



Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE NEFROLOGICHE XIX ciclo

SSD: MED 14

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Sergio Stefoni

**CAPACITA' TRANS-DIFFERENZIATIVA DELLE
CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE E
POTENZIALI APPLICAZIONI CLINICHE DELLA
TERAPIA CELLULARE NEI PAZIENTI CON
DANNO RENALE**

Tutor:

Chiar.mo Prof. Gaetano La Manna

Dottoranda:

Dr.ssa Francesca Bianchi

Anno Accademico 2005 - 2006

Introduzione

1.1 Patologie renali e terapia cellulare

Le malattie renali croniche e l'insufficienza renale terminale sono considerate tra le più importanti emergenze mediche del nuovo millennio. Esistono diverse malattie renali, alcune a carattere ereditario, altre si sviluppano con la vecchiaia. Di molte non si conoscono ancora le cause precise, ma è noto che lo stadio finale nella maggior parte dei casi è costituito dall'insufficienza renale cronica (IRC). L'IRC è lo stato patologico caratterizzato da una perdita permanente della funzione renale, che ha come conseguenza l'incapacità del rene ad espletare la funzione escretoria di cataboliti soprattutto azotati, a mantenere l'omeostasi idroelettrolitica e svolgere la sua attività endocrina. I pazienti affetti da insufficienza renale cronica sono in continuo aumento, perché i farmaci di cui si dispone consentono di rallentare il danno renale, ma non di ripristinare la funzionalità perduta.

In Italia, circa 41 mila persone sono in trattamento dialitico cronico, con gravi implicazioni per la qualità e l'aspettativa di vita dei pazienti e pesanti costi sociali, in particolare per le famiglie dei malati. Il trattamento dialitico è sicuramente un trattamento salvavita, ma sostituisce solo la funzione di filtrazione del rene, e non quella omeostatica, regolatoria, metabolica ed endocrina. Per coloro che comunque giungono alla dialisi, il trapianto è l'opzione terapeutica migliore per sostituire la funzione del rene. Tuttavia, i pazienti incontrano tre ostacoli principali: la scarsità di organi che li costringe a una lunga attesa, la necessità di assumere per tutta la vita farmaci immunosoppressivi che favoriscono le infezioni e l'insorgenza di tumori, la durata limitata del trapianto, che in media dopo 10 anni fallisce. L'incidenza di pazienti che ogni anno si sottopone a trattamento dialitico è attualmente di circa 160 su milione di abitanti, ed è considerata una delle più ingenti cause di spesa del Sistema Sanitario Nazionale.

In questo contesto, è sempre maggiore l'interesse rivolto alla ricerca di approcci terapeutici alternativi, come la terapia cellulare. L'idea alla base della terapia cellulare consiste nel coadiuvare il processo fisiologico di riparo attraverso il trapianto di cellule esogene che siano strutturalmente e funzionalmente congruenti alla logica tissutale renale. La possibilità di disporre di cellule staminali in grado di rigenerare il danno renale rappresenterebbe una prospettiva molto importante per la prevenzione e la terapia di eventuali danni renali.

L'efficacia della terapia cellulare dipende dalla valutazione di alcuni aspetti, riguardanti soprattutto:

- il tipo di cellule (staminali o progenitori renali)
- l'identificazione della quantità appropriata di cellule atte alla rigenerazione da trapiantare
- il metodo di impianto nell'organismo (delivery)
- l'efficacia di cellule attivate "ex-vivo" sulla ricostituzione tissutale.

1.2 Le cellule staminali

Per staminale si intende una cellula indifferenziata, capace di proliferare per tempi indefiniti, clonogenica, con capacità di "self-renewing", cioè in grado di generare copie identiche a se stessa per lunghi periodi (anche per l'intera vita di un organismo), attraverso divisioni mitotiche, ma in grado anche di differenziare in diversi organi e tessuti e dotata di plasticità funzionale, cioè della capacità di seguire i diversi destini a seguito dei differenti stimoli esterni.

Tradizionalmente il concetto di staminalità è stato da sempre associato all'embrione, che per definizione è formato da cellule ancora indifferenziate, destinate a proliferare enormemente e a generare una molteplicità di tipi cellulari distinti. L'embrione è una struttura del tutto particolare, in quanto formato da un numero esiguo di cellule, che però hanno in sé un vastissimo potenziale di differenziamento, essendo in grado di generare un intero organismo, composto da

più di 200 tipi cellulari. In base a questa proprietà le cellule staminali embrionali vengono definite totipotenti. In realtà, già nelle prime fasi del suo sviluppo, l'embrione è una struttura tutt'altro che omogenea: infatti, già pochi giorni dopo la fecondazione si riconoscono chiaramente tre foglietti (definiti rispettivamente ectoderma, mesoderma ed endoderma), che rappresentano un primo epifenomeno del differenziamento cellulare che caratterizzerà le fasi successive dell'embriogenesi (Fig. 1.1).

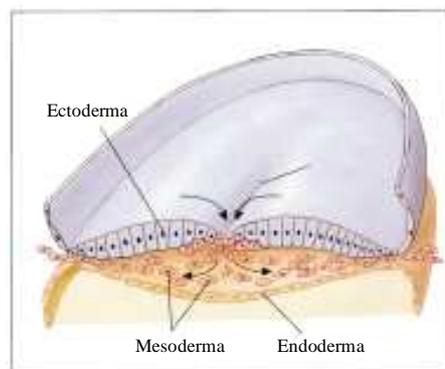


Fig. 1.1: Schematizzazione dell'embrione ad alcuni giorni dalla fecondazione in cui si possono osservare i tre foglietti embrionali.

In pratica, da ciascuno dei tre foglietti potrà originare un numero ampio ma limitato di tipi cellulari differenti: ad esempio una cellula che si localizza a livello dell'ectoderma potrà generare una progenie di cellule epiteliali, neurali o pigmentate, ma non sarà mai in grado di dare origine a cellule del sangue o del muscolo, che invece sono di derivazione mesodermica (Fig. 1.2). Questo concetto, viene definito generalmente “lineage restriction”.

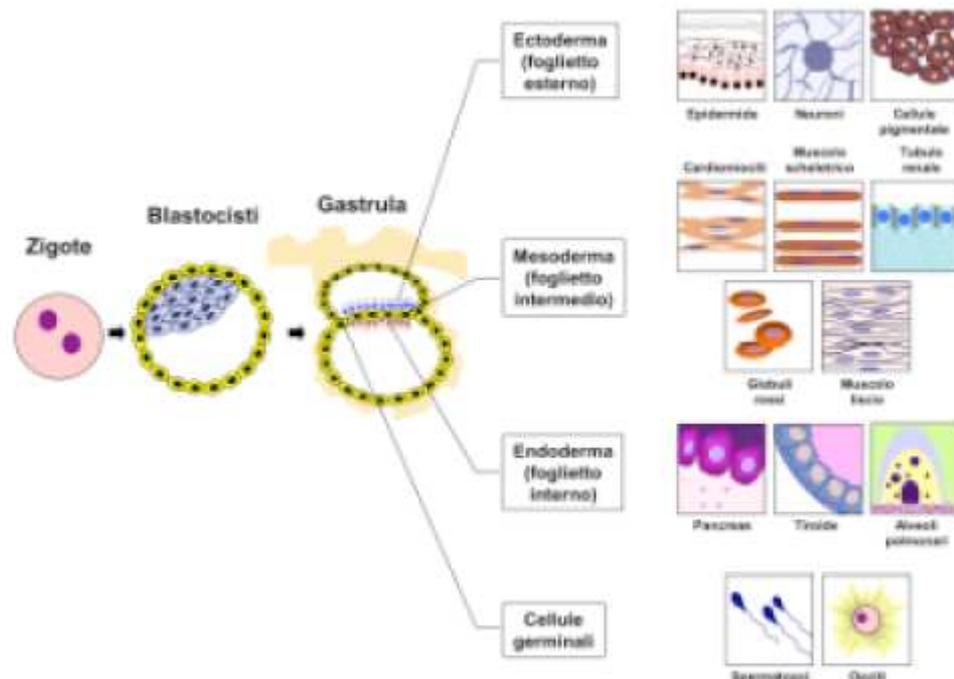


Fig. 1.2: Differenziamento dei tessuti umani. La figura rappresenta schematicamente il processo di embriogenesi, per il quale già nelle prime fasi dello sviluppo embrionale sono riconoscibili tre foglietti (definiti rispettivamente ectoderma, mesoderma ed endoderma), dai quali origineranno tutte le cellule che fisiologicamente compongono un organismo adulto. Al contrario, la segregazione delle cellule germinali nella maggior parte dei mammiferi avviene in una struttura adiacente, ma non appartenente ad alcuno dei tre foglietti.

In realtà, oggi questa visione della staminalità limitata alle cellule embrionali appare alquanto restrittiva, in quanto alcune popolazioni staminali si mantengono nei tessuti adulti diventando una riserva di precursori cellulari (Young et al. 2004) coinvolti probabilmente nei processi di mantenimento e riparazione tissutale che intervengono dopo traumi, lesioni o nell'invecchiamento (Pittenger et al. 1999), e che pertanto vengono chiamate cellule staminali dell'adulto.

Le cellule staminali adulte, sono parte di popolazioni cellulari tessuto-specifico di organismi adulti e quindi già commissionate per il differenziamento.

Le cellule staminali vengono classificate in base alla loro capacità differenziativa. Le cellule staminali pluripotenti hanno la capacità di differenziare nei tre strati germinali che costituiscono un organismo: mesoderma

(muscolo, ossa, ecc.), ectoderma (neuroni, pelle, ecc.) ed endoderma (epatociti, cellule β pancreatiche, ecc.); le cellule staminali multipotenti possono invece differenziare solo nei tipi cellulari di uno specifico foglietto germinale o tessuto.

Tutte le cellule staminali, come già accennato, devono in ogni caso soddisfare almeno tre criteri fondamentali:

- Capacità di auto-rinnovamento, con una divisione cellulare di tipo simmetrico o asimmetrico attraverso cui la popolazione staminale viene mantenuta; una divisione simmetrica implica che entrambe le cellule figlie mantengono le caratteristiche di staminalità; nella divisione asimmetrica solo una delle cellule figlie si conserva come cellula staminale mentre l'altra prosegue nel processo di differenziamento.
- Una singola cellula può dar luogo ad un differenziamento multi-lineage; l'abilità a differenziare in diversi lineage non deve essere quindi dovuta alla presenza di una popolazione cellulare mista costituita da elementi con potenziali di differenziamento diversi.
- Capacità di ricostituzione funzionale *in vivo* di un dato tessuto.

1.2.1 Le cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte hanno delle capacità di auto-rinnovamento e un potenziale di differenziamento molto più ristretti rispetto alle cellule staminali embrionali, e sebbene differenziano in molteplici lineage non sono cellule pluripotenti (Ulloa-Montoya et al. 2005).

Recenti osservazioni indicano che cellule staminali adulte possono differenziare anche in fenotipi diversi dal proprio "lineage" cellulare; questo fenomeno detto di "plasticità" cellulare è stato osservato per diverse popolazioni cellulari staminali (Alhadlaq et al., 2004).

La maggior parte degli approcci sperimentali, fino ad oggi, ha sfruttato le cellule staminali del midollo osseo (Jiang et al., 2002), principalmente per due ragioni: da un lato il trapianto di midollo è ormai una pratica clinica routinaria, dall'altro è ormai assodata la presenza di elementi staminali nel tessuto

midollare, in cui coesistono popolazioni staminali adulte differenti. A livello anatomico il midollo osseo è formato dal parenchima nobile, dove si trovano le cellule staminali emopoietiche (HSC) responsabili dell'emopoiesi, e da una regione stromale in cui sono presenti cellule staminali mesenchimali (MSC).

Le HSC sono cellule staminali adulte pluripotenti capaci di dare origine a tutti gli elementi linfoidi e mieloidi circolanti nel sangue periferico. Nel midollo osseo sono le più numerose, rappresentano lo 0,1% della staminalità totale e possono essere riscontrate anche nel sangue periferico dove costituiscono lo 0,01% delle cellule mononucleate circolanti. Sono cellule ben caratterizzate e separabili in distinte subpopolazioni sia per la diversa espressione di marker di membrana che per la diversa capacità di "self-renewal". Le HSC del midollo osseo sono caratterizzate dai marker Lin-/low, c-Kit+, Sca-1+; in particolare la frazione CD34+ è altamente presente nelle HSC umane.

1.3 Le cellule staminali mesenchimali umane (hMSC)

Nel midollo osseo adulto, oltre alle cellule staminali emopoietiche, è presente a livello stromale un'altra popolazione staminale i cui elementi cellulari sono chiamati cellule staminali mesenchimali (MSC) e possono costituire dallo 0,001% allo 0,01% delle cellule nucleate del midollo osseo. Le cellule staminali mesenchimali sono in uno stato di quiescenza e non sono ancora noti i meccanismi che portano ad una loro attivazione in vivo; in vitro, in assenza di fattori di induzione, non mostrano differenziamento spontaneo o fenomeni di iperproliferazione e nelle popolazioni a confluenza si osserva inibizione da contatto tra le cellule con la formazione di un monostrato cellulare (Young et al. 2004). Alcune molecole in grado di regolare la proliferazione di queste cellule come, ad esempio, il fattore Wnt-inibitor dickkopf-1, (Gregory et al. 2003) sono state identificate recentemente.

Questa tipologia cellulare ha dimostrato di possedere un'alta stabilità genica, la capacità di migliorare il processo rigenerativo di molti tessuti e una grande capacità differenziativa in vivo e in vitro.

Queste cellule hanno mostrato di avere la capacità di rigenerare non solo tessuti di origine mesenchimale, come la cartilagine dei dischi intervertebrali, cardiomiociti, osso e cartilagine articolare, ma anche di differenziare in cellule derivate da altri foglietti embrionali, inclusi i neuroni, l'epitelio della pelle, polmoni, fegato, intestino, rene e milza (Baksh et al., 2004; Krause et al., 2001; Ventura et al., 2006).

Data la loro elevata potenzialità differenziativa e proliferativa, le cellule staminali mesenchimali rappresentano un importante strumento della terapia cellulare e un interessante obiettivo della medicina rigenerativa; nell'ambito della terapia cellulare sull'uomo le cellule staminali mesenchimali hanno dimostrato nella pratica clinica o in avanzati trial clinici, il loro importante ruolo coadiuvante nel supporto dei trapianti di midollo osseo, nel trattamento dell'osteogenesi imperfetta e in numerosi altri casi in cui non erano disponibili altre alternative terapeutiche (Frasson et al. 2002).

Date le importanti questioni etiche, oltre ai limiti scientifici riguardo all'uso di cellule staminali embrionali, l'entusiasmo scientifico riferito alle cellule staminali mesenchimali è giustificato dalle loro interessanti caratteristiche che le rendono particolarmente stimolanti nell'ideazione di applicazioni ad ampio raggio in diversi settori clinici. In particolare le cellule staminali mesenchimali richiedono l'uso di tecniche di isolamento semplici e sono caratterizzate da un alto potenziale di espansione in vitro, da stabilità genica, dalla loro compatibilità con quelli che sono i principi della ingegneria tissutale e dalla capacità di potenziare i meccanismi di riparazione in molti tessuti vitali (Gronthos et al. 2003).

1.3.1 Caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali

Sebbene siano stati molti gli sforzi per caratterizzare i marker di superficie delle cellule mesenchimali, ad oggi non è conosciuto un marker specifico in grado di individuare una popolazione cellulare mesenchimale omogenea in modo univoco; sono comunque noti profili fenotipici che identificano delle proteine di

superficie importanti per caratterizzare le popolazioni cellulari isolate e utili per lo studio delle interazioni cellula-cellula e cellula-ambiente; alcuni importanti marker di superficie delle popolazioni cellulari mesenchimali sono il CD10, CD29, CD44, CD90, CD106, CD124 e molte altre proteine di superficie note, che, sebbene costituiscano un profilo di superficie estensivo, rappresentano comunque un quadro incompleto. Le cellule staminali mesenchimali devono comunque presentare un profilo fenotipico negativo per i marker del lineage ematopoietico come CD14, CD34 e CD45 e per marker delle cellule staminali embrionali come la fosfatasi alcalina o gli antigeni embrionali stadio-specifico (SSEA-1-2-3-4).

Recentemente è stata isolata una sottopopolazione di cellule stromali midollari selezionata con un anticorpo per un marker di superficie non ancora caratterizzato denominato STRO-1; le cellule così isolate dal midollo osseo dimostrano di avere numerosi attributi tipici delle cellule staminali mesenchimali (Gronthos et al. 2003).

Oltre che per l'espressione superficiale di particolari antigeni, le cellule mesenchimali vengono saggiate anche per le loro capacità differenziative in molteplici fenotipi; piccole differenze nei marker di superficie non sono infatti sufficienti per distinguere eventuali sottopopolazioni di cellule staminali e per questo la comparazione funzionale rappresenta il miglior approccio. Mediante induzione con promotori lineage-specifici si ottengono differenziamenti in senso adipogenico, condrogenico e osteogenico (Muraglia et al., 2000); la natura di queste popolazioni può essere identificata con test per l'attività enzimatica lineage-specifica, con RT-PCR, amplificando trascritti la cui espressione è lineage-specifica, o mediante criteri cito-morfologici; l'omogeneità delle popolazioni differenziate è verificata escludendo la presenza di lineage multipli, e accertando l'assenza di fenomeni apoptotici o necrotici associati ai processi di differenziamento (Pittenger et al. 2004).

Test citogenetici condotti su popolazioni di cellule mesenchimali di midollo osseo hanno dimostrato assenza di anomalie cromosomiche e persistenza

dell'attività telomerasica anche in piastre cellulari dopo un numero elevato di passaggi.

La Telomerasi è una ribonucleoproteina che replica la porzione telomerica dei cromosomi durante la fase S della mitosi e la sua attività è rilevata in cellule germinali umane, in cellule tumorali e in linee cellulari embrionali dove è responsabile della capacità illimitata di auto-rinnovamento di questi tipi cellulari (Wright et al. 1996), al contrario delle cellule somatiche che presentano limitate capacità di auto-rinnovamento che sembrerebbero dovute soprattutto alla breve emivita che le telomerasi hanno in queste cellule. Dato dunque che la capacità di auto-rinnovamento indefinito (self-renew) è una delle caratteristiche fondamentali delle cellule staminali l'attività telomerasica costituisce uno dei marker utili per la loro identificazione (Meeker et al. 1997).

Sebbene le MSC derivate da midollo osseo siano quelle più utilizzate nella pratica clinica, la loro presenza nel midollo osseo adulto è relativamente bassa e, così come la loro capacità differenziativa, diminuisce con l'età del paziente da cui vengono prelevate (D'Ippolito et al., 1999). L'isolamento di cellule mesenchimali dallo stroma midollare implica inoltre ulteriori difficoltà nella pratica clinica, poiché si avvale di un prelievo del midollo osseo mediante tecniche chirurgiche invasive e traumatiche per il paziente, ed è più facile l'insorgenza di infezioni in sede midollare (Rao et al., 2001). Queste problematiche hanno portato alla ricerca di fonti alternative di cellule mesenchimali che siano compatibili ai principi della terapia cellulare e all'applicabilità in campo clinico.

Cellule staminali adulte sono state isolate da altri tessuti oltre al midollo osseo, incluso l'osso trabecolare, il tessuto adiposo, il muscolo scheletrico, i polmoni, la polpa dentaria, le cellule perivascolari del cordone ombelicale derivate dalla gelatina di Wharton e le cellule di membrane fetali di placenta a termine (Korbling et al., 2003, Alviano et al., 2007). Recentemente sono state identificate cellule staminali adulte anche a livello renale (Bussolati et al., 2005)

1.3.2 Le cellule mesenchimali degli annessi embrionali

Il sangue del cordone ombelicale pur essendo considerata un'importante fonte di cellule staminali presenta una bassa percentuale di elementi cellulari mesenchimali spesso non rilevabile, e ciò rende tale fonte meno interessante per uno sviluppo in senso clinico (Mareschi et al. 2001).

La Gelatina di Wharton è un tessuto connettivale, presente nel cordone ombelicale umano, costituito da cellule stromali di tipo miofibroblastoide, fibre di collagene e proteoglicani; recenti studi hanno dimostrato la presenza in questo tessuto di cellule con una notevole attività proliferativa che possono essere isolate facilmente, espanse e mantenute in vitro; queste cellule possono essere indotte a differenziare, mediante specifici induttori (fattore di crescita dei fibroblasti, dimetilsolfossido, ecc.) in senso neurogenico, dimostrandosi dunque una potenziale risorsa di cellule staminali multipotenti facilmente ottenibili senza implicazioni etiche e utili per applicazioni terapeutiche e biotecnologiche (Mitchell et al. 2003).

Recenti studi hanno dimostrato che anche il fluido amniotico (prelevato tra il secondo e terzo trimestre) è una ricca fonte di cellule mesenchimali. Gli elementi cellulari presenti nel fluido amniotico costituiscono una popolazione piuttosto eterogenea di origine fetale; i potenziali siti che forniscono tali cellule sono l'epidermide, l'epitelio e la mucosa digestiva, il tratto urinario e respiratorio e le strutture membranose fetali (Golden 1983). L'origine delle cellule mesenchimali nel fluido amniotico non è ancora stata identificata ma è oggi oggetto di studio il ruolo delle membrane fetali placentari nella costituzione di tale popolazione staminale (Bailo et al. 2004).

1.3.3 Le cellule mesenchimali della membrana fetale

La placenta umana è un organo costituito sia da una porzione di origine materna che da una porzione di origine fetale: l'amnios e il corion sono tessuti di origine fetale mentre le differenti regioni della decidua sono di origine materna.

La membrana amniocorionica delimita la sacca che avvolge il feto; in tale struttura l'amnios, lo strato più interno del sacco amniotico, è costituito da un singolo strato di cellule epiteliali che rivestono internamente un basamento membranoso e un sottostante strato di cellule stromali (Hoyes et al., 1970) (Fig. 1.3).

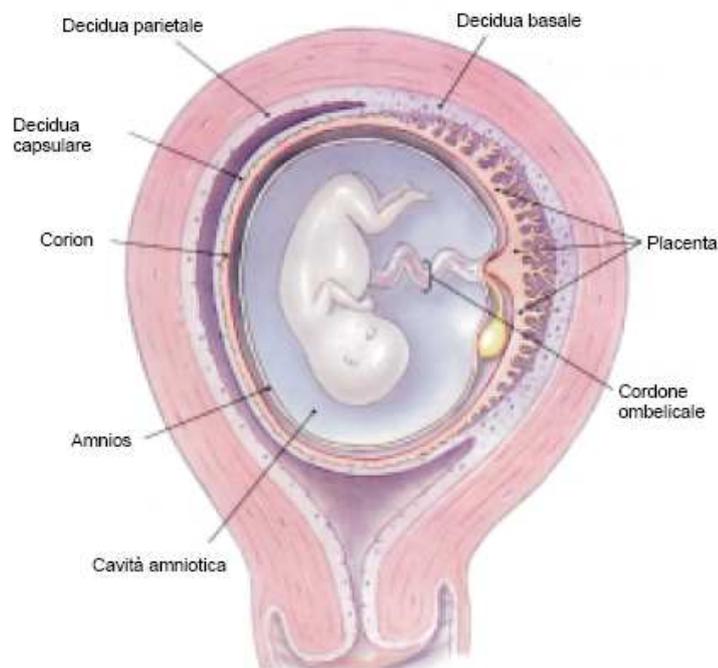


Fig.1.3: Immagine di placenta in cui è possibile osservare le rispettive posizioni di corion e amnios.

Il corion è costituito da un mesoderma corionico e dallo strato trofoblastico ricco di cellule citotrofoblastiche che formano i villi del corion frondoso. Embriologicamente l'amnios deriva dall'epiblasto della massa cellulare interna mentre il corion origina dal tessuto extra-embriionale (Moore et al. 1998).

Recenti studi hanno dimostrato che cellule ottenute dal fluido amniotico mostrano un fenotipo mesenchimale-staminale simile a quello delle cellule derivate dal midollo osseo (Anker et al. 2004); la caratterizzazione fenotipica e funzionale delle cellule di origine amniocorionica ancora oggi non è completa e

non sono ancora stati prodotti degli studi sistematici sulle cellule corioniche, che permettano di stabilire le caratteristiche di progenitori cellulari o di marker di differenziamento. Al contrario, sono stati recentemente effettuati degli studi sulle cellule stromali amniotiche che ne hanno dimostrato le caratteristiche mesenchimali (Alviano et al., 2007).

Alcuni importanti dati riguardanti queste popolazioni cellulari sono comunque noti, come ad esempio la bassa espressione di MHC I e la mancanza di espressione di MHC II (Kubo et al. 2001); la bassa immunogenicità di queste cellule è stata dimostrata da applicazioni cliniche con l'uso di cellule dell'epitelio amniotico come medicazione biologica per il trattamento del danno distruttivo corneale e congiuntivale (Solomon et al. 2003). Grazie a queste interessanti caratteristiche le cellule della membrane fetale possono offrire ampie possibilità nel campo della terapia cellulare e della medicina rigenerativa; recentemente è stata mostrata l'abilità di tali cellule mesenchimali derivanti da membrana fetale, in particolar modo da epitelio amniotico, nell'esprimere marker neurogenici, epatici e pancreatici, dimostrando quindi, ancora una volta, la presenza di progenitori multipotenti indifferenziati e il loro possibile utilizzo clinico (Wei et al. 2003).

1.3.4 Le MSC allogene e il sistema immunitario

La capacità di generare una risposta immunitaria è una caratteristica fondamentale da indagare se si stanno studiando cellule che dovranno essere trapiantate in un organismo con finalità di ricostruzione tissutale dopo un danno renale, o come terapia coadiuvante al trapianto d'organo, dove sono presenti tessuti di origine allogenica.

La terapia cellulare di derivazione autologa è una risorsa molto importante ma necessita di una biopsia del paziente e di un'espansione in coltura delle cellule prelevate, che poi devono essere opportunamente selezionate e controllate prima di essere trasferite. E' quindi una procedura costosa e non si ha la sicurezza che il numero di cellule prodotte dal soggetto al momento del bisogno sia sufficiente.

Un approccio alternativo è il trapianto di cellule allogeniche, e proprio per questo motivo è importante indagare se le hMSC possano indurre una risposta immunitaria o meno.

Le cellule mesenchimali possiedono numerose molecole di superficie che potrebbero interagire con le cellule T del sistema immunitario, come MHC I, Thy-1 (CD90), VCAM (CD106, vascular cell adhesion molecole), ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecole), ALCAM (CD166, activated leukocyte cell adhesion molecole), e integrine $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$. L'interferone- γ induce nelle hMSC di origine fetale un aumento dell'espressione di MHC II, normalmente espresso a livelli non apprezzabili, ma non di molecole co-stimolatorie come CD80 e CD86, comunque mai espresse dalle hMSC (Gotherstrom et al. 2004). La presenza di MHC I previene la reazione delle cellule NK mentre l'assenza di MHC II e di molecole costimolatorie impediscono una reazione delle cellule T o comunque predispongono ad un risultato di anergia: le MSC hanno quindi caratteristiche ipoimmunogeniche.

Per Zhang et al. (2004) le MSC interferiscono con la maturazione delle cellule dendritiche (DC), le cellule presentanti l'antigene (APC) con ruolo chiave nelle reazioni "self-non self" sia a livello centrale che periferico. In esperimenti di co-coltura le MSC determinano nelle DC una forte regolazione negativa dell'espressione di molecole importanti per il loro sviluppo come CD1a, CD40, CD80, CD86 e HLA-DR; le MSC sono inoltre in grado di interagire direttamente con le cellule T responsabili di alloreattività. Secondo diversi studi (McIntosh et Bartholomew 2000, Tse et al. 2003) le MSC coltivate con cellule T non ne causano la proliferazione e ridurrebbero addirittura la risposta di quest'ultime ad altre cellule o ad attivatori non specifici come la fitoemoagglutinina. La mancanza di risposta non è dovuta ad apoptosi o ad altri meccanismi deteriorativi dato che la competenza delle cellule T è efficientemente ripristinata in seguito alla rimozione delle hMSC in co-coltura (Pendelton et al. 2003). Si è cercato quindi di capire quali citochine fossero prodotte dalle MSC e nonostante la caratterizzazione sia ancora in corso e sia subordinata alle condizioni di isolamento e di coltura, tuttavia si ha evidenza della produzione del fattore di

crescita epatocitario (HGF), IL-10 e TGF β (Ryan J et al. 2005) che contribuiscono a creare un ambiente immunosoppressivo. Oltre alla secrezione di fattori solubili, le MSC esprimono sotto stimolazione di INF γ l'enzima Indolamina 2-3 diossigenasi (IDO) che catabolizza il triptofano presente nell'ambiente, impedendo la proliferazione delle cellule T (Meisel et al. 2004) attraverso la diminuzione della concentrazione dell'aminoacido nell'ambiente (tryptophan desert). Il meccanismo è simile a quello dell'induzione di tolleranza nell'interfaccia materno fetale per permettere l'impianto dell'ovulo fecondato.

L'ipotesi è quindi che le MSC agiscano come modulatori della risposta immune attraverso molteplici meccanismi (Fig. 1.4): ipoimmunogenicità, azione diretta cellula-cellula o tramite la produzione di fattori solubili; per esempio all'interno del midollo potrebbero avere un ruolo nel preservare la popolazione di linfociti immaturi finché a livello periferico non ne sia richiesta la proliferazione.

Le caratteristiche tollerogeniche delle hMSC permettono di sviluppare il loro utilizzo in medicina rigenerativa anche in senso allogenico, diminuendo così sensibilmente anche la mortalità associata all'incompatibilità del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA), che si fronteggia in clinica con l'uso di farmaci immunosoppressivi che hanno una relativa efficacia ed elevata tossicità. Buoni risultati in questo senso sono stati ottenuti da recenti studi in cui sono state trapiantate allo-MSK per indurre tolleranza ad altri tessuti trapiantati; ad esempio Bartholomew et al. (2001) hanno infuso MSC allogeniche per favorire l'attecchimento di un trapianto di pelle in un modello di babuino.

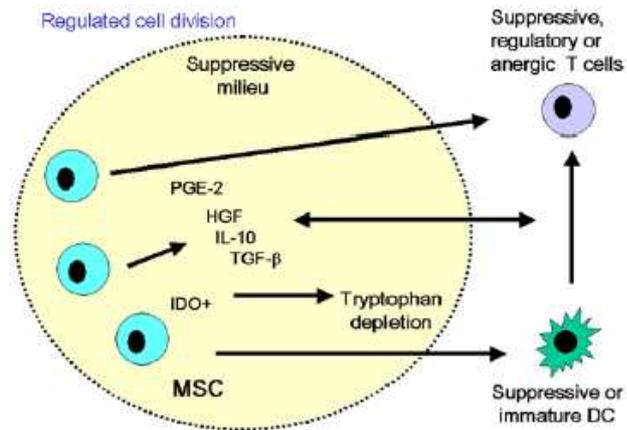


Fig 1.4: MSC e meccanismi di azione tollerogenica

Lo status immunologico delle cellule mesenchimali presenta dunque importanti vantaggi che vengono confermati anche in un ambito xenogenico; anche in questo caso studi condotti su modelli murini hanno confermato che l'impianto di cellule mesenchimali xenogeniche non è associato ad un'attivazione o un rigetto del sistema immunitario (Saito et al. 2002).

Le proprietà tollerogeniche delle cellule mesenchimali rendono quindi queste cellule strumenti d'elezione in terapia cellulare e compatibili con efficienti protocolli terapeutici in medicina rigenerativa d'urgenza; inoltre potrebbero essere addirittura utilizzate per il trattamento del rigetto in seguito a trapianto d'organo o in malattie autoimmuni.

1.4 Cellule staminali mesenchimali e rene

Data la considerevole morbilità dei trattamenti dialitici a lungo termine e l'aumento del numero di pazienti in lista d'attesa per il trapianto di rene, è chiaramente evidente la necessità di nuove terapie per la cura, o se non altro il miglioramento, delle patologie renali.

Nei pazienti con insufficienza renale cronica la malattia porta nella maggior parte dei casi ad una perdita cellulare, accumulo di proteine della matrice extracellulare e sviluppo di fibrosi interstiziale.

Molti studi si sono focalizzati sugli eventi cellulari e molecolari che portano allo sviluppo della fibrosi interstiziale, ma poco è noto riguardo ai meccanismi che promuovono il riparo cellulare e il rinnovamento tissutale.

Numerosi studi evidenziano la capacità delle cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo di rimpiazzare cellule renali adulte specializzate in modelli animali o nell'uomo (Ricardo et al., 2005; Yokoo et al., 2005). Tali studi hanno previsto l'analisi di individui con reni e midollo geneticamente differenti, permettendo in questo modo di verificare la presenza delle cellule di midollo a livello renale.

Nel caso dell'uomo, gli studi si sono basati sulla ricerca del cromosoma Y in pazienti maschi che avevano ricevuto un rene da donatrici femmine. Sono state rilevate cellule di midollo positive al cromosoma Y nei tubuli renali e nei glomeruli; queste cellule si mostravano positive a markers epiteliali, dimostrando un loro differenziamento verso un fenotipo tubulare.

Questi risultati clinici sono supportati anche da una serie di studi su animali. Nello studio di Poulsom et al., si dimostra la presenza di circa l'8% delle cellule tubulari epiteliali contenenti il cromosoma Y in reni di topi femmina, che avevano ricevuto un trapianto di midollo dopo irradiazione.

In altri modelli sperimentali, è stato riportato il transdifferenziamento delle cellule di midollo in cellule epiteliali del tubulo prossimale, in cellule mesangiali, endoteliali e interstiziali. Lange et al, hanno valutato l'effetto terapeutico di cellule staminali mesenchimali di midollo in un modello di insufficienza renale acuta (ARF) provocata da ischemia/riperfusionne indotta nel ratto. In questo studio sono state utilizzate cellule marcate con ferro-destrano, la cui localizzazione è stata rilevata mediante studi di risonanza magnetica. Le cellule hanno dimostrato di localizzarsi a livello renale, soprattutto nei glomeruli, e di migliorare la funzionalità renale. Questi effetti si manifestano già dopo 2 o 3 giorni dall'induzione dell'ARF; questo porta ad ipotizzare che il

transdifferenziamento delle cellule staminali in cellule renali, un processo che richiede più di tre giorni, non sia il meccanismo renoprotettivo primario. La somministrazione delle cellule mesenchimali in ratti con ARF è associata ad un recupero più rapido della funzione renale, probabilmente dovuto agli effetti paracrini delle cellule stesse.

La medicina rigenerativa renale si basa sullo sviluppo di nuove terapie basate su cellule staminali che possono offrire una valida alternativa per il recupero o il mantenimento della funzionalità renale. La progressione del danno renale può portare non solo ad una perdita cellulare, ma anche ad alterati meccanismi di riparo.

Sulla base dei risultati ottenuti in fase sperimentale riguardo alla capacità delle cellule staminali derivate da midollo osseo di riparare, almeno in parte, il rene danneggiato, diventa una valida prospettiva futura quella di utilizzare queste cellule per trapianti in pazienti con danno renale. In quest'ottica è molto importante identificare i fattori che controllano il differenziamento, l'homing e l'integrazione delle cellule nel tessuto renale. A tale scopo si stanno ricercando varie fonti di cellule staminali mesenchimali, alternative al midollo osseo, sulla base anche delle capacità immunomodulatorie delle cellule stesse.

1.5 Marker di nefrogenesi

Il rene permanente (metanefro) origina da reciproche interazioni tra due tessuti, il dotto ureterico e il mesenchima metanefrico. Ciascuno di questi tessuti deriva inizialmente dal mesoderma intermedio. Dopo invasione da parte del dotto ureterico, le cellule del mesenchima sono indotte a differenziare in specifiche tipologie renali. Il dogma centrale dello sviluppo renale suggerisce che il dotto ureterico formi l'uretere e il sistema dei dotti collettori del rene maturo, mentre il mesenchima metanefrico dia origine alle restanti porzioni del nefrone, dalla capsula di Bowmann al tubulo distale (Cullen et al., 2005).

Il mesenchima metanefrico non indotto è composto da cellule mesenchimali, che hanno dimostrato di essere l'unica popolazione, a livello embrionale, che può

essere indotta a generare nefrogenesi. Infatti evidenze sperimentali mostrano che le cellule del mesenchima metanefrico hanno la capacità di differenziare non solo in tutte le regioni epiteliali del nefrone, ma anche di essere incorporate nell'epitelio del dotto collettore derivato dal dotto ureterico (Bates et al., 2000).

Studi di microarray hanno permesso di identificare un set di geni che sono up-regolati nel mesenchima metanefrico non indotto rispetto al mesoderma intermedio, la cui espressione persiste durante lo sviluppo embrionale ma si riduce o viene ristretta ad alcune zone. Questi geni marker includono *Ewsh*, *14-3-3 θ*, *Scd2*, *RAR-α*, *CD24* e *Cadherin-11*. I marker intracellulari possono essere utili strumenti di identificazione di cellule staminali indotte verso un differenziamento renale, mentre i marker di superficie possono essere sfruttati per una eventuale identificazione, ad esempio tramite tecniche citofluorimetriche, di progenitori renali (Challen et al., 2004).

CD24 e *Cadherin-11* sono altamente espresse nel mesenchima metanefrico, ma la loro espressione cala durante lo sviluppo. *CD24* è presente in tutte le strutture epiteliali, mentre *Cadherin-11* è espressa dalle cellule mesenchimali dell'interstizio renale, ma non in quelle epiteliali. *CD24* potrebbe quindi identificare progenitori renali destinati a differenziare in segmenti epiteliali del nefrone, mentre *Cadherin-11* quelli destinati a formare l'interstizio renale primario. Esistono alcune evidenze indirette che suggeriscono che queste molecole possano marcare una popolazione di progenitori renali. *CD24* è fortemente espresso nei tumori di Wilms e in carcinomi renali, così come *Cadherin-11*. L'espressione di questi due marker nelle cellule tumorali può indicare che ci sia una reversione ad uno stato più primitivo o embrionale, una condizione analoga a quella delle cellule del mesenchima metanefrico non indotto.

Per quanto riguarda gli altri geni si è evidenziato che *14-3-3 θ* e *Scd2* sono ampiamente espressi nei segmenti epiteliali, *RAR-α* è espresso nell'interstizio renale, mentre *Ewsh* in quelle cellule che stanno subendo una trasformazione mesenchimo-epiteliale intorno alla punta del dotto ureterico.

Bisogna comunque tenere presente che l'espressione delle singole molecole non è ristretta al mesenchima metanefrico non indotto, per cui per identificare una popolazione di progenitori renali è necessario ricercare una combinazione di tutti questi marker.

1.5.1 Le proteine 14-3-3 (YWHAQ)

Le modifiche post-translazionali delle proteine sono essenziali per la loro regolazione, localizzazione e funzione. Uno dei più comuni tipi di modificazioni post-translazionali è la fosforilazione a livello di serina o treonina (Benzinger et al., 2005). La fosforilazione può influenzare una proteina influenzando il suo folding, la sua stabilità, le interazioni e le attività (Fig. 1.5). Un meccanismo comune per ottenere questi cambiamenti è l'interazione proteina-proteina (Coblitz et al., 2006).

Le proteine 14-3-3 appartengono ad una famiglia altamente conservata, in grado di legarsi ad una ampia varietà di proteine, circa 300, coinvolte in differenti vie di segnale, come chinasi, fosfatasi e recettori transmembrana. Questo fa sì che le proteine 14-3-3 giochino un ruolo importante in un vasto range di processi regolatori, così come segnali di trasduzione, segnali mitogeni, apoptosi, regolazione del ciclo cellulare e proliferazione cellulare interagendo con Raf, BAD, proteina chinasi C (PKC) e fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3K). (Malaspina et al, 2000).

Nell'uomo sono note 7 isoforme delle proteine 14-3-3, che formano dimeri che si legano ad altre proteine, in seguito alla loro fosforilazione a livello di residui di serina o treonina. L'associazione con YWHAQ regola la funzione dei ligandi attraverso il sequestro inter- o intra-compartmentale, l'attivazione o l'inattivazione dell'attività enzimatica e la promozione o inibizione delle interazioni con le proteine (Mackintosh 2004; Hermeking, 2004).

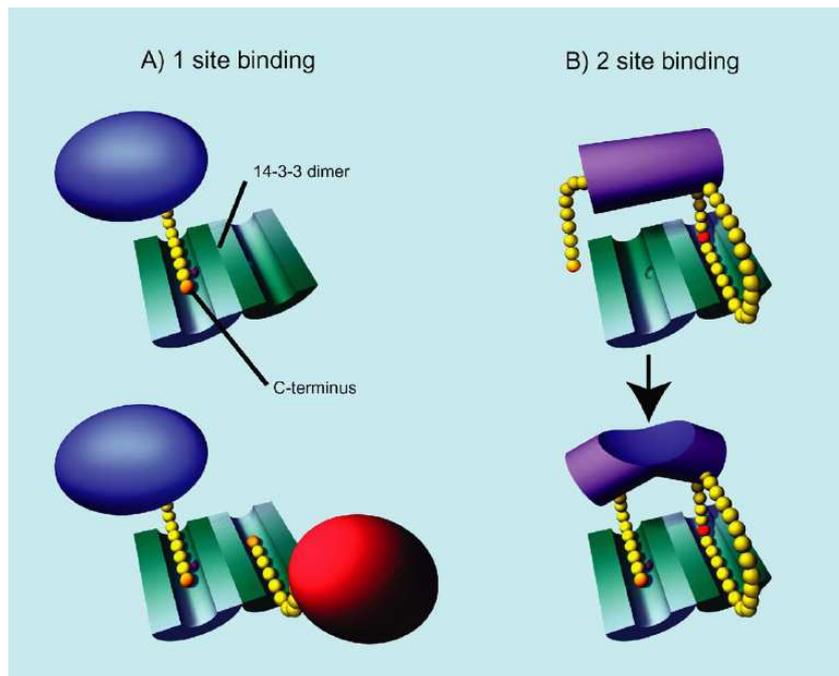


Fig.1.5: 14-3-3 può legare proteine che contengono uno o due siti target. (A) Il legame a proteine con un sito target può mascherare la proteina da altre interazioni (in alto) Più proteine con un singolo sito target possono essere co-localizzate dal legame con lo stesso dimero 14-3-3 (in basso). (B) Una proteina con due siti target può avere un legame cooperativo con 14-3-3. In questo caso le conseguenze funzionali possono includere un cambiamento conformazionale (attivazione o inattivazione) o mascherare altre interazioni.

Queste proteine risultano implicate anche nel mantenimento della funzionalità dei podociti renali.

Il glomerulo renale è il sito di un ampio numero di disordini che portano a proteinuria e a disfunzione renale cronica. Recenti studi sulla sindrome nefrosica ereditaria, caratterizzata da massiccia proteinuria e disfunzione renale cronica, hanno evidenziato il ruolo dei podociti glomerulari nel generare una barriera di filtrazione selettiva. Mutazioni nei geni che codificano per nefrina, podocina e proteina CD-2 associata, portano ad una severa sindrome nefrosica, suggerendo che queste proteine sono indispensabili per generare un filtro glomerulare intatto. Lipidi fosforilati, come PIP2 e PIP3, sono mediatori chiave in varie vie di segnale intracellulari che controllano la crescita, la migrazione cellulare, l'endocitosi e la sopravvivenza cellulare. La conversione di PIP2 a PIP3 a livello

della superficie interna della membrana plasmatica, è catalizzata dalla fosfoinositide 3-OH chinasi (PI3K). Le PI3K di classe I sono eterodimeri con una subunità catalitica ed una regolatoria. Uno dei maggiori mediatori dell'attività della PI3K è la serina-treonina chinasi AKT (Huber et al., 2003). Il legame dei fosfolipidi, generati dalla PI3K, alla AKT, porta alla traslocazione della AKT stessa alla superficie interna della membrana plasmatica e induce cambiamenti conformazionali che sono richiesti per la corretta fosforilazione ed attivazione di AKT. La rilocalizzazione della AKT a livello della membrana cellulare, infatti, porta a stretto contatto l'AKT con le chinasi regolatorie che la fosforilano, attivandola. Tra i numerosi effetti ad essa correlati, AKT è richiesta per la sopravvivenza cellulare dipendente dai fattori di crescita e blocca l'apoptosi indotta da stimoli tossici. L'attivazione della canonica cascata delle chinasi, come quella di PI3K/AKT, rappresenta un componente essenziale per mantenere l'integrità funzionale dei podociti *in vivo*.

Dopo fosforilazione, numerosi target della AKT si legano a proteine della famiglia 14-3-3, portando ad una loro redistribuzione cellulare o inattivazione. La regolazione delle 14-3-3 è mediata da interazioni proteina-proteina fosforilazione dipendenti, quindi il legame fosforilazione dipendente delle 14-3-3 alle proteine target è un evento critico nei programmi cellulari mediati da AKT. La fosforilazione AKT dipendente regola anche la proteina Bad, una proteina proapoptotica, determinandone l'associazione con 14-3-3. Tale legame promuove la sopravvivenza cellulare (Huber et al., 2003).

Il gene che codifica per le proteine 14-3-3 è fortemente espresso nel mesenchima ai primi stadi di sviluppo, ma il livello di espressione decresce durante il suo differenziamento. Questo cambiamento è particolarmente evidente nelle condensazioni mesenchimali che diventeranno cartilagine, osso, muscolo e rene. In quest'ultimo caso il gene è fortemente espresso nelle cellule staminali renali e nel mesenchima, ma decresce nei primi stadi di formazione dei condensati nefrogenici epitelizzati. Questo indica un ruolo della famiglia 14-3-3 nei primi stadi dello sviluppo del mesenchima, ma durante il differenziamento tissutale la sua funzione viene persa o rimpiazzata da altre proteine. In particolare

l'isoforma ϵ è espressa durante lo sviluppo renale di topo, e la sua espressione rimane elevata nel mesenchima indifferenziato, giocando quindi un ruolo dello sviluppo mesenchimale. I membri della famiglia 14-3-3 hanno mostrato di essere coinvolti in un ampio range di funzioni, che includono anche la regolazione della PKC, la formazione di parte di un complesso di legame al DNA e il legame alle proteine Raf, indicando un loro importante ruolo nella trasduzione del segnale. Si suppone che la loro azione a livello della modulazione del differenziamento mesenchimale sia dovuta alla loro capacità di indurre cambiamenti conformazionali nelle proteine a valle della cascata del segnale. E' quindi possibile che le proteine 14-3-3, e in particolare l'isoforma ϵ , si leghino a proteine in uno stato fosforilato e lo stato conformazionale così indotto mantenga attiva o inibita una particolare via di traduzione (McConnell et al, 1995).

1.5.1.2 Regolazione del signaling intracellulare da parte di 14-3-3

1.5.1.2.1 Trasduzione del segnale mediato da Raf-1

Raf-1 è una serina/treonina chinasi che gioca un ruolo chiave nella trasduzione del segnale indotto da fattori di crescita attivando geni che codificano per fattori di trascrizione coinvolti nella divisione cellulare.

14-3-3 mantiene Raf-1 in uno stato inattivo in assenza di segnali di attivazione e stabilizza la sua conformazione nel momento in cui riceve tali segnali (Fig. 1.6). La differente attività sarebbe dovuta al fatto che 14-3-3 lega diversi domini di Raf nelle cellule quiescenti e in quelle che hanno subito uno stimolo mitogeno (Fu et al., 2000).

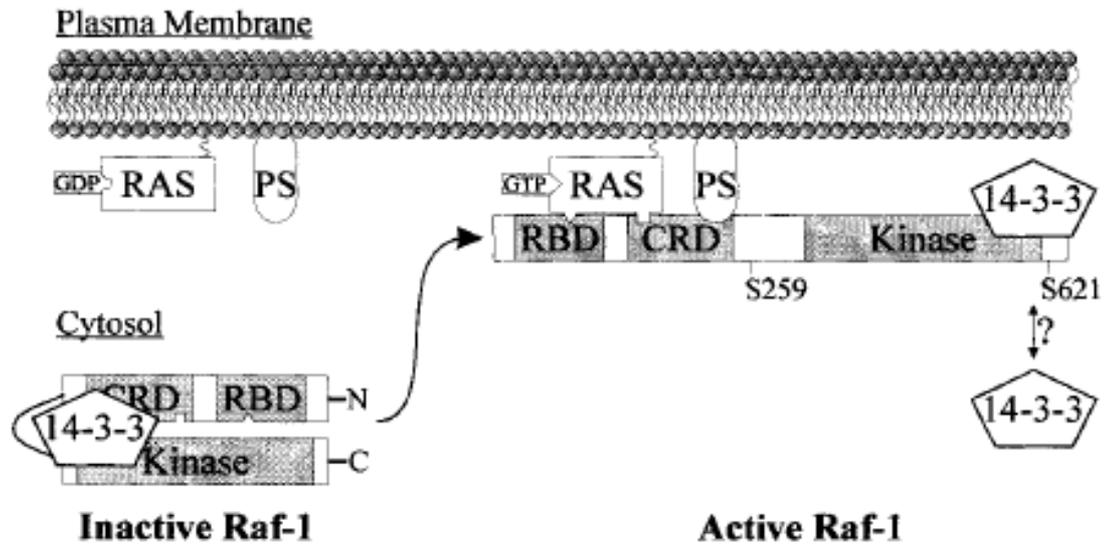


Fig. 1.6: Nelle cellule quiescenti 14-3-3 può mantenere Raf-1 in uno stato inattivo legandosi ad uno specifico dominio della proteina. In seguito ad uno stimolo mitogeno GTP-Ras si lega ad un differente motivo di Raf determinando la sua traslocazione alla membrana e la sua conseguente attivazione.

1.5.1.2.2 Bad e vie di apoptosi

14-3-3 risulta coinvolto anche nell'apoptosi tramite l'interazione con Bad, un membro propaoptotico della famiglia di Bcl-2, con cui si lega in maniera fosfoserina-dipendente. Il legame di 14-3-3 antagonizza l'attività propaoptotica di Bad, in quanto il complesso che si forma dall'interazione di queste due proteine a livello citosolico, lo rende inattivo (Fig. 1.7).

Almeno 4 chinasi sono in grado di fosforilare Bad in vitro, tra cui Proteina chinasi A (PKA), Akt/protein kinase B, PKC, e Raf-1. L'attivazione di AKT porta alla fosforilazione di Bad, all'associazione di quest'ultima con 14-3-3 e quindi all'inibizione della sua attività propaoptotica.

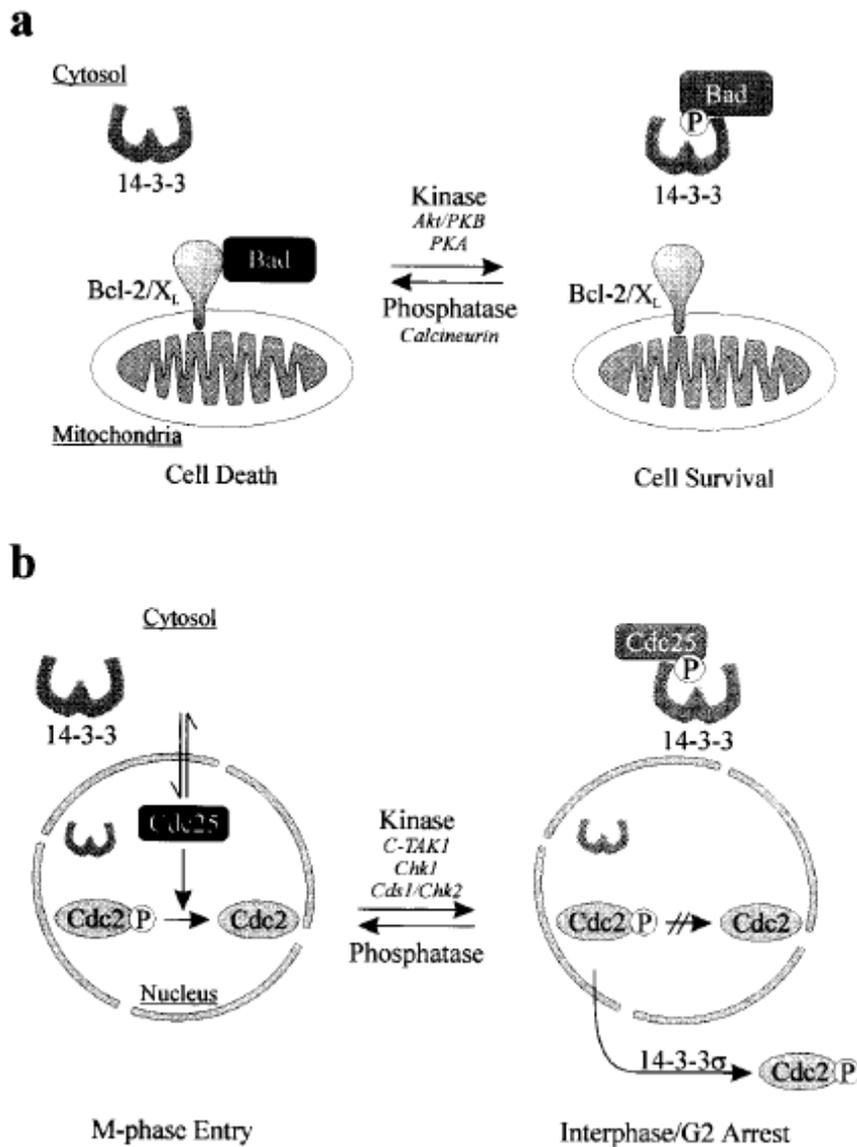


Fig. 1.7: (a) 14-3-3 sequestra Bad dal complesso mitocondriale Bcl-XL/Bcl-2. Nello stato basale Bad lega Bcl-XL/Bcl-2, favorendo l'apoptosi. In seguito a stimoli di sopravvivenza vengono attivate chinasi come AKT che fosforilano Bad. In questa forma Bad si lega a 14-3-3 e diventa inattivo. (b) Durante l'interfase o in seguito a danno del DNA Cdc25 viene fosforilata e si lega a 14-3-3 che la mantiene nel citosol.

Ma Bad non è l'unica molecola antiapoptotica con cui interagisce 14-3-3, per cui si suppone che questa proteina agisca come un fattore generale di sopravvivenza attraverso la sua capacità inibitoria dell'apoptosi (Fu et al., 2000).

1.5.1.2.3 Cdc25 e controllo del ciclo cellulare

14-3-3 risulta coinvolta anche nella regolazione del ciclo cellulare, attraverso la sua interazione con Cdc25. Quest'ultimo è il maggior regolatore del ciclo cellulare, defosforilando e quindi attivando la proteina chinasi Cdc2, e determinando l'ingresso della cellula in mitosi.

L'inibizione della defosforilazione di Cdc2 è fondamentale per bloccare la mitosi in risposta a danneggiamento del DNA. La fosforilazione di Cdc25 porta alla sua associazione con 14-3-3, per cui questa proteina potrebbe essere richiesta per mantenere Cdc25 in uno stato inattivo.

L'azione di Cdc25 richiede il suo ingresso nel nucleo, per cui è possibile che il legame a 14-3-3 regoli il trasporto citoplasma-nucleo, bloccando il complesso a livello citoplasmatico. 14-3-3 interagisce anche con altre proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, suggerendo che questa proteina sia coinvolta anche in questo meccanismo (Fu et al, 2000).

1.5.2 Cadherin-11

La morfogenesi tissutale nell'embrione implica riarrangiamenti dinamici cellulari, in cui gioca un importante ruolo regolatore l'adesione cellulare mediata da caderine. Queste proteine sono molecole di adesione calcio-dipendenti e si suppone che siano responsabili dell'indirizzamento di cellule tessuto-specifiche nei vari organi (Kii et al., 2004). Sono stati identificati 9 differenti sottotipi di caderine, che comprendono la caderina-11, N, P, E-/L-CAM, R, B e 7. L'interazione tra le caderine è primariamente omotipica, cioè cellule che presentano lo stesso tipo di caderina aderiscono l'una all'altra (Goemer et al., 1998).

Il livello di espressione delle caderine influenza la forza di adesione, e il tipo di caderina espresso determina la specificità delle interazioni cellulari e le proprietà delle interazioni.

Per quanto riguarda la regolazione di queste proteine sono stati proposti vari meccanismi:

(a) Durante alcuni processi morfogenetici, ad esempio, la forza dell'adesione cellulare viene rapidamente modulata in risposta a fattori di crescita o ad altri segnali senza concomitanti cambiamenti nella presenza di complessi di adesione, o di giunzioni cellulari (Fig. 1.8a).

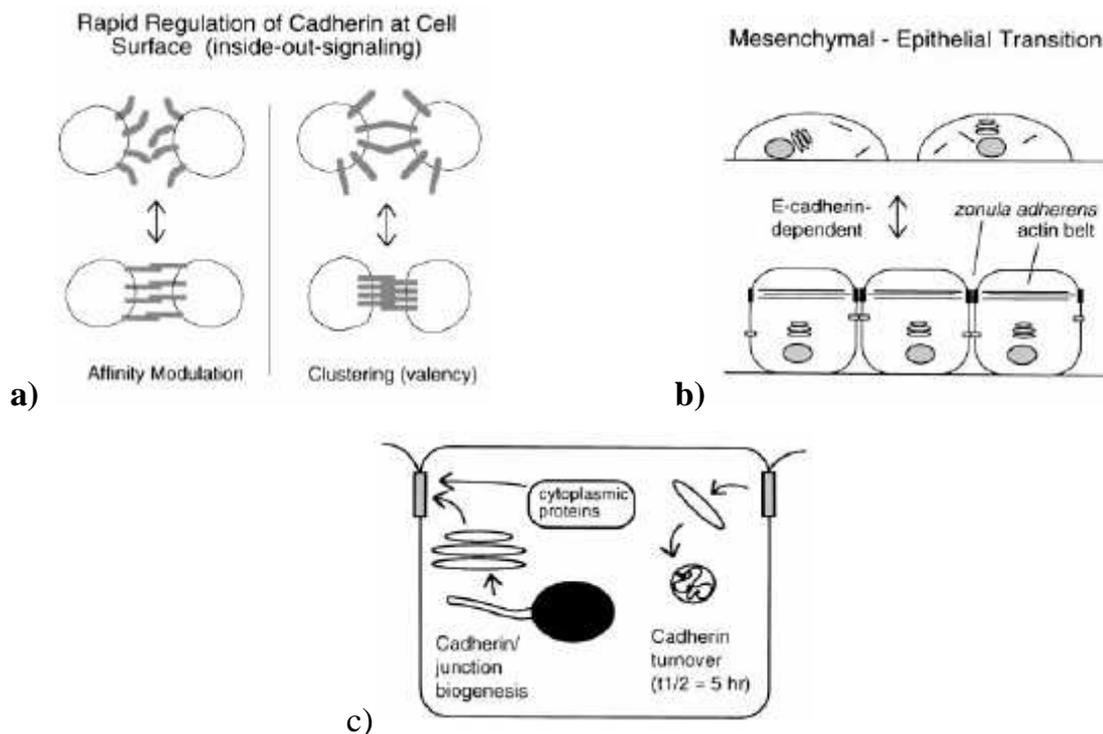


Fig. 1.8: Tipi di adesione mediate dalle caderine: a) Regolazione rapida delle molecole di adesione di superficie; b) Formazione delle giunzioni aderenti associate a maggiori cambiamenti nello stato della cellula, come transizioni epiteliali-mesenchimali; c) Controllo della biogenesi o turn-over delle giunzioni cellulari.

(b) D'altro canto, sembrano avvenire importanti cambiamenti nell'assemblaggio o disassemblaggio delle giunzioni aderenti, di solito in associazione con grossi cambiamenti nello stato cellulare o nel differenziamento, come le transizioni epitelio-mesenchimali o mesenchima-epiteliali (Gumbiner, 2000). (Fig. 1.8b)

(c) Il normale assemblaggio e disassemblaggio delle giunzioni formate da caderine in cellule in stato stazionario, e quindi la loro formazione a partire da elementi neo-formati, sembra essere sotto un controllo regolatorio (Fig. 1.8c).

1.5.2.1 Meccanismi di regolazione delle caderine

Le caderine formano forti complessi con le catenine, che si ritiene le mettano in contatto con l'actina del citoscheletro. Cambiamenti nella composizione del complesso caderina-catenina, la fosforilazione dei suoi componenti e alterazioni nell'interazione del complesso con l'actina del citoscheletro possono giocare un ruolo importante nell'adesione.

Cambiamenti nella composizione del complesso, come ad esempio aumentati livelli di beta catenina, promuovono la formazione del complesso a livello della membrana plasmatica ed aumentano l'adesione mediata da caderina in alcune linee cellulari.

La fosforilazione della tirosina del complesso caderina-catenina porta all'inibizione dell'adesione caderina-mediata. La regolazione dell'adesione viene mediata anche da proteine che si legano al complesso a livello intracitoplasmatico, come le piccole GTPasi, che possono portare all'inibizione o alla formazione di una maggior quantità di complesso a seconda della tipologia di proteina coinvolta. Il loro ruolo nella regolazione dell'adesione caderina-mediata non è ancora completamente chiaro, ma si pensa che abbiano un ruolo nell'assemblaggio e disassemblaggio delle giunzioni aderenti.

1.5.2.2 Caderine e rene

Lo sviluppo dell'epitelio renale a partire dal mesenchima metanefrico richiede interazioni induttive, proliferazione cellulare e rimodellamento tissutale. L'epitelio renale deriva per la maggior parte dal mesenchima metanefrico, un gruppo di cellule morfologicamente distinte dalle circostanti, posizionate all'estremità posteriore del mesoderma intermedio. Dopo induzione da parte del dotto ureterico, le cellule mesenchimali metanefriche si aggregano e si polarizzano a formare una vescicola epiteliale primitiva, proliferante, che genererà l'epitelio tubulare glomerulare, prossimale e tubulare distale.

Lo sviluppo del nefrone a partire dalle due tipologie cellulari primarie, l'epitelio del dotto ureterico e il mesenchima metanefrico, richiede una conversione fenotipica delle cellule mesenchimali verso un fenotipo epiteliale e una complessa serie di eventi morfogenetici che modellano l'epitelio lungo l'asse prossimale-distale.

Le attività del rene richiedono una struttura tridimensionale del nefrone, che è strettamente collegata alla sua funzione. Durante lo sviluppo questa architettura viene ottenuta non soltanto grazie all'azione di una serie di fattori di trascrizione, ma anche di proteine strutturali, che mediano, almeno in parte, la migrazione cellulare, l'adesione e la specificità della polarizzazione. Tra queste molecole, un ruolo importante è svolto dalle caderine, che risultano implicate nello sviluppo e nella migrazione cellulare. Il pattern di espressione delle molecole di adesione può influenzare lo sviluppo dell'epitelio renale in regioni morfologicamente e funzionalmente distinte, nel momento in cui il mesenchima si aggrega, forma la vescicola renale, e durante l'embriogenesi.

La caderina 11 è espressa nelle cellule mesenchimali dell'embrione, ma non nelle strutture epiteliali, anche se derivate da cellule mesenchimali che precedentemente esprimevano la proteina. L'espressione della caderina 11, che risulta molto alta nel mesenchima in via di sviluppo, infatti diminuisce quando le cellule cominciano a polarizzarsi e a formare l'epitelio indifferenziato della vescicola renale. Ciò nonostante, durante la risposta precoce all'induzione, la caderina 11 può essere ancora funzionalmente attiva, forse grazie all'attivazione controllata di altri fattori che interagiscono con il dominio intracellulare, come la famiglia delle catenine, fornendo così una rapida risposta ai segnali induttivi. (Cho EA et al, 1998).

Le cellule del mesenchima metanefrico non indotto possono essere morfologicamente distinte da quelle circostanti poiché sono più strettamente associate. Non è ancora stato stabilito se questo sia dovuto agli alti livelli della caderina 11.

1.5.3 EWSH

Il gene EWSH (o EWS) è stato per la prima volta identificato nel Sarcoma di Ewing, in cui è presente in una forma fusa con il fattore di trascrizione Fli-1 (Kim et al., 1999). La sua funzione nelle normali funzioni cellulari e il meccanismo per cui le proteine di fusione portano alla formazione di tumori non è ancora completamente nota, ma la sua espressione risulta aumentata nel mesenchima metanefrico non indotto (Challen et al., 2004).

La proteina EWSH possiede un dominio di attivazione trascrizionale, una regione omologa ad una subunità della RNA polimerasi II e un motivo di riconoscimento dell'RNA presente in numerose proteine leganti l'RNA o il DNA a singolo filamento. Possiede inoltre un dominio IQ che viene fosforilato dalla proteina chinasi C (PKC) ed interagisce con la calmodulina (CaM). Tale dominio agisce come dominio regolatorio nelle proteine coinvolte nel legame alla CaM e nella fosforilazione da parte della PKC. La fosforilazione di EWS da parte della PKC ne inibisce il legame con l'RNA, e viceversa il legame con l'RNA ne impedisce la fosforilazione da parte della PKC (Fig 1.9).

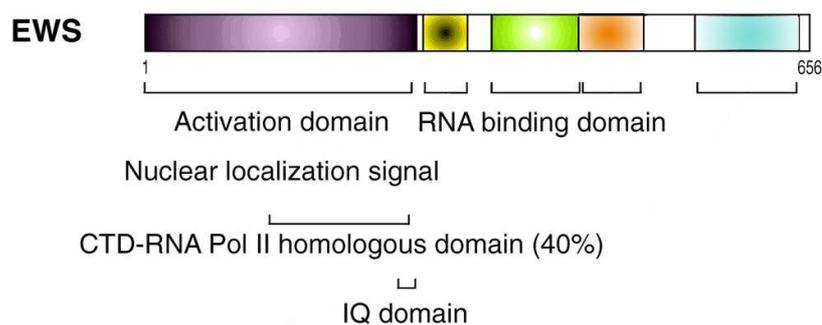


Fig. 1.9: Organizzazione schematica della struttura della proteina EWS.

Sulla base delle sue caratteristiche strutturali, si suppone che EWSH partecipi alla trascrizione dell'RNA e alla sintesi dell'mRNA. Inoltre è stata evidenziata la

sua interazione con il fattore di trascrizione basale TFIID, con alcune subunità della RNA polimerasi II e con alcuni fattori di splicing. Questo porta ad ipotizzare che EWS agisca come molecola adattatrice di legame tra la trascrizione genica e il processamento dell'mRNA, interagendo con L'RNA polimerasi II e i fattori di splicing (Araya et al., 2002).

Nello stesso studio risulta anche un'interazione di EWSH con il co-attivatore trascrizionale CBP e l'RNA Polimerasi II ipofosforilata. CBP potenzia l'attività di numerose proteine leganti il DNA che agiscono come attivatori trascrizionali, inclusi recettori nucleari e attivatori segnale-dipendenti, attraverso la sua attività di istone acetil-transferasi e il reclutamento del complesso di trascrizione basale dipendente dall'RNA polimerasi II o altri cofattori, ai promotori di geni target. Di conseguenza queste interazioni suggeriscono il potenziale coinvolgimento del gene EWSH nell'attivazione della trascrizione genica. Tuttavia il fatto che EWSH non abbia un sito di riconoscimento del DNA o attività di legame a promotori di geni specifici porta a supporre che EWSH possa agire come co-attivatore di fattori di trascrizione leganti il DNA, CBP dipendenti.

EWSH risulta espresso in grasso, rene, cuore e cervello, per cui si suppone che sia coinvolto in vari eventi biologici interagendo con altri recettori nucleari o fattori di trascrizione CBP dipendenti.

1.5.4 RAR

I retinoidi, metaboliti biologicamente attivi della vitamina A, svolgono un ruolo molto importante nella nefrogenesi, così come i loro recettori (Mendelsohn et al., 1999). Carenza di questa vitamina provoca severe malformazioni renali, come l'ipoplasia renale, o nei casi più gravi l'agenesi renale, in cui manca il dotto ureterico (Liebler et al., 2004). Anche *in vitro* i retinoidi hanno dimostrato di modulare la morfogenesi renale, infatti studi su reni di ratto in coltura hanno dimostrato l'abilità di queste molecole di stimolare la gemmazione del dotto ureterico e la formazione dei nefroni, e di determinare un aumento

nell'espressione di *c-ret*, un recettore tirosino-chinasico richiesto per la crescita e la gemmazione del dotto ureterico.

All'interno delle cellule sono presenti proteine in grado di legare i retinoidi (CRABP) e di determinarne il destino direzionandoli verso le rispettive vie metaboliche. Il segnale viene trasmesso da fattori di trascrizione appartenenti alle famiglie del recettore dell'acido retinoico (RAR) e del recettore retinoide X (RXR). Gli eterodimeri RAR/RXR possono agire direttamente legandosi ad elementi enhancer localizzati nella regione regolatoria dei geni responsivi ai retinoidi, attivandone la trascrizione, o indirettamente modulando altri fattori di trascrizione (Fig. 1.10).

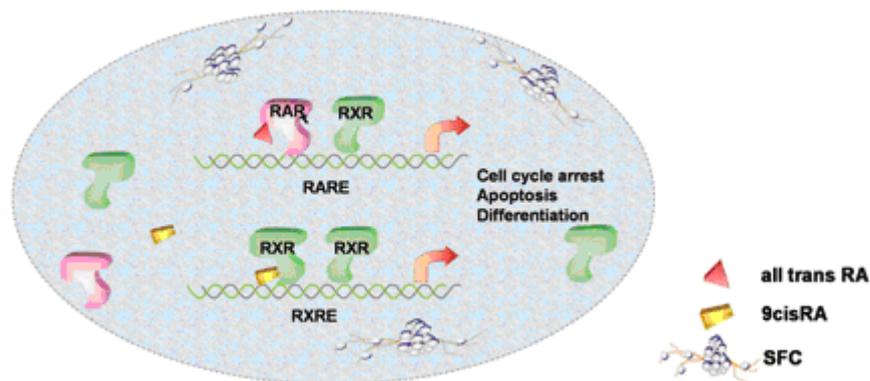


Fig 1.10: Gli omodimeri RXR/RXR o gli eterodimeri RAR/RXR si legano rispettivamente agli elementi enhancer RARE e RXRE attivando diverse vie metaboliche.

Questi recettori svolgono un ruolo fondamentale durante lo sviluppo renale, infatti reni di topi mutanti $RAR\alpha\beta2^-$, in cui mancano $RAR\alpha1$, $RAR\alpha2$ e $RAR\beta2$, sono piccoli alla nascita e contengono un numero ridotto di nefroni e di gemmazioni del dotto ureterico. In più i mutanti mancano della zona nefrogenica, la regione corticale esterna dove vengono aggiunti continuamente nuovi nefroni durante la prima settimana di vita.

In reni embrionali sani, RAR α e RAR β 2 sono coespressi nelle cellule stromali, ma non in altre tipologie di cellule renali, suggerendo che questa tipologia cellulare medi le funzioni dipendenti da retinoidi durante lo sviluppo renale. Nei mutanti RAR $\alpha\beta$ 2- a stadi embrionali precoci il differenziamento e la morfologia dei nefroni appare normale, ma la crescita e la gemmazione del dotto ureterico risulta alterata. Allo stesso tempo si osserva una down-regolazione dell'espressione di c-ret, che potrebbe essere la causa delle malformazioni. La somministrazione di retinoidi evita questo processo mantenendo normali i livelli di c-ret e suggerisce che i segnali indotti dai retinoidi siano normalmente richiesti per mantenere la sua espressione. La produzione di molecole importanti per il mantenimento dell'espressione di c-ret da parte delle cellule stromali può agire direttamente sul dotto ureterico, oppure sul mesenchima metanefrico che a sua volta agisce sul dotto ureterico, regolando l'espressione di c-ret. I retinoidi risultano quindi mediatori di vie di segnale delle cellule stromali richieste nello sviluppo renale (Mendhelson et al., 1999).

Negli embrioni RAR $\alpha\beta$ 2- lo stroma corticale situato alla periferia del rene embrionale, è caratterizzato da una perdita della popolazione stromale normalmente intercalata tra i nefroni, in più, come già detto, si ha un calo dell'espressione di c-ret. Questo porta a dedurre che sia necessaria un'azione combinata di RAR α e RAR β 2 per indurre il mesenchima stromale a produrre i segnali che regolano l'espressione di ret nell'epitelio del dotto ureterico. I retinoidi, ed in particolare l'acido retinoico, inducono l'espressione di ret nell'estremità del dotto ureterico vicina allo stroma corticale, ma non ectopicamente nel tronco del dotto ureterico, suggerendo che l'espressione di ret sia controllata da segnali retinoidi-dipendenti prodotti dallo stroma corticale, piuttosto che da un'azione diretta dell'acido retinoico stesso.

Il modello standard di sviluppo renale implica reciproche interazioni tra l'epitelio del dotto ureterico e il mesenchima metanefrico. Recenti studi suggeriscono la presenza di un secondo loop reciproco che controlla la morfogenesi della gemmazione ureterica e il patterning stromale mediato dall'acido retinoico e da ret (Fig. 1.11). In questo modello l'acido retinoico

induce l'espressione di un segnale (gene X) secreto dalle cellule stromali, che induce l'espressione di ret nel dotto ureterico (Fig. 1.11, riquadro di sinistra).

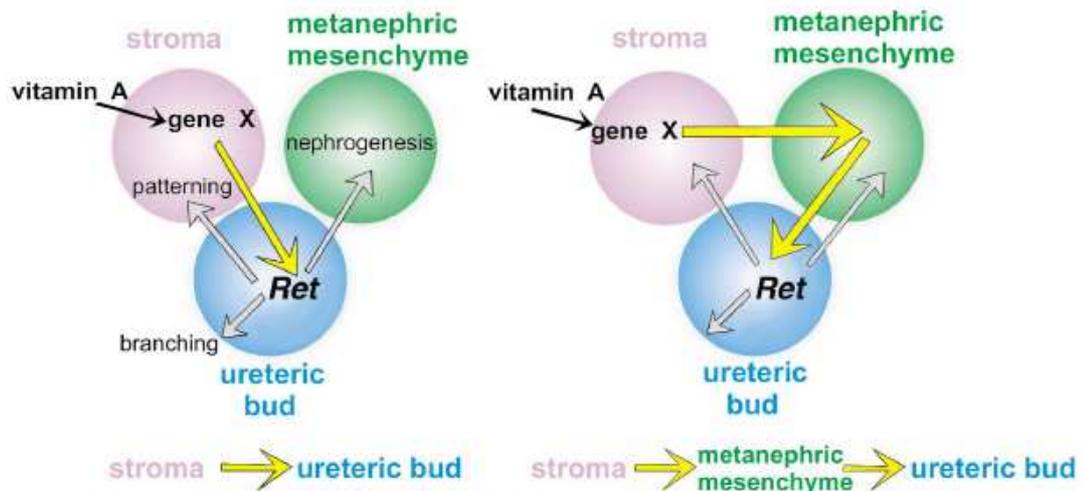


Fig. 1.11: L'acido retinoico e ret controllano un nuovo reciproco loop tra il mesenchima stromale e l'epitelio del dotto ureterico (immagine di sinistra). Il segnale indotto dall'acido retinoico induce l'espressione di un gene X, il cui prodotto è secreto dalle cellule stromali e agisce sulle cellule dell'epitelio del dotto ureterico inducendo l'espressione di ret (freccia gialla). Nella reciproca direzione, il segnale di Ret è richiesto per generare segnali secreti dal dotto ureterico importanti per patterning il mesenchima stromale, il differenziamento dei nefroni e la gemmazione del dotto ureterico (freccie grigie). Nel modello alternativo mostrato a destra, il mesenchima metanefrico funziona da intermediario. Il signaling dell'acido retinoico induce il gene X nelle cellule stromali; questo agisce prima sulle cellule del mesenchima metanefrico, e poi quest'ultimo genera segnali che inducono ret nelle cellule del dotto ureterico (freccia gialla).

Nel dotto ureterico la funzione di Ret è richiesta per la morfogenesi della gemmazione e per generare segnali che controllano il pattern delle cellule stromali. Visto che precedenti studi indicavano che in ratti $RAR\alpha\beta2^-$ il differenziamento dei nefroni era normale, è possibile che l'acido retinoico controlli l'espressione di Ret nel dotto ureterico tramite una via di segnale del mesenchima metanefrico sconosciuta (Fig. 1.11 riquadro di destra) (Batourina et al., 2001).

1.5.5 CD24

CD24 è una proteina altamente glicosilata, che è legata alla membrana plasmatica attraverso un'ancora di glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI). È espressa da vari tipi di cellule ematopoietiche ed epiteliali. Il grado di glicosilazione è variabile e dipende dalla tipologia cellulare. Nelle cellule B è espressa durante lo sviluppo, ma viene persa allo stadio di plasmacellule. Nell'epitelio umano mammario è specifico per le cellule epiteliali mammarie luminali, dove è espressa sulla membrana apicale plasmatica. La sua funzione non è ancora ben caratterizzata nell'uomo, ma primi studi evidenziano che sia una molecola co-stimolatoria per le cellule T CD4+ e che svolga un ruolo nello sviluppo linfocitario e nell'apoptosi delle cellule B essendo implicata nella trasduzione del segnale: nel topo il cross-linking di CD24 può portare ad apoptosi, ma anche aumentare i livelli intracellulari di calcio nei linfociti B maturi. Il solo ligando noto per CD24 è la P-selectina.

Nell'embrione in via di sviluppo, l'ibridizzazione in situ mostra che il trascritto di CD24 si trova nell'ectoderma primitivo, nel mesoderma e nell'endoderma.

Questa proteina è stata riscontrata nel cervello in via di sviluppo, ma anche nell'epitelio di altri tessuti non neuronali come in quello della mucosa intestinale, nasale, nell'epitelio duttale della ghiandola salivare, in quello bronchiale e tubulare renale. È stata dimostrata la sua presenza nelle cellule epiteliali del rene fetale, in particolare a livello glomerulare e tubulare, ma la sua espressione cala gradualmente con la maturazione del nefrone (Platt JL et al., 1983). Nello sviluppo dei denti, dove è necessaria una interazione mesenchimale-epiteliale perché si formi un corretto epitelio, l'mRNA di CD24 è specificamente indotto nelle cellule mesenchimali differenzianti in odontoblasti nella papilla dentaria, suggerendo un ruolo pilota di CD24 nel differenziamento cellulare in vivo.

Viene considerato un marker di staminalità, usato per la ricerca di cellule staminali a livello renale (Taguchi et al., 1998). È stato dimostrato infatti che un subset di cellule parietali epiteliali CD24+ CD133+, prelevate dalla capsula di

Bowman, mostrano un potenziale di autorinnovamento ed un'alta efficienza di clonazione. Le stesse cellule, iniettate in topi SCID in cui era stato indotto un danno renale acuto, determinano una rigenerazione delle strutture tubulari di differenti porzioni del nefrone, migliorando significativamente la funzionalità renale (Sagrinati et al., 2006).

1.5.6 Stearoyl-CoA Desaturase (SCD)

La Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) è una proteina integrale di membrana del reticolo endoplasmatico che catalizza uno step nella biosintesi degli acidi grassi monoinsaturi a partire dagli acidi grassi saturi. Il bilancio tra i due influisce sulle proprietà fisiche delle membrane. La regolazione degli acidi grassi insaturi è importante perché giocano un ruolo nell'attività cellulare, nel metabolismo e negli eventi che controllano la trascrizione genica, nel differenziamento e nella crescita cellulare. La reazione catalizzata dalla SCD è di tipo ossidativo e avviene in presenza di NADPH-Citocromo b5 reductasi e citocromo b5. La sua funzione è quella di trasformare il palmitoil- e lo stearoyl-CoA in palmitoleoyl- e oleoyl-CoA. L'acido palmitoleico e oleico sono i maggiori costituenti dei fosfolipidi di membrana. La percentuale tra acido stearico e oleico è uno dei fattori maggiormente influenzanti la fluidità di membrana; alterazioni di questa percentuale portano a malattie come diabete, cancro, obesità, ipertensione e a disturbi neurologici, vascolari e cardiaci (Ntambi et al., 1995).

Questo enzima aumenta drammaticamente nel differenziamento adipocitario. L'aggiunta di acido retinoico in vitro, in concomitanza con agenti differenzianti, inibisce il differenziamento adipocitario e reprime la trascrizione del gene per SCD.

1.6 Vasculogenesi

1.6.1 Vasculogenesi e angiogenesi

Nell'uomo e negli organismi superiori il sistema circolatorio e linfatico vengono originati tramite due distinti processi: la vasculogenesi, cioè la formazione ex-novo di un vaso, e l'angiogenesi, cioè la formazione di un nuovo vaso a partire dalla biforcazione di un capillare preesistente.

La vasculogenesi avviene durante i primi stadi di sviluppo embrionale: attraverso vari passaggi, cellule del mesoderma splancnico embrionale differenziano in cellule endoteliali che formano, di pari passo con gli organi che si stanno sviluppando, delle piccole reti capillari primitive; in seguito, il processo angiogenetico rimodella e completa questi abbozzi di tubuli primitivi e si forma in questo modo la vascolatura completa (Gilbert S.F., 2000, cap.15). Nell'organismo completamente formato l'angiogenesi è l'unico processo che può supplire a necessità riparative del sistema cardiocircolatorio, come per esempio la ricapillarizzazione del tessuto endometriale durante il ciclo mestruale nella donna.

I due processi sono regolati dal fine bilanciamento di fattori stimolatori e inibitori; eventuali alterazioni di questo equilibrio nell'embrione possono comprometterne lo sviluppo e la nascita. Nell'adulto lo squilibrio del meccanismo di angiogenesi è la porta d'accesso delle metastasi a tutto l'organismo.

Per quanto riguarda la terapia cellulare in pazienti con danni al tessuto renale, è importante non solo tentare di riparare il tessuto danneggiato con cellule compatibili all'integrazione nel rene danneggiato, ma anche quello endoteliale, in modo da garantire fattori nutrienti, ossigeno, rimozione dei metaboliti di scarto e prevenire così danni da stress ischemico. In questo contesto entrano in gioco la vasculogenesi e l'angiogenesi. E' probabile infatti che proprio la capacità di potenziamento del processo neo-angiogenetico delle hMSC giochi un ruolo

importante nell'effetto terapeutico che le cellule impiantate mostrano avere sull'uomo (Kinnaird et al. 2004)

1.6.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Il VEGF è uno dei fattori più importanti tra quelli che regolano la formazione dei vasi nell'embrione e l'omeostasi degli stessi nell'adulto; infatti interagisce con cellule emopoietiche, endoteliali e con i loro precursori. (Cèbe-Suarez S. et al., 2006).

Con il termine VEGF si intende una famiglia di fattori di crescita composta da omodimeri di glicoproteine collegate da un ponte disolfuro. Nei mammiferi sono state identificate cinque forme: VEGF-A,-B,-C,-D e PlGF. Ognuna di queste forme è soggetta a splicing alternativo e può dar luogo a isoforme con proprietà di segnalazione differente. Nei mammiferi VEGF-A, -B e PlGF sono importanti per la formazione di vasi sanguigni, mentre VEGF-C e -D per la formazione di vasi linfatici.

VEGF è espresso in risposta ad ipossia ed a fattori di crescita e differenziativi da parte di molti tipi cellulari, in particolar modo da cellule emopoietiche, stromali ed endoteliali. Il più studiato e il più importante per quel che riguarda lo sviluppo vascolare è il VEGF-A; studi condotti su topi knockout per questo gene hanno messo in evidenza che gli animali non sopravvivono a causa di problemi nella formazione dei vasi sanguigni (Carmeliet P. et al., 1996). Agisce anche come agente vasculogenetico, determinando il differenziamento di cellule staminali mesenchimali umane in cellule con caratteristiche fenotipiche e funzionali paragonabili a quelle endoteliali (Oswald et al., 2004).

Il VEGF-A, oltre a indurre la proliferazione dell'endotelio, svolge altre funzioni importanti: promuove la migrazione cellulare, inibisce l'apoptosi e induce la permeabilizzazione dei vasi. Essendo implicato in diversi processi la sua produzione è indotta mediante risposta a molteplici stimoli: fattori di crescita, citochine, gonadotropine, ossido nitrico, ipossia, ipoglicemia e mutazioni oncogeniche.

Oltre ad avere un ruolo chiave nella formazione di vasi, il VEGF è un fattore importante anche nello sviluppo e nell'omeostasi di molti organi quali l'apparato respiratorio, scheletrico, il sistema emopoietico, renale, nervoso e riproduttivo (Tjwa M. et al., 2003).

1.6.3 VEGFR: i recettori del VEGF

Il VEGF si lega a tre recettori tirosina chinasi (RTK, *receptor tyrosine kinases*) legati alla famiglia dei recettori di Fms, Kit e PDGF (fattore di crescita delle piastrine):

- VEGFR1 o Flt-1 (*Fms-like tyrosine kinase-1*);
- VEGFR2 o KDR (*kinase insert domain receptor*). In molti lavori è anche indicato come KDR/Flk-1, dove Flk-1 è il corrispondente murino del KDR umano e ha un'omologia pari all'85% di quest'ultimo (Matthews W. et al., 1991);
- VEGFR3 o Flt-4 (*Fms-like tyrosine kinase-4*).

Sono composti da un dominio extracellulare che contiene sette (sei nel caso di Flt-4) strutture immunoglobulino-simili (*Ig-like domains*), un dominio transmembrana, un dominio regolatorio, prossimo al lato interno della membrana plasmatica, e un dominio tirosin-chinasico intracellulare, interrotto da un corto peptide (*kinase insert domain*), seguito da una sequenza che contiene diversi residui di tirosina che fungono da aggancio ai messaggeri intracellulari.

Nei tre recettori i domini immunoglobulino-simili extracellulari sono molto importanti per il loro funzionamento. Il primo, Ig 1, regola il legame col ligando, Ig 2 e 3 sono i domini di legame del VEGF ad alta affinità e Ig 4 è coinvolto nella dimerizzazione del recettore (Shinkai A. et al., 1998).

Le modalità di azione di questi recettori sono quelle tipiche dei recettori tirosina chinasi: il VEGF, che è una proteina dimerica, si lega al recettore che a sua volta dimerizza formando omodimeri od eterodimeri (Flt-1/KDR e KDR/Flt-4) in seguito ad un cambiamento conformazionale del quarto dominio

immunoglobulinico. Si innesca così una cascata di modificazioni strutturali che attivano il dominio chinamico intracellulare.

Si autofosforilano sia le tirosine regolatorie della funzione chinamica, sia le tirosine che hanno funzione segnalatoria, che servono da sito di aggancio per proteine che possiedono un dominio SH2 (dominio 2 omologo a Src, *Src homology 2*) (Fig. 1.12), oppure un sito di legame PTB (*phosphotyrosine-binding*).

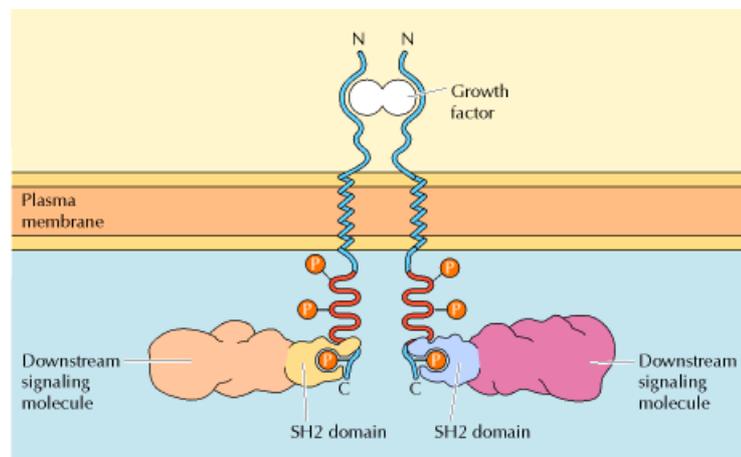


Fig. 1.12: Associazione di molecole segnale contenenti un dominio SH2 a recettori proteina tirosina chinasi.

Tra le proteine con domini SH2 troviamo Grb2 che, tramite la proteina di aggancio Sos, lega Ras, una switch protein con attività GTPasica, promuovendone l'attivazione. Ras fa partire la cascata del segnale delle MAP chinasi (*mitogen activating protein kinases*) attivando la proteina Raf (Fig. 1.13) che a sua volta attiva la proteina MEK (*MAP and ERK kinase*) fosforilandola. MEK fosforila e attiva le MAP chinasi, che dimerizzano ed entrano nel nucleo cellulare dove regolano fattori di trascrizione (Fig. 1.14).

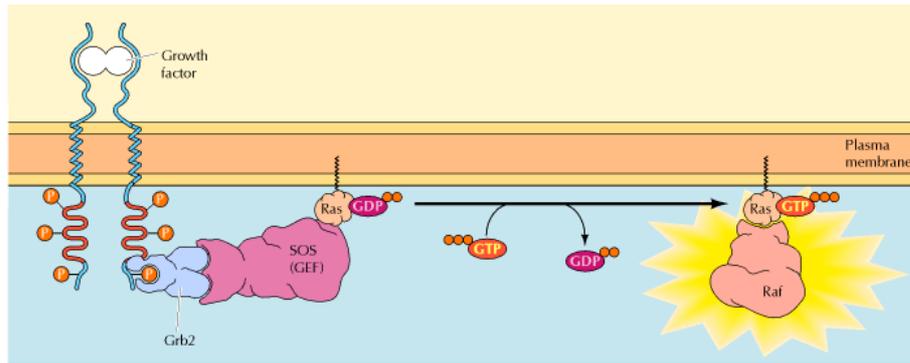


Fig. 1.13: Attivazione di Ras a valle dei recettori proteina tirosina chinasi.

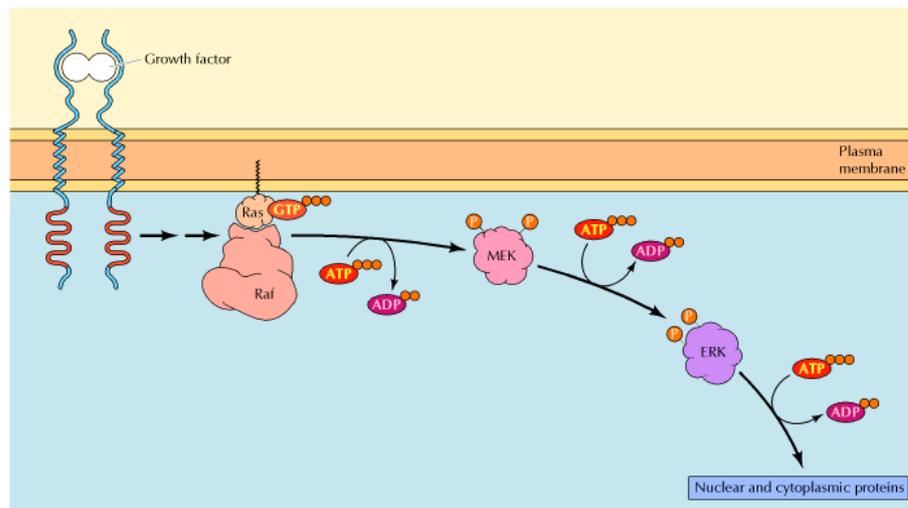


Fig. 1.14: Attivazione della cascata delle MAP chinasi.

Sempre tramite il dominio SH2, può essere attivata la via dei fosfatidil inositoli, con il legame delle proteine PI-3 chinasi (fosfatidilinositolo-3 chinasi) e PLC γ (fosfolipasi C γ), responsabile della formazione dei secondi messaggeri cellulari IP $_3$ (inositolo 1,4,5-trifosfato) e DAG (1,2-diacilglicerolo) (Fig. 1.15).

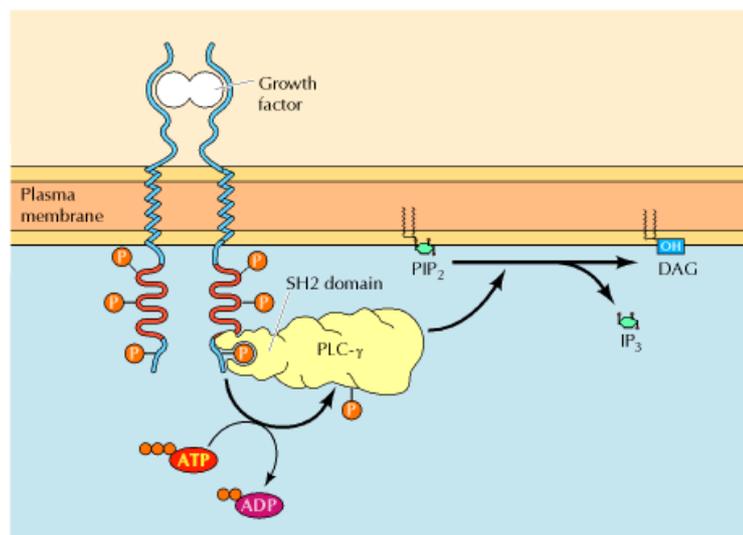


Fig. 1.15: Azione della PLC γ e formazione dei secondi messaggeri DAG e IP₃.

L'azione di VEGF e recettori è modulata da una serie di molecole corecetrici: eparina/eparan solfato e proteine della famiglia delle neuropiline interagiscono con tutte le isoforme di VEGF-A che contengono l'esone sette o il sei e il sette. L'eparina/eparan solfato interagisce direttamente anche con i recettori. Le neuropiline sono proteine transmembrana, con un ampio spettro di espressione, coinvolte nel direzionamento assionico e partecipano al complesso VEGF/VEGFR. Le Neuropilina-1 e -2 interagiscono rispettivamente con VEGFR-2 e -1, stimolando il segnale di questi recettori. Più in particolare, la neuropilina-1 agisce nelle arterie e nelle cellule endoteliali, mentre la neuropilina-2 agisce nelle vene e nei vasi linfatici.

Tra i corecettori sono annoverate anche le integrine della famiglia β_3 che si legano al dominio extracellulare di KDR e aumentano l'attivazione del recettore sotto la stimolazione del VEGF. Studi su topi knockout per le integrine β_3 o β_5 hanno evidenziato un aumento dell'attività di KDR e la vascolarizzazione di tumore. L'azione delle integrine sembra essere quindi volta a prevenire una stimolazione incontrollata di cellule endoteliali in condizioni non patologiche oppure di facilitare l'angiogenesi durante la riparazione dei vasi nelle malattie (Shibuya et al. 2006).

Le caderine, molecole di adesione cellulare coinvolte nella formazione di giunzioni aderenti in cellule endoteliali ed epiteliali, hanno un ruolo essenziale nella segnalazione mediata da VEGF.

Flt-1 è il bersaglio di VEGF-A, VEGF-F e, in modo esclusivo, di PlGF e VEGF-B; la sua funzione principale è quella di regolare la morfogenesi dei vasi sanguigni. Durante l'embriogenesi è necessario per il normale sviluppo dei vasi sanguigni, dove svolge un ruolo regolatorio negativo nello sviluppo vascolare catturando VEGF-A e impedendone il legame a KDR.

Flt-1 è coinvolto anche nella migrazione cellulare: l'attività chinasi di Flt-1 è richiesta per la migrazione stimolata da VEGF di cellule emopoietiche e nell'infiltrazione in tumori da parte di monociti e macrofagi.

Flt-4, bersaglio di VEGF-C e -D, è un importante regolatore della linfoangiogenesi. Questo recettore è cruciale per lo sviluppo vascolare dell'embrione, infatti l'inattivazione del gene che lo codifica causa la morte dell'embrione di topo al giorno E9.5 a causa di un rimodellamento anormale del plesso primario vascolare. Si ritiene che la crescita di vasi linfatici sia riconducibile all'azione di VEGF-C con Flt-4 e che VEGFR3 cooperi con KDR nello sviluppo dei medesimi.

Un discorso a parte merita KDR poiché è il marker più precoce dello sviluppo endoteliale della cellula ed è considerato il recettore più importante nella segnalazione angiogenica.

1.6.4 KDR

KDR è un recettore espresso in cellule emopoietiche, neurali e della retina.

Viene legato da VEGF-A, -C, -D, -F e, in modo esclusivo, da VEGF-E.

Il recettore è attivato dall'autofosforilazione di svariate tirosine che determinano l'attivazione di diverse vie di segnale intracellulare. La fosforilazione della tirosina 1175, ad esempio, svolge un ruolo importante nell'attivazione di molte vie mediate dalla PLC (fosfolipasi) di tipo γ -1.

Le funzioni di KDR sono molteplici:

-
- *promuove l'angiogenesi e la vasculogenesi:*

Esperimenti *in vivo* su topi hanno dimostrato che mutazioni a livello della tirosina 1175 portano alla morte in utero a causa di difetti vascolari simili a quelli riscontrati in topi privi del recettore KDR. Inoltre uno studio di mutagenesi ha identificato la tirosina 1008 come un sito addizionale coinvolto nell'attivazione di PLC γ -1, che promuove la tubulogenesi e il differenziamento delle cellule endoteliali, ma non la proliferazione.

- *promuove la mitogenesi:*

KDR, come tutti i recettori tirosino-chinasici, attiva la classica cascata chinasi Ras-dipendente che sfocia nell'attivazione di MAP chinasi come ERK1 e 2 ma, secondo Ogawa S. e collaboratori (1998), la formazione di Ras-GTP è modesta dopo stimolazione di questo recettore. La fosforilazione della tirosina 1175 porta all'attivazione di PLC γ -1 con conseguente formazione di IP₃ e DAG che determinano il rilascio di Ca²⁺ intracellulare e la stimolazione della PKC (proteina chinasi C). Inoltre questa via, attraverso la PKC β , stimola la cascata c-raf \rightarrow MEK \rightarrow MAP chinasi e la sintesi di DNA (Fig.I.9). A riprova di questo, il trattamento con inibitori della PKC blocca i segnali mitogeni. Analisi mutazionali hanno individuato le tirosine 801 e 1175 come possibili siti di legame della subunità p85 della PI3-chinasi. Questa chinasi regola una via di segnalazione (di cui fa parte la proteina chinasi B, PKB, chiamata anche Akt) che ha mostrato in molti tipi cellulari di stimolare la crescita cellulare. La PI3-chinasi sembra anche coinvolta nella trasmissione dei segnali mitogeni prodotti dall'attivazione di KDR.

- *regola la sopravvivenza cellulare:*

L'attivazione da parte di VEGF della PI3-chinasi, con conseguente azione di Akt, protegge le cellule coltivate dall'apoptosi indotta dalla mancanza di siero. Le giunzioni aderenti contengono un complesso composto da KDR, PI3-chinasi, VE caderina (caderina vasculo-endoteliale) e β -catenina: la distruzione di questo complesso per perdita o troncamento della VE caderina induce apoptosi delle cellule endoteliali e blocca la trasmissione dei segnali di sopravvivenza mediati dalla PI3-chinasi (Carmeliet P. et al., 1999).

Infine VEGF induce l'espressione di molecole antiapoptotiche come gli inibitori delle caspasi Bcl-2 e A1.

- regola l'organizzazione del citoscheletro e la migrazione cellulare:

L'inibizione dell'attività di KDR tramite l'utilizzo di anticorpi monoclonali anti-KDR (Sato Y. Et al., 2000) blocca l'assemblaggio di vinculina nelle placche di adesione focale di cellule HUVEC. La fosforilazione della tirosina 951 permette il legame e la successiva fosforilazione della proteina TSAd (*T cell specific adapter*) che possiede un dominio SH2 ed uno PTB. TSAd si associa ad Src regolando in questo modo l'organizzazione delle fibre di stress di actina e le risposte migratorie delle cellule endoteliali al VEGF-A (Fig. 1.16). l'assemblaggio e il disassemblaggio delle adesioni focali e l'organizzazione dell'actina è mediato anche da FAK (*focal adhesion kinase*), che è attivata da KDR. Nello specifico, l'attivazione di questa chinasi, così come della PI3-chinasi, avviene sempre attraverso la fosforilazione della tirosina 1175. Le chinasi così attivate regolano la formazione di fibre di stress, l'assemblaggio di adesioni focali e la migrazione cellulare.

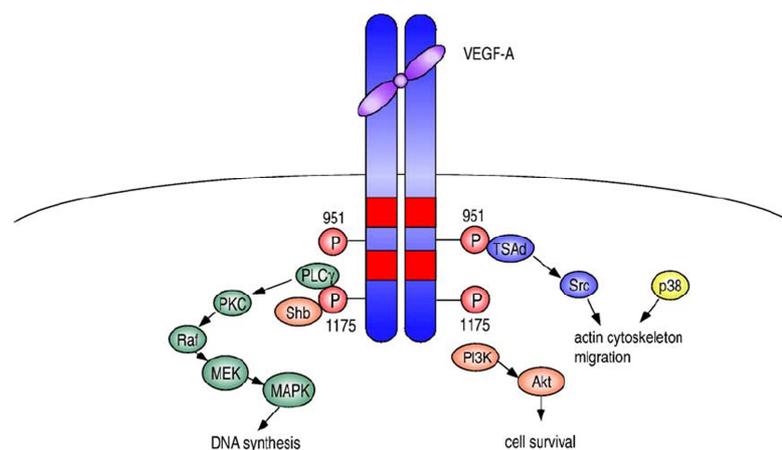


Fig. 1.16: Vie di segnalazione attivate da KDR.

-
- *regola la permeabilità dei vasi:*

un aumento della permeabilità vascolare è riscontrabile dopo somministrazione di VEGF in concomitanza con la formazione di organelli vescicolari vacuolari e fenestrae, che sono regioni della membrana plasmatica delle cellule endoteliali altamente permeabili alle macromolecole. Si suggerisce un coinvolgimento della famiglia delle chinasi Src nella formazione di queste strutture. Nei vasi maturi l'azione di VEGF porta alla perdita di giunzioni tra cellule endoteliali permettendo così la formazione di aperture transcellulari. In risposta a VEGF vengono inoltre fosforilate le maggiori componenti delle giunzioni serrate, aderenti e comunicanti come, per esempio, la VE caderina, la β -catenina e la connessina 43 (Shibuya et al., 2006).

1.7 Nefrogenesi: molecole a logica differenziativa

Il destino delle cellule staminali è fisiologicamente determinato sia da regolatori interni che dall'ambiente extracellulare. L'espansione e il differenziamento di queste cellule ex vivo è generalmente controllata da "cocktail" di fattori di crescita e molecole che trasducono segnali cellulari, o tramite la manipolazione genetica. Ottenere tramite specifiche metodiche di induzione di uno specifico differenziamento una popolazione omogenea di particolari tipi cellulari sarebbe essenziale non solo per i possibili usi terapeutici, ma anche per chiarire i meccanismi molecolari che intervengono nello sviluppo.

A questo scopo si stanno sperimentando piccole molecole sintetiche e prodotti naturali, che hanno fornito alcuni strumenti per modulare chimicamente i complessi processi cellulari. I primi risultati in vitro si sono ottenuti dall'uso di piccole molecole in grado di attraversare la membrana cellulare come l'acido ascorbico, la 5-azacitidina e l'acido retinoico, che hanno dimostrato la possibilità di indurre il differenziamento cardiaco in diversi tipi cellulari (cellule embrionali, mesenchimali e neuronali).

1.7.1 Nuove molecole a logica differenziativa: HB e HBR

Nuove molecole a logica differenziativa vengono oggi indagate dai ricercatori, al fine di evidenziare il potenziale nella modificazione dei programmi di espressione genica indotta mediante segnali chimici. L'utilizzo di molecole integrate ed esterne alla cellula e ad azione diretta e sinergica, offre così un nuovo approccio nell'ingegneria tissutale e nella terapia cellulare rigenerativa, permettendo così di evitare possibili azioni aspecifiche correlate a metodiche tradizionali quali il "gene transfer". A tale scopo, Ventura et al. (2004), hanno sviluppato monoesteri di acido ialuronico e butirrico, ed esteri misti dell'acido ialuronico con l'acido butirrico e l'acido retinoico (HBR), ideati in base alle conoscenze acquisite sui meccanismi di segnalazione cellulare.

Chimicamente HBR è un glicoconiugato caratterizzato da legami estere tra i gruppi idrossilici dell'acido ialuronico e i gruppi carbossilici degli acidi butirrico e retinoico; gli esteri misti dell'acido ialuronico sono dei copolimeri random di tre distinte unità dimeriche ripetitive (Fig. 1.17): la prima unità (x) non è esterificata, la seconda unità (y) e la terza (z) sono esterificate rispettivamente con i residui butirrico (C_3H_7CO) e retinoico ($C_{19}H_{27}CO$).

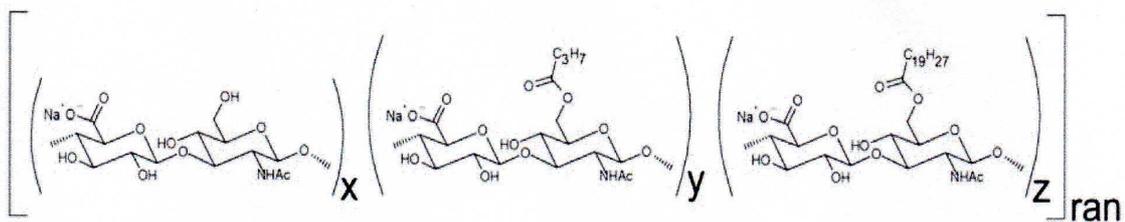


Fig. 1.17: Formula chimica di HBR

Il grado di sostituzione (DS) è il numero dei gruppi idrossilici esterificati per ciascuna unità dimerica di acido ialuronico, mentre la somma delle tre unità dimeriche ($n = x + y + z$) rappresenta il numero totale delle unità disaccaridiche del

polisaccaride. Il DS_{BU} è definito come il rapporto tra y ed n mentre il DS_{RA} è il rapporto tra z ed n . La formula chimica di HB è la stessa di quella riportata sopra, ma in cui manca l'unità z .

1.7.2 Acido ialuronico

L'acido ialuronico è il principale costituente della matrice extracellulare, in cui la maggior parte dei tessuti differenzia; forma infatti, soprattutto nei primi stadi dello sviluppo, una matrice simile a un gel altamente idratato che fornisce lo spazio e la plasticità richiesta per la rapida proliferazione delle cellule embrionali.

E' importante quindi, non solo per il mantenimento delle proprietà biofisiche e omeostatiche dei tessuti, ma anche per la partecipazione a diversi eventi morfogenetici.

L'acido ialuronico (HA) è un glicosamminoglicano costituito da unità disaccaridiche ripetute di acido D-glucuronico e D-N-acetilglucosamina, alternate con legami glicosidici $\beta 1,4$ e $\beta 1,3$ (Fig. 1.18). Viene identificato anche come ialuronato, poiché è presente *in vivo* come un polianione, e non nella sua forma acida protonata.

L'acido ialuronico è un costituente della sostanza fondamentale del tessuto connettivo della pelle, il quale contiene il 63% di acqua, il 32% di collagene e l'1% di acido ialuronico. E' contenuto in concentrazioni elevate nell'umor vitreo, nel cordone ombelicale, nei liquidi delle articolazioni. Si presenta come una sostanza amorfa, solubile in acqua, e regola il contenuto idrico della sostanza intracellulare e la permeabilità del tessuto connettivo. Funge da sostanza cementante dei tessuti ai quali conferisce la tipica plasticità, ed è contenuto nel collagene, nel quale ha la funzione di catturare e trattenere l'acqua. L'acido ialuronico è anche presente nelle capsule di alcuni Streptococchi che sfruttano il polisaccaride presente nell'ospite per non essere riconosciuti dal sistema immunitario (Weigel 1998).

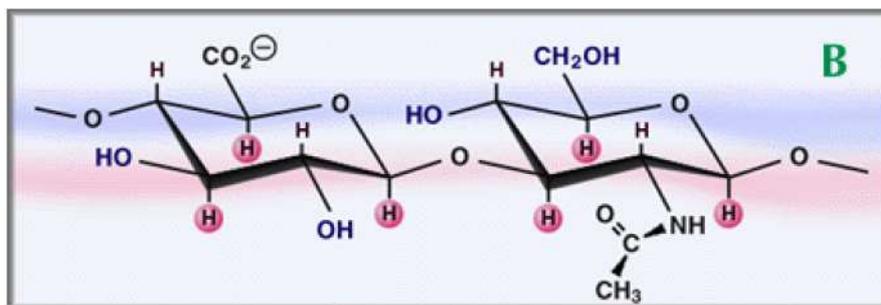


Fig.1.18: Struttura chimica dello ialuronato.

Allo stato solido ha una configurazione ad elica, mentre in soluzione acquosa assume una conformazione “random coil” che espone lungo la catena legami ad idrogeno e ponti ad acqua e, ad intervalli regolari, sequenze ripetute di residui relativamente idrofobici (atomi di idrogeno assiali) che probabilmente mediano le interazioni con le membrane cellulari e con le proteine idrofobiche (Hascall et al. 1997).

L’enzima deputato alla sintesi endogena di acido ialuronico è l’acido ialuronico sintasi (HAS), identificato per la prima volta nello streptococco; tale enzima è presente anche nei vertebrati in diverse isoforme, responsabili della sintesi di acido ialuronico a diversi pesi molecolari; il numero di unità disaccaridiche che costituiscono il polisaccaride può raggiungere le 10000 unità e i 4 milioni di Dalton di peso molecolare. E’ stato dimostrato che catene di acido ialuronico a diversi pesi molecolari hanno ruoli diversi, e agiscono differentemente nei processi di trasduzione del segnale cellulare; la scoperta quindi che diverse isoforme di HAS possono sintetizzare acido ialuronico con diverse lunghezze medie, costituisce un ulteriore livello di regolazione della fisiologia cellulare.

1.7.3 Il recettore CD44

Il recettore di membrana dell'acido ialuronico è il CD44, una proteina transmembrana, monomerica, altamente glicosilata, codificata da un singolo gene ma espressa come numerose isoforme dovute a splicing alternativo.

La forma più semplice e diffusa è chiamata forma standard (CD44s) e comprende una regione extracellulare, una transmembrana a singola elica ed una parte citoplasmatica (Fig. 1.19). La regione extracellulare di CD44s è formata da due domini: il dominio presunto responsabile del legame dello ialuronato (link module) e il dominio più prossimo alla membrana che può avere diverse forme di splicing. La regione citoplasmatica può subire fosforilazioni su residui di serina e contiene i motivi proteici di interazione con le proteine del citoscheletro (come la famiglia ERM e la famiglia delle ankirine) e per potenziali interazioni con il signaling intracellulare.

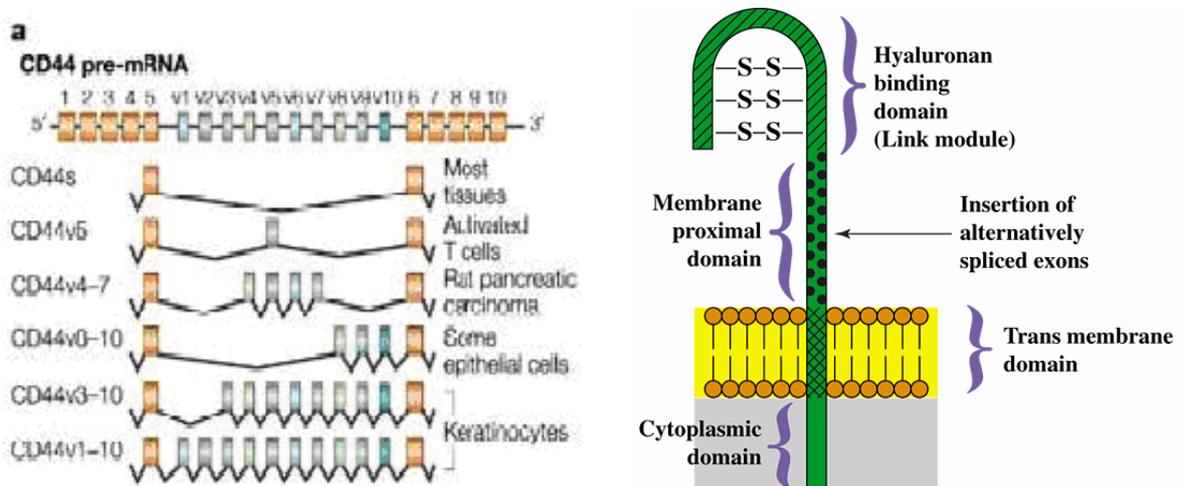


Fig 1.19: a) Le isoforme del recettore CD44 dovute a splicing alternativo; b) La struttura proteica del recettore in cui sono evidenziate le diverse regioni.

Il fatto che il CD44 sia un recettore transmembrana con un dominio citoplasmatico esteso, suggerisce che il CD44 possa interagire con la matrice

(outside-in signalling) e possa modificarla in risposta ad altri segnali intracellulari (inside-out signalling).

Il legame dello ialuronato può indurre il clustering di più recettori, ed essendo il CD44 in collegamento con il citoscheletro sottostante, l'interazione HA-CD44 può indurre cambiamenti nell'organizzazione, provocando il rilascio o il sequestro di una varietà di molecole coinvolte nel signalling (catenine, Fak, Src, p56, p185, Rho, PKC, IP3).

L'interazione dell'acido ialuronico con il CD44 porta all'internalizzazione del complesso, mediante invaginazione della membrana con un meccanismo molecolare non ancora identificato, probabilmente simile al classico meccanismo di endocitosi, che porta alla formazione delle vescicole rivestite di clatrina; l'endosoma formato viene indirizzato al compartimento lisosomiale grazie ai motori molecolari associati al citoscheletro e dopo la fusione tra le endomembrane dei due compartimenti subcellulari si ha la degradazione finale del contenuto vescicolare (Fig. 1.20) (Tammi et al. 2001).

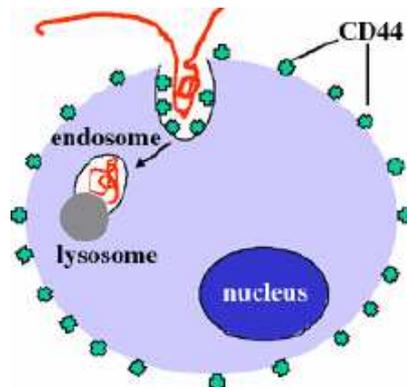


Fig. 1.20: Internalizzazione e degradazione dello ialuronato

Il dominio extra cellulare della proteina può legare delle metalloproteasi che possono tagliare il legame che unisce il dominio responsabile del legame dello

ialuronato alla parte transmembrana, rendendolo indipendente dalla cellula e rimanendo unito ai suoi ligandi. Questo riduce la possibilità dei CD44 rimasti attaccati alla cellula, di trovare un ligando libero a cui legarsi, diminuendo in questo modo la quantità di segnali che il CD44 intatto può trasmettere alla cellula.

Nel corso degli anni sono state trovate nuove funzioni della proteina (Wheatley et al., 1993) ma la principale rimane il riconoscimento dell'acido ialuronico, componente della matrice extracellulare, trasducendo dei segnali all'interno della cellula con conseguenze variabili a seconda della tipologia cellulare.

Lo ialuronato è in grado di interagire con i processi cellulari anche mediante l'interazione con specifiche proteine (ialaderine) che traslocano nel nucleo intervenendo nella cascata di signaling della via delle MAP chinasi (Zhang et al. 1998).

L'acido ialuronico è in grado, dunque, di interagire con i processi cellulari sia mediante una via CD44 dipendente, sia mediante l'interazione con altri recettori transmembrana o endocellulari; queste caratteristiche hanno anche portato i ricercatori ad indagare le potenzialità di carrier dell'acido ialuronico, per veicolare altre molecole in modo specifico all'interno della cellula.

1.7.4 Il butirrato

L'acido butirrico, un acido grasso naturale a corta catena presente nel colon umano, è una molecola capace di modulare una gran varietà di processi cellulari fondamentali; appartiene alla classe degli inibitori dell'istone deacetilasi (HDACi), potenti induttori dell'arresto della crescita cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi in cellule trasformate (Coradini et al. 1997).

Il meccanismo d'azione di queste molecole è basato sulla capacità di inibire l'attività di enzimi iston deacetilasi (HDAC) che svolgono un'attività antagonista rispetto agli enzimi iston acetiltrasferasi (HAT) e insieme sono coinvolti nella

regolazione dell'espressione genica modulando il grado di acetilazione degli istoni.

Gli istoni sono una famiglia di proteine basiche (H1, H2A, H2B, H3, H4) presenti in tutti i nuclei eucarioti in cui costituiscono uno degli elementi primari di organizzazione strutturale della cromatina; i cinque tipi di proteine istoniche sono ricchi di amminoacidi basici carichi positivamente, che interagiscono con i gruppi fosfato del DNA, carichi negativamente. Tutti gli istoni che compongono il core proteico di un nucleosoma (un livello strutturale di ordine superiore del DNA, organizzato dagli istoni) contengono una sequenza ammino-terminale flessibile, costituita da 20-40 residui amminoacidici, che si estendono dai loro domini globulari (Fig. 1.21).

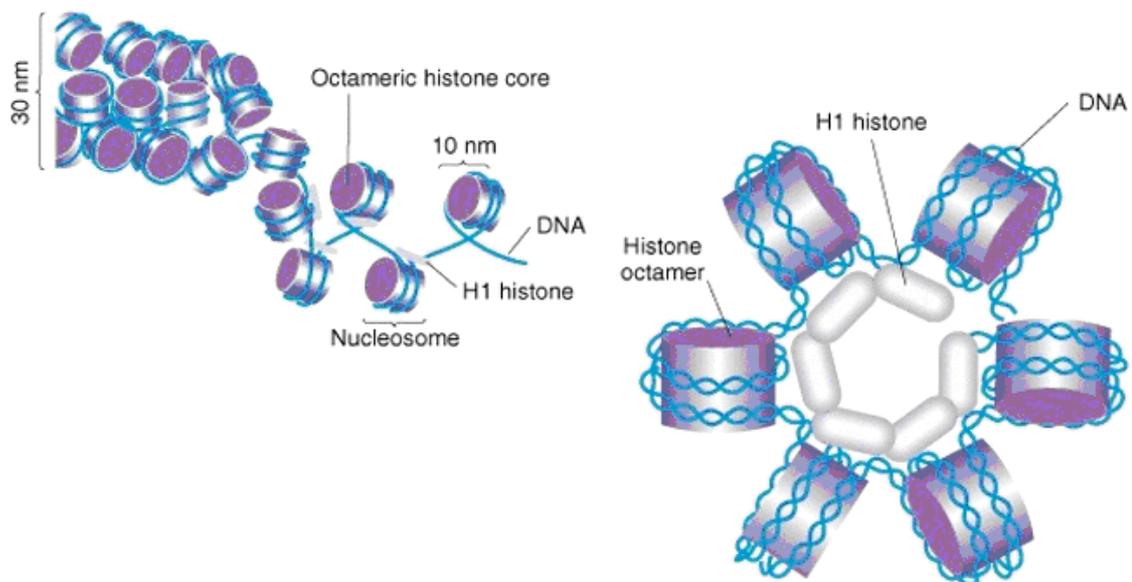


Fig.1.21: Livelli di organizzazione del DNA nucleare

Tali terminazioni possiedono diversi residui di lisina carichi positivamente, alcuni dei quali interagiscono con i gruppi fosfato dello stesso nucleosoma, mentre altri possono interagire con il DNA interposto tra i singoli nucleosomi o

con i nucleosomi vicini. Questi residui di lisina sono sottoposti a reazioni reversibili di acetilazione e deacetilazione; nella forma acetilata la carica positiva del gruppo amminico di un residuo di lisina è neutralizzato e viene pertanto eliminata la sua interazione con un gruppo fosfato del DNA. Di conseguenza maggiore è il grado di acetilazione delle terminazioni amminiche degli istoni, minore è la probabilità che la cromatina assuma una conformazione strutturale più condensata. I geni trascrizionalmente inattivi sono in genere localizzati in zone della cromatina più compatta (eterocromatina); in questo contesto, dunque, il livello di organizzazione strutturale della cromatina (condensata–decondensata) costituisce un importante livello di regolazione endogena dell’espressione genica che può essere modulato, ad esempio, mediante l’utilizzo di sostanze che inibiscono l’attività delle HDAC.

Il sodio butirrato (NaB) è l’unico inibitore delle HDAC approvato per l’uso clinico e in particolare come agente antineoplastico; il meccanismo terapeutico con cui agisce il butirrato è proprio basato sulla inibizione delle HDAC che risulta in una riattivazione dell’espressione di numerosi geni, inclusi quelli responsabili del controllo della crescita e del differenziamento cellulare (terapia differenziante) (Marks et al. 2001).

A causa del suo rapido metabolismo cellulare (breve emivita) il sodio butirrato deve essere utilizzato ad alte concentrazioni e per questo, *in vivo*, non costituisce un agente farmacologico ideale.

Nello studio di Coradini et al. (2004) si è valutata, *in vitro* e *in vivo*, l’efficacia come agente antitumorale di un estere dell’acido ialuronico con acido butirrico (HB) nel trattamento del carcinoma epatocellulare; in questi studi è stato possibile dimostrare *in vitro* che HB ha un’efficacia pari a 10 volte quella di NaB, suggerendo quindi che l’uso dell’acido ialuronico come carrier può significativamente aumentare l’attività biologica del butirrato senza apparenti effetti negativi dovuti, ad esempio, alle grandi dimensioni della molecola (HB); gli stessi studi hanno confermato *in vivo*, su modelli murini, che HB determina un’efficace inibizione della formazione di metastasi epatiche (Coradini et al. 2004).

Ulteriori studi sull'effetto del sodio butirato su cellule di carcinoma embrionale murino hanno inoltre dimostrato che l'ipoacetilazione degli istoni induce l'attivazione del'eterodimero RAR/RXR promuovendo i processi di differenziamento cellulare (McCue et al. 2005).

La logica molecolare che giustifica il ruolo del butirato in HBR consiste nella possibilità, attraverso il doppio estere, di sfruttare le potenzialità biologiche del butirato (decompattante cromatinico) a concentrazioni più basse, aumentando così l'efficienza con cui l'acido retinoico può agire come agente differenziante.

1.7.5 L'acido retinoico

I retinoidi sono un gruppo di composti sintetici e naturali che sono strutturalmente correlati al retinolo (vitamina A), una sostanza necessaria nella dieta dei vertebrati, e all'acido retinoico (RA), uno dei derivati biologicamente attivi più importante del retinolo. Evidenze sperimentali indicano che i retinoidi funzionano come importanti molecole segnale per la regolazione dei processi di crescita e differenziamento cellulare, sia durante l'embriogenesi che negli organismi adulti (Summerbell et al. 1990).

Molti degli effetti biologici cellulari dei retinoidi sono mediati da recettori appartenenti alla famiglia dei recettori ormonali steroidei. Questi recettori agiscono come fattori di trascrizione ligando-inducibili e possono aumentare la trascrizione di specifici geni legandosi a sequenze denominate RAREs (Retinoic Acid-Response Elements). Le isoforme dei recettori RAR, α , β e γ si legano sia all'acido trans-retinoico (All-Trans-RA, ATRA) che all'isoforma strutturale 9-cis-retinoica, mentre i recettori RXR (isoforme α , β e γ) legano efficientemente solo l'acido 9-cis-retinoico (Levin et al. 1992).

RXR forma eterodimeri con altri recettori nucleari come RAR, il recettore della vitamina D (VDR) e il recettore per l'ormone tiroideo (TR) che si vanno a legare al solco maggiore del DNA agli elementi RAREs.

La regolazione retinoide dei processi di differenziamento in numerosi tipi cellulari include la capacità di queste molecole segnale di alterare l'espressione

di un gran numero di geni differenti; è stato osservato, ad esempio, che in un modello di differenziamento di cellule staminali derivate da teratocarcinoma murino, l'acido retinoico determina profondi e rapidi cambiamenti dei livelli di mRNA di numerosi geni, che avvengono da poche ore fino a 1-2 giorni dal trattamento con molecole retinoidi. Molti di questi cambiamenti nel profilo di espressione genica sono degli effetti primari determinati direttamente dal legame dei recettori retinoidi alle sequenze RARE dei geni la cui espressione è modificata da RA. Successivamente a questi effetti primari, RA influenza l'espressione di altri importanti geni, come, ad esempio, quelli che codificano per glicoproteine coinvolte nella produzione di matrice extracellulare, proteasi come la tPA (tissutal Plasminogen Activator), proteine dei filamenti intermedi come la cheratina e ancora geni per diversi fattori di crescita e per i loro recettori; la maggior parte di questi effetti comunque sono secondari e non coinvolgono direttamente il legame di un recettore retinoide ad una sequenza RARE; è plausibile che i rapidi cambiamenti di espressione di numerosi fattori di trascrizione causati da RA (effetti primari) siano critici perchè il processo di differenziamento cellulare possa procedere (Gudas et al. 1994).

1.7.6 HBR

L'azione integrata dei costituenti di HBR suggerisce dunque la logica differenziativa con cui questa molecola agisce: l'acido retinoico esplica la sua azione come differenziante a livello nucleare, agevolato dall'azione decompattante sulla cromatina del butirrato; in questo contesto l'acido ialuronico funge da carrier per l'internalizzazione della molecola e per la sua veicolazione a livello nucleare grazie alle modificazioni citoscheletriche. L'utilizzo dello ialuronato per il trasporto della molecola all'interno della cellula fornisce un sistema di delivery biocompatibile e a bassa tossicità, e un uptake selettivo che permette il targeting degli acidi butirrico e retinoico.

Scopo della tesi

Negli ultimi anni la caratterizzazione di varie tipologie di cellule staminali umane ha fornito dei risultati entusiasmanti, ponendo nuove frontiere nel campo della medicina rigenerativa. La possibilità di usufruire clinicamente e sperimentalmente di cellule staminali mesenchimali umane provenienti da tessuti adulti ha permesso di superare le questioni di carattere etico relative all'uso di cellule staminali embrionali, aprendo nuove possibilità nell'ideazione di protocolli clinici in terapia cellulare.

Il trapianto di cellule staminali per il riparo del danno renale, costituisce quindi un nuovo potenziale terapeutico per la cura delle patologie del rene.

In questo ambito si muove lo studio e la caratterizzazione della fonte mesenchimale individuata nei tessuti degli annessi embrionali e in particolare nella membrana fetale di placenta a termine normalmente destinata all'eliminazione.

Obiettivi di questo studio sono, quindi:

- evidenziare che il fenotipo di cellule mesenchimali isolate da membrana fetale (FM-hMSC) sia analogo a quello delle cellule mesenchimali isolate da midollo osseo
- appurare che le FM-hMSC siano in grado di dare origine ai tre differenziamenti classici: condrogenico, adipogenico ed osteogenico, in modo da dimostrarne l'effettiva mesenchimalità
- verificare la capacità di nuove molecole a logica differenziativa (esteri dell'acido ialuronico con butirrico e retinoico) di forzare il processo di differenziamento nefrogenico ed endoteliale. Questo significherebbe modulare l'andamento della nefrogenesi e il riparo dell'endotelio danneggiato, senza dover ricorrere a metodiche di "gene transfer", evitando quindi di perturbare l'omeostasi cellulare con la trasduzione di vettori virali o con molecole estranee all'organismo. La possibilità di manipolare chimicamente la programmazione genetica della nefrogenesi in cellule

staminali, porrebbe le basi per nuovi approcci nello studio della ricostruzione tissutale e della rigenerazione renale.

Il razionale alla base della sintesi delle molecole sintetiche che sono state utilizzate si basa su molteplici considerazioni. L'acido ialuronico è il principale costituente della matrice extracellulare, in cui la maggior parte dei tessuti differenzia, quindi l'innovazione dell'uso dello ialuronato consiste sia nel fornire un sistema di delivery biocompatibile e a bassa tossicità, sia nell'uptake selettivo che permette il targeting dell'acido butirrico e del retinoico, il tutto con l'utilizzo di molecole endogene, quindi tollerate dall'organismo.

Il butirrato, essendo un inibitore delle iston-deacetilasi, genera una iperacetilazione che neutralizza la carica degli istoni e genera una conformazione del DNA più aperta, determinando una maggiore accessibilità dei fattori di trascrizione ai siti regolatori target e promuovendo quindi un differenziamento cellulare.

Per quanto riguarda l'acido retinoico, risulta implicato nello sviluppo nefrogenico; è infatti noto che la delezione dei recettori RAR porta ad una alterazione delle cellule del mesenchima stromale e della crescita del dotto ureterico.

Il raggiungimento di risultati positivi aprirebbe la strada alla possibilità di utilizzare nuove fonti allogeniche, con future prospettive di applicazioni cliniche nella terapia cellulare del danno renale.

Materiali e Metodi

3.1 Isolamento di hMSC da membrana fetale

Le cellule staminali mesenchimali utilizzate derivano da placentate a termine di madri donatrici sane operate con sezione cesaria; la placenta integra viene rapidamente trasferita in laboratorio, lavata con HBSS (Hanks' balanced salt solution, Sigma) contenente penicillina e streptomina (200 U/ml penicillina, 200mg/ml streptomina, Sigma) per la rimozione di sangue ed eventuali detriti e sottoposta immediatamente al trattamento per l'isolamento delle cellule mesenchimali (fig. 2.1).

La membrana amniotica viene separata meccanicamente dal corion e sminuzzata con forbici chirurgiche; I frammenti maggiori di membrana ottenuti vengono sminuzzati e sottoposti a digestione enzimatica con una soluzione di tripsina-EDTA (Sigma) allo 0,25%. Successivamente il sovrinatante viene eliminato e il tessuto residuo viene sottoposto ad una seconda digestione con tripsina-EDTA allo 0,25%, 10 U/ml di DNaseI (Invitrogen) e una soluzione di collagenasi allo 0,1% in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium – Sigma-Aldrich Co.). I frammenti, in sospensione enzimatica, vengono successivamente pipettati vigorosamente per 5 minuti, evitando la formazione di schiuma; la sospensione viene lasciata a riposo per 5 minuti a 37°C, in modo che i frammenti più grandi si depositino sul fondo per gravità.

Il sovrinatante ottenuto viene trasferito in una nuova provetta, neutralizzato con siero fetale bovino (FBS–Calbiochem) e centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti. Il pellet cellulare viene risospeso in 5 ml di mezzo di coltura contenente DMEM, FBS al 20%, penicillina (10U/ml) e streptomina (100mg/ml). Le cellule vengono seminate in fiasche da 25 cm² e lasciate in coltura a 37°C al 5% di CO₂.

3.2 Espansione delle hMSC isolate da membrana fetale

La coltura primaria viene controllata per alcuni giorni al microscopio ottico e quando raggiunge un livello di confluenza del 90% le cellule vengono recuperate ed espanse.

Il seguente protocollo descrive la metodica per staccare ed espandere *in vitro* le cellule da fiasche di coltura di 75cm² (T75) al 90% di confluenza circa:

- Eliminare il terreno dalla fiasca di coltura e fare almeno 2 lavaggi con 5ml di PBS.
- Aggiungere 2,5ml di Tripsina (Biowhittaker) 0.08% in PBS e incubare a 37°C per 2' e 30".
- Aggiungere 2,5ml di terreno completo e trasferire la sospensione cellulare in una Falcon da 15ml
- Se necessario raccogliere le cellule residue nella falcon lavando con PBS.
- Centrifugare a 1000g x 5min a T_a.
- Risospendere in 1ml di terreno di coltura e contare le cellule.

Per la conta cellulare, viene usata la camera di Burker:

- Preparare in una provetta 40µl di Tripian blue (Sigma) diluito 1:9 con PBS, e 10µl sospensione cellulare
- Risospendere accuratamente, prelevare 10µl di sospensione e riempire la camera Bürker.
- Contare le cellule in **n** quadranti delimitati dalla tripla riga.
-

Il numero di cellule totali si ottiene mediante la seguente formula:

$$\text{numero di cellule/ml} = \text{media di n quadranti} \times \text{fattore di diluizione della camera} \\ (10000) \times \text{diluizione in Tripian}$$

Il passaggio nelle nuove fiasche viene fatto con un volume di semina dipendente dal fattore di diluizione con cui si vogliono seminare le cellule.

- Mettere in ogni fiasca da 75cm² 12ml di medium meno il volume in cui sono state risospese le cellule (ad esempio 0.5ml); riportare il tipo cellulare, la data e il numero del passaggio.
- Seminare la sospensione di cellule nelle nuove fiasche e agitare delicatamente con movimenti orizzontali in modo da disperdere omogeneamente le cellule; incubare a 37°C e CO₂ al 5%.

Con questo protocollo è stato possibile effettuare fino a 15 passaggi, dopodichè le cellule cominciano a presentare i primi segni di senescenza.

3.3 Citometria a flusso

L'analisi citofluorimetrica è una tecnica che permette di misurare caratteristiche chimiche e fisiche delle cellule o, per estensione, di altre particelle biologiche.

Tale metodica consente l'analisi automatica di sospensioni cellulari monodisperse e si basa sulla misurazione di alcune caratteristiche della cellula, in rapporto alle sue dimensioni, alla sua architettura interna ed alla presenza in essa di uno o più marcatori fluorescenti, identificati mediante utilizzo di anticorpi coniugati con fluorocromi.

Consente la misurazione di una serie di parametri come la dimensione cellulare, la granularità, il contenuto di pigmenti, di DNA, di RNA, l'organizzazione del citoscheletro, il potenziale di membrana, i recettori di superficie ed intracellulari, le attività enzimatiche o la fosforilazione di proteine.

Molte molecole a significato antigenico o recettoriale sulla membrana, nel citoplasma o nel nucleo possono essere identificate con ligandi fluorescenti o anticorpi marcati con fluorocromi. Altre sostanze, come il DNA, l'RNA e organelli cellulari, possono essere direttamente colorati con fluorocromi che si

legano stechiometricamente ad essi. Il vantaggio consiste nella possibilità di analizzare più parametri contemporaneamente, in relazione al numero di fluorocromi utilizzati per ogni analisi.

Il campione da analizzare, costituito da una sospensione cellulare, viene convogliato da un sistema fluidico di trasporto fino al punto in cui avviene la misurazione, cioè nella camera di flusso. Qui incontra un fascio luminoso focalizzato di alcune decine di micron; quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare (stream), il suo incontro con ogni singola cellula genera dei segnali (Fig. 3.1).

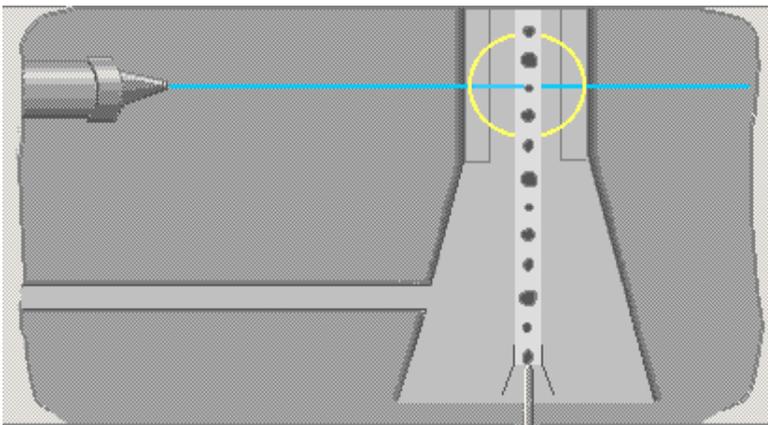


Fig. 3.1: Rappresentazione del punto in cui il laser intercetta le cellule.

Questi sono legati alle caratteristiche fisiche della particella (diametro, rapporto nucleo/citoplasma, granularità interna, rugosità di membrana), e alla presenza di molecole fluorescenti localizzate in diversi siti. Una volta emessi, i segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi dicroici e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicari) che ne misurano l'intensità. Questi segnali elettrici (analogici) provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati, digitalizzati e associati tra loro, sono inviati a un computer che provvede alla presentazione dei medesimi e alla loro definizione statistica.

A livello della camera di flusso si realizzano alcune condizioni idrodinamiche necessarie per la misurazione, come la focalizzazione idrodinamica, che consiste nel fare in modo che le cellule attraversino il punto di intersezione con il laser mantenendo un flusso a singola fila, che viene prodotto introducendo il campione (core flow) contenente le cellule, in tubo più grande in cui sta scorrendo un fluido privo di cellule, lo “sheath fluid”, (generalmente PBS o altro tampone) che mantiene il campione lungo l’asse ideale di flusso; se il regime fluidico è di tipo laminare, si creano due flussi coassiali.

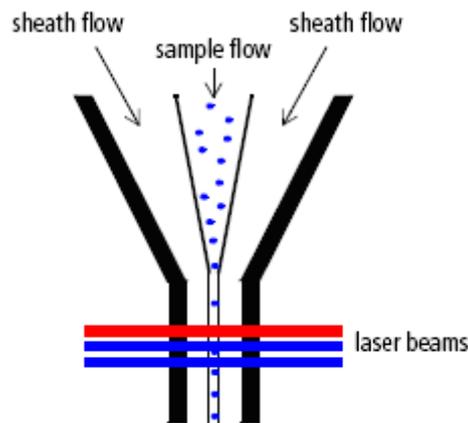


Fig. 3.2: Focalizzazione idrodinamica: i due flussi sono coassiali

Agendo sul sistema pneumatico di trasporto che controlla la differenza di pressione tra core flow e sheath fluid si regola la velocità di efflusso delle cellule (flow rate), normalmente valutata in numero di “eventi” al secondo, cioè numero di “particelle” che hanno incontrato lo spot luminoso nell’unità di tempo. E’ logico pertanto evitare la formazione di aggregati di grosse dimensioni.

Al centro della camera di flusso le cellule incontrano uno o più laser provenienti da una sorgente di eccitazione (di solito ioni Argon). Il punto in cui le cellule sono colpite dalla luce viene definito observation point e in questo punto le direzioni del flusso, del laser e del sistema di raccolta della fluorescenza sono perpendicolari. L’assemblaggio meccanico deve essere mantenuto rigido,

poiché se vibra o slitta, le cellule non saranno colpite sempre dal punto centrale del raggio, e le lenti di raccolta della luce non mireranno esattamente alle cellule. Per far questo occorre mantenere il flusso laminare, e far corrispondere le velocità relative del core e dello sheat fluid, poiché altrimenti le cellule si porteranno sui lati del tubo o usciranno dalla zona di illuminazione uniforme. Occorre anche mantenere la velocità delle cellule all'interno del sistema costante poiché se le loro velocità sono diverse, saranno esposte alla regione illuminata per tempi diversi; di conseguenza saranno esposte a diverse quantità di luce, ed emetteranno o diffonderanno segnali luminosi diversi tra loro.

Una cellula colpita emette innanzitutto segnali relativi alle sue caratteristiche fisiche e morfologiche, in base a fenomeni di riflessione, rifrazione e diffrazione. A 180° dalla sorgente luminosa si misura il segnale legato alla diffusione che è funzione soprattutto del diametro cellulare (Forward Scatter, FSC).

Se ci si pone ortogonalmente al fascio si misura un segnale legato sia alla riflessione e alla diffrazione, che sono funzioni della granularità interna, del rapporto nucleo-citoplasma, della rugosità di superficie (Side Scatter, SSC), che alla emissione di fluorescenza dei fluorocromi legati all'unità cellulare (Fig. 3.3).

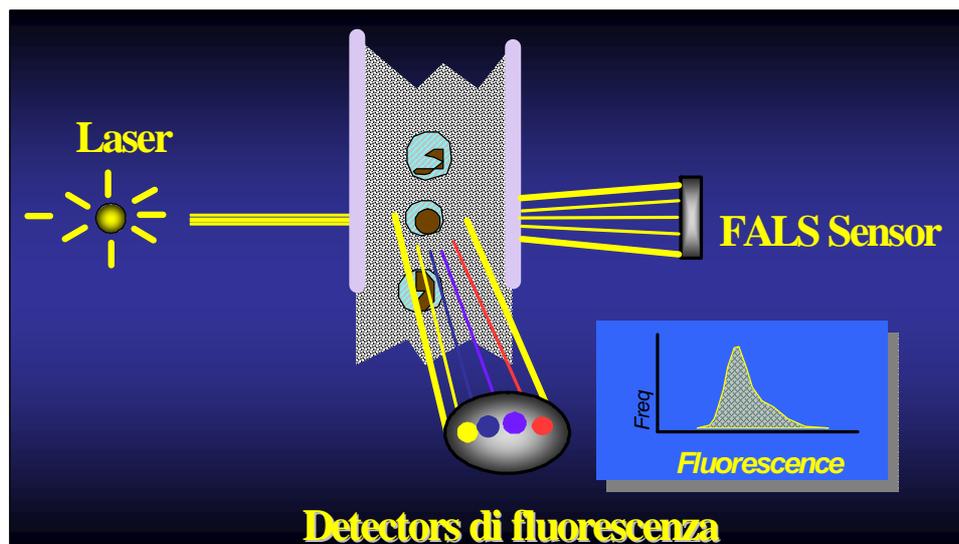


Fig. 3.3: La luce emessa dalla cellula in seguito all'interazione con il laser viene rilevata dai sensori per il Forward Scatter, Side Scatter e fluorescenza.

Questa luce, è sottoposta ad un'analisi spettrale che comporta la separazione delle varie componenti a diverse lunghezze d'onda con l'ausilio di specchi dielettrici e filtri ottici, quindi raccolta da fotomoltiplicatori, in quanto si tratta di emissioni molto meno intense rispetto al segnale di forward scatter. Dalla combinazione dei due tipi di segnali si ottiene un particolare diagramma bidimensionale detto "citogramma", nel quale è possibile rilevare diverse popolazioni cellulari.

3.4 Caratterizzazione immunofenotipica

La caratterizzazione immunofenotipica è stata effettuata mediante analisi citofluorimetrica, con misurazione della fluorescenza per antigeni caratteristici del profilo fenotipico mesenchimale individuato da Pittenger et al. nel 1999.

Le cellule isolate da membrana fetale ed espanse in piastra sono state staccate con EDTA-tripsina (0,05%) e incubate con $1\mu\text{g}/10^6$ cellule di anticorpo primario coniugato con FITC, PE-Cy5, PerCP, APC, PE e Alexa-Fluor per 40 minuti a 4°C al buio. Gli anticorpi usati sono: CD 105 (Chemicon), CD73, CD90, CD166, CD14, CD34, CD44, CD45 (Becton Dickinson).

Per l'analisi citofluorimetrica, effettuata con lo strumento FACSAria (Becton Dickinson), sono stati acquisiti 10000 eventi per saggio e l'analisi è stata eseguita col software FACSDiva.

3.5 Test funzionali di differenziamento *in vitro*

Dopo caratterizzazione immunofenotipica al citofluorimetro, al terzo passaggio di coltura le cellule mesenchimali, isolate da membrana fetale (FM-hMSCs), fetal membrane-human mesenchymal stem cells), vengono esaminate per il loro potenziale differenziativo in quattro diversi lineage fenotipici (adipociti, osteoblasti e condroblasti) mediante specifici medium di induzione.

Differenziamento adipogenico

Per l'induzione del differenziamento adipogenico una popolazione di FM-hMSC di circa 10×10^3 cell/cm² viene espansa in apposite piastre (multiwell 9 pozzetti, NUNC) con un terreno di coltura così composto:

- DMEM con FBS al 10%;
- 0,5mM di isobutil-metil xantina (IBMX, Sigma);
- 200µM di indometacina (Sigma);
- 10^{-6} desametasone (Sigma);
- 10µg/ml di insulina (Sigma);

Il medium completo di induzione viene sostituito ogni 2-3 giorni; dopo 2-3 settimane di coltura è possibile osservare al microscopio ottico cellule contenenti lipidi neutri accumulati in vacuoli citoplasmatici. Le cellule adipocitiche mature vengono infine fissate con formalina al 10% e trattate mediante una soluzione colorante lipido-specifica di Oil red-O (Sigma).

Differenziamento osteogenico

Per indurre un differenziamento osteogenico, 3×10^3 cell/cm² di FM-hMSC vengono seminate in piastra con il seguente medium di induzione:

- DMEM con FBS al 10%;
- 10 mM di β-glicerolfosfato (Sigma);
- 0,2 mM di acido ascorbico (Sigma);
- 10^{-8} M di desametasone (Sigma);

Il medium completo di induzione viene sostituito ogni 2-3 giorni; per l'esame del differenziamento osteogenico la popolazione cellulare viene fissata con formalina e trattata con soluzione colorante di von Kossa.

Differenziamento condrogenico

Per indurre il differenziamento condrogenico un'aliquota di 5×10^5 cellule viene centrifugata in tubetti conici in polipropilene contenente 0,5 ml di DMEM con le seguenti componenti:

- 6.25µg/ml di insulina (Sigma);

-
- 6.25µg/ml di transferrina (Sigma);
 - 6.25µg/ml di acido di selenio (Sigma);
 - 5.33µg/ml di acido linoleico (Sigma);
 - 1.25mg/ml di BSA (Sigma);
 - 0.35mM di prolina (Sigma);
 - 1mM di piruvato di sodio (Sigma);
 - 10⁻⁷ desametasone (Sigma);
 - 0,1 mM di acido 2-fosfato L- ascorbico (Sigma);
 - 10 ng/ml TGF β3 (Trasformino Growth Factor β3, Sigma);

Il medium completo di induzione viene sostituito ogni 2-3 giorni per 3-4 settimane; il pellet, fissato in formalina 10% e conservato in paraffina, viene esaminato per le caratteristiche morfologiche e trattato con soluzione immunocolorante per il collagene di tipo 2 (Chemicon).

3.6 “Population doubling”

La conoscenza del tempo di raddoppiamento (population doubling) per una popolazione cellulare, in determinate condizioni di crescita, ci permette di calcolare la probabile concentrazione cellulare ad ogni momento della coltura. Il tempo di “population doubling” è caratteristico di un certo tipo di cellula sotto particolari condizioni di crescita, e non dovrebbe variare in modo significativo se non varia alcun parametro; tuttavia può modificarsi spontaneamente con l’invecchiamento della coltura. Il numero di passaggio (p) fornisce effettivamente un’indicazione sull’età della coltura, in più, conoscendo il tempo di duplicazione e il tempo intercorso tra due passaggi, è possibile calcolare a quante duplicazioni è andata in contro la coltura cellulare.

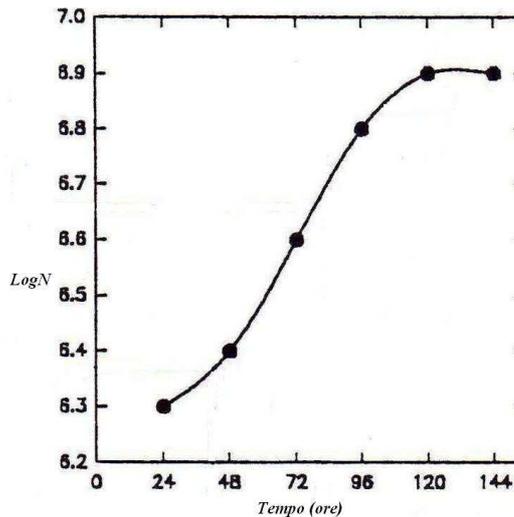


Fig. 3.4: Tipica curva di crescita cellulare

Come già detto lo sviluppo di una coltura cellulare segue nel tempo un andamento caratteristico e riproducibile. Tale andamento viene rappresentato con un sistema di assi cartesiani ortogonali, ponendo in ascisse il tempo di crescita e in ordinate il numero di cellule vitali presenti nella coltura: in tal modo otteniamo un grafico che rispecchia il processo cinetico di crescita cellulare nel mezzo di coltura; tale grafico prende il nome di "curva di crescita" cellulare (fig. 3.4). Essa è contraddistinta da quattro fasi sequenziali: latenza, fase di crescita esponenziale o logaritmica, stazionarietà, decremento o morte.

La fase di latenza è compresa fra il momento della semina e l'inizio della moltiplicazione cellulare: le cellule non si moltiplicano, ma si adattano ai principi nutritivi del terreno di coltura. Crescono i componenti cellulari in preparazione alla divisione cellulare.

La fase di crescita esponenziale (o logaritmica) è caratterizzata da una rapida riproduzione cellulare che procede in progressione geometrica, in quanto da ogni cellula si originano due nuove cellule figlie (1 - 2 - 4 - 8 - 16 cioè $1 - 2^1 - 2^2 - 2^3 - 2 - \text{ecc.}$); in questa fase quasi tutte le cellule sono vive.

La fase stazionaria è preceduta da un rallentamento della crescita cellulare fino a raggiungere un equilibrio dinamico con un numero fisso di cellule vive; in tale condizione di equilibrio il numero delle cellule nuove è bilanciato da quelle che

muoiono. Nel terreno colturale si accumulano sostanze di rifiuto e, incomincia l'esaurimento delle sostanze nutritive.

La fase di decremento esponenziale (fase di morte o declino) si ha quando il numero delle cellule morte prevale nettamente su quelle vive fino alla completa estinzione della popolazione cellulare presente nel terreno colturale, per il completo esaurimento delle sostanze nutritive e il contemporaneo aumento di cataboliti tossici. Le colture cellulari dovrebbero essere passate prima di raggiungere la concentrazione che comporta il rallentamento della crescita e questo è il motivo per cui è bene determinare la curva di crescita.

La curva di crescita presenta sempre questo andamento con un unico elemento variabile che è il fattore tempo: il fenomeno, infatti, può durare, a seconda della specie, giorni o settimane.

Convertendo i dati su scala logaritmica la fase esponenziale appare come una retta. In questa fase le cellule raddoppiano ad intervalli di tempo regolari. Il tempo che intercorre tra una divisione e l'altra delle singole cellule è il "tempo di generazione" e quello che viene calcolato sull'intera popolazione costituisce un "tempo medio di generazione".

Nei nostri esperimenti la curva di crescita è stata sviluppata seminando cellule provenienti da fiasche T75 a confluenza in piastre multiwell da 6 pozzetti; nel calcolo del numero dei pozzetti consideriamo una replica per ogni pozzetto e un pozzetto in eccesso utile per un'ulteriore conta indicativa del numero di cellule effettivo nella soluzione diluita. Il numero di cellule viene calcolato utilizzando una camera di conta; la metodica seguita viene descritta nel seguente protocollo:

Semina nelle multiwell

- Tripsinizzare una fiasca T75 a confluenza;
- Centrifugare e risospendere il pellet in 1ml di terreno di coltura (volume di risospensione valutato in base al pellet);
- Prelevare 10 μ l con puntali sterili per una prima conta.
- In base al numero totale di cellule calcolare il volume da prelevare per ottenere il numero di cellule sufficienti per la semina dei pozzetti da

contare. (Se la soluzione madre risulta troppo concentrata effettuare una diluizione).

- Diluire il volume contenente il numero di cellule necessarie in un volume di terreno completo sufficiente per n pozzetti e aliquotare;
- Centrifugare il volume del pozzetto in eccesso, risospendere in 20µl e contare in camera di conta (camera di Bürker); tale valore viene assunto come numero di cellule al tempo 0 (t_0).
- Periodicamente (come da programma) tripsinizzare e contare due pozzetti; con i due dati calcolare la media e la deviazione standard.

Formula per il calcolo del numero di cellule:

$$\text{numero di cellule (N) / ml} = \text{media di n quadranti} \times 10.000 \times \text{fattore di diluizione}$$

Per calcolare il numero di cellule totale per pozzetto si moltiplica per il volume in cui è stato risospeso il pellet. Per ottenere il numero di cellule per centimetro quadrato si divide per l'area del pozzetto: 9.6cm².

Se si inoculano n_0 cellule al tempo t_0 , dopo z generazioni avremo che

$$N = n_0 * 2^z$$

ovvero

$$\log N = \log n_0 + z \log 2$$

cioè

$$z = (\log N - \log n_0) / \log 2$$

Se T è il tempo medio di generazione e t è il tempo che la popolazione cellulare impiega per crescere esponenzialmente da n_0 a n, allora:

$$t/T = z$$

3.7 Estrazione di RNA totale da cellule con metodo TRizol, quantificazione e valutazione qualitativa

L'estrazione di RNA cellulare costituisce il primo passo per lo studio del profilo di espressione genica delle cellule; ulteriori tecniche di biologia molecolare applicate all'RNA estratto ci consentono inoltre di analizzare l'espressione differenziale tra cellule sottoposte a diversi trattamenti, o tra diverse popolazioni cellulari. La metodica usata nel nostro laboratorio consente di estrarre RNA totale cellulare (messaggero, ribosomiale, transfert), che viene quantificato e successivamente sottoposto all'analisi dei trascritti dei geni di interesse.

La tecnica di estrazione usata si serve di TRIzol (soluzione monofasica di fenolo e guanidio tiocianato; GIBCO-BRL) in un primo momento si ha degradazione selettiva della membrana cellulare e delle altre componenti intracellulari, preservando l'integrità del materiale genetico. Successivamente si separa la fase organica dalla fase acquosa con aggiunta di cloroformio ed una centrifugazione; l'RNA in fase acquosa viene recuperato mediante precipitazione con alcool isopropilico.

Nella metodica di estrazione eseguita le cellule vengono staccate dalle fiasche di coltura e centrifugate; il pellet viene tenuto in ghiaccio per rallentare la degradazione enzimatica dell'RNA da parte di RNasi e sottoposto ai passaggi descritti nel seguente protocollo:

- Eliminare il sovrnatante e risospendere velocemente il pellet con 1ml di TRIzol
- Trasferire in eppendorf RNasi e DNasi free da 1.5ml e incubare 5 min.
- Aggiungere 200ul di cloroformio e agitare il campione col vortex fin quando non appare lattiginoso; incubare poi per 3 min.
- Centrifugare 15 min a 12000g a 4°-6°C.
- Trasferire il sovrnatante (fase chiara superficiale).

-
- Aggiungere 1µl di Glicogeno (20µg/µl, Invitrogen) e 500µl di Alcol Isopropilico, al fine di favorire la precipitazione .
 - Incubare a -80°C per almeno 45 min.
 - Centrifugare 15 min a 12000g a 4°C.
 - Eliminare il surnatante e lavare con 1ml di Etanolo 75%.
 - Centrifugare 15 min ad almeno 8000g a 4°C.
 - Eliminare il surnatante e far asciugare il pellet all'aria (non completamente).
 - Risospendere con H₂O DEPC 10-15µl (il volume varia a seconda della dimensione del pellet).
 - Incubare 10 min a 55-60°C.
 - Quantificare RNA e Conservare a -80°C.

Un µl della soluzione di RNA estratto viene quantificato con spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (*CELBIO*) che fornisce un valore di assorbanza proporzionale alla sua concentrazione.

Le molecole di RNA e DNA assorbono ad una lunghezza d'onda di 260nm, mentre le proteine hanno un picco di assorbimento a 280nm; il rapporto tra i valori di assorbanza a 260nm e a 280nm fornisce un'indicazione circa la purezza del campione (il rapporto ottimale RNA/proteine è circa 1.8).

3.7.1 Elettroforesi su gel dell'RNA

Per valutare la qualità dell'estrazione viene allestita una corsa elettroforetica su gel (Agarosio 1%, TAE 2%) su cui vengono caricati 6µg di RNA estratto; un campione di RNA di buona qualità deve porre in risalto uno striscio in cui siano ben visibili due bande appartenenti ai due RNA ribosomiali 28s e 18s.

3.8 Trattamento con DNAsi

Il trattamento con DNAsi serve ad eliminare eventuali contaminazioni di DNA che in sede di PCR possono dare amplificati aspecifici. È una procedura delicata e importante perché con un trattamento troppo forte c'è il rischio di degradare l'RNA, mentre uno troppo debole rischia di non essere sufficiente ad evitare contaminazioni.

La miscela di reazione comprende:

- 1μg RNA
- 1μl di DNAsi Amp Grade (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, *Invitrogen*), enzima che digerisce il DNA
- 1μl di 10X DNAsi Reaction Buffer (200mM Tris-Hcl pH=8.4, 20mM MgCl₂, 500mM KCl)
- H₂O DEPC da portare a volume finale di 10μl

Il tutto deve essere preparato e mantenuto in ghiaccio.

La reazione avviene in un termociclatore (Mastercycler Gradient, *Eppendorf*).

Il processo di degradazione del DNA avviene a 25°C per 11.30 min. Per fermare l'azione della DNAsi si aggiunge al campione 1μl di EDTA.

Il campione viene poi portato a 65°C per 10 min per inattivare definitivamente l'enzima.

Al termine della reazione i campioni di RNA sono mantenuti a 4°C.

3.9 Retrotrascrizione (RT) dell'RNA

Per studiare il profilo di espressione genica di una cellula sono necessarie metodiche di indagine molecolare, quali PCR e Real-time RT-PCR, che amplificano sequenze geniche di DNA. Tale amplificazione viene effettuata mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) che sarà successivamente descritta; la fonte di DNA di partenza può essere non solo DNA nucleare o plasmidico ma anche DNA con una sequenza complementare all'RNA che si intende esaminare (cDNA).

In questo caso bisogna effettuare una tappa di retrotrascrizione ad opera dell'enzima trascrittasi inversa (un enzima virale ad attività DNA-polimerasica su stampo di RNA) e di un opportuno primer (un corto oligo-dT complementare alla sequenza poly-A dell'RNA messaggero), per ottenere un filamento di DNA complementare alla sequenza di RNA che si intende analizzare (fig. 3.5).

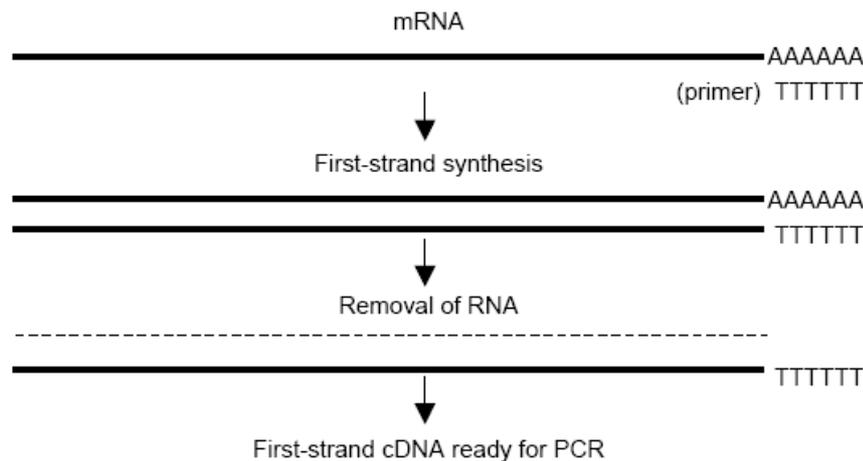


Fig. 3.5: Schematizzazione della reazione di retrotrascrizione

La metodica seguita dal nostro laboratorio, e descritta nel seguente protocollo, prevede l'utilizzo dell'enzima SUPERSCRIPT II, (SSII Reverse Transcriptase 200U/ μ l Invitrogen) una versione ingegnerizzata dell'enzima retrotrascrittasi M-MLV RT con una ridotta attività della RNasi H ed una aumentata stabilità termica.

Per ogni campione si prepara una miscela (Mix) di reazione composta da:

- 4 μ l di First Strand Buffer 5X (*Invitrogen*)
- 2 μ l di DTT 0,1M (*Invitrogen*), per stabilizzare la reazione
- 1 μ l RNasi Out, per proteggere l'RNA dall'eventuale azione delle RNasi (*Invitrogen*)
- 0.5 μ l di H₂O DEPC

Per un volume finale di 7.5µl.

I campioni sono preparati a parte con una miscela (MIX primer) che comprende:

- 1 µg RNA
- 1µl di OligodT (25 µg, 0,5 µg/µl, *Invitrogen*).
- 1µl di dNTP mix (100 nM dNTP set, PCR GRADE, *Invirogen*).
- H₂O DEPC per un volume finale di 12µl
- La reazione avviene in un termociclatore:
- Porre la MIX primer nel termociclatore a 65°C e lasciarla in incubazione per 5 min. L'inizio a caldo della reazione permette l'eliminazione di eventuali appaiamenti interni ai filamenti di RNA
- Tirare fuori i campioni, centrifugarli e si lasciarli in ghiaccio per 2 min, il tempo in cui il termociclatore raggiunge i 42°C
- Aggiungere la mix di reazione, agitare tramite una pipetta e mettere di nuovo la MIX primer nel termociclatore
- Lasciare incubare per 2 min a 42°C
- Aggiungere la retrotrascrittasi: 0,5µl di SUPERSCRIPT III (Reverse Transcriptase 200U/µl, *Invitrogen*)
- Lasciare incubare a 42°C per 50 min
- Seguono 15 min a 70°C
- Tirare fuori i campioni e conservarli in ghiaccio per 2 min, centrifugare e aggiungere 1µl di RNase H (Ribonuclease H 2 U/µl, *Invitrogen*), per degradare l'RNA
- Il termociclatore è intanto sceso a 37°C, reinserire i campioni e lasciarli incubare per 20 min a questa temperatura in modo che l'enzima possa agire
- Il programma è terminato, il termociclatore rimane in HOLDER (6°C)
- Mettere i campioni a -80°C o a -20°C

3.10 Reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction–PCR)

La PCR è una tecnica che permette di copiare ed amplificare determinate sequenze bersaglio di DNA.

In questa tesi, la PCR è stata usata su prodotti di retrotrascrizione per controllare la riuscita di quest'ultima.

Per ogni campione si prepara in ghiaccio una miscela composta da:

- 2,5 µl di Reaction Buffer (100 mM Tris HCL, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, Roche)
- 0,5µl di dNTP (10 mM)
- 1,0µl di Primer senso (Forward, F) (10 µM)
- 1,0µl di Primer antisenso (Reverse, R) (10 µM)
- 0,125µl di Taq (*Taq polymerase* 5 U/µl, Roche), da aggiungere per ultima
- 1,0µl di cDNA

Aggiungere H₂O fino a 25 µl di volume totale.

Preparare la miscela di reazione totale, riferendosi al numero dei campioni con l'aggiunta di un campione per il negativo e di uno in eccesso.

Aliquotare la mix nelle provette da 0,2 ml, aggiungere il DNA e mettere i campioni nel termociclatore.

Temperature impostate nel termociclatore:

- Fase iniziale di denaturazione: 95 °C per 10 min
- 35 cicli:
 1. Denaturazione: 94°C per 30 sec;
 2. Annealing: T_{ann} (variabile a seconda dei primer utilizzati) per 30 sec;
 3. Sintesi DNA: 72°C per 30 sec (nel 35° ciclo step finale di 10 min a 72°C)

I primer utilizzati sono:

- GAPDH

Primer senso (F): 5'-CAGCCTCAAGATCATCAGCA-3'

Primer antisenso (R): 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'

T di annealing: 57°C

- VEGF

Primer senso (F): 5'-AGAAGGAGGAGGGCAGAATC-3'

Primer antisenso (R): 5'-ACACAGGATGGCTTGAAGATG-3'

T di annealing: 62°C

3.11 Elettroforesi su gel di agarosio

Il risultato della PCR è valutato attraverso corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% in EDTA-Tris-Borato (TBE) 1X.

Per il caricamento dei campioni preparare in eppendorf:

- 2µl loading buffer (TrackIt Cyan/orange Loading Buffer, Invitrogen)+ 10µl campione.
- Ladder: 2µl loading buffer+8.5µl H₂O PPI+1.5µl ladder (1Kb plus DNA ladder, Invitrogen).

3.12 Real time RT-PCR

La Real time PCR è una variante della reazione a catena della polimerasi che permette di quantificare l'espressione di cDNA sia in modo assoluto, utilizzando una curva di calibrazione interna o esterna (Karge et al., 1998), che relativo, rapportando i valori di un gene bersaglio rispetto ad un gene di riferimento (Bustin et al., 2000).

Uno dei principali vantaggi di questa metodica è il fatto che è possibile seguire in tempo reale l'andamento dell'amplificazione. La metodica si basa sull'utilizzo di una sonda fluorescente, nel nostro caso SYBR Green I, una molecola che emette fluorescenza ad una lunghezza d'onda di 530nm, quando si intercala al

DNA a doppio filamento, che permette di analizzare e quantificare i risultati, monitorando l'emissione di fluorescenza durante l'amplificazione.

Dopo un numero n di cicli si raggiunge il ciclo soglia (*threshold cycle*, C_t) nel quale la rivelazione della fluorescenza è significativa rispetto al segnale di fondo. Questo punto è all'inizio della fase esponenziale dell'amplificazione ed è il punto nel quale viene quantificato il DNA.

Dal momento che il SYBR Green I è aspecifica, si legherà a qualsiasi prodotto a doppio filamento formato, inclusi ad es. i dimeri di primer. Per questo occorre sempre effettuare alla fine della reazione l'analisi della curva di melting, cioè osservare il valore della temperatura di fusione della doppia elica di DNA, la T melting (T_m), che deve essere uguale in tutti i prodotti di PCR amplificati da una specifica coppia di primer. Si costruisce quindi una "curva di melting": si aumenta gradualmente la temperatura al di sopra di quella stimata essere la T_m dei primer e si misurano continuamente le variazioni di fluorescenza dei prodotti della PCR. Al punto di fusione si avrà la separazione dei due filamenti di DNA e sarà possibile osservare un brusco calo di fluorescenza. Se la reazione di amplificazione si è svolta in condizioni prive di contaminazioni, sarà possibile osservare dei picchi di melting sostanzialmente sovrapponibili indicando così l'omogeneità dei prodotti ottenuti; diversamente la presenza di ulteriori picchi indicherà la presenza di un prodotto di amplificazione aspecifico.

I punti da considerare nella valutazione di un esperimento di RT-PCR sono diversi:

- Scelta dell'amplicone: la lunghezza ottimale è sotto le 200bp poiché gli ampliconi corti sono amplificati con maggiore efficienza dei più lunghi e tollerano meglio le condizioni di reazione.
- Progettazione dei primer: un primer a singolo filamento ottimale è di circa 20bp con un contenuto di G/C del 20-70%. Generalmente, i primer sono scelti su due esoni diversi, per distinguere un'amplificazione di cDNA da una contaminazione di DNA. I primer vengono scelti attraverso "Primer 3", un programma disponibile in rete (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e controllati con il programma

“Amplify”(Amplify3 for MacOS). programma che permette una simulazione di PCR. Si verifica poi con BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) che le sequenze scelte non si appaino con differenti parti del genoma.

- Ciclo soglia: il Ct è il numero di cicli necessario per raggiungere un valore di fluorescenza che sia superiore ad un livello base, in modo statisticamente significativo. Cade sempre nella parte esponenziale dell'amplificazione, quindi la quantificazione non è influenzata da altri componenti della reazione, che diventano quantitativamente limitati nella fase di plateau, per cui non viene introdotto alcun errore sistematico che possa alterare i risultati. Il C si definisce essere pari a 10 volte la deviazione standard del segnale di fluorescenza nei primi 15 cicli.
- Normalizzazione: per correggere la variabilità tra i campioni dovuta al diverso quantitativo di mRNA di partenza si amplifica insieme al gene in esame un altro mRNA di riferimento (standard interno). Lo standard interno viene scelto tra i geni “housekeeping” la cui espressione è considerata stabile in vari tessuti, anche se sottoposti a trattamenti sperimentali. In questo caso è stata usata la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GADPH).

I campioni sono stati analizzati in duplicato e il valore medio del ciclo soglia (C_t) è stato usato per l'analisi dei dati.

La metodica di real-time è semplice e veloce, ma perché il risultato corrisponda a un'accurata quantificazione degli acidi nucleici bisogna che la valutazione dei dati si basi su metodologie riproducibili e su adeguati modelli matematici.

In questi esperimenti il metodo usato per elaborare i risultati è l'analisi semiquantitativa o quantificazione comparativa (Pfaffl, 2001). Questo metodo è indicato per determinare il cambiamento di espressione di geni tessuto-specifici, tra campione di controllo e campioni che hanno subito diversi trattamenti.

L'incremento o la diminuzione dell'espressione dei geni bersaglio sono espressi in relazione ad un gene di riferimento (GAPDH), presente nello stesso materiale che serve all'amplificazione.

Viene costruita una curva di calibrazione per ogni gene utilizzando quantità note di standard di rene (*Ambion*).

Il metodo matematico utilizzato è quello della comparazione dei cicli soglia. Nel modello matematico da noi usato (metodo delta-delta, $\Delta\Delta C_t$), descritto da Pfaffl (2001) si presume un'efficienza di amplificazione ottimale, cioè $E=2$.

Viene costruita una curva di calibrazione per il gene bersaglio e per lo standard endogeno utilizzando quantità note di standard di rene (*Ambion*) e viene calcolata l'efficienza

$$E = 10^{[-1/\text{slope}]}$$

con ^{slope} uguale alla pendenza della retta ricavabile dalla curva di calibrazione del gene.

Se le efficienze di amplificazione del gene bersaglio ($E_{\text{gene bersaglio}}$) e dello standard endogeno (E_{GADPH}) sono ottimali e identiche:

$$E_{\text{gene bersaglio}} = E_{\text{GADPH}} = 2$$

si può procedere con la quantificazione comparativa con il metodo di comparazione dei cicli soglia " $\Delta\Delta C_t$ ".

L'indicazione della quantità di espressione del gene bersaglio nei campioni trattati rispetto al controllo (R) è dato dalla formula:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t(T)}$$

dove 2 è il valore della $E_{\text{gene bersaglio}} = E_{\text{GADPH}}$.

Per ogni campione analizzato calcolare il ΔC_t del gene in studio ($\Delta C_t_{\text{gene bersaglio}}$) sia nei campioni controllo (i non trattati, $\Delta C_t(C)$) che nei trattati ($\Delta C_t(T)$):

$$\Delta C_t_{\text{gene bersaglio}} = C_{t \text{ gene bersaglio}} - C_{t \text{ standard endogeno (GADPH)}}$$

e la relativa deviazione standard (s) che è data dalla formula:

$$(S_{\text{gene bersaglio}}^2 + S_{\text{GADPH}}^2)^{1/2}$$

Calcolare poi il $\Delta\Delta C_t$ di ogni campione:

$$\Delta\Delta C_{t(T)} = \Delta C_{t(T)} - \Delta C_{t(C)}$$

La Real time RT-PCR è stata effettuata con un Lightcycler System (*Roche Diagnostics*) e per l'amplificazione è stato usato il kit Lightcycler®FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I.

La miscela di reazione (Reaction Mix) si prepara unendo 14µl di enzima (FastStart Taq DNA polymerase, *Roche*) a 128µl di Master mix (reaction buffer, MgCl₂, SYBR Green I dye, dNTP mix, *Roche*).

Per ogni singolo campione si preparano:

- 4,0µl Reaction Mix
- 0,5µM primer F
- 0,5µM primer R
- 200ng cDNA campione
- H₂O DNA PCR GRADE fino a 20µl di volume totale

I primer usati per la real time RT-PCR sono:

- GAPDH (standard interno)
Primer senso (F): 5'-CAGCCTCAAGATCATCAGCA-3'
Primer antisenso (R): 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'
T annealing a 61°C
- SCD
Primer senso (F): 5'-tggttcacttgagctgtg-3'
Primer antisenso (R): 5'-gccatgcaatcaatgaagaa-3'
T annealing a 56°C

-
- CD24
Primer senso (F): 5'-gccagtctcttcgtgggtctc-3'
Primer antisenso (R): 5'-tgttttccttgccacattg-3'
T annealing a 56°C
 - Cadherin 11
Primer senso (F): 5'-atcgtcattctcctgggttg-3'
Primer antisenso (R): 5'-gccaccacatagaggaaagg-3'
T annealing a 58°C
 - YWHAQ
Primer senso (F): 5'-ctttgatgaggccattgct-3'
Primer antisenso (R): 5'-tcctgcactgtctgatgtcc -3'
T annealing a 58°C
 - RARalpha
Primer senso (F): 5'-gagatggatgatgcggagac-3'
Primer antisenso (R): 5'-tccgcacgtagaccttagc-3'
T annealing a 60°C
 - EWSH
Primer senso (F): 5'-cctggacaaggaaacaggaa-3'
Primer antisenso (R): 5'-tccgagcaagggagacttta-3'
T annealing a 58°C

I 20µl della miscela di reazione vengono inseriti in capillari di vetro; i capillari vengono chiusi, centrifugati e posizionati nel rotore del LightCycler, quindi si fa partire la corsa:

- fase iniziale di denaturazione: 95°C per 10 min;

-
- 45 cicli:
 1. Denaturazione: 95°C per 10 sec;
 2. Annealing: $T_{\text{annealing}}$ (specifica per ogni primer) per 6-10 sec;
 3. Sintesi DNA: 72°C per 10 sec (ultimo ciclo step finale di 10 min a 72°C)con una velocità di variazione della temperatura di 20°C/sec.

La fluorescenza è stata misurata alla fine di ogni fase di estensione. La specificità del prodotto è stata determinata con l'analisi della curva di melting, condotta con una scala di temperature, che va da 55°C a 95°C variando ad una velocità di 0,1°C/sec.

3.13 Immunofluorescenza

La tecnica di immunofluorescenza permette di evidenziare antigeni tissutali o cellulari attraverso l'impiego di anticorpi marcati con sostanze fluorescenti (fluorofori); la presenza e la localizzazione dell'anticorpo vengono osservate con un microscopio a fluorescenza in grado di eccitare il fluoroforo e rilevarne il segnale.

La metodica di immunofluorescenza usata si basa sul metodo indiretto di rilevazione dell'immunocomplesso: le cellule sono incubate con un anticorpo monoclonale murino (anticorpo primario) per un tempo che garantisce la formazione degli immunocomplessi; dopo un lavaggio per eliminare gli anticorpi primari non legati all'antigene bersaglio, si aggiunge un anticorpo monoclonale marcato con un fluoroforo (anticorpo secondario) specifico per la catena costante dell'anticorpo primario presente nell'immunocomplesso.

Questa metodica è stata usata per la ricerca del von Willebrand Factor. L'anticorpo secondario è un'immunoglobulina di capra del tipo IgG, fluorescina e specifica contro le catene costanti di IgG di topo (fluorescein-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG ICN/CAPPEL). Le cellule vengono seminate e trattate in piastre da 24 pozzetti nei quali sono stati posti vetrini coprioggetto.

Nel seguente protocollo è descritta la preparazione delle cellule trattate per l'analisi immunofluorimetrica:

- lavare il pozzetto con 500µl di PBS a pH 7.4
- fissare con 300µl di formaldeide al 4% (ICN/CAPPEL) a temperatura ambiente (T_a) per 1 ora
- lavare velocemente con 500µl di PBS
- eseguire altri 3 lavaggi da 2 min con 500µl di PBS
- permeabilizzare le membrane cellulari con 200µl di Triton (X-100) (Sigma) 0.2% in PBS, per 15 min a T_a
- eseguire un lavaggio veloce con 500 µl di PBS
- fare 2 lavaggi da 2 min con 500 µl di PBS
- aggiungere 300µl di RNasi (70U/mg, Sigma) per 1h a 37°C (per evitare contaminazioni da RNA che potrebbero dare legami con il propidio)
- togliere l'RNasi senza fare lavaggi
- aggiungere BSA (BSA V fraction: Sigma) all'1% in PBS (per saturare i siti di legame anticorpale aspecifici) e incubare per 1h a 37°C (oppure O/N a 4°C)
- togliere BSA senza fare lavaggi
- aggiungere 150µl di anticorpo primario (anti-MHC MF20, anti- α -actinina sarcomerica 1:100, anti-Cx43 1:400) e incubare 1h a 37°C
- per rimuovere l'anticorpo primario in eccesso eseguire 3 lavaggi da 2 min con 500µl di PBS
- aggiungere 200µl di anticorpo secondario (ICN Cappel) diluito 1:300 in BSA/PBS e incubare 1h a 37°C al buio
- allontanare l'anticorpo secondario
- fare un risciacquo veloce con 500 µl di PBS
- aggiungere 0.05ng/µl di DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma) per 15 min a T_a
- eseguire 3 lavaggi da 2 min con 500µl di PBS.

Montaggio dei vetrini:

- mettere 5-10µl di Mowiol (4-88: Sigma) su un vetrino portaoggetto
- togliere i vetrini coprioggetto dal pozzetto, asciugare la goccia di PBS appoggiando il bordo del vetrino su carta bibula e sistemarli con cautela sulla goccia di Mowiol
- lasciare asciugare O/N e sigillare con smalto
- osservare al microscopio (Biorad Microradians confocal microscope) o conservare i vetrini a -20°C.

3.14 Saggio di vasculogenesi

Per valutare la capacità delle hMSC di formare strutture tubulari endoteliali, è stato utilizzato un saggio di vasculogenesi *in vitro* su Matrigel (ECM gel E1270 Sigma), un gel derivato da sarcoma di topo Engelbreth-Holm-Swarm che mima la matrice extracellulare.

Preparazione del gel:

- Scongelare il gel a 4°C il giorno prima dell'analisi
- Inserire 50µl di gel diluito 1:2 con DMEM in ogni pozzetto di una piastra da 96, mantenendo a freddo la piastra per impedire al gel di polimerizzare
- Mantenere a 37°C per almeno 3 ore per far solidificare il gel
- Semina delle cellule:
- Preparare soluzioni di 150µl di trattamento in una eppendorf sterile in cui sono risospese 10×10^3 cellule per pozzetto
- Trasferire la sospensione nei pozzetti sulla superficie del Matrigel
- Osservare e fotografare al microscopio rovesciato i pozzetti ad intervalli di tempo prestabiliti.

Risultati

4.1 Caratterizzazione immunofenotipica

Le cellule mesenchimali su cui sono stati effettuati gli esperimenti di differenziamento in senso nefrogenico sono state isolate da placenta a termine di madri donatrici sane, operate con sezione cesarea, che hanno fornito il loro consenso informato (Fig.4.1).

