

Scuola di Dottorato in Scienze Mediche e Chirurgiche Cliniche

Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche: Scienze Morfologiche Umane e Molecolari

Settore concorsuale di afferenza 05/H1

Settore Scientifico disciplinare BIO/16

***STUDIO DEL RUOLO DELLA PROTEIN CHINASI B/AKT
NELLA MIGRAZIONE DI
CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE***

Presentata da: *Dott.ssa Zrinka Bulj*

Relatori

Chiar.mo Prof. Nadir Mario Maraldi

Chiar.ma Prof.ssa Sandra Marmioli

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Lucio Ildebrando Cocco

Correlatore

Dott. Enrico Lucarelli

XXV CICLO

Esame finale anno 2013

INDICE	1
ABBREVIAZIONI	4
ABSTRACT	5
RIASSUNTO	6
INTRODUZIONE	7
1. Cellule Stromali Mesenchimali (Mesenchymal Stromal Cells, MSC)	7
1. 1. Biologia delle Cellule Stromali Mesenchimali	7
1. 2. Applicazioni cliniche delle Cellule Stromali Mesenchimali	9
2. Migrazione delle Cellule Stromali Mesenchimali	11
2. 1. Il network migratorio	11
2. 2. I meccanismi migratori	14
3. I fenomeni migratori:	15
3. 1. Mobilizzazione e Homing delle Cellule Stromali Mesenchimali	15
4. Via di segnale PI3K/Akt	17
4. 1. Struttura della protein chinasi B/Akt	17
4. 2. Funzioni fisiologiche di Akt	18
4. 3. Regolazione della via di segnale PI3K/Akt	20
4. 4. PI3K/Akt e il controllo della progressione del ciclo cellulare	23
4. 5. PI3K/Akt e il metabolismo cellulare	24
5. PI3K/Akt come “druggable target”	26
5. 1. Inibitori farmacologici	26
6. Il ruolo della chinasi Akt nella regolazione del traffico cellulare	28
OBIETTIVO DELLA RICERCA	29
MATERIALE E METODI	30
1. Coltura cellulare	30
2. Saggio CFU (Unità Formanti Colonie)	33
3. Cinetica di proliferazione cellulare	34
4. Test funzionali di differenziamento cellulare	35
5. Trattamenti con gli Inibitori di PI3K e Akt	37
6. Saggio di citotossicità	38
7. Citometria a flusso	40
8. Saggio di motilità cellulare	40
9. Saggio di migrazione	41
10. Saggio di Western blotting	42
11. Saggio di vitalità cellulare	43
12. Immunocitochimica	44
13. Live imaging (Time Lapse)	45
14. Analisi statistica dei dati	46

RISULTATI	47
<i>L'inibizione della via di segnale PI3K/Akt attiva il rimodellamento del citoscheletro actinico nelle hMSC</i>	47
<i>La via di segnale PI3K/Akt è in grado di modulare sia la migrazione che la motilità delle hMSC</i>	50
<i>L'inibizione della isoforma Akt2 compromette la migrazione delle hMSC</i>	56
DISCUSSIONE	60
BIBLIOGRAFIA	62

ABBREVIAZIONI

α -MEM	Alpha Minimum Essential Medium
BCA	Bicinchoninic Acid Protein Assay
BSA	Bovine Serum Albumin
BM	Bone Marrow
BM-MSC	Bone Marrow - Mesenchymal Stromal Cells
CFU	Colony Forming Unit
CPD	Cumulative Population Doubling
DMEM-HG	Dulbecco's Modified Eagle Medium - High Glucose
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DT	Doubling Time
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EthD-1	Ethidium Homodimer-1
FBS	Siero Bovino Fetale
hMSC	Human Mesenchymal Stromal Cells
HRP	Horseradish Peroxidase
MSC	Mesenchymal Stromal Cells
NP-40	Nonyl Phenoxyethoxyethanol
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD	Population Doubling
PIP ₂	Phosphatidylinositol (3,4) Bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5) Bisphosphate
PI3-kinasi/PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinasi
PnPP	para-Nitrophenylphosphate
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RT	Room Temperature
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TBS	Tris Buffered Saline
TRIS	Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane

ABSTRACT

Key words:

Mesenchymal stem/stromal cells (MSC), PI3K/Akt pathway, cell migration, Akt inhibitors, wound healing

Human Mesenchymal Stromal Cells (hMSC) are currently tested in several clinical trials. In spite of hMSC efficacy is frequently linked to their ability to reach the affected site, little is known on their migratory behavior and the underlying mechanism. This study was designed to investigate the migratory behavior of hMSC and to test the involvement of Akt, also known as protein kinase B.

Akt protein expression and phosphorylation was investigated in hMSC western blotting analysis. Cell migration was assessed by *transwell*, *wound healing* and *time lapse in vivo* motility assays.

MSC results fairly migratory and Akt was strongly activated at basal level. Furthermore, the characterization of the major regulatory proteins and effectors, upstream and downstream of Akt, has led to the conclusion that the cascade of reactions of this signaling pathway in hMSC follows a canonical pathway.

Pharmacological inhibitors were used to determine the potential mechanism responsible for cell migration and invasion. Blocking PI3K/Akt pathway resulted in decreased hMSC migration. The use of pharmacological inhibitors specific for individual Akt isoforms allowed us to discriminate the different role of Akt1 and Akt2 in the migration of the hMSC. Through our analysis, we demonstrated that pharmacological inactivation of Akt2, but not that of Akt1, significantly decreased cell migration and invasion.

Although these results are not fully comprehensive for the understanding of the phenomenon, in the complex indicate that the activation of Akt2 plays a critical role in allowing the migration of the hMSC. The demonstration that the Akt2 isoform is required for the chemotaxis of direct hMSC, makes this kinase a potential pharmacological target to modulate the migration of such cells.

RIASSUNTO

Parole chiave:

Cellule staminali/stromali mesenchimali (MSC), via di segnale PI3K/Akt, migrazione cellulare, Akt inibitori, *wound healing*

Le cellule staminali/stromali mesenchimali umane (hMSC) sono attualmente applicate in diversi studi clinici e la loro efficacia è spesso legata alla loro capacità di raggiungere il sito d'interesse. Poco si sa sul loro comportamento migratorio e i meccanismi che ne sono alla base. Perciò, questo studio è stato progettato per comprendere il comportamento migratorio delle hMSC e il coinvolgimento di Akt, nota anche come proteina chinasi B.

L'espressione e la fosforilazione della proteinchinasi Akt è stata studiata mediante Western blotting. Oltre al *time-lapse in vivo imaging*, il movimento cellulare è stato monitorato sia mediante saggi tridimensionali, con l'uso di *transwell*, che mediante saggi bidimensionali, attraverso la tecnica del *wound healing*.

Le prove effettuate hanno rivelato che le hMSC hanno una buona capacità migratoria. E' stato osservato che la proteinchinasi B/Akt ha elevati livelli basali di fosforilazione in queste cellule. Inoltre, la caratterizzazione delle principali proteine di regolazione ed effettrici, a monte e a valle di Akt, ha permesso di concludere che la cascata di reazioni della via di segnale anche nelle hMSC segue un andamento canonico.

Specifici inibitori farmacologici sono stati utilizzati per determinare il potenziale meccanismo coinvolto nella migrazione cellulare e nell'invasione. L'inibizione della via PI3K/Akt determina una significativa riduzione della migrazione. L'utilizzo di inibitori farmacologici specifici per le singole isoforme di Akt ha permesso di discriminare il ruolo diverso di Akt1 e Akt2 nella migrazione delle hMSC. E' stato infatti dimostrato che l'inattivazione di Akt2, ma non quella di Akt1, diminuisce significativamente la migrazione cellulare.

Nel complesso i risultati ottenuti indicano che l'attivazione di Akt2 svolge un ruolo critico nella migrazione della hMSC; ulteriori studi sono necessari per approfondire la comprensione del fenomeno. La dimostrazione che l'isoforma Akt2 è necessaria per la chemiotassi diretta delle hMSC, rende questa chinasi un potenziale bersaglio farmacologico per modulare la loro migrazione.

INTRODUZIONE

1. Cellule Stromali Mesenchimali (*Mesenchymal Stromal Cells, MSC*)

1.1. *Biologia delle Cellule Stromali Mesenchimali*

La medicina rigenerativa si prefigge di riparare e rigenerare tessuti/organi che hanno perso la funzionalità strutturale e metabolica a causa di danni o di malattie degenerative. Negli ultimi decenni vi è stato un orientamento generale verso l'utilizzo di cellule come agenti terapeutici. In particolare, le cellule mesenchimali staminali o stromali sono utilizzate per un numero elevato di *trials* clinici, essendo di facile reperibilità ed con minori implicazioni di ordine etico¹.

L'impiego delle cellule in clinica ha perciò imposto una più approfondita comprensione delle caratteristiche biologiche rilevanti per i vantaggi ed i rischi connessi al loro utilizzo. In generale, le "*human mesenchymal stromal cells*" (hMSC) hanno la capacità di riparare il tessuto danneggiato mediante differenti meccanismi, quali ad esempio il differenziamento verso un fenotipo opportuno, rimpiazzando le cellule che originariamente popolavano il tessuto.

Nella letteratura scientifica, le MSC possono essere indicate anche con i seguenti nomi:

- *colony forming fibroblastic cells*
- *stromal fibroblasts*
- *marrow stromal stem cells*
- *mesenchymal progenitor cells*
- *mesenchymal stromal cell*

Le MSC sono state isolate da numerosi tessuti, tuttavia il midollo osseo rappresenta una nicchia biologica che fornisce un microambiente particolarmente stabile per la cellula staminale. Tale ambiente è costituito da cellule e da un componente extracellulare che può ospitare una o più cellule staminali, e controllarne l'auto-rinnovamento, nonché il mantenimento della progenie. La nicchia di appartenenza presenta un *pool* di staminali adulte mantenute indifferenziate in uno stato di quiescenza e garantisce il fisiologico *turnover*

tissutale. La matrice extracellulare e le molecole di adesione definiscono i confini spaziali della nicchia e modulano l'espressione delle molecole di adesione e di quelle destinate al *signaling*.

Il midollo osseo costituisce quindi una sorgente privilegiata per l'isolamento delle MSC. Il prelievo di midollo viene fatto nella maggior parte dei casi dalla cresta iliaca, più raramente dallo sterno. Solitamente, le MSC sono presenti in percentuali molto basse, rappresentando lo ~0.001-0.01% della popolazione totale delle cellule mononucleate del midollo osseo ². Sono state descritte da Friedenstein et al. ³⁻⁵ come precursori multipotenti presenti nello stroma del midollo osseo. Le MSC sono una popolazione eterogenea di cellule mononucleate, morfologicamente simili ai fibroblasti, contenente cellule progenitrici in diverse fasi di maturazione, oltre a cellule stromali mature ⁶.

La caratterizzazione delle MSC, per l'utilizzo a scopo clinico, si basa su una combinazione di saggi biochimici, morfologici e funzionali. Queste cellule esprimono infatti alcuni antigeni di superficie quali il CD44, CD73, CD90, CD105, mentre non esprimono i marcatori CD34 e CD45 ⁷. Tuttavia, va sottolineato che nessuna di queste proteine può essere considerata un marcatore in grado di individuare una popolazione MSC omogenea in maniera univoca, in quanto altri tipi cellulari, come i fibroblasti della cute, esprimono le stesse proteine.

Coltivate *in vitro*, le MSC possono poi essere caratterizzate anche funzionalmente, a conferma della multipotenza. Infatti, il differenziamento in senso osseo, cartilagineo e adiposo, si può ottenere *in vitro* in seguito all'esposizione delle cellule a stimoli opportuni.

1. 2. Applicazioni cliniche delle Cellule Stromali Mesenchimali

L'applicazione delle MSC in terapia avanzata, nel quadro normativo Italiano, è considerata equivalente all'utilizzo di un prodotto medicinale. La donazione, l'approvvigionamento e il controllo delle cellule sono regolati in Europa dalla direttiva sui tessuti e sulle cellule ⁸. Il processo di produzione e l'autorizzazione alla fabbricazione devono rispettare le linee guida per la *good manufacturing practice*. Le linee guida sono predisposte in modo da controllare la sicurezza, la purezza e la potenza dei prodotti terapeutici, e riguardano l'intero processo di produzione, coinvolgendo strutture, personale, apparecchiature, reagenti, materiali di consumo e procedure (isolamento delle cellule, selezione, espansione, controllo di qualità, rilascio, trasporto). La sperimentazione clinica invece è regolata dalle linee guida sulla buona pratica clinica.

Le cellule staminali vengono impiegate in terapie innovative *cell-based* grazie alle loro caratteristiche, che sono state approfondite da numerosi studi recenti. Il vasto potenziale differenziativo delle MSC ha portato a sperimentare la loro efficacia nel trattamento di patologie caratterizzate da reazioni infiammatorie e da degenerazione tissutale ⁹. In ambito rigenerativo, le MSC sono state sperimentate nella rigenerazione del tessuto osseo, cardiovascolare o neuronale ¹⁰⁻¹². In questi studi è stato dimostrato che la presenza delle cellule, o del supporto stromale contenente le cellule stesse, rende la terapia efficace. Inoltre, anche le capacità secretorie delle MSC sono di grande interesse, in quanto i fattori rilasciati sono in grado di influenzare le cellule dei tessuti circostanti. Il secretoma delle MSC completa il loro ruolo modulando il microambiente e creando la sinergia tra capacità rigenerative delle MSC e fattori coadiuvanti ¹³.

L'applicazione clinica di queste cellule è favorita anche dal fatto che, essendo nella maggior parte dei casi prelevabili dal paziente stesso, non ci sono particolari controindicazioni dal punto di vista etico. Inoltre, la maggior parte dei dati preclinici e clinici non riportano eventi negativi dopo l'applicazione delle MSC, supportandone l'uso terapeutico ¹⁴.

La sicurezza e l'efficacia della terapia cellulare dipendono anche dalla modalità di somministrazione delle cellule. Un primo tipo consiste nella mobilitazione sistemica delle MSC residenti, e si ottiene mediante la somministrazione di fattori di crescita. Un secondo tipo, finora poco applicato, è l'iniezione delle MSC nel circolo sanguigno per via sistemica, che condurrebbe poi le cellule nel sito di lesione. Più utilizzata è la somministrazione diretta

delle MSC *in situ*, spesso supportata dall'impiego di materiali biocompatibili detti “*scaffolds*”, a loro volta arricchiti con le MSC.

Dal punto di vista immunologico, le MSC sono scarsamente immunogeniche poiché non esprimono le molecole co-stimolatorie (CD80, CD86, CD40) necessarie per la stimolazione diretta del sistema immunitario. Hanno perciò dimostrato di ridurre l'incidenza e la gravità del *graft-versus-host disease* durante il trapianto allogenico di midollo osseo ¹⁵. La comparsa degli effetti collaterali dopo l'infusione di MSC può essere trattata con terapia anticoagulante o con somministrazione lenta, frazionando il dosaggio delle MSC.

Le forti proprietà immunomodulatorie ¹⁶ rendono più potente la terapia a lungo termine.

Oltre alla capacità immunomodulatoria, le MSC esercitano anche un effetto anti-infiammatorio. L'infiammazione è il processo che permette all'organismo di mettere in atto meccanismi di difesa in risposta ad eventi dannosi e di attivare successivamente i processi di riparazione dei tessuti. In alcune malattie, come la sclerosi multipla, è possibile che l'infiammazione, scatenata come meccanismo di difesa e volta ad attivare successivi processi di riparazione, sia alla base di risposte aberranti del sistema immunitario a stimoli non particolarmente dannosi. In queste condizioni, le MSC somministrate rilasciano fattori prorigeneranti, antiapoptotici, e antifibrotici che favoriscono i processi di riparazione endogena.

L'azione combinata di tutti i fattori descritti è probabilmente necessaria per il successo della terapia basata sull'uso delle MSC.

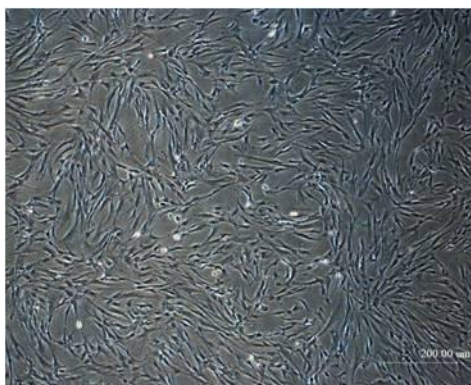


Figura 01. Immagine rappresentativa delle MSC

2. Migrazione delle Cellule Stromali Mesenchimali

L'omeostasi dell'organismo adulto dipende, in larga misura, dalla corretta migrazione cellulare. La capacità stessa delle MSC di raggiungere i siti del danno tissutale sottolinea come la migrazione sia un elemento cruciale del loro potenziale.

L'invasione dei tessuti da parte delle cellule può essere guidata o da un movimento passivo, attraverso i meccanismi di crescita ed espansione cellulare, o dalla motilità cellulare. Dalle alterazioni nella migrazione possono dipendere condizioni patologiche infiammatorie e infettive. Un esempio estremo è dato dalle cellule neoplastiche che abbandonano il sito originario del tumore e che si diffondono attraverso le vie linfatiche o ematiche; in seguito all'invasione dei tessuti circostanti ¹⁷, le cellule tumorali maligne generano metastasi le quali sono più resistenti ed aggressive rispetto al tumore primario, e che sono spesso responsabili dell'evoluzione nefasta della malattia.

Un'approfondita comprensione dei meccanismi molecolari alla base del fenomeno migratorio *in vitro* è perciò essenziale per applicare terapie innovative *cell-based* anche *in vivo*. Pertanto, la migrazione cellulare rappresenta un campo di investigazione di grande attualità.

2.1. Il network migratorio

La corretta esecuzione del movimento cellulare richiede il coordinamento di numerose funzioni specializzate che permettono il ciclico svolgersi di un processo dinamico. Il mantenimento dell'attività migratoria viene supportato dal riarrangiamento del citoscheletro, dalla formazione di complessi di adesione e dalla polarizzazione delle strutture cellulari. Inoltre l'omeostasi della rete migratoria dipende dalla riorganizzazione dei segnali intracellulari e dall'orientamento spaziale.

La forma della cellula che si muove è asimmetrica, con un ben delineato fronte migratorio nella direzione del movimento, e un corpo cellulare. Questa disposizione rende la cellula polarizzata. Le due porzioni cellulari sono ben separate morfologicamente, ma funzionalmente collegate.

Il movimento migratorio può essere definito come casuale, direzionale, sincrono o coordinato, a seconda del tipo cellulare e delle condizioni ambientali in cui la cellula stessa si trova.

Regolazione della dinamica migratoria

Le cellule modificano la propria forma e il grado di adesione al substrato, in risposta a cambiamenti ambientali o durante processi di trasformazione. Il rimodellamento comporta la formazione di estroflessioni della membrana plasmatica, come *filopodi* e *lamellopodii*, e di fibre da stress caratteristiche del compartimento intracellulare, che sono fondamentali per il movimento cellulare. Il movimento si verifica in risposta a gradienti chimici che stimolano specifici recettori presenti sulla superficie cellulare.

In generale, il movimento si compone di tre momenti essenziali: sporgenza, attacco e trazione. In primo luogo, la cellula capta il gradiente e viene stabilita una polarità, che darà successivamente la direzione del movimento; in seguito, la cellula emette prolungamenti citoplasmatici nella direzione verso la quale dovrà avvenire il movimento; infine, si verifica la generazione di una forza di trazione che muove in avanti il corpo cellulare, mentre si ha il rilascio dell'estremità posteriore, trascinata a seguito del primo movimento. Il malfunzionamento di uno di questi sottoprocessi individuali, o il mancato accoppiamento in modo appropriato, si traduce in una migrazione difettosa.

Per eseguire la migrazione in maniera costante, le cellule stabiliscono i punti in cui vengono promosse le protrusioni e retrazioni della membrana.

Come già accennato, la polarità della cellula viene regolata dal microambiente e dai segnali generati. Numerose sono le proteine coinvolte nella trasduzione del segnale durante il rimodellamento citoscheletrico. Un ruolo rilevante viene svolto dai membri della famiglia Rho di piccole proteine G, quali Rho-1, Rac-1 e Cdc42, che presiedono al riassetto delle fibre di actina intracellulari e alla comparsa di estroflessioni citoplasmatiche, quali *filopodi* e *lamellopodii*. In particolare, l'attivazione di ciascuna di queste tre proteine si traduce in una risposta cellulare caratteristica. Rho-1 regola la formazione delle fibre da tensione, costituite da fasci contrattili acto-miosinici e adesioni focali (strutture multimeriche date da integrine, da proteine strutturali come la vincolina e l' α -actinina, e da chinasi come la protein-chinasi C α (PKC α), src (pp60SRC) o la chinasi delle adesioni focali, pp125FA). La stimolazione di Rac, invece, comporta la formazione di *lamellopodii* e di increspature periferiche note come "*ruffles*" di membrana, congiuntamente a complessi che ricordano le adesioni focali indotte da Rho, ma che sono distinti da esse sia da un punto di vista della composizione sia da un punto di vista morfologico¹⁸. Ad esempio, l'attivazione delle piccole proteine G della famiglia Rho avviene, in seguito alla stimolazione di recettori di membrana, attraverso i cosiddetti "Fattori di scambio guanosinici" (GEFs). Questi fattori promuovono lo scambio GDP-GTP a livello

delle piccole proteine G, transitandole nello stato attivo. Tutti i GEFs per la famiglia Rho contengono un dominio d'omologia a "dbl" (dominio DH), che rappresenta il dominio catalitico; in più, tali fattori recano un dominio PH, che, al pari di quello presente in Akt, determina la localizzazione dei GEFs in membrana, ove possono svolgere la propria funzione catalitica. Ne risulta che l'attivazione dei GEFs avviene ad opera dei fosfoinositidi generati dalla PI3K, o in alternativa tramite fosforilazione recettore-dipendente di residui di tirosina.

La proteina Rac è in grado di attivare la Fosfatidilinositolo-4-fosfato 5-chinasi (PI-5K), formando PI(4,5)P2, che tramite il legame con la gelsolina libera i filamenti d'actina ¹⁹, oppure, tramite interazione con *Scar/Wave-1*, induce la polimerizzazione di nuovi filamenti d'actina. Inoltre è in grado anche di prevenire la depolimerizzazione attivando la chinasi LIM e bloccando la cofilina che lega l'estremità negativa dell'actina ²⁰.

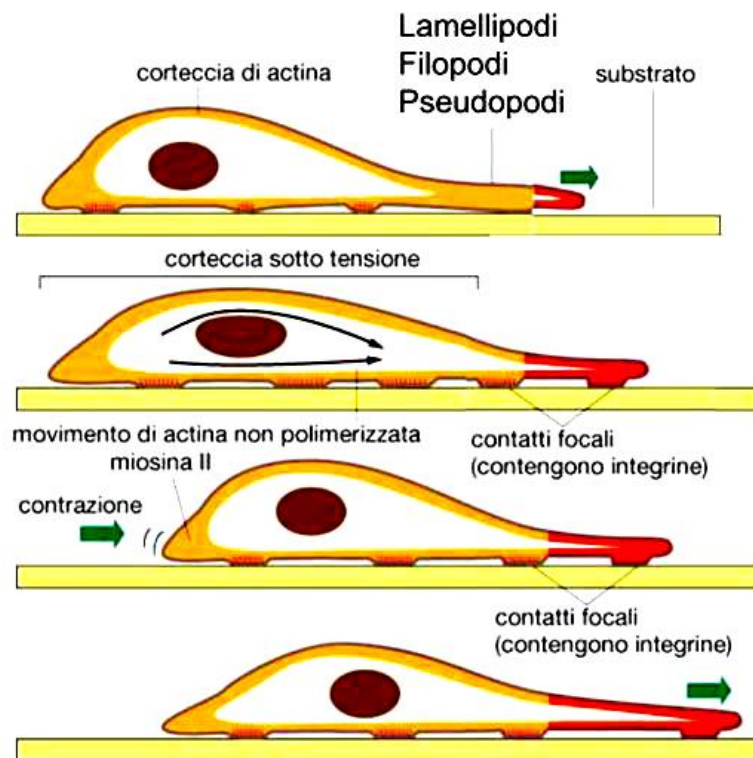


Figura 02. I meccanismi dinamici della migrazione cellulare
 (*Molecular Biology of the Cell*, Alberts, 4th Ed)

2. 2. *I meccanismi migratori*

Il comportamento migratorio delle cellule dipende molto dal microambiente circostante, il quale a sua volta è considerato una ricca sorgente di stimoli chemiotattici. Le molecole regolatrici rappresentano appunto gli stimoli che indirizzano il movimento cellulare lungo il gradiente chemiotattico, il quale a sua volta può essere attrattivo o repulsivo.

Il movimento può essere promosso in tre diversi modi: chemiochinesi, chemiotassi e aptotassi. La risposta migratoria definita chemiochinesi provoca un movimento di tipo casuale senza gradiente. Le cellule si muovono in maniera irregolare, in assenza di direzionalità specifica, con l'alterazione della velocità e della frequenza dei movimenti rotatori.

La chemiotassi, invece, è il movimento migratorio direzionale, guidato da un gradiente di molecole dette chemioattrattori. La chemochina CXCL12 (*Stromal cell Derived Factor*, SDF-1) ²¹ ed il *Fetal Bovine Serum* (FBS) (10-20%) sono noti in letteratura come i fattori che stimolano la chemiotassi delle MSC. La migrazione varia sia in base alla sostanza utilizzata, che in base alla natura del gradiente di concentrazione. Per mezzo di una curva dose-risposta, viene determinata la concentrazione di chemioattrattore che si traduce nella risposta ottimale da parte delle cellule stesse. In letteratura ²² è suggerito l'uso di FBS al 0.1% come controllo negativo per la migrazione delle MSC, e di FBS al 10% come controllo positivo. Quindi l'FBS può essere usato come l'unica discriminante per avere due diverse condizioni che influenzano il movimento.

L' aptotassi è il tipo di movimento migratorio direzionale secondo il gradiente delle molecole regolatrici legate ad un substrato. Si tratta quindi del gradiente presente all'interno della matrice extracellulare.

3. I fenomeni migratori:

3.1. Mobilizzazione e Homing delle Cellule Stromali Mesenchimali

Il tessuto danneggiato non è in grado di autorigenerarsi endogenamente, ma attraverso la mobilizzazione delle MSC che vengono reclutate nel punto critico. Le MSC vengono condizionate dalla specifica locazione nei tessuti e, di conseguenza, la terapia *in vivo* ha buona probabilità di successo. In quanto sorgente primaria, il midollo osseo è una componente indispensabile per il processo di mobilizzazione e per la circolazione periferica delle MSC in sito. Oltre che da questa sorgente, le cellule possono essere introdotte nell'organismo per via sistemica, e questa possibilità rappresenta un grande passo in avanti per la terapia cellulare. Migrando spontaneamente nei tessuti danneggiati in maniera selettiva, raggiungono il sito bersaglio per iniziare il processo riparativo. La domiciliazione delle cellule nel sito di lesione necessita tuttavia dell'arrivo di diversi fattori e di citochine che promuovono lo stato anti-infiammatorio. Il tessuto compromesso rilascia nel sangue periferico segnali che promuovono lo spostamento delle MSC. Per evitare che le cellule si disperdano o si fermino in siti indesiderati, attualmente la somministrazione avviene localmente per iniezione intra-tissutale o intratecale, e le cellule vengono veicolate alla sede del danno da riparare. La capacità delle MSC di arrestarsi a livello dei piccoli vasi dei tessuti e di trasmigrare passivamente o attivamente nelle sedi specifiche è detta *homing*. Tale rilocalizzazione nella sede compromessa permette alle cellule di essere richiamate *in loco* per ripristinare l'omeostasi fisiologica. Le componenti della matrice extracellulare (ECM) svolgono un ruolo fondamentale nell'*homing* e nell'adesione delle MSC, anche se non è chiaro né il meccanismo alla base del passaggio dall'endotelio vascolare ai rispettivi tessuti, né le componenti del microambiente in cui le cellule si muovono.

Sono perciò state suggerite una varietà di strategie tese a migliorare l'*homing* delle MSC in base alle loro caratteristiche note. Tali strategie mirano a modulare la barriera fisiologica costituita da vasi sanguigni o organi nonché dal microambiente infiammatorio del corpo, e a favorire i segnali chemiotattici verso il sito del danno.

La distribuzione delle MSC dopo somministrazione endovenosa è stata studiata mediante immunofluorescenza, trasduzione con geni reporter, individuazione dei geni umani in animali riceventi, immunistochemical, real-time e ibridazione in situ fluorescente.

Devine et al.²³ hanno riportato la presenza di cellule trapiantate nei tessuti gastrointestinali, e in minor misura nel rene, nei polmoni, nel fegato e nella pelle, stimata dallo 0.1% al 2.7% delle cellule somministrate.

L'osservazione *in vivo* si basa su tecniche di *imaging* in tempo reale, come la risonanza magnetica (MRI) per rintracciare le MSC marcate con nanoparticelle, che ha migliorato la capacità di indagare l'*homing* nonché il comportamento e l'accumulo organo-specifico delle MSC trapiantate.

Ma cosa guida il traffico delle MSC dopo la somministrazione endovenosa, intra-arteriosa, o locale intra-tessuto? Le chemochine, le citochine ed i fattori di crescita rilasciati nel sito della lesione sono stimoli migratori per le cellule somministrate sia per via sistemica che locale, suggerendo che modulare la risposta a fattori di crescita e citochine sia un approccio per migliorare l'*homing* delle MSC.

4. Via di segnale PI3K/Akt

4.1. Struttura della protein chinasi B/Akt

La scoperta della Serina/Treonina chinasi Akt si deve alla sua analogia con il prodotto dell'oncogene v-AKT isolato dal retrovirus AKT8²⁴. Questa proteina viene indicata anche con il nome RAC (Related to A and C kinases) e PKB, a causa dell'omologia del suo dominio catalitico con quello della PKA e della PKC²⁵. Esistono tre isoforme di Akt: (Akt1/ α , 2/ β e 3/ γ); Akt1 è espresso in maniera ubiquitaria, Akt2 è prevalentemente espresso in quei tessuti soggetti all'azione dell'insulina, come il tessuto adiposo, il fegato e il muscolo scheletrico, Akt3 è maggiormente espresso nel tessuto cerebrale e nei testicoli²⁶. Le isoforme di Akt hanno una struttura molecolare simile, avendo i tre domini funzionali ampiamente conservati in ciascuna isoforma²⁷.

Il dominio catalitico centrale contiene una treonina nell' "activation loop", la cui fosforilazione è necessaria per l'attivazione di Akt (T308/ T309/T305 per rispettive 3 isoforme). La completa attivazione della chinasi, però, dipende dalla fosforilazione di un secondo residuo, la serina 473 (S474/472), nel dominio regolatorio della regione C-terminale, un dominio tipico delle proteinchinasi della famiglia AGC: FX-X-F/Y-S/T-Y/F²⁸. La fosforilazione dei due residui chiave stabilizza il sito attivo nella sua conformazione attiva, favorendo l'interazione del motivo idrofobico con il sito di legame per l'ATP²⁹, e facilita inoltre la fosforilazione della T308. Il dominio PH (*pleckstrin homology*), situato all'estremità N-terminale, è responsabile del legame con i fosfolipidi: si tratta infatti di un dominio di interazione proteina/lipide, in grado di legare i fosfoinositidi prodotti dalla chinasi lipidica fosfoinositide 3-chinasi (PI-3K), e più precisamente il fosfatidilinositolo (3,4,5) trisfosfato (PIP₃) e il fosfatidilinositolo (3,4) bisfosfato (PIP₂)³⁰ (Fig. 03).

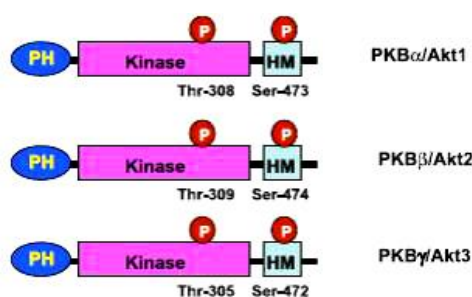


Figura 03. Struttura dei domini delle isoforme di Akt³⁰

4. 2. Funzioni fisiologiche di Akt

Ruolo di Akt nei processi apoptotici

Akt regola negativamente la funzione o l'espressione di una serie di proteine, denominate *Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins*, il cui ruolo a favore dell'apoptosi consiste nel legare o inattivare membri della famiglia di proteine *prosurvival*, Bcl-2.

Akt, ad esempio, inibisce direttamente la *BH3-only protein* BAD ³¹ fosforilandola sulla S136, determinandone quindi il legame con le 14.3.3 e impedendole di interagire con i suoi *target* proteici proapoptotici.

Altro meccanismo tramite il quale Akt inibisce l'espressione di *BH3-only proteins* è la fosforilazione di fattori di trascrizione come FOXO e p53. Akt fosforila FOXO1 sulle T24, S256 e S319, fosforila FOXO3a e FOXO4 su tre siti equivalenti ³² e determina anche in questo caso il legame con le 14.3.3 che sequestrano i fattori di trascrizione FOXO, esportandoli dal nucleo, e impedendogli di interagire con i loro geni *target* proapoptotici (come il gene per il ligando Fas e Bim).

Un terzo target di Akt che promuove la sopravvivenza inibendo una *BH3-only protein* è MDM2, una ubiquitina ligasi che induce la degradazione di p53. Akt fosforila MDM2 sulle S166 e S186, ciò promuove la sua traslocazione al nucleo, dove regola negativamente la funzione di p53 ^{33,34}.

Akt fosforila inoltre la procaspasi-9 sulla S196, determinando in questo modo una riduzione della sua attività proteasica e quindi della sua capacità di indurre apoptosi.

In alternativa, tramite cross-talk con le altre vie, Akt può mediare l'apoptosi attivando fattori di trascrizione proapoptotici, come NF-κB (*Nuclear Factor-kappaB*), e inibendo SAPK/JNK (*Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase*). NF-κB infatti viene attivato in seguito a fosforilazione da parte di Akt della chinasi IKK che, a sua volta, fosforila e promuove la degradazione dell'inibitore di NF-κB, IκB, attraverso il sistema ubiquitina-proteosoma. Come conseguenza, si ha la traslocazione al nucleo di NF-κB.

Anche il fattore di trascrizione YAP (*Yes Associated Protein*) viene fosforilato da Akt e rimane perciò sequestrato nel citosol, dove non può svolgere la sua funzione proapoptotica³⁵. Infine, la fosforilazione di CREB (*Cyclic AMP Response Element Binding protein*) da parte di Akt ne aumenta l'attività trascrizionale promuovendo l'espressione di geni a funzione antiapoptotica.

4. 3. Regolazione della via di segnale PI3K/Akt

Il meccanismo d'attivazione di Akt

L'attività di Akt dipende strettamente dal legame stereospecifico con i fosfoinositidi D3, prodotti dell'azione della chinasi lipidica fosfoinositide-3 chinasi, PI3K, in risposta a citochine, ormoni, fattori di crescita, che spesso agiscono tramite recettori associati a tirosine chinasi.

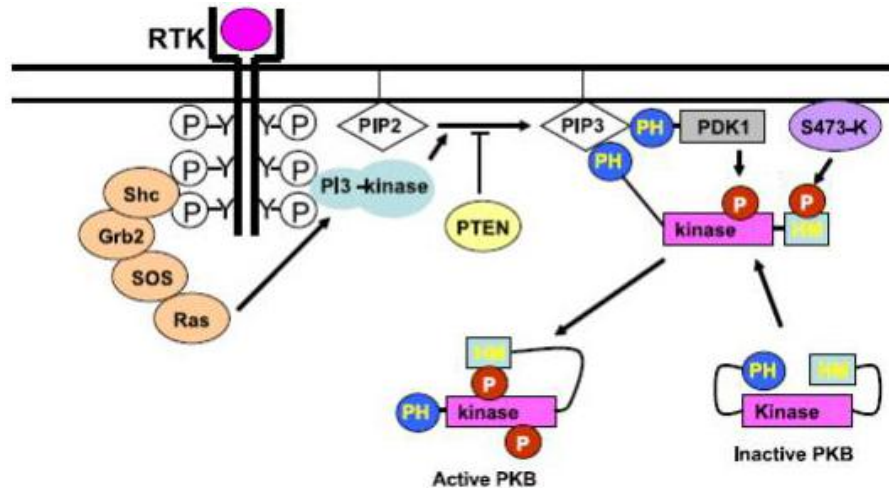


Figura 04. Attivazione di Akt ³⁰

Infatti, l'attivazione di PI3K genera un picco transiente del secondo messaggero lipidico PtdIn(3,4,5)P3 a livello della membrana plasmatica, il quale lega il dominio PH di Akt, ancorandolo transientemente alla membrana.

L'interazione tra Akt e PtdIn(3,4,5)P3 non attiva direttamente Akt, ma induce specifici residui da parte di chinasi fosfoinositide-dipendenti denominate rispettivamente PDK1 e 2 ³⁶. La fosforilazione dei due residui T308 e S473 è condizione necessaria per una completa attivazione di Akt, mentre la fosforilazione su un unico sito attiva la chinasi parzialmente. Si pensa che la fosforilazione della S473 sia cruciale nell'attivazione di Akt per la sua capacità di stabilizzare il dominio chinasi in uno stato conformazionale attivo, favorendo l'interazione del motivo idrofobico con il sito di legame per l'ATP ²⁹.

Una volta attivato, Akt si dissocia dalla membrana plasmatica e può fosforilare numerosi substrati nel citoplasma e nel nucleo.

PDK1, (*Phosphoinositide Dependent Kinase*)³⁷, la chinasi che fosforila Akt sulla T308, possiede, come Akt, un dominio PH che consente il legame al PtdIn(3,4,5)P3.

L'identità della chinasi che fosforila la S473 è stata a lungo dibattuta. Tuttavia, una serie di evidenze ha recentemente dimostrato che la serina/treonina chinasi mTORC2 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*) è la PDK2 fisiologica³⁸.

E' stato poi descritto che la fosforilazione della S129 da parte di CK2 (*Caseina chinasi 2*) è in grado di aumentare ulteriormente l'attività dell'enzima³⁹. Inoltre, la fosforilazione dei tre residui tirosinici T315 e T326 all'estremità N-terminale e T474 all'estremità C-terminale ad opera della chinasi Src sembrano importanti regolatori dell'attività della proteina Akt.

Al contrario, la fosforilazione costitutiva sui residui S124, nel dominio PH, e T450, nella regione C-terminale, non sembrano indispensabili per l'attivazione. Tuttavia, questa fosforilazione potrebbe necessaria al corretto ripiegamento della proteina.

Oltre ad essere un effettore a valle di PI3K, Akt può essere attivata anche attraverso vie alternative. Lo stato di stress cellulare, ad esempio, provoca una iperattivazione di Akt, che rappresenta un meccanismo compensatorio importante per la protezione della cellula.

Inoltre, Akt viene fosforilata in modo indipendente da PI3K, a seguito della stimolazione di recettori accoppiati a proteine G.

Come accennato, una volta attivato Akt trasloca sia al nucleo sia al citoplasma, dove sono localizzati la maggior parte dei suoi substrati noti, caratterizzati dalla sequenza consenso RXXRXX(S/T)⁴⁰. E' stato calcolato che Akt fosforila più del 2% delle proteine dell'intero proteoma cellulare.

Inattivazione di Akt

Akt viene inattivata o indirettamente, tramite defosforilazione dei prodotti della PI3K, PtdIn(3,4)P2 e PtdIn(3,4,5)P3 da parte di fosfatasi lipidiche, o direttamente, per defosforilazione dei residui S473 e T308 da parte di fosfatasi proteiche.

La fosfatasi PTEN (*Phosphatase and TENsin homologue*) rimuove il gruppo fosfato dalla posizione 3'OH⁴¹, mentre la fosfatasi SHIP (*SH domain-containing Inositol Phosphatases*)

rimuove il gruppo fosfato dalla posizione 5' ⁴² dei fosfoinositidi. In entrambi i casi, il dominio PH non legato ai fosfoinositidi rimane nella conformazione chiusa, che blocca il sito catalitico.

Le proteinfosfatasi che regolano la fosforilazione di Akt sono la PP2A (*Protein Phosphatase 2A*), responsabile della defosforilazione del residuo di T308 ⁴³, e la famiglia di fosfatasi PP2C, nota come PHLPP 1 e 2 (*PH domain Leucine rich repeat Protein Phosphatase*), che defosforilano in modo selettivo la S473 ⁴⁴ delle diverse isoforme di Akt.

4. 4. PI3K/Akt e il controllo della progressione del ciclo cellulare

Una volta attivato, Akt stimola la proliferazione cellulare agendo su una serie di *targets* coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare. Akt fosforila p27kip1 sulla T257⁴⁵⁻⁴⁷ e ne induce il sequestro nel citoplasma mediato dal legame con le 14.3.3⁴⁸. Non essendo più localizzato nel nucleo, p27 non può svolgere la sua funzione di inibitore della cdK2 e quindi la duplicazione del DNA, che altrimenti sarebbe stata bloccata, avviene; Akt inibisce p27 anche attraverso la fosforilazione e la conseguente inibizione dei fattori di trascrizione FOXO⁴⁹.

Anche p21Cip1/WAF1 viene fosforilato da Akt sulla T145, questa fosforilazione determina, come nel caso di p27, la localizzazione citosolica di questo inibitore³⁴ e la progressione del ciclo cellulare.

Akt sembra inoltre inibire l'espressione di p21 attraverso la fosforilazione e l'attivazione di MDM2 che determina la *down-regolazione* della trascrizione di p21 mediata da p53^{33,34}.

La fosforilazione Akt dipendente di una serie di altre proteine come GSK3, TSC2 e PRAS40 guida la proliferazione cellulare attraverso la regolazione della sintesi e la stabilizzazione di fattori coinvolti nell'ingresso della cellula nel ciclo cellulare. GSK3 ad esempio, fosforila la ciclina D, la ciclina E e i fattori di trascrizione c-jun e c-myc, rendendoli un bersaglio per la degradazione da parte del proteasoma; l'inibizione di GSK3 ad opera di Akt promuove la transizione dalla fase G1 alla fase S. La proliferazione cellulare mediata da Akt è stata recentemente messa in relazione anche all'attivazione di mTORC1. L'effetto predominante degli inibitori di mTORC1, come la rapamicina, è quello di bloccare il ciclo in fase G1⁵⁰, la stimolazione della via di segnale di Akt porta all'attivazione di eIF4E attraverso l'inibizione esercitata da mTORC1 su 4E-BP1, in questo modo eIF4E promuove la traduzione degli mRNA che codificano per la ciclina D1 e c-myc.

4. 5. *PI3K/Akt e il metabolismo cellulare*

Akt gestisce, in risposta ai fattori di crescita, l'assorbimento dei nutrienti e il metabolismo cellulare in maniera specifica, a seconda del tipo di cellula, e attraverso la regolazione di una serie di proteine *target*.

Una delle più importanti funzioni fisiologiche di Akt è quella di stimolare l'assorbimento del glucosio in risposta all'insulina. In seguito a stimolazione insulinica negli adipociti, Akt2 l'isoforma più espressa nei tessuti insulino dipendenti, è in gran parte associato a vescicole contenenti il trasportatore di glucosio Glut4⁵¹.

L'attivazione di Akt determina la traslocazione di Glut4 alla membrana plasmatica⁵¹ ma il meccanismo preciso tramite il quale avviene questa traslocazione non è ancora stato chiarito completamente; Rab-GAP AS160 sembra essere il target diretto di Akt coinvolto in questo processo^{52,53}. Cinque sono i siti per Akt fosforilati, in AS160, in risposta all'insulina; di questi la S588 e la T642 sembrano essere quelli determinanti. Il modello proposto attualmente prevede che la fosforilazione Akt dipendente di AS160 inibisca la sua attività di *GTP-ase Activating Protein* (GAP), permettendo ad un'altra GTPasi della famiglia Rab di stimolare la traslocazione delle vescicole di Glut4.

Recenti studi hanno suggerito un meccanismo alternativo per la regolazione di questo processo⁵⁴, e un altro candidato, substrato di Akt, coinvolto in varie fasi della traslocazione di Glut4 ossia PIKfive⁵⁵. Glut1 è il trasportatore di glucosio principale in molti tipi di cellule; l'attivazione di mTORC1, attraverso la fosforilazione di TSC2 e PRAS40 ad opera di Akt, contribuisce sia alla trascrizione del gene di Glut1 mediata da HIF α , sia alla traduzione del suo mRNA^{56,57}. La frequente attivazione della via di segnale di PI3K/Akt nel cancro, insieme al grande accumulo di HIF α , spiega gli alti livelli di Glut1 e l'aumento dell'assorbimento di glucosio osservato nei tumori^{58,59}.

Oltre al trasporto del glucosio, Akt sembra regolare l'espressione di altri trasportatori di nutrienti, sulla superficie cellulare, come gli aminoacidi, in maniera dipendente da mTORC1⁶⁰. Del resto il meccanismo mediante cui ciò avvenga non è ancora completamente chiaro.

L'attivazione di Akt altera il metabolismo del glucosio e quello lipidico nella cellula. Una volta entrato nella cellula il glucosio viene convertito nella sua forma attiva, glucosio 6-fosfato grazie all'azione delle esochinasi, Akt stimola l'associazione delle esochinasi al

mitocondrio, sede in cui esse maggiormente fosforilano il glucosio. Il target diretto di Akt in questo processo è ancora sconosciuto ⁶¹. Il glucosio 6-fosfato può essere accumulato attraverso la conversione in glicogeno o catabolizzato per produrre energia attraverso la glicolisi e Akt può regolare entrambi processi. In maniera particolare nel muscolo e nel fegato, la fosforilazione e l'inibizione di GSK3 mediata da Akt fa sì che questa chinasi non fosforili la glicogenosintasi, e che quindi aumenti la sintesi di glicogeno. L'attivazione di Akt può d'altro canto aumentare la glicolisi ⁶² e questo fattore probabilmente contribuisce a spiegare la natura altamente glicolitica delle cellule tumorali. La capacità di Akt di aumentare la glicolisi è dovuta alla sua capacità di promuovere l'espressione di enzimi glicolitici attraverso HIF α ^{63,64}.

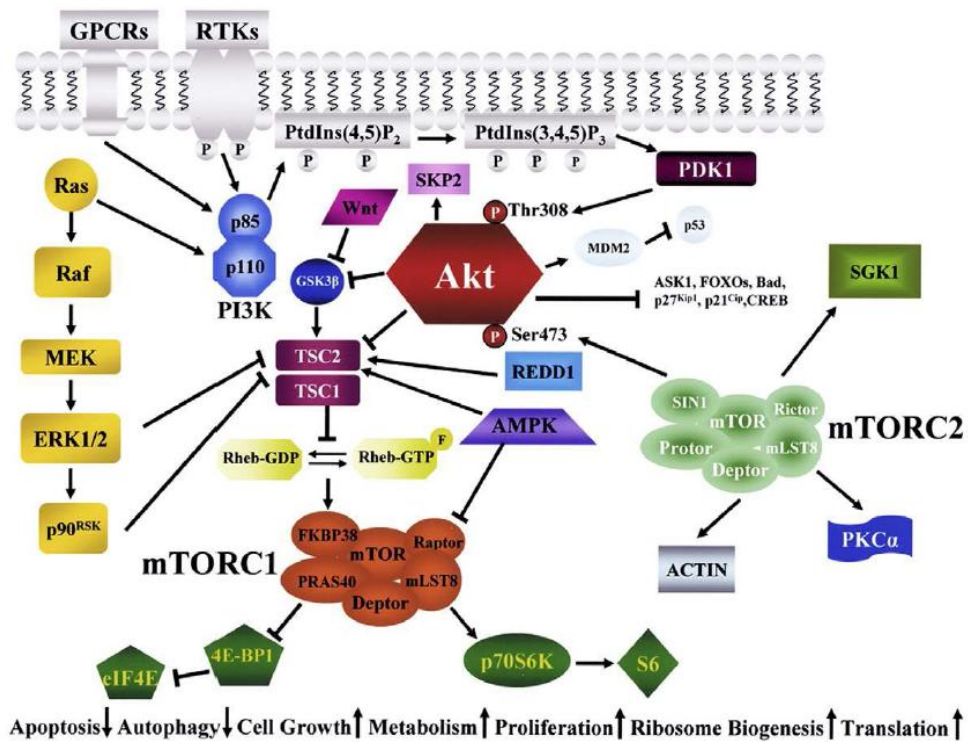


Figura 05. La via di segnale PI3K/Akt ⁶⁵

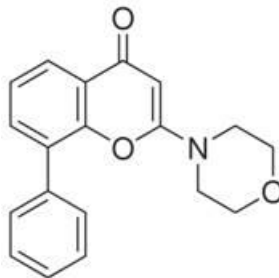
5. *PI3K/Akt come “druggable target”*

5.1. *Inibitori farmacologici*

La “via di sopravvivenza” PI3K/Akt è da sempre considerata un importante bersaglio farmacologico.

Uno dei primi inibitori della via, tuttora molto utilizzato *in vitro*, è il derivato sintetico dei flavonoidi **LY294002**, un inibitore reversibile di PI3K ⁶⁶.

LY294002 è un inibitore competitivo che si lega alla subunità catalitica di PI3K, p110, in corrispondenza del sito di legame per l’ATP. Purtroppo, LY294002 non è utilizzabile a scopi terapeutici per l’elevata citotossicità e la sua incompleta solubilità in ambiente acquoso ⁶⁶.



inibitore LY294002

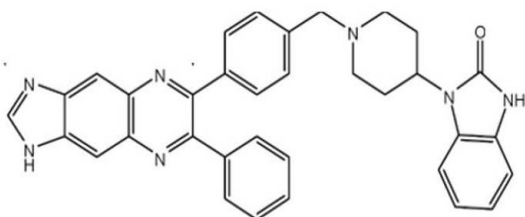
In generale, le prime molecole dirette contro la via PI3K/Akt erano inibitori competitivi per la tasca di legame dell’ATP, un dominio estremamente conservato sia nella chinasi PI3K che in Akt. Tuttavia, sia a causa dell’omologia di questa tasca con quella di altre proteinchinasi AGC, sia per le funzioni diversamente espletate dalle isoforme di Akt, tali inibitori sono risultati poco efficaci.

Una nuova e più efficace classe di molecole è rappresentata da inibitori allosterici, che hanno come bersaglio il dominio PH di Akt. Infatti tale dominio, pur essendo altamente conservato tra le isoforme di Akt, ha solo il 30% di analogia con l’analogo dominio di altre proteine ⁶⁷. Sono perciò stati sintetizzati numerosi analoghi strutturali dei fosfoinositidi D3, che competono con questi per il legame al dominio PH di Akt e influenzano la sua traslocazione alla membrana ⁶⁶. Queste molecole si sono rivelate ottimi inibitori e alcune di queste, quali la perifosina, sono attualmente in trial clinico per diverse patologie.

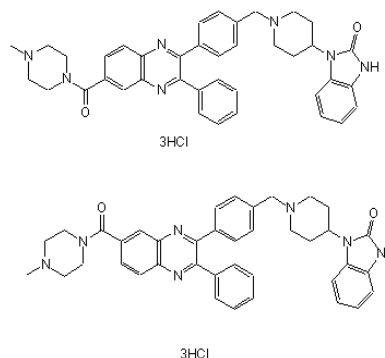
L'inibitore VIII è un inibitore allosterico di Akt1/2, diretto contro il dominio PH della chinasi. Il composto deriva dai piperidinil benzimidazoloni e lega sia l'isoforma 1 che l'isoforma 2 di Akt. La dose minima è più alta per l'isoforma Akt2 che per l'isoforma Akt1. Il legame al dominio PH previene la fosforilazione di Akt e di conseguenza la sua attivazione. La chinasi viene bloccata in una conformazione chiusa dove il sito di legame per i fosfolipidi blocca il dominio chinasi ⁶⁸.

In studi preclinici, l'inibitore VIII si è rivelato un potente farmaco antitumorale con azione mirata sulla chinasi Akt.

L'inibitore XII è un composto idrosolubile, che inibisce la fosforilazione di Akt attraverso l'interazione con il suo dominio PH, e quindi impedendogli di ancorarsi alla membrana. Questo inibitore è altamente selettivo nei confronti dell'isoforma Akt2.

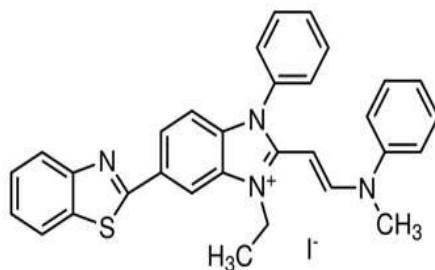


inibitore VIII



inibitore XII

L'inibitore IV è un composto benzimidazolico in grado di inibire reversibilmente la fosforilazione di Akt. Si lega all'ATP *binding pocket* di una chinasi a monte di Akt, ed è quindi un inibitore indiretto e meno specifico rispetto agli inibitori allosterici di Akt. E' una molecola altamente lipofila, e quindi penetra con facilità nella cellula. A differenza degli analoghi dei fosfoinositidi, questo inibitore blocca Akt senza influire sulla PI3K.



inibitore IV

6. *Il ruolo della chinasi Akt nella regolazione del traffico cellulare*

L'asse di trasduzione del segnale costituito da PI3K/Akt, come è stato ampiamente descritto, ricopre un ruolo fondamentale nei meccanismi che regolano la proliferazione, la crescita e la sopravvivenza cellulare, in condizioni fisiologiche. Recenti studi hanno dimostrato che Akt riveste un ruolo fondamentale anche nella migrazione cellulare e nell'invasione⁶⁹⁻⁷¹, poiché promuove la riorganizzazione dell'actina attraverso un numero di substrati e/o interattori, quali Girdin/*Akt-Phosphorylation Enhancer* (APE)⁷², Palladin⁷³ e probabilmente il substrato specifico di Akt2, ANKRD⁷⁴. E' molto interessante notare che recenti osservazioni condotte da laboratori indipendenti hanno rivelato inaspettatamente che le isoforme Akt1 e Akt2 esercitano funzioni opposte sulla regolazione della migrazione cellulare nel carcinoma mammario invasivo. La maggioranza delle osservazioni concorda con un modello generale in cui Akt1 inibisce la migrazione invasiva delle cellule tumorali mentre, nelle stesse condizioni Akt2 promuove l'invasione e la metastasi, probabilmente *up-regolando* l'integrina $\beta 1$ ⁷⁵. Tuttavia, si hanno ancora poche informazioni riguardo il loro ruolo in altri modelli cellulari.

OBIETTIVO DELLA RICERCA

L'obiettivo di questo studio è stato quello di contribuire alla comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono al comportamento migratorio delle cellule stromali mesenchimali di origine umana (*human Mesenchymal Stromal Cells* - hMSC).

Le cellule stromali mesenchimali adulte isolate dal midollo osseo sono ampiamente studiate ed applicate per le loro capacità multi potenti, il potenziale differenziativo e di rigenerazione tissutale.

Inoltre le hMSC stanno emergendo come nuovi possibili agenti veicolatori di farmaci nella terapia cellulare. Infatti, la terapia mirata per i tumori isolati e le metastasi potrebbe essere veicolata dalle hMSC proprio per le loro caratteristiche tumoritrofiche.

Tuttavia, un'alterata migrazione è un *caveat* nella terapia cellulare. Inoltre l'applicazione sistemica delle hMSC necessita di un efficace *homing* cellulare, ed è quindi della massima importanza comprendere i meccanismi molecolari che stanno alla guida del movimento verso siti specifici.

La via di segnale PI3K/Akt regola una pletora di funzioni cellulari, come il ciclo cellulare, la sopravvivenza e la crescita⁷⁶. Recenti studi hanno inoltre dimostrato che Akt riveste un ruolo cruciale nella migrazione e nell'invasione cellulare⁶⁹⁻⁷¹, attraverso la fosforilazione o il legame a proteine che regolano il rimodellamento dell'actina. In particolare, va sottolineato che le isoforme 1 e 2 di Akt esercitano funzioni opposte nella regolazione della migrazione delle cellule del cancro della mammella e delle metastasi^{69,70,73,77}. Tuttavia, si hanno poche informazioni sul loro ruolo in altri modelli cellulari. Con l'ausilio di specifici inibitori farmacologici delle due diverse isoforme, abbiamo quindi cercato di chiarire il contributo di Akt alla migrazione delle hMSC.

MATERIALE E METODI

1. Coltura cellulare

L'allestimento di una coltura di hMSC provenienti dal midollo osseo comprende le seguenti fasi:

- Prelievo del midollo osseo
- Isolamento delle MSC
- Espansione delle MSC

Prelievo

Nell'ambito di uno studio approvato dal Comitato Etico locale è stato prelevato il midollo osseo dalla cresta iliaca di pazienti sottoposti ad interventi chirurgici, dopo aver ottenuto il loro consenso informato. Il prelievo è stato effettuato dal personale medico in sala chirurgica. L'aspirazione del midollo è stata effettuata usando un'apposita siringa e l'aspirato è stato trasferito in provette vacutainer contenenti 10.8 mg K₂EDTA (Becton Dickinson, NJ, USA). Le cellule mesenchimali sono concentrate nei primi millilitri dell'aspirato, per cui la sede di introduzione dell'ago è stata cambiata più volte in modo da prelevare, in totale, circa 20ml di sangue midollare.

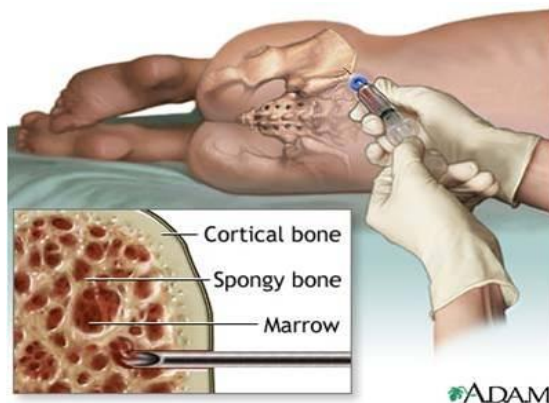


Figura 06. Prelievo midollare

Isolamento

L'aspirato midollare (*Bone Marrow*, BM) è stato trasportato a RT in laboratorio dove è stato effettuato l'isolamento delle MSC mediante gradiente di densità. Il BM è stato diluito con PBS (Euroclone), stratificato su Ficoll (Ficoll-Paque™ PREMIUM densità 1.073 GeHealthcare, Uppsala, Svezia) e centrifugato a 450g per 30min a RT. In questo modo è stata ottenuta la separazione delle cellule mononucleate da quelle polimorfonucleate e non nucleate; l'anello di cellule mononucleate è stato prelevato e messo in coltura.

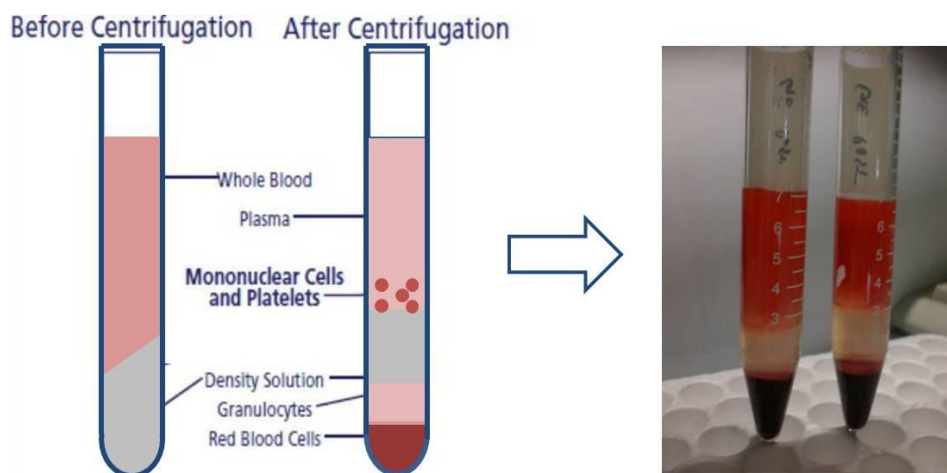


Figura 7. Schema dell'isolamento

Espansione

Le cellule mononucleate sono state analizzate per numero e vitalità con un sistema automatizzato (NucleoCounter®, ChemoMetec A/S, Allerød, Danimarca) che permette di identificare le cellule non vitali mediante colorazione con ioduro di propidio e le cellule totali attraverso il conteggio dei nuclei. La vitalità è il rapporto tra il numero delle cellule non vitali e le cellule totali. In media sono stati ottenuti 50×10^6 di cellule mononucleate per ogni ml di sangue midollare. Dati riportati in letteratura sostengono che la frequenza delle cellule staminali mesenchimali in un prelievo di aspirato midollare è di 1 su 18000 cellule mononucleate⁷⁸ e questo significa che da ogni prelievo il numero di MSC che si ottiene è molto limitato ed è quindi importante ricorrere all'espansione cellulare *in vitro*.

Le cellule mononucleate sono state seminate in una fiasca con il mezzo di crescita costituito da terreno α -MEM (Lonza, Verviers, Belgio) supplementato con il 20% di FBS (Gibco,

Invitrogen, Paisley, UK), GlutaMAX™ 2mM (Gibco) e 100U/ml penicillina/streptomicina (Gibco). Le cellule sono state coltivate in incubatore a 37°C e al 5% di CO₂.

Le MSC, a differenza delle altre cellule mononucleate, hanno la capacità di aderire alla plastica e sfruttando tale caratteristica, mediante cambio di terreno, il giorno successivo alla semina, è stata eliminata la maggior parte dei tipi cellulari contaminanti. I tempi per ottenere una quantità di cellule sufficienti per il trapianto è variabile e può dipendere sia dall'individuo che dalla modalità del prelievo.

2. Saggio CFU (Unità Formanti Colonie)

Il saggio CFU-F (*colony forming unit-fibroblast*) viene generalmente utilizzato per valutare la presenza, in un campione di BM, di cellule staminali mesenchimali (MSC); le unità formanti colonie rappresentano infatti il numero delle MSC presenti nel prelievo e per definizione un'unità formante colonia è rappresentata da una colonia con un numero di cellule maggiore o uguale a 50.

Le cellule nucleate sono state seminate a bassa densità, 2×10^3 cellule/cm² (1.5×10^5 /100mm *dish*) in terreno α -MEM con il 20% FBS e 1% GlutaMAX™ a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. I precursori BM-MSC sono stati quantificati dopo due settimane, fissando le colonie con metanolo a RT per 10min e colorandole con blu di metilene 1% in tampone borato 0.01 M (pH 8.5). La quantità di MSC è stata stabilita contando le colonie derivate da una singola cellula. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato.

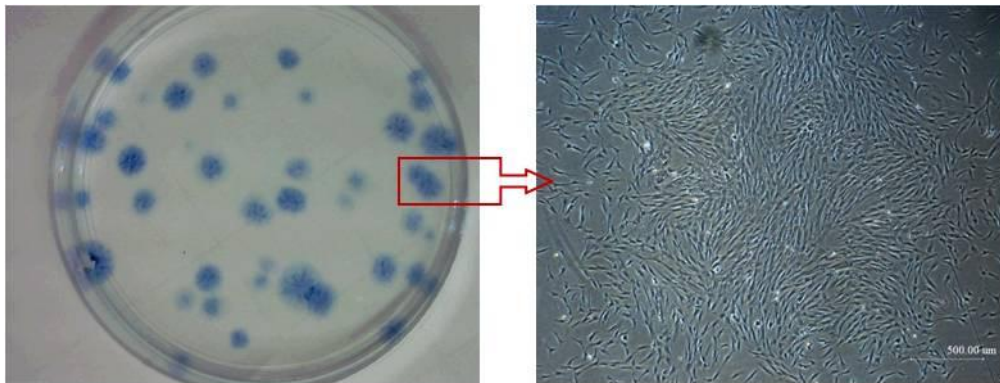


Figura 8. Colonie colorate con blu di metilene e una singola colonia vista al microscopio

3. Cinetica di proliferazione cellulare

La proliferazione cellulare è stata valutata determinando il tempo di duplicazione (*doubling time*, DT) e di raddoppiamento della popolazione (*population doubling*, PD). Le cellule sono state seminate in terreno α -MEM con 20% FBS e 1% GlutaMAX e al raggiungimento della confluenza un numero definito di cellule è stato riseminato in una nuova fiasca. La vitalità cellulare è stata determinata ad ogni passaggio con il sistema di conta automatizzato NucleoCounter®.

Il DT e il PD sono stati valutati, rispettivamente, secondo le seguenti formule $T x ((\log 2) / \log N)$ e $\log N / \log 2$, dove T è il tempo e N è il rapporto tra le cellule finali e le cellule seminate inizialmente. L'andamento delle cellule è stato osservato fino al sesto passaggio mostrando sempre una fase di crescita esponenziale. Le MSC hanno *doubling time* di circa 2 giorni e mezzo.

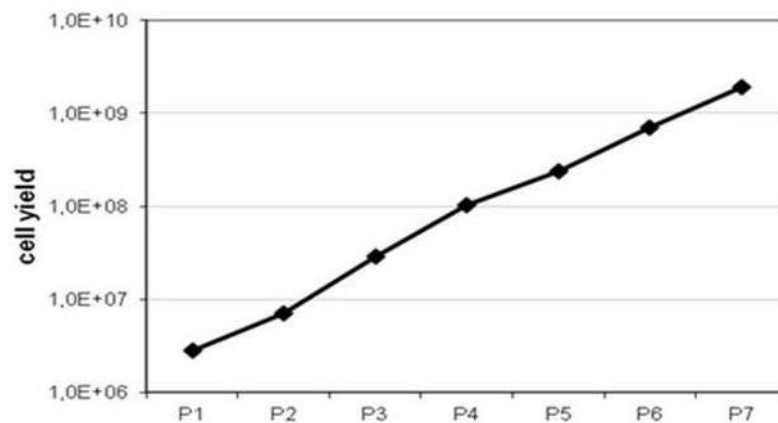


Figura 9. Tipica curva di crescita cellulare

4. Test funzionali di differenziamento cellulare

Le MSC sono state esaminate per valutare il loro potenziale differenziativo, seguendo diversi protocolli che si basano sull'utilizzo di specifici mezzi di coltura per indurre il differenziamento in senso osteogenico, adipogenico o condrogenico.

Per il differenziamento in senso **osteogenico**, sono state seminate 5×10^4 cellule/cm² in α -MEM al 2% di FBS e il giorno seguente sono state trattate con il Mix osteo-induttivo contenente 50 μ g/mL acido ascorbico (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 100nM dexametasone (Sigma) e 10mM β -glicerofosfato (Sigma). Il mezzo induttivo è stato cambiato 2 volte alla settimana e dopo 14 giorni i campioni sono stati sottoposti al saggio della deposizione di calcio⁷⁹. La valutazione del differenziamento avviene evidenziando la formazione di noduli extracellulari di matrice mineralizzata. Tale metodo è basato sull'utilizzo del colorante Alizarin Red (Sigma). Le cellule sono state fissate per 1h con etanolo 70% e colorate con la soluzione di Alizarin Red S 40mM pH 4.0-4.2 (Sigma) per 10min. Dopo un lavaggio, è stato aggiunto cetilpiridinio (Sigma) al 10% in sodio fosfato 10mM, pH 7 per 15min, al buio, per eluire il colorante. Sono stati prelevati 200 μ L in duplicato e letti allo spettrofotometro $\lambda = 562$ nm utilizzando un lettore ELISA (Synergy HT, Biotek, Winooski, USA). Gli standard sono stati preparati diluendo la soluzione di Alizarin Red allo 0.5% in cetilpiridinio.

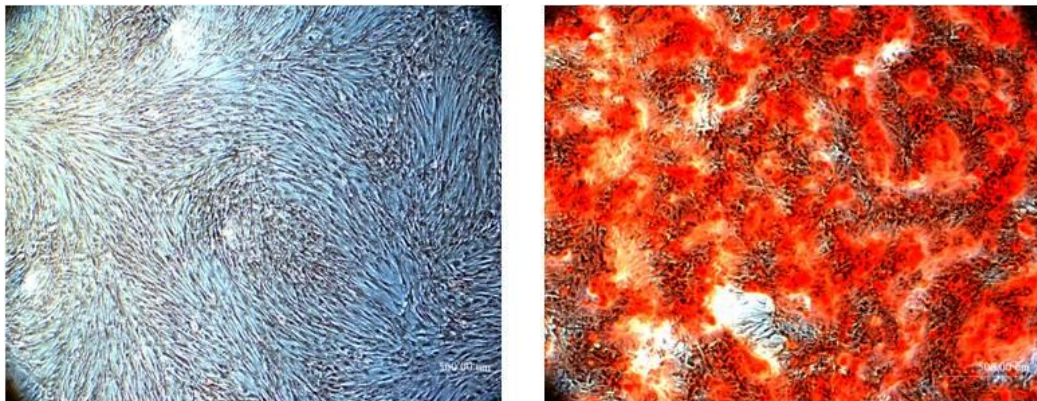


Figura 10. Differenziamento osteogenico: Ctrl VS Mix osteoinduttivo

Il differenziamento **adipogenico** è stato indotto seminando 5×10^4 cellule/cm² in DMEM-HG (Euroclone, Milano, Italia) con 2% FBS e il giorno successivo le cellule sono state trattate con il Mix adipo-induttivo contenente 1 μ M dexametasone (Sigma), 0.2mM indometacina (Sigma), 0.5mM IBMX (Sigma) e 10 μ M insulina bovina (Sigma). L'induzione è stata ripetuta con il cambio del mezzo 2 volte alla settimana per 21 giorni. La valutazione del differenziamento avviene evidenziando la formazione di vacuoli intracellulari di natura adipocitaria nelle MSC mediante la colorazione con Oil Red O (Sigma). Le cellule sono state fissate in paraformaldeide 4% in PBS, colorate con la soluzione Oil Red O 0.3% in isopropanolo e osservate al microscopio per valutare la presenza di vacuoli contenenti il colorante. L'estrazione del colorante è stata effettuata con isopropanolo al 100% per 15min a RT e 200 μ L dell'estratto sono stati letti allo spettrofotometro a $\lambda=500$ nm.

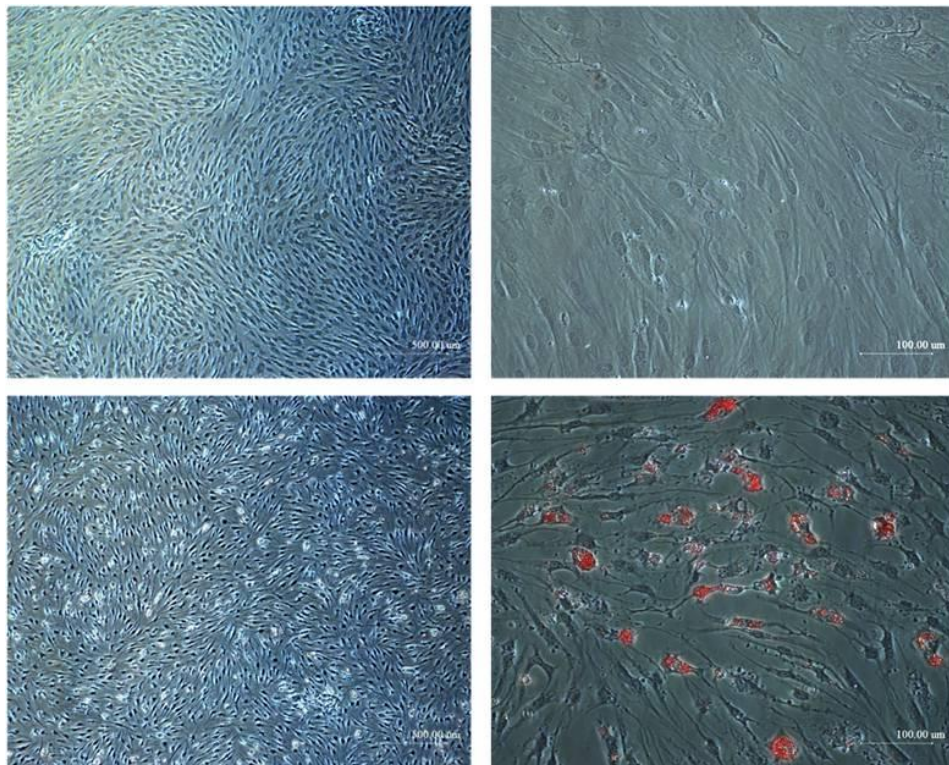


Figura 11. Ctrl VS Mix adipo-induttivo, prima e dopo la colorazione Oil RedO

Il differenziamento **condrogenico** è stato indotto su pellet di 2.5×10^5 cellule trattati con 6 dosi di *StemPro Chondrogenesis differentiation Kit*[®] (Invitrogen) ogni 3 giorni e coltivati in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Le cellule di controllo sono state mantenute in DMEM-HG (Euroclone) supplementato con 10% FBS (Gibco). Dopo 21 giorni i pellet sono stati digeriti con papaina (Sigma) per 3 ore a 65°C e centrifugati a 10000g per 10min. Il contenuto di glicosaminoglicani (GAG) è stato misurato mediante *Blyscan solfatate glicosaminoglicano Assay Kit* (Biocolor Ltd., Carrickfergus, UK) che permette di quantificare i GAG ad una lunghezza d'onda di 656 nm interpolando i dati con una curva standard di condroitina 4-solfato bovina⁸⁰.

5. Trattamenti con gli Inibitori di PI3K e Akt

Sono stati utilizzati i seguenti inibitori:

LY294002 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), un inibitore reversibile specifico della PI3K, solubilizzato in DMSO.

Inibitore IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), che agisce su diversi *targets* a monte della via PI3K/Akt, solubilizzato in DMSO.

Inibitore VIII (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), un inibitore di Akt1 e Akt2, solubilizzato in DMSO.

Inibitore XII (CalBiochem, Temecula, CA, USA), un inibitore specifico per l'isoforma Akt2, solubilizzato in DMSO.

Le hMSC sono state trattate con gli inibitori, alle concentrazioni specificate negli esperimenti, per 30min (per LY294002 e inibitore IV) e per 1h (inibitori VIII e XII). Prima del trattamento le cellule sono state mantenute in un terreno a bassa concentrazione di siero (0.2% di FBS per 16h).

6. Saggio di citotossicità

Il saggio AlamarBlue[®] (AbD Serotec, Oxford, UK) è stato utilizzato per misurare la proliferazione delle hMSC e la citotossicità degli inibitori utilizzati per i trattamenti.

Il saggio si basa sull'utilizzo di un indicatore colorimetrico non tossico (Resazurina) che varia in risposta all'attività metabolica cellulare: cellule metabolicamente attive e vitali riducono il Resazurina a Resorufina, mentre cellule non vitali non sono in grado di ridurlo e generano un segnale proporzionalmente inferiore, misurabile come fluorescenza o assorbanza.

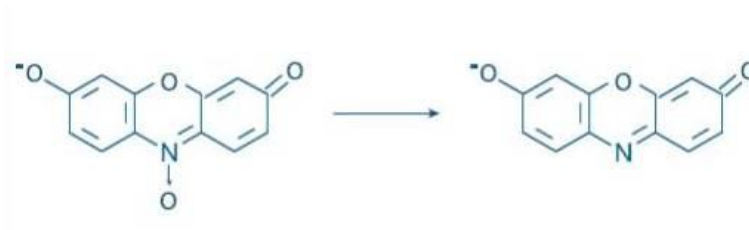


Figura 12. Reazione che sta alla base del saggio AlamarBlue[®]: Resazurina → Resorufina

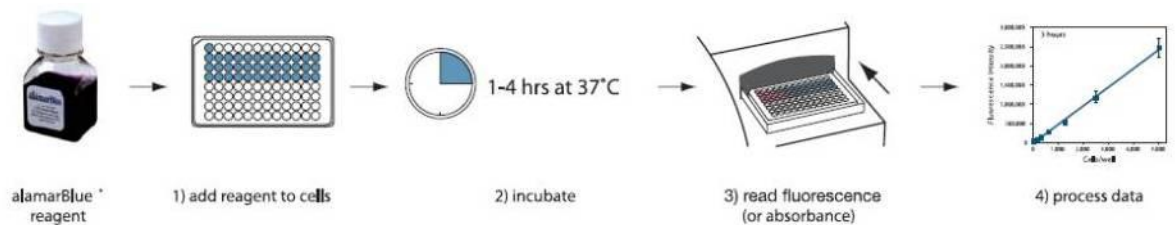


Figura 13. Protocollo per il saggio AlamarBlue[®]

Il test è semplice da eseguire in quanto l'indicatore è solubile in acqua e si elimina così lavaggio, fissaggio e fasi d'estrazione richieste da altri saggi comunemente utilizzati per misurare la proliferazione. Inoltre il risultato che si ottiene è chiaro, stabile e di facile interpretazione.

Le hMSC sono state seminate alla concentrazione di 1×10^4 cellule/cm², senza siero per 16h e trattate con gli inibitori per tempi definiti. Il reagente è stato aggiunto al campione e lasciato per 4h a 37°C. L'indicatore REDOX è passato dalla forma ossidata (blu) alla forma ridotta (rossa) in maniera proporzionale rispetto alle cellule metabolicamente attive presenti nel campione.

La percentuale della vitalità cellulare è stata calcolata come la differenza della riduzione dell'AlamarBlue tra i campioni trattati e i campioni di controllo utilizzando la seguente formula:

$$\begin{array}{l} \% \text{ sopravvivenza} \\ \text{cellulare} \end{array} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2)}{(R1 \times N2) - (R2 \times N1)} \times 100$$

Dove: O1 = coefficiente di AlamarBlue ossidato a 570nm, 80586

O2 = coefficiente di AlamarBlue ossidato a 600nm, 117216

R1 = coefficiente di AlamarBlue ridotto a 570nm, 155677

R2 = coefficiente di AlamarBlue ridotto a 600nm, 14652

A1 = assorbanza del campione a 570nm

A2 = assorbanza del campione a 600nm

N1 = assorbanza del CTRL negativo (mezzo senza le cellule) a 570nm

N2 = assorbanza del CTRL negativo (mezzo senza le cellule) a 600nm

7. Citometria a flusso

La citometria a flusso permette di analizzare caratteristiche chimico-fisiche, il numero e la dimensione delle cellule. Tale tecnica si basa sull'utilizzo di anticorpi coniugati con fluorocromi che consentono di analizzare più parametri contemporaneamente.

Per valutare le fasi del ciclo cellulare e l'apoptosi in seguito ai trattamenti, sono state utilizzate 5×10^5 cellule, fissate in etanolo e colorate con propidio ioduro (PI).

8. Saggio di motilità cellulare

Lo *Scratch Wound healing assay* ha permesso di valutare la capacità delle cellule di riformare un monostrato confluyente dopo un'azione meccanica di taglio eseguita con un puntale sterile da 200 μ L. Lo “*scratch*” è un'incisione superficiale longitudinale in corrispondenza del diametro della piastra, che genera una risposta migratoria direzionale. Dopo un lavaggio in PBS per eliminare le cellule staccate durante tale operazione, la piastra è stata lasciata nell'incubatore per 16h con terreno addizionato con FBS 0.2% e successivamente trattata con i farmaci indicati. In questo modo si è simulato il meccanismo di riparazione della ferita, per valutare la capacità migratoria delle cellule trattate e non.

La migrazione è stata monitorata nel tempo (30', 1.5h, 3h, 4.5h, 6h, 7.5h, 24h) attraverso l'acquisizione di immagini al microscopio che hanno consentito di visualizzare il processo di riparazione della ferita e la motilità cellulare. Il *software TScratch*⁸¹ è stato utilizzato per analizzare i dati. Tale *software* fornisce una percentuale dello “*scratch*” per ogni singola immagine, in modo affidabile e riproducibile. Lo svantaggio è la mancanza di un'area di “*scratch*” definita. Si è quindi cercato di superare tale limite normalizzando i dati con la percentuale dello “*scratch*” a tempo zero definita come 100%.

9. Saggio di migrazione

Il saggio di migrazione, o chemiotassi, consente di valutare *in vitro* la capacità delle cellule di migrare in risposta agli stimoli. Il saggio è stato effettuato utilizzando piastre da 24 pozzetti nei quali sono stati inseriti dei *Transwell* (Corning Incorporated, Corning, NY, USA), ovvero degli inserti in policarbonato, a distanza fissa dalla base, che consentono la suddivisione del pozzetto in due compartimenti, inferiore (basale) e superiore (apicale). In base alla dimensione delle cellule sono stati scelti *Transwell* con pori da 8µm, in quanto l'abilità migratoria delle cellule attraverso la membrana porosa dipende sia dalla grandezza dei pori che dalle condizioni di coltura.

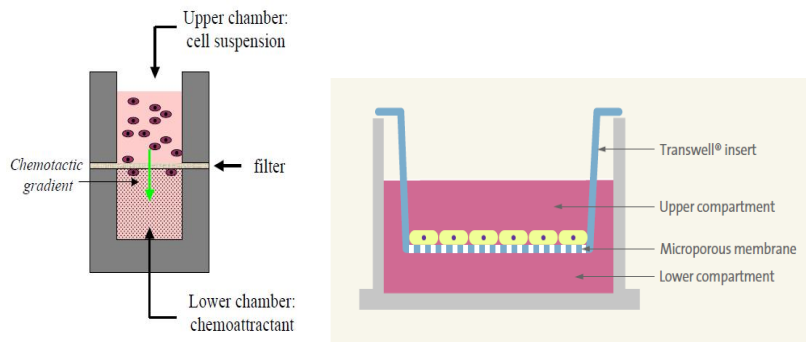


Figura 14. Transwell

Le cellule in fase di crescita esponenziale sono state staccate con tripsina bloccata con Quenching medium (5% BSA/PBS) e contate mediante NucleoCounter®, per uniformare e riprodurre il saggio mantenendo identiche condizioni.

Nella parte superiore è stata seminata una sospensione di 4×10^4 cellule in 100µL, mentre in quella inferiore sono stati aggiunti 600µL di terreno al 10% FBS, che ha costituito uno stimolo chemiotattico e ha conferito alle cellule un elevato grado di invasività.

Le cellule sono state coltivate a 37°C al 5% di CO₂ per 6h, in seguito fissate e colorate mediante HEMA 3® STAIN SET (Fisher Diagnostics, Middletown, USA). Soltanto le cellule fissate e colorate sulla parte inferiore della membrana sono state considerate le cellule migranti. Il saggio è stato condotto su 3 diverse linee in triplicato e sono stati contati al microscopio 10 campi per ogni condizione (obiettivo 40X).

10.Saggio di Western blotting

Preparazione dei lisati cellulari

Le hMSC sono state seminate in terreno completo a una concentrazione iniziale di 10^4 cellule/cm² per 24h. Dopo una parziale deprivazione del siero (0.2% FBS) per 16h, le cellule sono state trattate con differenti concentrazioni degli inibitori per i tempi prestabiliti. I campioni di controllo sono stati trattati con la quantità equivalente del veicolo (DMSO). Dopo lavaggio in PBS i campioni sono stati lisati in ghiaccio, per 20min, utilizzando il tampone RIPA buffer (Tris-Cl 20mM pH 7.0, 10% glicerolo (Sigma), 1% NP-40 (Euroclone), 10mM EDTA (Sigma), 150mM NaCl (Sigma), 20mM NaF (Fluka BioChemika, Buchs, Svizzera), 5mM Sodio Pirofosfato) addizionato con 10mM di Na₃VO₄ (Sigma), 10mM PnPP (Sigma) e inibitori delle proteasi (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma). Il lisato cellulare è stato successivamente sonicato, per 10sec, e centrifugato a 15000 rpm per 15min a 4°C.

Quantificazione proteica

La quantificazione delle proteine contenute nei lisati cellulari è stata effettuata usando il metodo dell'acido bicinconinico (BCA, Bicinchoninic acid Protein assay, Pierce, Rockford, USA), basato sulla reazione del biureto. La concentrazione proteica è stata calcolata per interpolazione dei valori di assorbanza ottenuti con la curva standard di BSA. I campioni sono stati conservati a -80°C.

Western Blotting

L'elettroforesi è stata effettuata su gel di poliacrilamide 7,5% (*Gel Precast*, Bio-Rad, Hercules, USA) in condizioni denaturanti (SDS-PAGE). 25µg di proteine per ogni campione sono stati addizionati con *Leamml* Loading Buffer e fatti bollire per 5min a 100°C.

Al termine della corsa elettroforetica (200V per 40min), le proteine sono state trasferite su membrana PVDF 0.45µm (Immobilon-P, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), attivata in metanolo al 100% e lavata con *Transfer Buffer* (25mM Tris-Cl, 192 mM glicina (Bio-Rad), con 20% di metanolo). Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana è stato fatto per 1h a 100V a RT. La qualità del trasferimento è stata valutata mediante colorazione delle proteine con *Rosso Ponceau*. La membrana è stata poi saturata con BSA, e incubata con anticorpi primari e secondari (*SNAP i.d. SYSTEM*, Millipore). Le soluzioni erano in tampone

TBS (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM NaCl, Sigma) + 0.1% Tween 20 (Sigma) contenente 1% BSA (Sigma).

Il sistema di rilevazione utilizzato è stato il *Luminata Classico Western HRP Substrate* (Millipore).

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anti-pAkt S473 (Cell Signaling Technology, MA, USA), anti-Akt1/2 (Santa Cruz), e anticorpi secondari anti-mouse (Santa Cruz), anti-rabbit (Santa Cruz). Per ogni esperimento la quantità di proteina caricata nei differenti campioni è stata normalizzata contro β -actina.

11. Saggio di vitalità cellulare

Il saggio *Live&Dead* è stato utilizzato per valutare la vitalità cellulare in seguito ai trattamenti con gli inibitori. Questo tipo di saggio si è basato sulla marcatura delle cellule con tre diversi fluorocromi: **calceina AM**, **etidio omodimero** e **Hoechst 33342** (Invitrogen) e ha consentito di ottenere informazioni sul numero totale delle cellule e sulla loro vitalità, valutando l'attività dell'esterasi intracellulare e l'integrità della membrana plasmatica.

La **calceina AM** (2.5 μ M) all'interno delle cellule vitali è stata convertita da un'esterasi, da calceina non fluorescente a calceina fluorescente e quest'ultima, mediante la presenza di cariche negative, è stata trattenuta all'interno delle cellule e ha conferito loro una fluorescenza verde (eccitazione/emissione ~495/~515nm).

L'**etidio omodimero** (EthD-1) è penetrato soltanto nelle cellule con membrana plasmatica danneggiata e, oltrepassata la membrana nucleare, è andato ad intercalarsi al DNA, producendo così una fluorescenza rossa nelle cellule non vitali (eccitazione/emissione ~495/635nm). La concentrazione utilizzata è stata di 10 μ M.

L'**Hoechst** è un colorante fluorescente (eccitazione/emissione ~350/~461nm) in grado di oltrepassare la membrana plasmatica delle cellule vitali e, essendo un intercalante del DNA, colora i nuclei in blu. La concentrazione utilizzata è stata di 5 μ g/ml.

I tre coloranti, diluiti in PBS, sono stati incubati (per 10min) con le cellule al termine del trattamento. Per ogni campo sono state acquisite le immagini alle tre lunghezze d'onda e sovrapposte utilizzando il *software* ImageJ.

12.Immunocitochimica

Le cellule sono state seminate su vetrino copri-oggetto sterile all'interno di una piastra da 12 pozzetti (2.5×10^4 cellule/pozzetto). Al termine dei trattamenti, le cellule sono state fissate in paraformaldeide 4% per 10min e permeabilizzate con PBT (PBS 1X+0.1% Triton) prima dell'incubazione con gli anticorpi primari (1h) e secondari (45min). Durante l'incubazione del vetrino con l'anticorpo secondario è stato possibile aggiungere *Phalloidin*, marcata con il fluoroforo di interesse (es. FITC o TRITC).

Hoechst 33342 diluito 1:2000 in PBS 1X è stata utilizzato per colorare i nuclei.

Ogni copri-oggetto è poi stato montato su di un vetrino con *Fluoromount-G* (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). I vetrini sono stati osservati dopo 2h al microscopio confocale NikonTE2000-U con laser A1 automatizzato che incorpora “*resonant scanner*” con la frequenza di 7.8 kHz e permette *high-speed imaging*, con la camera DS-QiMc-U2 a 12bit.

13.Live imaging (Time Lapse)

Le cellule sono state seminate ad una densità di 2.5×10^4 cellule in piastre di vetro da 35mm (MatTek Corporation Ashland, OR, USA) e sono state lasciate aderire per una intera notte. I trattamenti farmacologici sono stati eseguiti come descritto in precedenza. I filmati sono stati registrati con un microscopio NikonTi Eclipse, dotato di un regolatore di temperatura e CO₂ (Okolab, Ottaviano, NA, Italia) ed una fotocamera DS-QiMc-U2 a 12-bit. Per l'acquisizione delle immagini è stato utilizzato un obiettivo 10X Plan-apocromatico Ph1 DL 0.25NA, ottenendo una risoluzione finale di 0.91µm/pixel. La durata totale di ciascun filmato è stata di 15h con un intervallo di tempo di 5min tra due immagini consecutive.

Per ogni singola piastra sono state acquisite sei sequenze da 180 immagini ciascuna. Per l'analisi di motilità delle cellule presenti, sono state prese in considerazione tre regioni rappresentative di interesse (*Region-Of-Interest*, ROI) per ogni singola sequenza. Al fine di valutare la motilità delle singole MSC, è stato utilizzato un algoritmo di tracciamento appositamente sviluppato all'interno del gruppo. In particolare, sono stati impiegati metodi di segmentazione, tipici dell'elaborazione di immagini, per rilevare in ogni immagine il Centro di Massa (CM) di ogni singola cellula. Sono stati utilizzati anche metodi di tracciamento basati su caratteristiche salienti delle cellule (*feature-based*) e su combinazioni di operatori morfologici (*morphology-based*) per tracciare, in maniera accurata, il CM delle singole cellule tra le immagini della sequenza. E' stata così identificata la traiettoria di ogni singola cellula presente nel campo di vista. Il tracciamento del CM potrebbe essere stato negativamente influenzato da eventuali artefatti. Ad esempio, un cambiamento di illuminazione tra le immagini acquisite in una stessa sequenza potrebbe generare errori nella stima delle traiettorie. Inoltre, a causa della bassa accuratezza di spostamento del supporto motorizzato del microscopio, le immagini di una stessa sequenza potrebbero risultare leggermente disallineate. Riguardo i due problemi appena citati, il disallineamento delle immagini può essere facilmente corretto, a posteriori, minimizzando l'errore di correlazione tra immagini seguenti impiegando algoritmi standard dell'elaborazione di immagini⁸².

14. Analisi statistica dei dati

I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando *ANOVA* (analisi di varianza calcolata) seguito dal test di confronto multiplo Bonferroni, con significatività $p < 0.05$. I risultati sono stati espressi come la media \pm la deviazione standard (SD). Tutti i risultati riportati sono rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti nelle stesse condizioni.

RISULTATI

L'inibizione della via di segnale PI3K/Akt attiva il rimodellamento del citoscheletro actinico nelle hMSC

Il ruolo della via di segnale PI3K/Akt sul rimodellamento del citoscheletro actinico è stato studiato nelle MSC in seguito ad esposizione a dosi crescenti di inibitori di PI3K/Akt ben caratterizzati, con una concentrazione tale da non compromettere la vitalità cellulare. La morfologia del citoscheletro cellulare è stata poi osservata in microscopia confocale tramite colorazione con Phalloidina (Fig. 15).

Nelle MSC controllo, la colorazione con PhalloidinFITC ha mostrato una fitta rete di F-actina organizzata in fasci stretti e fibre da stress. Sono ben visibili anche le adesioni focali e il fronte di migrazione nella direzione del movimento (Fig. 15A). Viceversa, nelle cellule trattate con LY-294002, l'inibitore specifico di PI3K, è stata osservata una minore quantità di fasci di actina, e una parziale perdita di contatto cellula-cellula (Fig. 15B). Questo effetto è stato confrontato con quello di un inibitore più ampio di tutta la via PI3K/Akt, l'inibitore IV, che blocca la PDK1, cioè la chinasi a monte di Akt. L'azione di questa seconda molecola sull'organizzazione citoscheletrica è stata molto più profonda, provocando il collasso dei fasci di actina e la perdita completa delle interazioni intercellulari e delle adesioni focali, dedotta tramite colorazione con anticorpo anti-vinculina (Fig. 15C). In base a queste osservazioni, si è cercato il rimodellamento Akt-dipendente del citoscheletro actinico, monitorandolo ulteriormente in risposta ad inibitori specifici di Akt. Come precedentemente descritto, lo stato di fosforilazione dei residui serina 473 e treonina 308 è direttamente correlato all'attività della chinasi, ed è strettamente dipendente dal legame del dominio PH della proteina ai 3'-fosfoinositidi di membrana. Si è scelto pertanto di utilizzare inibitori allosterici, che competono con il legame del dominio PH alla membrana, in modo da monitorare l'efficacia dell'inibizione attraverso lo stato di fosforilazione di Akt. Tali inibitori, inoltre, si sono dimostrati più efficaci degli inibitori che competono per il dominio di legame all'ATP in *trials* clinici. In particolare, sono state utilizzate molecole, quali l'inibitore XII (Akti XII), in grado di bloccare in modo altamente specifico una singola isoforma, e precisamente Akt2, oppure due isoforme, nel caso dell'inibitore VIII (Akti VIII). Va sottolineato inoltre che è stato dimostrato che queste molecole, alle dosi utilizzate, non hanno come bersaglio altre chinasi della famiglia AGC⁶⁸. Il trattamento con i composti Akti VIII e XII diminuisce i fasci di actina corticale, limita le adesioni focali a discrete estroflessioni della periferia cellulare,

con conseguente parziale perdita di adesività e arrotondamento delle cellule (Fig. 15D ed E). Pertanto, in accordo con quanto descritto precedentemente in altri tipi di cellule, le alterazioni della morfologia cellulare e l'organizzazione dello scheletro actinico, osservate in seguito ad inibizione farmacologica di PI3K/Akt, indicano un ruolo chiave di questa via anche nel rimodellamento del citoscheletro delle hMSC.

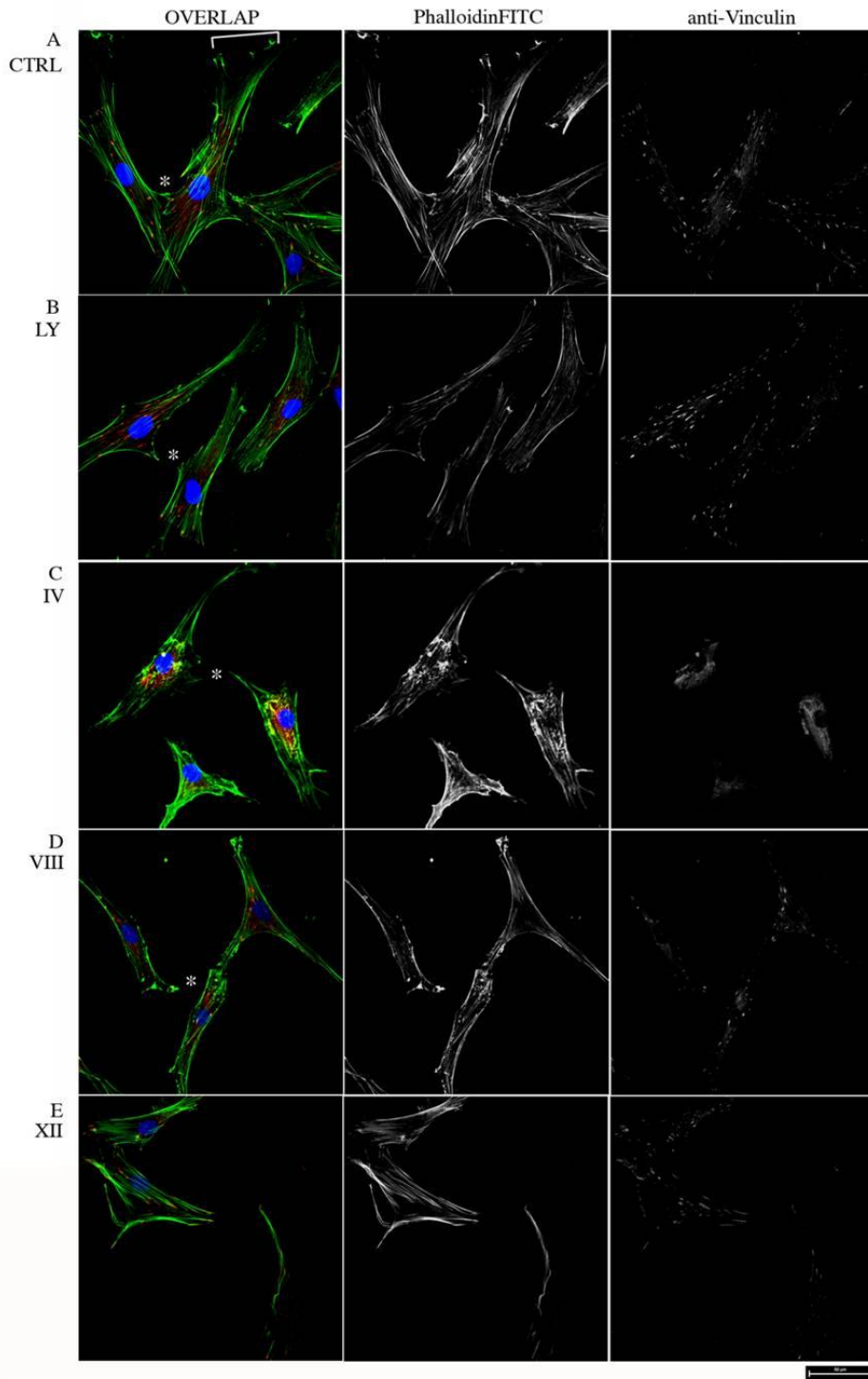


Figura 15. Rimodellamento del citoscheletro actinico di hMSC esposte agli inibitori di PI3K/Akt

(A) MSC controllo. (B) MSC trattate per 30min con LY294002 (10 μ M). (C) MSC trattate per 30min con Akti IV (2.5 μ M). (D) MSC trattate per 60min con Akt1/2i VIII (1 μ M). (E) MSC trattate per 60min con Akt2i XII (5 μ M). Gli anticorpi α -vinculina (in rosso) e PhalloidinFITC (in verde) sono stati usati in immunofluorescenza. La parentesi bianca nell'immagine A indica il fronte migratorio delle MSC, invece l'asterisco * nelle immagini B, C e D mostra i punti di perdita del contatto intercellulare.

Per verificare l'efficacia dell'inibizione, la fosforilazione di Akt S473 è stata monitorata mediante analisi immunoblotting, dimostrando che tutti gli inibitori, ai tempi stabiliti, diminuiscono la fosforilazione di Akt in maniera dose-dipendente (Fig. 19).

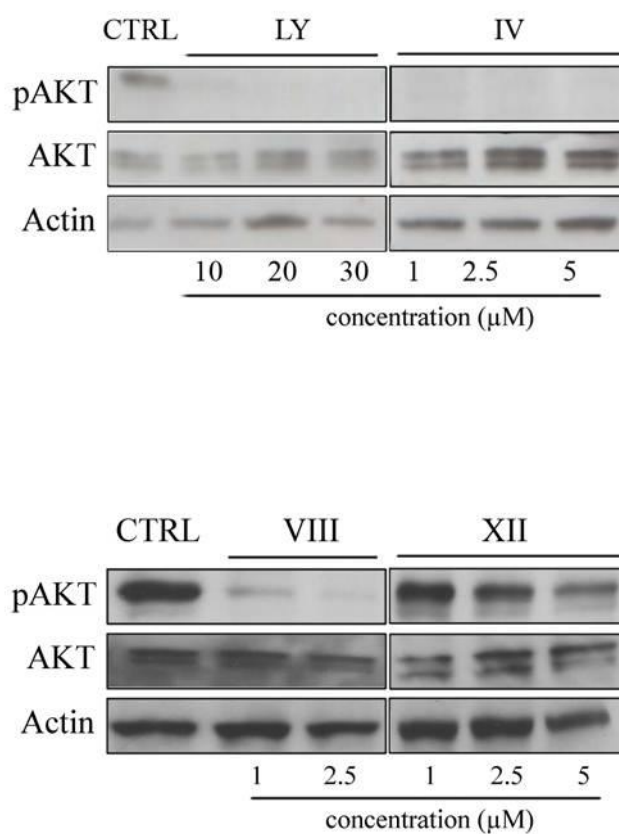


Figura 16. Attività di Akt efficacemente bloccata dagli inibitori di PI3K/Akt

Analisi western blotting dell'attività di Akt (pAkt) e della proteina totale (Akt1/2) in campioni di controllo (CTRL) trattati con DMSO o con concentrazioni crescenti di inibitori per 30 o 60min. Il filtro è poi stato rivelato con anti-actina per il controllo della carica proteica.

La via di segnale PI3K/Akt è in grado di modulare sia la migrazione che la motilità delle hMSC

Difetti nella migrazione rappresentano una limitazione importante per la terapia cellulare. Pertanto, alla luce del ruolo ben descritto di Akt nel rimodellamento dell'actina, a sua volta legata alla migrazione cellulare in diversi modelli cellulari, e sulla base delle osservazioni in immunofluorescenza sopra indicate, abbiamo voluto indagare più a fondo le funzioni di Akt nelle hMSC.

Poiché la riparazione della ferita (*wound healing*) è un processo di ripristino dell'omeostasi in cui la migrazione cellulare ha un posto rilevante, abbiamo dapprima esaminato l'effetto dell'inibizione di Akt sulla migrazione di hMSC mediante lo *Scratch Wound healing assay*, che permette di valutare la capacità delle cellule di ripristinare il monostrato in seguito ad incisione meccanica. Secondo questo test, le hMSC hanno dimostrato di avere una buona capacità migratoria, come si può osservare nella figura 17.

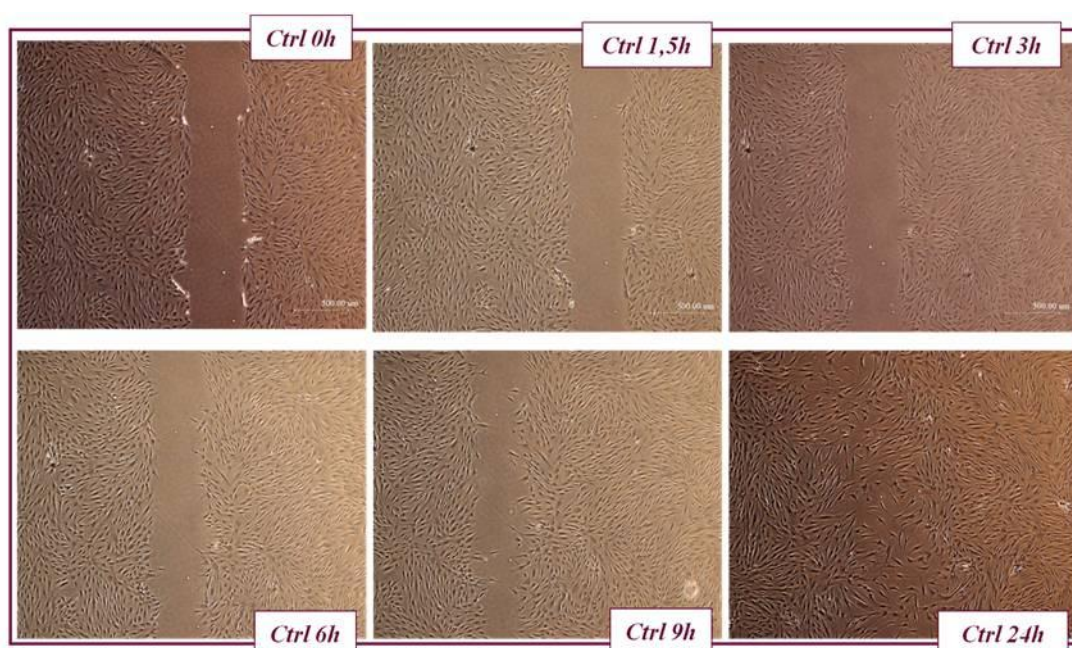


Figura 17. Le hMSC hanno buona capacità migratoria

L'osservazione di hMSC a diversi tempi dopo la ferita dimostra la capacità di queste cellule di riparare la ferita e ripristinare quasi completamente il monostrato dopo 24h.

In seguito al trattamento con LY-294002, l'inibitore specifico di PI3K, si è potuto notare un rallentamento nella riparazione del monostrato, che dopo 24h presenta ancora delle aree non chiuse, indicando una diminuzione della invasività. L'utilizzo di un inibitore più ampio della via PI3K/Akt, l'inibitore IV, rallenta ulteriormente la migrazione, come ben visibile nella figura 18, che mostra come dopo 24h la ferita sia ancora molto ampia, e indica che questa via di segnale gioca un ruolo importante nel processo fisiologico di riparazione.

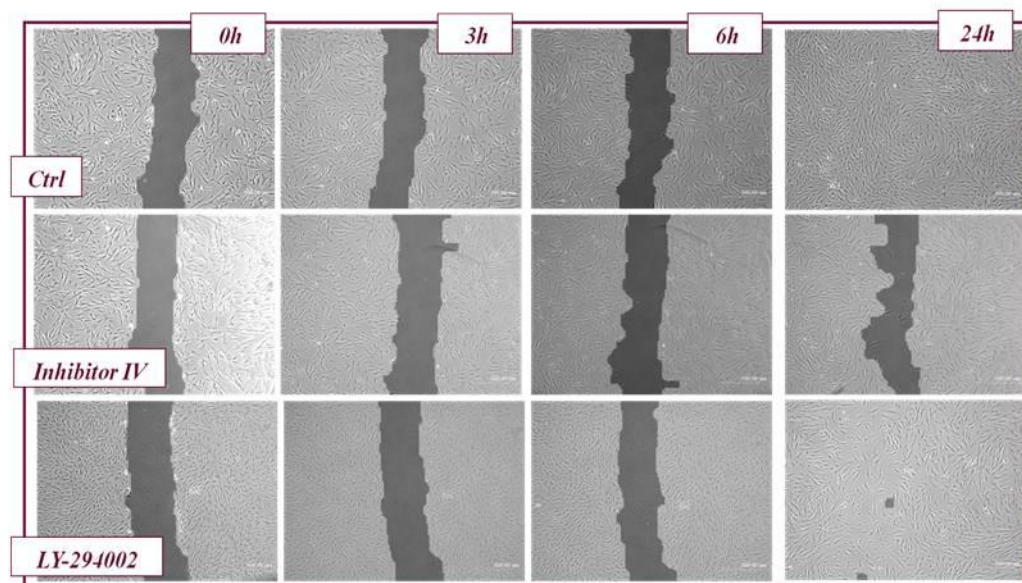


Figura 18. Il blocco della via PI3K/Akt rallenta la motilità delle hMSC

La parte delle immagini in grigio scuro rappresenta spazio non ripopolato dalle cellule migranti dopo lo *scratch*. La percentuale della chiusura dello *scratch* è stata determinata tramite analisi con TScratch software.

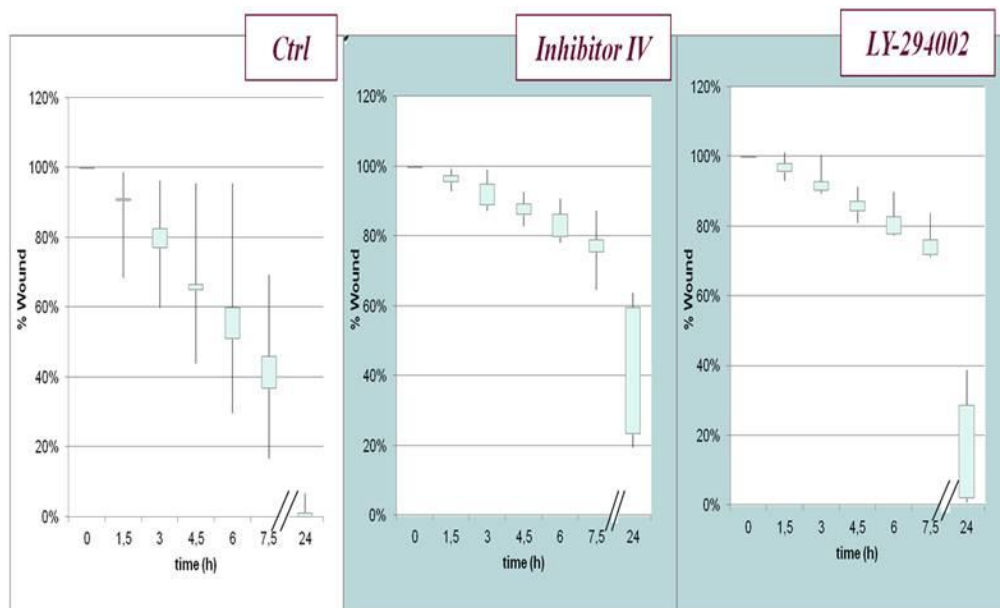


Figura 19. Rappresentazione Box Plot della ripopolazione dello scratch del monostrato nel tempo, in presenza o assenza di inibitori della via di PI3K/Akt

La percentuale di chiusura dello *scratch* è stata misurata grazie ad algoritmi specifici del *software TScratch*. Si può notare che il campione di controllo chiude più velocemente lo *scratch* rispetto ai campioni trattati con gli inibitori.

Lo studio è stato quindi ripetuto utilizzando inibitori allosterici di Akt. Mentre il campione di controllo, trattato solo con DMSO, è in grado di chiudere lo *scratch* in 24h, il campione trattato con il Akti XII, che inibisce selettivamente l'isoforma 2, migra in maniera notevolmente rallentata e dopo 24h la chiusura della ferita è ancora incompleta (Fig. 20). Questo risultato è in linea con quanto riportato in letteratura sul ruolo pro-migratorio di Akt2 in cellule epiteliali di carcinoma della mammella. Tuttavia, la contemporanea inibizione delle isoforme 1 e 2 in seguito al trattamento con Akti VIII, pur rallentando la migrazione, è molto meno efficace dell'inibizione della sola isoforma 2. Questa osservazione suggerisce che, in queste cellule, le due isoforme abbiano un ruolo antagonista sulla migrazione, e che pertanto il blocco di entrambe le isoforme indebolisca l'attività antimigratoria.

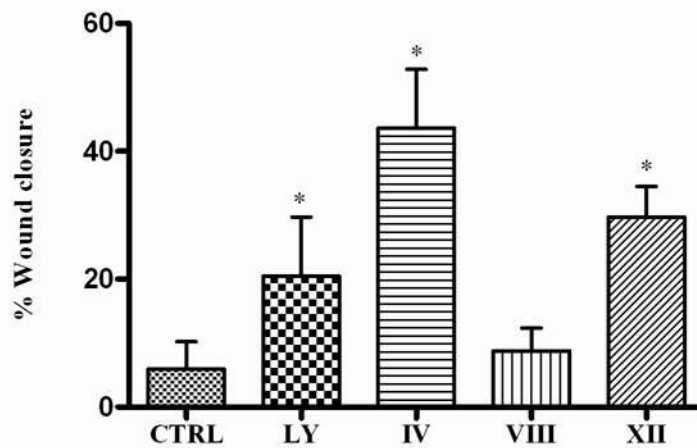
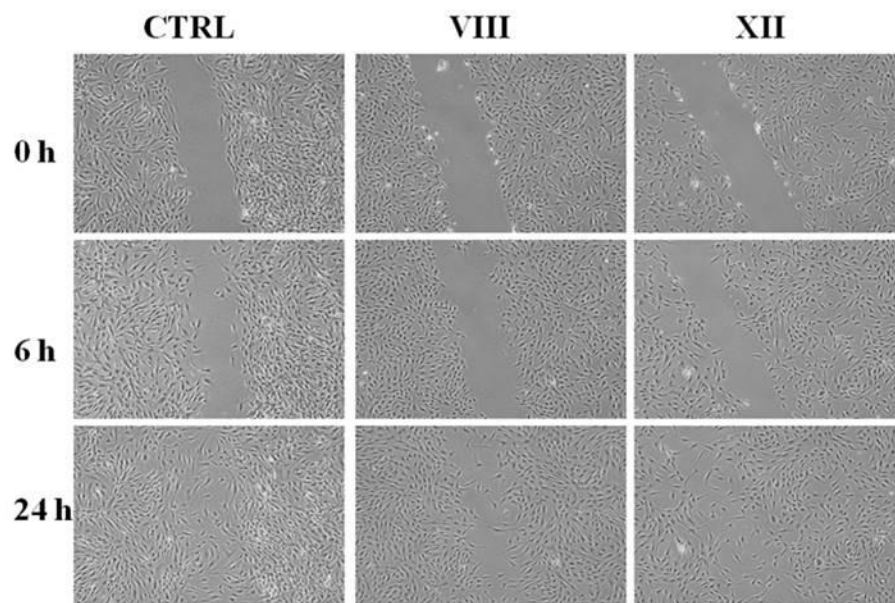


Figura 20. Gli inibitori di PI3K e di Akt modulano negativamente la migrazione delle MSC

La percentuale della chiusura dello *scratch* è maggiore nei campioni trattati con gli inibitori.

* p<0.05

Va tuttavia considerato che anche la proliferazione cellulare potrebbe interferire con il processo di riparazione della ferita, con un effetto positivo sul tempo di chiusura. Al contrario, gli inibitori di Akt potrebbero influenzare negativamente la chiusura della ferita poiché potrebbero rallentare la crescita cellulare o persino, considerando il ruolo *pro-survival* di Akt, provocare apoptosi. Per escludere una possibile interferenza, è stata valutata la salute sia dei campioni di controllo, trattati con DMSO, che dei campioni trattati con gli inibitori, mediante il saggio di AlamarBlu[®] (Fig. 21). Tale saggio misura l'attività metabolica cellulare. Le cellule danneggiate o non vitali sono metabolicamente inattive, quindi generano un segnale proporzionalmente inferiore rispetto alle cellule sane. La misura dell'attività metabolica totale, controllata al tempo zero (0h) e dopo 24h, non ha indicato nessuna variazione sostanziale a seguito dell'inibizione di Akt, escludendo perciò eventuali interferenze dei farmaci utilizzati sulla vitalità cellulare.

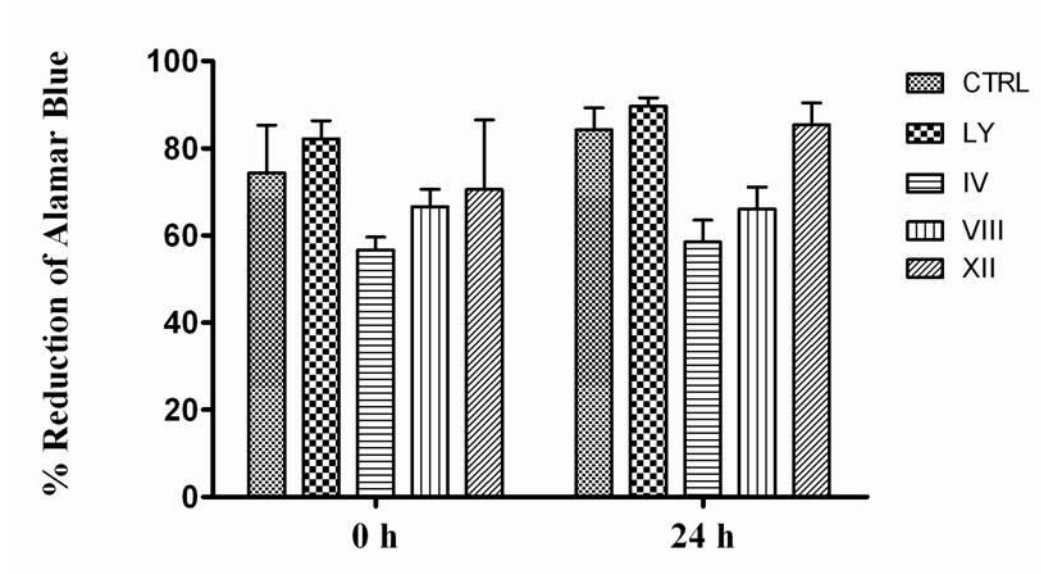


Figura 21. Citotossicità e proliferazione degli inibitori di PI3K e di Akt sulle hMSC

Le percentuali di riduzione di AlamarBlu[®] dopo i trattamenti con gli inibitori di PI3K o gli inibitori specifici delle isoforme di Akt a tempo zero (0h) e a 24h dal trattamento sono simili.

In seguito, è stato anche confermato che gli inibitori non alterano la crescita cellulare per la durata dei saggi. Il ciclo cellulare misurato in citofluorimetria ha confermato la vitalità cellulare e ha mostrato che la distribuzione del ciclo cellulare tra i campioni è sovrapponibile (Tabella I). Inoltre, l'apoptosi è contenuta, escludendo che i farmaci utilizzati siano citotossici ai tempi e nelle dosi indicate.

Si può pertanto concludere che gli effetti osservati sulla motilità delle MSC non sono influenzati né dalla proliferazione né dalla citotossicità.

	PHASE (%)							
	G0/G1		S		G2/M		h-apoptosis	
	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
CTRL	90	93	0,7	0,1	1,3	3,6	6,5	1,4
VIII	94	90	0,8	0,9	2,3	1,4	2,1	6,6
XII	94	87	0,7	0,7	2,5	2,1	1,6	7,3

Tabella 01. Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

I campioni di hMSC trattati e non con gli inibitori della via di PI3K/Akt mostrano paragonabile distribuzione del ciclo cellulare e bassa percentuale di apoptosi.

L'inibizione della isoforma Akt2 compromette la migrazione delle hMSC

Gli effetti degli inibitori di PI3K/Akt sull'attività chemiotattica tridimensionale delle hMSC sono stati valutati usando un saggio di migrazione 3D in *Transwell*. In linea con osservazioni precedenti, le cellule MSC hanno buona capacità migratoria in condizioni basali. Come chemioattrattore per la migrazione direzionale delle hMSC è stato utilizzato 10% FBS. La colorazione delle cellule ha permesso di contare quelle che hanno completamente superato la membrana (Fig. 22).

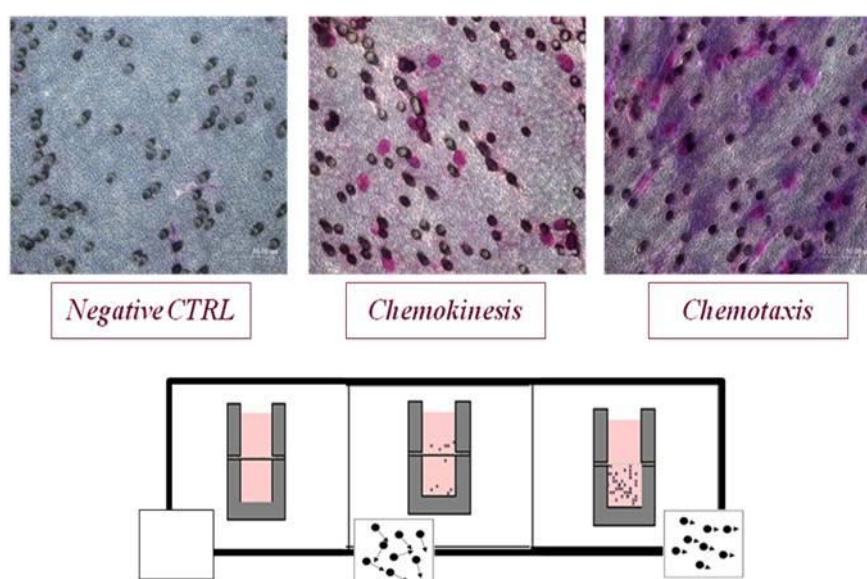


Figura 22. Colorazione delle cellule migrate sulla membrana di policarbonato con pori da 8 μ m
Colorazione con Hema 3® Stain Set delle hMSC dopo la migrazione in *Transwell assay* in 3 diverse condizioni mostra ben visibili i nuclei ed i contorni del corpo cellulare.

Questo saggio ha permesso di osservare che i trattamenti con gli inibitori di PI3K/Akt hanno un effetto molto marcato di inibizione della migrazione in 3D. In particolare, il trattamento con Akti XII blocca la migrazione, indicando anche in questo caso un effetto promigratorio della isoforma Akt2 nelle hMSC (Fig. 23). Viceversa, il blocco combinato di Akt1 e Akt2 ad opera di Akti VIII porta a un effetto molto più debole rispetto all'inattivazione di Akt2 da solo, analogamente a quanto osservato con il *wound healing assay*.

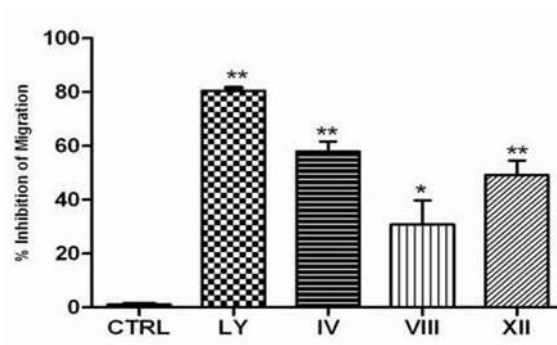


Figura 23. Effetto dell'inibizione della via PI3K/Akt sulla migrazione in 3D

La migrazione in matrice tridimensionale è stata rallentata in tutti i campioni trattati con gli inibitori di PI3K e di Akt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Sulla base di questi risultati, abbiamo successivamente studiato la motilità delle MSC in presenza di Akti XII in saggi bidimensionali, attraverso acquisizioni di immagini in microscopia *time-lapse*. Nella figura 24A viene riportata la velocità media ($\mu\text{m}/\text{min}$) delle traiettorie relative alle cellule presenti nelle 18 sequenze analizzate. La velocità media stimata in cellule controllo è superiore a quella delle cellule trattate. In particolare, la velocità media misurata utilizzando tutte le sequenze è risultata $9.22 \pm 0.98 \mu\text{m}/\text{min}$ nelle cellule controllo e $6.99 \pm 1.04 \mu\text{m}/\text{min}$ nelle cellule trattate. In conclusione, le cellule trattate con Akti XII mostrano una riduzione del 24% della velocità media.

Inoltre, per ogni traiettoria è stato calcolato lo spostamento quadratico medio (*Mean Squared Displacement*, MSD) in funzione del tempo Δt ⁸⁴. Nella figura 24B è riportato il valore logaritmico dei MSD ottenuti. Sia la curva relativa al controllo, sia quella relativa alle cellule trattate, presentano per piccoli intervalli di tempo un movimento di tipo super-diffusivo (per confronto si osservi anche la curva con pendenza logaritmica di valore 2, che rappresenta un moto quasi balistico, e la curva con pendenza di valore 1, che corrisponde ad una traiettoria aleatoria di moto *browniano*) e per lunghi intervalli di tempo, un movimento di tipo sub-diffusivo. Inoltre, per ogni intervallo di tempo considerato, le hMSC non trattate hanno percorso una distanza maggiore rispetto alle hMSC trattate con Akti XII.

Nella figura 24C e D sono rispettivamente rappresentate con grafici tridimensionali traiettorie ricavate dalle sequenze di CTRL 3c e Akti XII 3c. Queste traiettorie raffigurano in modo esplicito il ruolo dell'inibitore XII sulla motilità cellulare: le cellule caratterizzate da un maggior spostamento medio rispetto al punto iniziale sono le cellule controllo. Nella figura 24E sono riportate tre immagini successive estratte dalla stessa sequenza (acquisite in *time*

lapse con $\Delta t = 5\text{min}$, quindi rappresentative di un lasso di tempo di 15min). Tutte le cellule presenti nel campo sono state tracciate e univocamente identificate (per ogni cellula è riportato un numero all'interno di un'etichetta gialla). Il movimento della maggior parte delle cellule presenti risulta di entità minima. Infatti le etichette delle cellule appaiono quasi nella stessa posizione per tutto il periodo di osservazione, ad eccezione delle cellule etichettate con i numeri 46 e 47 che sono caratterizzate da una maggior mobilità.

In generale, considerando l'intera sequenza, le cellule non trattate tendono a muoversi più velocemente rispetto a quelle trattate con Akti XII. Nel complesso, l'analisi del movimento e della direzionalità hanno dimostrato rispettivamente una diminuzione del tasso di velocità ed uno stato compromesso della coltura cellulare trattata.

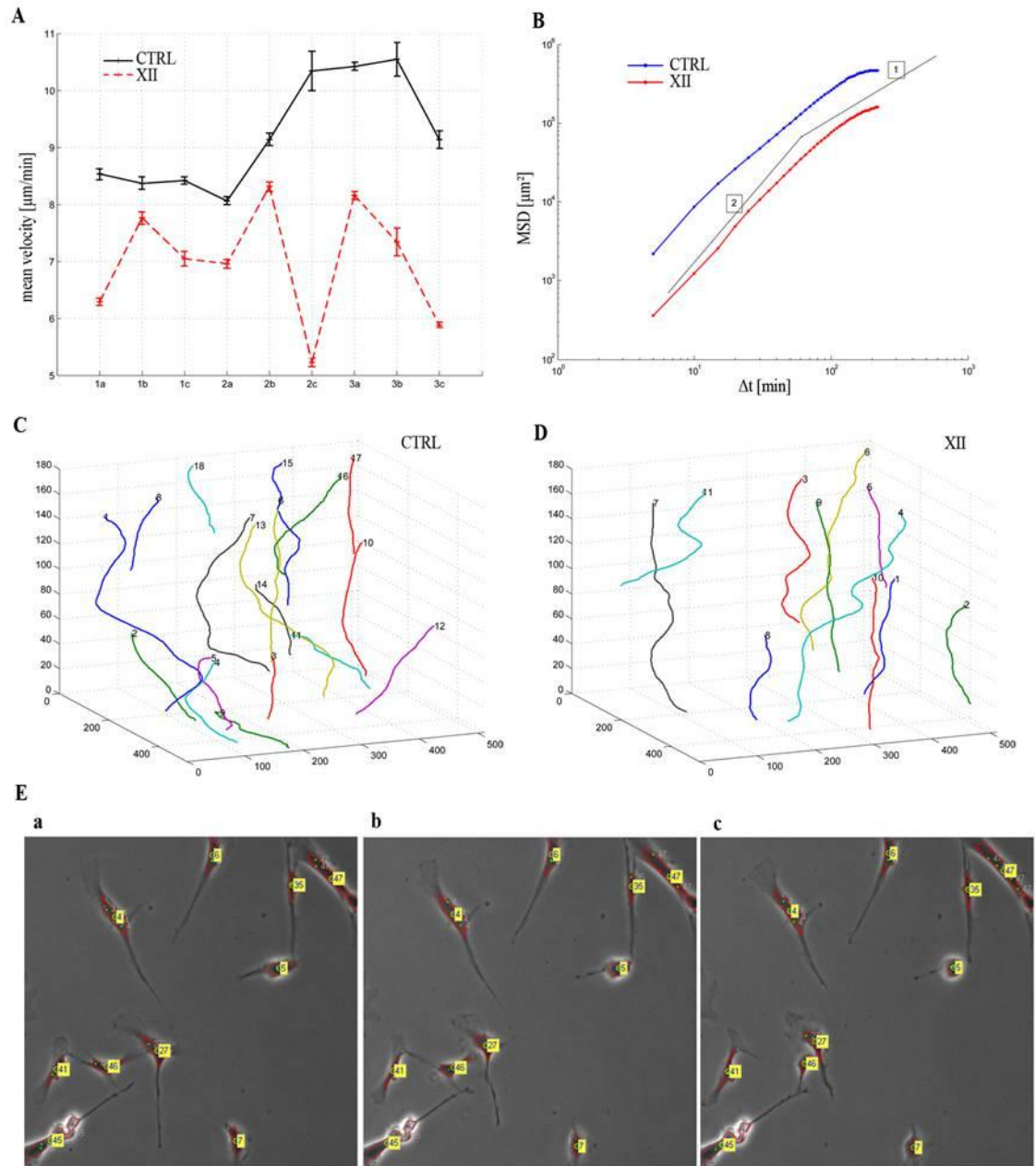


Figura 24. Monitoraggio della motilità delle hMSC tramite time-lapse imaging

(A) Velocità media (asse Y) delle cellule tracciate in 18 sequenze (asse X) differenti delle MSC di controllo (CTRL) e trattate (XII). (B) MSD. Le linee sottili rappresentano il versante logaritmico di 1 o 2. (C e D) Traiettorie singole delle cellule tracciate nella sequenza (C) CTRL 3c e (D) XII 3c nel grafico 3D, dove il piano XY rappresenta le coordinate per l'intera sequenza delle immagini (Z). (E) Tre immagini seguenti ($\Delta t=5\text{min}$) estratte dalla sequenza CTRL 3c mostrano il monitoraggio delle cellule etichettate.

DISCUSSIONE

Le cellule staminali/stromali mesenchimali (MSC) sono cellule non emopoietiche, morfologicamente simili ai fibroblasti, che rappresentano lo ~0,001-0,01% delle cellule nucleate nel midollo osseo. Il potenziale enorme delle MSC, l'accessibilità e la relativa facilità di manipolazione, oltre alla capacità di auto-rinnovamento ⁸⁵ e il loro potenziale rigenerativo, hanno reso le MSC una fonte importante per l'applicazione clinica.

Negli ultimi anni, le MSC sono state oggetto di molti studi, con l'obiettivo di capire meglio la loro biologia. In particolare, grazie alle loro caratteristiche tumoritrofiche, è emerso che le MSC sono potenziali agenti trasportatori di farmaci per la terapia cellulare dei tumori primari e delle metastasi. Tuttavia, l'applicazione sistemica necessita di un efficace *homing* cellulare, ed è quindi della massima importanza comprendere i meccanismi molecolari che guidano la migrazione di queste cellule verso siti specifici ⁸⁶. È stato recentemente riportato che le MSC, rilasciate dal midollo osseo, entrano nella circolazione periferica, dove contribuiscono alla riparazione tissutale. Inoltre, chemochine infiammatorie, citochine e fattori di crescita rilasciati in seguito ad un danno, forniscono gli stimoli migratori che guidano la loro mobilitazione verso i siti del danno tissutale. Tuttavia, i meccanismi molecolari che regolano il meccanismo migratorio non sono stati completamente chiariti.

La via di segnale PI3K/Akt è un regolatore consolidato di importanti funzioni cellulari, come la sopravvivenza, la crescita e la progressione del ciclo cellulare. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che Akt riveste un ruolo fondamentale nella modulazione dei processi di migrazione e d'invasione cellulare. In particolare, sono state recentemente evidenziate funzioni isoforma-specifiche dei membri della famiglia Akt 1 e 2 nella regolazione della motilità cellulare, sia attraverso la fosforilazione diretta dei bersagli cellulari coinvolti nella organizzazione del citoscheletro cellulare e nell'interazione con la matrice extracellulare, sia attraverso la modulazione dell'espressione di geni della motilità e della polarità cellulare.

È molto importante sottolineare che l'isoforma 1 e l'isoforma 2 di Akt sembrano esercitare effetti opposti sulla migrazione di cellule del cancro della mammella e delle rispettive metastasi. Infatti, in seguito a *down-regolazione* con specifici shRNA, è stato osservato che Akt2 promuove la migrazione e l'invasione delle cellule epiteliali mammarie, probabilmente mediata dall'*up-regolazione* di integrina $\beta 1$ e dalla maggiore stabilità della proteina associata al citoscheletro actinico Palladin. Viceversa, Akt1 influisce negativamente sulla migrazione cellulare, attraverso la regolazione trascrizionale di geni della motilità, dell'organizzazione

dell'actina, della formazione di fibre da stress e dell'interazione cellula-matrice extracellulare. Non è però chiaro se questa modulazione della motilità cellulare da parte delle isoforme di Akt sia universalmente valida. Infatti, è stato riportato che nel carcinoma della prostata Akt1 e Akt2 sembrano avere entrambi un ruolo inibitorio sulla migrazione e sull'invasione cellulare. Obiettivo di questa ricerca è perciò stato quello di determinare il contributo delle diverse forme di Akt nella migrazione delle hMSC.

Sono stati perciò inizialmente definiti la migrazione e il potenziale di *wound closure in vitro* delle hMSC.

MSC ottenute da tre individui differenti e coltivate *in vitro* hanno mostrato livelli basali di fosforilazione di Akt molto elevati, valutati attraverso l'uso di specifici anticorpi anti-fosfo-Akt S473. Gli inibitori delle isoforme Akt 1 e 2, la cui specificità rispetto le isoforme è stata confermata mediante *western blotting*, sono stati poi utilizzati con l'obiettivo di definire il contributo di ciascuna isoforma alla migrazione.

In seguito ad inibizione selettiva di Akt2, la migrazione è notevolmente rallentata. Tuttavia, l'inibizione contemporanea delle due isoforme, pur provocando un rallentamento della migrazione, è molto meno efficace. Questo risultato, apparentemente contraddittorio, può essere spiegato tenendo presente che, come citato in precedenza, in cellule di carcinoma della mammella Akt1 contrasta la migrazione cellulare. Si può quindi ipotizzare che, nelle hMSC, il blocco di entrambe le isoforme indebolisca l'efficacia dell'inibizione di Akt2 e l'attività antimigratoria.

Questo è un risultato importante, in quanto si tratta del primo studio che fornisce la prova di un ruolo positivo di Akt2 nella regolazione della migrazione delle hMSC *in vitro*.

Recentemente, è stato dimostrato che Ankrd2 è un substrato specifico di Akt2, una proteina che ha un importante ruolo nel rimodellamento del citoscheletro. E perciò possibile che Akt2 promuova la migrazione delle hMSC attraverso la fosforilazione diretta di Ankrd2. Tuttavia, l'eventuale contributo della fosforilazione di Ankrd2 alle alterazioni fenotipiche associate all'attivazione di Akt2 necessita di ulteriori e approfondite indagini.

BIBLIOGRAFIA

1. Weissman, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science (New York, N.Y.)* **287**, 1442–6 (2000).
2. Muschler, G. F., Boehm, C. & Easley, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **79**, 1699–709 (1997).
3. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V, Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230–47 (1968).
4. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* **3**, 393–403 (1970).
5. Friedenstein, A. J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology* **2**, 83–92 (1974).
6. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)* **284**, 143–7 (1999).
7. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–7 (2006).
8. Kinzebach, S. & Bieback, K. Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Xenogenic-Free Culture Conditions. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (2012).doi:10.1007/10_2012_134
9. Bernardo, M. E., Pagliara, D. & Locatelli, F. Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine? *Bone marrow transplantation* **47**, 164–71 (2012).
10. Schmitt, A., Van Griensven, M., Imhoff, A. B. & Buchmann, S. Application of stem cells in orthopedics. *Stem cells international* **2012**, 394962 (2012).
11. Vono, R., Spinetti, G., Gubernator, M. & Madeddu, P. What's new in regenerative medicine: split up of the mesenchymal stem cell family promises new hope for

- cardiovascular repair. *Journal of cardiovascular translational research* **5**, 689–99 (2012).
12. Liu, S.-P. *et al.* Stem Cell Applications in Regenerative Medicine for Neurological Disorders. *Cell transplantation* (2012).doi:10.3727/096368912X655145
 13. Nakanishi, C. *et al.* Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society* **75**, 2260–8 (2011).
 14. Lalu, M. M. *et al.* Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *PLoS ONE* **7**, e47559 (2012).
 15. Bernardo, M. E. *et al.* Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone marrow transplantation* **46**, 200–7 (2011).
 16. English, K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and cell biology* (2012).doi:10.1038/icb.2012.56
 17. Bravo-Cordero, J. J., Hodgson, L. & Condeelis, J. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Current opinion in cell biology* **24**, 277–83 (2012).
 18. Ridley, A. J. & Hall, A. Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **57**, 661–71 (1992).
 19. Tolia, K. F. *et al.* Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Current biology: CB* **10**, 153–6 (2000).
 20. Yang, J. J., Kang, J. S. & Krauss, R. S. Ras signals to the cell cycle machinery via multiple pathways to induce anchorage-independent growth. *Molecular and cellular biology* **18**, 2586–95 (1998).
 21. Bhakta, S., Hong, P. & Koc, O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovascular revascularization medicine: including molecular interventions* **7**, 19–24
 22. Mishima, Y. & Lotz, M. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **26**, 1407–12 (2008).

23. Devine, S. M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A. & Hoffman, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* **101**, 2999–3001 (2003).
24. Franke, T. F., Kaplan, D. R. & Cantley, L. C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**, 435–7 (1997).
25. Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P. & Tsichlis, P. N. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science (New York, N.Y.)* **254**, 274–7 (1991).
26. Yang, Z.-Z. *et al.* Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *The Journal of biological chemistry* **278**, 32124–31 (2003).
27. Hill, M. M. & Hemmings, B. A. Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics* **93**, 243–51 (2002)
28. Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A. & Cohen, P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS letters* **399**, 333–8 (1996).
29. Frödin, M. *et al.* A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *The EMBO journal* **21**, 5396–407 (2002).
30. Hanada, M., Feng, J. & Hemmings, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochimica et biophysica acta* **1697**, 3–16 (2004).
31. Del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R. & Nuñez, G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science (New York, N.Y.)* **278**, 687–9 (1997).
32. Tran, H., Brunet, A., Griffith, E. C. & Greenberg, M. E. The many forks in FOXO's road. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* **2003**, RE5 (2003).
33. Mayo, L. D. & Donner, D. B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11598–603 (2001).
34. Zhou, B. P. *et al.* Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature cell biology* **3**, 245–52 (2001).

35. Basu, S., Totty, N. F., Irwin, M. S., Sudol, M. & Downward, J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular cell* **11**, 11–23 (2003).
36. Vivanco, I. & Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer* **2**, 489–501 (2002).
37. Vanhaesebroeck, B. & Waterfield, M. D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Experimental cell research* **253**, 239–54 (1999).
38. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)* **307**, 1098–101 (2005).
39. Brazil, D. P., Yang, Z.-Z. & Hemmings, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in biochemical sciences* **29**, 233–42 (2004).
40. Fayard, E., Tintignac, L. A., Baudry, A. & Hemmings, B. A. Protein kinase B/Akt at a glance. *Journal of cell science* **118**, 5675–8 (2005).
41. Stambolic, V. *et al.* Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29–39 (1998).
42. Choi, Y. *et al.* PTEN, but not SHIP and SHIP2, suppresses the PI3K/Akt pathway and induces growth inhibition and apoptosis of myeloma cells. *Oncogene* **21**, 5289–300 (2002).
43. Andjelković, M. *et al.* Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* **272**, 31515–24 (1997).
44. Gao, T., Furnari, F. & Newton, A. C. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Molecular cell* **18**, 13–24 (2005).
45. Liang, J. *et al.* PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature medicine* **8**, 1153–60 (2002).
46. Shin, I. *et al.* PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nature medicine* **8**, 1145–52 (2002).
47. Viglietto, G. *et al.* Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature medicine* **8**, 1136–44 (2002).
48. Sekimoto, T., Fukumoto, M. & Yoneda, Y. 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *The EMBO journal* **23**, 1934–42 (2004).

49. Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L. & Burgering, B. M. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**, 782–7 (2000).
50. Skeen, J. E. *et al.* Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer cell* **10**, 269–80 (2006).
51. Calera, M. R. *et al.* Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *The Journal of biological chemistry* **273**, 7201–4 (1998).
52. Eguez, L. *et al.* Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell metabolism* **2**, 263–72 (2005).
53. Sano, H. *et al.* Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 14599–602 (2003).
54. