD (-) e ANXV (+)] ed apoptosi tardiva [7-AAD (+) e ANXV (+)] non differiscono in modo significativo tra le co-culture di controllo e le co-culture trasfettate con *active siRNA* o *siRNA scrambled*. Questi risultati rendono improbabile che le alterazioni che si evidenziano nei valori di TER e pAPP siano dovuti ad un cambiamento della vitalità cellulare.

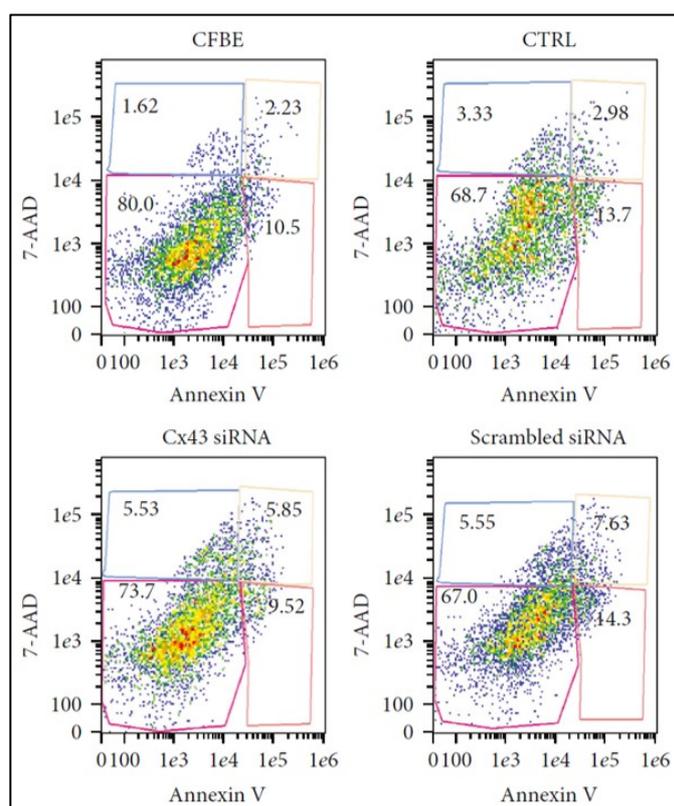


Figura 32. Dot plots rappresentativi di cellule vive [7-AAD (-) e ANXV (-)], di cellule necrotiche [7-AAD (+) e ANXV (-)], di cellule in apoptosi precoce [7-AAD (-) e ANXV (+)] e cellule in apoptosi tardiva [7-AAD (+) e ANXV (+)]. È mostrato un esperimento rappresentativo.

In conclusione, il silenziamento della proteina Cx43 e, di conseguenza, l'inibizione della formazione delle GJ tra le cellule in co-coltura, mostra una significativa diminuzione dell'attività del canale CFTR rispetto alle co-culture non silenziate, indicando che l'efflusso di cloro nelle co-culture venga aumentato rispetto alle CFBE coltivate da sole, mediante un meccanismo legato alla presenza delle GJ.

Il silenziamento della proteina Cx43 incide anche sui valori di resistenza elettrica trans-epiteliale, che risultano più bassi rispetto alle co-culture controllo, mostrando che la formazione delle GJ sia coinvolta nell'effetto di recupero dell'integrità epiteliale indotta dalle hAMSC. Parimenti, l'effetto sulla permeabilità cellulare, che aumenta in seguito al silenziamento di Cx43, corrobora in modo complementare quanto detto per la TER.

Quale possa essere il collegamento tra Cx43, formazione delle GJ ed attività della CFTR non è ancora chiaro. Vi sono alcune indicazioni che la proteina CFTR possa regolare le GJ nell'ambito degli epitelii, pertanto è possibile che tale regolazione sia bidirezionale, ovvero che la formazione delle GJ tra cellule epiteliali e mesenchimali influenzi positivamente l'espressione e/o la funzionalità della proteina-canale CFTR. Il passaggio di piccole molecole come i *miRNA* tra le cellule potrebbe essere alla base di questo fenomeno.

4.7. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DEL *miRNA*-138

Come precedentemente detto, studi condotti da Ramachandran e colleghi (2012) hanno evidenziato che *miRNA*-138 regola l'espressione della CFTR.

Per valutare l'ipotesi per cui tale *miRNA*, passando tra le cellule in co-coltura mediante le *GJ*, aumenti l'espressione della proteina CFTR e, di conseguenza, possa essere coinvolto e, in parte, responsabile dell'aumento dell'efflusso di cloro CFTR- dipendente precedentemente evidenziato sono state messa a punto una *Real Time* PCR e una ddPCR.

La *Real-Time* PCR, condotta su RNA estratto da cellule 16HBE, CFBE, hAMSC e co-culture e retro-trascritto in cDNA, ha evidenziato risultati difficilmente interpretabili a seguito della difficoltà di normalizzare i dati ottenuti rispetto al *miRNA housekeeping*, il *miRNA-16*, scelto come controllo endogeno, normalizzatore, dal momento che diversi studi dimostrano che sia uniformemente espresso in un gran numero di tessuti (Ludwig *et al.*, 2016; Landgraf *et al.*, 2007).

Il *miRNA-16* ha, invece, mostrato un'eccessiva variabilità nei replicati dell'esperimento, rendendo difficile la valutazione dell'espressione genica del *miRNA target*.

Per ovviare al problema della variabilità di espressione genica del *miRNA* normalizzatore ed avere un dato assoluto di espressione nel *miRNA target*, è stata condotta una ddPCR su cDNA retrotrascritto a partire da RNA estratto da 16HBE, CFBE, hAMSC e co-cultura. La ddPCR è un approccio molecolare di ultima generazione capace di fornire una quantificazione degli acidi nucleici ultrasensibile ed assoluta, superando alcuni limiti della *Real time* PCR. Si tratta di una misurazione *end-point* che utilizza un sistema di reazione di amplificazione simile alla *Real Time*-PCR basato sull'utilizzo di sonde fluorescenti o di molecole fluorescenti intercalanti. Il vantaggio è quello di poter calcolare in maniera più accurata e sensibile il numero assoluto di copie del genoma *target* (copie/ μ L), specialmente per campioni con una piccola concentrazione di RNA/DNA, così come in campioni complessi, senza l'utilizzo di standard quantitativi esterni. La mix di reazione di ciascun campione è casualmente distribuita in circa 20.000 goccioline prima dell'amplificazione. Ciascuna goccia costituisce un singolo sotto campione e contiene almeno una o nessuna molecola di acido nucleico *target*. Dopo l'amplificazione, la rilevazione viene effettuata misurando l'intensità di fluorescenza derivante dall'idrolisi della sonda o dal fluoroforo intercalante e contando il numero di goccioline positive e

negative. Il numero totale di molecole *target* è calcolato dalla porzione di gocce negative utilizzando la distribuzione binomiale di Poisson. Inoltre, essendo un approccio *end-point*, la *ddPCR* è meno soggetta a variazioni in termini di efficienza di amplificazione (Hindson *et al.*, 2013).

I risultati, espressi in copie di *miRNA*/ul, hanno evidenziato che nelle cellule 16HBE il *miRNA*-138 è più espresso rispetto alle CFBE, alle hAMSC e alle co-culture, ma solo nei confronti delle CFBE e delle co-culture la differenza di espressione è significativa (Fig. 33).

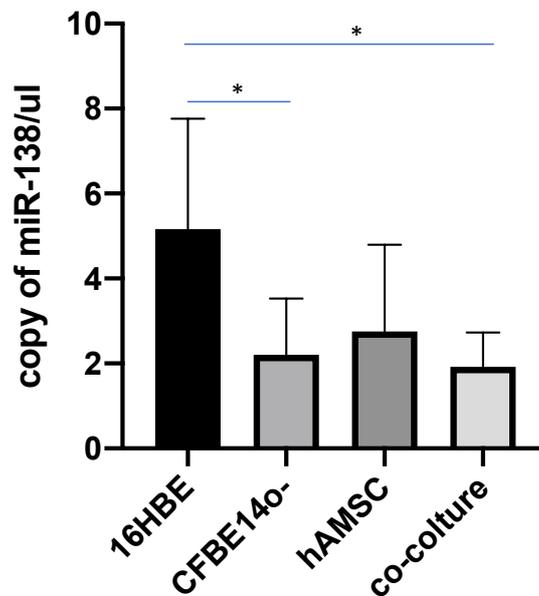


Figura 33. Livelli di espressione di *miRNA*-138 in 16HBE, CFBE140-, hAMSC e co-culture ottenuti con saggio *droplet digital* PCR. I dati sono mostrati come media \pm S.D. di due esperimenti. * $p < 0.05$. One-way ANOVA test.

Tali risultati, però, richiedono di essere ampliati con ulteriori esperimenti per poter confermare o meno l'ipotesi iniziale. I *miRNA*, per loro natura, sono instabili e la loro espressione può variare facilmente da un campione biologico all'altro. Sarebbe utile studiare se la loro espressione cambi in base al passaggio (numero di divisioni e split)

delle cellule da cui viene estratto l'RNA, così come potrebbe essere importante anche studiare un rapporto di co-coltura hAMSC: CFBE non di 1:5 ma superiore per le hAMSC, ossia 1:1. Si dovrà anche valutare se il *miRNA-138* svolga un ruolo nell'espressione della CFTR nei tipi cellulari considerati in questo studio (per es. mediante trasfezione con anti-*miR*) e se, effettivamente, le GJ siano implicate nel trasferimento di *miRNA-138* tra cellule mesenchimali e cellule epiteliali.

4.8 RIPARAZIONE DELL'EPITELIO RESPIRATORIO

Dal momento che, come detto precedentemente, la rigenerazione e la riparazione dell'epitelio respiratorio sono difettivi nei pazienti FC, si è voluto indagare se le cellule hAMSC, aggiunte su una ferita simulata su cellule CFBE (per ricreare ciò che avviene sull'epitelio respiratorio in un paziente), siano in grado di velocizzare la riparazione del danno.

Il primo confronto è stato effettuato sulla chiusura di una ferita effettuata su un monostrato di cellule epiteliali bronchiali *wild type* (16HBE), rispetto a cellule epiteliali bronchiali con mutazione *F508del* (CFBE14o-) cresciute su piastre da 24 *well*. I risultati hanno evidenziato che le 16HBE presentano la capacità di chiudere la ferita già a 24 ore, mentre le cellule CFBE impiegano 48 ore (Fig.34).

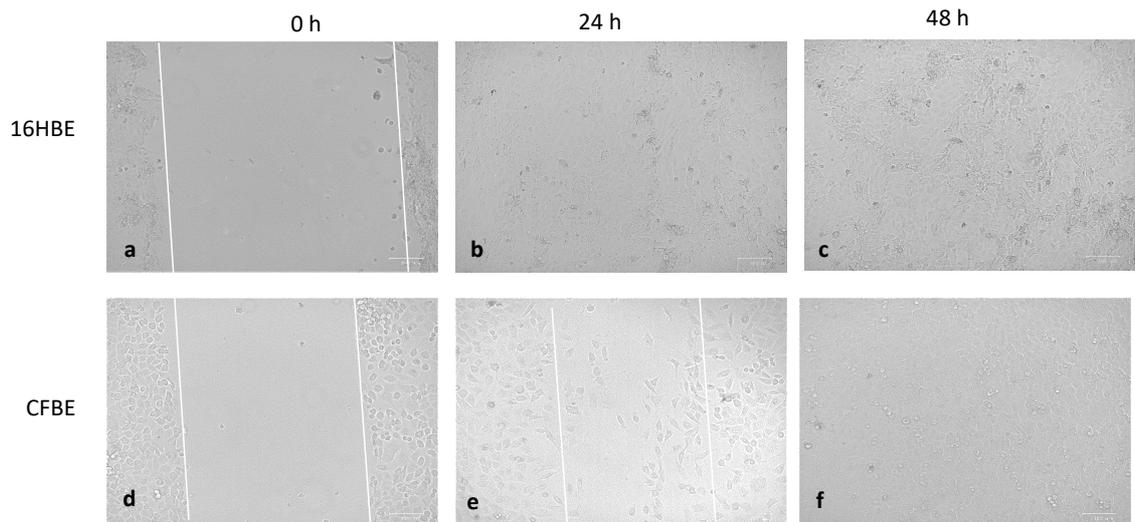


Figura 34. Chiusura della ferita su monostrato di cellule 16HBE (a-b-c) e CFBE14o- (d-e-f), cresciute su piastra da 24 well, rispettivamente a t.0 (a-d), 24h (b-e) e 48h (c-f).

Dal momento che i dati ottenuti confermano che la rigenerazione e la riparazione dell'epitelio respiratorio fibrocistico sono difettivi, si è provveduto a valutare sia la velocità di chiusura della ferita simulata su un monostrato di cellule in co-cultura (hAMSC: CFBE), sia se l'aggiunta di hAMSC potesse velocizzare la chiusura della ferita simulata sul monostrato di cellule CFBE, cresciute su piastra da 24 well. La figura 35 mostra che l'aggiunta di hAMSC sulla ferita riesce a recuperare il danno già dopo 24 ore (Fig.35 G), ciò non avviene sulla ferita con sole CFBE (Fig.35 C) mentre sulle co-culture, allo stesso tempo, i lembi della ferita appaiono più ravvicinati ma non completamente uniti (Fig.35 K). Le cellule hAMSC sono facilmente riconoscibili e distinguibili rispetto alle cellule epiteliali bronchiali grazie alla loro conformazione allungata.

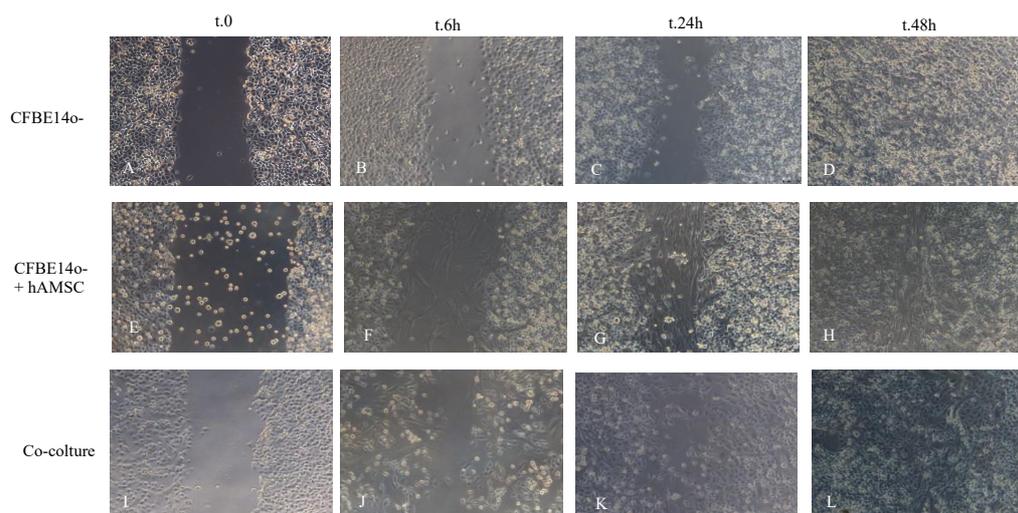


Figura 35. Confronto di chiusura della ferita su monostrato di CFBE, CFBE con aggiunta di hAMSC successivamente e co-culture. A-B-C-D sono CFBE ai tempi 0, 6, 24 e 48 ore; E-F-G-H sono CFBE con la successiva aggiunta di hAMSC ai tempi 0, 6, 24, 48 ore; I-J-K-L sono le co-culture ai tempi 0, 6, 24 e 48 ore.

La simulazione della ferita sulla condizione di co-cultura è stata, poi, eliminata per focalizzare l'attenzione sulla sola aggiunta delle hAMSC. Quest'ultima condizione, infatti, si avvicina in maniera più verosimile ad una situazione reale e potrebbe essere più facilmente tramutata in possibile terapia da effettuare su pazienti con FC. Anche l'analisi della chiusura della ferita a 6 ore non è più stata valutata poiché si tratta di un tempo troppo breve per evidenziare cambiamenti significativi sulla chiusura della ferita.

Per comprendere se la riparazione del danno sui monostrati di CFBE fosse velocizzata dall'aggiunta di hAMSC sono stati condotti esperimenti di simulazione della ferita bloccando la proliferazione delle CFBE dal momento che la proliferazione cellulare fa parte del processo di riparazione delle ferite epiteliali, insieme alla migrazione.

Il blocco è necessario per assicurare che siano solo le hAMSC a proliferare e riparare il danno, valutando, così, anche il ruolo relativo della proliferazione rispetto alla migrazione delle CFBE nella riparazione.

Per bloccare la proliferazione cellulare, bisogna agire sul processo di mitosi. È possibile bloccare la mitosi utilizzando dei metodi chimici (es. colcemid) o metodi fisici (es. radiazioni γ).

È stato utilizzato dapprima un metodo chimico, usando diverse concentrazioni di colcemid che, con il suo effetto antimitotico, blocca la cellula nello stadio di metafase della mitosi. La colchicina lega la β -tubulina, subunità fondamentale dei microtubuli, in un sito vicino alla α -tubulina in eterodimero, e il suo legame forza il dimero in una configurazione piegata che non è compatibile con la normale polimerizzazione. Ciò determina un effetto antimitotico nella cellula, che viene bloccata allo stadio di metafase per la mancata genesi del fuso mitotico. L'azione depolarizzante della colchicina è substechiometrica, basta che solo il 5% dei dimeri di tubulina nella cellula siano legati alla colchicina per arrestare la cellula in mitosi. È importante considerare, quando si usa la colchicina, che le sue costanti di velocità di associazione e dissociazione per il legame alla tubulina sono estremamente lente, motivo per cui si è soliti usare il colcemid come strumento di ricerca. Il colcemid, infatti, si lega alla tubulina nello stesso sito della colchicina, ma circa 10 volte più velocemente e si dissocia anche più velocemente (Florian S. *and* Mitchinos T.J.; 2016).

I risultati hanno evidenziato che concentrazioni basse di colcemid (1 ng/ml, 3 ng/ml e 10 ng/ml) non riescono a bloccare completamente la proliferazione, ma sono in grado solo di rallentare la crescita cellulare (Fig. 36).