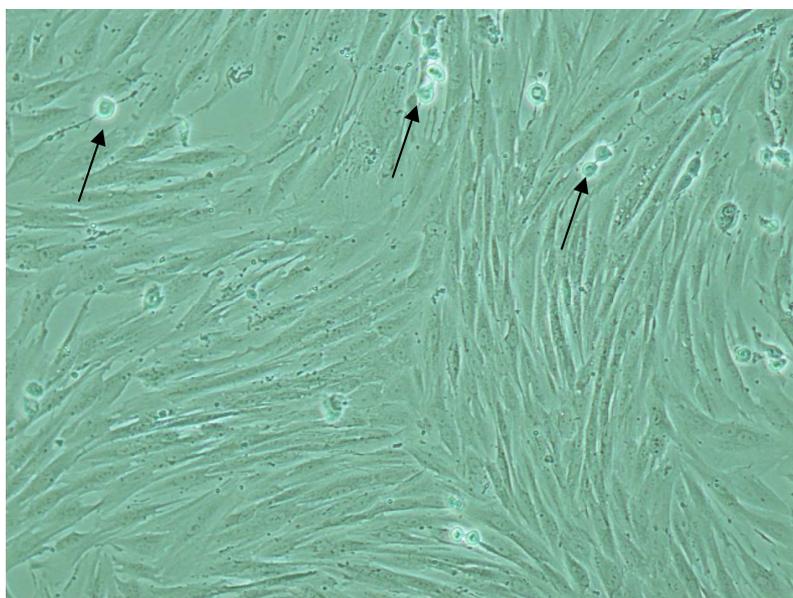


Fig. 4.1: Cellule mesenchimali umane di membrana fetale (le frecce indicano delle mitosi).

Le cellule provenienti da ciascun campione sono state isolate secondo il metodo di aderenza su plastica ed espanse e caratterizzate secondo il protocollo riportato nella sezione Materiali e Metodi (paragrafi 3.1–3.4); i dati ottenuti dalla caratterizzazione fenotipica sono stati confrontati con quelli delle hBM-MSc allo scopo di verificare il profilo mesenchimale delle FM-hMSC.

La caratterizzazione immunofenotipica è stata effettuata mediante analisi citofluorimetrica con misurazione della fluorescenza diretta per gli anticorpi

monoclonali CD105 (Chemicon), CD73, CD90, CD166, CD14, CD34, CD44, CD45 (Becton Dickinson).

Nella figura 4.2 a), b) e c) sono mostrati rispettivamente i grafici citofluorimetrici delle popolazioni di cellule non marcate, usate come controllo negativo, hBM- MSC e hFM- MSC.

Le popolazioni di cellule sono risultate positive nella reazione con gli anticorpi anti-CD29, anti-CD166, anti-CD105, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD44 e negative nella reazione con quelli anti-CD14, anti-CD34, anti-CD45.

In Tabella 4.1 sono riportati i valori percentuali medi di 4 popolazioni isolate di hBM- MSC e hFM- MSC; le popolazioni di cellule isolate da membrana fetale hanno un profilo immunofenotipico confrontabile con quello delle cellule mesenchimali di midollo osseo.

I risultati ottenuti, pertanto, mostrano che le popolazioni isolate sono costituite da cellule dal profilo mesenchimale, che non esprimono marker ematopoietici e che, in particolare, sono positive al recettore dell'acido ialuronico CD44.

Antigene	BM-hMSC	FM-hMSC
CD73	96 ± 1	95 ± 4
CD90	96 ± 2	94 ± 3
CD105	95 ± 1	96 ± 3
CD29	98 ± 1	97 ± 1
CD166	95 ± 2	94 ± 2
CD44	96 ± 1	95 ± 2
CD14	0	0
CD34	0	0
CD45	0	0

Tabella 4.1: Valori percentuali medi delle popolazioni isolate

Controllo negativo

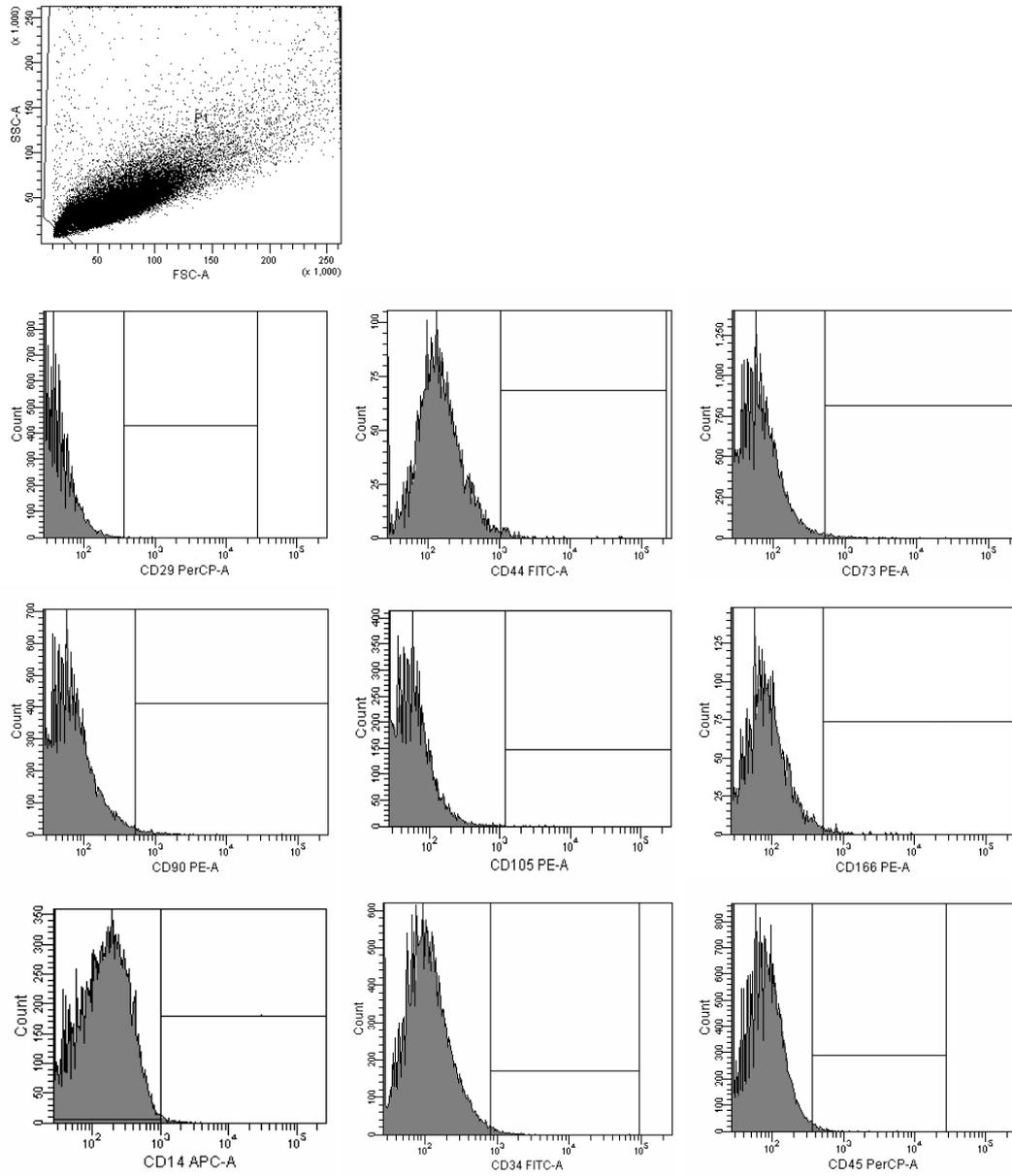


Fig. 4.2a): Controllo negativo degli anticorpi utilizzati.

Midollo osseo

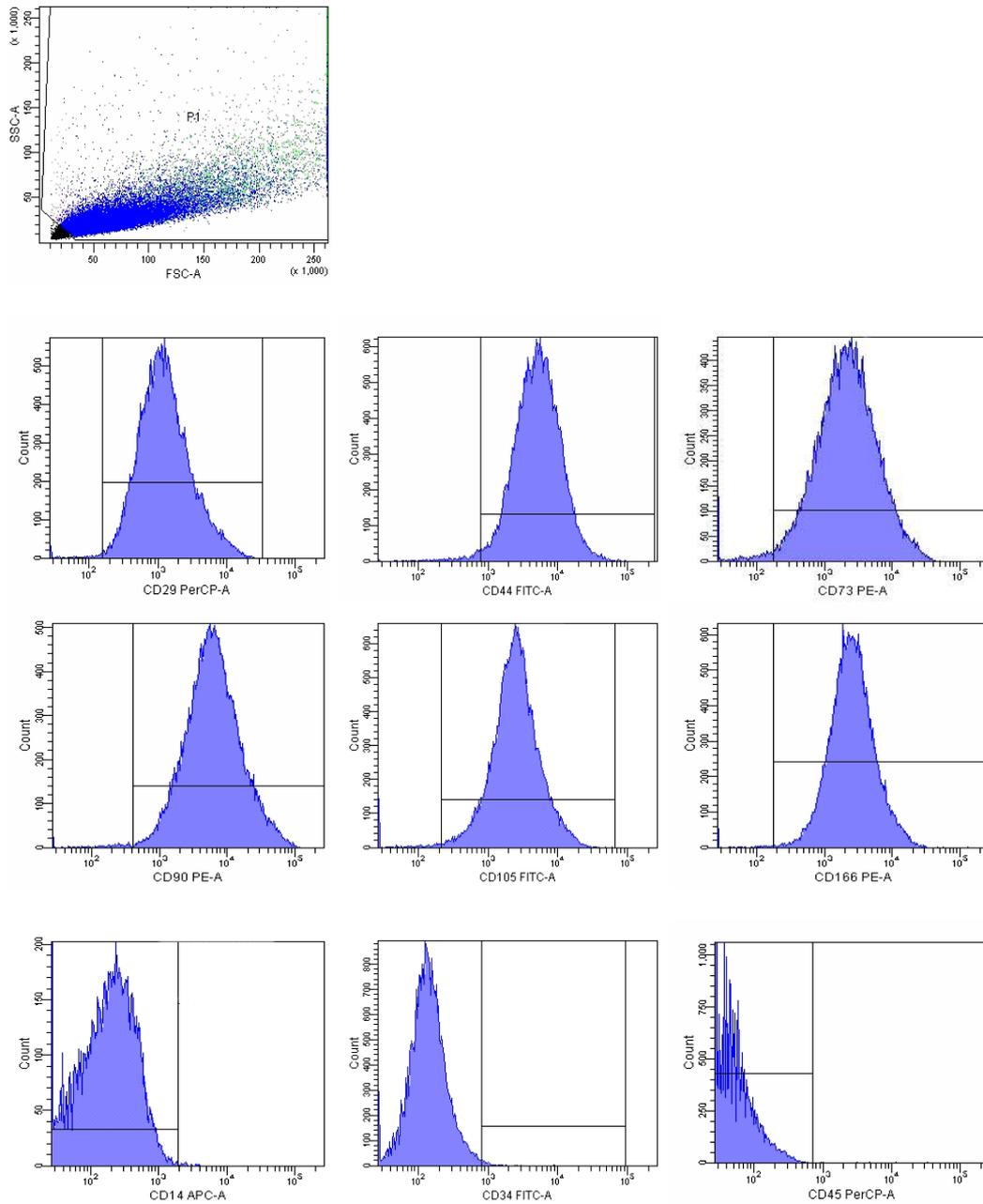


Fig. 4.2b): Caratterizzazione immunofenotipica delle cellule di midollo osseo.

Membrana fetale

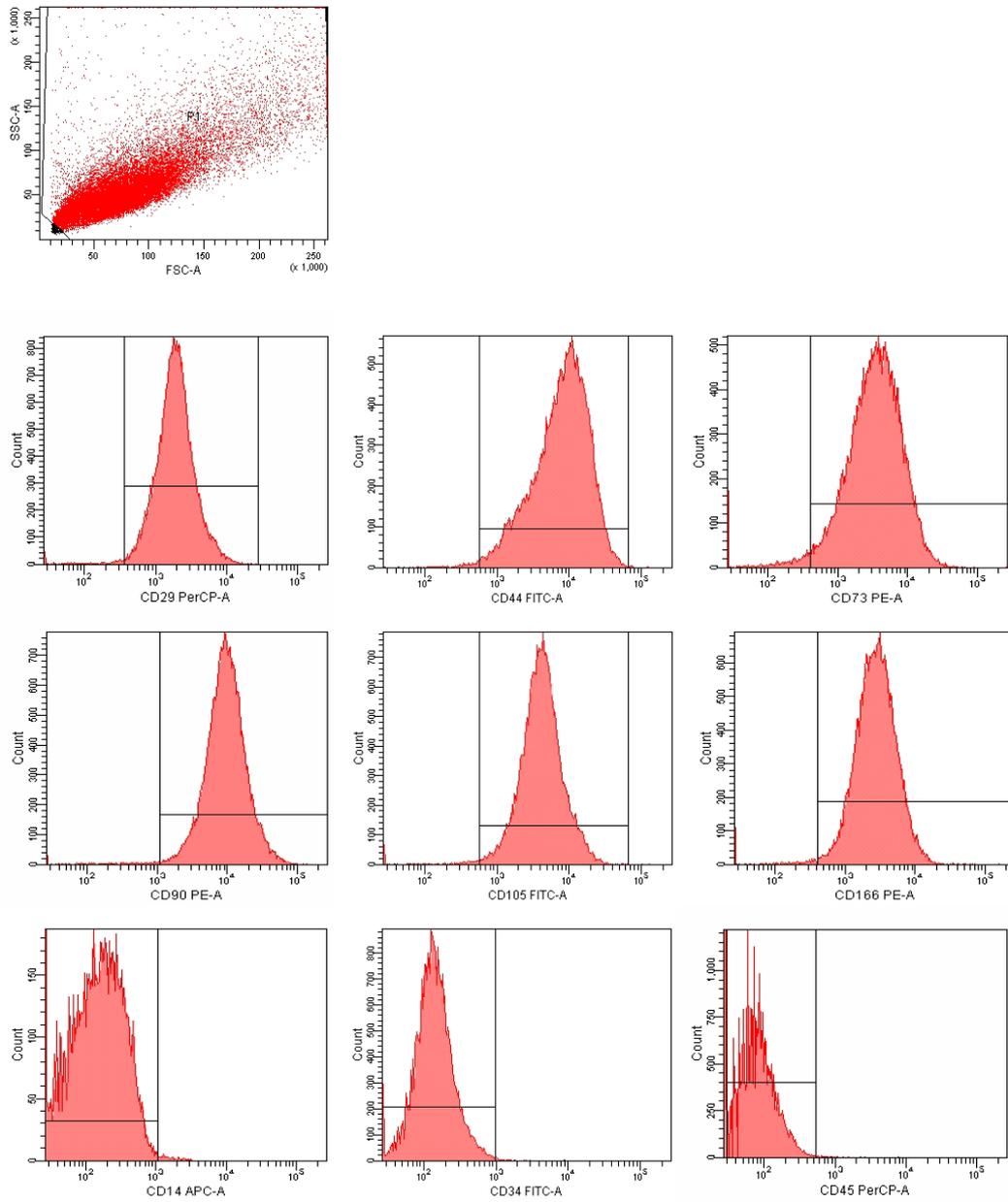


Fig. 4.2c): Caratterizzazione immunofenotipica delle cellule di membrana fetale.

4.2 Test funzionali di differenziamento *in vitro*

La natura mesenchimale delle cellule hFM-MSC isolate è stata valutata funzionalmente mediante saggi di differenziamento *in vitro*. Il differenziamento viene indotto mediante l'uso di terreni di induzione lineage-specifici, in senso adipogenico, osteogenico e condrogenico.

Nel saggio di differenziamento osteogenico le cellule hFM-MSC, similmente alle hBM-MSC, hanno dimostrato di differenziare funzionalmente *in vitro* in cellule capaci di generare una matrice mineralizzata. Già dopo la prima settimana di induzione si possono osservare dei cambiamenti morfologici, mentre al termine del periodo di trattamento le cellule presentano una morfologia appiattita, caratteristica degli osteociti, e depositi di calcio, come rivelato dalla colorazione istochimica di Von Kossa (Fig. 4.3).

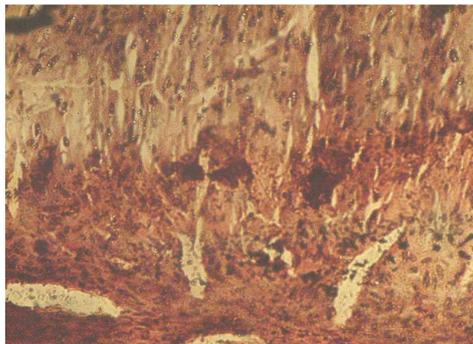


Fig. 4.3: Il differenziamento osteogenico è evidenziato dalla produzione di matrice mineralizzata, come è mostrato dalla reazione positiva alla colorazione di Von Kossa. Ingrandimento al 10X.

Nel saggio di differenziamento condrogenico le hFM-MSC hanno generato, dopo 3 settimane dall'induzione, un bottoncino integro e consistente di cartilagine ialina come confermato dall'analisi immunohistochimica per il collagene di tipo II (Fig. 4.4).

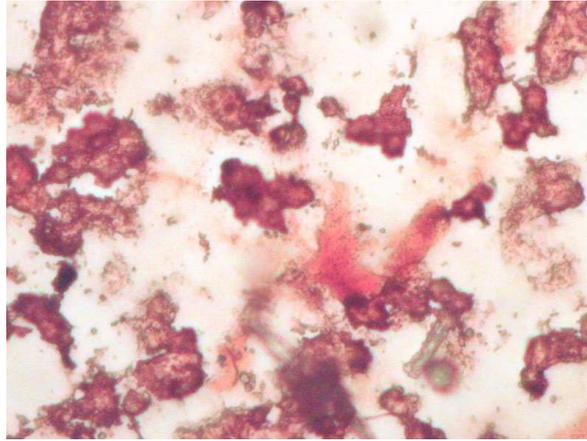


Fig. 4.4: Cellule derivate da membrane fetali mostrano un'abbondante matrice extracellulare positiva al collagene di tipo II. Ingrandimento al 40X.

Queste cellule hanno mostrato di essere in grado anche di effettuare adipogenesi, pertanto risultano positive al test Oil Red-O che mette in evidenza l'accumulo di vacuoli lipidici nel citoplasma. Le cellule differenziate si presentano sia come singole cellule multivacuolari, sia come piccole o grandi colonie, le cui dimensioni aumentano con il tempo di induzione. Tali colonie mostrano un'intensa secrezione di grosse gocce lipidiche (Fig. 4.5).

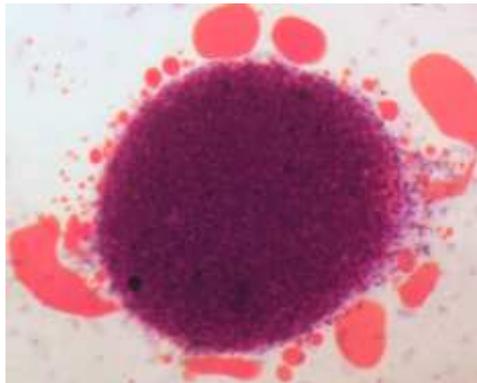


Fig. 4.5: Grossi aggregati cellulari che mostrano una massiccia secrezione lipidica alla terza settimana di induzione adipogenica. Ingrandimento al 10X.

Non è stato osservato nessuno di questi differenziamenti quando le cellule sono state coltivate nel normale terreno di coltura.

4.3 Curva di crescita

La popolazione di hFM-MSK è stata ulteriormente caratterizzata per il suo potenziale di duplicazione cellulare attraverso una curva di crescita (fig. 4.6), secondo il protocollo riportato nel capitolo Materiali e Metodi (par 3.6).

In Tabella 4.2 vengono mostrati, per ogni intervallo di tempo valutato, la media del numero di cellule contate, la deviazione standard e il tempo di duplicazione.

Ore	N.ro cellule (media)	Deviazione standard	Td
0	7980,0	-	-
92	18712,3	961,7	58,6
76	26214,7	1728,2	49,3
120	41171,3	1772,0	36,9
168	58800,0	4582,1	93,3
240	114866,1	14142,1	74,5
264	165166,1	7071,1	45,8

Tabella 4.2: Tempi di duplicazione

I tempi di duplicazione ottenuti (Tab.4.2, Td) risultano sensibilmente variabili, a dimostrazione della natura eterogenea di questa popolazione, composta prevalentemente da elementi coriali e amniotici.

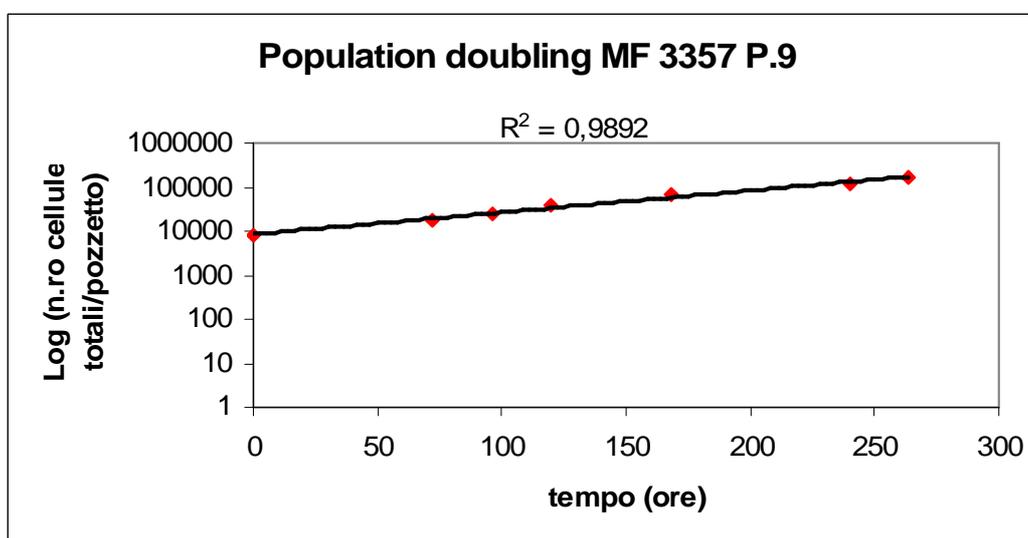
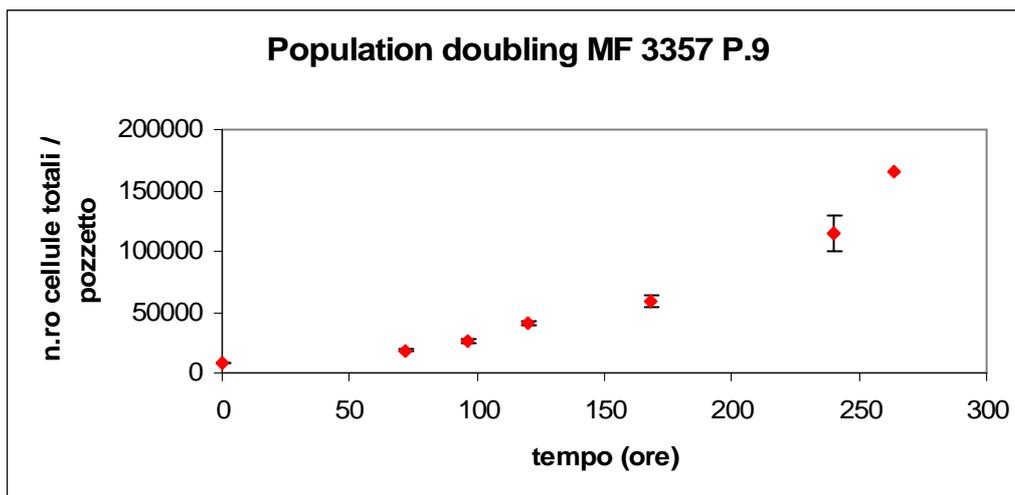


Fig. 4.6: Curva di crescita

4.4 Espressione genica in cellule trattate con HB e HBR

4.4.1 Valutazione della scala di concentrazione per HB

Le cellule MF-hMSC sono state trattate 48 ore dopo la semina con una scala di concentrazioni di HB o HBR pari a 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, e lasciate in coltura per 7 giorni, in accordo con i risultati ottenuti da precedenti

esperimenti sulla finestra temporale. In Tabella 4.3 è riportato lo schema degli esperimenti.

	Concentrazioni esteri (mg/ml)
HB	1, 1.5, 2, 3
HBR	1, 1.5, 2, 3

Tab. 4.3: Schema degli esperimenti di 7 gg a diverse concentrazioni di esteri

4.4.2 Estrazione mRNA

L'RNA è stato estratto e ottenuto secondo la metodica precedentemente descritta. Per valutare la qualità dell'estratto è stato allestito un gel di corsa elettroforetica (Fig. 4.7). Per tutti gli esperimenti è stata calcolata la resa dell'estrazione dell'RNA (Tab 4.4).

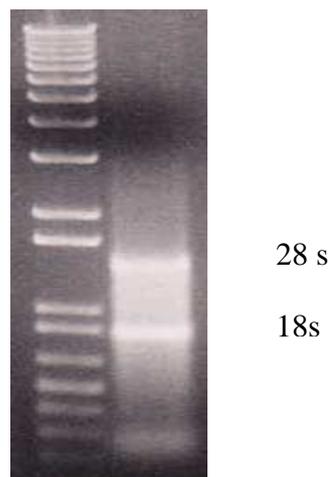


Fig 4.7: Gel di RNA

Esperimento	Concentrazione esteri (mg/ml)	RNA µg/ml	260/280	Resa totale (µg)
HB	1	C: 1055,50	2,05	15,83
		T: 574,90	2,07	8,62
	1.5	C: 1389,20	1,95	20,83
		T: 335,00	1,95	5,03
	2	C: 1708,67	1,96	30,67
		T: 137,60	1,94	2,06
3	C: 1520,00	1,89	22,80	
	T: 642,65	1,91	9,64	
HBR	1	C: 1538,00	2,03	23,1
		T: 188,00	2,01	2,82
	1.5	C: 1348,00	2,00	20,22
		T: 208,00	2,07	3,12
	2	C: 1479,00	1,98	22,19
		T: 198,00	2,01	2,97
3	C: 1688,00	2,05	25,32	
	T: 247,00	1,99	3,71	

Tabella 4.4: Resa di RNA totale di un esperimento in cui le cellule sono state trattate per 7gg a diverse concentrazioni di HB o HBR.

4.4.3 Retrotrascrizione e valutazione del retrotrascritto

Per ogni campione é stato trascritto 1 µg dell'RNA estratto. L'efficienza della retrotrascrizione è stata valutata mediante amplificazione del gene housekeeping GAPDH e successiva corsa su gel (Fig 4.8)

Ladder C T1 T2

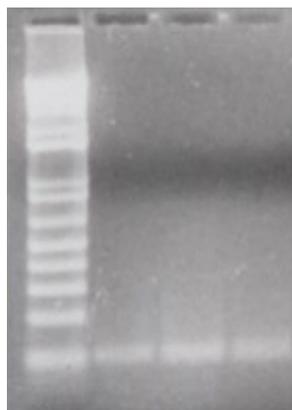


Figura 4.8: Gel di amplificazione di GAPDH in un campione controllo e due campioni trattati con HB.

4.4.4 Real time RT-PCR

Costruzione delle curve a concentrazioni standard

Per i geni presi in esame (14-3-3 ϑ , Stereroly-CoA, Cadherin 11, Stearoyl-CoA, desaturase 2, CD24, Ewing sarcoma homolog, RAR-alpha) e per il gene di riferimento (GAPDH) sono state costruite curve di calibrazione ottenute amplificando diluizioni diverse di standard di rene a concentrazione nota. È stato retrotrascritto 1 μ g di RNA standard di rene (Ambion) ed utilizzato come concentrazione madre, da cui sono state ottenute le diluizioni successive pari a 1:10, 1:100, 1:500 e 1:1000 che sono state usate per ottenere una curva di calibrazione.

Per ogni gene è stata valutata l'efficienza di amplificazione e la specificità dell'amplificato. Il modello matematico chiamato " $\Delta\Delta C_t$ ", utilizzato per il confronto tra diversi campioni, presentato dalla PE Applied Biosystems (Perkin Elmer), presume un'efficienza di amplificazione ottimale e identica per tutti i geni presi in esame.

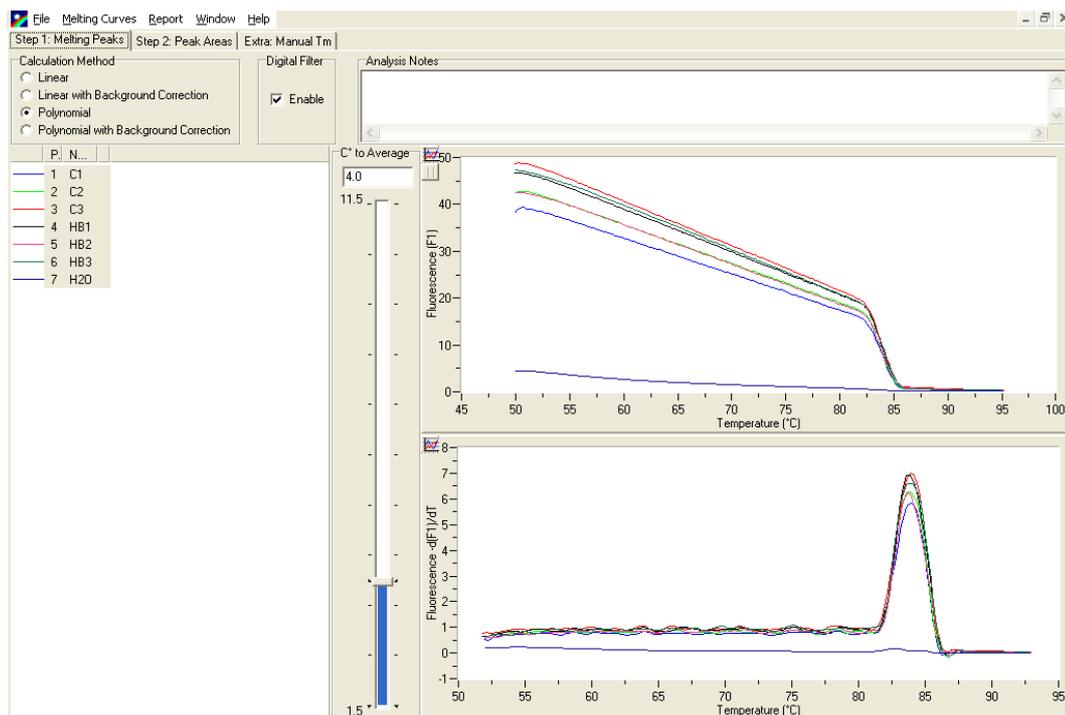
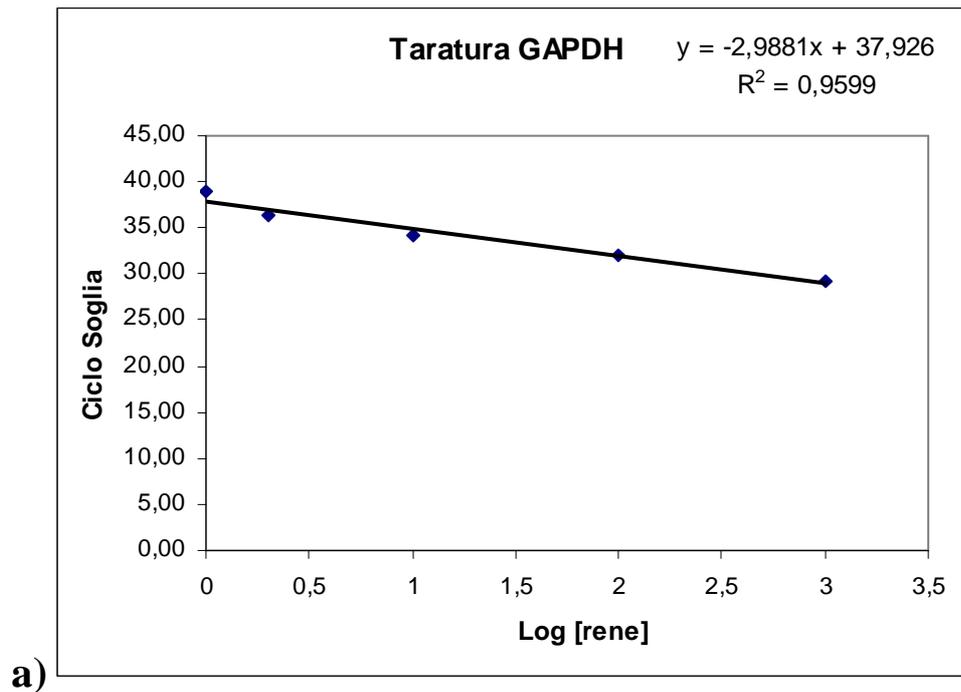
L'efficienza E è definita come:

$$E=10^{(-1/\text{pendenza})}$$

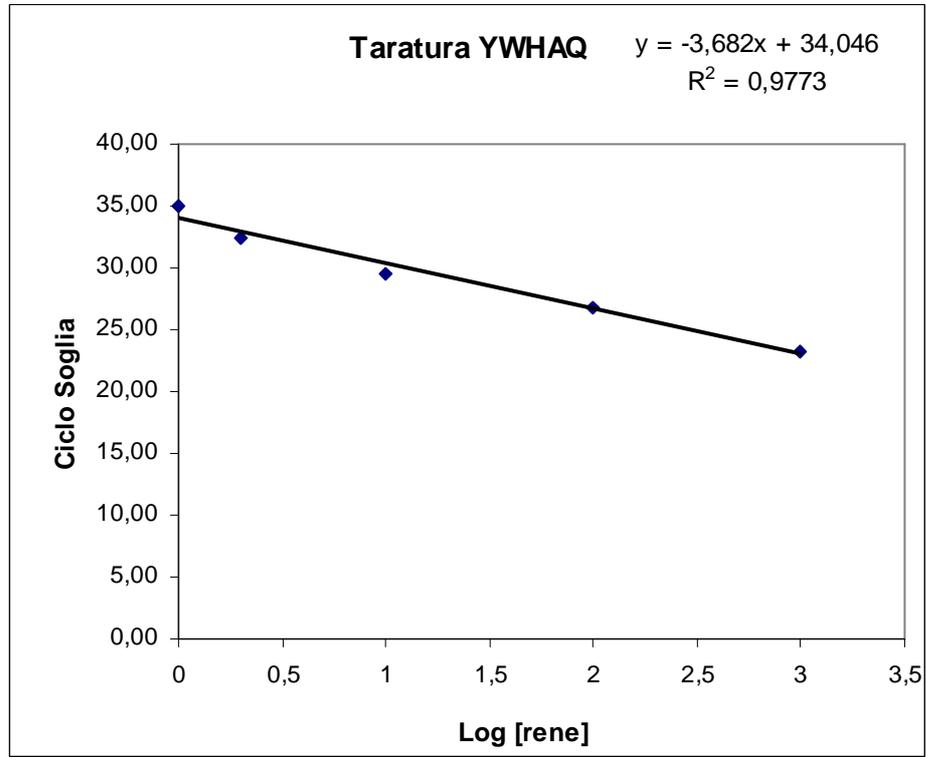
Perché il metodo possa essere utilizzato l'efficienza deve essere uguale a 2 per tutti i geni.

Di seguito (Fig. 4.9a), b), c), d), e), f), g)) vengono mostrate le curve di calibrazione e le curve di melting dei geni presi in esame. In tabella 4.5 sono riportati i valori di efficienza ottenuti per ciascun gene.

