

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN :
BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
INDIRIZZO: SCIENZE EPATOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

CICLO XXIII

**Ruolo della via di segnale di Wnt5a nel fenotipo dei miofibroblasti
sub-epiteliali intestinali in corso di Colite Ulcerosa**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Pier Paolo Parnigotto

Supervisore: Dott. Andrea Buda

Co-supervisore :Ch.mo Prof. Ignazio Castagliuolo

Dottorando : Laura Nai

ABSTRACT

Background: Wnts are a highly conserved family of secreted glycoproteins involved in several physiological and pathological processes. Intestinal subepithelial myofibroblasts (ISEMFs), a cellular population releasing growth factors and cytokines involved in tissue remodelling, have been recently identified as a source of Wnts ligands. Since Wnt5a, the main ligand of the non-canonical pathway, plays a pivotal role in intestinal epithelial repair and is up-regulated in chronic inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis, the aim of our study was to evaluate, in ISEMFs derived from normal subjects and ulcerative colitis (UC) patients, the expression of Wnt5a and its receptors and determine its autocrine role on ISEMFs. *Methods:* ISEMFs were isolated from colonic mucosa of healthy subjects (n=6) or from patients with UC (n=10). Wnt5a and Frzd1, 2, 4, 5 expressions was evaluated by quantitative RT-Time PCR and Western Blot. To determine the autocrine effect of Wnt5a, we performed functional studies using Wnt5a KO by shRNA or exposing ISEMFs to human recombinant Wnt5a. Following 96 hours culture, cell proliferation was quantitated by 3H-thymidine incorporation and cell cycle analysis. To evaluate anti-apoptotic role of Wnt5a, we performed functional studies exposing ISEMFs to human recombinant Wnt5a and staurosporin. Following 24 hours culture Annexin V and caspase-3 assay was estimated. To identify pathway induced by Wnt5a signal, functional studies using β -catenin KO by shRNA or exposing ISEMFs to Ca^{2+} inhibitors was performed and CamKII protein levels was measured by Western blot. *Results:* UC-derived ISEMFs showed a significantly higher Wnt5a expression at mRNA and protein level ($p < 0.05$) in basal condition as compared to controls. Furthermore, as compared to controls UC-derived ISEMFs produced significantly higher amounts of Wnt5a following exposure to LPS or TGF β ($p < 0.05$). ISEMFs derived both normal and UC patients showed a similar pattern of Wnts receptors. Wnt5a silencing in UC-derived ISEMFs and in control ISEMFs, caused a significant reduction in cell proliferation ($p < 0.05$). Indeed, rWnt5a supplementation stimulated cell proliferation and resistance to staurosporin induced-apoptosis. Wnt5a signal is β -catenin independent because supplementation of rWnt5a in KO β -catenin ISEMFs led to a significative increase of cell proliferation ($p < 0.05$). On the contrary, Wnt5a signal seems to be mediated by CamKII, promoting an increase of its phosphorylation. *Conclusions:* ISEMFs from UC patients produce an excess of Wnt5a that is able to stimulate cellular proliferation, resistance to apoptosis and that acts by CamKII

activation. We speculate that Wnt5a plays a key role to expand the ISEMFs population in UC patients and might contribute to tissue damage and remodeling during chronic inflammation.

INDICE

ABSTRACT

1. SOMMARIO	1
2. INTRODUZIONE	3
2.1 Le malattie infiammatorie croniche intestinali	3
2.2 La Rettocolite Ulcerosa	6
2.3 Terapia farmacologica per il trattamento delle IBD	7
2.4 Tipi cellulari coinvolti nell'infiammazione cronica intestinale	10
2.5. Miofibroblasti sub-epiteliali intestinali (ISEMFs)	12
2.6 La via di segnale di Wnt	14
2.7 La via di segnale di Wnt nell'intestino	15
2.8 Biosintesi e Secrezione delle proteine di Wnt	16
2.9 Recettori, agonisti e Antagonisti per Wnt	17
2.10 La via canonica	18
2.11 La via non canonica	18
2.12 Wnt5a nello sviluppo	20
2.13 Wnt5a nel cancro	20
2.14 Wnt5a nell'infiammazione cronica	23
2.15 Vie che inducono la secrezione di Wnt5a	23
3. SCOPO	25
4. MATERIALI E METODI	27
4.1 Selezione dei pazienti e raccolta dei tessuti	27
4.2 Score di attività di malattia	27
4.3 Immunofluorescenza (IF) ed immunohistochimica (IHC)	29
4.4 Isolamento e coltura dei miofibroblasti subepiteliali intestinali umani	29
4.4.1 Caratterizzazione dei miofibroblasti intestinali subepiteliali (ISEMFs)	30
4.5 Estrazione dell'RNA totale	31
4.6 Retrotrascrizione (RT) e reazione a catena della polimerasi (PCR)	32
4.7 Allestimento di curve standard per PCR quantitativa	32
4.7.1 Ligazione del prodotto di PCR nel vettore pGEM [®] -T (TA cloning)	32
4.7.2 Caratteristiche del vettore pGEM [®] -T	33
4.7.3 Trasformazione in cellule batteriche	34
4.7.4 Verifica del clonaggio	35
4.7.5 Sequenziamento genico	35
4.7.6 Preparazione della curva standard per PCR quantitativa	36
4.8 Determinazione dei livelli di mRNA mediante RT-PCR Real Time	37
4.9 Western Blotting (WB)	38
4.10 Produzione di vettori adenovirali per silenziamento genico	39
4.10.1 Caratteristiche del plasmide pAd/BLOCK-IT [™] -DEST e del plasmide di trasferimento pENTR [™] /U6	40
4.10.2 Progettazione degli oligonucleotidi codificanti per i shRNA	41
4.10.3 Generazione degli oligonucleotidi a doppio filamento (ds oligo)	41
4.10.4 Ligazione dei ds oligo nel vettore di trasferimento pENTR [™] /U6	42
4.10.5 Trasformazione in cellule batteriche competenti <i>E.coli</i> One	

Shot [®] TOP10	42
4.10.6 Verifica del clonaggio di ds oligo nel vettore di trasferimento pENTR [™] /U6	42
4.10.7 Verifica dell'efficacia di silenziamento	43
4.10.8 Ricombinazione LR per la produzione di costrutti adenovirali ricombinanti	43
4.10.9 Trasfezione del genoma adenovirale ricombinante in cellule di packaging	44
4.10.10 Amplificazione dell'adenovirus ricombinante	45
4.10.11 Titolazione dell'adenovirus ricombinante mediante metodo Tissue Culture Infection Dose (TCID ₅₀)	45
4.11 Saggio d'infettività su ISEMFs	46
4.12 Silenziamento di Wnt5a in ISEMF mediante AdshRNA	46
4.13 Determinazione della proliferazione cellulare mediante saggio con Timidina Triziata	47
4.14 Ciclo cellulare e citometria di flusso	48
4.15 Apoptosi e analisi morfologica dell'apoptosi con l'anessina V	51
4.16 Analisi statistica	53
5. RISULTATI	55
5.1. Espressione di Wnt5a in corso di Rettocolite Ulcerosa	55
5.1.1 L'espressione di Wnt5a è aumentata nella mucosa colica sede di infiammazione attiva nei pazienti affetti RCU	55
5.1.2 I livelli di mRNA di Wnt5a correlano con gli score di attività di malattia clinica ed endoscopica	57
5.1.3 L'aumento dell'espressione di Wnt5a nella colite attiva in corso di RCU è mantenuta dai miofibroblasti sub-epiteliali intestinali (ISEMFs)	57
5.2 Espressione di Wnt5a in miofibroblasti sub-epiteliali intestinali (ISEMFs) in vitro	58
5.2.1 Wnt5a è aumentato in ISEMFs derivati da RCU	58
5.2.2 TGFβ ed LPS modulano l'espressione di Wnt5a in ISEMFs	59
5.3 Silenziamento di Wnt5a mediante short hairpin RNA	60
5.3.1 Costruzione del vettore adenovirale per il silenziamento di Wnt5a mediante shRNA	60
5.3.2 Verifica del silenziamento di Wnt5a in ISEMFs	61
5.4. Ruolo di Wnt5a sul fenotipo di ISEMFs.	62
5.4.1 Verifica dell'espressione dei recettori di Wnt5a in ISEMFs derivati da pazienti controllo e da Rettocolite Ulcerosa (RCU)	62
5.4.2 Wnt5a agisce in maniera autocrina su ISEMFs promuovendo la proliferazione cellulare	63
5.4.3 Wnt5a promuove la divisione cellulare e diminuisce la fase SubG0 del ciclo cellulare	64
5.4.4 Wnt5a promuove la resistenza all'apoptosi indotta dalla staurosporina	66
5.5 Vie di segnale coinvolte nell'effetto pro-proliferativo di Wnt5a sulle ISEMFs	68
5.5.1 Verifica del ruolo di Wnt5a nella via canonica	68
5.5.2 Coinvolgimento della CamKII nella proliferazione mediata da Wnt5a	69

6. DISCUSSIONE	71
7. ABBREVIAZIONI	77
8. BIBLIOGRAFIA	79

1. SOMMARIO

Wnt5a rappresenta il ligando prototipo della via non canonica di Wnt, via di segnale coinvolta nei processi di embriogenesi, riparazione tissutale e carcinogenesi dell'epitelio intestinale. Fisiologicamente, Wnt5a agisce sulla migrazione e proliferazione di tipi cellulari diversi coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi epiteliale, fungendo da mediatore nel dialogo tra epitelio e mesenchima. Numerosi dati sperimentali suggeriscono inoltre che l'aumento di Wnt5a possa essere un meccanismo comune dell'infiammazione cronica in quanto è sovra-espresso nell'artrite reumatoide, nell'aterosclerosi e nella psoriasi.

Abbiamo pertanto iniziato ad esaminare il ruolo di Wnt5a nell'infiammazione cronica intestinale.

Il modello preso in esame è rappresentato da miofibroblasti subepiteliali intestinali (ISEMFs) da Rettocolite Ulcerosa (RCU). Le ISEMFs sono cellule coinvolte nell'omeostasi intestinale: nell'intestino rappresentato il maggior sito di produzione del collagene e di altre proteine della matrice extracellulare, promuovendo dunque il rimodellamento tessutale. Inoltre interagiscono con le cellule epiteliali, le staminali e i macrofagi promuovendo e la restituzione epiteliale e la secrezione di citochine e chemochine. Si è osservato che nella mucosa dei pazienti affetti da IBD, il numero di queste cellule è significativamente aumentato rispetto a quello della mucosa sana, e che un'alterazione della loro funzionalità è coinvolto nella fisiopatologia delle IBD.

L'aumentata espressione di Wnt5a a livello trascrizionale e proteico è stata verificata in soggetti affetti da RCU, con correlazione diretta con il grado di attività di malattia. Studi di immunisto chimica hanno permesso, mediante co-localizzazione con α -SMA, di osservare la distribuzione di Wnt5a nel tessuto e la sua preponderante espressione in miofibroblasti sub epiteliali. La caratterizzazione di Wnt5a è stata dunque effettuata su miofibroblasti primari estratti da mucosa di Rettocolite Ulcerosa e tessuto controllo. Cellule derivate da tessuto infiammato hanno mostrato maggiori livelli di espressione proteica di Wnt5a. Dosaggi del trascritto e western blotting hanno permesso di osservare che il TGF β e LPS sono in grado promuovere una sovra-espressione di Wnt5a nei miofibroblasti intestinali. Abbiamo quindi condotto dei saggi per verificare se Wnt5a regolasse caratteristiche fisiologiche e fenotipiche nelle ISEMFs stesse. A tal fine, dopo aver verificato la presenza dei recettori per Wnt5a, abbiamo iniziato degli studi di tipo funzionale mediante RNA interference (RNAi) per lo spegnimento genico (*loss of function*); perciò abbiamo messo a punto la metodica per il Knockdown di Wnt5a in colture primarie di ISEMFs con vettori adenovirali codificanti shRNA. Viceversa sono stati condotti degli studi di *gain of function* supplementando al terreno di coltura cellulare la proteina purificata rWnt5a. Sono stati effettuati dei saggi proliferazione rilevata mediante il metodo dell'incorporazione della timidina triziata da cui emerso che nelle ISEMFs Wnt5a promuove la proliferazione. Inoltre sono stati effettuati dei saggi sul ciclo cellulare mediante colorazione di ioduro di propidio e di resistenza all'apoptosi mediante annessina V e test di attivazione della caspasi-3, da cui emerge che questa glicoproteina promuove la sopravvivenza cellulare.

Complessivamente questi dati sembrano indicare che Wnt5a ha il ruolo di promuovere l'espansione e il mantenimento di questo tipo cellulare e quindi di perpetuare il danno tissutale e l'infiammazione cronica intestinale in RCU.

2.INTRODUZIONE

2.1 Le malattie croniche intestinali

Le malattie infiammatorie croniche intestinali, conosciute nella comunità scientifica internazionale con l'acronimo inglese IBD (*Inflammatory Bowel Disease*), includono varie patologie, tra le quali le più comuni sono Rettocolite Ulcerosa (RUC) e Morbo di Crohn

(CD). Queste patologie, la cui eziopatogenesi è ancora oggetto di studio, coinvolgono primariamente l'apparato gastrointestinale e sono caratterizzate da un andamento cronico con fasi alternate di remissione e riacutizzazione[12]. Le IBD si manifestano soprattutto in soggetti giovani con un picco d'incidenza tra la seconda e la terza decade, che può variare con l'etnia e l'area geografica. In Italia vengono diagnosticati 3-4 nuovi casi all'anno di Morbo di Crohn e circa 8 di Rettocolite Ulcerosa ogni 100000 abitanti. L'incidenza di nuovi casi di IBD è maggiore nelle popolazioni del nord Europa e del nord America e si è osservata una maggiore incidenza nei migranti da sud a nord, soprattutto nella seconda metà del ventesimo secolo [2]. L'ipotesi eziopatogenetica delle IBD più accreditata attualmente è che in soggetti geneticamente predisposti, si verifichi nella mucosa un'anomala ed inappropriata risposta immunitaria ad antigeni ambientali [44]. Si ritiene, infatti, che la flora microbica intestinale fisiologicamente determini una continua stimolazione del sistema immunitario inducendo una minima risposta infiammatoria nella mucosa intestinale dei soggetti sani. Detta risposta potrebbe essere esagerata in soggetti geneticamente portatori di difetti della funzione di barriera della parete intestinale, anomalie del sistema immunitario o di alterata produzione di peptidi ad attività antimicrobica causa di distiasi. La complessità dei fattori implicati nello sviluppo delle IBD rendono ragione della loro classificazione tra le patologie cosiddette multi-fattoriali. Molteplici e di varia natura sono, infatti, i fattori coinvolti nello sviluppo delle malattie infiammatorie dell'intestino:

- fattori **ambientali**: l'insorgenza delle patologie infiammatorie croniche intestinali è associata al progresso sociale ed economico che si è verificato nel XX secolo prima osservato nei Paesi nordici dell'Europa e dell'America, poi altrove [5]. L'ipotesi dell'igiene riconosce un ruolo importante al consumo di cibi microbiologicamente più controllati e al crescente ricorso a vaccini e farmaci (antibiotici, FANS) con conseguente alterazione della flora microbica intestinale e ridotta capacità di risposta ad antigeni batterici. Ciò comporterebbe, in soggetti predisposti, un'aumentata suscettibilità, non solo verso le malattie infiammatorie intestinali, ma anche verso altre patologie autoimmunitarie ed allergiche.
- fattori **genetici**: è stato osservato che il Morbo di Crohn e la Rettocolite Ulcerosa ricorrono in particolar modo in membri della stessa famiglia che appartengono alla stessa generazione (fratello-sorella) o a generazioni incrociate (genitore-figlio). Diversi studi hanno individuato l'esistenza di una concordanza del 50-60% per il

Morbo di Crohn e del 10% per la Rettocolite Ulcerosa in gemelli omozigoti [41]. Tale concordanza non sussiste per circa il 40% dei soggetti aventi lo stesso genotipo, a dimostrazione del fatto che i fattori genetici non sono gli unici fattori coinvolti nella patogenesi. L'ereditarietà rappresenta pertanto un importante fattore di rischio il Morbo di Crohn e studi in campo genetico hanno focalizzato l'attenzione sul cromosoma 16, in particolare sul gene CARD15 il quale codifica per una proteina citosolica, il NOD2. Tale proteina riconosce l'MDP (muramil-dipeptide), componente della parete batterica e regola l'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB e l'apoptosi dei macrofagi. Nel gene che codifica per il NOD2 sono state individuate tre principali mutazioni localizzate sul dominio ricco di leucina del gene CARD15, o in prossimità. Tali mutazioni sono Leu1007fs (3020insC), Gly908Arg, Arg702Trp e sono associate al Morbo di Crohn che colpisce l'ileo distale: infatti il gene CARD15/Nod2 è costitutivamente espresso nelle cellule di Paneth le quali sono presenti a livello ileale. Almeno una di queste tre mutazioni è presente nel 25-35% dei soggetti Europei e nord-americani affetti da Morbo di Crohn, ma non in pazienti Afro-americani e asiatici. Oggetto di studio sono oggi i polimorfismi riguardanti il cromosoma 5 (gene OCTN1 e OCTN2) e il cromosoma 10 (gene DLG5).

- fattori **immunitari**: il sistema immunitario intestinale è continuamente esposto ad un'ampia gamma di antigeni di natura microbica e di origine alimentare che sono in grado di instaurare quell'evento noto come "infiammazione fisiologica", rappresentato da un'abbondante infiltrato leucocitario a livello della mucosa che, in condizioni non patologiche, viene limitato con successo grazie ad un appropriato controllo della risposta immunitaria, innata ed acquisita [41]. Come già affermato, però, alla base delle IBD sembra essere presente un'anomala attività del sistema immunitario intestinale, da cui scaturirebbe la cronicità del processo infiammatorio. I fattori genetici, ambientali e psicologici probabilmente collaborano nel sostenere l'attivazione della risposta immunitaria a livello della mucosa intestinale. Alcuni studi hanno individuato che l'immunità innata è attivata in maniera simile nel Morbo di Crohn e in Rettocolite Ulcersa, mentre ciò che consente di distinguere le due patologie è l'immunità acquisita, in quanto il profilo di attivazione appare diverso [2]. Nella mucosa intestinale di pazienti con Morbo di Crohn si evidenzia la significativa presenza di linfociti CD4+ con fenotipo cellulare 1 T-helper (Th1) responsabili della produzione di INF γ , IL-2 e sovraespressione dei fattori di

trascrizione delle cellule linfocitarie Th1. Contrariamente, nella mucosa di soggetti con RCU dominano linfociti CD4+ con un fenotipo cellulare 2 T-helper atipico, i quali si caratterizzano per la produzione di IL-5 e TGF- β . La cronicità del processo di flogosi è legata al fatto che le citochine dell'immunità innata attivano i macrofagi che producono IL-12, IL-18 ed il fattore inibitorio della migrazione dei macrofagi; sono rilasciate ulteriori potenti citochine infiammatorie quali TNF α , IL-1 β e IL-6, favorendo l'amplificazione e la persistenza del processo infiammatorio [42].

- agenti **biologici**: non si può attualmente ancora escludere la possibilità che l'eziologia delle IBD possa essere legata ad agenti infettivi. Particolare attenzione è riservata al *M. paratuberculosis* e al *M. avium* subspecies *paratuberculosis*, i quali in alcuni studi sono riconosciuti come possibile causa, nonostante non ne sia stata dimostrata la correlazione con le malattie infiammatorie intestinali [54].
- fattori **psicologici**: fattori emozionali sono considerati come potenziali agenti in grado di scatenare e sostenere un processo infiammatorio nell'ambito delle IBD. È stato infatti evidenziato come lo stress possa comportare l'alterazione della permeabilità della mucosa con deregolazione della secrezione di acqua ed elettroliti nel lume intestinale. Viene alterata anche l'espressione di citochine e neuropeptidi [54]. Lavori sperimentali nell'animale suggeriscono che lo stress possa aggravare o scatenare la colite sperimentale nell'uomo.
- **fumo**: diversi studi hanno evidenziato come il fumo di sigaretta rappresenti un fattore protettivo per la Rettocolite Ulcerosa e un fattore di rischio per il Morbo di Crohn. L'azione protettiva nella RCU è stata dimostrata attraverso studi randomizzati placebo-controllo nei quali è stato osservato un miglioramento del quadro clinico per il 40-50% dei pazienti a cui è stata somministrata nicotina. Si pensa che il beneficio legato al fumo di sigaretta sia secondario agli elevati livelli di nicotina oppure al contributo dato da altri componenti. Tecniche di meta-analisi hanno invece individuato nel fumo di sigaretta un fattore di rischio per il Morbo di Crohn, tanto che i soggetti fumatori hanno una probabilità due volte maggiore di sviluppare la patologia rispetto ai non fumatori. Inoltre il mantenimento del vizio del fumo dopo una resezione chirurgica aumenta il rischio di recidiva. L'associazione fumo-IBD però non è valida per tutte le etnie e le aree geografiche, a sostegno ancora una volta dell'importanza del contributo dei fattori ambientali allo sviluppo della malattia infiammatoria intestinale. Uno studio condotto sul fumo passivo ha

poi evidenziato come l'esposizione al fumo in gravidanza e nella prima infanzia aumenti il rischio di comparsa del Morbo di Crohn .

2.2 La Rettocolite Ulcerosa

La Rettocolite Ulcerosa (RCU) è un'inflammatione a carattere ulcerativo della mucosa colica la cui causa è ancora ignota. Il processo patologico non si limita al colon ma coinvolge anche il retto e per questo motivo si può chiamare Rettocolite Ulcerosa. Nessuna delle numerose ipotesi formulate fino ad oggi riesce a spiegare completamente la causa della colite ulcerosa. L'incidenza è di 6-8 persone ogni 100.000 abitanti per anno. I due sessi sono colpiti con frequenza uguale; per quanto riguarda l'età, è completamente nulla nel primo decennio ma aumenta rapidamente nel secondo e nel terzo. I sintomi sono caratterizzati da diarrea emorragica che, nella forma più caratteristica, ha inizio con l'emissione di feci assieme a muco e sangue, quindi le scariche si fanno sempre più frequenti finché il paziente emette solo sangue. A ciò si aggiunge la febbre ad andamento intermittente. Gli attacchi diarroici sono annunciati e accompagnati da dolori addominali diffusi e crampiformi, che rapidamente aggravano la situazione del malato; a ciò possono aggiungersi anche violenti dolori dovuti alla comparsa di fistole anali. Il quadro clinico si può aggravare per la sovrapposizione di sepsi e rapida anemizzazione, che possono condurre a morte in poche settimane. In altri casi queste manifestazioni iniziali gradualmente si attenuano, e solo in casi eccezionali si ha la guarigione. In qualsiasi momento del suo decorso, la colite ulcerosa può improvvisamente aggravarsi e assumere un andamento acuto, talvolta a distanza di mesi o di anni dal suo inizio. Il decorso può protrarsi per anni, la mortalità è elevata nel primo biennio, e peraltro è da considerare che con la sola terapia medica anche i pazienti che sopravvivono più a lungo, difficilmente riacquistano una completa capacità lavorativa. Oltre i 10 anni dalla diagnosi si presenta il rischio di sviluppare cancro al colon, che cresce rapidamente con il tempo. La diagnosi è data dalla clinica: esami delle feci, clisma a doppio contrasto, ma soprattutto una colonscopia con prelievi biotici per l'esame istologico per arrivare a una diagnosi di certezza.

2.3 Terapia farmacologica per il trattamento delle IBD

Non essendo ancora nota l'eziopatogenesi delle malattie infiammatorie intestinali, il trattamento farmacologico è in gran parte volto all'eliminazione dei sintomi mirando a ristabilire l'equilibrio tra l'eccessiva liberazione di molecole pro-infiammatorie e

l'insufficiente produzione di mediatori con attività anti-infiammatoria. Nella fase d'infiammazione acuta si ricorre quindi alla somministrazione di farmaci antinfiammatori per favorire la remissione dei sintomi. L'obiettivo è di garantire e mantenere quanto più a lungo possibile uno stato di benessere per il paziente, cercando di migliorarne la qualità di vita.

Il problema è come gestire il follow-up di questi pazienti, cioè come e quando monitorare, quali cure attuare nei momenti di remissione e se è il caso in tale circostanza, attuare una terapia. Il quadro clinico è eterogeneo per la variabilità individuale dei sintomi, per il decorso, per la modalità di insorgenza clinica e temporale delle recidive e per la durata della remissione.

Gli **aminosalicilati** sono per lo più impiegati nel trattamento dell'infiammazione acuta ileale e colon-ileale. Sono farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) che bloccano il processo infiammatorio interferendo a livello del metabolismo dell'acido arachidonico attraverso un meccanismo di tipo inibitorio nei confronti della ciclossigenasi. In questo modo i FANS interrompono la cascata di produzione dei mediatori dell'infiammazione, le prostaglandine e i leucotrieni, a livello del sito di flogosi; inoltre impediscono l'espressione di molecole necessarie per l'aggregazione cellula-cellula e riducono l'attività di chemiotassi delle cellule fagocitarie e sembrano inibire anche l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare (NF) κ B, implicato nel processo di flogosi. In terapia sono impiegati sulfasalazina, mesalazina, olsalazina e balsalazide. La mesalazina, se impiegata nel Morbo di Crohn, fornisce risultati assai modesti. Nella Rettocolite Ulcerosa è invece il farmaco di prima istanza nelle forme con lieve attività, ma soprattutto rappresenta la terapia di scelta nel mantenimento della remissione, in quanto modifica il decorso naturale della malattia, riducendo il numero di recidive (soprattutto severe) e forse il rischio di displasia. I pazienti che ottengono la remissione dei sintomi, circa la metà di quelli in trattamento, proseguono con una terapia di mantenimento, mentre coloro che non raggiungono questo obiettivo sono costretti ad orientarsi verso una terapia alternativa, come quella rappresentata dai **corticosteroidi**. Quella dei corticosteroidi è una classe terapeutica che è stata oggetto di elevata considerazione sin dal 1950 in quanto, utilizzata per il trattamento del Morbo di Crohn in fase attiva, è in grado di indurre la remissione dei sintomi. Generalmente si ricorre alla somministrazione orale o parenterale di corticosteroidi per il trattamento di malattia di grado severo o moderato, caratterizzata da una significativa infiammazione transmurale. Nel Morbo di Crohn ad esempio, risulta efficace la terapia orale con prednisone o budenoside dovendo però accettare, assieme

all'indiscussa efficacia, anche un numero elevato di effetti collaterali correlati alla dose e alla durata del trattamento.

Gli effetti collaterali sono legati anche all'attività ormonale di queste molecole steroidee: comportano diabete mellito, ipertensione, faccia lunare, sindrome di Cushing (eccessiva biosintesi di ormoni surrenalici), osteoporosi, ritardo della crescita, glaucoma. I corticosteroidi espletano l'attività antinfiammatoria con duplice effetto: agiscono a livello del metabolismo dell'acido arachidonico dove inibiscono la fosfolipasi A2 bloccando la sintesi di mediatori dell'infiammazione (prostaglandine e leucotrieni) e riducono la produzione di citochine pro-infiammatorie quali IL-1, IL-14 2, IL-6, IL-8, INF γ e TNF α esercitando un'azione inibitoria nei confronti della trascrizione di geni coinvolti nella loro produzione. Inoltre riducono la chemiotassi dei linfociti e inibiscono la proliferazione delle cellule linfocitarie T. Sono stati introdotti poi i cosiddetti "**nuovi corticosteroidi**", come la **budesonide**. Si tratta di corticosteroidi rilasciati nell'intestino con un meccanismo PH dipendente, tale da liberare la sostanza attiva in parte nell'ileo terminale e in parte nel colon. Solo una minima parte viene assorbita a livello sistemico e completamente metabolizzata nel fegato, evitando di produrre un' inibizione dell'asse ipofisi-surrene. Infine va precisato che i corticosteroidi non possono essere impiegati per il mantenimento dello stato di quiescenza della malattia. Più del 50% dei pazienti in trattamento con corticosteroidi, in particolare fumatori e pazienti con Rettocolite Ulcerosa, acquisisce nel tempo dipendenza o resistenza a questa classe farmacologica . Per questi pazienti la probabilità di un intervento chirurgico ad un anno è stimata al 36% per il Morbo di Crohn e al 28% per la RCU. Nei pazienti steroide-dipendenti e resistenti è stato introdotto l'utilizzo di un'altra classe di farmaci: gli **immunomodulatori** . Tale classe farmaceutica viene somministrata anche a pazienti per i quali vi sia impossibilità di riduzione o interruzione del trattamento farmacologico, in quanto consentono la riduzione del dosaggio di corticosteroidi e prolungano la fase di remissione dei sintomi. La lenta manifestazione dei benefici, che compaiono dopo diverse settimane di trattamento rispetto all'inizio della terapia, rende gli immunosoppressori inadeguati per il trattamento delle forme acute, pertanto vengono presi in considerazione solo nel caso sia prevista una terapia farmacologica a lungo termine. Tra gli agenti immunosoppressori utilizzati vi sono la 6-mercaptopurina e l'azatioprina, che agiscono interferendo con la sintesi di DNA e RNA, il metotrexato che inibisce la diidrofolicoreduttasi interferendo con la sintesi delle purine, e la ciclosporina. Tutti questi farmaci anche se con meccanismi diversi bloccano l'attivazione delle cellule linfocitarie. L'impiego di agenti immunosoppressori, così come quello di

corticosteroidi, comporta la comparsa di alcuni effetti collaterali tra cui la riduzione delle difese immunitarie proprie dell'organismo, esponendo il paziente al rischio d'infezioni opportunistiche.