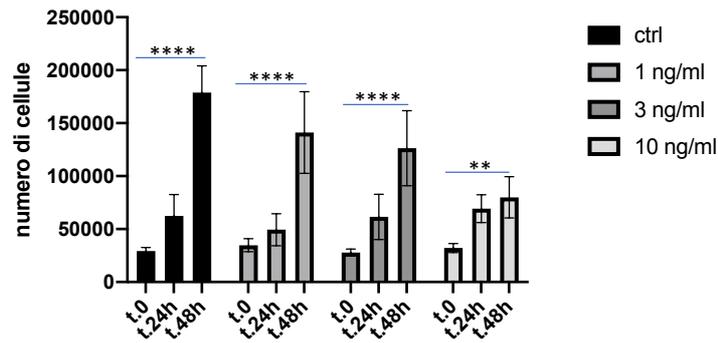


Figura 36. Il grafico mostra il numero di cellule CFBE, contate dopo il trattamento con basse concentrazioni di colcemid, a tempo 0, dopo 24h e 48h e cellule ctrl, non trattate con colcemid. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. One-way ANOVA test.

Sono quindi state testate concentrazioni più alte di colcemid direttamente sul monostrato di cellule, cresciute su piastra da 24 well, su cui è stata simulata la ferita. I risultati hanno mostrato che concentrazioni alte di colcemid (200 ng/ml e 400 ng/ml) danneggiano le cellule rendendo il monostrato di CFBE non più uniforme ma disgregato, rendendo difficile riconoscere la ferita simulata e indicando che tali concentrazioni sono tossiche. Concentrazioni intermedie di colcemid (50 ng/ml e 100 ng/ml), invece, sono in grado di bloccare la proliferazione delle cellule CFBE senza danneggiarle, ma soltanto fino a quando il colcemid è presente nel terreno di coltura. Nel momento in cui il terreno con colcemid viene eliminato per essere sostituito con terreno MEM completo, mezzo utile per la successiva aggiunta delle cellule hAMSC sulla ferita e per evitare che anche le hAMSC siano coinvolte dall'effetto anti proliferativo del farmaco, l'effetto del colcemid viene meno ed il monostrato di epitelio danneggiato si rimargina già 24 ore dopo la sostituzione del medium. Tale risultato non consente di utilizzare neanche le concentrazioni intermedie di colcemid per bloccare la proliferazione delle CFBE.

Sulla base di questi risultati si è scelto di utilizzare un metodo alternativo, di tipo fisico, per bloccare la proliferazione cellulare: le radiazioni gamma (raggi γ). Si tratta di radiazioni elettromagnetiche, a frequenza molto alta, prodotte dal decadimento

radioattivo dei nuclei atomici. Sono tra i fattori di danno cellulare più significativi: la radiazione che attraversa le cellule ionizza ed eccita gli atomi e le molecole della struttura cellulare alterandoli e generando specie chimicamente instabili come ioni o radicali. Questi ultimi, a loro volta, possono interagire con altre molecole dando luogo a nuove alterazioni, in particolare a livello del DNA. Le doppie rotture (*Doble Strand Breaks*, DSB) sono considerate le lesioni più critiche del DNA indotte da radiazioni ionizzanti. La presenza di DSB porta ad una complessa risposta da parte della cellula, che consiste in una cascata di eventi che coinvolgono la percezione del danno, trasduzione del segnale a effettori cellulari, arresto del ciclo cellulare e, talvolta, morte cellulare per apoptosi (Reisz *et al.*, 2014).

Tra i dispositivi in grado di produrre radiazioni gamma ce ne sono fondamentalmente di due tipi: dispositivi contenenti isotopi e dispositivi contenenti un tubo a raggi X. I primi, in generale, sono costituiti da una o più sorgenti radioattive incapsulate [cobalto-60 (^{60}Co), o Cesio-137 (^{137}Cs)] chiuse in un contenitore cavo schermato. Fa parte del dispositivo anche un sistema elevatore, che permette di spostare la sorgente radioattiva in modo tale che sia in grado di irradiare il campione. Alcuni dispositivi contenenti isotopi sono dotati, inoltre, di un piatto girevole per posizionare il campione di fronte alla sorgente. La seconda tipologia utilizza un convenzionale tubo a raggi X racchiuso in un contenitore cavo schermato. In alcuni casi il tubo a raggi X è in grado di emettere raggi X a 360° intorno al suo piano cilindrico.

Per gli esperimenti è stato utilizzato un dispositivo contenente l'isotopo Cesio-137 e per valutare la dose, Gy, a cui irradiare le cellule senza comprometterne la vitalità, sono state effettuate delle prove preliminari che hanno permesso di escludere i Gy più bassi (1-3 Gy) in quanto non in grado di bloccare la proliferazione delle CFBE. Sono state testate dosi di energia più alte e ne è stato valutato l'effetto sul numero di cellule a diversi tempi,

dopo irradiazione con 10, 15 e 20 Gy e semina su piastra da 24 *well*. Il confronto ha mostrato che, nella condizione di irradiazione con 10 Gy, il numero di cellule cresce sia dopo 24 ore, sia dopo 48 ore, in modo molto simile al controllo. Le condizioni di irradiazione con 15 e 20 Gy, hanno mostrato, invece, un blocco nella crescita cellulare sia a 24 ore, sia a 48 ore rispetto al tempo 0, con unica differenza che la condizione a 20 Gy evidenzia una minore vitalità cellulare a 48 ore rispetto alla condizione di CFBE irradiate con 15Gy (Fig.37).

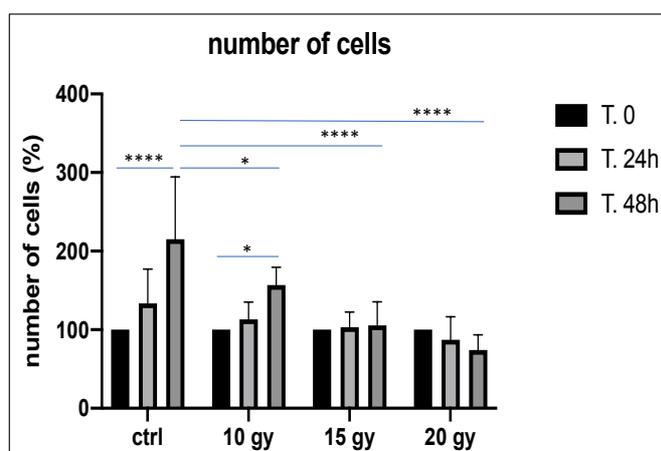


Figura 37. Numero di cellule a diversi tempi dopo irradiazione con 10 Gy, 15 Gy e 20 Gy. I risultati sono espressi in percentuale (%), confrontando i tempi 24 h e 48 h di ogni condizione al rispettivo tempo 0 rappresentato come 100%. I dati sono mostrati come media \pm S.D. di tre esperimenti. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$. One-way ANOVA test.

Anche il risultato relativo alla conta dei nuclei (Fig. 38 a) e alla misurazione della loro fluorescenza (Fig. 38 b), dopo colorazione con DAPI, mostra che la condizione di irradiazione con 15 Gy è in grado di mantenere un numero di nuclei costante tra 24 e 48 ore dopo irradiazione, mentre nella condizione di esposizione a 10 Gy il numero di nuclei e, conseguentemente, la misurazione della fluorescenza, aumenta. La condizione di irradiazione a 20 Gy, invece, evidenzia un minor numero di nuclei e della fluorescenza ad essi associata a 48 ore (Fig.38 a-b).

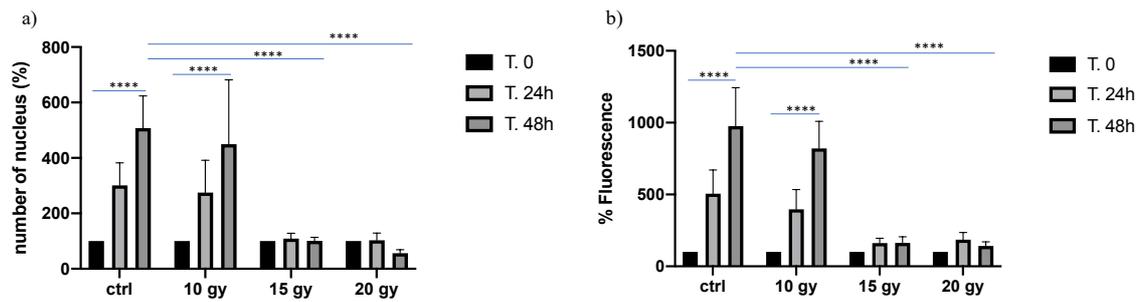


Figura 38. a) Numero di nuclei contati dopo irradiazione con 10 Gy, 15 Gy e 20 Gy e colorazione con DAPI ai tempi 0, 24h e 48h. b) Fluorescenza associata ai nuclei colorati con DAPI dopo irradiazione con 10 Gy, 15 Gy e 20 Gy ai tempi 0, 24h e 48h. Tutti i risultati sono espressi in % rispetto al t. 0 di ciascuna condizione rappresentato come 100%. I dati sono mostrati come media \pm S.D. di tre esperimenti. **** $p < 0.0001$. One-way ANOVA test.

La figura 39 mostra un pannello in cui si possono confrontare immagini dei nuclei colorati con DAPI al tempo 0, dopo 24 ore e 48 ore nelle quattro condizioni testate, ossia controllo, 10 Gy, 15 Gy e 20 Gy. Anche questa sequenza di immagini mostra in modo abbastanza chiaro che solo nella condizione di 15 Gy il numero di nuclei resta costante.