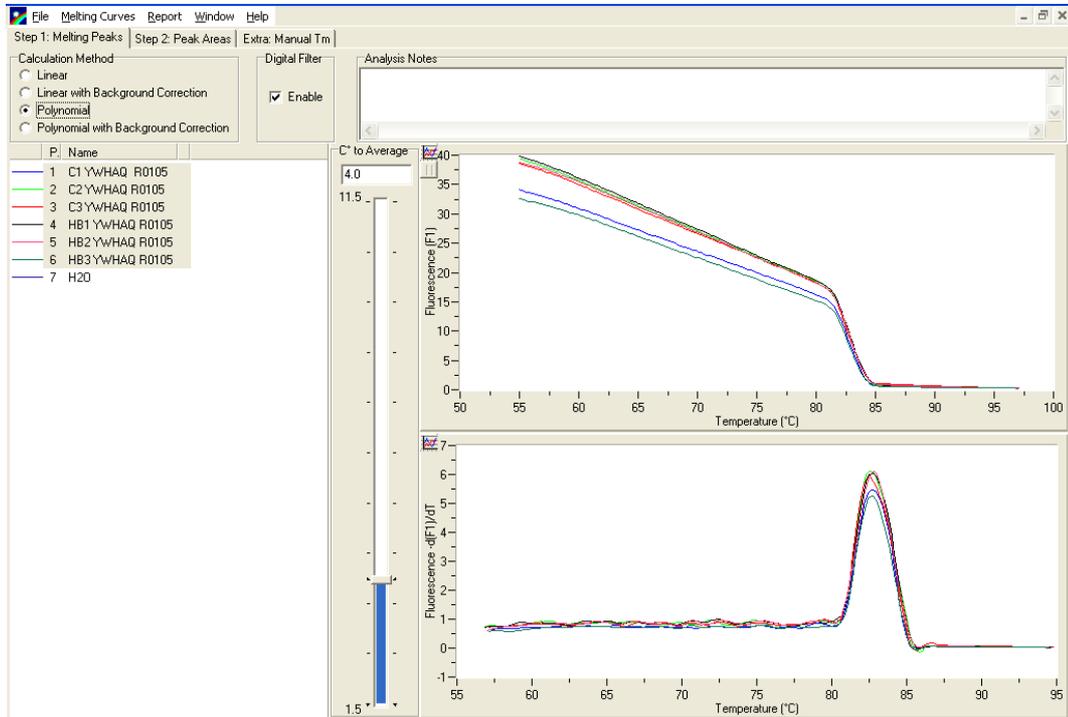
GAPDH



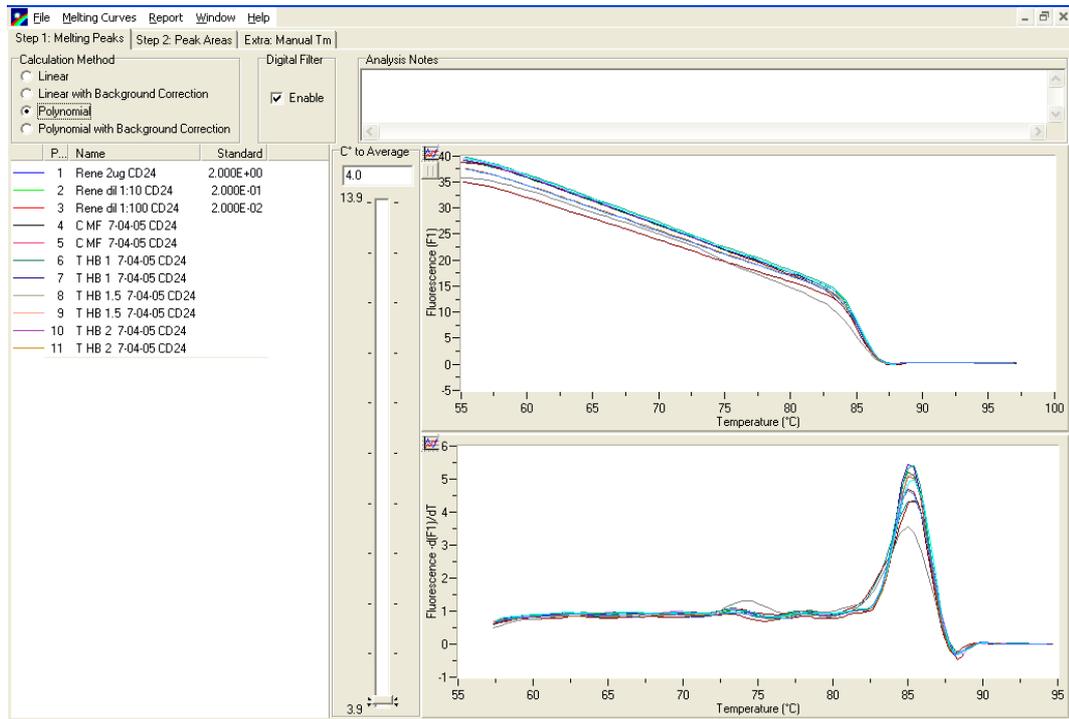
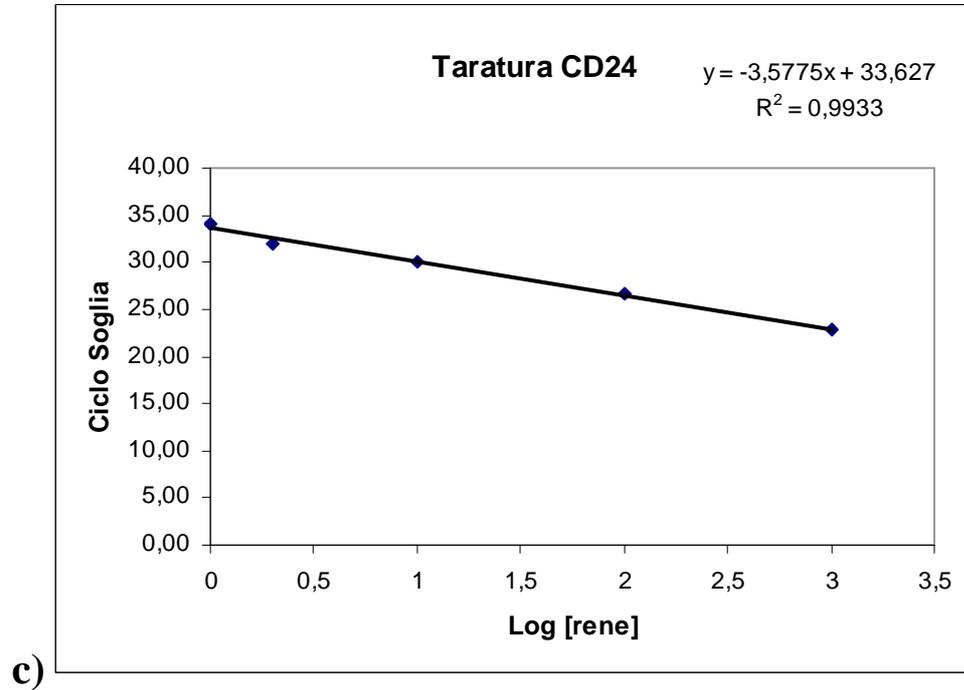
YWHAQ



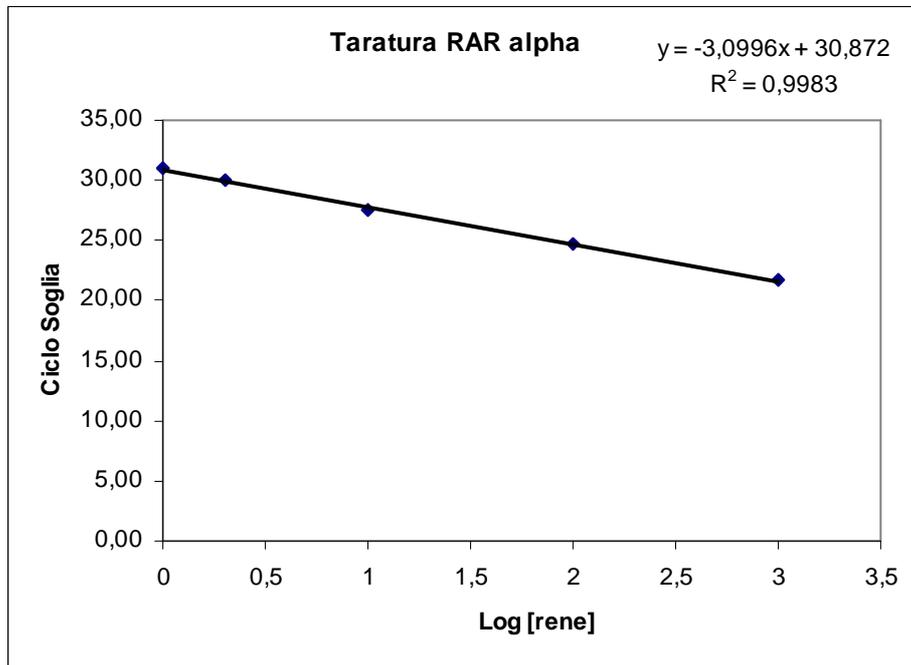
b)



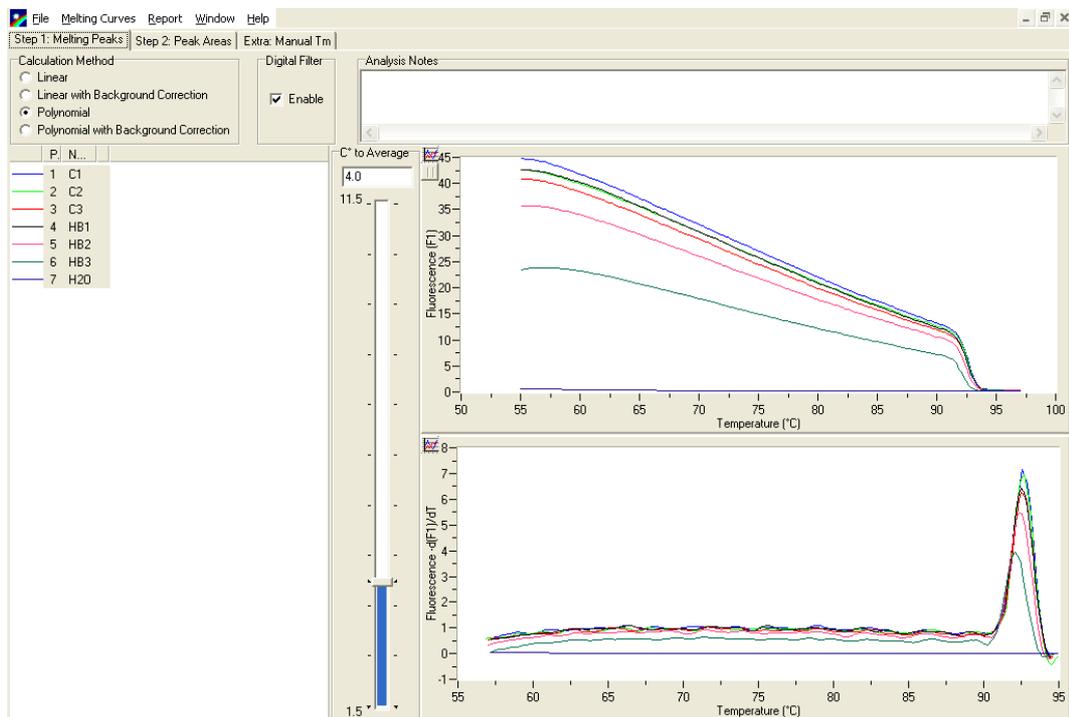
CD24



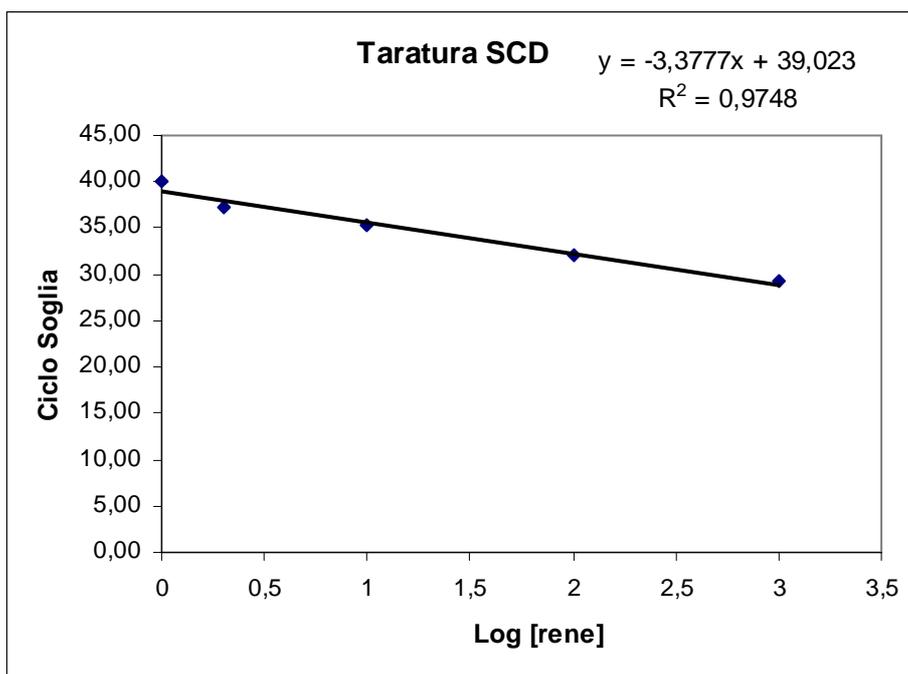
RAR alpha



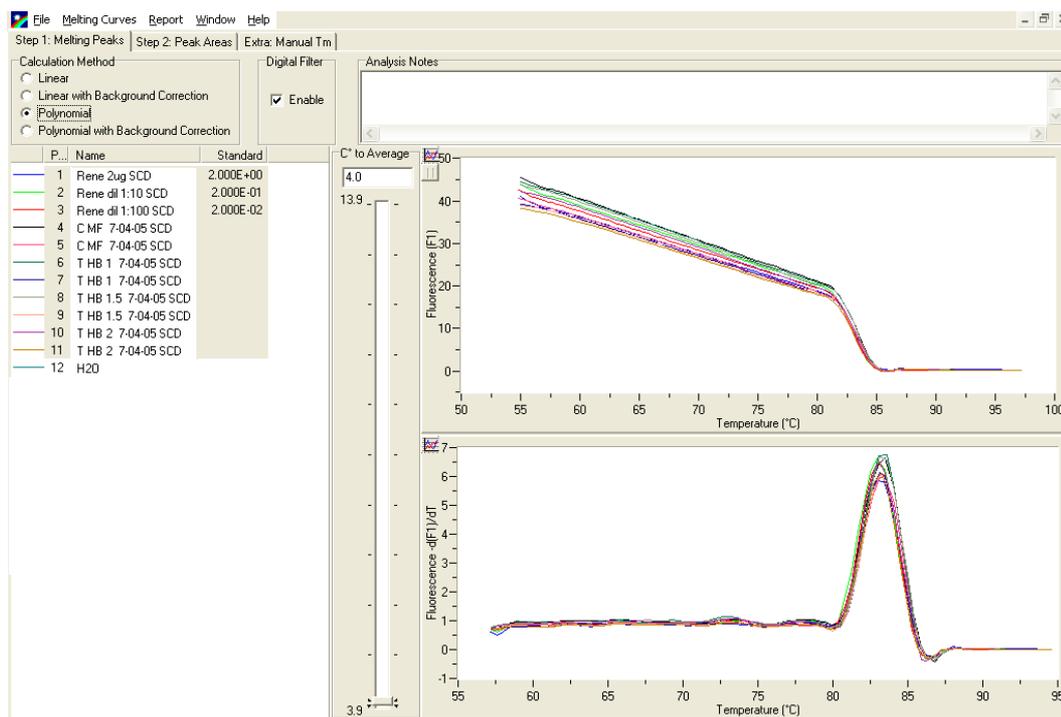
d)



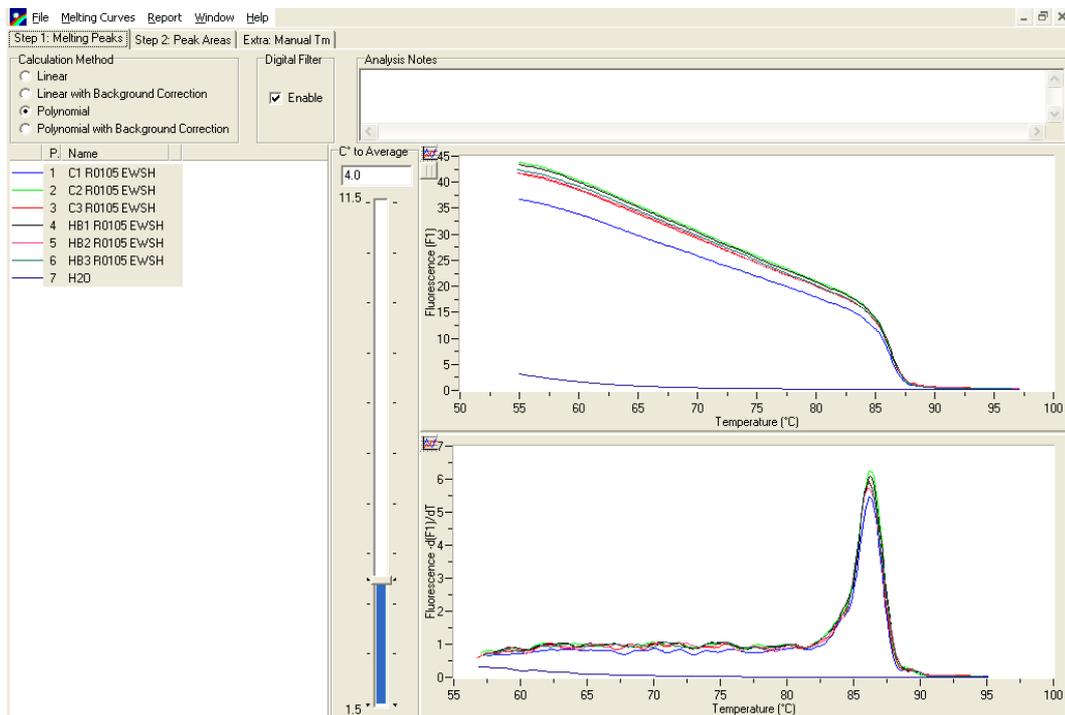
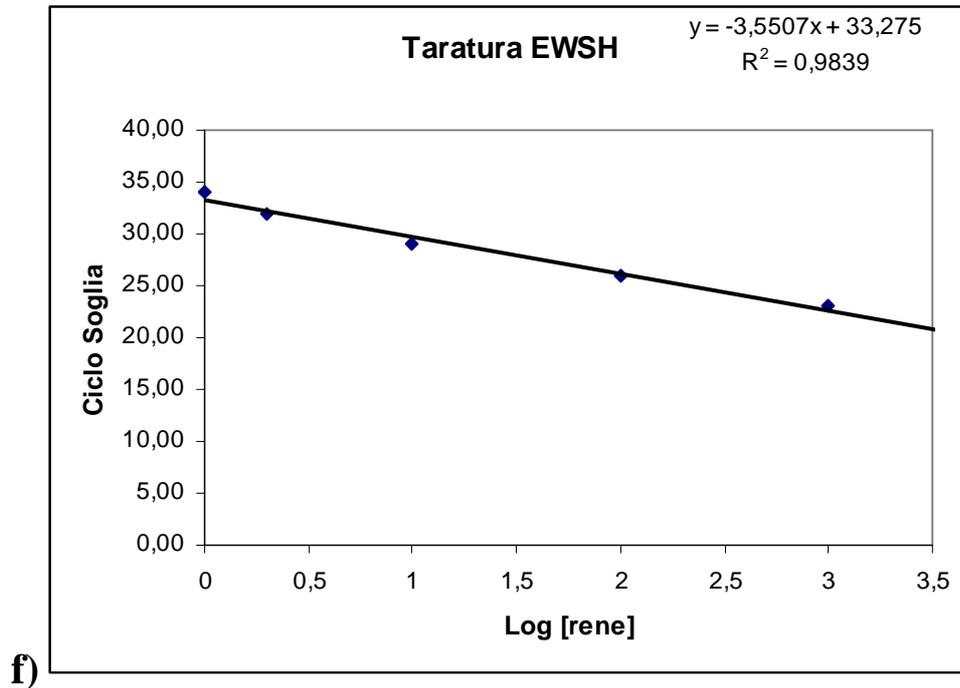
SCD



e)



EWSH



Cadherin 11

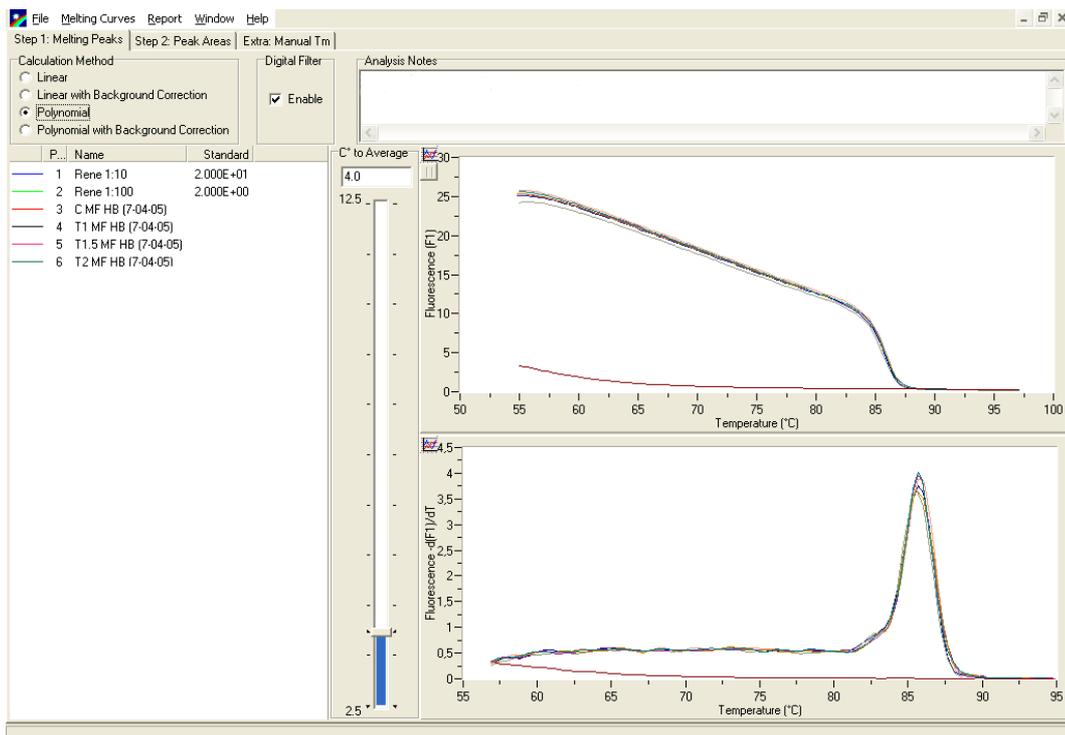
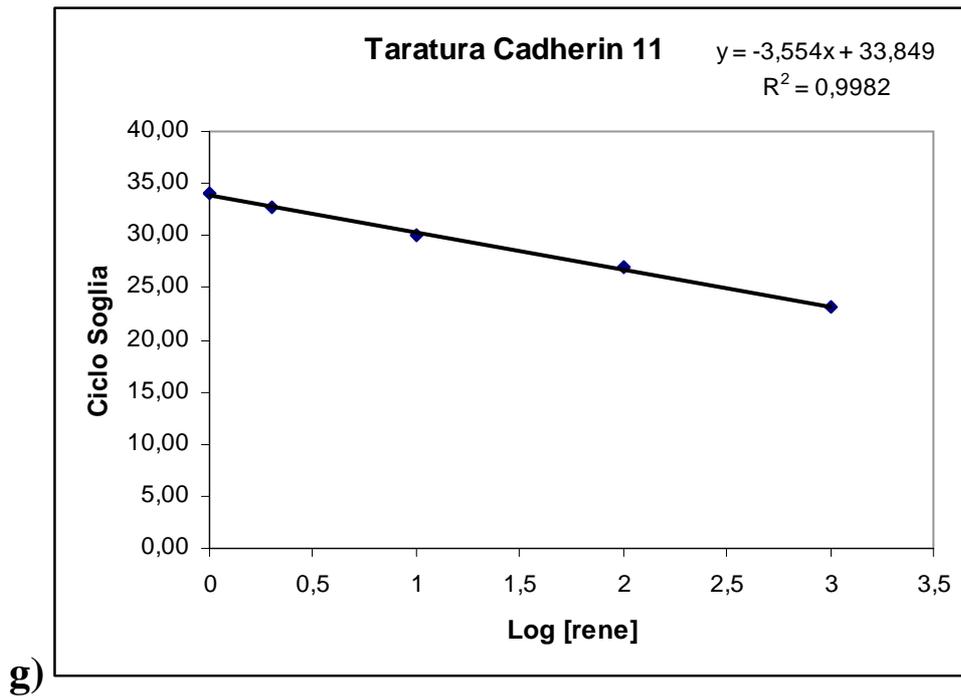


Fig. 4.19: Curva di calibrazione e di melting per i diversi geni: a) GAPDH, b) EWSH, c) Cadherin 11, d) CD24, e) RAR alpha, f) YWAQ, g) SCD.

Gene	GAPDH	EWSH	Cadherin11	CD24	RAR α	YWAQ	SCD
Efficienza	E=2.16	E=2.01	E=1.91	E=1.90	E=2.01	E=1.87	E=1.98

Tabella 4.5: Indicazione dei valori di efficienza ottenuti per i geni esaminati.

In Tabella 4.6 sono mostrati i valori di espressione genica ($R=2^{-\Delta\Delta C_t}$). La quantità di mRNA di ciascun gene nelle cellule di controllo è considerato pari a 1, mentre quello relativo alle cellule trattate con HB alle diverse concentrazioni è indicato come numero di volte (fold increase) superiore a questo valore.

	YWHAQ	SD	CD24	SD	RAR α	SD	SCD	SD	EWSH	SD	Cadherin 11	SD
HB 1g/l	1,29	±0,09	1,46	±0,45	1,86	±0,12	1,85	±0,35	11,19	±1,63	1,29	±0,16
HB 1.5g/l	1,84	±0,68	0,79	±0,32	1,51	±0,67	1,20	±0,29	0,90	±0,29	0,97	±0,11
HB 2g/l	2,58	±0,84	0,50	±0,11	1,21	±0,80	0,48	±0,32	0,90	±0,26	0,63	±,47
HB 3g/l	2,77	±0,61	1,03	±0,38	3,23	±0,94	1,03	±0,37	5,28	±1,20	0,61	±0,36

Tabella 4.6: Indicazione dell'espressione genica nelle cellule trattate rispetto a quelle di controllo.

Negli istogrammi in Fig 4.20 sono rappresentati i valori medi dei rapporti relativi di espressione tra trattato e controllo alle diverse concentrazioni di trattamento.

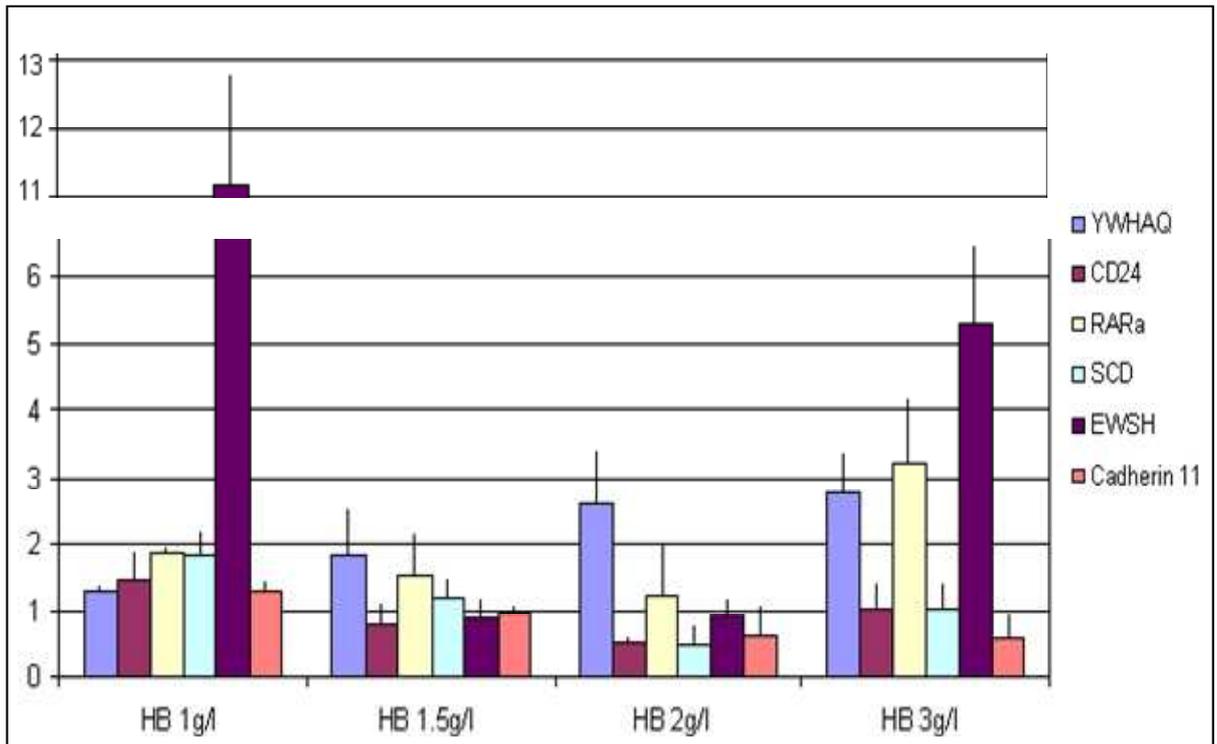


Fig. 4.20: Dati relativi all'espressione genica in seguito a trattamento delle FM-hMSC a diverse concentrazioni di HB.

L'analisi dei campioni mostra un aumento di espressione significativo ($p < 0,05$) in seguito a trattamento con HB, ad una concentrazione pari a 1g/l, di tutti i marker in esame, mentre utilizzando le altre concentrazioni si ha una variazione solo di alcuni dei geni studiati.

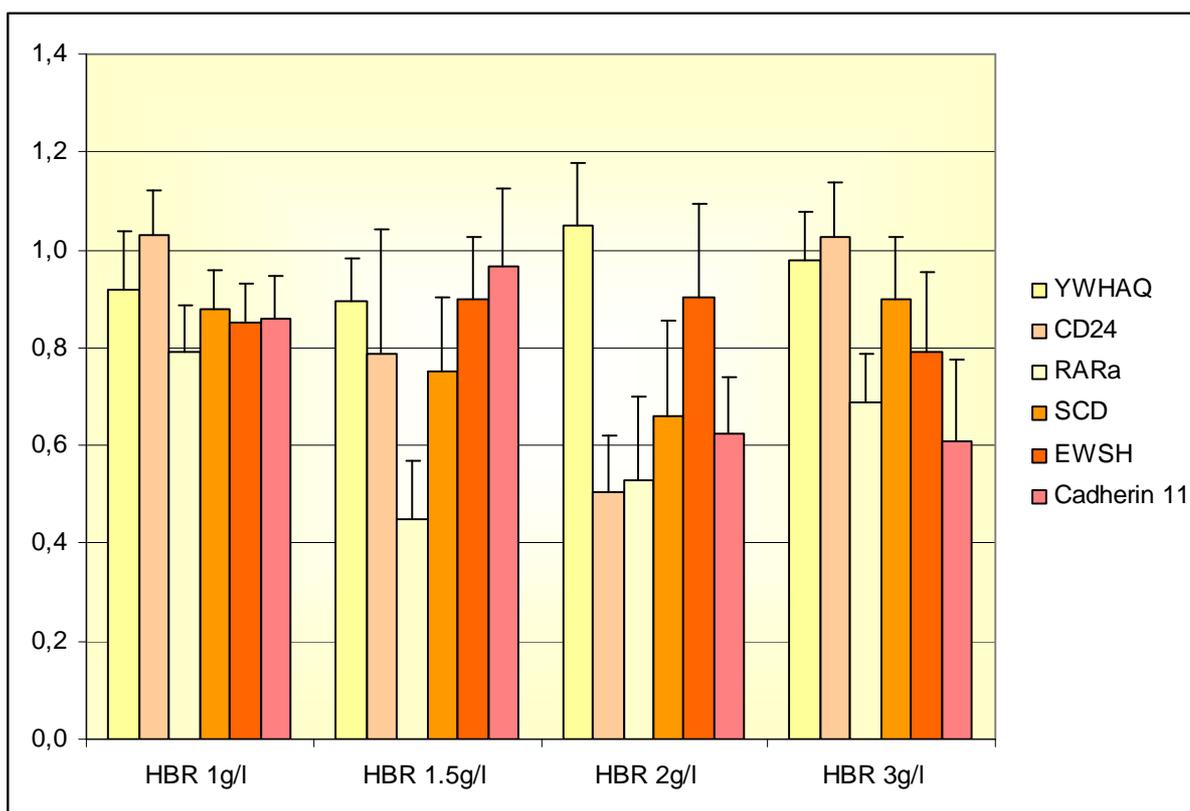


Fig. 4.21: Dati relativi all'espressione genica in seguito a trattamento delle FM-hMSC con HBR. I valori ottenuti sono calcolati come aumento dell'espressione rispetto al controllo, che per convenzione è posto=1.

Come mostrato dall'istogramma (Fig. 4.21) il trattamento con HBR non determina una variazione dei geni considerati, ma la loro espressione non differisce in maniera statisticamente significativa da quella delle cellule di controllo.

4.5 Differenziamento endoteliale

Per verificare la multipotenza delle FM-hMSC è stata valutata la loro capacità di transdifferenziare in cellule endoteliali. A questo scopo le cellule sono state trattate per 7 giorni con terreno addizionato di VEGF 50ng/ml. Al termine del trattamento sono state condotte delle analisi di immunofluorescenza al fine di

valutare la presenza del fattore di von Willebrand (vWF), che costituisce un marker endoteliale.

Le cellule coltivate per lo stesso periodo in terreno di coltura non condizionato sono risultate negative all'analisi, mentre quelle coltivate in presenza di VEGF presentavano positività all'anticorpo per il vWF. Si è potuto osservare a livello citoplasmatico una fluorescenza granulare, corrispondente ai caratteristici corpi di Weibel-Palade (Fig. 4.22). Le cellule positive erano circa il $70\pm 8\%$.

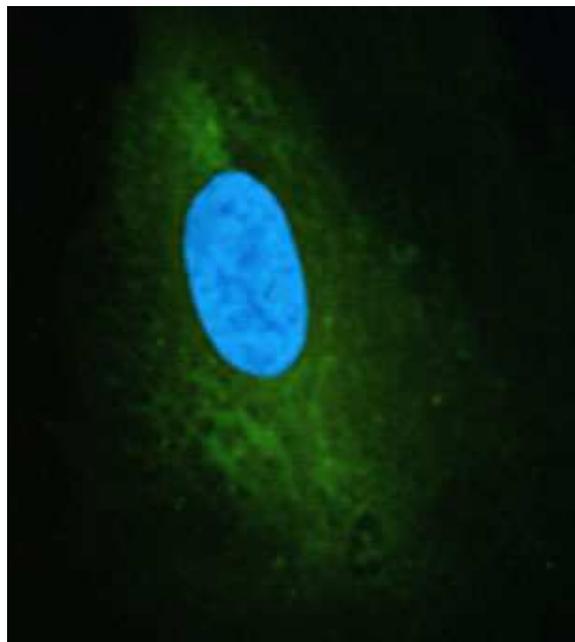


Fig. 4.22: Cellula FM-hMSC coltivata per 7 giorni in presenza di VEGF 50ng/ml in cui è visibile il vWF (fluorescenza verde) e i caratteristici corpi di Weibel-Palade. Il nucleo è colorato con DAPI (fluorescenza blu). Scala 20 μm .

4.6 Vasculogenesi

Nella prospettiva di un possibile futuro utilizzo delle cellule trattate con HB nella cura di patologie renali, è interessante valutare se tali cellule siano in grado di formare delle strutture capillari, in quanto il riparo endoteliale rappresenterebbe un importante traguardo nella prevenzione dello sviluppo di nefropatie renali croniche. Dal momento che era stata dimostrata la capacità delle

FM-hMSC di differenziare, in appropriati terreni di differenziamento, in cellule endoteliali, si è voluto indagare se le stesse cellule, trattate con HB, fossero in grado di formare delle strutture capillari-simili quando seminate in terreno semisolido.

Si è voluto prima di tutto valutare se le FM-hMSC esprimessero a livelli basali il gene del fattore di crescita vasculo-endoteliale (VEGF) una molecola che gioca un ruolo chiave nella vasculogenesi. È stata quindi effettuata una PCR utilizzando come controllo positivo mRNA di HUVEC (Human Umbelical Vein Endothelial Cells). La corsa su gel (Fig. 4.23) ha messo in evidenza la presenza del gene analizzato.



Fig. 4.23: Le MF-hMSC esprimono basalmente il gene di VEGF.

Essendo noto che la produzione e il rilascio di VEGF, in seguito ad opportuni stimoli, avviene entro alcune ore, le cellule sono state trattate con l'estere al momento della semina. In tabella 4.7 sono riportati i trattamenti utilizzati.

Trattamento	Concentrazione
C	-
HB	1mg/ml
VEGF	50ng/ml
VEGF 7gg	50ng/ml ogni 48h

Tabella 4.7: Schema dei trattamenti a cui sono state sottoposte le FM-hMSC per le prove di vasculogenesi.

“VEGF 7gg” indica un pretrattamento delle cellule a confluenza per una settimana con VEGF, che in letteratura (Oswald J. et al., 2004) è indicato come

induttore del differenziamento endoteliale a una concentrazione di 50ng/ml, quando aggiunto al terreno ogni 2 giorni. Gli altri trattamenti sono stati effettuati contemporaneamente alla semina in Matrigel. Le cellule sono state osservate al microscopio ottico a intervalli di un'ora fino ad un massimo di 24 ore.

Per quanto riguarda le cellule di controllo (C), solo dopo 8 ore hanno cominciato a migrare, allinearsi e formare collegamenti (fig. IV.2).

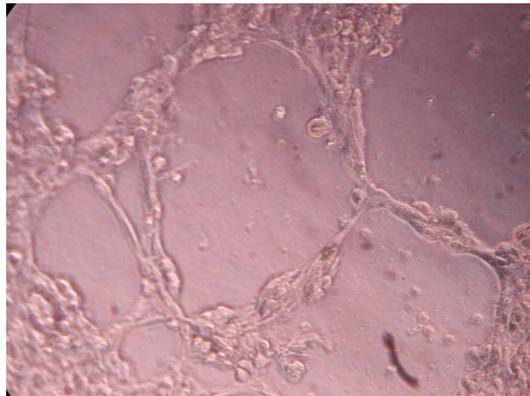


Figura 4.24: Cellule di controllo a 8 ore dopo semina su Matrigel, fotografate al microscopio rovesciato con obiettivo 20X.

Le MSC trattate in acuto con HB e VEGF e pretrattate per sette giorni con VEGF hanno mostrato vasculogenesi rispettivamente dopo 3 ore, 5 ore e 8 ore (Fig. 4.25, 4.26, 4.27).

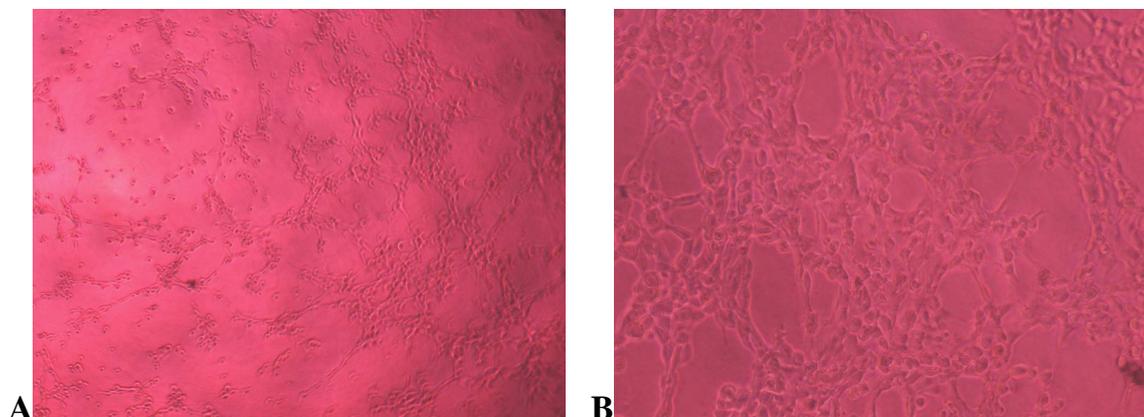


Fig. 4.25: Cellule trattate con VEGF 50ng/ml a 5 ore dalla semina su Matrigel, fotografate al microscopio rovesciato con obiettivo 4X (A) e 10X (B).

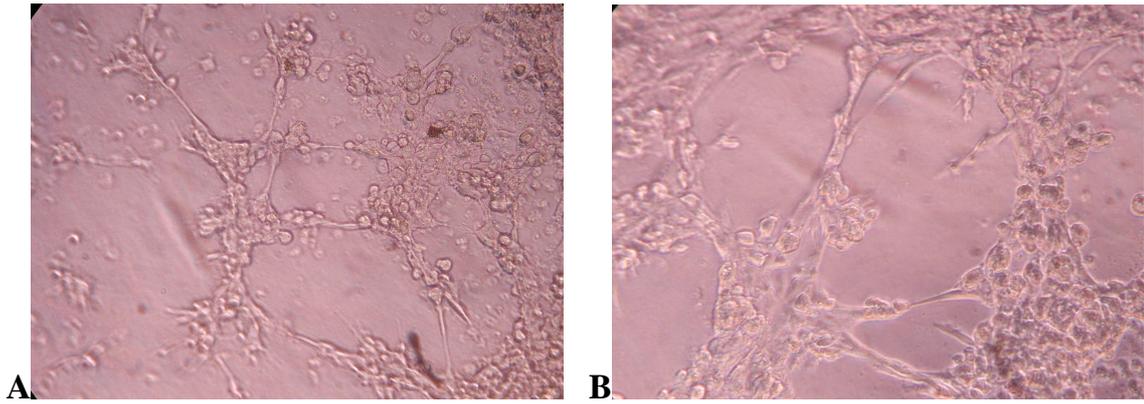


Fig. 4.26: Cellule pretrattate con VEGF 50ng/ml per una settimana a 8 ore dalla semina su Matrigel, fotografate al microscopio rovesciato con obiettivo 10X (A) e 20X (B).

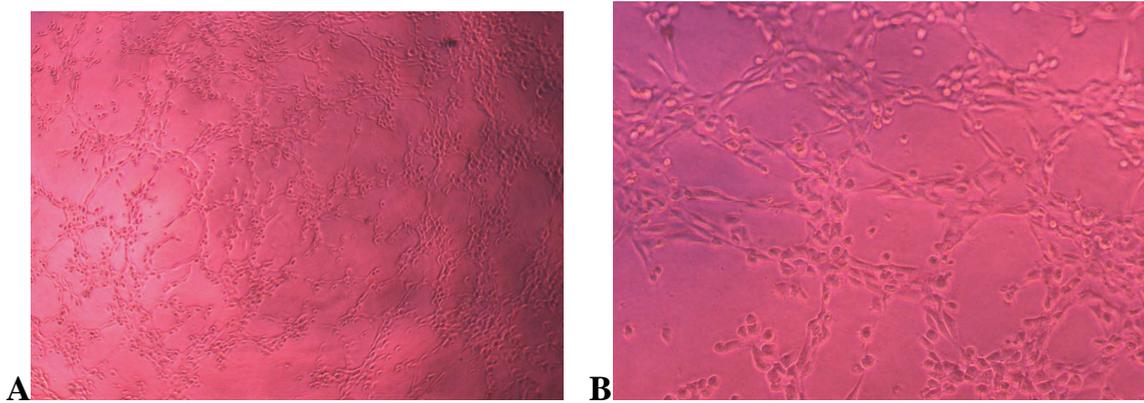


Fig. 4.27: Cellule trattate con HB 1mg/ml a 3 ore dalla semina su Matrigel, fotografate al microscopio rovesciato con obiettivo 4X (A) e 10X (B).

Discussione

La distruzione di un tessuto, come quella riscontrata nelle malattie renali croniche e nell'insufficienza renale terminale, è alla base della maggioranza delle patologie che affliggono la popolazione. I pazienti affetti da insufficienza renale cronica devono sottoporsi a trattamento dialitico, con conseguenti gravi complicazioni sulla qualità e l'aspettativa di vita, senza considerare i pesanti costi sociali. Al momento, la soluzione terapeutica migliore è il trapianto d'organo, ma con due limiti fondamentali: la scarsità di organi da trapiantare e la necessità di immunosoppressione cronica per prevenire il rigetto.

In quest'ottica, la possibilità di disporre di una sorgente che ci permetta di ottenere grandi quantità di tutti i tipi cellulari dei tessuti, come quella rappresentata dalle cellule staminali, apre nuovi scenari terapeutici per l'approccio a patologie cronico-degenerative, come le patologie renali. La messa a punto di un modello di differenziamento nefrogenico *in vitro* potrebbe dunque rappresentare la base di una terapia riparativa per rallentare l'evoluzione verso il danno renale progressivo.

La terapia cellulare costituisce oggi un interessante obiettivo per il trattamento dell'insufficienza renale. L'idea alla base della terapia cellulare è coadiuvare il processo fisiologico di riparo attraverso il trapianto di cellule esogene che siano strutturalmente e funzionalmente congruenti alla logica tissutale renale.

Le cellule staminali, coltivate *in vitro* e indirizzate a differenziare in tipologie cellulari specifiche, costituirebbero una sorgente rinnovabile di cellule, ovviando al problema della disponibilità di organi. La possibilità di disporre di cellule staminali in grado di rigenerare il danno renale rappresenterebbe una prospettiva molto importante per la prevenzione e la terapia di eventuali danni renali.

In questo ambito l'attenzione è stata posta dapprima sulle cellule staminali adulte del midollo osseo. Numerosi studi infatti hanno evidenziato la capacità delle cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo di rimpiazzare cellule renali adulte specializzate sia in modelli animali che nell'uomo; nel caso

degli esperimenti sull'uomo si è dimostrata la presenza di cellule di derivazione midollare nel rene, mentre nel caso degli studi *in vivo* sull'animale, è stata dimostrata la loro capacità di migliorare la funzionalità renale in seguito a danno ischemico.

Sebbene tale popolazione cellulare mesenchimale sia caratterizzata da un buon potenziale proliferativo, alta stabilità genetica e capacità di migliorare il processo rigenerativo di molti tessuti (Pittenger et al. 2004), vi sono una serie di problematiche che ne limitano le possibili applicazioni cliniche tra cui la tendenza ad invecchiare, ad accumulare infezioni e una bassa capacità proliferativa *in vitro* (Rao et al. 2001).

Ciò ha spinto la ricerca alla caratterizzazione di fonti mesenchimali alternative nei tessuti adulti in grado di superare i limiti imposti dalle cellule mesenchimali del midollo osseo.

In questo studio è stata utilizzata, come fonte di cellule mesenchimali, la membrana fetale di placenta a termine, una popolazione eterogenea costituita da elementi cellulari coriali ed amniotici. L'uso della popolazione cellulare mesenchimale della membrana fetale e degli altri annessi embrionali fornisce sicuramente delle prospettive molto interessanti: protocolli con cellule autologhe risultano essere difficoltosi a causa della necessità di ottenere biopsie dai pazienti, espandere le cellule in coltura, effettuare dei test sulla popolazione ottenuta e conservarla adeguatamente prima della somministrazione della terapia; con l'uso di cellule mesenchimali allogene, al contrario, il donatore può essere scelto con anticipo, esaminato e analizzato per caratterizzare la popolazione di MSC al fine di escludere disfunzioni, e la popolazione cellulare terapeutica può essere immediatamente disponibile per la somministrazione in caso di necessità. Le proprietà tollerogeniche delle cellule mesenchimali, inoltre, rendono queste cellule strumenti d'elezione in terapia cellulare e compatibili con efficienti protocolli terapeutici. Appare interessante, dunque, la possibilità di creare banche di cellule mesenchimali derivate da annessi fetali e placente a termine, altrimenti destinati all'eliminazione.

In questa tesi vengono descritti gli effetti che il trattamento con un monoestere di acido ialuronico e butirrico (HB) ed un estere misto dell'acido ialuronico con acido butirrico e retinoico (HBR), nell'ambito dei processi nefrogenetici, provoca su una popolazione di cellule mesenchimali di membrana fetale.

HB e HBR rappresentano molecole innovative a “logica differenziativa”, il cui razionale si basa sulla capacità dello ialuronato di essere internalizzato attraverso il suo specifico recettore CD44 e di agire a livello intracellulare come “scaffold” per l'ancoraggio e la traslocazione nucleare di chinasi e di molecole segnale implicate nel differenziamento. Lo ialuronato agisce, dunque, come “carrier” per l'internalizzazione delle entità chimiche ad esso collegate e, a livello intracellulare, questo processo si traduce in una sequenza concertata di modificazioni epigenetiche, mediate dal butirrato (rilassamento della cromatina e ingresso di fattori di trascrizione tessuto-specifici) e di eventi trascrizionali, come quelli indotti dall'acido retinoico e dai suoi specifici recettori.

Le cellule isolate da membrana fetale di placenta a termine sono state espanse e caratterizzate al citofluorimetro per confermare un profilo di membrana mesenchimale (CD29+, CD166+, CD73+, CD90+, CD105+, CD44+, CD34-, CD45-, CD14-). I dati ottenuti evidenziano che il profilo antigenico delle hFM-MSK è analogo a quello delle hBM-MSK. In particolare la presenza del recettore per l'acido ialuronico CD44 in più del 95% delle cellule, rafforza il razionale nell'utilizzo di HBR. Per dimostrare la natura mesenchimale della popolazione isolata, le cellule sono state trattate con specifici terreni arricchiti di appositi fattori di crescita, che hanno determinato il differenziamento in osteociti, adipociti e condrociti.

Le cellule sono state sottoposte a trattamento con diverse concentrazioni di HB o HBR. Per stabilire se fosse avvenuto un differenziamento nefrospecifico è stata eseguita un'analisi dell'espressione genica.

L'espressione dei geni Cadherin 11, CD 24, RAR-alpha, stearoyl-CoA desaturase 2, 14-3-3 θ , Ewing sarcoma homolog, è stata analizzata quantificando i livelli trascrizionali mediante l'uso della metodica di Real Time RT-PCR.

Questi geni vengono espressi ai primi stadi di differenziamento nefrogenico, a livello del mesenchima metanefrico.

L'analisi di Real Time RT-PCR rivela che il trattamento con HBR delle cellule mesenchimali delle membrane fetali non porta ad un aumento significativo ($p < 0,05$) di espressione dei geni al giorno 7 di trattamento. Questo risultato era parzialmente atteso, in quanto precedenti esperimenti di induzione di differenziamento cardiogenico avevano dimostrato una selettività d'azione di questo estere nell'indurre cardiogenesi. Abbiamo comunque ritenuto utile testare la molecola anche per il differenziamento renale, in quanto l'acido retinoico svolge un ruolo fondamentale durante lo sviluppo renale. Il risultato ottenuto può essere comunque spiegato con il fatto che una somministrazione di acido retinoico può determinare una down-regulation del proprio recettore, ed anche del gene SCD, come noto dalla letteratura. Il calo di espressione anche di soli due geni ci porta a concludere, in questo caso, che la molecola non determini un differenziamento nefrogenico, che può essere testimoniato solo dalla presenza simultanea di tutti e sei i geni in esame.

Per quanto riguarda il trattamento con HB alle diverse concentrazioni testate, si è ottenuto che i livelli di trascrizione di tutti i geni considerati aumenta in modo significativo alla concentrazione di 1mg/ml.

Basandosi sul fatto che il riparo endoteliale rappresenterebbe un importante traguardo nella prevenzione dello sviluppo di nefropatie renali croniche, è stata valutata la capacità di differenziamento endoteliale *in vitro* delle FM-hMSC sottoposte all'azione di HB. Le cellule sono state trattate con l'estere al momento della semina in terreno semisolido (Matrigel) in quanto è noto che la produzione e il rilascio di VEGF, la molecola che gioca un ruolo chiave nei processi vasculogenetici, avviene entro alcune ore dallo stimolo induttivo. Si è potuto osservare che FM-hMSC trattate con HB 1mg/ml, migrano e si allineano nel matrigel a formare organizzazioni capillari-simili già dopo 3-4 ore, a differenza delle cellule di controllo che cominciano solo dopo 8 ore e in misura minore.

I risultati presentati dimostrano quindi che il trattamento con HB 1mg/ml risulta essere quello più efficace nell'aumentare i livelli di espressione dei marker

metanefrici considerati, dimostrando la possibilità di utilizzare un composto chimico per modificare l'espressione genica di geni nefro-specifici. Questi risultati, unitamente all'evidenza che il trattamento è in grado di indurre anche un differenziamento endoteliale, aprono la strada a nuovi approcci nella rigenerazione cellulare in seguito a danno renale.

Pur essendo evidenti gli effetti biologici che HB induce sulle cellule mesenchimali in esame, la caratterizzazione degli effetti biomolecolari con cui l'estere agisce non sono ancora ben chiari e fanno parte dei futuri obiettivi di questi studi.

Pur costituendo una popolazione omogenea per i marker caratteristici del profilo fenotipico mesenchimale, descritto da Pittenger et al., le cellule della membrana fetale costituiscono comunque una popolazione eterogenea di elementi coriali e amniotici. Un ulteriore obiettivo dei nostri studi sarà caratterizzare tali elementi cellulari ed evidenziare, eventualmente, quale componente presenta peculiarità più idonee ai programmi sperimentali progettati.

Infine, sarà indispensabile in futuro effettuare degli studi *in vivo*, su vari modelli animali, prima di poter ideare un qualsiasi protocollo sperimentale di trattamento sull'uomo.

Bibliografia

- **Alhadlaq, Mao.**
Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics.
Stem Cells Dev. Aug;13(4):436-48. (2004).
- **Alviano, Fossati, Marchionni, Arpinati, Bonsi, Franchina, Lanzoni, Cantoni, Cavallini, Bianchi, Pasquinelli, Foroni, Ventura, Grossi, Bagnara.**
Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells.
Development in press
- **Anker, Scherjon, Kleijburg-van der Keur, Groot-Swings, Claas, Fibbe, Kanhai.**
Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta.
Stem Cells; 22(7): 1338-45. (2004).
- **Araya, Hirota, Shimamoto, Miyagishi, Yoshida, Ishida, Kaneko, Kaneko, Nakajima, Fukamizu.**
Cooperative interaction of EWS with CREB-binding protein selectively activates hepatocyte nuclear factor 4-mediated transcription.
J Biol Chem. Feb 14;278(7):5427-32. (2003).
- **Bailo, Soncini, Vertua, Signoroni, Sanzone, Lombardi, Arienti, Calamani, Zatti, Paul, Albertini, Zorzi, Cavagnini, Candotti, Wengler, Parolini.**
Engraftment potential of human amnion and corion cells derived from term placenta.
Transplantation (2004).
- **Baksh, Song, Tuan.**
Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation and application in cell and gene therapy.
J Cell Mol Med. 301-316. (2004).
- **Bartholomew, Patil, Mackay, Nelson, Buyaner, Hardy, Mosca, Sturgeon, Siatskas, Mahmud, Ferrer, Deans, Moseley, Hoffman, Devine.**
Baboon mesenchymal stem cell can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo.
Gene Ther. 1527-1541. (2001).
- **Bates.**
Kidney development: regulatory molecules crucial to both mice and men.
Mol Genet Metab. Sep-Oct;71(1-2):391-6. (2000).
- **Batourina, Gim, Bello, Shy, Clagett-Dame, Srinivas, Costantini, Mendelsohn.**
Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression.
Nat Genet. Jan;27(1):74-8. (2001).
- **Benzinger, Muster, Koch, Yates, Hermeking.**
Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer.
Mol Cell Proteomics. Jun;4(6):785-95.(2005).
- **Bussolati, Bruno, Grange, Buttiglieri, Deregibus, Cantino, Camussi.**
Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney.
Am J Pathol. Feb;166(2):545-55 (2005).
- **Bustin.**
Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.
Journal of molecular Endocrinology (2000).

-
- **Carmeliet, Lampugnani, Moons, Breviario, Compornelle, Bono, Balconi, Spagnuolo, Oostuyse, Dewerchin, Zanetti, Angellilo, Mattot, Nuyens, Lutgens, Clotman, de Ruiter, Gittenberger-de Groot, Poelmann, Lupu, Herbert, Collen, Dejana.**
Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis.
Cell. 98: 147–157 (1999).
 - **Cèbe-Suarez, Zehnder-Fjällman, Ballmer-Hofer.**
The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships.
Cell. Mol. Life Sci. **63**: 601-615 (2006).
 - **Challen, Martinez, Davis, Taylor, Crowe, Teasdale, Grimmond, Little.**
Identifying the Molecular Phenotype of Renal Progenitor Cells.
J Am Soc Nephrol 15: 2344–2357, (2004).
 - **Cho, Patterson, Brookhiser, Mah, Kintner, Dressler.**
Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development.
Development. Mar;125(5):803-12 (1998).
 - **Coradini, Biffi, Costa, Pellizzaro, Pirronello, Di Fronzo.**
Effect of sodium butyrate on human breast cancer cell lines.
Cell Prolif (1997).
 - **Coradini, Zorzet, Rossin, Scarlata, Pellizzaro.**
Inhibition of Hepatocellular Carcinomas in vitro and Hepatic Metastases in vivo Mice by histone deacetylase inhibitor HA-But.
Clinica Cancer Research (2004).
 - **Cullen-McEwen, Caruana, Bertram.**
The where, what and why of the developing renal stroma.
Nephron Exp Nephrol.;99(1):e1-8 (2005).
 - **D’Ippolito, Schiller, Ricordi, Roos, Howard.**
Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal cells from human vertebral bone marrow.
J Bone Miner Res (1999).
 - **Frassoni, Mosely.**
Expanded MSCs, coinfused with HLA identical hemopoietic stem cells transplants, reduce acute and chronic graft versus host disease.
Bone Marrow Transplant (2002).
 - **Fu, Subramanian, Masters.**
14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2000. 40:617–47. (2000)
 - **Gilbert Scott.**
“*Developmental biology*”,
6°edizione 2000 Sinauer Associates, Inc. Sunderland (MA) .
 - **Golden.**
Amniotic fluid cell types and culture.
Br Med Bull (1983).
 - **Goomer, Maris, Amiel.**
Age-related changes in the expression of cadherin-11, the mesenchyme specific calcium-dependent cell adhesion molecule.
Calcif Tissue Int. Jun;62(6):532-7 (1998).

-
- **Gotherstrom, Ringden, Tammik, Zetterberg, Westgren, LeBlanck.**
Immunological properties of human fetal mesenchymal stem cells.
Am J Obstet Gynecol (2004).
 - **Gregory, Singh, Perry, Prockop.**
The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrows.
J Biol Chem (2003).
 - **Gronthos, Simmons.**
Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow,
J Cell Sci (2003).
 - **Gudas, Sporn, Roberts.**
The Retinoids: biology, chemistry and medicine.
Raven Press (1994).
 - **Gumbiner.**
Regulation of cadherin adhesive activity.
J Cell Biol. Feb 7;148(3):399-404. (2000).
 - **Hascall.**
Hyaluronan: Structure and physical properties.
<http://www.glycoforum.gr.jp> (1997).
 - **Hoyes.**
Ultrastructure of the mesenchymal layers of the human amnion in early pregnancy.
Am J Obstet Gynecol (1970).
 - **Huber, Hartleben, Kim, Schmidts, Schermer, Keil, Egger, Lecha, Borner, Pavenstadt, Shaw, Walz, Benzng.**
Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling.
Mol Cell Biol. Jul;23(14):4917-28 (2003).
 - **Jiang, Jahagirdar, Reinhardt, Schwartz, Keene, Ortiz-Gonzalez, Reyes, Lenvik, Lund, Blackstad, Du, Aldrich, Lisberg, Low, Largaespada, Verfaillie.**
Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult bone marrow.
Nature (2002).
 - **Karge, Schaefer, Ordovas.**
Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method.
Methods in Molecular Biology (1998).
 - **Kii, Amizuka, Shimomura, Saga, Kudo.**
Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage.
J Bone Miner Res. Nov;19(11):1840-9 (2004).
 - **Kim, Pelletier.**
Molecular genetics of chromosome translocations involving EWS and related family members.
Physiol Genomics. Nov 11;1(3):127-38 (1999).
 - **Kinnaird, Stabile, BurnettEpstein.**
Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanism,
Circ Res (2004).

-
- **Korbling.**
Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept?.
The New England Journal of Medicine (2003).
 - **Korbling.**
Adult stem cells for tissue repair.
New England Journal of Medicine (2003).
 - **Krause, Theise, Collector, Henegariu, Hwang, Gardner, Neutzel, Sharkis.**
Multi-organ multi-lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell.
Cell (2001).
 - **Kubo, Sonoda, Muramatsu, Usui.**
Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2001.
 - **Lange, Togel, Ittrich, Clayton, Nolte-Ernsting, Zander, Westenfelder.**
Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats.
Kidney Int. Oct;68(4):1613-7 (2005).
 - **Levin, Sturzenbecker, Kazmer, Bosakowski, Huselton, Allenby, Speck, Kratzeisen, Rosenberger, Lovey.**
9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha.
Nature (1992).
 - **Liebler, Uberschar, Kubert, Brems, Schnitger, Tsukada, Zouboulis, Ritz, Wagner.**
The renal retinoid system: time-dependent activation in experimental glomerulonephritis.
Am J Physiol Renal Physiol. Mar;286(3):F458-65 (2004).
 - **Mackintosh.**
Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes.
Biochem J. Jul 15;381(Pt 2):329-42 (2004).
 - **Mareschi, Biasin, Piacibello, Aglietta, Madon, Fagioli.**
Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood.
Haematologica (2001).
 - **Marks, Richon, Breslow, Rifkin.**
Histone deacetylase inhibitors as a new cancer drugs.
Curr Opin Oncol (2001).
 - **Masuda, Kalka, Asahara.**
Endothelial progenitor cells for regeneration.
Hum Cell (2000).
 - **McConnell, Armstrong, Hodges, Bard.**
The mouse 14-3-3 epsilon isoform, a kinase regulator whose expression pattern is modulated in mesenchyme and neuronal differentiation.
Dev Biol. May;169(1):218-28 (1995).
 - **McCUE, Gubler, Sherman, Cohen.**
Sodium butyrate induces histone hiperacetylation and differentiation of murine embryonal carcinoma cells.
J of Cell Biol (2005).

-
- **McIntosh, Bartolomew.**
Stromal cell modulation of Immune system: a potential role of mesenchymal stem cells.
Graft. 324-328 (2000)
 - **Meeker, Coffey.**
Telomerase: a promising marker of biological immortalità of germ, stem, and cancer cells.
Biochemistry (1997).
 - **Mendelsohn, Batourina, Fung, Gilbert, Dodd.**
Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development.
Development. Mar;126(6):1139-48 (1999).
 - **Mendelsohn, Ruberte, Chambon.**
Retinoid receptors in vertebrate limb development.
Dev Biol. (1992).
 - **Mitchell, Weiss, Mitchell, Martin, Davis, Morales, Helwig, Beerenstrauch, Abou-Easa, Hildreth, Troyer, Medicetty.**
Matrix Cells from Wharton's Jelly form neurons and glia.
Stem Cells (2003).
 - **Moore, Persaud.**
The developing human: clinically oriented embriology.
Philadelphia, Saunders Company (1998).
 - **Muraglia, Cancedda, Quarto.**
Clonal mesenchimal progenitors from human bone marrow differenziate in vitro according to a hierarchical model.
J Cell Sci (2000).
 - **Ntambi.**
The regulation of stearyl-CoA desaturase (SCD).
Prog Lipid Res.;34(2):139-50 (1995).
 - **Ogawa, Oku, Sawano, Yamaguchi, Yazaki, Shibuya.**
A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain.
J. Biol. Chem. 273: 31273–31282 (1998).
 - **Pendelton, Guinan.**
Suppression of allogenic T- cell proliferation by human marrow stromal cells: implication in transplantation,
Transplantation (2003).
 - **Pittenger, Marshack.**
Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal
Stem Cells, Science (2004).
 - **Platt, LeBien, Michael.**
Stages of renal ontogenesis identified by monoclonal antibodies reactive with lymphohemopoietic differentiation antigens.
J Exp Med. Jan 1;157(1):155-72 (1983).
 - **Rao, Mattson.**
Stem Cells and aging. Expanding the possibilities.
Mech Ageing Dev (2001).

-
- **Ricardo, Deane.**
Adult stem cells in renal injury and repair.
Nephrology (Carlton). Jun;10(3):276-82 (2005).
 - **Ryan, Barry, Murphy, Mahon.**
Mesenchymal stem cells avoid allogenic reaction.
J of Inflammation. 2-8. (2005).
 - **Sagrinati, Netti, Mazzinghi, Lazzeri, Liotta, Frosali, Ronconi, Meini, Gacci, Squecco, Carini, Gesualdo, Francini, Maggi, Annunziato, Lasagni, Serio, Romagnani, Romagnani.**
Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys.
J Am Soc Nephrol. Sep;17(9):2443-56 (2006).
 - **Saito, Kuang, Bittira, Al-Khaldi.**
Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells.
Ann Thorac Surg (2002).
 - **Sato, Kanno, Oda, Abe, Ito, Shitara, Shibuya.**
Ann. NY Acad. Sci. **902**: 201-205(2000).
 - **Shibuya, Claesson-Welsh.**
Exp. Cell Res. **312**: 549-560. (2006).
 - **Summerbell, Maden.**
Retinoic acid, a developmental signalling molecule.
Trends Neurosci. (1990).
 - **Taguchi, Uchida, Kiyokawa, Mori, Sato, Horie, Takeda, Fujimoto.**
Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived cells.
Kidney Int. Jun;53(6):1681-8 (1998).
 - **Tammi, Rilla, Pienimaki, MacCallum, Hogg.**
Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism.
J of Biol Chem (2001).
 - **Ulloa-Montoya, Verfaillie Wei-Shou.**
Culture systems for pluripotent stem cell.
Journal of Bioscience and Bioengineering (2005).
 - **Ventura, Cantoni, Bianchi, Cavallini.**
Stem cells: a promise for cardiac repair.
Organs, tissues and cells Vol. 9 (3) November (2006).
 - **Ventura, Maioli, Asara, Santoni, Scarlata, Cantoni, Perbellini.**
Butyric and Retinoic mixed ester of hyaluronan.
J Biol Chem (2004).
 - **Wei, Zhang, Kawa, Aizawa, Ota Akaike, Kato, Konishi, Nikaido.**
Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice.
Cell Transplant (2003).
 - **Weigel.**
Bacterial hyaluronan synthases.
[Http://www.glycoforum.gr.jp](http://www.glycoforum.gr.jp) (1998).

-
- **Wheatley, Isake, Crossleu.**
Restricted expression of the hyaluronan receptor CD44 during postimplantation mouse embryogenesis suggest key roles in tissue formation and patterning.
Development (1993).
 - **Wright, Piatyszek, Rainey, Byrd, Shay.**
Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells.
Dev Genet (1996).
 - **Yokoo, Ohashi, Shen, Sakurai, Miyazaki, Utsunomiya, Takahashi, Terada, Eto, Kawamura, Osumi, Hosoya.**
Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues.
Proc Natl Acad Sci U S A. Mar 1;102(9):3296-300 (2005).
 - **Young, Black.**
Adult stem cells.
Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. Jan;276(1):75-102 (2004).
 - **Zhang, Chang, Zylka, Turley, Harrison, Turley.**
The Hyaluronan Receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase.
J of Biol Chem (1998).

Indice

Introduzione	1
1.1 Patologie renali e terapia cellulare.....	2
1.2 Le cellule staminali	3
1.2.1 Le cellule staminali adulte	6
1.3 Le cellule staminali mesenchimali umane (hMSC)	7
1.3.1 Caratterizzazione delle cellule staminali mesenchimali	8
1.3.2 Le cellule mesenchimali degli annessi embrionali.....	11
1.3.3 Le cellule mesenchimali della membrana fetale	11
1.3.4 Le MSC allogeniche e il sistema immunitario.....	13
1.4 Cellule staminali mesenchimali e rene.....	16
1.5 Marker di nefrogenesi	18
1.5.1 Le proteine 14-3-3 (YWHAQ).....	20
1.5.1.2 Regolazione del signaling intracellulare da parte di 14-3-3	23
1.5.1.2.1 Trasduzione del segnale mediato da Raf-1	23
1.5.1.2.2 Bad e vie di apoptosi.....	24
1.5.1.2.3 Cdc25 e controllo del ciclo cellulare	26
1.5.2 Cadherin-11	26
1.5.2.1 Meccanismi di regolazione delle caderine.....	28
1.5.2.2 Caderine e rene	28
1.5.3 EWSH.....	30
1.5.4 RAR.....	31
1.5.5 CD24.....	35
1.5.6 Stearoyl-CoA Desaturase (SCD).....	36
1.6 Vasculogenesi.....	37
1.6.1 Vasculogenesi e angiogenesi	37

1.6.2	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	38
1.6.3	VEGFR: i recettori del VEGF	39
1.6.4	KDR.....	43
1.7	Nefrogenesi: molecole a logica differenziativa	46
1.7.1	Nuove molecole a logica differenziativa: HB e HBR	47
1.7.2	Acido ialuronico	48
1.7.3	Il recettore CD44.....	50
1.7.4	Il butirrato.....	52
1.7.5	L'acido retinoico.....	55
1.7.6	HBR	56
	Scopo della tesi	57
	Materiali e Metodi	59
3.1	Isolamento di hMSC da membrana fetale	59
3.2	Espansione delle hMSC isolate da membrana fetale.....	60
3.3	Citometria a flusso	61
3.4	Caratterizzazione immunofenotipica	65
3.5	Test funzionali di differenziamento <i>in vitro</i>	65
3.6	“Population doubling”	67
3.7	Estrazione di RNA totale da cellule con metodo TRizol, quantificazione e valutazione qualitativa	71
3.7.1	Elettroforesi su gel dell'RNA.....	72
3.8	Trattamento con DNAsi.....	73
3.9	Retrotrascrizione (RT) dell'RNA	73
3.10	Reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction–PCR) ...	76
3.11	Elettroforesi su gel di agarosio	77

3.12	Real time RT-PCR	77
3.13	Immunofluorescenza	83
3.14	Saggio di vasculogenesi.....	85
	Risultati	86
4.1	Caratterizzazione immunofenotipica	86
4.2	Test funzionali di differenziamento <i>in vitro</i>	91
4.3	Curva di crescita	93
4.4	Espressione genica in cellule trattate con HB e HBR	94
4.4.1	Valutazione della scala di concentrazione per HB.....	94
4.4.2	Estrazione mRNA	95
4.4.3	Retrotrascrizione e valutazione del retrotrascritto	96
4.4.4	Real time RT-PCR	97
	Costruzione delle curve a concentrazioni standard	97
4.5	Differenziamento endoteliale	107
4.6	Vasculogenesi.....	108
	Discussione	112
	Bibliografia	117