La flora microbica intestinale è un fattore centrale nello sviluppo delle malattie infiammatorie dell'intestino. Questa affermazione è supportata da studi di colite indotta in modelli murini nei quali si è osservato che le coliti "spontanee" non si manifestano in topi allevati in ambienti sterili, mentre si presentano rapidamente nel momento in cui tali animali vengono colonizzati da batteri commensali [4,15]. Evidenziato il ruolo significativo della flora microbica nelle malattie infiammatorie croniche dell'intestino, studi clinici hanno dimostrato come il ricorso ad **antibiotici** ad ampio spettro sia di maggiore aiuto per il controllo dei sintomi nel Morbo di Crohn rispetto alla Rettocolite Ulcerosa. La ciprofloxacina, da sola o in associazione con il metronidazolo, ha indotto la remissione dei sintomi nel 50% dei pazienti in studio ed il metronidazolo in particolare è di notevole ausilio per il trattamento della malattia di Crohn localizzata al colon e caratterizzata da fistole perianali. In associazione con l'azatioprina, il metronidazolo porta ad ottenere risultati maggiori nella prevenzione delle recidive postoperatorie, rispetto alla monoterapia.

Probiotici: i probiotici sono stati definiti "microorganismi vivi che, se ingeriti in quantità sufficiente, esercitano effetti positivi sullo stato di salute dell'ospite, al di là del semplice effetto nutrizionale". Molte osservazioni cliniche e sperimentali suggeriscono che la microflora intestinale gioca un ruolo nella patogenesi delle IBD. La manipolazione del contenuto luminale usando antibiotici o probiotici rappresenta quindi una potenziale opzione terapeutica efficace. Gli studi disponibili non supportano l'uso degli antibiotici nella Rettocolite Ulcerosa. Antibiotici sono efficaci nel trattamento delle complicanze settiche nel Morbo di Crohn, ma il loro uso come terapia primaria è ancora controverso, anche se questo approccio è frequentemente utilizzato con successo nella pratica clinica. I recenti progressi scientifici ottenuti nella comprensione di alcuni meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo delle IBD hanno permesso di prendere in considerazione nuovi agenti terapeutici di natura biologica. Nuove strategie terapeutiche in corso di studio prevedono l'utilizzo di anticorpi diretti ad inibire citochine pro-infiammatorie, quali IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF, potenziando in tal modo gli effetti antiinfiammatori dei farmaci impiegati [49]. La somministrazione dell'anticorpo monoclonale Infliximab diretto contro il fattore di necrosi tumorale TNF α si è dimostrata efficace nei pazienti che non rispondono alle convenzionali terapie con aminosalicilati, corticosteroidi, immunosoppressori e antibiotici. In soggetti con stadi severi di malattia o che abbiano intrapreso la terapia immunosoppressiva, esistono

criteri, per il monitoraggio clinico della malattia e della terapia, sulla base delle conoscenze dei possibili effetti collaterali. Al contrario si discute su quale sia il giusto follow-up clinico, per i pazienti, con malattia lieve e moderata, o in fase di remissione. Spesso la decisione sulla cadenza temporale con cui monitorarli, si basa sulla consapevolezza che la malattia cronica in questi soggetti determina anche un importante coinvolgimento emotivo, pertanto, sulla base dello stato psicologico del paziente e dalla consapevolezza che il colloquio periodico con lo specialista dà sicurezza, il medico stabilisce la periodicità della visita.

In genere i pazienti in remissione clinica vengono valutati in Italia, ogni 6, 12 mesi, con lo scopo di valutare la comparsa di ripresa di malattia in fase precoce. Numerosi studi hanno ampiamente dimostrato, che una rete sociale di supporto determina effetti positivi sullo stato di salute dei pazienti, riduce lo stress psicosociale e quindi migliora la loro qualità di vita, con conseguente, riduzione nella frequenza di accessi agli ambulatori specialistici.

2.4 Tipi cellulari coinvolti nell'infiammazione cronica intestinale

L'infiammazione cronica si definisce come un'infiammazione di lunga durata (settimane, mesi) in cui la fase d'infiammazione attiva, di distruzione tissutale e di riparo procedono simultaneamente. Può derivare da un'infiammazione acuta non risolta, ma il più delle volte inizia in modo lento, insidioso e spesso asintomatico. Un'infiammazione cronica può essere fatta risalire alle seguenti cause:

- *Infezioni persistenti*, dovute a patogeni che, resistendo all'azione difensiva di macrofagi e del sistema immunitario, permangono nell'organismo
- *Esposizione prolungata ad agenti tossici, esogeni o endogeni*
- *Patologie autoimmuni*

Diversamente dall'infiammazione acuta, l'infiammazione cronica non presenta cambiamenti vascolari importanti né edema, ma è caratterizzata da un abbondante infiltrato costituito prevalentemente da macrofagi, linfociti e plasmacellule. La distruzione tissutale è progressiva ed avviene ad opera delle cellule dell'infiltrato. I tentativi di riparo sono caratterizzati dall'attivazione di fibroblasti, con conseguente deposito di tessuto connettivo ed eventualmente fibrosi.

I **macrofagi** sono le cellule più importanti del processo d'infiammazione cronica. Comprendono sia i monociti circolanti che i macrofagi tissutali. I monociti nella circolazione hanno un'emivita piuttosto breve, circa 24 ore, ma nei tessuti possono sopravvivere anche

per diversi mesi. Il loro accumulo dalla circolazione inizia precocemente durante un'inflammatione acuta e persiste nel tempo favorito dalla continua produzione di fattori chemiotattici (C5a e chemiochine) e dall'espressione di molecole di adesione sulla superficie endoteliale. Una volta raggiunto il distretto extravascolare, i monociti si differenziano in macrofagi, cellule più grandi e con spiccata attività fagocitica. Grazie al rilascio di fattori di crescita, si può avere anche una proliferazione di macrofagi in loco. I macrofagi, inoltre, possono essere attivati dai prodotti batterici o dalle citochine presenti nel microambiente in cui si vengono a trovare. L'attivazione comporta un cambiamento di forma e dimensioni, un aumento dei livelli di enzimi lisosomiali, maggiore capacità fagocitica e aumentata produzione di radicali dell'ossigeno e dell'azoto: diventano cellule citotossiche e secernono un'ampia serie di mediatori solubili e citochine infiammatorie (TNF α , IL-1...). Nell'inflammatione acuta, se l'agente causale del danno viene rimosso, anche i macrofagi scompaiono o perché muoiono in loco o perché ricircolano in altri distretti. Invece, nell'inflammatione cronica il reclutamento di macrofagi persiste grazie alla continua produzione di fattori chemiotattici e di citochine infiammatorie. Il fatto che i macrofagi siano attivati e in grado di secernere tutti quei fattori ed enzimi descritti, fa sì che possano contribuire alla distruzione tissutale, che è una delle caratteristiche dell'inflammatione cronica. Inoltre, nei tessuti infiammati, la presenza di aree di necrosi è di per sé causa d'inflammatione e facilita il perpetuarsi ciclico di fasi di inflammatione, danno e riparo che caratterizzano le lesioni croniche [19]. Macrofagi attivati sono stati rilevati nella mucosa intestinale infiammata di pazienti con IBD e si pensa siano tra le cellule maggiormente implicate nella produzione di citochine infiammatorie a livello intestinale. Alterati livelli di citochine, rilevati in pazienti con IBD, sono importanti per la patogenesi, il decorso e la ricorrenza di episodi in IBD: si tratta infatti dei principali fattori regolatori della risposta infiammatoria nella Rettocolite Ulcerosa e Morbo di Crohn. Citochine infiammatorie, probabilmente prodotte da macrofagi attivati, come TNF α , IL-1 e IL-6 sono iper-espresse nella mucosa colon-rettale di pazienti affetti da IBD in fase attiva [56]. Oltre ai macrofagi, altre cellule che costituiscono l'infiltrato cronico sono:

Linfociti. Linfociti e plasmacellule vengono reclutati nei siti infiammati in quanto mediatori di risposta immune specifica. Sono attivati dalla stimolazione con l'antigene e migrano in risposta a fattori chemiotattici prodotti dagli endoteli o dai macrofagi. I linfociti T helper attivati producono localmente molte citochine, tra cui principalmente l'interferone gamma (IFN- γ) che è un potente attivatore dei monociti/macrofagi. Si stabilisce pertanto un circuito di attivazione/amplificazione tra citochine dei macrofagi che reclutano i linfociti, e

linfocine, quali IFN γ , che attivano i macrofagi. Le plasmacellule contribuiscono a produrre anticorpi diretti contro l'antigene persistente in loco o componenti tissutali, contribuendo al mantenimento della risposta infiammatoria.

Altri importanti tipi cellulari che prendono parte attiva alla risposta infiammatoria in IBD sono le **cellule epiteliali, endoteliali e mesenchimali** come i fibroblasti e i miofibroblasti. Queste cellule esercitano molte delle tipiche funzioni delle cellule immunitarie, come la produzione di citochine ed esprimono il complesso d'istocompatibilità di classe II (MHC di classe II). Nel Morbo di Crohn, le cellule intestinali epiteliali presentano una minore espressione di TLR3 (toll-like receptor 3) mentre questo non si verifica nella colite ulcerosa; iper-espressione di TLR4 interessa invece entrambe le patologie.

Anche le cellule endoteliali svolgono un ruolo importante nel processo infiammatorio: mediano la migrazione leucocitaria, il processo che porta alla formazione dell'essudato infiammatorio tramite extravasazione dei leucociti e migrazione tissutale. Si tratta di un processo complesso, mediato da diversi fattori tra cui citochine, chemochine e molecole di adesione.

Per quanto riguarda i **fibroblasti e miofibroblasti**, il loro ruolo nelle IBD viene solitamente relegato alla produzione di matrice extracellulare e alla patogenesi di complicazioni, come la fibrosi intestinale. Rappresentano, infatti, oltre alla sede di produzione di ECM, il maggiore sito di produzione di metalloproteinasi (MMPs). Si tratta di una famiglia di enzimi proteolitici che sono direttamente responsabili del rimodellamento tissutale che si realizza nel processo infiammatorio e fisiologicamente nei processi di riparazione tissutale. Nella mucosa intestinale di pazienti affetti da IBD, le MMPs e i relativi inibitori tissutali TIMP sono iper-espressi. Inoltre i miofibroblasti svolgono una funzione cruciale nella fisiologia della mucosa intestinale supportando il mantenimento della nicchia di cellule staminali, e possono essere associati indirettamente a fenomeni di restituzione tissutale. Sono quindi delle cellule coinvolte nell'omeostasi intestinale che possono, proprio per le loro molteplici funzioni, contribuire ad orchestrare l'attività delle cellule protagoniste dell'infiammazione intestinale cronica [56].

2.5. Miofibroblasti sub-epiteliali intestinali (ISEMFs)

I miofibroblasti sub-epiteliali intestinali (ISEMFs) sono cellule di origine mesenchimale di forma fibroblastoide. [44]. Sono localizzati nella lamina propria, a livello sub-epiteliale del tratto gastro-intestinale che si spinge dall'esofago all'ano ma occupano maggiormente la

regione del piccolo intestino ed il colon. A livello delle cripte dove sono abbondantemente localizzati, sono saldamente uniti gli uni gli altri attraverso giunzioni comunicanti e aderenti. Si è osservato che nella mucosa di IBD e cancro, il numero di queste cellule è significativamente aumentato rispetto a quello della mucosa sana. Da studi sperimentali sembra che possano derivare da precursori circolanti originati nel midollo osseo e/o dalla trans-differenziazione di fibroblasti in seguito a stimolazione con TGF- β . La proliferazione di ISEMFs è stimolata da mediatori infiammatori come IL-1 β e TNF α , ma anche da fattori di crescita, quali ad esempio b-FGF (basic fibroblast growth factor), IGF-I (insulin-like growth factor). Nell'intestino sano rappresentano il maggiore sito di produzione del collagene e di altre proteine della matrice extracellulare (ECM), ma anche di metalloproteinasi, proteine in grado di regolare il turn-over della matrice. Sono cellule attive nella produzione di fattori di crescita, mediatori dell'infiammazione e neurotrasmettitori ed agiscono in maniera paracrina. Mediando il flusso d'informazioni sia all'epitelio che alle cellule del sistema immunitario e ad altre cellule mesenchimali della lamina propria, contribuendo a mantenere l'omeostasi intestinale[53].

L'infiammazione cronica intestinale è caratterizzata dalla distruzione della mucosa e dalla formazione di ulcere epiteliali. In questa situazione le cellule mesenchimali come i fibroblasti e i miofibroblasti si attivano acquisendo maggiori capacità proliferative, migratorie e secernenti; attivano la risposta immunitaria ma soprattutto promuovono il rimodellamento tissutale. La guarigione è associata ad un bilanciamento tra il processo infiammatorio e quello di riparazione che porta al ripristino della normale architettura intestinale[56]. La transitoria presenza delle cellule mesenchimali è un aspetto fisiologico del processo di guarigione, ma la persistenza di queste cellule in forma attivata è associata ad un'eccessiva deposizione di collagene e fibrosi, che si osserva frequentemente nei pazienti affetti da Morbo di Crohn ed evolve in iperplasia cellulare, disorganizzazione tissutale e deposizione di collagene fibrillare. Le ISEMFs quindi hanno un ruolo importante nel processo di riparazione tissutale: intervengono nella guarigione delle ferite e influenzano il processo di restituzione epiteliale e successiva proliferazione. Fattori che regolano questa fase riparatoria di ISEMFs sono ad esempio TGF β e KGFs: KGFs (*keratinocyte growth factors*): questi ultimi agiscono in maniera paracrina, sono secreti dalle cellule mesenchimali, in particolare da ISEMFs che li iper-esprimono nelle IBD e nella celiachia e sono in grado di portare alla guarigione piccole ulcere intestinali nei ratti. Il TGF β facilita il processo di migrazione epiteliale: esso ricopre un importante ruolo nell'attivazione di ISEMFs osservata durante la guarigione tissutale, processo durante il

quale aumenta l'espressione di α SMA e aumenta l'espressione di elementi necessari per il processo di *remodelling* tissutale: MMPs e componenti costituenti la matrice come ad esempio proteoglicani[36]. Le MMPs sono enzimi responsabili del rimodellamento della matrice. Fanno parte di una famiglia di 24 o più membri di proteasi neutre, con specificità di diverso substrato: collagenasi (MMP-1, -8, -13, -18), gelatinasi (MMP-2,-9), stromalisine (MMP-3, -7, -10, -11), elastasi (MMP-12) e altre. Le MMPs e relativi fattori inibitori, sono coinvolti in diverse malattie GI (IBD, enterocolite necrotizzante, malattia celiaca, diverticolite, ulcera peptica e cancro del colon-retto) [37]. L'azione enzimatica delle MMPs è cruciale per qualsiasi forma di infiammazione acuta e/o cronica e per la carcinogenesi e successiva metastasi (sono secrete in quantità particolarmente elevata da parte delle cellule tumorali). Le molecole costituenti la matrice extracellulare (ECM) secrete da ISEMFs, sono costituite da un gruppo eterogeneo di macromolecole complesse che conferiscono le caratteristiche tipiche alla membrana basale, alle superfici delle cellule, e quindi alla matrice stessa. Le molecole di matrice (in particolare proteoglicani) possono inibire o promuovere attività cellulari connesse con lo sviluppo, la riparazione, o la carcinogenesi [37].

Tra gli altri fattori qui elencati, le ISEMFs secernono inoltre delle glicoproteine della famiglia di Wnt. È stato dimostrato che Wnt2 Wnt3, Wnt4 e Wnt5a vengono secreti da ISEMFs murini posti in coltura e che su queste cellule sono presenti anche i rispettivi recettori Frizzled. Ciò suggerisce che queste cellule abbiano un ruolo fondamentale nel mantenimento della nicchia delle staminali, data la secrezione di proteine funzionali al controllo della differenziazione cellulare e la loro presenza proprio al di sotto della cripta dove risiedono le cellule progenitrici. D'altra parte, la presenza di recettori in queste stesse cellule, suggerisce anche che queste glicoproteine agiscano anche in maniera autocrina sui miofibroblasti stessi[44].

2.6 La via di segnale di Wnt

Nel 1982 il gene *wnt1*, originariamente denominato *Int-1*, è stato identificato da Nusse e Varmus come sito preferenziale di integrazione per il Virus Tumorale della Mammella Murino (MMTV), nei tumori mammari di origine virale. Quando fu sequenziato, il virus proto-oncogene era visto codificare per una proteina di secrezione ricca in cisteina[11].

Successivamente, è stato dimostrato che il gene "Drosophila Wingless (*wg*)" che controlla la polarità segmentale durante lo sviluppo larvale era l'omologo di *Int-1*. Da qui fu coniato il nome Wnt, come una combinazione di Wg (wingless) e Int, e viene pronunciato 'wint'.

Sempre studi in *Drosophila* hanno portato ad osservare che la segmentazione dell'epidermide degli embrioni dei moscerini con *wg* mutati è severamente danneggiata nella cuticola ventrale esterna. Infatti a differenza della cuticola wild type, che mostra parasegmenti alternati semplici e dentellati, la cuticola con *wg* mutato è completamente ricoperta di parasegmenti dentellati. Gli embrioni del moscerino che portano delle mutazioni nei geni *armadillo*, *porcupine*, e *dishellved* e dispongono una cuticola simile agli embrioni mutati per *wg*, mentre altre mutazioni causano un fenotipo opposto.

Nel 1989, MacMahon e Moon, osservarono una duplicazione dell'asse del corpo in *Xenopus* a seguito di un'iniezione dell'mRNA murino di *Wnt1* nei blastomeri embrionali allo stadio di 4 cellule. Queste osservazioni supportarono la nozione che la via di Wnt era condivisa tra i vertebrati e gli invertebrati. La duplicazione degli assi era indotta anche da *Dishellved*, β -catenina e dalla versione dominante negativa di GSK3 β . Complessivamente questi studi in *Drosophila* e *Xenopus* hanno rilevato l'importanza di questa via di segnale nello sviluppo[11].

Indipendentemente da ciò, si era scoperto che il gene APC è associato alla sindrome di FAP (*familial adenomatous polyposis*) nel colon, e non molto dopo si è visto che la proteina citoplasmatica APC interagisce con la β -catenina. Queste osservazioni portarono per la prima volta alla connessione tra via di Wnt e cancro.

Il sequenziamento genomico ha portato a scoprire la presenza di 20 glicoproteine di Wnt, che possono essere divise in 12 sottofamiglie conservate. Fino ad oggi, tre differenti vie di segnali sembrano agire sotto l'attivazione recettori di Wnt: la via di segnale canonica della β -catenina, la non canonica che comprende la via di segnale della polarità cellulare, e la via di segnale di Wnt/ Ca.²⁺[46]

La via di di Wnt non è solo caratteristica dei processi di sviluppo e di carcinogenesi ma è fondamentale anche nei fenomeni di rinnovamento tissutale nei mammiferi, aspetto intrinsecamente collegato con lo sviluppo di patologie. Esso infatti è fondamentale per la formazione del follicolo pilifero, nella regolazione delle cellule progenitrici e staminali ematopoietiche e nella formazione della massa ossea. Non da ultimo svolge un controllo regolatorio nel mantenimento dell'epitelio intestinale.

2.7 La via di segnale di Wnt nell'intestino

L'epitelio di assorbimento costituisce il tessuto più velocemente rinnovabile nell'intestino. Le cellule differenziate del villo e quelle progenitrici "proliferanti" alla base della cripta formano un foglietto contiguo di cellule che si muovono perpetuamente lungo l'asse cripta-

villo dal basso verso l'alto. Queste cellule progenitrici committenti fermano la loro proliferazione e si differenziano velocemente quando raggiungono le giunzioni cripta-villo. È noto che le cellule figlie si amplificano e transitano lungo la cripta dividendosi ogni 12-16 ore, generando 600 cellule per cripta ogni giorno. Ci sono molte evidenze che mostrano come la cascata di Wnt sia la forza dominante nel controllo del destino cellulare in questo percorso[11].

Nei topi KO per il gene *Tcf4* per esempio, fattore di trascrizione attivato dalle glicoproteine Wnt, l'epitelio differenziato del villo appare normale ma il compartimento della cripta dove risiede la nicchia di staminali è completamente assente[11]. Ciò implica che il segnale fisiologico di Wnt è necessario per il compartimento delle progenitrici. Le glicoproteine di Wnt tuttavia stimolano non solo la proliferazione cellulare delle progenitrici ma promuovono anche la differenziazione terminale delle cellule di Paneth, che risiedono alla base delle cripte.

In questo continuo turn-over cellulare è molto comune che patologie intestinali maligne siano dovute a mutazioni al sistema di Wnt. Il segnale di Wnt infatti è strettamente associato alla carcinogenesi del colon. Sebbene le mutazioni nei geni APC e β catenina sono chiaramente associati alla cancerogenesi del cancro colon rettale si sa di meno sul ruolo dei ligandi secreti a valle del segnale. *Holcombe* et al riportarono dei cambi dell'espressione di alcuni ligandi nel cancro del colon. Wnt2 mRNA è stato determinato nel cancro del colon ma non nella mucosa normale. Wnt5a mostra una espressione differenziale nella mucosa, maggiore alla base delle cripte rispetto ai villi luminali. Wnt7a sembra esibire un'espressione minima alla base delle cripte sia nel tessuto colico normale che maligno, mentre altri ligandi di Wnt, incluso Wnt1, 4, 5b, 6, 7b e 10b sono stati espressi equamente alla base delle cripte e nei villi sia nel tessuto normale che maligno[23]. D'altro canto, i recettori Fz1 e 2 non sono stati trovati espressi nel tessuto normale e nei tumori altamente differenziati mentre i tumori poco differenziati esibiscono un alto grado di espressione di recettori di Fz, specialmente al margine dell'invasione cellulare. I recettori Fzd1 e 2 quindi potrebbero essere associati a fenomeni di invasione mentre Wnt2 e Wnt5a potrebbe essere collegato al processo di carcinogenesi.

2.8 Biosintesi e Secrezione delle proteine di Wnt

Le proteine della famiglia di Wnt sono caratterizzate da un alto numero di residui conservati di cisteina. Sebbene per la loro secrezione queste proteine abbiano un peptide segnale all'estremità N-terminale, sono relativamente insolubili. Questa insolubilità è

attribuita ad una particolare modifica post-trascrizionale, la cistein-palmitoilazione, essenziale per la funzione delle proteine stesse. *Hoffmann* ha riportato che in *Drosophila* è presente un gene richiesto nelle cellule secernenti Wnt chiamato porcupine, che ha un'omologia con le acil trasferasi, degli enzimi che acilano una grande varietà di substrati nel reticolo endoplasmatico. Si reputa che questi enzimi siano deputati alla palmitoilazione di Wnt[58].

Recentemente *Bazinger* et altri hanno scoperto un altro gene in *Drosophila* che è importante per la secrezione, nominato *wntless* e *evenness interrupted*. Questo gene è altamente conservato e codifica per una proteina a 7 domini transmembrana. In assenza di questa proteina, esse vengono ritenute all'interno dell'apparato di Golgi dove vengono prodotte. Queste proteine vengono poi portate al reticolo endoplasmatico per mezzo di un complesso multiproteico tetramerico, conservato dal lievito all'uomo[11].

Le glicoproteine Wnt sembrano agire come morfogeni, cioè molecole che formano un gradiente, il cui segnale ha un'attività concentrazione dipendente. Anche se non è ancora chiaro come questi gradienti di segnale vengano generati, è plausibile che le estremità palmitoilate, li allontanino dalle membrane o dalle particelle di lipidi. Perciò potrebbero venire legate a vescicole di trasporto intercellulare o particelle lipoproteiche. Alternativamente potrebbero essere trasportate da lunghi e sottili processi filopoidiali detti citonemi. In più, studi in *Drosophila* suggeriscono il ruolo per i proteoglicani di eparan-sulfato l'HSPG per la stabilizzazione delle proteine di Wnt[11].

2.9 Recettori, agonisti e Antagonisti per Wnt

A livello della membrana plasmatica della cellula bersaglio le glicoproteine Wnt interagiscono con un complesso recettoriale costituito da un recettore a 7 domini transmembrana noto come Frizzled (FZD), del quale esistono nell'uomo 10 varianti, e dal corecettore LDL-Receptor-related Protein 5-6 (LRP5 e LRP6). La specificità dell'interazione tra tale complesso e le singole glicoproteine Wnt è assicurata per lo più da un dominio ricco in cisteina (Cistein Rich Domain, CRD) presente sul versante extracellulare di FZD[11].

L'attivazione del recettore porta all'innescamento di una complessa via del segnale intracellulare caratterizzata, nelle prime fasi, dalla fosforilazione del LRP5/6 a livello della porzione citoplasmatica e dall'attivazione della proteina Dishevelled (DSH). Questi eventi sono responsabili della successiva interazione dello stesso LRP5 con l'axina, molecola facente parte di un complesso multiproteico in associazione con Adenomatous Polyposis Coli

(APC) e Glicogeno Sintasi Kinasi-3(GSK-3). Nel pathway non canonico, Wnt5a lega il recettore FZD ed attiva le proteine G eterotrimeriche, determinando un incremento del calcio intracellulare tramite meccanismi proteina C-dipendenti o inducendo cambiamenti Rho- o c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dipendenti nell'actina citoscheletrica[46].

2.10 La via canonica

La via canonica di Wnt guida una serie di eventi che sono necessari quando le proteine di Wnt legano i recettori di superficie cellulare della famiglia di Frizzled , provocando l'attivazione dei di una famiglia di proteine denominate Dishevelled e portando ad un incremento della quantità di b catenina traslocata al nucleo. Dishevelled (DSH) è un componente chiave del complesso recettoriale associate alla membrane che quando è attivato dal legame di Wnt è in grado di inibire un secondo complesso che include l'axina, la GSK3 e la proteina APC[11]. Il complesso axina-GSK-3 APC normalmente promuove la degradazione proteolitica della b catenina intracellulare. In seguito all'inibizione del complesso proteolitico un pool di b catenina citoplasmatica viene stabilizzata e una parte di b catenina è in grado di raggiungere il nucleo e interagire con il complesso di fattori di trascrizione TCF/LEF per promuovere l'espressione di alcuni geni. Le proteine Frizzled potrebbero interagire con delle proteine transmembrana chiamate LRP, stabilizzando così il complesso Wnt/Frizzled/LRP/Dishevelled/axin[46] .

Nei vertebrati sono state trovate delle proteine che sono in grado di inibire il segnale di Wnt legandosi a Wnt o ai recettori di Wnt. La Sclerostin per esempio lega LRP.

2.11 La via non canonica

La via di segnale meno nota, comunemente detta non canonica comprende in realtà diverse vie tra le quali la via del Calcio e la via della polarità cellulare(PCP). Il ligando prototipo di questa via di segnale è Wnt5a, che traduce vie alternative rispetto a Wnt1.

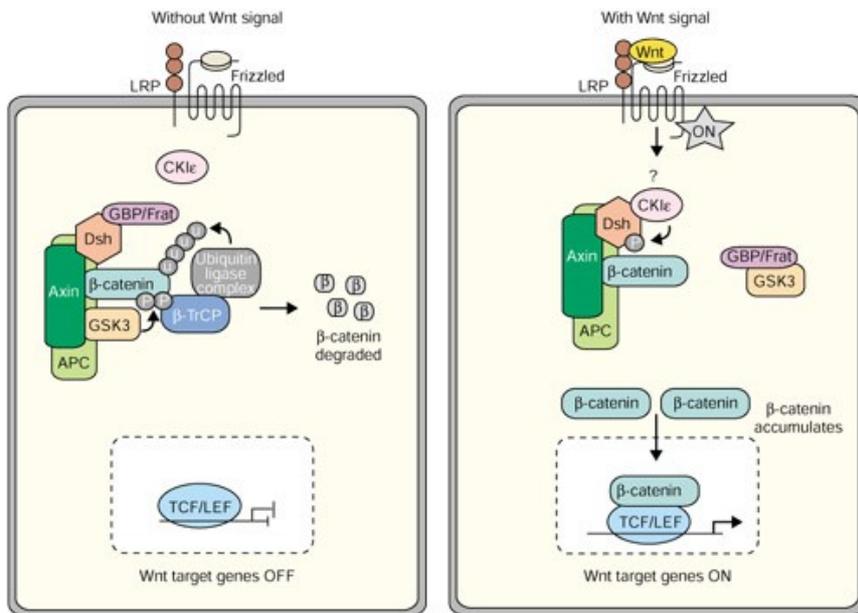
La via del calcio è mediata da un incremento del calcio intracellulare ed agisce attraverso i recettori Fz2 . Questa può stimolare la PKC , il fattore nucleare delle cellule T(NFAT) oppure la chinasi II calcio-dipendente (CaMKII).L'altra via non canonica è quella della polarità cellulare planare, distinta dalla polarità apicale/basale. Il segnale viene innescato dai recettori Frizzled e dishevelled ma non segue poi attraverso il complesso recettoriale canonico dell'axina in quanto vengono attivate piccole GTPase quali RhoA e Rac. Queste proteine guidano infine alla riorganizzazione del citoscheletro e all'attivazione di JNK (Jun N-terminal kinase) [46].