I risultati di questi esperimenti preliminari hanno portato a concludere che la giusta dose di energia assorbita necessaria a bloccare la proliferazione delle cellule CFBE fosse quella pari a 15 Gy. Tale dose è stata utilizzata per gli esperimenti successivi, evitando l'irradiazione a 20 Gy, che mostra una compromissione della vitalità cellulare.

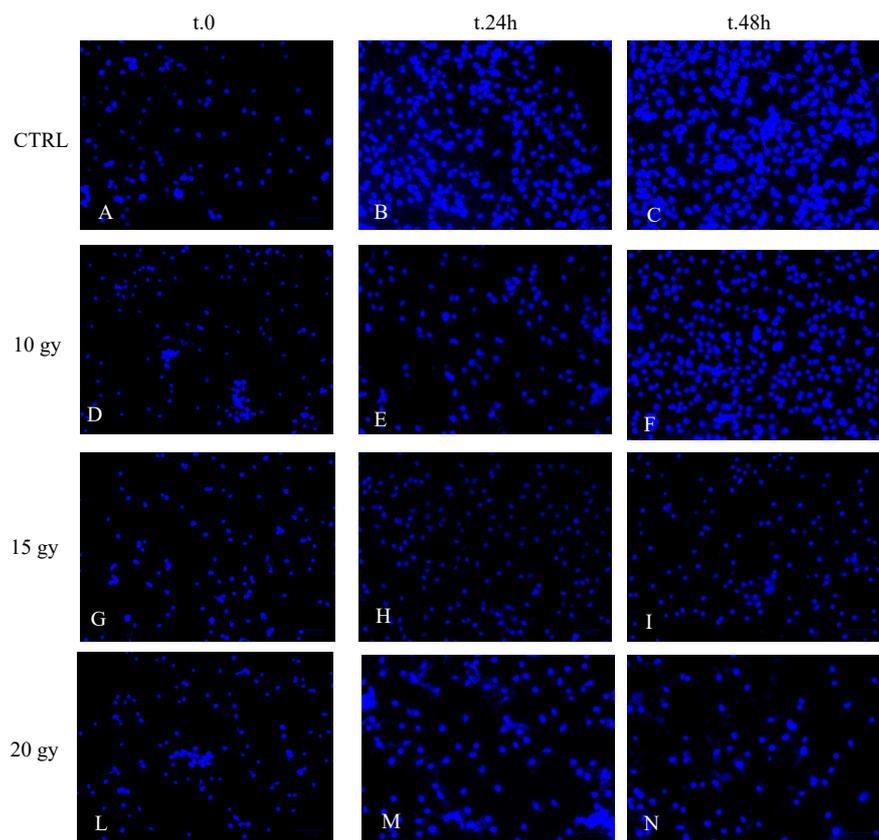


Figura 39. Effetto dell'irradiazione sul numero di nuclei colorati con DAPI. Vengono mostrate immagini dei nuclei delle CFBE irradiate alle dosi di 10 Gy, 15 Gy e 20 Gy o non irradiate (CTRL), a tempo 0, dopo 24h e 48h, relativamente al CTRL (A-B-C); a 10 Gy (D-E-F); a 15 Gy (G-H-I); a 20 Gy (L-M-N).

Inoltre, per esigenze tecniche relative all'irradiazione, i successivi esperimenti sono stati condotti su piastre Petri da 60 mm, anziché su pozzetti di piastre da 24 *well*. Per cui, gli esperimenti di riparazione della ferita sono stati ripetuti in questa condizione.

I risultati hanno mostrato che le cellule 16HBE mantengono la capacità di chiudere la ferita già 24 ore dopo il taglio, mentre le CFBE impiegano più di 48 ore (Fig. 40, a-b-c per le 16HBE, d-e-f per le CFBE), confermando i dati ottenuti sui pozzetti.

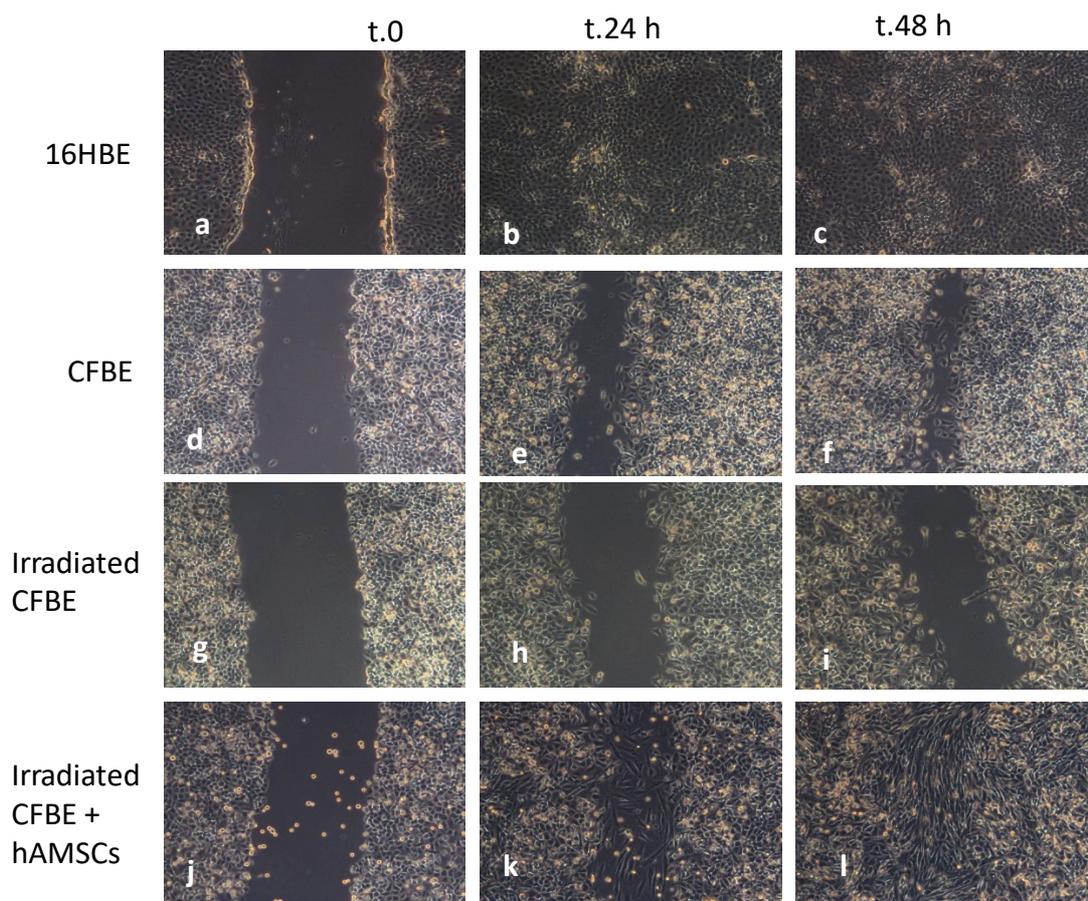


Figura 40. Chiusura della ferita su monostrato di cellule 16HBE (a-b-c) e CFBE (d-e-f), rispettivamente a t.0 (a-d), t.24h (b-e) e t.48h (c-f). Mancata chiusura della ferita su monostrato di CFBE irradiate a 15 Gy, rispettivamente a t.0 (g), t.24h (h) e t.48h (i). Chiusura della ferita simulata su monostrato di CFBE irradiate a 15 Gy con l'aggiunta di hAMSC, rispettivamente a t.0 (j), t.24h (k) e t.48h (l). Tutte le immagini mostrano ferite effettuate su monostrati di cellule cresciute su piastre Petri da 60 mm.

Relativamente alla chiusura della ferita, la condizione di irradiazione a 15 Gy evidenzia che l'ampiezza della ferita si riduce lievemente a 24 ore e 48 ore rispetto al tempo 0, molto probabilmente per effetto della migrazione, ma resta comunque ampia (Fig. 40, g-h-i).

Al fine di valutare se le hAMSC fossero in grado di velocizzare la riparazione del danno, le cellule CFBE, cresciute su piastre Petri da 60 mm, raggiunta la confluenza e formato un monostrato, sono state danneggiate per simulare una ferita e irradiate con una dose di energia pari a 15 Gy. Subito dopo il trattamento, sulle cellule epiteliali sono state aggiunte

hAMSC in rapporto 1:5. I risultati dimostrano che le cellule staminali sono in grado di riparare la ferita già dopo 24 ore dall'aggiunta di queste ultime sul monostrato di CFBE, recuperando il difetto di rigenerazione e riparazione dell'epitelio respiratorio fibrocistico. Il danno è completamente riparato dopo 48 ore (Fig.40, j-k-l).

4.9 VALUTAZIONE DELLA MIGRAZIONE DELLE CELLULE CFBE140- E hAMSC CON MEDIUM CONDIZIONATO

Dopo la lesione, le cellule epiteliali, i macrofagi e i fibroblasti rilasciano fattori di crescita che, legandosi ai recettori presenti sulle cellule epiteliali respiratorie, inducono mitosi, migrazione e variazione morfologica che facilitano la riparazione (Puchelle *et al.*, 2006; Knight D, 2001). Per valutare quanto la migrazione dei due tipi cellulari interessati sia coinvolta nella riparazione della ferita su monostrato di CFBE, dopo aggiunta di hAMSC, è stato effettuato un esperimento di chemiotassi. È stata valutata la migrazione delle CFBE e delle hAMSC, sottoposte allo stimolo derivante dal medium condizionato recuperato a tempo 0, a 24 e 48 ore dalla ferita e dall'irradiamento delle cellule CFBE.

I risultati mostrano che sia le CFBE che le hAMSC migrano dalla porzione apicale del *transwell* alla porzione basale. In particolare, si può osservare che le CFBE migrano alla stessa maniera sia verso il medium condizionato (delle 24h e delle 48h) sia verso il medium non condizionato (t.0) (Fig.41). Le hAMSC migrano in maggior numero rispetto alle CFBE e la loro migrazione sembra aumentare con i medium condizionati.

Questi risultati, seppur preliminari, indicano che, oltre alla proliferazione, anche la migrazione delle hAMSC sia coinvolta nella riparazione della ferita. La migrazione basale delle cellule CFBE, inoltre, potrebbe spiegare il motivo per cui, nonostante l'irradiazione delle cellule a 15 Gy, l'ampiezza della ferita si riduca leggermente dopo 24

e 48 h (Fig.40, h-i). Ulteriori esperimenti di chemiotassi, anche a tempi intermedi (6 h) aiuteranno a confermare e ad approfondire questi risultati.

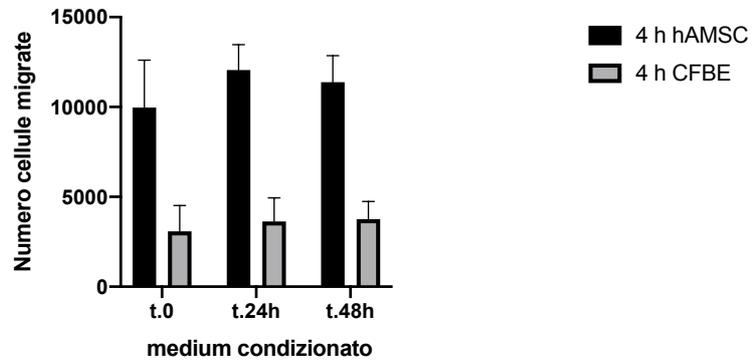


Figura 41. Numero di cellule migrate dalla porzione apicale del *transwell* a quella basale in cui sono presenti medium condizionati ottenuti sul monostrato di CFBE subito dopo taglio e irradiazione a 15 Gy (t.0), dopo 24 h e 48h dal taglio e irradiazione (rispettivamente t.24h e t.48h).

5. CONCLUSIONI

Diversi lavori presentano le hAMSC, come fonte nuova, promettente, facilmente ed eticamente accessibile di cellule pluripotenti da poter utilizzare nella medicina rigenerativa.

In questo lavoro di tesi, in modo specifico, le cellule hAMSC isolate da placenta a termine sono state usate in esperimenti *in vitro*, al fine di valutare la loro efficacia e il loro possibile utilizzo nel contesto della terapia cellulare per la FC. Questo elaborato consegue alla dimostrazione che le hAMSC siano in grado di recuperare alcuni dei difetti di base legati alla patologia, come il basso efflusso di cloro dipendente dalla proteina-canale CFTR, l'aumentato assorbimento di liquido dipendente dal canale ENaC, la disorganizzazione del citoscheletro di actina e delle TJ. Rilevante per il trattamento della FC è la proprietà delle hAMSC, in co-coltura con le cellule CFBE, di differenziare in cellule simil-epiteliali, così come quella di poter acquisire l'espressione del CFTR a livello dell'mRNA e della proteina. Tale effetto è, con molta probabilità, indotto dal contatto con le cellule FC, infatti questo studio, focalizzandosi sulle GJ, suggerisce fortemente che la comunicazione intercellulare mediata da queste ultime svolga un ruolo rilevante nel favorire la correzione dei difetti di base della patologia. Ulteriori studi dovranno essere effettuati per comprendere se le GJ svolgano un ruolo anche nella riorganizzazione del citoscheletro di actina e delle proteine delle TJ, un effetto precedentemente osservato nelle co-culture. Infine, anche l'inibizione dell'iperassorbimento di fluido, che sembra essere un effetto importante nella terapia della malattia polmonare associata alla FC, dovrà essere indagata in presenza di *active siRNA Cx43*.

In questo lavoro di tesi, inoltre, si è cercato anche di comprendere il ruolo che i *miRNA* possano avere nella comunicazione intercellulare tra hAMSC e cellule epiteliali FC e nel recupero della funzionalità ed espressione della CFTR. I dati preliminari di espressione

mostrano che *miRNA-138*, un *miRNA* chiave nell'espressione della CFTR, è espresso dalle hAMSC e, pertanto, ulteriori studi saranno necessari per svelare il suo preciso ruolo nel recupero della CFTR nelle co-culture.

Appare centrale anche il coinvolgimento delle hAMSC nel recupero del difetto di rigenerazione e riparazione dell'epitelio delle vie aeree FC. Sia nelle co-culture, sia in seguito all'aggiunta delle cellule staminali ad una ferita simulata su CFBE, si assiste ad una velocizzazione della riparazione del danno, processo alterato nella FC, con conseguenze fisiopatologiche determinanti l'insufficienza respiratoria, come la fibrosi e le bronchiectasie. In particolare, appare rilevante, per le sue applicazioni, il modello dell'aggiunta di hAMSC alla ferita epiteliale, che dovrebbe essere ottenuta somministrando, in modelli *in vivo* di danno all'epitelio delle vie aeree, le hAMSC tramite la via respiratoria. Esistono, comunque, molte barriere all'integrazione delle cellule staminali nell'epitelio delle vie aeree FC, che hanno rappresentato un ostacolo anche ad una efficiente terapia genica, tra le quali la più rilevante è rappresentata dal muco denso e viscoso che le ricopre. È quindi preconizzabile l'intervento con le hAMSC in seguito ad un pre-trattamento con mucolitici che, determinando una certa degradazione del muco, possano meglio far arrivare le cellule staminali all'epitelio FC in corso di riparazione. Auspicabilmente, la loro integrazione nello strato basale dell'epitelio FC porterebbe ad una continua rigenerazione dello stesso ed a una corretta espressione della CFTR con il recupero di tutti i difetti che si generano a valle. È molto importante ricordare che le hAMSC possono essere tollerate dal sistema immune e secernono esse stessi fattori anti-infiammatori e immunomodulanti, potendo quindi essere somministrate hAMSC allogeniche rispetto all'individuo da trattare.

La conseguenza di questi risultati è che la somministrazione di cellule hAMSC ai fini della terapia cellulare della FC dovrebbe essere perseguita come tale e cioè sotto forma

di sospensione cellulare. Al momento però, non è possibile escludere un ruolo da parte di fattori solubili secreti dalle hAMSC, quando indotte a diventare epiteliali, oppure secreti dalle stesse cellule FC quando crescono in co-coltura con le hAMSC. Del resto, anche in questo ultimo caso, le GJ tra i due tipi cellulari potrebbero giocare un ruolo importante.

Questi studi *in vitro* su cellule immortalizzate dovranno essere corroborati da ulteriori studi in cui cellule epiteliali primarie saranno utilizzate come modello di cellule con FC. Le cellule immortalizzate possono presentare delle anomalie dopo numerosi passaggi *in vitro* e, quindi, talvolta perdere alcune caratteristiche biologiche epiteliali. D'altro canto, prima di poter indicare la membrana amniotica come fonte utilizzabile in clinica di cellule staminali utili per una terapia cellulare per la FC, studi pre-clinici *in vivo* nel modello animale FC dovranno essere effettuati.

BIBLIOGRAFIA

Abbasi-Kangevari M, Ghamari SH, Safaeinejad F, Bahrami S, Niknejad H. (2019) “Potential Therapeutic Features of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: Immunomodulation, Inflammation Suppression, Angiogenesis Promotion, Oxidative Stress Inhibition, Neurogenesis Induction, MMPs Regulation, and Remyelination Stimulation.” Front Immunol. **10**:238.

Alfonso-Sánchez MA, Pérez-Miranda AM, García-Obregón S, Peña JA (2010). “An evolutionary approach to the high frequency of the Delta F508 CFTR mutation in European populations.” Med Hypotheses. **74** (6):989-92

Amaral, M.D. (2015) “Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients.” J Intern Med, **277** (2):155-166.

Amaral MD, Quaresma MC, Pankonien I (2020). “What Role Does CFTR Play in Development, Differentiation, Regeneration and Cancer?” Int J Mol Sci. **21** (9):3133

Ambrosi G, et al. Embriologia e organogenesi in Anatomia dell'uomo. Edi. Ermes, Editor 2001: Milano.

Badri L, Walker NM, Ohtsuka T, Wang Z, Delmar M, Flint A, Peters-Golden M, Toews GB, Pinsky DJ, Krebsbach PH, Lama VN (2011). “Epithelial interactions and local engraftment of lung-resident mesenchymal stem cells.” Am J Respir Cell Mol Biol. **45** (4):809-16.

Boucher RC (2007). "Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease." J Intern Med. **261** (1):5-16.

Brugha R. E. and Davies J. C. (2011). "*Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and new treatments." Br J Hosp Med (Lond). **72** (11): 614-619.

Caci E, Melani R, Pedemonte N, Yueksekdag G, Ravazzolo R, Rosenecker J, Galiotta LJ, Zegarra-Moran O. (2009) "Epithelial sodium channel inhibition in primary human bronchial epithelia by transfected siRNA" Am J Respir Cell Mol Biol. **40** (2):211-6.

Cai J, Weiss ML, Rao MS. (2004) "In search of stemness." Exp Hematol. **32**:585-598.

Caplan AI. (2007) "Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine." J Cell Physiol. **213** (2): 341-7.

Carbone A., Castellani S., Favia M., Diana A., Paracchini V., Di Gioia S., Seia M., Casavola V., Colombo C., Conese M. (2014) "Correction of defective CFTR/ENaC function and tightness of cystic fibrosis airway epithelium by amniotic mesenchymal stromal (stem) cells." J. Cell. Mol. Med.**10**: 1-13.

Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A, Signoroni PB, Nassuato C, Arienti D, Lombardi G, Albertini A, Wengler GS, Parolini O. (2009) "Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis." Cell Transplant. **18** (4):405-22

Cargnoni A, Romele P, Bonassi Signoroni P, Farigu S, Magatti M, Vertua E, Toschi I, Cesari V, Silini AR, Stefani FR, Parolini O (2020). “Amniotic MSCs reduce pulmonary fibrosis by hampering lung B-cell recruitment, retention, and maturation.” Stem Cells Transl Med. **9** (9):1023-1035.

Castellani S., Guerra L., Favia M., Di Gioia S., Casavola V., Conese M. (2012) “NHERF1 and CFTR restore tight junction organisation and function in cystic fibrosis airway epithelial cells: role of ezrin and the RhoA/ROCK pathway.” Laboratory Investigation. **92** (11):1527–1540.

Chanson M, Berclaz PY, Scerri I, Dudez T, Werneke-Dollries K, Pizurki L, Pavirani A, Fiedler MA, Suter S. (2001) “Regulation of gap junctional communication by a pro-inflammatory cytokine in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-expressing but not cystic fibrosis airway cells”. Am J Pathol. **158** (5):1775-84.

Conese M., Castellani S., D’Oria S., Di Gioia S., Montemurro P (2017). “Role of Neutrophils in Cystic Fibrosis Lung Disease. In “Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis”, Maitham Abbas Khajah editor, IntechOpen, London, UK

Cooney AL, McCray PB Jr, Sinn PL (2018). “Cystic Fibrosis Gene Therapy: Looking Back, Looking Forward.” Genes (Basel). **9** (11):538

Conti L. and Cattaneo E. (Ottobre 2011) “Il punto sulle staminali” Le Scienze, vol. 518.

Crosby, L.M. and C.M. Waters. (2010) “Epithelial repair mechanisms in the lung.” Am J

Physiol Lung Cell Mol Physiol. **298** (6): L715-31.

Cruz FF, Rocco PRM (2020). "The potential of mesenchymal stem cell therapy for chronic lung disease." Expert Rev Respir Med. **14** (1):31-39

De Boeck K., Wilschanski M., Castellani C., Taylor C., Cuppens H., Dodge J., Sinaasappel M. and Group D. W. (2006). "Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms." Thorax. **61** (7): 627-635.

De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, et al. (2007) "Isolation of amniotic stem cells lines with potential for therapy." Nature Biotechnology. **25**:100-106.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006) "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy. **8** (4): 315-7.

Fire A., Xu S., Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature. **391** (6669): 806-11.

Florian S. et Mitchison TJ (2016). "Anti-microtubule drugs". Methods Mol Biol. **1413**:403-21.

Fortier L. (2005) "Classifications, Controversies, and Clinical Applications Surgery."

Stem Cells. **34**: 415–423.

Ge, Q., et al. (2004) “Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference”. Proc Natl Acad Sci U S A. **101** (23): 8676-81.

Götherström C, Ringdén O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. (2004) “Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells.” Am J Obstet Gynecol. **190** (1): 239-45.

Grinnemo KH, Månsson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringdén O, Sylvén C, Le Blanc K. (2004) “Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium.” J Thorac Cardiovasc Surg. **127** (5): 1293-300.

Hajj R., Lesimple P., Nawrocki-Raby B., Birembaut P., Puchelle E., Coraux C. (2007). “Human Airway Surface Epithelial Regeneration Is Delayed and Abnormal in Cystic Fibrosis” J Pathol. **211** (3), 340-50.

Hansen-Smith FM, Carlson BM. (1979) “Cellular responses to free grafting of the extensor digitorum longus muscle of the rat.” J. Neurol. Sci. **41** (2): 149-173.

Hindson, C.M., Chevillet, J.R., Briggs, H.A., Gallichotte E.N., Ruf I.K., Hidson B.J., Vessella R.L., Tewari M. (2013). “Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR.” Nature methods. **10**:1003-5.

Hima Bindu, A. and B. Srilatha (2011). "Potency of various types of stem cells and their transplantation." J Stem Cell Res Ther **1** (3).

Høiby N. (2011). "Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis." BMC Med. **9**: 32.

Hong X, Sin WC, Harris AL, Naus CC (2015). "Gap junctions modulate glioma invasion by direct transfer of microRNA." Oncotarget.**6**:15566-15577

Huang, G. L., N. N. Zhang, et al. (2012). "Transdifferentiation of human amniotic epithelial cells into acinar cells using a double-chamber system." Cell Reprogram **14** (4): 377-383.

Huang W (2017). "MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics." Methods Mol Biol. **1617**:57-67

Jones PH. (1982) "In vitro comparison of embryonic myoblasts and myogenic cells isolated from regenerating adult rat skeletal muscle." Exp. Cell Res. **139** (2): 401-404.

Karamanou M., Tsoucalas G., Pantos K., Androutsos G. (2018). "Isolation Colchicine in 19th Century: an old drug revisited." Curr Pharm Des. **24** (6):654-658.

Karaoz, E., P. C. Demircan, et al. (2011). "Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Histochem Cell Biol **136** (4): 455-473.

Karlsson H, Erkers T, Nava S, Ruhm S, Westgren M, Ringdén O. (2012) “Stromal cells from term fetal membrane are highly suppressive in allogeneic settings in vitro.” Clin Exp Immunol. **167** (3):543-55.

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989). “Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis.” Science. **245** (4922):1073-80

Knight D (2001). “Epithelium-fibroblast interactions in response to airway inflammation.” Immunol Cell Biol. **79** (2):160-4

Kumar NM., Gilula NB. (1996) “The gap junction communication channel.” Cell. **84** (3):381-8.

Landgraf P., Rusu M., Sheridan R., Sewer A., Iovino N., Aravin A., Pfeffer S., Rice A., Kamphorst A.O., Landthaler M., Lin C., Succi N.D., Hermida L., Fulci V., Chiaretti S., Foà R., Schliwka J., Fuchs U., Novosel A., Müller R.U., Schermer B., Bissels U., Inman J., Phan Q., Chien M., Weir D.B., Choksi R., De Vita G., Frezzetti D., Trompeter H.I., Hornung V., Teng G., Hartmann G., Palkovits M., Di Lauro R., Wernet P., Macino G., Rogler C.E., Nagle J.W., Ju J., Papavasiliou F.N., Benzing T., Lichter P., Tam W., Brownstein M.J., Bosio A., Borkhardt A., Russo J.J., Sander C., Zavolan M., Tuschl T. (2007). “A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing.” Cell. **129** (7):1401-14.

Lee HK, Finniss S, Cazacu S, Bucris E., Ziv-Av A., Xiang C., Bobbitt K., Rempel SA., Hasselbach L., Mikkelsen T., Slavin S., Brodie C. (2013). “Mesenchymal stem cells

deliver synthetic microRNA mimics to glioma cells and glioma stem cells and inhibit their cell migration and self-renewal.” Oncotarget. **4** :346-361

Lemcke H, Steinhoff G, David R (2015). “Gap junctional shuttling of miRNA--A novel pathway of intercellular gene regulation and its prospects in clinical application.” Cell Signal. **27** (12):2506-14

Li Y, Kowdley KV (2012). “MicroRNAs in common human diseases.” Genomics Proteomics Bioinformatics. **10** (5):246-53

Li J., Koike-Soko C., Sugimoto J., Yoshida T., Okabe M., Nikaido T. (2015) “Human Amnion-Derived Stem Cells Have Immunosuppressive Properties on NK Cells and Monocytes.” Cell Transplant **24** (10):2065–2076.

Li JY, Ren KK, Zhang WJ, Xiao L, Wu HY, Liu QY, Ding T, Zhang XC, Nie WJ, Ke Y, Deng KY, Liu QW, Xin HB. (2019) “Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway.” Stem Cell Res Ther. **10** (1):247.

Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. (2000) “Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep.” Nat Med. **6** (11): 1282-6.

Lim R. (2017) “Fetal Membranes in Regenerative Medicine: New Tricks from an Old Dog?” Stem Cells Transl Med. **6** (9):1767-1776.

Lucarelli M. *et al.*; Analisi genetica in Fibrosi Cistica – Consensus 2019 (rev. 1.0 – 21 Dicembre 2019). <https://www.sifc.it/documenti-e-pubblicazioni/linee-guida/>

Ludwig N., Leidinger P., Becker K., Backes C., Fehlmann T., Pallasch C., Rheinheimer S., Meder B., Stähley C., Meese E., Keller A. (2016) “Distribution of miRNA expression across human tissues.” Nucleic Acids Research, vol.**44**:3865-3877.

Magatti M., De Munari S., Vertua E., Nassauto C., Albertini A., Wengler GS, Parolini O. (2009) “Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes.” Cell Transplant **18** (8)899–914

Magaña-Guerrero FS, Domínguez-López A, Martínez-Aboytes P, Buentello-Volante B, Garfias Y. (2017) “Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells inhibit Neutrophil Extracellular Traps through TSG-6.” Sci Rep. **7** (1):12426.

Magatti, M., Vertua E., De Munari S., Caro M., Caruso M., Silini A., Delgado M., Parolini O. (2016) “Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features.” J Tissue Eng Regen Med. **11** (10):2895-2911

Mansilla E, Marin GH, Sturla F, Drago HE, Gil MA, Salas E, Gardiner MC, Piccinelli G, Bossi S, Salas E, Petrelli L, Iorio G, Ramos CA, Soratti C. (2005) “Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries.” Transplant

Proc. **37** (1): 292-4.

Markov V, Kusumi K, Tadesse MG, William DA, Hall DM, Lounev V, Carlton A, Leonard J, Cohen RI, Rappaport EF, Saitta B. (2007) "Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles." Stem Cells Dev. **16** (1): 53-73.

Marwan E El-Sabban, Lina F Abi-Mosleh, Rabih Shabik Talhouk (2003) "Development Regulation of Gap Junctions and Their Role in Mammary Epithelial Cell Differentiation." Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia **8** (4):463-73.

McKiernan PJ, Greene CM (2015). "MicroRNA Dysregulation in Cystic Fibrosis." Mediators Inflamm. **2015**:529642.

Menachem Hanani. (2012) "Lucifer yellow- an angel rather than the devil." J Cell Mol Med. **16** (1): 22-31.

Menon S., Shailendra S., Quarto N. (2016). "An Overview of Direct Somatic Reprogramming: The Ins and Outs of iPSCs." Int J Mol Sci **17** (1)141.

Miki T., Strom SC (2006) "Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells" Stem Cell Rev. **2** (2): 133-42.

Miotto E., Saccenti E., Lupini L., Callegari E., Negrini M., Ferracin M. (2014). "Quantification of circulating miRNAs by Droplet Digital PCR: Comparison of

EvaGreen- and TaqMan- based chemistries.” CEBP. **23** (12):2638-42.

Obokata H., Wakayama t., Sasai Y., Kojima K., Vacanti MP, Niwa H., Yamato M., Vacanti CA. (2014) “Retraction: Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency.” Nature **511** (7507):112.

O'Grady S.M. (2017) “CFTR Involvement in Cell Migration and Epithelial Restitution.” Progress in Understanding Cystic Fibrosis (Book). Doi: 10.5772/66309

Ooi CY, Durie PR (2016). “Cystic fibrosis from the gastroenterologist's perspective.” Nat Rev Gastroenterol Hepatol. **13** (3):175-85

Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. (1996) “Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities.” Development. **122** (8): 2339-48.

Paracchini V., Carbone A., Colombo F., Castellani S., Mazzucchelli S., Di Gioia S., Degiorgio D., Seia M., Porretti L., Colombo C., Conese M. (2012) “Amniotic Mesenchymal Stem Cells: A New Source for Hepatocyte-Like Cells and Induction of CFTR Expression by Coculture with Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells.” Journal of Biomedicine and Biotechnology **2012**: 575471.

Peltier HJ and Latham GJ (2008). “Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues.” RNA **14**(5):844-852

Pianta, S., Bonassi Signoroni P., Muradore I., Francis Rodrigues M., Rossi D., Silini A., Parolini O. (2015). "Amniotic membrane mesenchymal cells-derived factors skew T cell polarization toward Treg and downregulate Th1 and Th17 cells subsets." Stem Cell Rev Rep **11** (3)394–407

Piccoli C, D'Aprile A, Scrima R, Ambrosi L, Zefferino R, Capitanio N. (2012) "Subcytotoxic mercury chloride inhibits gap junction intercellular communication by a redox- and phosphorylation-mediated mechanism." Free Radic Biol Med **52** (5):916-27.

Phillipson G. (1998) "Cystic fibrosis and reproduction" Reprod Fertil Dev **10** (1):113-9.

Pranke I, Golec A, Hinzpeter A, Edelman A, Sermet-Gaudelus I (2019). "Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. From Gene Editing to Personalized Medicine." Front Pharmacol. **10**:121

Prasad R., Sharma H., Kaur G. (2010) "Molecular Basis of Cystic Fibrosis Disease: An Indian Perspective." Ind J Clin Biochem **25** (4):335–341.

Prayle AP, Smyth AR (2013). "From pipeline to patient: new developments in cystic fibrosis therapeutics." Expert Opin Pharmacother. **14** (3):323-9

Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C (2006). "Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease." Proc Am Thorac Soc. **3** (8):726-33

Ramachandran S., Karp P.H., Jiang P., Ostedgaard L.S., Walz A.E., Fisher J.T., Keshavjee S., Lennox K. A., Jacobi A.M., Rose S.D., Behlke M.A., Welsh M.J., Xing Y., McCray Jr P.B. (2012) “A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.” PNAS **109** (33):13362-13367

Ramkisoensing AA, Pijnappels DA, Swildens J, Goumans MJ, Fibbe WE, SchaliJ MJ, de Vries AA, Atsma DE. (2012) “Gap junctional coupling with cardiomyogenic differentiation of cocultured human mesenchymal stem cells.” Stem Cells. **30** (6):1236-45.

Ratjen F (2006). “Restoring Airway Surface Liquid in Cystic Fibrosis.” NEJM **354** (3):291-3.

RIFC, Registro Italiano Fibrosi Cistica, <http://www.registroitalianofibrosicistica.it>.

Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdui CM (2014). “Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection.” Antioxid Redox Signal. **21** (2):260-92

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al (1989). “Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.” Science. **245** (4922):1066-73

Robbins and Cotran. (2014) “Pathologic Basis of Disease” Kumar V., Abbas A.K., Aster

J.C., Elsevier.

Robbins and Cotran. (2015) “Pathologic Basis of Disease” Kumar V., Abbas A.K., Aster J.C., Elsevier.

Rossi D., Pianta, S., Magatti, M., Sedlmayr, P., Parolini, O. (2012). “Characterization of the conditioned medium from amniotic membrane cells: prostaglandins as key effectors of its immunomodulatory activity.” PLoS One **7** (10): e46956

Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. (2005) “Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection.” J Inflamm (Lond). **26**:2:8.

Saint-Criq V, Gray MA (2017). “Role of CFTR in epithelial physiology.” Cell Mol Life Sci. **74** (1):93-115.

Schiller, K.R., P.J. Maniak, and S.M. O'Grady. (2010) “Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair”. Am J Physiol Cell Physiol, **299** (5): C912-21.

Scotet V, L'Hostis C, Férec C (2020) “The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the CFTR Gene Discovery”. Genes (Basel). **11** (6):589.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal D, Huggins GR, Gearhart JD. (1998) “Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells.” Proc Natl Acad Sci. **95**: 13726-13731.

Silini A., Parolini O., Berthold H., Ingrid L. (2013) "Soluble Factors of Amnion-Derived Cells in Treatment of Inflammatory and Fibrotic Pathologies." *Current Stem Cell Research & Therapy*.vol.**8**, 6-14.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. (1988) "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." *Nature*. **336**:688-690.

Solan JL., Lampe PD. (2014) "Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo." *FEBS Lett*. **588** (8):1423-9.

Southern K. W. (2007). "Cystic fibrosis and formes frustes of CFTR-related disease." *Respiration*.**74** (3): 241-251.

Sprandling A., Drummond-Barbosa D., Kai T. (2001) "Stem cells find their niche." *Nature*. **414**: 98-104.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126** (4): 663-676.

Taylor-Cousar JL, Mall MA, Ramsey BW, McKone EF, Tullis E, Marigowda G, McKee CM, Waltz D, Moskowitz SM, Savage J, Xuan F, Rowe SM (2019). "Clinical development of triple-combination CFTR modulators for cystic fibrosis patients with one or two F508del alleles." *ERJ Open Res*. **5** (2):00082-2019

Thomas, M., et al. (2005) "Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung." Proc Natl Acad Sci USA. **102** (16): 5679-84.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998) "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science. **282** (5391): 1145-7.

Trinh, N.T., Privé A., Maillé E., Noel J., Brochiero E. (2008) "EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair". Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, **295** (5):866-80

Turnbull AR, Davies JC (2016). "New drug developments in the management of cystic fibrosis lung disease." Expert Opin Pharmacother. **17** (8):1103-12

Ullah I., Subbarao RB., Rho GJ. (2015). "Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective." Biosci Rep **35** (2):e00191.

Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, Potapova I, Zuckerman J, Walcott B, Robinson RB, Rosen MR, Brink PR, Cohen IS. (2004) "Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions". J Physiol. **555** (3):617-26.

Wabik, A. and P. H. Jones (2015). "Switching roles: the functional plasticity of adult tissue stem cells." EMBO J **34** (9): 1164-1179.

Wang G., Bunnell B.A., Painter R.G., Quiniones B.C., Tom S., Lanson N.A., Jr., Spees J.L., Bertucci D., Peister A., Weiss D.J., Valentine V.G., Prockop D.J. and Kolls J.K. (2005) “Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: Potential therapy for cystic fibrosis” *PNAS*, vol. 102, no.1:186-191.