Ci sono svariati modi in cui questa via di segnale può interagire con la via canonica. Sembra infatti che i segnali attraverso la via della CamKII possano portare ad effetti antagonisti, oppure il legame di Wnt5a con Ror2 portando ad un attivazione di JNK e all'inibizione della via della b catenina. D'altra parte si è visto che attraverso la via della PKC Wnt5a può stabilizzare la b catenina.

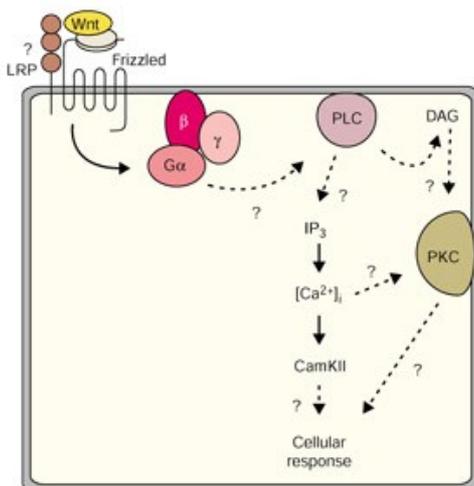
Concludendo, non è ancora del tutto chiaro come agisca il ligando Wnt5a , in quanto sono numerose le possibilità di trasduzioni del segnale, e sono strettamente correlate tra loro. Sicuramente questo agisce in maniera contesto dipendente, e la sua azione non dipende solo dalle caratteristiche della proteina stessa ma per esempio, anche a seconda della costellazione di recettori presenti e disponibili, dalla presenza di inibitori del segnale, come sFRP e DKK[38].

Poiché questo lavoro di tesi si basa proprio su questa molecola, e date le sue molteplici azioni che si esplicano con numerose vie di segnale, verranno qui sotto passate in rassegna dati in letteratura di azioni di Wnt5a nello sviluppo, nel cancro e nelle patologie croniche.

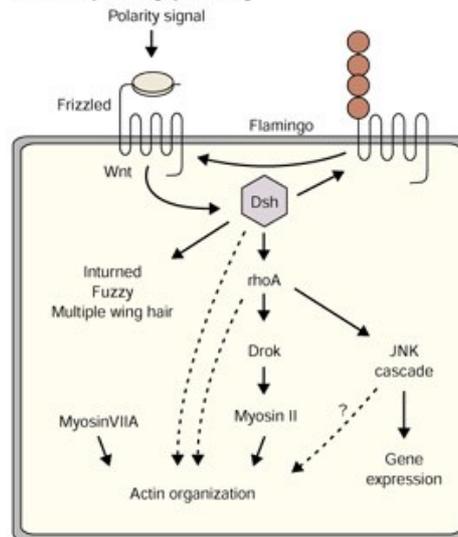
(a) Wnt/ β -catenin signaling pathway



(b) Wnt/ Ca^{2+} pathway



(c) Wnt/polarity pathway



2.12 Wnt5a nello sviluppo

Wnt5a è una delle 19 glicoproteine della famiglia di Wnt che mostrano un pattern altamente regolato e che ha numerosi ruoli nello sviluppo e nell'omeostasi tissutale. L'importanza di questa glicoproteina nelle vie di segnale implicate nello sviluppo è evidente nel fenotipo dei topi Wnt5a $-/-$ la cui morte alla nascita se mostrano delle caratteristiche difettive come il corpo tronco, anomalie facciali e limbi corti e deformati. Non-canonical Wnt signaling è stata implicata in molti processi dello sviluppo. La PCP (planar cell polarity o induzione planare) è conosciuta per regolare i movimenti di estensioni convergenti. L'embrione di topo che portano a mutazioni nei geni della PCP come Van Gogh-like 2 (Vangl2), Celsr1, Fzds and Dishevelled (Dvl), mostrano accorciamenti degli assi del corpo A-P e difetti di tubo neuronale. Questi geni sono richiesti per l'orientamento di fasci stereocigliari necessari per lo sviluppo delle cellule sensoriali capellute nella coclea, caratteristiche del PCP fenotipo nei mammiferi. È noto che topi KO per Wnt5a $-/-$ e per Ror2 $-/-$ mostrino un accorciamento degli assi del corpo antero-posteriori e una disorganizzazione dei fasci ciliati, enfatizzando il ruolo cruciale di Wnt5a in questa via di segnale. Studi recenti hanno dimostrato che la via di segnale della PCP è richiesta per lo sviluppo della divisione cellulare orientata (OCD) durante la morfogenesi del rene e dell'intestino nel topo[11].

2.13 Wnt5a nel cancro

Non sorprende che Wnt5a, date le numerose vie di segnale che è in grado di attivare, abbia ruoli completamente diversi nel cancro. Questa glicoproteina infatti può agire sia come tumor suppressor che come tumor promotor a seconda del tipo di cancro.

Un grande numero di studi indicano che esso ha un'azione di tumor suppressor e in questi tipi di cancro Wnt5a è down-regolato come nel cancro colon rettile nel neuroblastoma, nel cancro duttale alla mammella. La down-regolazione è stata associata ad un tumore di alto grado. Questi risultati hanno dimostrato che per la progressione a cancro Wnt5a deve essere attivamente silenziato, caratteristica questa dei tumor suppressor[46].

Questo ruolo di tumor suppressor fu ulteriormente evidenziato da studi in cui Wnt5a introdotto in una linea cellulare di cancro colon rettile, la SW480, o su una linea di cancro alla tiroide, FTC133 risulta in un decremento dell'invasività, della migrazione, della clonogenicità e della proliferazione. Ulteriori evidenze di un potenziale tumor suppressor fu

ulteriormente mostrato da un peptide sintetico per mimare le proprietà biologiche di Wnt5a.

Table 1. Studies where Wnt-5a has tumour-suppressing effect

Tissue type (n)	Detection method	Expression in tumour	Disease outcome	References
Neuro blastoma (37)	mRNA levels	Reduced expression in some tumours	Reduced expression associated with poor outcome	Blanc <i>et al</i> (2005)
Colon cancer primary dukes B (55)	IH	Expression lost or reduced in 50% of tumours	Reduced expression strong predictor of adverse outcome and correlated with shorter survival	Dejmek <i>et al</i> (2005a)
Breast cancer (94)	IH	Reduced expression in 56% of breast tumours	Univariate regression analysis showed loss of Wnt-5a expression indicates an increased risk of death	Dejmek <i>et al</i> (2005b)
Invasive ductal breast carcinomas (59)	IH	Loss of Wnt-5a expression in 44% of tumours	Loss associated with a higher histological grade and loss was an independent predictor of recurrence	Jonsson <i>et al</i> (2002)
Thyroid Normal Papillary Anaplastic (5)	cancer (11) IH (12)	Low expression in normal tissue High expression in differentiated tumours but low expression in non differentiated tumours	ND	Kremenevskaja <i>et al</i> (2005)
Acute myeloid leukaemia (AML) (10) or ALL (10)	mRNA levels	Wnt-5a absent in 80% of ALL and at low levels or absent in all AML	ND	Liang <i>et al</i> (2003)
Hepatocellular carcinoma (92)	IH	Reduction or loss of Wnt-5a protein expression was found in 81% of tumours	Loss was significantly associated with higher tumour stage	Liu <i>et al</i> (2008)
Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cell lines (6) patients (307)	Gene methylation	Wnt-5a hypermethylation in all cell lines	Wnt-5a methylation was an independent prognostic factor predicting disease-free survival	Roman-Gomez <i>et al</i> (2007)
Leukaemia Cell lines NL(4), Leukaemia (4) Burkett lymphoma (6) peripheral blood mononuclear cells (3) Lymphoblastoid cell lines (3) Burkett lymphoma tumours (10) NL tumours (30) Non-Hodgkin's lymphomas(36)	Gene methylation	Wnt-5a highly methylated and mRNA silenced in all cell lines. Methylation of Wnt-5a was shown in 50% of Burkett lymphoma, 73% of NL tumours and 31% of Non-Hodgkin's lymphomas but not in normal tissue	ND	Ying <i>et al</i> (2007)
Colorectal cancer Normal colon tissues (15)	(29) Gene methylation	Wnt-5a methylation was detected in 48% of CRC tumours, but only in 13%	ND	Ying <i>et al</i> (2008)

Tissue type (n)	Detection method	Expression in tumour	Disease outcome	References
		of normal tissue paired normal $P=0.025$)		

IH=immunohistochemistry; ND=no data.

Sebbene ci sono delle evidenze molto solide che Wnt-5a abbia un ruolo di tumor suppressor , pochi studi hanno dimostrato anche mostrato che Wnt5a ha un azione oncogenica.

Table 2. Studies where Wnt-5a has a tumour-promoting effect

Tissue type (n)	Detected by	Expression in tumour compared with normal	Disease outcome	References
Melanoma Primary tumours and matched metastases (59)	IH	Increased expression as disease ($P=0.013$)	Multivariate analysis showed as Wnt-5a expression was an independent risk factor for reduced metastasis-free and overall survival	Da Forno <i>et al</i> (2008)
Breast cancer cell lines normal tissue (10) Metastatic tissue (9) Normal breast cancer cell lines (11)	mRNA levels	Over expression of Wnt-5A in metastasis-derived breast cancer cells in comparison with normal tissues and to breast cancer cell lines	ND	Fernandez-Cobo <i>et al</i> (2007)
Non-small-cell lung cancer (123)	IH	Expression of Wnt-5a in 58% of patients	Wnt-5a expression was associated with reduced overall survival and was a bad prognostic indicator	Huang <i>et al</i> (2005)
Gastric cancer (237)	IH	Increased expression detected in 30% of tumours and was frequently seen in tumours of a higher grade	Positivity correlated with advanced stage and poor prognosis	Kurayoshi <i>et al</i> (2006)
Pancreatic cancer (16)	IH	Upregulation in 81% of tumours compared with normal tissue	ND —	Ripka <i>et al</i> (2007)
Prostate cancer (17)	Gene methylation	Reduced methylation in 65% of tumours	ND —	Wang <i>et al</i> (2007)
Melanoma Nevi (8) Primary melanoma (10) Metastases (9)	IH	Low expression 25% of Nevi, expression in 80% of primary melanoma, 89% of metastases showed large regions of expression.	Wnt5a overexpression correlates strongly both to survival and time to the development of metastases	Weeraratna <i>et al</i> (2002)

IH=immunohistochemistry; ND=no data.

Un aumentata espressione di Wnt5a , un marker dell'oncogenesi, è stato identificato nel melanoma della pelle, nel cancro alla mammella/seno, nel cancro gastrico, nel cancro al pancreas, carcinoma polmonare a cellule non piccole e il cancro alla prostata. Un aumentata espressione è associata con un aumentato grado del tumore e esito-prognosi nefasta, un'azione promotrice è stata mostrata in UACC 1273 , linea cellulare di melanoma, le cellule gastriche MKN-74 and MKN-45 e di cancro pancreatiche PANC1,

HT1080, ImimPc1 and MiaPaca, dove l'espressione di Wnt5a promuove la proliferazione e l'invasione.

2.14 Wnt5a nell'infiammazione cronica

L'alterata espressione di Wnt5a non è associata solamente con il cancro ma anche con fenomeni infiammatori cronici quali l'artrite reumatoide, l'aterosclerosi e la psoriasi[43,57,9,48]

Riferendoci al modello di artrite reumatoide *Sen et al.* [43] osservarono che i sinoviociti derivati da pazienti affetti dalla patologia dispongono un persistente fenotipo attivo con livelli endogeni di Fzd5 e Wnt5a più alti che non nei sinoviociti normali, dimostrando che la via di segnale di Wnt5a/Fzd5 potrebbe contribuire alla loro attivazione: sia un costrutto Wnt5a anti-senso che una forma negativa della proteina promuovono la diminuzione di secrezione di IL-6, IL-15 e del recettore di RANKL (*receptor activator of nuclear factor κ B ligand*). L'attivazione di questa via di segnale promuoverebbe in ultima analisi la formazione di una massa stromale e tessuto di granulazione in grado di distruggere la cartilagine e portare all'erosione ossea.

Nell'aterosclerosi invece emerge dalla letteratura che Wnt5a interagisca con il TLR-4, un recettore dell'immunità innata in grado di riconoscere il prodotto di derivazione batterica LPS. *Christman, et al*[9] dimostrarono infatti attraverso studi di ibridazione in situ che Wnt5a viene fortemente co-espresso con il TLR-4 nelle lesioni murine e umane di placche aterosclerotiche nelle regioni ricche in macrofagi. Questi dati sono stati poi confermati da esperimenti *in vitro* che dimostrano un aumento di espressione di Wnt5a in macrofagi esposti all'LPS.

Infine, nella psoriasi *Reischl et al.* [57] Osservarono attraverso profili di espressione con micro-array per RNA che Wnt5a è 4 volte più alto nelle lesioni da psoriasi della pelle (biopsie con lesioni della pelle da placche di psoriasi) rispetto al gruppo di controllo (biopsie derivate da pazienti sani).

2.15 Vie che inducono la secrezione di Wnt5a

Tutte queste evidenze insieme suggeriscono che Wnt5a venga attivato da alcune vie di segnale, riassunte di seguito.

-NF- κ B. I recettori del TNF (TNFRs), i Toll-like receptors, i recettori per IL-1 e i recettori per il TGF β sono coinvolti nell'attivazione delle MAP3K7 mediate da IKK. IKK fosforila ilb per indurre la degradazione mediata dall'ubiquitina che permette la stabilizzazione e

l'attivazione dell'NFKb. È stata dimostrata un' aumentata regolazione di Wnt5a indotta dall'NFKb, nelle cellule di cancro gastrico. Blumenthal *et* hanno riportato invece una sovra-espressione di Wnt5a mediata dai TLR e dall'attivazione dell'NFKb nei macrofagi.

Poiché inoltre il sito di legame dell'NFKb all'interno del promotore B di Wnt5a è conservato nei mammiferi, si può concludere che Wnt5a viene up-regolato dal TNF, TLR IL1 e TGFb attraverso NFKb[27].

-Hedgehog .I segnali di Hedgehog inducono l'up-regolazione di Wnt5a indirettamente attraverso la famiglia delle proteine FOXO.

-IL6 attiva IL6ST-JAKSTAT3

IL-6 , secreto dai macrofagi e dalle cellule epiteliali durante in molti fenomeni di infiammazione cronica, attiva la via di Jak-Stat3. è stato riportato che IL-6, presente in abbondanza durante la gastrite cronica atrofica da *Helicobacte Pylori* , guida all'over-espressione di Wnt5a.

Inoltre, LIF (leukemia inhibitory factor) and CTF1 (cardiotrophin 1) inducono l'up-regolazione di Wnt5a attraverso la via di Stat-3 nei miociti cardiaci di ratto.

-TGFB La via di segnale del TGF b è trasdotta attraverso delle Ser/Thr chinasi per Smad2/3 –Smad4 complesso trascrizionale e la cascata di segnale delle MAP3K7-NFKb. Roarty and Serra hanno riportato che l'up-regolazione di Wnt5a è indotta da TGFb per lo sviluppo della ghiandola della mammella. Ripka *et al* riportarono che il TGFb induce l'up-regolazione di Wnt5a attraverso la via di CUX-1; Inoltre il sito di legame per l' NF- κ B all'interno della regione del promotore B di Wnt5a è conservato nei mammiferi come detto prima. Tutti questi fatti indicano che il TGF-b up-regola Wnt5a direttamente attraverso il complesso delle Smad e indirettamente attraverso la loro induzione con CUX-1 e MAP3K7 mediato dall'NFKb[27].

-Notch L'attivazione della via di segnale di Notch guida all'attivazione della trascrizione dei geni target per Notch attraverso il complesso NICD-CSL oppure attraverso il complesso dell'NFKb. Koyanagi *et al* riportarono che I ligandi di Notch promuovono l'up-regolazione di Wnt5a nelle cellule endoteliali progenitrici. [28]

3. SCOPO

Le ISEMFs sono cellule coinvolte nell'omeostasi intestinale e possono, per le loro molteplici funzioni, contribuire ad orchestrare l'attività delle cellule protagoniste dell'infiammazione intestinale cronica. Studi recenti hanno dimostrato che il numero ed il profilo di espressione genica di queste cellule sia alterato nei pazienti affetti da IBD, anche se i meccanismi alla base non sono ancora del tutto chiariti.

E' stato suggerito come Wnt5a, ligando prototipo della via non canonica di Wnt coinvolta nei processi di embriogenesi e carcinogenesi dell'epitelio intestinale, sia coinvolto nella patogenesi delle IBD ed in particolare nella RCU.

Gli scopi di questo progetto sono stati: 1. Valutare i livelli di Wnt5a in corso di infiammazione cronica intestinale 2. l' effetto di Wnt5a sulla biologia dei ISEMFs 3. esplorare la vie di segnale coinvolte.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Selezione dei pazienti e raccolta dei tessuti

Per lo studio del ruolo di Wnt5a nella Colite Ulcerosa sono stati raccolti campioni di mucosa colica mediante biopsia in corso di colonscopie, eseguite presso gli ambulatori del Dipartimento di Scienze Gastroenterologiche dell'Università degli Studi di Padova. Sono stati reclutati per lo studio tutti i pazienti con Rettocolite Ulcerosa. Sono stati reclutati anche pazienti con Morbo di Chron (controllo malattia) e pazienti sottoposti ad esame endoscopico per screening delle neoplasie coliche o follow-up per polipi (controlli sani). Inoltre sono stati raccolti segmenti di colon (sigma-ascendente) rimossi in corso di resezioni chirurgiche, presso la sala operatoria "Tropea" della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Padova, sia da pazienti con Rettocolite Ulcerosa che, come controlli, pazienti con neoplasie coliche sottoposti a colectomia, prendendo di questi ultimi il tessuto ad almeno 15 cm dal tumore (controlli).

Tutti i pazienti hanno fornito il loro consenso scritto alla raccolta ed utilizzo dei tessuti.

Al momento della raccolta dei campioni sono stati registrati i dati anagrafici, la storia clinica, la terapia in corso e, successivamente, l'esito dell'esame istologico.

I campioni tissutali ottenuti sono stati processati con quattro procedure:

- a) immediatamente congelati in azoto liquido per successiva estrazione di RNA o proteine;
- b) posti in liquido per inclusione di tessuto congelato (OCT) e quindi congelate in isopentano raffreddato con azoto liquido;
- c) posto in terreno DMEM addizionato con antibiotico a 4°C per successiva estrazione dei miofibroblasti;
- d) fissato in 4% PFA e successivamente incluso in paraffina;

4.2 Score di attività di malattia

Le biopsie e le resezioni raccolte per le indagini molecolari sono state inoltre correlate con degli score clinici, endoscopici ed istologici di malattia qui descritti. Per valutare l'attività di malattia, nella rettocolite ulcerosa, si utilizzano score che si basano su parametri di varia natura: clinici, endoscopici, istologici. Ognuno di essi presenta vantaggi e svantaggi. Nel 1955 Truelove and Witts proposero uno score basato su 6 variabili (numero di scariche

giornaliere, presenza di sangue nelle feci, temperatura, polso, concentrazione emoglobinica e VES), che risulta all'oggi non utilizzabile in molti trials clinici, in quanto non consente di misurare i cambi nell'attività di malattia. In seguito sono sorti numerosi altri score clinici, che prendono in considerazione le variabili del Truelove and Witts Severity Index, ma anche il dolore addominale, la consistenza fecale, la presenza di nausea o vomito, lo stato di benessere generale, le complicanze extraintestinali. Attualmente lo score clinico più usato è il Modified Truelove and Witts Severity Index (MTWSI), che si basa su 8 variabili: 1) numero di scariche al giorno; 2) numero di scariche notturne; 3) presenza di sangue visibile nelle feci; 4) episodi di incontinenza fecale; 5) presenza di dolore addominale; 6) grado di benessere generale; 7) utilizzo di farmaci anti-diarroici. Lo score ha un range da 0 a 21. Si definisce come "risposta clinica" uno score < 10 per 2 giorni successivi e come "remissione" uno score < 3.

L'attività di malattia da un punto di vista endoscopico viene valutata in base all'aspetto della mucosa alla rettosigmoidoscopia: eritema della mucosa, pattern vascolare, vulnerabilità della mucosa (friabilità) e danno mucosale (presenza di muco, fibrina, essudato, erosioni e ulcere). Il Sigmoidoscopic Inflammation Grade Score utilizza una scala a 4 punti: 0) mucosa normale; 1) edema e/o perdita della vascolarizzazione visibile della mucosa; 2) friabilità (definita come sanguinamento visibile e inducibile al tocco con lo strumento endoscopico); 3) sanguinamento spontaneo, ulcere visibili.

Un recente studio ha evidenziato che aggiungere una valutazione endoscopica allo score clinico contribuisce poco ad indicare l'effettiva attività di malattia, anche se in realtà il punteggio conferito al parametro endoscopico all'interno dello score clinico è al massimo di 2 punti su 22 totali, per cui poco enfatizzato.

Per quanto riguarda lo score istologico, la valutazione viene fatta eseguendo delle biopsie a livello rettale, dato il consueto coinvolgimento di questo tratto intestinale nella malattia. Gli aspetti caratteristici sono la presenza di polimorfonucleati, la formazione di ascessi criptici, le ulcerazioni e l'intensità dell'infiltrato di cellule mononucleate nella lamina propria, oltre alle alterazioni strutturali delle cripte e della lamina propria. Si definisce come "malattia attiva" la presenza di neutrofili in associazione con il danno epiteliale, "malattia cronica inattiva" la presenza di modificazioni architetturali (superficie irregolare e anomalie nelle cripte) e un aumento di mononucleati nella lamina propria, "malattia quiescente" la presenza di alterazioni architetturali senza alterazioni nell'intensità e nella composizione dell'infiltrato della lamina propria.

Attualmente si conviene che l'attività di malattia definita su base istologica correli bene con la valutazione endoscopica, soprattutto se i campioni sono ottenuti durante un'inflammatione acuta: aspetti microscopici di attività però possono persistere anche nella malattia microscopicamente attiva. La correlazione tra gli indici clinici e istologici invece è variabile.

4.3 Immunofluorescenza (IF) ed immunoistochimica (IHC)

Al fine di valutare la presenza e la distribuzione delle proteine in esame nelle biopsie e resezioni umane da micosa colica, sono stati eseguiti saggi di immunofluorescenza. A tale scopo sezioni dello spessore di 4 µm ottenute da campioni inclusi in OCT (DKK s.r.l.) sono state poste su vetrini porta oggetto. Le sezioni mucosali sono state fissate per 10 minuti in PFA 4% p/v a pH 7.3 e successivamente lavate per tre volte per 5 minuti con TBS (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl). Al fine di ridurre l'autofluorescenza i campioni sono stati trattati per 10 minuti a temperatura ambiente con NH₄Cl 50 mM. In seguito è stata effettuata un'incubazione per 30 minuti con BSA (Sigma) al 2% p/v e Triton X-100 (BM Biomedicals) allo 0,03% v/v in TBS per bloccare legami aspecifici e permeabilizzare la membrana cellulare, rispettivamente. Successivamente i campioni sono stati trattati con anticorpo primario diretto contro la proteina d'interesse [Tabella 1] opportunamente diluito in TBS allo 0,5% p/v di BSA. Dopo un'ora di incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati accuratamente lavati e quindi incubati per un'ora al buio con l'appropriato anticorpo secondario coniugato con fluoroforo alla diluizione adeguata [Tabella 2]. I campioni sono stati poi lavati in TBS per tre volte. Dopo lavaggio, le sezioni sono state coperte con vetrini coprioggetto e le cellule montate su vetrini portaoggetto. I vetrini sono quindi stati analizzati mediante microscopio confocale a fluorescenza (TCS-NT/SP2, Leica) utilizzando un obiettivo x40 o x63. Le immagini sono state paragonate ad un controllo negativo (isotipo) costituito da campioni incubati con il solo anticorpo secondario.

4.4 Isolamento e coltura dei miofibroblasti subepiteliali intestinali umani

I miofibroblasti subepiteliali umani sono stati isolati dalla mucosa ileale secondo un protocollo già descritto in precedenza [69]. Per ciascun paziente sono state usate 2 biopsie coliche o un segmento di mucosa ileale (3x3 cm) ottenuta da una resezione chirurgica. In questo secondo caso la mucosa è stata separata mediante microdissezione dal sottostante strato di muscolatura liscia e divisa in frammenti di circa 5x5 mm. Dai campioni così ottenuti il muco è stato rimosso mediante un lavaggio in soluzione di PBS 0,04% DTT (dithiotreitolo Applichem), mentre lo strato epiteliale è stato asportato mediante incubazione con EDTA 10 mM per 30 minuti a 37°C. Le cellule epiteliali rimosse sono state eliminate, il tessuto è stato lavato in RPMI 5% penicillina/streptomicina e sottoposto a digestione enzimatica in 0,05% p/v di collagenasi di tipo IV di *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich) e 4 µg/ml di DNAsi (Calbiochem) di pancreas bovino disciolte in HBSS. La sospensione cellulare così ottenuta, è stata lavata per 3 volte e risospesa in RPMI (Gibco®) e successivamente risospesa in DMEM addizionato di 20% v/v FBS (Gibco®) inattivato per 30 minuti a 56°C, 2 mM L-glutammina, 0,1 mM di amminoacidi non essenziali, 1 mM di sodio piruvato, 100 U penicillina/100 µg streptomicina/0,25 µg amfotericina B/ml (Gibco®). Le cellule sono state poste in coltura in atmosfera controllata al 5% di CO₂ ed a 37°C per 48 ore senza cambiare il terreno per permettere ai miofibroblasti di migrare dal tessuto ed aderire alla plastica. Si sono stabilite colture primarie da 5 RCU e da 4 controlli.

Le cellule sono state caratterizzate ed utilizzate per gli esperimenti dopo 4 passaggi ed utilizzate per esperimenti tra il passaggio 5 e 15.

4.4.1 Caratterizzazione dei miofibroblasti intestinali subepiteliali (ISEMFs)

Gli ISEMF umani isolati come sopra descritto sono stati caratterizzati dal punto di vista morfologico mediante microscopia a contrasto di fase e mediante immunocitochimica con anticorpi monoclonali diretti contro α -SMA (α -actina del muscolo liscio), la vimentina e la desmina.

A tale scopo, ISEMF dopo 4 passaggi in coltura sono stati seminati su vetrini per microscopia ed incubati in terreno completo. Dopo 24 ore di incubazione le cellule sono state fissate in 4% PFA p/v. Le cellule sono quindi state incubate per 30 minuti con BSA al 2% p/v e Triton X-100 allo 0,03% v/v per bloccare legami aspecifici e permeabilizzare la membrana cellulare, rispettivamente. Dopo lavaggio, sono state incubate per 1 ora con gli anticorpi diretti contro: l' α -SMA (diluito 1: 300 in PBS con 0,5% p/v di BSA (Sigma); la vimentina (diluito 1: 100 Santacruz) e la desmina (diluito 1: 100 Dako). Successivamente sono state lavate per tre volte in PBS e incubate con gli opportuni anticorpi secondari per 1 ora al buio. L'anticorpo contro l' α -SMA viene fornito dalla ditta produttrice già coniugato a Cy3. Dopo incubazione di 1 ora a temperatura ambiente ed al buio, i vetrini sono stati lavati in PBS per tre volte e montati su vetrini porta oggetto. Le cellule sono state quindi analizzate e fotografate mediante microscopio confocale a fluorescenza (TCS-NT/SP2, Leica) utilizzando un obiettivo x63. Con questo stesso procedimento, i miofibroblasti sono stati caratterizzati anche per Wnt5a.

Tabella 1

ANTICORPO PRIMARIO	TIPO	AZIENDA PRODUTTRICE	WORKING DILUTION
<i>α-sma</i> (clone 1A4)	Ms mono-Cy3 TM	Sigma Aldrich	1:300 (IF)
<i>Desmina</i>	Ms mono	Sigma Aldrich	1:500 (IF)
<i>Wnt5a</i>	Ms mono	Santa Cruz	1:1000 (WB) 1:200 (IF)
<i>CamKII</i>	Ms mono	Cell Signalling	1:1000 (WB)
<i>Phospho CamKII</i>	Ms mono	Cell Signalling	1.1000 (WB)

Tabella 2

ANTICORPO SECONDARIO	AZIENDA PRODUTTRICE	WORKING DILUTION
Gt X Ms IgG-HRP	Sigma Aldrich	1:10000 (WB)
Gt X Rb IgG-HRP	Invitrogen	1:1000(WB)

Gt x Rb IgG–Alexa Fluor 488

Invitrogen

1:200 (IF)

4.5 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit SV Total RNA Isolation System (Promega). I campioni (<30 mg di tessuto o 10^6 cellule) sono stati omogeneizzati in 175 μ l di SV RNA Lysis Buffer (4 M guanidina isotiocianato, 0.01 M Tris pH 7.5, 0.97% v/v β -mercaptoetanol) utilizzando l'omogeneizzatore Mixer Mill MM300 (Qiagen) 5 minuti a 30 Hz. Dopo centrifugazione a 13000 rpm per 10 minuti, è stato raccolto il surnatante e l'estrazione proseguita secondo le indicazioni del produttore. Il protocollo di purificazione comprende una fase di trattamento con DNase, utile per ridurre sostanzialmente eventuali contaminazioni di DNA genomico. L'RNA totale estratto è stato quindi conservato a -80°C . La quantità dell'RNA estratto è stata determinata tramite lettura spettrofotometrica (NanoDrop[®] ND-1000) alla lunghezza d'onda di 260 nm, mentre la purezza è stata stimata tramite i rapporti d'assorbanza A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} .

4.6 Retrotrascrizione (RT) e reazione a catena della polimerasi (PCR)

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA impiegando la trascrittasi inversa del virus della leucemia murina (MuLV) e utilizzando primers universali (random). Tutte le procedure sono state eseguite in cappa a flusso laminare al fine di evitare contaminazioni. Per la retrotrascrizione (RT) si prepara una miscela costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 5,5 mM MgCl_2 , 2 mM dNTPs, 2,5 μ M oligonucleotidi innesco universali (Random hexamers), 60 U inibitore dell' RNasi , 125 U di trascrittasi inversa MuLV, 2 μ g di RNA estratto ed acqua MilliQ fino ad un volume finale di 100 μ l. La miscela viene quindi posta in termociclatore (Mastercycler[®] Personal, Eppendorf[®]) per 10 minuti a 25°C seguiti da 60 minuti a 48°C e 5 minuti a 95°C .

Successivamente, 5 µl di cDNA così ottenuti sono stati amplificati utilizzando primers specifici per valutare la presenza dell'mRNA dei geni d'interesse utilizzando oligonucleotidi di sintesi disegnati in base alla sequenza genica codificante la proteina d'interesse ricavata dall'analisi della GenBank. La reazione d'amplificazione (polymerase chain reaction, PCR) è stata condotta in 25 µl di una miscela costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 5,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 0,2 µM primers senso ed antisenso, 0,625 U Taq polimerasi (Applied Biosystems) ed acqua MilliQ. La reazione è stata fatta avvenire in un termociclatore con 40 cicli di amplificazione. Ogni ciclo prevedeva 15 sec di denaturazione del cDNA a 95°C, ed 1 minuto di appaiamento/estensione alla temperatura indicata. La sequenza dei primers, le temperature di appaiamento e le dimensioni degli amplificati sono riportate in Tabella 1 per i geni murini ed in Tabella 2 per i geni umani. Gli amplificati così ottenuti sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% (p/v) (Seakem, FMC), addizionato di etidio bromuro (0,5 µg/ml) e visualizzati mediante transilluminatore a raggi UV.

4.7 Allestimento di curve standard per PCR quantitativa

4.7.1 Ligazione del prodotto di PCR nel vettore pGEM[®]-T (TA cloning)

Ciascuna curva standard, utilizzata nella reazione di PCR quantitativa, è stata preparata mediante clonaggio del rispettivo cDNA. In un primo momento sono state allestite normali reazioni di PCR utilizzando i primers riportati in Tabella 1 e cDNA di colon umano come *template*. I prodotti di PCR sono stati quindi visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% p/v e colorazione con etidio bromuro, al fine di evidenziare la presenza di un amplificato delle dimensioni attese. Il prodotto di amplificazione è stato quindi inserito nel vettore di clonaggio pGEM[®]-T (Promega) mediante reazione di ligazione condotta in una miscela formata da 3 Weiss unità di DNA ligasi del fago T4, 5 µl di buffer di ligazione 2x (60 mM Tris-HCl pH 7.8, 20 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 20 mM DTT, 10% PEG MW8000), 50 ng di vettore, dall'amplificato ed acqua fino ad un volume finale di 10 µl. La miscela, incubata a 16°C *overnight*, è stata poi utilizzata per trasformare cellule di *E.coli* DH5αF'.

Tabella1: primers umani utilizzati. T_m = temperatura di melting Pb = paia di basi

	<i>Primers senso</i>	<i>Primers antisenso</i>	<i>T_m</i>	<i>Pb</i>
WNT-5a	ctggcaggactttctcaagg	cctgccaaaaacagaggtgt	60	165

FRZ-1	gtgagccgaccaaggtgtat	gtgtaacagccggacaagaa	60	190
FRZ-5	ttcctgtcagcctgctacct	gacaggatgaccaccagat	60	194
FRZ-4	tcctgctcagaaggtccat	gcctcgttgttggaaggtt	60	190
ROR-2	gggacgtggaaaagatctg	caggggtgggatgctcttcag	60	189
GAPDH	atggaaatcccatcaccatctt	agagatgatgaccctttggct	60	164

4.7.2 Caratteristiche del vettore pGEM[®]-T

Il plasmide pGEM[®]-T [Figura 4.1] viene fornito nel kit "TA Cloning" (Promega) in forma linearizzata. Il plasmide lineare presenta, alle due estremità 3', delle code di dTTP a singolo filamento. I prodotti di PCR presentano, invece, alle estremità 3', dei prolungamenti costituiti da dATP. La complementarietà delle basi permette la ligazione dei due frammenti di DNA, reazione catalizzata dalla DNA ligasi del fago T4. Il plasmide contiene anche il promotore lac, che controlla l'espressione batterica del gene lacZα codificante per i primi 146 aminoacidi della β-galattosidasi. La ligazione di un frammento di DNA, quale un prodotto di PCR, interrompe la continuità del gene lacZα; in questo modo il gene codificante la β-galattosidasi non viene più espresso da cellule batteriche di *E.coli* DH5α. La carenza di tale enzima dà origine a colonie batteriche di colore bianco anziché blu in un terreno di crescita arricchito con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside; 40 μl ad una concentrazione di 40 mg/ml). Nella sequenza del plasmide pGEM[®]-T è compreso anche il gene per conferire la resistenza all'ampicillina, l'origine di replicazione batterica ColE1, la sequenza di basi complementari ai primers M13 Forward e M13 Reverse.

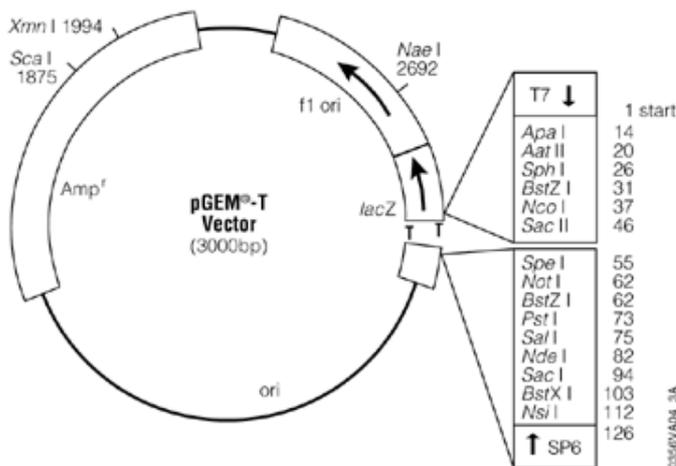


Figura 4.1 Rappresentazione schematica del vettore pGEM[®]-T (Promega): il sito di clonaggio si trova all'interno del gene lacZ; inoltre è presente il gene per la resistenza all'ampicillina.

4.7.3 Trasformazione in cellule batteriche

Per la trasformazione è stato impiegato il ceppo batterico *E.coli* DH5 α F' (F'/endA1 hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR (ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)). I batteri sono stati coltivati in terreno LB (Luria Bertani) sia liquido (1% bacto triptone, 0,5% estratto di lievito, 1% NaCl) che solido (contenente 1,5% p/v bacto agar) a cui è stata aggiunta ampicillina alla concentrazione finale di 100 μ g/ml.

Tale ceppo batterico è stato dapprima reso competente sottoponendo la coltura batterica in fase di crescita esponenziale precoce (O.D.₆₀₀=0,375) ad una serie di lavaggi con una soluzione di CaCl₂ 60 mM, glicerolo 15% v/v, PIPES 10 mM, pH 7.0 e successive centrifugazioni. Infine le cellule, risospese nella stessa soluzione, sono state suddivise in aliquote e conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

La trasformazione delle cellule batteriche è stata ottenuta con il metodo dello shock termico. Un volume corrispondente a 100 μ l di cellule competenti è stato miscelato con l'intero volume della soluzione di ligazione (10 μ l) ed incubato in ghiaccio per 30 minuti. Successivamente le cellule sono state sottoposte a shock termico incubando per 2 minuti a 37°C e subito dopo 5 minuti in ghiaccio. Alle cellule è stato aggiunto 1 ml di terreno LB liquido e quindi sono state incubate per 1 h a 37°C in agitazione (70 rpm). Le cellule sono quindi state seminate su piastre LB-agar addizionate di ampicillina e substrato X-gal e lasciate crescere per 16 ore a 37°C. Le colonie di colore bianco (dove la continuità della β -galattosidasi è stata interrotta) sono state sottoposte a screening per individuare la presenza del plasmide/inserto d'interesse.

4.7.4 Verifica del clonaggio

La verifica del clonaggio del cDNA d'interesse nel plasmide pGEM[®]-T è stata eseguita mediante estrazione del DNA plasmidico da una coltura batterica di 2 ml di terreno. Dopo lisi alcalina dei batteri, il DNA plasmidico è stato purificato mediante estrazione in fenolo/cloroformio e quindi precipitato per aggiunta di isopropanolo. Il pellet, lavato con etanolo al 70%, è stato risospeso in tampone TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) contenente RNasi pancreatica alla concentrazione di 20 µg/ml. L'avvenuta inserzione del cDNA d'interesse è stata verificata mediante doppia restrizione enzimatica condotta a 37°C per due ore e successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio per visualizzare i frammenti di DNA delle dimensioni attese. I cloni che mostravano inserti di dimensioni compatibili sono stati, infine, sottoposti a sequenziamento genico (par. 4.6.5). Il clone così selezionato è stato fatto crescere in 100 ml di LB liquidi addizionato di ampicillina. Da tale coltura batterica è stato successivamente purificato il DNA plasmidico mediante plasmidi Isolation Spin-Kit (Applichem GmbH) secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

4.7.5 Sequenziamento genico

Per il sequenziamento dei frammenti genici clonati è stato utilizzato un sequenziatore automatico a 16 capillari (ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems). Nella reazione di sequenziamento vengono utilizzati dideossinucleotidi terminatori (ddNTP) cui è legato un gruppo donatore di fluorescenza (fluoresceina) collegato, tramite un *linker*, ad un gruppo accettore di fluorescenza. Il *linker* assicura la massima efficienza di trasferimento di energia tra il gruppo donatore ed accettore di fluorescenza. Questi due gruppi sono associati ai ddNTP in modo tale da non interferire stericamente con la reazione di incorporazione nel filamento di DNA neosintetizzato. Ognuno dei quattro ddNTPs lega un diverso gruppo accettore, che è eccitato dalla stessa lunghezza d'onda (448 nm) ma emette il massimo di fluorescenza in un diverso intervallo di lunghezza d'onda, variabile tra 500 e 700 nm (dR110 per la guanosina nel blu, dR6G per l'adenosina nel verde, dTAMRA per la timidina nel giallo, dROX per la citidina nel rosso).

Il DNA da sequenziare è stato amplificato mediante una reazione di PCR, condotta in un volume di 10 μl contenente 500 ng di DNA plasmidico, 3,2 pmoli di primer specifico per l'inserto in esame, 1 μl di Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (contenente i quattro ddNTP terminatori marcati con i quattro fluorocromi e la polimerasi), 2 μl di buffer specifico 5x (5 mM MgCl_2 , 200 mM Tris-HCl pH 9), il tutto portato eventualmente a volume con acqua MilliQ. L'enzima che catalizza la reazione è l'AmpliTaq polimerasi che, a differenza della Taq polimerasi, è priva dell'attività nucleasica e discrimina con minor efficienza dNTP e ddNTP. La reazione di PCR di sequenza è stata condotta secondo il seguente schema ripetuto per 35 cicli: denaturazione a 96°C per 10 secondi, appaiamento a 50°C per 5 secondi, allungamento a 60°C per 4 minuti. Il DNA a singolo filamento così ottenuto viene purificato mediante precipitazione a freddo con sodio acetato 3 M e successivi lavaggi con etanolo al 95% ed al 70%. Tale purificazione permette di eliminare i terminatori di catena in eccesso che potrebbero interferire nell'analisi della sequenza. Una volta liofilizzato, il DNA viene risospeso in 10 μl di formamide (Amresco[®]) e denaturato a 95°C per 2 minuti.

Il DNA così ottenuto viene quindi analizzato al sequenziatore automatico: il DNA lineare a singolo filamento viene separato per elettroforesi capillare ed illuminato con una luce a lunghezza d'onda di 448 nm. Le differenti lunghezze d'onda di emissione associate ai quattro ddNTP vengono rilevate e registrate dal software Sequencing Analysis. Analizzando quindi lo spettro di emissione di ciascun campione è possibile ricostruire la sequenza nucleotidica del DNA.

4.7.6 Preparazione della curva standard per PCR quantitativa

Dopo aver determinato mediante misura spettrofotometrica la concentrazione di DNA plasmidico, espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, è stato calcolato il corrispondente numero di copie plasmidiche grazie ad un programma di foglio elettronico (MS-Excel) opportunamente impostato. Le concentrazioni espresse in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sono state computate in copie plasmidiche/ μl .

Il plasmide purificato è stato quindi diluito in acqua in maniera da ottenere una diluizione iniziale pari a 10^{10} copie plasmidiche/ μl . Tale soluzione è quindi stata sottoposta a diluizioni successive di un fattore 10 per ottenere concentrazioni plasmidiche decrescenti di un logaritmo fino al valore di 10^1 . La curva standard per la reazione di PCR Real Time è stata costruita amplificando 5 μl delle diluizioni comprese tra 10^6 e 10^1 contenenti quindi, all'inizio della reazione, 5×10^6 e 5×10^1 molecole di plasmide rispettivamente. Al termine della reazione d'amplificazione il software correla i valori di fluorescenza al numero di copie presenti inizialmente e, mediante una retta di regressione, è in grado di determinare il numero di copie di cDNA presenti in ogni campione analizzato.

4.8 Determinazione dei livelli di mRNA mediante RT-PCR Real-Time

Sull'RNA totale estratto e retrotrascritto in cDNA è stata eseguita la quantificazione dell'mRNA utilizzando il sistema ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer), un unico strumento risultante dalla combinazione di un termociclatore, di un rilevatore a fluorescenza laser e di software applicativi specifici. La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando delle sonde fluorescenti sequenza-specifiche riportate in tabella 2 la cui sequenza di appaiamento al DNA è interposta ai primers. Queste sonde sono legate al sito 5' al fluoroforo Fam che emette fluorescenza a 520 nm e al 3' un quencer (TAMRA) e sfruttano l'attività esonucleasica al 5' della Taq polimerasi. Infatti, quando la sonda non è idrolizzata, il quencer ed il fluoroforo sono vicini e non vi è alcuna emissione di fluorescenza perchè avviene il trasferimento di energia tra le due molecole (fenomeno così detto di quencing). Quando il fluoroforo viene liberato emette fluorescenza la cui intensità dipende dalla quantità iniziale di campione. Queste sonde sono state disegnate in modo da essere su un punto di giunzione tra due esoni e quindi permettono di escludere dalla misurazioni eventuali contaminazioni di DNA. Per alcuni geni invece la reazione di amplificazione della curva standard e di alcuni campioni è stata valutata utilizzando come sistema rilevatore il SYBR[®] Green I dye, un intercalante che presenta una minima fluorescenza nella miscela iniziale ed emette fluorescenza solo quando è legato a dsDNA. Il SYBR[®] Green è un intercalante estremamente aspecifico in quanto si lega a qualsiasi molecola di DNA a doppio filamento generato dalla Taq polimerasi. Al termine di ogni reazione di PCR quantitativa quindi è stata effettuata l'analisi delle curve di melting, al fine di escludere la presenza di dimeri di primers o amplificati aspecifici.

L'emissione di fluorescenza durante l'amplificazione di PCR viene analizzata da un software (SDS, Sequence Detection System software), che costruisce una curva d'amplificazione. Le misurazioni dal 3° al 15° ciclo vengono considerate rumore di fondo (livello di base) e su questi viene calcolata la deviazione standard. I valori di ciclo soglia vengono calcolati determinando il punto in cui la fluorescenza supera di 10 volte la deviazione standard del livello di base. Per determinare la concentrazione iniziale di campione, il software calcola il ciclo soglia di ogni campione e inserisce questo valore in una curva standard creata con concentrazioni note di uno template. La reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µl in una miscela costituita da 12,5 µl di *Universal Power* Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 µM primers senso ed antisenso, 5 µl di cDNA ed acqua MilliQ. La fase di denaturazione a 95°C per 10 minuti è seguita anche in queste reazioni da 40 cicli di denaturazione per 15 secondi e di appaiamento alla temperatura richiesta dai primers per 1 minuto. Ogni campione è stato analizzato in duplicato. Primers e condizioni delle reazioni di PCR sono riportati in Tabella 1. I trascritti mRNA specifici per ciascun gene sono stati sottoposti a quantificazione rapportandoli alle curve standard generate dall'amplificazione di diluizioni seriali in base 10 dei corrispondenti cDNAs clonati nel vettore pGEM[®]-T (Promega). In ogni esperimento lo *slope* della curva standard era costante e compreso tra i valori di -3,3 e -4,1 ed il coefficiente di correlazione 0.99. L'espressione di ciascun gene studiato è stata normalizzata utilizzando l'espressione del gene *house-keeping* GAPDH come controllo endogeno.

Tabella2: sonde umane utilizzate. T_A = temperatura d'appaiamento

GENE	Sequenza sonda
<i>Wnt5a</i>	5'Fam-GGGACGACATGGAAAAGATCTG-Tamra3'

4.9 Western Blotting (WB)

Campioni di mucosa colica o ISEMF sono stati seminati ad una densità di 1×10^6 /ml in piastre del diametro di 10 cm e lasciati in coltura sino al raggiungimento del 75-90% di confluenza. Per estrarre le proteine totali, dopo l'applicazione dell'opportuno stimolo e il periodo di incubazione indicato le cellule sono state lavate due volte con PBS freddo, rimosse dalla piastra di coltura, e quindi lisate in ghiaccio per 10 minuti mediante aggiunta di 100 μ l di buffer di lisi [1% Triton X-100, 0.5% acido deossicolico, 10 mM EDTA, 1X Protease Inhibitor Cocktail (Calbiochem) in PBS]. I tessuti congelati in azoto liquido sono stati invece omogeneizzati in 250 μ l di buffer di lisi [50 mM Tris HCl, pH 7.6, 0.25% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.1 mM PMSF, 1X Protease Inhibitor Cocktail (Calbiochem)] utilizzando l'omogeneizzatore Mixer Mill MM300 (Qiagen) 5 min a 30 Hz (Quiagen) e lasciati in ghiaccio per 10 min.

I campioni sono stati quindi centrifugati a 15.000 x *g* per 30 min a 4°C. Il sovranatante è stato raccolto e la concentrazione delle proteine totali è stata determinata mediante saggio di Bradford utilizzando il Protein Assay Kit (Bio-Rad). Ad opportuna quantità di campione (100 µg di proteine totali estratte da ISEMF o 100 µg di proteine totali estratte da tessuto) è stato aggiunto loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% v/v glicerolo, 2% SDS 10%, 5% v/v β-mercaptoetanol e 0.1% blu di bromofenolo). I campioni sono stati riscaldati a 100°C per 5 minuti prima di essere frazionati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide al 10% e successivamente trasferiti su una membrana di PVDF (Bio-Rad). Il trasferimento è stato condotto per 1 ora a 100 mV a 4°C utilizzando buffer di trasferimento (Tris base 20 mM, glicina 150 mM, metanolo 20% v/v). Eventuali legami aspecifici alla membrana sono stati bloccati mediante incubazione a temperatura ambiente per un'ora con blocking buffer (5% p/v latte non grasso (Oncogene), 0,05% v/v Tween-20 in PBS). La membrana è stata quindi incubata con anticorpo primario diretto contro la proteina d'interesse opportunamente diluito in blocking buffer (Tabella 1). L'incubazione è stata protratta per 16 ore a 4°C sotto costante agitazione. La membrana è stata quindi nuovamente lavata (tre volte per 15 minuti) in PBS-T e successivamente incubata per un'ora a temperatura ambiente con l'appropriato anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (HRP) alla diluizione adeguata (Tabella 2) in blocking buffer. Dopo ulteriori lavaggi con PBS-T, la membrana è stata sviluppata al buio per tempi diversi usando "ChemiLucent™ detection system" (Chemicon). Gli immunocomplessi sono stati visualizzati mediante reazione con l'anticorpo coniugato HRP, fotografati con il sistema VersaDoc (BioRad) ed analizzati con il software Quantity One (Bio-Rad).

Allo scopo di verificare il frazionamento su gel di quantità uguali di proteine per ciascun campione, gli immunocomplessi sono stati rimossi dalla membrana di nitrocellulosa mediante riscaldamento a 50°C per 15 min con strip buffer (Tri-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2% p/v e β-mercaptoetanol 100 mM). Dopo numerosi lavaggi con PBS, la membrana è stata nuovamente bloccata e si è proceduto al rilevamento della proteina β-actina come sopra descritto. La membrana è stata quindi nuovamente sviluppata ed analizzata.

4.10 Produzione di vettori adenovirali per silenziamento genico

Per la produzione dei vettori adenovirali è stato utilizzato il "BLOCK-iT™ Adenoviral RNAi Expression System" (Invitrogen). In tale sistema l'oligonucleotide codificante lo shRNA d'interesse viene clonato in un vettore di trasferimento (pENTR™/U6). Il plasmide risultante viene poi sottoposto a ricombinazione LR con pAd/BLOCK-iT™-DEST, il plasmide costituito dal DNA virale privo delle regioni E1 ed E3. I costrutti adenovirali ricombinanti vengono poi tagliati con Pac I per far esporre le regioni ITR e transfettati in cellule 293A (cellule di packaging), in grado di supplire le funzioni della regione E1 e quindi di far produrre particelle virali. I vettori adenovirali, successivamente amplificati e titolati mediante infezione di cellule 293A, sono pronti per la transfezione delle cellule d'interesse.

4.10.1 Caratteristiche del plasmide pAd/BLOCK-iT™-DEST e del plasmide di trasferimento pENTR™/U6

pAd/BLOCK-iT™-DEST [Figura 4.2A] è un plasmide di 34864 pb contenente il genoma del sierotipo 5 dell'Adenovirus umano (Ad5), delecto delle regioni E1 ed E3. Esso possiede una copia del gene per la resistenza all'ampicillina ed una per la resistenza al cloramfenicolo, utilizzati per la selezione dei costrutti ricombinanti, ed un'origine di replicazione pUC che ne permette la replicazione in *E.coli*. I siti *attR1* ed *attR2* sono sequenze derivanti dal Batteriofago λ che consentono la ricombinazione LR *in vitro* con il vettore di trasferimento.

pENTR™/U6 [Figura 4.2B] è un plasmide di 2854 pb contenente la cassetta d'espressione U6 RNAi, che comprende gli elementi necessari per l'espressione dello shRNA d'interesse: il promotore umano U6, riconosciuto dall'RNA polimerasi III, che consente l'espressione costitutiva dello shRNA, ed una sequenza di terminazione della trascrizione RNA polimerasi III-dipendente costituita da un *cluster* di 6 timidine. Tale cassetta d'espressione è fiancheggiata dai siti *attL1* ed *attL2*, sequenze derivanti dal Batteriofago λ , che permettono il clonaggio dello shRNA nel plasmide pAd/BLOCK-iT™-DEST mediante ricombinazione LR. pENTR™/U6 presenta inoltre la sequenza dell'origine di replicazione pUC ed il gene di resistenza alla kanamicina quale gene di selezione. Il vettore viene fornito linearizzato con *overhangs* di 4 nucleotidi alle estremità 5' per facilitare il clonaggio dell'oligonucleotide codificante lo shRNA.

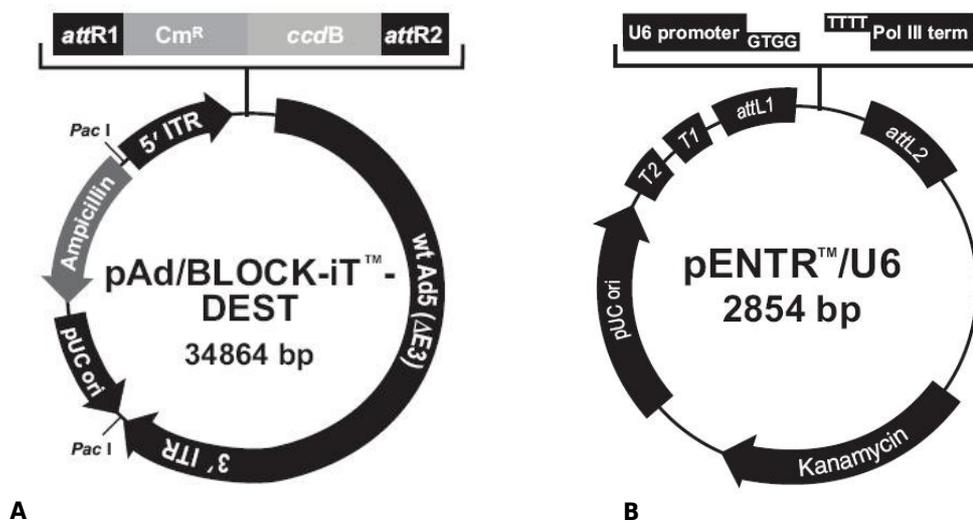


Figura 4.2 Rappresentazione schematica dei plasmidi **(A)** pAd/BLOCK-iT™-DEST e **(B)** pENTR™/U6. Nei plasmidi sono presenti i siti *attR* ed *attL*, sequenze derivanti dal Batteriofago λ , che permettono il clonaggio dello shRNA nel plasmide pAd/BLOCK-iT™-DEST mediante ricombinazione LR.

4.10.2 Progettazione degli oligonucleotidi codificanti per i shRNA

Le sequenze *target* per il silenziamento post-trascrizionale del gene umano TAK1 ed i relativi oligonucleotidi a singolo filamento (ss oligo) necessari per il clonaggio nel vettore di trasferimento pENTR™/U6 sono stati individuati e disegnati utilizzando il BLOCK-iT™ RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/index.jsp>)

4.10.3 Generazione degli oligonucleotidi a doppio filamento (ds oligo)

Per ogni inserto codificante lo shRNA sono stati ordinati alla ditta Invitrogen due ss oligo, uno con la sequenza senso e l'altro con la sequenza antisenso dell'inserto. Gli oligonucleotidi, forniti liofilizzati, sono stati risospesi in acqua *nuclease-free* ad una concentrazione finale di 200 μ M. Per generare gli oligonucleotidi a doppio filamento necessari per il clonaggio in pENTRTM/U6 è stata quindi allestita una reazione d'appaiamento. In un tubo è stata preparata una miscela costituita da 5 μ l di ss oligo senso, 5 μ l di ss oligo antisenso, 2 μ l di Oligo Annealing Buffer 10X (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 1 M NaCl) e 8 μ l di acqua *nuclease-free*. La soluzione è stata quindi incubata a 95°C per 5 minuti (denaturazione), e successivamente lasciata raffreddare a temperatura ambiente per 15 minuti (appaiamento). I ds oligo così ottenuti (stock 50 μ M) sono stati poi diluiti ad una concentrazione finale di 5 nM in Oligo Annealing Buffer 1X per il successivo clonaggio in pENTRTM/U6.

4.10.4 Ligazione dei ds oligo nel vettore di trasferimento pENTRTM/U6

La reazione di ligazione è stata condotta in un volume totale di 20 μ l. Tale volume è costituito da 4 μ l di tampone di ligazione 5X (250 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (w/v) polyethylene glycol-8000), 2 μ l (1 ng) di vettore pENTRTM/U6, 1 μ l di ds oligo 5nM ed 1 μ l (1 unità) della DNA ligasi del fago T4, il tutto in acqua *nuclease-free*. La reazione è stata incubata a temperatura ambiente per 2 ore e 5 μ l del prodotto utilizzati per trasformare ceppi competenti di *E.coli* One Shot[®] TOP10.

4.10.5 Trasformazione di cellule batteriche competenti *E.coli* One Shot[®] TOP10

E' stato impiegato il ceppo di *E.coli* One Shot[®] TOP10 (F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*) fornito dal kit, caratterizzato da un'efficienza di trasformazione di 1x10⁹ cfu/ μ g di DNA.

Un volume corrispondente a 20 µl di cellule competenti è stato miscelato con 5 µl della soluzione di ligazione ed incubato in ghiaccio per 30 minuti. Successivamente le cellule sono state sottoposte a shock termico incubando per 1 minuto a 42°C e subito dopo 5 minuti in ghiaccio. Alle cellule sono stati aggiunti 250 µl di terreno S.O.C. (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosio) e quindi sono state incubate per 1 h a 37°C in agitazione (200 rpm). Infine le cellule batteriche sono state seminate su piastre di LB-agar addizionato di kanamicina (50 µg/ml).

Dopo incubazione *overnight* a 37°C le colonie cresciute sono state sottoposte a screening per individuare la presenza del plasmide/inserto d'interesse.

4.10.6 Verifica del clonaggio di ds oligo nel vettore di trasferimento pENTRTM/U6

Per verificare l'avvenuto clonaggio dell'inserto codificante lo shRNA d'interesse nel vettore di trasferimento pENTRTM/U6, le colonie kanamicina-resistenti sono state inoculate in 5 ml di terreno SOB (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) addizionato di kanamicina (50 µg/ml) e lasciate crescere *overnight* a 37°C. Il DNA plasmidico è stato poi isolato mediante miniprep e sottoposto a sequenziamento genico (par. 4.6.5). Il DNA da sequenziare è stato amplificato mediante una reazione di PCR, condotta in un volume di 15 µl contenente 500 ng di DNA plasmidico, 6 µl di primer 1 µM, 1 µl di BigDye Terminator Ready Reaction Mix, 3 µl di buffer 5x (5 mM MgCl₂, 200 mM Tris-HCl pH 9), 5% v/v di dimetilsolfossido (DMSO), il tutto portato eventualmente a volume con acqua MilliQ. I primers utilizzati per il sequenziamento sono l'U6 Forward 5'-GGACTATCATATGCTTACCG-3' e l'M13 Reverse 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' forniti dal kit.

Una volta accertata la correttezza del clonaggio e della sequenza dell'inserto, il DNA plasmidico è stato amplificato e purificato mediante maxiprep per la successiva analisi d'efficacia di silenziamento.

4.10.7 Verifica dell'efficacia di silenziamento

Per verificare l'efficacia dei shRNA clonati in pENTRTM/U6 sono stati effettuati dei saggi di iRNA transiente mediante transfezione dei costrutti nella linea cellulare umana 293A (Invitrogen).

In particolare, 3 µg di ogni plasmide codificante lo shRNA per Wnt5a1 o per LacZ quale controllo negativo sono stati transfettati in cellule 293A confluenti al 90%, precedentemente seminate in una piastra da 6 pozzetti (Cellstar®), utilizzando 6 µl di Lipofectamine™2000 (Invitrogen) (par. 4.10.9). Dopo 48 ore le cellule sono state raccolte e l'RNA totale estratto e retrotrascritto (par. 4.4-5) per la successiva analisi quantitativa mediante Real Time RT-PCR dell'espressione del gene Wnt5a (par. 4.7). Il costrutto maggiormente efficace nel silenziamento di TAK1 è stato scelto per il successivo trasferimento mediante ricombinazione LR nel plasmide pAd/BLOCK-iT™-DEST.

4.10.8 Ricombinazione LR per la produzione di costrutti adenovirali ricombinanti

La ricombinazione LR catalizza *in vitro* la ricombinazione tra i siti *attL* del vettore di trasferimento pENTR™/U6 ed i siti *attR* del vettore pAd/BLOCK-iT™-DEST sfruttando le proprietà della ricombinazione sito-specifica del batteriofago λ. Il kit fornisce la LR Clonase™ Il enzyme mix, che contiene le proteine del Batteriofago λ Integrasi (Int), Excisionasi (Xis) e la proteina codificata da *E.coli* Integration Host Factor (IHF) nel tampone di reazione.

La reazione di ricombinazione è stata condotta in un volume totale di 10 µl. Tale volume è costituito da 150 ng di pENTR™/U6 contenente lo shRNA, 150 ng di plasmide pAd/BLOCK-iT™-DEST e 2 µl di LR Clonase™ Il enzyme mix, il tutto in tampone TE, pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA). La reazione è stata incubata a 25°C per 3 ore; successivamente è stata bloccata mediante aggiunta di 1 µl di soluzione di proteinasi K (2 µg/µl in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM CaCl₂, 50% glicerolo) ed incubazione a 37°C per 10 minuti. L'intero prodotto è stato poi utilizzato per trasformare ceppi competenti di *E.coli* One Shot® TOP10 (par. 4.10.5). Le cellule batteriche sono state seminate su piastre di LB-agar addizionato di ampicillina (100 µg/ml). Dopo incubazione *overnight* a 37°C le colonie cresciute sono state inoculate in 5 ml di terreno SOB addizionato di ampicillina (100 µg/ml) e lasciate crescere *overnight* a 37°C. L'avvenuta ricombinazione è stata verificata mediante semina su piastre di LB-agar addizionato di cloramfenicolo (30 µg/ml): i costrutti ricombinanti risultano sensibili al cloramfenicolo, poiché la ricombinazione fa perdere il gene di resistenza per tale antibiotico. Il DNA plasmidico è stato poi isolato mediante miniprep e sottoposto a sequenziamento genico (par. 4.6.5) per confermare la presenza dello shRNA. I primers utilizzati per il sequenziamento sono il pAd forward priming site 5'-GACTTTGACCGTTTACGTGGAGAC-3' ed il pAd reverse priming site 5'-CCTTAAGCCACGCCACACATTTTC-3' forniti dal kit.

Una volta accertata la presenza dell'inserto e la stabilità della ricombinazione, il DNA plasmidico è stato amplificato e purificato mediante maxiprep per la successiva transfezione in cellule di packaging.

4.10.9 Transfezione del genoma adenovirale ricombinante in cellule di packaging

In preparazione alla transfezione, 8 µg di genoma adenovirale ricombinante sono stati digeriti con l'enzima Pac I, estratti con il metodo fenolo/cloroformio e precipitati con etanolo. Il plasmide linearizzato è stato risospeso in 20 µl di acqua sterile.

Ventiquattro ore prima della transfezione 5×10^5 cellule della linea cellulare umana 293A (Invitrogen) sono state seminate in un pozzetto di una piastra da 6 pozzetti (Cellstar®) in 2 ml di terreno DMEM completo, così da ottenere circa l'80-90% di confluenza al momento della transfezione. Il giorno della transfezione il terreno è stato sostituito con 1,5 ml di terreno DMEM 10% privo di antibiotico.

Per introdurre il genoma adenovirale ricombinante nelle cellule 293A è stata utilizzata Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), una soluzione di lipidi cationici in grado di complessare il DNA, formando così dei lipoplessi che poi si fondono con la membrana citoplasmatica delle cellule.

Al momento della transfezione, si sono preparate due soluzioni in terreno DMEM privo di siero ed antibiotici, per un volume finale di 250 µl ognuna: nella prima si sono posti 1 µg di DNA adenovirale ricombinante linearizzato con Pac I mentre nella seconda si sono aggiunti 3 µl di lipofectamina. Entro 5 minuti dalla loro preparazione, le due soluzioni sono state mescolate e lasciate a temperatura ambiente per 20 minuti. Al termine dell'incubazione, la miscela ottenuta è stata aggiunta al pozzetto contenente le cellule 293A. La piastra è stata poi posta in incubatore a 37°C, 5% CO₂ *overnight*, dopodiché il terreno è stato sostituito con DMEM 10% completo. 48 ore dopo la transfezione le cellule sono state tripsinizzate e seminate in una piastra da 10 cm di diametro in 10 ml di DMEM 10% completo. Successivamente metà del terreno è stato cambiato ogni 3 giorni.

Circa 8-10 giorni dopo la transfezione, si è iniziato ad osservare effetto citopatico (CPE). Si è lasciata procedere l'infezione finchè non si è osservato CPE in circa l'80% delle cellule (circa 12-15 giorni); le cellule sono state quindi raccolte e sono stati effettuati tre cicli di congelamento/scongelo (alternando immersione in azoto liquido e incubazione a 37°C) per favorire il rilascio dei virioni presenti all'interno delle cellule. Al termine della procedura i detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione a 4000 rpm per 15 min ed il surnatante contenente il virus ricombinante (*crude viral lysate stock*) è stato raccolto e conservato a -80°C per la successiva amplificazione.

4.10.10 Amplificazione dell'adenovirus ricombinante

Allo scopo di generare un'adeguata quantità di virus, sono stati compiuti più cicli d'amplificazione utilizzando il seguente schema: sono state seminate 5×10^6 cellule 293A in una fiasca da 75 cm² (Cellstar®); il giorno successivo le cellule sono state infettate con 100 µl del *crude viral stock* ottenuto dalla transfezione, diluito in 10 ml di terreno DMEM 5%. Quando si è osservato l'80% di CPE (48-72 ore circa dopo l'infezione), il terreno è stato raccolto e le cellule, risospese in 1 ml di terreno DMEM e 10% v/v di glicerolo, sono state sottoposte a tre cicli di congelamento/scongelo, centrifugate ed il surnatante ottenuto è stato titolato, aliquotato e conservato a -80°C.

4.10.11 Titolazione dell'adenovirus ricombinante mediante metodo Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID₅₀)

Per stimare il titolo di adenovirus ricombinante ottenuto in seguito ad amplificazione è stato utilizzato il metodo TCID₅₀, che si basa sull'osservazione dello sviluppo d'effetto citopatico in cellule 293A in seguito ad infezione con diluizioni seriali del virus.

Ventiquattro ore prima dell'infezione una piastra da 96 pozzetti è stata seminata con $2,5 \times 10^3$ cellule 293A/100 μ l DMEM 2%/pozzetto. Il giorno successivo 100 μ l di adenovirus ricombinante da titolare sono stati diluiti in 900 μ l di DMEM 2% (diluizione 10^{-1}). Tale soluzione è quindi stata sottoposta a diluizioni successive di un fattore 10 per ottenere concentrazioni virali decrescenti di un logaritmo fino alla diluizione 10^{-11} . In ogni fila di pozzetti della piastra da 96 sono stati aggiunti 100 μ l/pozzetto per 10 pozzetti delle otto diluizioni virali più alte (dalla 10^{-4} alla 10^{-11}); gli ultimi due pozzetti d'ogni fila sono stati invece utilizzati come controllo negativo. La piastra è stata poi incubata a 37°C, 5% CO₂ per 10 giorni. Dopo tale periodo è stato osservato l'effetto citopatico (CPE) al microscopio ottico e si sono contati i pozzetti positivi per fila. Un pozzetto è stato considerato positivo per l'effetto citopatico anche se solo poche cellule presentavano CPE. Il test è da ritenersi valido solamente se i controlli negativi non presentano CPE e la diluizione più bassa (10^{-4}) mostra il 100% d'infezione mentre la diluizione più alta (10^{-11}) non presenta alcun CPE. Il titolo virale viene quindi stimato mediante il metodo statistico di Kärber:

$$T=10^{1+d(S-0,5)+1} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$$

d=Log₁₀ della diluizione (=1 per diluizioni di fattore 10)

S=somma dei rapporti di pozzetti CPE+/fila per ogni diluizione (dalla 10^{-1} alla 10^{-10})

In seguito si converte il titolo virale in PFU/ml sottraendo 0,7 Log al titolo calcolato come TCID₅₀/ml.

4.11 Saggio d'infettività su ISEMF

Al fine di determinare la minima quantità di particelle adenovirali necessarie per assicurare un'efficienza di trasduzione dei miofibroblasti pari o superiore al 95%, un ugual numero di ISEMF è stato trasdotto con 25, 50, 100, 200 o 500 MOI d'adenovirus ricombinante AdLacZ, generato precedentemente nel nostro laboratorio.

L'adenovirus ricombinante AdLacZ codifica per l'enzima β -galattosidasi, che idrolizza i β -galattosidi. L'X-gal è un suo substrato cromogeno, utilizzato per individuare le cellule che esprimono l'enzima: la β -galattosidasi infatti idrolizza l'X-gal determinando la formazione di galattosio e di un precipitato insolubile di colore blu.

Quarantotto ore dopo la trasduzione, le cellule sono state staccate mediante tripsinizzazione, centrifugate e lavate con PBS. Sono state in seguito fissate con una soluzione di glutaraldeide 0,2% v/v per 10 min a 4°C, lavate con PBS ed incubate per 2 ore a 37°C con una soluzione di X-gal (1 mg/ml). Al termine di queste operazioni il numero di ISEMF trasdotte (risultanti di colore blu) è stato determinato al microscopio ottico, contando le cellule per mezzo di un emocromocitometro.

4.12 Silenziamento di Wnt5a in ISEMF mediante AdshRNA

ISEMF sono stati cresciuti per 4 passaggi in DMEM addizionato di 20% v/v FBS (Gibco®), 2 mM L-glutamina, 0,1 mM di amminoacidi non essenziali, 1 mM di sodio piruvato, 100 U penicillina/100 µg streptomina/0,25 µg amfotericina B/ml (Gibco®) e poi posti in coltura in piastre da sei pozzetti, 1 ml per ciascun pozzetto. Il giorno successivo il terreno è stato sostituito ed il secondo giorno di coltura un pozzetto di cellule è stato utilizzato per contare le cellule presenti. A ciascun pozzetto è stato quindi aggiunto l'adenovirus ricombinante codificante lo shRNA d'interesse ad una MOI=100 in 1 ml di DMEM 20%. Dopo 90 minuti d'incubazione a 37°C, 5% CO₂ ogni pozzetto è stato portato ad un volume finale di 2 ml con terreno DMEM 20% e la piastra è stata riposta in incubatore. Dopo 72 ore le cellule sono state raccolte e congelate per le successive analisi mediante real-time PCR.

4.13 Determinazione della proliferazione cellulare mediante saggio con Timidina Triziata

Sono state seminate 20.000 cellule in piastre da 12 pozzetti, 2 per ciascuna linea cellulare. Dopo 48 ore è stato effettuato il silenziamento di Wnt5a mediante adWnt5a specifico su un singolo pozzetto per linea, mentre si è usato adLacZ come controllo. A 24 ore dalla transfezione, il terreno di coltura è stato prelevato, le cellule sono state lavate con 1ml di RPMI e per ciascun pozzetto è stato aggiunta una mix costituita da 0,5 ml di DMEN al 5% di FBS con o senza la proteina ricombinante e 0,3 µl di timidina triziata: le cellule incorporano questo elemento nel loro DNA durante la fase di replicazione, e con ciò si è in grado di marcarle. Si usa la timidina in quanto si tratta di una base presente solo nel DNA, mentre il trizio in quanto isotopo dell'idrogeno di cui è possibile misurarne la radioattività: attraverso questo saggio si possono quindi valutare le diverse condizioni di crescita delle diverse linee cellulari considerate e, attraverso il silenziamento di adWnt5a e l'aggiunta della corrispondente proteina ricombinante, se e in che modo Wnt5a agisca nella proliferazione cellulare. Dopo 48 ore dal trattamento con timidina triziata, il terreno è

stato prelevato dai pozzetti, ciascun pozzetto è stato lavato con 1ml di PBS e successivamente aggiunto di 200 µl di SDS al 10% e lasciato over night: in questo modo si determina la lisi delle cellule e si ottiene dunque la fuoriuscita di DNA marcato. Successivamente il lisato cellulare è stato aggiunto a 5ml di un liquido di scintillazione e l'analisi è stata effettuata attraverso l'utilizzo di uno strumento specifico, il beta counter. Le radiazioni beta emesse dal lisato cellulare contenente DNA marcato, collidono con le molecole del liquido di scintillazione che a loro volta rilasceranno dei fotoni di luce, rilevati e misurati (in colpi per minuto CPM) dal beta counter. Un elevato valore di CPM è indice di un'elevata proliferazione, in quanto indica una maggiore quantità di timidina nel lisato cellulare: infatti, più le cellule crescono e si riproducono, più replicano il DNA e più timidina triziata incorporano per sintetizzarlo. I dati ottenuti nei singoli esperimenti sono stati normalizzati considerando la proliferazione ottenuta nei ISEMF ottenuti da mucosa di soggetti sani (controllo) pari a 100%.

4.14 Ciclo cellulare e citometria di flusso

Ciclo cellulare

Il ciclo cellulare consiste in quattro fasi coordinate: la crescita cellulare, la replicazione, la distribuzione dei cromosomi duplicati per le cellule figlie, e la divisione cellulare. Negli eucarioti il ciclo cellulare consiste di quattro fasi discrete. Sebbene la crescita cellulare sia normalmente un processo continuo, il DNA è sintetizzato solo durante una fase del ciclo cellulare e i cromosomi replicati sono allora distribuiti ai nuclei delle cellule figlie attraverso una complessa serie di eventi che precedono la divisione cellulare. La progressione tra questi stadi del ciclo cellulare è controllata attraverso un apparato regolarmente conservato che non solo coordina i differenti eventi del ciclo cellulare ma anche connette il ciclo stesso con segnali extracellulari che controllano la proliferazione cellulare stessa. Un tipico ciclo cellulare di una cellula eucariotica è di circa 24 ore e si divide in due fasi ben distinte: la mitosi e l'interfase. La mitosi (divisione nucleare) corrisponde alla divisione delle cellule madri in cellule figlie e culmina con la citocinesi (divisione fisica vera e propria delle cellule). La mitosi e la citocinesi durano solo circa un'ora e il 95% del tempo la cellula lo trascorre in interfase. Durante l'interfase i cromosomi sono condensati e distribuiti nel nucleo, così che questo appare morfologicamente uniforme. A livello molecolare l'interfase è il periodo durante il quale avviene sia la crescita cellulare sia la replicazione del DNA, in maniera ordinata in preparazione alla divisione cellulare.

Le cellule crescono durante l'interfase e la maggior parte si divide raddoppiando in dimensione da una mitosi all'altra. In contrasto il DNA è sintetizzato soltanto durante una porzione d'interfase. Il tempo di sintesi di DNA perciò divide il ciclo delle cellule eucariote in quattro fasi discrete: la fase M corrisponde alla fase di mitosi, che è normalmente seguita dalla citocinesi. Questa fase poi è seguita da una fase di passaggio G1 che corrisponde all'intervallo tra la mitosi e l'inizio della replicazione del DNA. Durante la fase G1 la cellula è metabolicamente attiva e cresce continuamente, però non replica il suo DNA. La fase G1 è seguita dalla fase S durante la quale avviene la replicazione del DNA. Dopo la sintesi del DNA segue la fase G2 durante la quale la crescita continua e sono sintetizzate le proteine in preparazione alla mitosi. La durata del ciclo cellulare varia notevolmente dal tipo di cellula. Per una cellula proliferante umana il ciclo totale è di 24 ore e la fase G1 potrebbe durare più o meno 11 ore, la fase S 8 ore, la G2 4 ore e la fase M 1 ora. La progressione delle cellule attraverso il ciclo cellulare è regolata da segnali extra-cellulari dall'ambiente e da segnali interni che monitorizzano e coordinano i vari processi che prendono parte alle differenti fasi del ciclo cellulare. Un esempio del ciclo cellulare da segnali extra-cellulari è dato dall'effetto dei fattori di crescita sulla proliferazione cellulare. In più, differenti processi cellulari come la crescita cellulare, la replicazione del DNA e la mitosi, tutti devono essere coordinati durante la progressione del ciclo. Questo fa sì che ci siano una serie di punti di controllo che regolino la progressione nelle diverse fasi del ciclo. Un importante punto di controllo in molti tipi di cellule avviene nella fase G1 che controlla la progressione dalla fase G1 alla fase S. Nelle cellule animali è detto punto di restrizione: in presenza di fattori di crescita appropriati le cellule passano il punto di restrizione ed entrano nella fase S. Passato il punto di restrizione, la cellula è costretta a passare alla fase S e al resto del ciclo cellulare, anche in assenza di ulteriori fattori di crescita. D'altra parte se i fattori di crescita appropriati non sono disponibili in G1, la progressione attraverso il ciclo cellulare si ferma al punto di restrizione e le cellule entrano in uno stato di quiescenza del ciclo cellulare che si chiama G0, in cui possono rimanere per lunghi periodi di tempo senza proliferare. Le cellule in G0 sono metabolicamente attive nonostante cessino di crescere e abbiano un ridotto tasso di sintesi proteica. Sebbene la maggior parte delle cellule siano regolate nella fase G0, alcuni tipi cellulari sono regolati in G2.

Analisi del ciclo cellulare mediante citometria di flusso e marcatura con propidio ioduro

L'analisi del ciclo cellulare richiede l'identificazione delle cellule nei diversi stadi. Sebbene le cellule in mitosi possano essere distinte microscopicamente, le cellule negli altri stadi (G1,S,G2) devono essere identificate da altri criteri, per esempio la quantificazione del contenuto di DNA cellulare.

Le cellule animali in fase G1 sono diploidi e il loro contenuto di DNA è di $2n$. Durante la fase S la replicazione incrementa da $2n$ a $4n$ e le cellule che sono in questa fase hanno contenuto di DNA che varia da $2n$ a $4n$. Il contenuto in DNA rimane di $4n$ per le cellule in fase G2 e in fase M tuttavia dopo la citocinesi si dimezza e ritorna nuovamente ad essere $2n$. Sperimentalmente il contenuto di DNA cellulare può essere determinato attraverso l'incubazione delle cellule con un fluorocromo che lega il DNA, seguita da un'analisi dell'intensità della fluorescenza delle singole cellule. L'analisi viene effettuata con uno strumento detto citofluorimetro a flusso.

Il citofluorimetro a flusso permette la misurazione rapida della luce deviata e della fluorescenza emessa da cellule opportunamente marcate e illuminate. Le cellule sono sospese in un mezzo liquido e producono segnali quando attraversano un fascio di luce. La luce diffusa e la fluorescenza emessa da ciascuna particella sono raccolte da specifici dispositivi opto-elettronici, che le convertono in segnali analogico-digitali, ed inviate ad un computer, dove la distribuzione del segnale viene rappresentata con istogrammi di frequenza o citogrammi, facendo riferimento a diversi parametri. La luce diffusa nella stessa direzione della luce incidente è collegata alla dimensione della cellula (Forward Scatter, FSC), mentre la luce diffusa con un angolo di 90° fornisce informazioni relative alla complessità strutturale della particella (Side Scatter, SSC). La dimensione e la complessità sono considerati parametri intrinseci poiché possono essere ottenuti senza sottoporre il campione a particolari procedure di marcatura, tuttavia al fine di ottenere altre informazioni, i campioni possono essere opportunamente trattati con differenti fluorocromi. In questo lavoro si sono marcate le cellule con ioduro di propidio la cui fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di DNA cellulare, intercalandosi questo agli acidi nucleici. In questa maniera si può risalire alla fase del ciclo delle cellule stesse.

Lo studio del ciclo cellulare con citometria di flusso è stato condotto con un FACSort flow cytometer dotato di un computer MacIntosh e del relativo software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, Calif.) per l'acquisizione dei dati. L'apparato è dotato di una lampada ad argo che opera alla lunghezza d'onda di 480nm .

Per ogni campione si sono analizzato 10.000 cellule per ottenere una statistica significativa. Grazie all'analisi multiparametrica così condotta si sono ottenuti 2 grafici:

- Il primo che mostra le popolazioni cellulari, ottenuto grazie alle proprietà intrinseche delle cellule stesse che permettono di discriminare la dimensione della cellula (FSC e SSC)
- Il secondo che corrisponde all'istogramma del ciclo cellulare che normalmente viene fatto prendendo in considerazione il parametro FL2-A (canale della fluorescenza dello PI)

Per l'analisi invece, si è usato il programma MacIntoch ModFit for Mac.

L'analisi è sicuramente la fase più delicata di tutto il processo. Infatti, per interpretare i dati in modo corretto è necessario prima di tutto selezionare gli eventi cellulari interessanti, ossia selezionare per il primo grafico ottenuto, la popolazione che ci interessa. Una volta selezionate queste regioni il software chiede all'operatore di scegliere un modello matematico-statistico a cui rifarsi. Dopo di questo si sistemano i picchi del modello con quelli dei dati reali, facendoli coincidere. I picchi del modello sono 4:

- picco della fase G0-G1
- picco della fase G2-M
- Area della fase S
- Area della fase dei detriti cellulari e delle cellule in apoptosi

I campioni sono stati preparati seminando 100.000 cellule in piastre da 6 pozzetti. Il giorno successivo alla semina, le cellule sono state sincronizzate privandole di siero e trasfettate (vedi par 4.6) come da protocollo. Dopo la sincronizzazione e il trattamento con il vettore adenovirale adWnt5a o la proteina rWnt5a, sono state nuovamente poste in presenza di terreno contenente siero. Allo scadere del tempo di trattamento sono state raccolte per l'analisi. In breve, le cellule risospese con la tripsina vengono raccolte e centrifugate a 1800 rpm per 5 minuti e lavate con 1 ml di PBS. Successivamente, il pellet viene risospeso e le cellule vengono fissate con etanolo al 70% in ghiaccio per 2 ore. Dopo questa fase, vengono centrifugate nuovamente e lavate con PBS. Infine vengono risospese in una soluzione contenente ioduro di propidio (0,1% trito X 100; 0,2 mg/ml RNase A ; 0,02 mg/ml PI) . Dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente e al buio, sono stati aggiunti 100 µl di Binding Buffer ad ogni campione. La rivelazione è avvenuta utilizzando il citofluorimetro FACSCalibur (Becton&Dickinson,-BD- Franklin Lakes, NJ USA); L'acquisizione è avvenuta usando il programma della BD Cellquest.

4.15 Apoptosi e analisi morfologica dell'apoptosi con l'annessina V

Le fasi dell'apoptosi

L'apoptosi o morte cellulare programmata è un processo elementare della vita che, assieme alla proliferazione e al differenziamento mantiene l'omeostasi di tessuti ed organi; ha quindi un ruolo importante nello sviluppo di organismi pluricellulari, nella regolazione e nel mantenimento della popolazione cellulare sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Leist & Jaattela, 2001). Il processo apoptotico viene diviso in quattro fasi, una iniziatrice o di induzione, una esecutrice, una di riconoscimento e una di fagocitosi. La prima fase ha inizio con l'arrivo di segnali, interni o esterni alla cellula (mediati da recettori), altri fisici o genotossici (l'espressione di oncogeni etc.). In questa fase i segnali sono individuati dalla cellula che, come risposta, attiva vie multiple di trasduzione e amplificazione del segnale. Prende così inizio la fase esecutrice, durante la quale la macchina apoptotica agisce secondo diversi obiettivi portando a morte la cellula mediante l'attivazione di diverse proteine tra le quali le caspasi (cysteinyll aspartate prtoteinases). Infine, intervengono dei sistemi di riconoscimento ed eliminazione delle cellule apoptotiche (Bohm & Schild, 2003; Mandic, 2003; Guenzi, 2006). Nelle prime fasi dell'apoptosi la membrana cellulare subisce delle alterazioni funzionali; la fosfatidilserina (phosphatidylserine= PS) che normalmente è localizzata sulla superficie interna della membrana citoplasmatica, viene esposta all'esterno (meccanismo a "Fip-Flop") e può essere riconosciuta con l'utilizzo dell'annessina-V in grado di legarla (Fig.10). La PS è uno dei vari segnali che, le cellule adiacenti o altre con capacità fagocitaria, riconoscono per distruggere i corpi apoptotici. La perdita di ioni K^+ attraverso la membrana citoplasmatica insieme al taglio enzimatico del citoscheletro causa lo shrinkage cellulare. Simultaneamente aumenta l'entrata di ioni Ca^{2+} , importanti per l'attivazione degli enzimi della catena apoptotica (Bohm & Schild, 2003).

Esterno della cellula

APOPTOSI

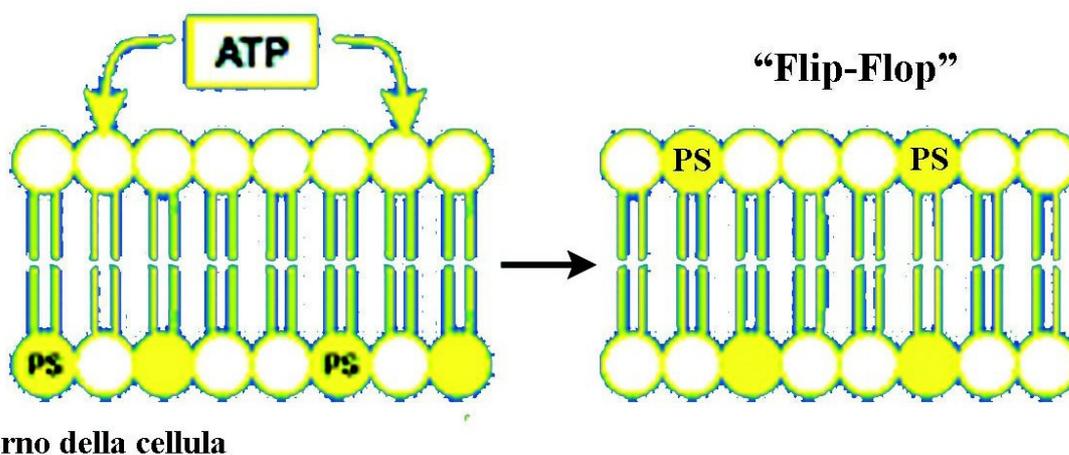


Figura .fasi iniziali dell'apoptosi; meccanismo a "Flip-Flop" con esposizione della fosfatidilserina (PS) sulla membrana citoplasmatica.

Analisi morfologica dell'apoptosi con l'annessina V

Per studiare il ruolo del Wnt5a nell'apoptosi, e per testare se il trattamento con AdWnt5a o rWnt5a protegge o espone le cellule all'apoptosi, si è utilizzato il metodo dell'annessina V. Questa molecola è in grado di legare la fosfatidilserina (PS) esposta sulla membrana citoplasmatica delle cellule in apoptosi colorandole in verde. Assieme all'annessina è stato utilizzato il PI che colora in rosso i nuclei delle cellule morte o di quelle che hanno la membrana cellulare alterata e non sono pertanto più in grado di espellere il colorante. Quindi le cellule in apoptosi si colorano in verde nelle fasi iniziali del processo e anche in rosso durante l'avanzamento dell'apoptosi, mentre le cellule vive si colorano solo in rosso. I campioni sono stati preparati seminando in pozzetti da 6 100.000 cellule/pozzetto. Il giorno successivo alla semina le cellule sono state trasfettate (vedi par x) come da protocollo, e trattate con una molecola che induce l'apoptosi, la staurosporina, con una concentrazione pari a 0,6 μM per 12 ore tale da indurre la morte del 50% delle cellule. Allo scadere del tempo di trattamento vengono raccolte il per l'analisi. E' stata seguita la metodica allegata al kit (IMGENEX CytoGLO Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit). In breve, le cellule risospese e presenti nel surnatante vengono raccolte e centrifugate a 1800 rpm per 5 minuti e lavati con 500 μl di PBS. Successivamente, il pellet è stato risospeso in 100 μl di Binding Buffer, 1 μl di Annessina V-FITC e 1 μl di ioduro di propidio (PI). Dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente e al buio, sono stati aggiunti 100 μl di Binding Buffer ad ogni campione. La rivelazione è avvenuta utilizzando il

citofluorimetro FACSCalibur (Becton&Dickinson,-BD- Franklin Lakes, NJ USA); L'acquisizione è avvenuta usando l'applicativo della BD-Cellquest.

4.16 Analisi statistica

I dati ottenuti dall'analisi di RT-PCR quantitativa vengono riportati come incremento del numero di copie di mRNA rispetto al controllo. Tutti i dati vengono espressi come media \pm errore standard. L'analisi statistica è stata condotta mediante *t* test di Student. L'analisi statistica della coorte di pazienti è stata condotta mediante test U di Mann Whitney, l'analisi di correlazione mediante la correlazione per Ranghi di Spearman. I risultati ottenuti sono stati considerati statisticamente significativi per un valore di $p < 0.05$.

5.RISULTATI

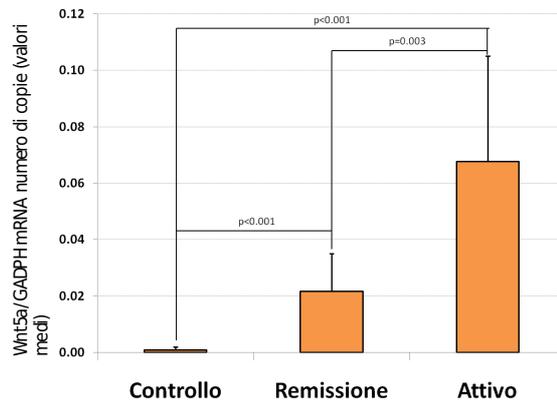
5.1. Espressione di Wnt5a in corso di Rettocolite Ulcerosa

5.1.1 L'espressione di Wnt5a è aumentata nella mucosa colica sede di infiammazione attiva nei pazienti affetti RCU

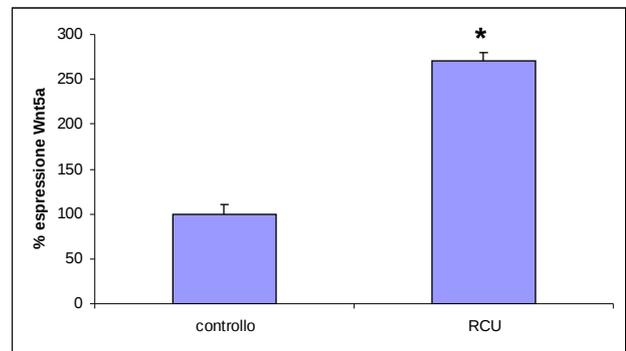
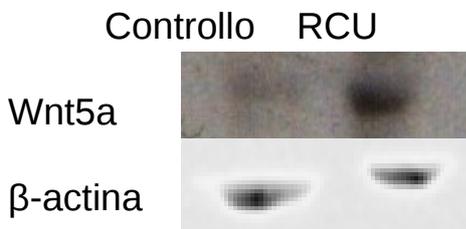
Sono stati valutati i livelli di Wnt5a trascritto e di proteina di Wnt5a in campioni di mucosa colica ottenuti da pazienti affetti da RCU (sezioni infiammate e remissione) ed in soggetti di controllo mediante Real Time PCR e Western Blot. La quantificazione del trascritto mostra dei livelli di Wnt5a aumentati nei campioni di RCU attiva e in remissione rispetto ai campioni di pazienti sani (0.06 ± 0.03 e 0.024 ± 0.02 vs 0.005 ± 0.002 * $p<0.05$) , come mostrato in figura 1. In particolare, nei soggetti affetti da RCU nei campioni di mucosa con infiammazione attiva si è assistito ad un aumento significativo dei livelli di espressione di mRNA di Wnt5a. Questo è supportato da analisi proteica mediante Western Blot dove un forte segnale per Wnt5a è stato osservato in campioni con RCU in corso di infiammazione attiva.

Tale aumento di espressione è stato confermato all'immunofluorescenza, tecnica che ha permesso di valutarne anche la distribuzione a livello dei diversi compartimenti dell'epitelio mucoso: la maggior positività si è concentrata soprattutto a carico del tessuto stromale alla base della cripta. Coerentemente con quanto descritto in letteratura infatti, si è osservato come Wnt5a nella mucosa di colon presenti una caratteristico gradiente di espressione nell'asse cripta-villo. Le colorazioni hanno dimostrato un significativo incremento di espressione di Wnt5a in sezioni da pazienti con malattia attiva comparata alla sezione di mucosa normale. Risultati simili sono stati osservati in tutte le sezioni da tutti i soggetti.

A



B



D

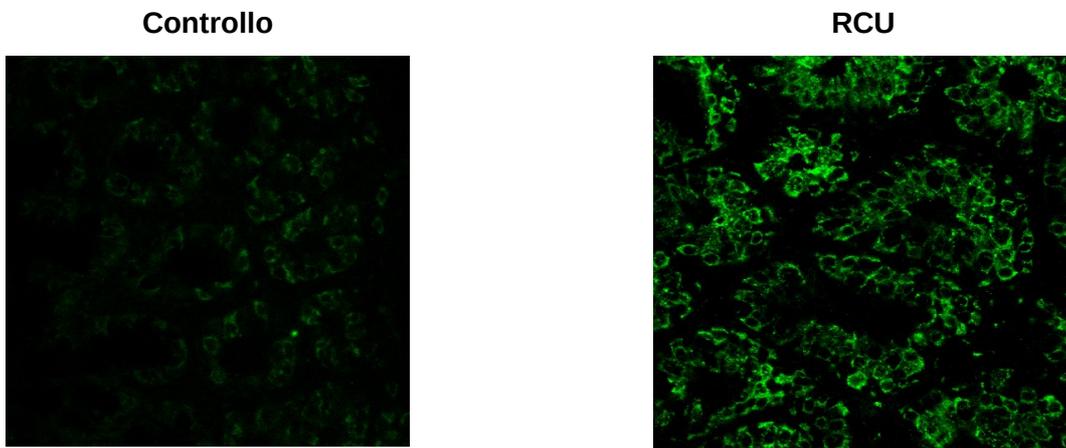


Figura 1. Caratterizzazione dell'espressione di Wnt5a nella mucosa colica in RCU. A) L'RNA totale è stato estratto da campioni biotipici prelevati da pazienti affetti da RCU in fase attiva (n=15), campioni in fase di remissione (n=10) e campioni derivati da colon sano (n=10) e l'mRNA specifico per il gene Wnt5a è stato quantificato mediante Real Time PCR. Ogni campione è stato saggiato in duplicato. **B)** Proteine totali estratte da campioni biotipici di mucosa colica di pazienti affetti da RCU in fase attiva (n=9) e pazienti sani (n=8) sono state sottoposte a corsa elettroforetica e western blotting per l'espressione di Wnt5a. L'espressione della β actina è stata utilizzata come controllo di caricamento dei campioni. L'immagine riportata è rappresentativa di 3 esperimenti diversi **C)** L'analisi della densità delle bande di Wnt5a è stata effettuata mediante software imageJ e normalizzata per la rispettiva densità delle bande relative all'espressione della β actina. (**p=0.05). **D)** Campioni (n=12) tissutali derivanti da resezioni prelevati da pazienti affetti da RCU in fase attiva sono stati paragonati a campioni biotipici di pazienti sani (n=6). Sezioni di colon sono state

sottoposte a marcatura con gli anticorpi diretti contro Wnt5a e successivamente analizzate al microscopio confocale utilizzando un obiettivo con ingrandimento 40x. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti condotti separatamente.

5.1.2 I livelli di mRNA di Wnt5a correlano con gli score di attività di malattia clinica ed endoscopica

I dati ottenuti da pazienti affetti da RCU sottolineano l'associazione tra i livelli di espressione di Wnt5a, valutati in maniera quantitativa con Real-Time PCR e la presenza di infiammazione attiva. A conferma, abbiamo voluto valutare la correlazione tra i livelli di Mrna, determinati in maniera quantitativa, con gli score di attività clinica (Modified Truelove and Witts Severity Index) ed endoscopica (Mayo Endoscopic Score). Entrambi gli score hanno dimostrato una buona correlazione (MTWSI, $\rho=0.935$, Mayo Endoscopic Score $\rho= 0.819$) con i livelli di Wnt5a, correlazione che è risultata maggiore nel confronto con lo score clinico.

5.1.3 L'aumento dell'espressione di Wnt5a nella colite attiva in corso di RCU è mantenuta dai miofibroblasti sub-epiteliali intestinali (ISEMFs)

Poiché Wnt5a sembra essere localizzato principalmente nello stroma pericriptico, abbiamo ipotizzato che gli ISEMFs possano contribuire all'aumentata produzione di questo ligando. Sezioni di mucosa colica derivate da campioni bioptici di pazienti con RCU attiva e pazienti sani sono state analizzate all'immunofluorescenza con un esperimento di co-localizzazione mediante doppia colorazione per Wnt5a ed α -SMA (*alpha-sma muscle actin*), marcatore per questa popolazione cellulare. L'analisi al microscopio confocale ha dimostrato la colocalizzazione di Wnt5a nelle cellule α -SMA positive, confermando quindi l'ipotesi secondo cui gli ISEMFs possono contribuire all'aumentata espressione di Wnt5a in corso di infiammazione attiva.

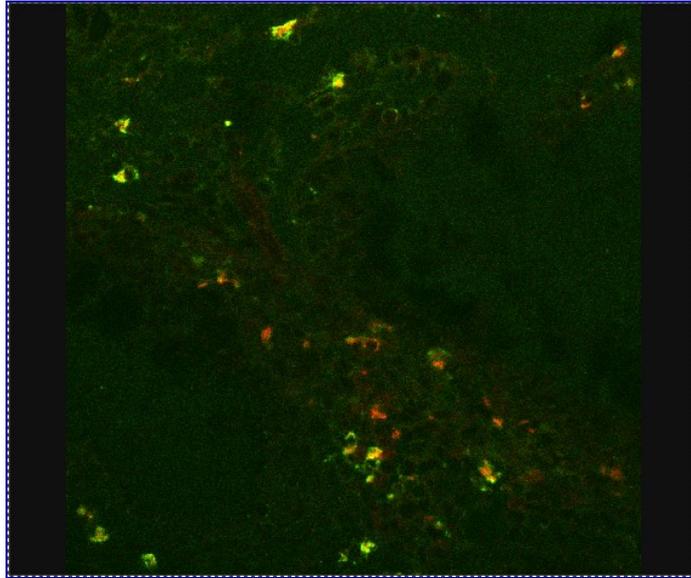


Figura 2 Co-localizzazione tra Wnt5a e ISEMFs nella mucosa in corso di RCU attiva. Campioni biotici prelevati da pazienti affetti da RCU in fase attiva (n=10) Le sezioni di mucosa colica sono state sottoposte a marcatura con gli anticorpi diretti contro Wnt5a ed α SMA e successivamente analizzate al microscopio confocale utilizzando un obiettivo con ingrandimento 40x. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti condotti separatamente.

5.2 Espressione di Wnt5a in miofibroblasti sub-epiteliali intestinali (ISEMFs) *in vitro*

5.2.1 Wnt5a è aumentato in ISEMFs derivati da RCU

ISEMFs sono stati estratti dalla mucosa colica ottenuta da pazienti con malattia di RCU sottoposti a resezione chirurgica o esami endoscopici. Cellule controllo sono state estratte da colon sano rimosso in corso di colectomia per cancro al colon. Le cellule poste in coltura e dopo 5 passaggi sono state caratterizzate, mediante studi di immunocitochimica, per l'espressione di α SMA e Vimentina, marcatori per questa popolazione cellulare. Al fine di verificare che la popolazione in coltura fosse omogenea cellule sono state anche saggiate per la negatività all'immunoreattività per l'anticorpo diretto contro la desmina, marcatore del tessuto muscolare (dati non riportati).

Abbiamo inizialmente valutato l'espressione di Wnt5a in culture primarie di ISEMFs da pazienti con RCU e controlli. I livelli di mRNA di Wnt5a sono significativamente più alti in ISEMFs derivati da RCU rispetto a ISEMFs controllo (0.42 ± 0.1 vs 0.10 ± 0.05 $p < 0.05$).

All'analisi dell'immunofluorescenza e del Western Blot Wnt5a è aumentato in ISEMFs derivati da RCU. (Fig 3)

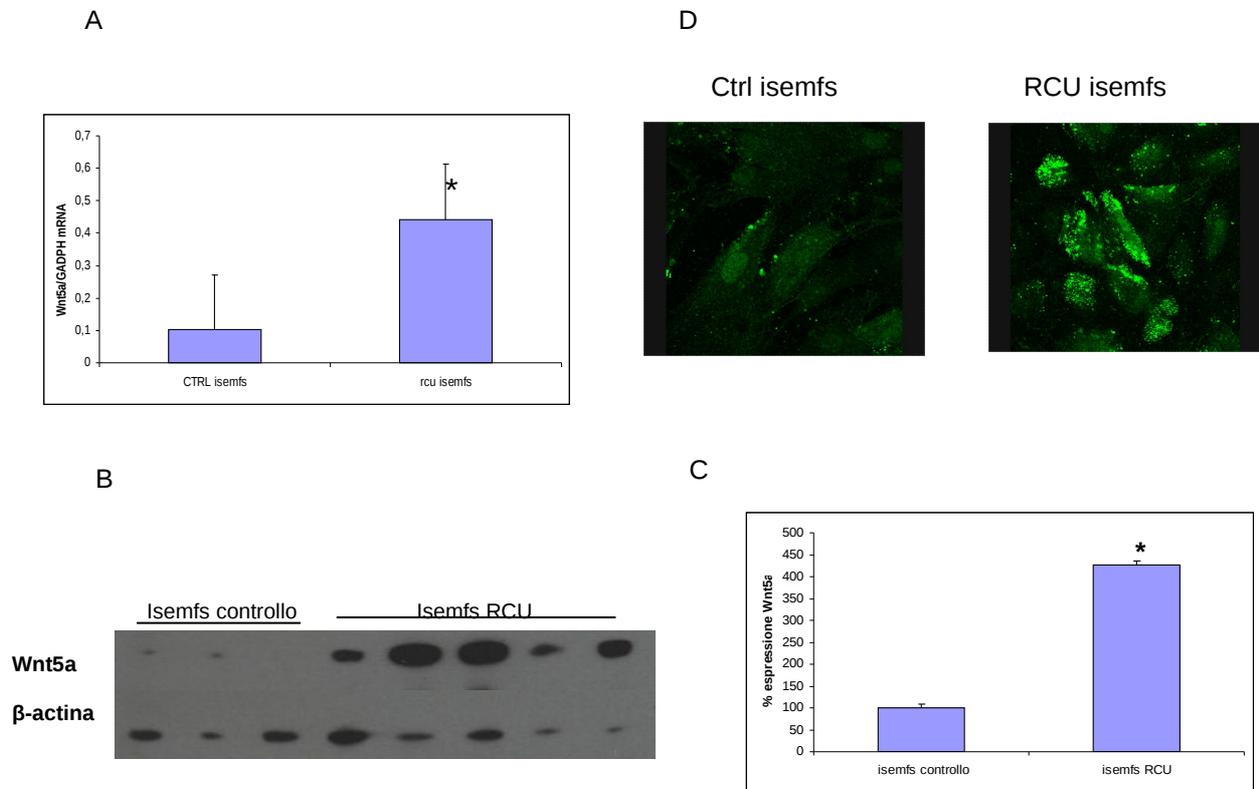


Figura 3. Caratterizzazione dell'espressione di Wnt5a negli ISEMFs in RCU. **A)** L'RNA totale è stato estratto da ISEMFs prelevati da pazienti affetti da RCU in fase attiva (n=10), e ISEMFs derivati da controlli sani (n=6). L' mRNA specifico per il gene Wnt5a è stato quantificato mediante Real Time PCR. Ogni campione è stato saggiato in duplicato. **B)** Proteine totali estratte da ISEMFs prelevati da pazienti affetti da RCU in fase attiva (n=10), e ISEMFs derivati da controlli sani (n=6) sono state sottoposte a corsa elettroforetica e western blotting per l'espressione di Wnt5a. L'espressione della β actina è stata utilizzata come controllo di caricamento dei campioni. L'immagine riportata è rappresentativa di 3 esperimenti diversi **C)** L'analisi della densità delle bande di Wnt5a è stata effettuata mediante software imageJ e normalizzata per la rispettiva densità delle bande relative all'espressione della β actina. (* $p=0.05$). **D)** ISEMFs controllo e da RCU sono state poste in coltura su vetrini per microscopia e le cellule sono state dunque fissate e caratterizzate per l'espressione di Wnt5a. I vetrini sono stati analizzati mediante microscopia confocale (obiettivo 63x). Le immagini sono rappresentative della caratterizzazione di tutte le linee cellulari utilizzate in questo studio.

5.2.2 TGF β ed LPS modulano l'espressione di Wnt5a in ISEMFs

Il fatto che diversi mediatori dell'infiammazione giocano un ruolo nello sviluppo, nella ricorrenza e l'esacerbazione del processo infiammatorio in RCU ci ha portato ad investigare la loro capacità di influenzare l'espressione di Wnt5a. Dunque abbiamo esaminato se l'espressione di Wnt5a in ISEMFs è modulata da citochine pro-infiammatorie

come il TNF α , TGF β e IL-1 β oppure da prodotti batterici quali LPS. Cellule controllo e derivate da RCU sono state seminate e trattate per 24 ore con TNF α , TGF β , IL-1 β ed LPS alle concentrazioni di 10 ng/ml per TNF α e IL-1 β , 5 ng/ml per TGF β e 10 μ g/ml per LPS.

Come mostrato in figura 4 l'esposizione di ISEMFs al TGF β e LPS aumentano i trascritti di Wnt5a in ISEMFs controllo (0.193 ± 0.09 , 0.181 ± 0.085 vs 0.102 ± 0.1 $p < 0.05$) e da colite (1.57 ± 0.33 , 0.62 ± 0.28 vs 0.442 ± 0.23 $p < 0.05$). D'altro canto, l'esposizione al TNF α e IL-1 β non influenzano l'espressione di Wnt5a.

A

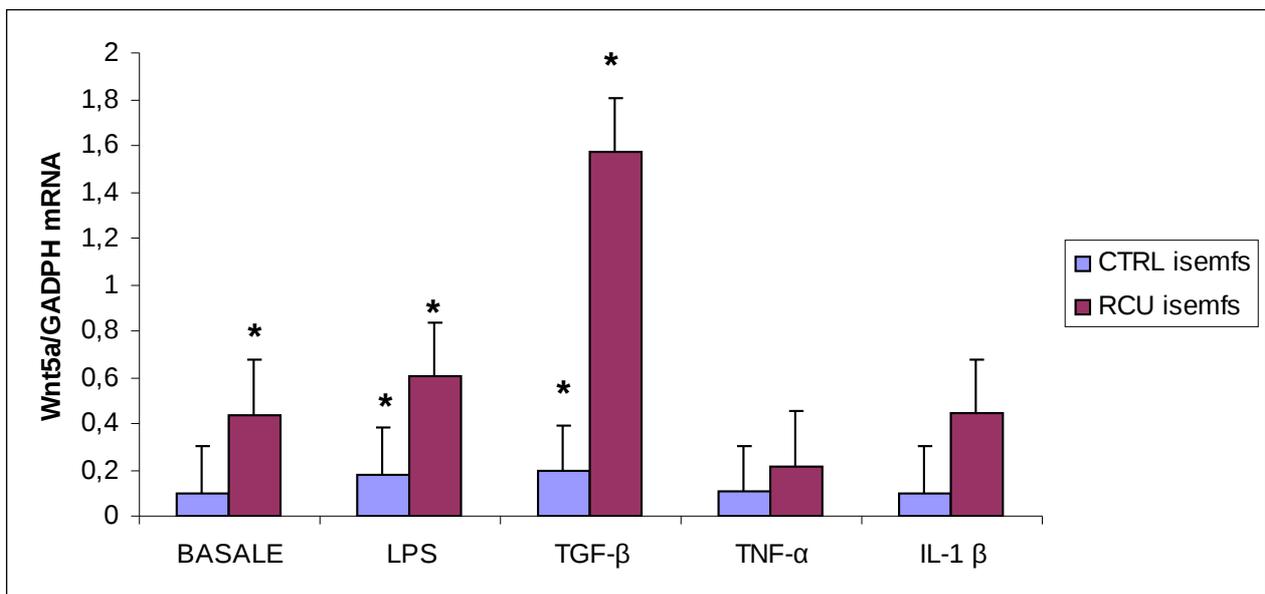


FIGURA 4-Effetto di alcuni mediatori dell'infiammazione su ISEMFs. **A** L'RNA totale è stato estratto da ISEMF e l'mRNA specifico per Wnt5a è stato quantificato mediante qReal Time PCR. I dati provengono da tre esperimenti differenti condotti su tre differenti linee cellulari per ciascun gruppo. I dati sono espressi come aumento di espressione \pm SE vs cellule non trattate (basale) (* $p \leq 0.05$)

5.3.Silenziamento di Wnt5a mediante short hairpin RNA

5.3.1 Costruzione del vettore adenovirale per il silenziamento di Wnt5a mediante shRNA

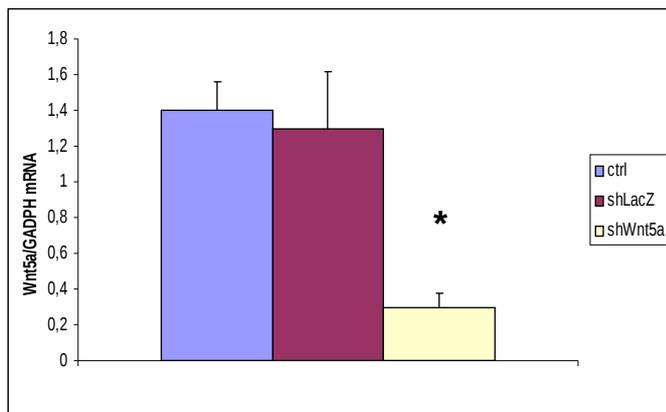
Per chiarire il ruolo di Wnt5a negli ISEMFs sono stati eseguiti degli esperimenti siRNA nei quali si è proceduto a ridurre selettivamente l'espressione di Wnt5a. A tale scopo, due diversi oligonucleotidi codificanti gli shRNA aventi come *target* due diverse porzioni dell'mRNA di Wnt5a sono stati clonati nel vettore pENTRTM/U6. Per verificarne il clonaggio, la presenza degli inserti e la correttezza delle sequenze *target* sono state confermate mediante sequenziamento genico. Successivamente l'efficacia di silenziamento mediato dai shRNA clonati in pENTRTM/U6 è stata valutata per mezzo di saggi di iRNA transiente

mediante transfezione dei costrutti nella linea cellulare umana 293A codificante il gene umano Wnt5a. I due costrutti shRNA1 e shRNA2 evidenziano una variabile efficacia nel silenziamento di Wnt5a, rispettivamente del 38% e del 60% , valutato con analisi Real Time RT-PCR quantitativa (dato non riportato). La sequenza del shRNA2, che si è dimostrata più efficiente, è stata prescelta per il successivo trasferimento mediante ricombinazione LR nel plasmide pAd/BLOCK-iT™-DEST. Una volta accertata la presenza dell'inserito mediante sequenziamento e la stabilità della ricombinazione, il genoma adenovirale ricombinante è stato transfettato in cellule di packaging per la successiva produzione ed amplificazione di adenovirus ricombinanti.

5.3.2 Verifica del silenziamento di Wnt5a in ISEMFs

Al fine di valutare l'efficacia del silenziamento, l'adenovirus codificante per la sequenza short hairpin diretta contro l'mRNA di Wnt5a (AdshWnt5a) è stato amplificato e successivamente titolato. ISEMFs sono stati trasdotti con il vettore adenovirale con una MOI di 100 che assicura una efficienza di trasduzione pari al 60% come precedentemente testato. Allo stesso modo ISEMFs sono state trasdotte con AdshLacZ precedentemente ottenuto nel nostro laboratorio ed utilizzato come controllo. L'efficacia del silenziamento genico è stata valutata mediante analisi Real Time PCR quantitativa e mediante western blotting. La quantificazione dei trascritti dell'mRNA di Wnt5a di ISEMFs trasdotti con AdshWnt5a risulta ridotta rispetto a cellule trasdotte con l'RNAi controllo (0.2 ± 0.08 vs 1.4 ± 0.04 $p < 0.05$). Anche l'analisi dei livelli proteici mediante western blotting mostra l'efficacia del silenziamento (Figura 5).

A



B

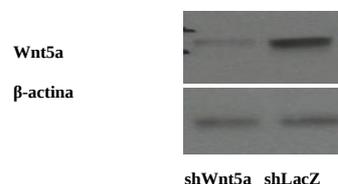


FIGURA 5. Verifica del silenziamento di Wnt5a mediante AdshWnt5a-1 **A** L'RNA totale è stato estratto da ISEMF tradotte con AdshLacZ e con AdshWnt5a con una MOI pari a 100. L'efficacia del silenziamento è stata analizzata mediante Real Time PCR. I dati sono espressi come percentuale d'espressione + SE vs shRNA e provengono da tre esperimenti differenti. **B** Proteine totali sono state estratte da ISEMF e sottoposte a corsa elettroforetica e successivo western blotting utilizzando un anticorpo diretto contro Wnt5a. L'espressione della β actina é stata utilizzata come controllo di caricamento della stessa quantità di campione. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti diversi

5.4. Ruolo di Wnt5a sul fenotipo di ISEMFs.

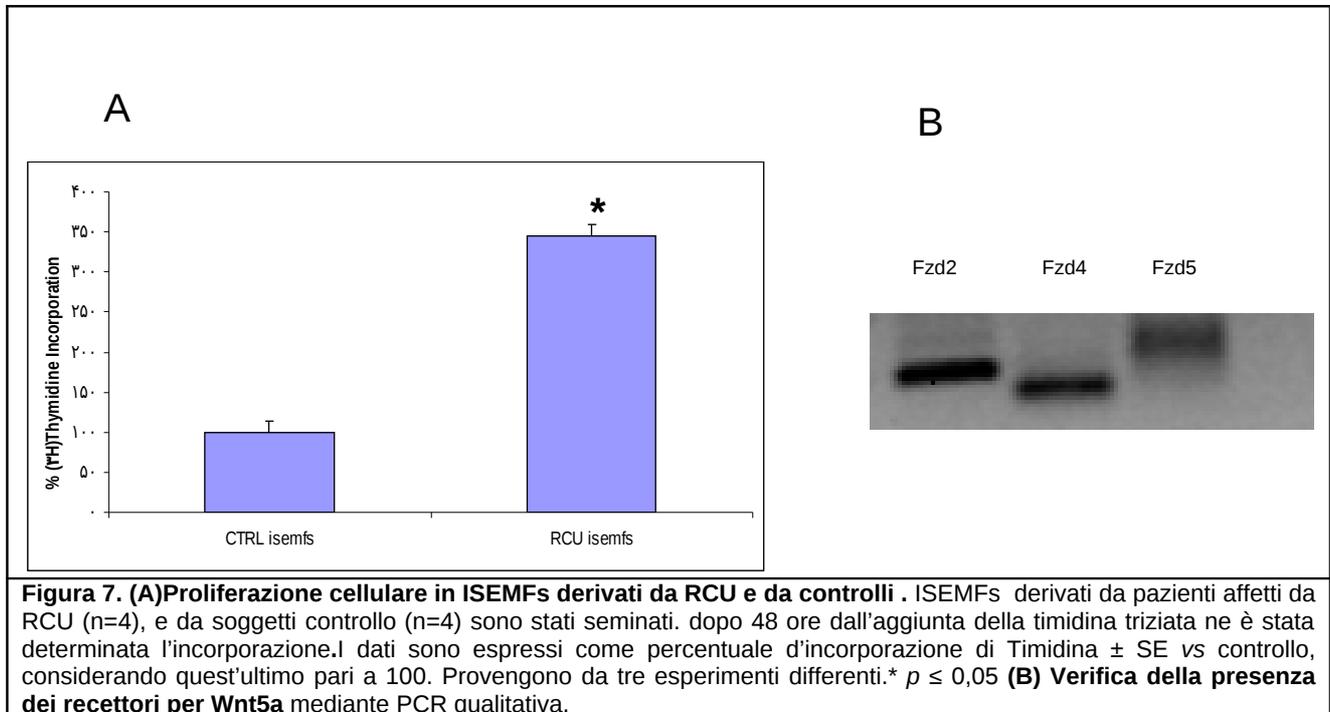
Poiché gli ISEMFs in un contesto infiammatorio acquisiscono un fenotipo "attivato", in grado di favorire fisiologicamente il rimodellamento tissutale e la riparazione epiteliale dopo danno o di portare patologicamente all'esacerbazione dell'infiammazione e del danno stesso, abbiamo voluto valutare se Wnt5a avesse un ruolo in questo fenomeno valutando alcune caratteristiche della biologia di questo tipo cellulare, quali la proliferazione, la sopravvivenza cellulare e la migrazione.