Wilschanski M, Novak I (2013). “The cystic fibrosis of exocrine pancreas.” Cold Spring Harb Perspect Med. **3** (5):009746

Wolbank, S., Peterbauer A., Fahrner M., Hennerbichler S., van Griensven M., Stadler G., Redl H., Gabriel C. (2007). “Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue.” Tissue Eng **13** (6)1173–1183

Yan K, Zhang R, Chen L, Chen F, Liu Y, Peng L, Sun H, Huang W, Sun C, Lv B, Li F, Cai Y, Tang Y, Zou Y, Du M, Qin L, Zhang H, Jiang X. (2014) “Nitric oxide-mediated immunosuppressive effect of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells on the viability and migration of microglia.” Brain Res. **1590**:1-9.

PUBBLICAZIONI

- **Beccia E.**, Carbone A., Cecchino L.R., Pedicillo M.C., Annacontini L., Lembo F., Di Gioia S., Parisi D., Angiolillo A., Pannone G., Portincasa A., Conese M. (2020) “Adipose stem cells and PRP induce vascular-like structures in a Dermal Regeneration Template”. Tissue Engineering, Part A (Ahead of Print) doi: 10.2089/ten.tea.2020.0175
- Conese M., Annacontini L., Carbone A., **Beccia E.**, Cecchino L.R., Parisi D., Di Gioia S., Lembo F., Angiolillo A., Mastrangelo F., Lo Muzio L., Portincasa A. (2020). “The role of Adipose-Derived Stem Cells, Dermal Regenerative Templates, and Platelet-Rich Plasma in Tissue Engineering-Based Treatments of Chronic Skin Wounds”. Stem Cells International 7056261.
- Matteo M., **Beccia E.**, Carbone A., Castellani S., Milillo L., Lauritano D., Di Gioia S.; Angiolillo A., Conese M. (2019). “Effect of mother's age and pathology on functional behavior of amniotic mesenchymal stromal cells-Hints for bone regeneration”. Applied Sciences **9** (17), 3471.
- Carbone A., Zefferino R., **Beccia E.**, Casavola V., Castellani S., Di Gioia S., Giannone V., Seia M., Angiolillo A., Colombo C., Favia M., Conese M. (2018). “Gap Junction are involved in the rescue of CFTR-dependent chloride efflux by Amniotic Mesenchymal Stem Cells in Coculture with Cystic Fibrosis CFBE41o-Cells” Stem Cells International 1203717.
- Conese M., **Beccia E.**, Carbone A., Castellani S., Di Gioia S., Corti F., Angiolillo A., Colombo C. (2018). “The role of stem cells in cystic fibrosis disease modeling and drug discovery”. Expert Opinion on Orphan Drugs. 6(12):707-717.
- Conese M., **Beccia E.**, Castellani S., Di Gioia S., Colombo C., Angiolillo A., Carbone A. (2018). “The long and winding road: stem cells for cystic fibrosis” Expert Opinion on Biological Therapy. 18(3).

- Conese M., Carbone A., **Beccia E.**, Angiolillo A. (2017). “The Fountain of Youth: A tale of parabiosis, stem cells, and rejuvenation.” Open Medicine 12, 376-383.

COMUNICAZIONI A CONGRESSO

- **Beccia E.** (2017) “Amniotic mesenchymal stem cells for cell therapy of cystic fibrosis: involvement of gap junctions in the rescue of CFTR-dependent chloride efflux”. XXIII Congresso Italiano della Fibrosi Cistica SIFC, Napoli. Comunicazione orale
- **Beccia E.** (2017) “Gap junctions are involved in the rescue of CFTR-dependent chloride efflux by amniotic mesenchymal stem cells in co-culture with cystic fibrosis CFBE41o- cells”. VIII Meeting Stem Cell Research Italy SCR, Chieti. Comunicazione orale
- Conese M., Annacontini L., **Beccia E.**, Cecchino L.R., Parisi D., Di Gioia S., Lembo F., Portincasa A. (2020). “New experimental perspectives in adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma in tissue engineering-based treatment of chronic skin wounds”. ESCI Virtual Meeting 2020 - covid edition.
- Portincasa A., Conese M., Cecchino L.R., Lembo F., **Beccia E.**, Di Gioia S., Annacontini L., Parisi D. (2020). “New clinical protocols of employment of adipose derived stem cells (adscs) and dermal regeneration template (DRT)”. ESCI Virtual Meeting 2020 -covid edition.

RINGRAZIAMENTI

Non c'è due senza tre. Ed eccomi di nuovo qui, alla fine di un percorso formativo che tanto mi ha insegnato e mi ha aiutata a crescere tanto professionalmente quanto umanamente.

Tante sono le persone da ringraziare. Ognuna ha partecipato, in modi diversi ma tutti importanti, a permettermi di raggiungere questo bel traguardo.

Provo a ringraziare tutti sperando di non dimenticare nessuno.

Desidero ringraziare la prof.ssa Antonella Angiolillo per la sua presenza costante e la sua disponibilità continua. Con la sua dolcezza, la sua comprensione e i suoi sorrisi mi ha seguita in questo lavoro di tesi. Il suo esserci, anche se spesso dietro lunghe telefonate, è stato per me un sostegno importante.

Un grazie doveroso e sentito va al prof. Massimo Conese, co-tutor di questa tesi, ma già correlatore della mia tesi magistrale. Ha continuato ad accogliermi nel suo laboratorio con grande disponibilità e gentilezza anche per questo percorso di dottorato così da proseguire insieme i tanti progetti sperimentali iniziati ed elaborarne sempre di nuovi. Devo a lui, e al suo gruppo di ricerca attuale e passato, tutto quello che ho imparato in laboratorio in questi anni. Lo ringrazio perché, essendo un vulcano di idee, è stato per me uno stimolo continuo a sperimentare cose nuove. Ringrazio il prof. Sante Di Gioia sempre pronto ad aiutarmi mettendo a disposizione le sue competenze e conoscenze.

Ringrazio con affetto le colleghe storiche di questi lunghi anni di laboratorio, Piera, Giorgia, Antonella, Annalucia, Pia, Nicoletta, Rosanna, ormai care amiche e confidenti, ma anche le nuove arrivate Katia, Giorgia, Valeria, Giorgia che tra un sorriso e un caffè sono riuscite sempre ad incoraggiarmi e sostenermi nei momenti più critici e ad aiutarmi mettendomi a disposizione le loro competenze. Ringrazio Niamat sempre pronto ad addolcire le mie giornate con tanta cioccolata. Ringrazio Onofrio, conosciuto da poco, ma sempre pronto ad aiutarmi con esperimenti e grafici ed offrirmi un caffè con la sua contagiosa allegria.

Un grazie di cuore va alla mia grande e stupenda famiglia. Quella che ho formato con mio marito, Gianfranco, e le mie bimbe, Miriam ed Emma, sono loro tre a darmi la forza di proseguire ogni giorno in questa stupenda avventura che è la vita. Il loro amore, i loro sorrisi, i loro abbracci, il loro supporto, contribuiscono fortemente a far andare tutto per

il verso giusto anche e soprattutto quando mi chiedo chi me lo abbia fatto fare ad intraprendere questa strada non sempre facile e comoda. E ringrazio quella famiglia che mi ha permesso di arrivare dove sono arrivata oggi, mamma Clara e papà Edoardo, i genitori migliori che potessi desiderare, che ogni giorno mi hanno incoraggiata e sostenuta, tranquillizzandomi quando le cose non andavano come io avrei voluto e spingendomi a guardare sempre ciò che c'è di buono in ogni situazione. Grazie perché continuate ad accompagnarmi con i vostri consigli e il vostro amore non facendomi mai mancare il vostro sostegno. Grazie a Mercedes ed Alberto, a Giuseppe e Chiara, a Giovanna ed Antonio, a Loreta, a Giulia e Patrizio, che non mi hanno mai fatto mancare il loro pensiero e il loro affettuoso sostegno, la loro vicinanza e il loro entusiasmo sono per me stimolo e forza ogni giorno. Ringrazio Mario, so che è sempre al mio fianco. Grazie a Domenico e Filomena, a Daniela e Mino, il loro aiuto dietro le quinte è stato fondamentale per concludere questo percorso. Non posso non ringraziare i miei nipoti, Michele, Enrique, Clara, Aurora, Edoardo, Giorgia e Laura, la loro gioia e i loro sorrisi sono contagiosi e danno sempre la carica giusta.

Un grazie agli “amici del condominio”, Rosaria e Gianfranco, Nina, Consiglia e Mimi, Giulia e Antonella, sono molto più che amici, sono quella famiglia che ho avuto la fortuna di poter scegliere, sempre pronti a fare da zie e zii-sitter con le mie piccole e a non far mancare il loro “tifo da stadio”.

Ringrazio gli amici di sempre, Dina, Annamaria, Pina e Francesco, Angelo, ci sono sempre stati, sono la mia famiglia allargata e il loro sostegno lo sento sempre forte e chiaro, come le loro preghiere.

Un grazie speciale a Gianfranco che con amore è sempre al mio fianco sopportando pazientemente le mie ansie e tensioni, risolvendo continuamente i miei problemi con file e pc, incoraggiandomi e gioendo con me di ogni piccolo traguardo raggiunto sognando nuovi traguardi da raggiungere ancora insieme.

Vi ringrazio tutti con affetto,

Elisa.