5.4.1 Verifica dell'espressione dei recettori di Wnt5a in ISEMFs derivati da pazienti controllo e da Rettocolite Ulcerosa (RCU)

Da studi preliminari abbiamo visto come ISEMFs isolati da RCU presentano una proliferazione significativamente aumentata rispetto a quelli di controllo (345.54 ± 30 vs 100 ± 20 , $p < 0.05$) (figura 6 A). Per testare l'ipotesi di un eventuale effetto di Wnt5a su quest'aumento della proliferazione abbiamo prima di tutto verificato la presenza dei recettori per Wnt5a negli ISEMFs in coltura.

Per mezzo della RT-Time PCR abbiamo determinato l'espressione di specifici recettori di Wnt5a come Frizzled-2 Frizzled-4, Frizzled-5. La conferma della presenza dei recettori per

Wnt5a (figura 6 B) a livello delle ISEMFs, peraltro già dimostrata da altri autori, suggerisce la possibilità di un effetto autocrino.



5.4.2 Wnt5a agisce in maniera autocrina su ISEMFs promuovendo la proliferazione cellulare

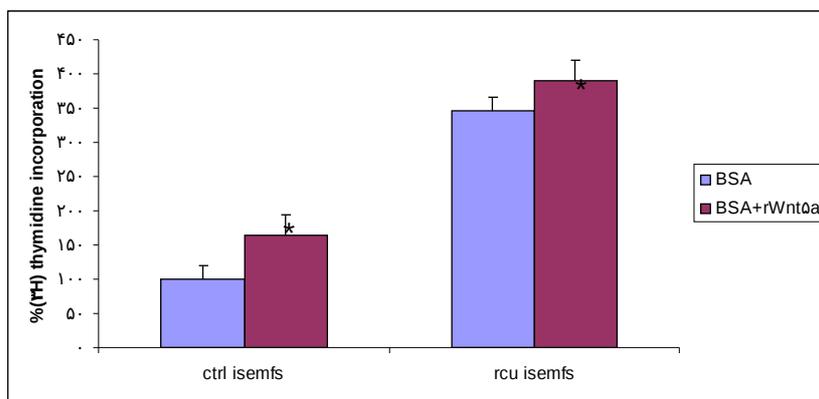
Per verificare se la proteina ricombinante Wnt5a avesse un effetto mitogenico sugli ISEMFs derivati da pazienti sani e RCU, sono state trattate le cellule con una concentrazione di proteina purificata pari a 200 ng/ml per un tempo di 24 ore ed è stata successivamente misurata l'incorporazione della timidina triziata e parallelamente è stata fatta la conta cellulare .

Come si evince dalla figura 8, la proteina ricombinante Wnt5a (rWnt5a) stimola la proliferazione sia in cellule controllo (163.6 ± 20 vs 100 $p < 0.05$), che in quelle derivate da pazienti affetti da RCU (389.4 ± 28 vs 345.1 ± 39 $p < 0.05$) sebbene in maniera evidente solo nelle cellule controllo dove è aumentata di circa il 60%.

Per verificare se Wnt5a è realmente responsabile dell'aumento della proliferazione cellulare, è stato spento il gene Wnt5a mediante silenziamento genico con il vettore adenovirale precedentemente costruito e sopra descritto. Dopo 72 ore dall'infezione, gli ISEMFs sono stati raccolti ed è stato valutato il livello di incorporazione della timidina

triziata. Il silenziamento del gene Wnt5a guida effettivamente ad una diminuzione della proliferazione quando paragonata a quelle infettate con il vettore controllo Ad-LacZ sia in cellule controllo (74.26 ± 10 vs 92.83 ± 16 $p < 0.05$) e in cellule da RCU (347.09 ± 14 vs 146.14 ± 30 $p < 0.05$).

D'altro canto, le cellule infettate con AdshWnt5a e trattate dopo 48 ore con la proteina ricombinante rWnt5a ad una concentrazione di 200 ng/ml ripristina la funzionalità e acquista nuovamente una risposta proliferativa in cellule controllo (129.73 ± 28 vs 74.26 ± 21 $p < 0.05$) ed in cellule da RCU (347.09 ± 30 vs 146.14 ± 28 $p < 0.05$).



A

B

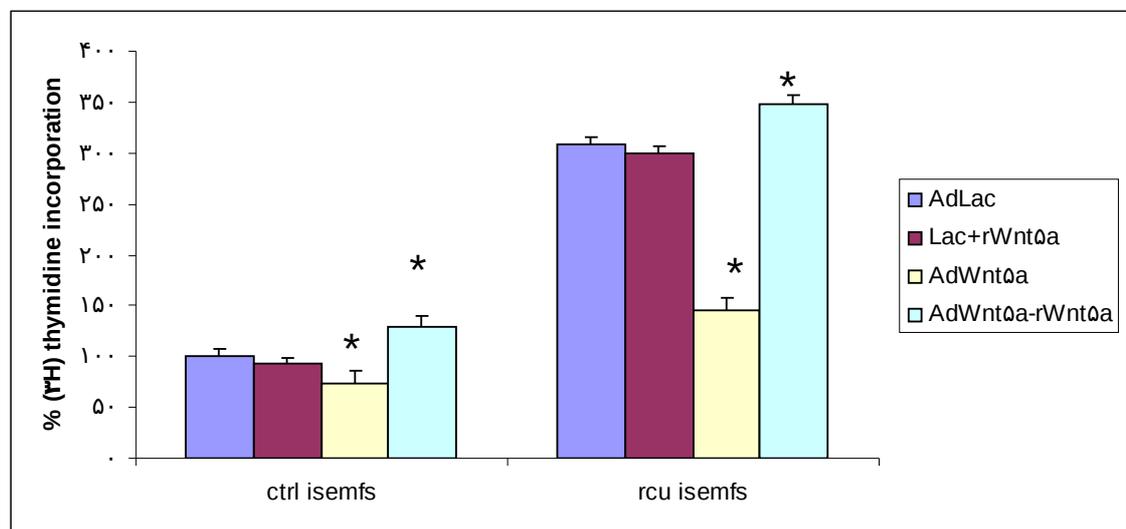
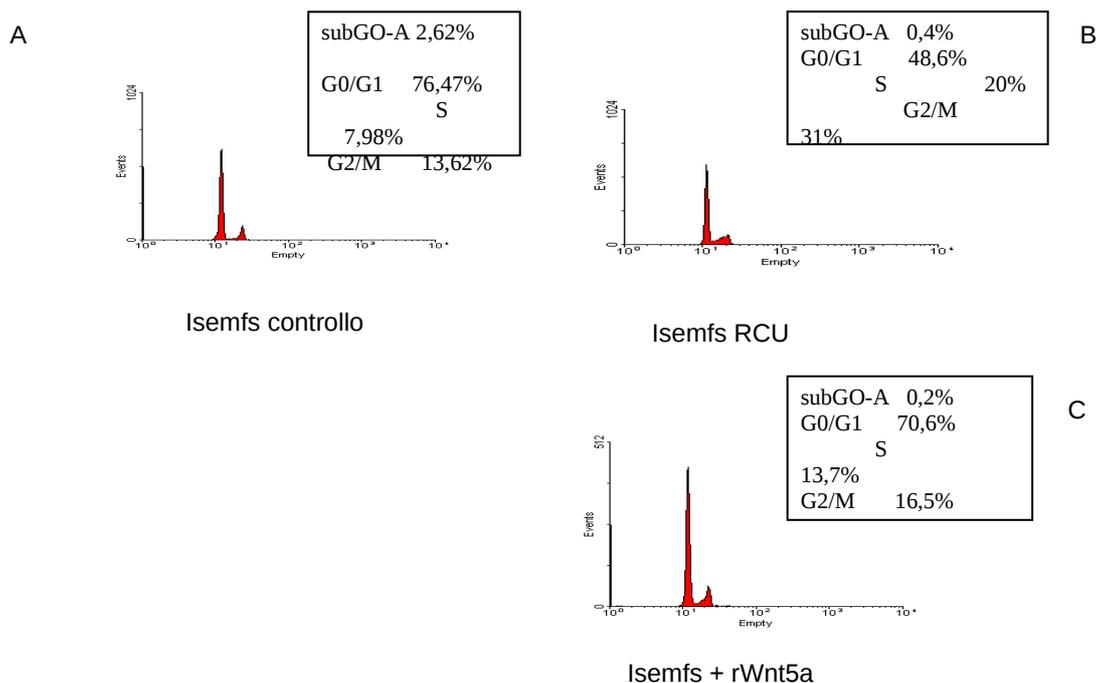


Figura8 .Effetto di Wnt5a sulla proliferazione cellulare di ISEMFs mediante saggio della Timidina Triziata. ISEMFs derivati da pazienti affetti da RCU (n=4), e da soggetti controllo (n=4) sono stati seminati, (A) trattati con la proteina rWnt5a in medium di coltura all'1% . Quindi è stata aggiunta la timidina triziata e dopo 48 ore ne è stata determinata l'incorporazione.(B) ISEMFs derivati da pazienti affetti da RCU (n=4), e da soggetti controllo (n=4) sono stati seminati, trasfettati con AdshWnt5a o con AdshLacZ con una MOI pari a 100all'1% di FBS. Dopo 48 ore è stata aggiunta la timidina triziata ed eventualmente rWnt5a; dopo ulteriori 48 ore è stata determinata l'incorporazione della timidina triziata. I dati sono espressi come percentuale di Timidina \pm SE vs controllo, ponendo ISEMFs controllo=100 e provengono da tre esperimenti differenti.* $p \leq 0.05$

5.4.3 Wnt5a promuove la divisione cellulare e diminuisce la fase SubG0 del ciclo cellulare del ciclo cellulare

Poiché questi dati evidenziano un ruolo autocrino di Wnt5a sulla sintesi e la proliferazione delle ISEMFs, abbiamo voluto valutare anche la distribuzione del ciclo cellulare delle ISEMFs in seguito a degli studi funzionali di *gain of function* di Wnt5a. E' stato innanzitutto valutato il ciclo nelle due differenti popolazioni cellulari, quella di ISEMFs derivati da pazienti sani e quelli da colite ulcerosa. Dall'analisi del ciclo cellulare, è emerso che nelle cellule ottenute da soggetti con RCU una maggiore percentuale di cellule sono in fase S rispetto alle cellule ottenute da tessuto sano (controllo) (20 ± 0.5 vs 7.98 ± 0.9 $p < 0.05$), indicando una maggiore tendenza proliferativa delle ISEMFs da IBD rispetto ai soggetti sani. Nelle cellule da tessuto normale al contrario di quelle di pazienti con IBD, infatti, le cellule si concentrano per lo più nella fase G0/G1 (76.84 ± 0.05 vs 48.6 ± 0.89 $p < 0.05$). Per gli studi di *gain of function*, sono stati trattati ISEMFs controllo con la proteina purificata ricombinante ad una concentrazione di pari a 200 ng/ml per un tempo di 24 ore. In seguito a tali studi si può osservare un aumento della percentuale in fase mitotica M (20.2 ± 0.7 vs 13.62 ± 0.2). Con questa metodica si evince inoltre che dopo l'aggiunta del ricombinante la fase sub G0-A, indice delle cellule apoptotiche-necrotiche e dei frammenti cellulari diminuisce rispetto ai campioni non trattati (2.62 ± 0.06 vs 0.2 ± 0.05 $p < 0.05$) e sembra mimare la popolazione di ISEMFs derivanti da RCU.



	A	G0/G1	S	G2/M
RCU ISEMFs	0.4%	48.6%	20%	31%
Ctrl ISEMFs	2.62%	76.47%	7.98%	13.62%
Ctrl ISEMFs + rWnt5a	0.2%	73.39%	8.38%	20.2%

Figura 9. Effetto di Wnt5a sulla distribuzione del ciclo cellulare di ISEMFs. ISEMFs derivati da pazienti affetti da RCU (n=2), e da soggetti controllo (n=2) sono stati seminati, sincronizzati in terreno di coltura all'1% di FBS. Gruppi di cellule derivate da pazienti controllo sono state trattate con la proteina rWnt5a. Dopo 24 ore dalla supplementazione sono state raccolte, fissate in etanolo e colorate con propidio ioduro. Gli eventi cellulari sono stati acquisiti mediante citometro a flusso. I dati sono rappresentativi di tre diversi esperimenti.* $p \leq 0.05$

5.4.4 Wnt5a promuove la resistenza all'apoptosi indotta dalla staurosporina

Il dato suggerito dal ciclo cellulare ci ha indotto ad indagare l'eventuale ruolo di Wnt5a sull'apoptosi, mediante la tecnica dell'annessina V.

A tale scopo, sono stati condotti studi preliminari per verificare la resistenza all'apoptosi delle ISEMFs isolate da tessuto normale (controllo) e da pazienti con RCU, sottoponendole ad un trattamento di 12 ore con la staurosporina ad una concentrazione 1,5 μM . Da tali studi è emerso che ISEMFs di RCU sono risultate più resistenti alla morte dopo l'esposizione alla staurosporina rispetto a ISEMFs controllo in quanto nelle prime l'aumento delle cellule in *late apoptosis* (11 ± 0.4 vs 6 ± 0.8) è significativamente minore rispetto a ISEMFs controllo (45 ± 0.6 vs 16 ± 0.03) (Figura 10). Poiché ISEMFs controllo rispondono in maniera più evidente all'esposizione del pro-apoptotico, sono state utilizzate due linee cellulari controllo per valutare l'effetto di rWnt5a. Dopo trattamento con staurosporina e pretrattamento con rWnt5a alla concentrazione di 200 ng/ml si osserva una riduzione di cellule in *late apoptosis* nei campioni che sono stati pre-trattati con rWnt5a (45 ± 0.05 vs 31 ± 0.09 $p < 0.05$). Questo dato viene confermato dall'analisi della caspasi-3 in cui si osserva una diminuzione di circa il 25% dell'attività della caspasi in seguito a supplemento del ricombinante (Figura 11 e 12).

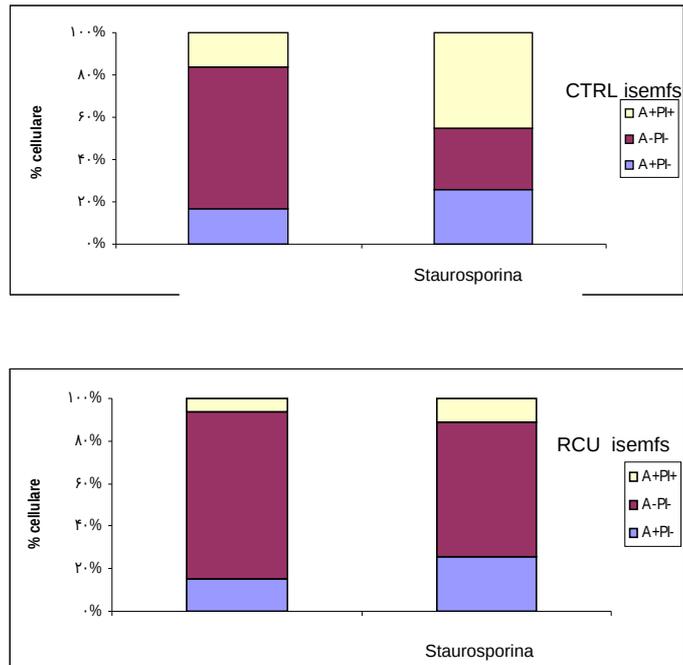


Figura 10. Istogramma rappresentativo di ISEMFs controllo e RCU trattate con staurosporina e quindi colorate con PI e Annessina V. Percentuale di cellule Annessina V e PI negative (vive), Annessina V e PI negative (early apoptosis) e PI ed annessina V positive necrotiche.

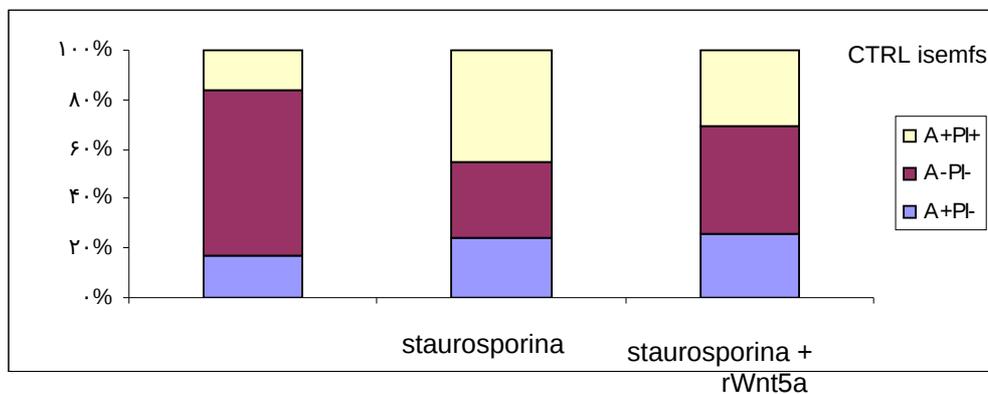


Figura 11. Effetto protettivo di Wnt5a sull'apoptosi indotta dalla staurosporina. Istogramma rappresentativo di ISEMFs di due diverse linee di controllo indotte all'apoptosi con staurosporina e quindi colorate con PI e Annessina V. Percentuale di cellule Annessina V e PI negative (vive), Annessina V e PI negative (early apoptosis) e PI ed annessina V positive (necrotiche). Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte.

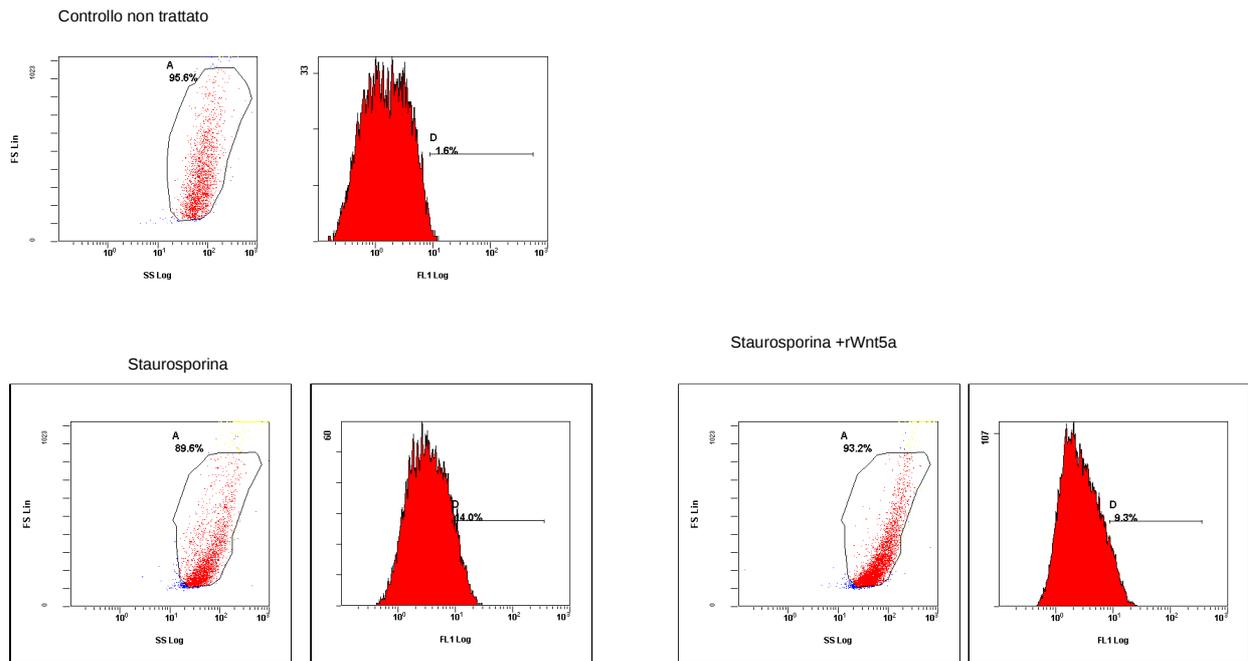


Figura 12. Riduzione dell'attività della caspasi-3 dopo pre-trattamento con rWnt5a. Grafico rappresentativo dell'attività della caspasi-3 svolta su due diverse linee di ISEMFs controllo. Gli esperimenti sono stati svolti tre volte

5.5 Vie di segnale coinvolte nell'effetto pro-proliferativo di Wnt5a sulle ISEMFs

5.5.1 Verifica del ruolo di Wnt5a nella via canonica

È noto che il segnale di Wnt5a può modulare sia la via canonica interagendo con la β -catenina o in via β -catenina indipendente. Poiché la β -catenina è una via di segnale di fondamentale importanza nella regolazione della proliferazione cellulare, sono stati eseguiti dei saggi funzionali per testare se questa molecola è coinvolta nel segnale di Wnt5a. Per questo, è stato silenziato in queste cellule il gene della β -catenina, transfettandole con un vettore adenovirale precedentemente costruito nel nostro laboratorio ed esprimente uno specifico shRNA per la β -catenina. Similmente all'esperimento condotto e descritto nel 4.2 gli ISEMFs sono stati transfettati con il vettore e dopo sono stati trattati con la proteina ricombinante rWnt5a.

Come ci si aspettava, l'incorporazione della timidina triziata diminuisce nelle cellule infettate con l'adenovirus β -catenina rispetto a quelle infettate con il controllo LacZ (ISEMFs controllo (71.9 ± 34 vs 100 ± 54 $p < 0.5$) e ISEMFs da RCU (224.7 ± 46 vs 320.5 ± 23 $p < 0.05$)); questo è indice che la proliferazione è influenzata anche dalla β -catenina. Dopo

la supplementazione di rWnt5a alle stesse, vi è un aumento significativo della proliferazione sia nelle cellule controllo che in quelle con il gene β -catenina spento (ISEMFs controllo (129.6 ± 41 vs 71.9 ± 33 $p < 0.05$) e ISEMFs da RCU (403.7 ± 29 vs 224.5 ± 36 $p < 0,05$)). Questo suggerisce come Wnt5a agisce attraverso la via β -catenina indipendente (non canonica).

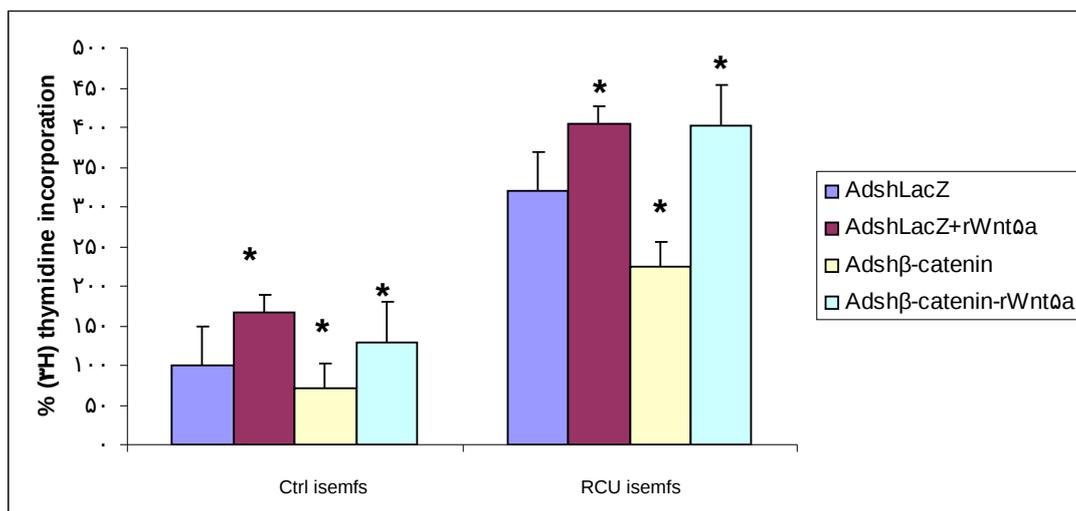


Figura 13 Effetto di Wnt5a sulla proliferazione cellulare di ISEMFs silenziate per il gene β -catenina mediante saggio della Timidina Triziata. ISEMFs derivati da pazienti affetti da RCU (n=3), e da soggetti controllo (n=3) sono stati seminati, trasfettati con Adsh β -catenina o con AdshLacZ con una MOI pari a 100 all'1% di FBS. Dopo 48 ore è stata aggiunta la timidina triziata ed eventualmente rWnt5a; dopo ulteriori 48 ore è stata determinata l'incorporazione della timidina triziata. I dati sono espressi come percentuale di Timidina \pm SE vs controllo e provengono da tre esperimenti differenti.* $p \leq 0.05$

5.5.2 Coinvolgimento della CamKII nella proliferazione mediata da Wnt5a

Mentre la via canonica di Wnt agisce bloccando la degradazione della β -catenina e la trascrizione mediata da TCF Wnt5a può attivare la via non canonica attraverso la via del Calcio portando alla fosforilazione di alcune chinasi come la PKC e la CamKII (Calmodulin dependent kinase II).

Diversi dati hanno mostrato che una di queste chinasi che può mediare la proliferazione è la CamKII, una chinasi nota per essere attivata dal rilascio di Ca^{2+} e la fosforilazione del residuo Thr286 dopo il legame con Wnt5a. Quindi ci siamo concentrati sullo studio di questa chinasi. È stato testato se bloccando l'attività della CamKII viene inibita la proliferazione cellulare. ISEMFs da RCU sono stati fatti crescere fino al 70% di confluenza e trattati con KN-93 (un inibitore selettivo della CamKII) o un volume uguale di DMSO come controllo per 24 ore. La proliferazione è stata stimata per mezzo

dell'incorporazione di Timidina Triziata. Bloccando l'attività della CamKII con 5, 10 o 25 μM di KN-93, si inibiva significativamente la proliferazione di ISEMFs in una maniera dose-dipendente (figura 14). Quando Wnt5a è stato aggiunto a ISEMFs trattati con l'inibitore (con una concentrazione pari a 10 μM) non si è osservato un significativo incremento della proliferazione (59.02 ± 19 vs 56.08 ± 18 $p = \text{ns}$) (figura 15). Questo dato suggerisce che sia la proliferazione Wnt5a dipendente sia mediata da questa chinasi.

Per verificare ciò, si sono dosati i livelli di proteina CamKII e della sua forma fosforilata dopo trattamento con rWnt5a. Infatti, se realmente Wnt5a agisce attraverso questa chinasi, attivandola, la fosforilazione della proteina dovrebbe aumentare.

Sono state trattate delle cellule controllo con il ricombinante ed estratte le proteine in time-course. L'aumento della fosforilazione dimostrato dopo 30' dal trattamento, conferma la nostra ipotesi (figura 15).

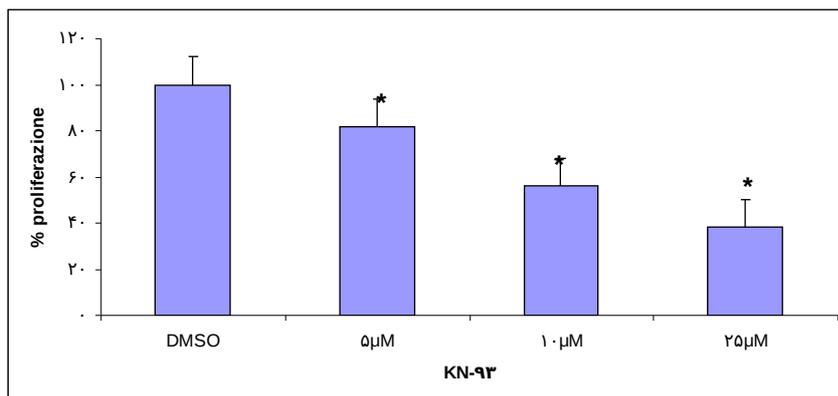


Figura 14. KN-93 riduce in maniera dose dipendente la proliferazione di ISEMFs

ISEMFs derivati da pazienti controllo ($n=3$) sono stati seminati e trattati con concentrazioni crescenti di KN-93, inibitore della CamKII. Dopo 48 ore dal trattamento e dall'aggiunta della timidina triziata è stata determinata l'incorporazione della timidina triziata. I dati sono espressi come percentuale di Timidina \pm SE vs controllo e provengono da tre esperimenti differenti. * $p \leq 0.05$

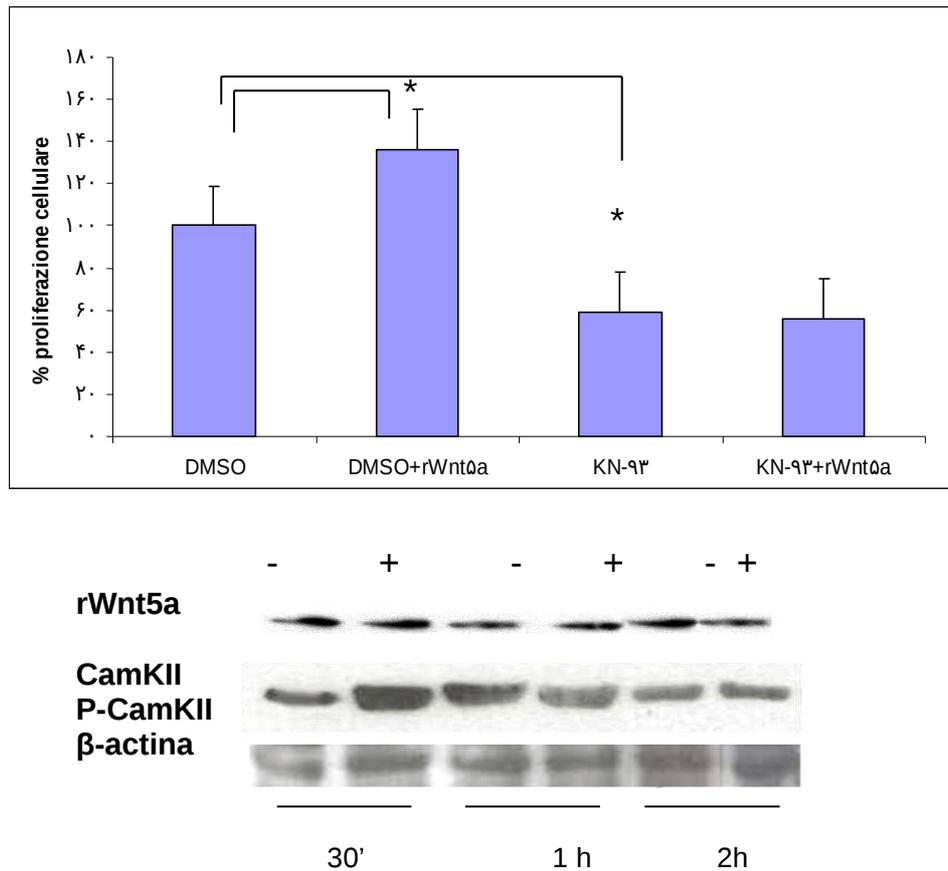


Figura 15 ISEMFs derivati da pazienti affetti da soggetti controllo (n=4) sono stati seminati, **(A)** pre-trattati per un'ora con l'inibitore della CamKII KN-93 e supplementari successivamente con la proteina rWnt5a in medium di coltura all'1%. Quindi è stata aggiunta la timidina triziata e dopo 48 ore ne è stata determinata l'incorporazione. **(B)** ISEMFs derivati da pazienti controllo (n=4) sono stati seminati, portati a confluenza e in terreno di coltura all'1% di FBS ed è stata supplementata la proteina rWnt5a. Le cellule sono state raccolte a 30', 1 h e 2h dallo stimolo. Le proteine sono quindi state sottoposte a corsa elettroforica e western blotting per l'espressione di CamKII totale e fosforilata. L'espressione della β actina è stata utilizzata come controllo di caricamento dei campioni. L'immagine riportata è rappresentativa di 3 esperimenti diversi.

6.DISCUSSIONE

La colite ulcerosa è una malattia infiammatoria cronica intestinale, caratterizzata da fasi di attività alternati a periodi di remissione. L'ipotesi eziopatogenetica più accreditata prevede che stimolazioni antigeniche ambientali e/o della stessa flora intestinale determinino, in soggetti geneticamente predisposti la perdita dei fisiologici meccanismi di controllo dell'infiammazione. Tale anomalia comporta una produzione amplificata di citochine pro-infiammatorie, la perdita del normale equilibrio di mediatori della flogosi a livello intestinale e la conseguente distruzione della mucosa e la formazione di ulcere epiteliali.

L'infiammazione cronica è caratterizzata da un abbondante infiltrato costituito prevalentemente da macrofagi, linfociti e plasmacellule. Tuttavia anche cellule di derivazione mesenchimale come i miofibroblasti intestinali giocano un ruolo fondamentale: si è osservato infatti che l'alterazione della loro funzione è implicata nella patogenesi delle IBD e che nella mucosa di pazienti affetti da tali patologie il numero di queste cellule è significativamente aumentato [26]. Queste cellule svolgono un ruolo chiave nella riparazione a seguito di danno acuto e nei processi di cicatrizzazione: una volta attivate le ISEMFs partecipano al rimodellamento della matrice attraverso la secrezione di metallo proteinasi, citochine e chemochine e promuovono la proliferazione delle cellule epiteliali.

Wnt5a rappresenta il ligando prototipo della via non canonica di Wnt, via di segnale coinvolta nei processi di embriogenesi, riparazione tissutale e carcinogenesi dell'epitelio intestinale [46]. Fisiologicamente, Wnt5a agisce sulla proliferazione di tipi cellulari diversi coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi epiteliale, fungendo da mediatore nel dialogo tra epitelio e mesenchima.

In questo lavoro è stata per la prima volta caratterizzata l'espressione di Wnt5a nell'infiammazione cronica intestinale della Colite Ulcerosa e ne è stato valutato il ruolo in miofibroblasti ed il suo coinvolgimento nello sviluppo di un fenotipo cellulare "attivato" in termini di proliferazione e sopravvivenza cellulare.

In particolare abbiamo dimostrato che: 1) aumentati livelli di Wnt5a sono presenti in mucosa colica derivata da pazienti affetti da RCU rispetto a soggetti sani; 2) i miofibroblasti pericriptici sono responsabili dell'aumentata produzione di questo ligando; 3) i miofibroblasti pericriptici derivati da RCU esprimono livelli endogeni maggiori di Wnt5a rispetto a quelli derivati da controlli, 4) l'espressione di Wnt5a da parte dei miofibroblasti è mediata dalle citochine pro-infiammatorie ed in particolare dal TGF- β ; 5) Wnt5a ha un ruolo autocrino sui miofibroblasti stessi ed in particolare sulla proliferazione agendo attraverso la CamKII e sull'apoptosi

In esperimenti preliminari abbiamo dimostrato come l'espressione proteica di Wnt5a sia aumentata in corso di infiammazione attiva in un modello murino di infiammazione cronica intestinale. L'aumentata espressione di Wnt5a a livello trascrizionale è stata successivamente confermata in soggetti affetti da RCU, con correlazione diretta con il grado di attività di malattia. Infatti, mentre i valori di trascritto sono significativamente aumentati nei campioni provenienti da infiammazione attiva nei campioni provenienti da mucosa con quadro clinico di remissione endoscopica ed istologica l'espressione è risultata inferiore a quella riscontrata nelle sedi di attività di malattia ma ancora superiore a quanto riscontrato nei controlli. Tali dati sono in linea con quanto osservato da Holcombe et al. [23], che riportarono dei cambi dell'espressione del trascritto di alcuni ligandi di Wnt, tra cui Wnt5a, nella mucosa di pazienti affetti da IBD. Sulla base dei nostri dati e coerentemente a quanto descritto in letteratura, abbiamo quindi valutato l'espressione proteica mediante western blot ed immunofluorescenza, verificando l'aumentata espressione di questa molecola in corso di RCU. Quest'ultima tecnica ha permesso di valutare anche la distribuzione a livello dei diversi compartimenti dell'epitelio mucoso: la maggior positività si è concentrata soprattutto a carico del tessuto stromale alla base delle cripte, e presenta un caratteristico gradiente cripta-villo. Tali evidenze ci hanno quindi indotto ad indagare sul tipo cellulare responsabile dell'aumentata produzione di questo ligando. Le cellule presenti a livello stromale sub-pericriptico sono molteplici e tra queste è stato dimostrato come i miofibroblasti intestinali (ISEMFs) sintetizzino e secernono le glicoproteine della famiglia Wnt. Abbiamo svolto dunque degli esperimenti di immunolocalizzazione con doppia marcatura per α -SMA e Wnt5a dimostrando la colocalizzazione dei 2 segnali; questo supporta l'ipotesi di come l'aumento di espressione di Wnt5a possa essere sostenuto in parte da ISEMFs. Infatti in letteratura ci sono evidenze che associano la produzione di questo ligando anche ad altre tipologie cellulari: oltre alle cellule epiteliali si annoverano i macrofagi, che sono di primaria importanza in fenomeni di infiammazione cronica e che sembrano produrne maggiormente in seguito all'attivazione della via di NFK- β [27].

Colture primarie di miofibroblasti derivati da mucosa di RCU e controllo hanno permesso di confermare l'espressione di Wnt5a da parte di queste cellule. L'espressione del trascritto è aumentata significativamente in cellule derivate da RCU e tale aumento ha avuto riscontro anche nell'analisi della proteina.

Abbiamo inoltre dimostrato che Wnt5a è up-regolato a livello genico da alcuni mediatori dell'infiammazione quali LPS e TGF β e che in questo caso le cellule derivate da colite

rispondono maggiormente di quelle controllo. Questi dati sono effettivamente sostenuti da diversi autori in cui mostrano una correlazione tra Wnt5a e questi due mediatori infiammatori. In uno studio recente si mostra una correlazione tra Wnt5a e TLR4 in macrofagi in placche di aterosclerosi e osservano anch'essi un up-regolazione di Wnt5a in macrofagi dopo stimolo con LPS. [9]. Per quanto riguarda lo stimolo con il TGF β invece, ci sono dati che riportano un controllo trascrizionale su Wnt5a, up-regolandolo e agendo o direttamente attraverso il complesso delle SMAD o indirettamente attraverso il complesso CUX1 indotto da SMAD e MAPK3K7 mediato da NFK β [28].

Inoltre è stato riportato come il TGF β induca l'up-regolazione di Wnt5a necessaria per lo sviluppo della ghiandola mammaria. TGF β in ISEMFs promuove la mobilitazione e ne stimola l'attivazione, quindi come fattore pro-fibrogenico che guida alla deposizione di matrice extracellulare e l'espressione della COX-2. Sembra interessante notare il fatto che il TGF β agisce più sulle cellule di colite rispetto alle cellule controllo: probabilmente l'effetto è dipendente dallo stato di attivazione pronunciato in corso di infiammazione e/o dalle caratteristiche modificate del microambiente circostante. Un ipotesi potrebbe essere che le ISEMFs derivate da RCU possano essere sottoposte a modifiche epigenetiche che guiderebbero a differenti risposte al segnale del TGF β .

La via di segnale di Wnt5a orchestra notoriamente i processi di differenziazione cellulare, e alcuni studi indicano avere un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'intestino nel topo [7]. Il dato dell'aumentata produzione di Wnt5a da parte di questa tipologia cellulare che è annessa al compartimento delle staminali è significativo, è numerosi dati suggeriscono come possa influire in maniera paracrina sulla loro differenziazione [7]. Viceversa il ruolo di questa molecola nella biologia cellulare di ISEMFs è ancora oscuro. In questo lavoro abbiamo cercato di delucidare il potenziale ruolo autocrino di Wnt5a.

Dopo aver confermato che questo tipo cellulare risulta essere aumentato nella mucosa di pazienti affetti da RCU coerentemente con quanto descritto in letteratura, abbiamo prima di tutto valutato il ruolo di Wnt5a sulla proliferazione delle ISEMFs.

Dopo aver confermato la presenza dei recettori per Wnt5a, è stato valutato l'effetto dello stimolo con Wnt5a ricombinante sulla proliferazione cellulare delle ISEMFs, registrando un aumento dell'incorporazione di timidina triziata, sia su ISEMFs da soggetti sani che da soggetti con RCU, anche se il dato è risultato più evidente nel primo tipo cellulare. Contrariamente lo spegnimento genico di Wnt5a attraverso uno specifico vettore adenovirale ne produce una diminuzione, ripristinata se si supplementa la proteina nel terreno di coltura degli stessi. Da questi dati si evince il ruolo autocrino di questa molecola

sulla proliferazione di questo tipo cellulare. È interessante notare inoltre come la proteina agisca in maniera spiccatamente evidente sulle cellule controllo: probabilmente l'effetto non è così rilevante sulle cellule derivate da colite poiché è già espressa maggiormente a livello endogeno; inoltre questo tipo di cellula ha già un fenotipo "attivato".

Per confermare questi dati è stata valutata la distribuzione del ciclo cellulare in ISEMFs mediante analisi citofluorimetrica in seguito all'esposizione delle cellule controllo alla proteina ricombinante rWnt5a. È interessante notare come ISEMFs controllo dopo l'aggiunta del ricombinante in fase M aumentino significativamente, confermando il ruolo mitogenico di Wnt5a e peraltro, l'andamento che assumono sembra mimare quello delle ISEMFs isolate da RCU. Da tali esperimenti inoltre si è potuto intuire anche un probabile ruolo pro-apoptotico della glicoproteina in quanto si è stimata una diminuzione delle cellule in fase SubG0. Quest'ultimo dato è stato confermato dal saggio dell'Annessina V e dal saggio di attivazione della caspasi-3.

Questi dati evidenziano che Wnt5a è un regolatore della proliferazione e della sopravvivenza cellulare dei miofibroblasti e che possa avere un ruolo sull'espansione e il mantenimento di questa popolazione cellulare.

Wnt5a è in grado di attivare diverse vie di segnale: a seconda del contesto recettoriale e del milieu extra-cellulare in cui si trova infatti, può agire o attraverso la β -catenina, stabilizzandola e permettendo la sua traslocazione nucleare, o altre vie di segnale tra cui quella del Calcio[38]. Poiché è noto che la β -catenina regola la trascrizione di alcuni geni target coinvolti nella proliferazione, si è indagato se la proliferazione Wnt5a-mediata agisce attraverso questa proteina. Dai risultati è emerso che Wnt5a agisce in maniera β -catenina indipendente: il silenziamento genico della β -catenina ha portato ad un decremento della proliferazione in ISEMFs da RCU e da controllo, tuttavia l'aggiunta di rWnt5a ha promosso comunque un incremento della proliferazione. Diversi studi hanno mostrato come la proliferazione cellulare nelle cellule endoteliali e nei macrofagi è mediata dalla CamKII, una chinasi conosciuta per essere attivata in seguito al rilascio di calcio sotto il legame di Wnt5a [43,16]. Anche in questo lavoro abbiamo analizzato il coinvolgimento di tale via di segnale, trattando ISEMFs con gli inibitori della via del Calcio quali quelli per PKC e CamKII. Tali esperimenti hanno condotto all'evidenza che rWnt5a non è in grado di ripristinare la proliferazione abbattuta dall'inibizione della CamKII. Questo fatto è stato poi consolidato con lo studio sull'espressione proteica della CamKII. A seguito della supplementazione con la proteina purificata infatti, a parità di livelli di CamKII intracellulare, i livelli della forma fosforilata, ovvero attiva, sono risultati aumentati.

Sebbene venga supportato da studi su altri modelli cellulari, questo è il primo studio in ISEMFs che dimostra come la via di segnale coinvolta dopo stimolazione da Wnt5a sia quella della CamKII.

Concludendo questi risultati indicano come Wnt5a induca la proliferazione e la sopravvivenza di ISEMFs promuovendo il mantenimento e l'espansione di questa popolazione e mantenendo la perpetuazione dell'infiammazione e del danno tissutale. Infatti Wnt5a determina l'acquisizione di un il fenotipo infiammatorio dei ISEMFs provenienti da mucosa di soggetti sani, paragonabile a quanto osservato in quelli derivati da RCU. ■

7. ABBREVIAZIONI

Ad, *adenovirus*; ATP, *adenosine triphosphate*; BSA, *albumina di siero bovino*; CPE, *cytophatic effect*; Cy3, *cyanine3*; RCU, *Rettocolite ulcerosa*; DN, *dominant negative*; DMEM, *Dulbecco's modified Eagle Medium*; dNTP, *deossiribonucleoside trifosfato*; ds, *double stranded*; DTT, *dithiothreitol*; ECM, *extracellular matrix*; EDTA, *acido etilendiamminotetraacetico*; EGF, *epidermal growth factor*; FBS, *siero fetale bovino*; GAPDH, *gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi*; HBSS, *Hanks' balanced salt solution*; IBD, *inflammatory bowel diseases*; IGF, *insulin like growth factor*; IL, *interleuchina*; INF_{γ} , *interferon γ* ; ISEMF, *intestinal subepithelial myofibroblast*; MAPK, *mitogen activated protein kinase*; MC, *malattia di Crohn*; MMP, *metalloproteinasi*; MOI, *multiplicity of infection*; mRNA, *RNA messaggero*; pb, *paia di basi*; PBS, *phosphate buffered saline*; PCR, *polymerase chain reaction*; PEG, *polyetilen glicole*; PFA, *paraformaldeide*; PFU, *plaque forming unit*; p/v, *peso su volume*; RNAi, *RNA interference*; SDS, *sodio dodecil solfato*; shRNA, *short hairpin RNA*; α -SMA, *α -smooth muscle actin*; ss, *single stranded*; TCA, *tricloroacetic acid*; TGF- β , *transforming growth factor- β* ; Th *linfociti T helper*; TIMP, *tissue inhibitor of metalloproteinase*; TLR, *Toll like receptor*, TNF- α , *tumor necrosis factor- α* ; TBS, *Tris-buffered saline*.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Andoh A, Bamba S, Brittan M, Fujiyama Y, Wright NA. Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut. *Pharmacol Ther* 2007 Apr;114(1):94-106.
2. Andus T., Gross V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease- environmental factor *Hepatogastroenterology*,2000;47:29-43
3. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004 Nov 18;432(7015):324-31.
4. Bruce D, Cole WH et al Complication of ulcerative colitis. *Ann Surg* 1962;155:768-81
5. Burke J.P, Mulsonw J. et al Fibrogenesis in Crohn's disease *Am J Gastroenterol* 2007;102:439-448
6. Cao J, Chiarelli C, Richman O, Zarrabi K, Kozarekar P, Zucker S. Membrane type 1 matrix metalloproteinase induces epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. *J Biol Chem* 2008 Mar 7;283(10):6232-40.
7. Cervantes S, Yamaguchi TP, Hebrok M. Wnt5a is essential for intestinal elongation in mice. *Dev Biol* 2009 Feb 15;326(2):285-94.
8. Cheng CW, Yeh JC, Fan TP, Smith SK, Charnock-Jones DS. Wnt5a-mediated non-canonical wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Jan 11;365(2):285-90.
9. Christman MA,2nd, Goetz DJ, Dickerson E, McCall KD, Lewis CJ, Benencia F, Silver MJ, Kohn LD, Malgor R. Wnt5a is expressed in murine and human atherosclerotic lesions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 Jun;294(6):H2864-70.
10. CO Elson Experimental Models of intestinal inflammation: new insights into mechanisms of mucosal homeostasis. *Mucosal Immunology 2° ed. San Diego, Calif: Accademic Press, 1999; 1007-24*
11. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006 Nov 3;127(3):469-80.
12. Danese S., Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology* 2006; Vol 30: 4807-4812
13. Dale TC. Signal transduction by the wnt family of ligands. *Biochem J* 1998 Jan 15;329 (Pt 2)(Pt 2):209-23.
14. Daniel K. Podolsky Inflammatory Bowel Disease. *The New England Journal of Medicine* 2002; Vol 347: 534-539

15. Di Sabatino A, Jackson CL, Pickard KM, Buckley M, Rovedatti L, Leakey NA, Picariello L, Cazzola P, Monteleone G, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT, Pender SL. Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying crohn's disease strictures. *Gut* 2009 Jun;58(6):777-89.
16. Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD, Shah KV, Hewitt KJ, Rosenthal DT, Indig FE, Jiang Y, Nickoloff BJ, Taub DD, Trent JM, Moon RT, Bittner M, Weeraratna AT. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007 Jun 8;282(23):17259-71.
17. Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N, Reya T. Integration of notch and wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 2005 Mar;6(3):314-22.
18. Fiocchi C. Intestinal inflammation: A complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol* 1997 Oct;273(4 Pt 1):G769-75.
19. Fiocchi C, Ina K, Danese S, Leite AZ, Vogel JD. Alterations of mesenchymal and endothelial cells in inflammatory bowel diseases. *Adv Exp Med Biol* 2006;579:168-76.
20. Francoeur C, Bouatrouss Y, Seltana A, Pinchuk IV, Vachon PH, Powell DW, Sawan B, Seidman EG, Beaulieu JF. Degeneration of the pericryptal myofibroblast sheath by proinflammatory cytokines in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009 Jan;136(1):268,277.e3.
21. Goodwin AM, Kitajewski J, D'Amore PA. Wnt1 and Wnt5a affect endothelial proliferation and capillary length; Wnt2 does not. *Growth Factors* 2007 Feb;25(1):25-32.
22. Hata K, Andoh A, Shimada M, Fujino S, Bamba S, Araki Y, Okuno T, Fujiyama Y, Bamba T. IL-17 stimulates inflammatory responses via NF-kappaB and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 Jun;282(6):G1035-44.
23. Holcombe RF, Marsh JL, Waterman ML, Lin F, Milovanovic T, Truong T. Expression of wnt ligands and frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma. *Mol Pathol* 2002 Aug;55(4):220-6.

24. Huang CL, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, Ueno M. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005 Dec 1;23(34):8765-73.
25. Huang L, Pu Y, Hu WY, Birch L, Luccio-Camelo D, Yamaguchi T, Prins GS. The role of Wnt5a in prostate gland development. *Dev Biol* 2009 Apr 15;328(2):188-99.
26. Hughes KR, Sablitzky F, Mahida YR. Expression profiling of wnt family of genes in normal and inflammatory bowel disease primary human intestinal myofibroblasts and normal human colonic crypt epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis* 2011 Jan;17(1):213-20.
27. Katoh M, Katoh M. Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF-kappaB, hedgehog, TGFbeta, and notch signaling cascades. *Int J Mol Med* 2009 Jun;23(6):763-9.
28. Katoh M, Katoh M. STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (review). *Int J Mol Med* 2007 Feb;19(2):273-8.
29. Kazuhiko Nakamura, Kuniomi Honda, Takahiro Mizutani et al Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: selective inhibition of cytokines and adhesion molecule. *World Journal of Gastroenterology* 2006; Vol 29: 4628-4635
30. Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S. Multiplicity of the interactions of wnt proteins and their receptors. *Cell Signal* 2007 Apr;19(4):659-71.
31. Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, Schofl C, Andersson T, Brabant G. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* 2005 Mar 24;24(13):2144-54.
32. Leeb SN, Vogl D, Gunckel M, Kiessling S, Falk W, Goke M, Scholmerich J, Gelbmann CM, Rogler G. Reduced migration of fibroblasts in inflammatory bowel disease: Role of inflammatory mediators and focal adhesion kinase. *Gastroenterology* 2003 Nov;125(5):1341-54.
33. Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, Gerstein R, Jurecic R, Jones SN. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 2003 Nov;4(5):349-60.
34. Lust M, Vulcano M, Danese S. The protein C pathway in inflammatory bowel disease: The missing link between inflammation and coagulation. *Trends Mol Med* 2008 Jun;14(6):237-44.

35. Masckauchan TN, Agalliu D, Vorontchikhina M, Ahn A, Parmalee NL, Li CM, Khoo A, Tycko B, Brown AM, Kitajewski J. Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and tie-2. *Mol Biol Cell* 2006 Dec;17(12):5163-72.
36. McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 Jan;282(1):C172-82.
37. McKaig BC, McWilliams D, Watson SA, Mahida YR. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 2003 Apr;162(4):1355-60.
38. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 2006 Apr;4(4):e115.
39. Murdoch B, Chadwick K, Martin M, Shojaei F, Shah KV, Gallacher L, Moon RT, Bhatia M. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Mar 18;100(6):3422-7.
40. Oldenburg B and Daan Hommes Biological therapies in inflammatory bowel disease: top-down or bottom-up? *Current Opinion in Gastroenterology 2007; Vol 23: 395-399*
41. Ogura Y., Saab L et al Genetic variation and activity of mouse Nod2, a susceptibility gene for Crohn's disease. *Genomics* 2003;81(4):369-77
42. Pierer M., Krause C., et al. Extra-intestinal manifestation of chronic inflammatory bowel disease. *Z Gastroenterol* 2002 Apr; 40 Suppl 1: 92-4
43. Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, Kurrer MO, Schoedon G. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Mar;28(3):504-10.
44. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors I. role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 Jul;289(1):G2-7.
45. Pucilowska JB, McNaughton KK, Mohapatra NK, Hoyt EC, Zimmermann EM, Sartor RB, Lund PK. IGF-I and procollagen alpha1(I) are coexpressed in a subset of

- mesenchymal cells in active crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 Dec;279(6):G1307-22.
46. Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trumper L, Binder C. Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Apr 4;103(14):5454-9.
 47. Rattis FM, Voermans C, Reya T. Wnt signaling in the stem cell niche. *Curr Opin Hematol* 2004 Mar;11(2):88-94.
 48. Reischl J, Schwenke S, Beekman JM, Mrowietz U, Sturzebecher S, Heubach JF. Increased expression of Wnt5a in psoriatic plaques. *J Invest Dermatol* 2007 Jan;127(1):163-9.
 49. Rogler Gerard, Andus Tilo Cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Surgery* 1998; Vol 22: 382-389
 50. Regueiro M Management and prevention of postoperative Crohn's disease. *Inflammatory bowel disease* 2009; Vol 00: 000-000
 51. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005 Apr 14;434(7035):843-50.
 52. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, Hintz L, Nusse R, Weissman IL. A role for wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003 May 22;423(6938):409-14.
 53. Rieder F, Fiocchi C. Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009 Apr;6(4):228-35.
 54. Sartor Balfour Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology & Hepatology* 2006; Vol 3: 449-448
 55. Sartor RB. The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res Immunol.* 1997 Oct-Dec;148(8-9):567-76].
 56. Scaldaferrri F, Correale C, Gasbarrini A et al Mucosal biomarkers in inflammatory bowel disease: Key pathogenic players or disease predictors? *World Journal of Gastroenterology* 2010 June 7; Vol 16: 2616-2625
 57. Sen M, Chamorro M, Reifert J, Corr M, Carson DA. Blockade of wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. *Arthritis Rheum* 2001 Apr;44(4):772-81.
 58. Smolich BD, McMahon JA, McMahon AP, Papkoff J. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol Biol Cell* 1993 Dec;4(12):1267-75.

59. Torii K, Nishizawa K, Kawasaki A, Yamashita Y, Katada M, Ito M, Nishimoto I, Terashita K, Aiso S, Matsuoka M. Anti-apoptotic action of Wnt5a in dermal fibroblasts is mediated by the PKA signaling pathways. *Cell Signal* 2008 Jul;20(7):1256-66.
60. Vuga LJ, Ben-Yehudah A, Kovkarova-Naumovski E, Oriss T, Gibson KF, Feghali-Bostwick C, Kaminski N. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009 Nov;41(5):583-9.
61. Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 1999 Mar;126(6):1211-23.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il prof. Giorgio Palù, direttore della sezione di Microbiologia e Virologia del Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, per avermi dato l'opportunità di svolgere questo lavoro di tesi presso i laboratori del dipartimento.

Esprimo la mia gratitudine al responsabile di questo lavoro, il dott. Andrea Buda, per la fiducia e la stima che mi ha riservato.

Grazie al prof. Ignazio Castagliuolo per la disponibilità, gli insegnamenti e i preziosi suggerimenti senza i quali non avrei potuto realizzare questo lavoro.

Esprimo inoltre riconoscenza alla dott.ssa Renata D'Incá ed al Prof. Carlo Giacomo Sturniolo.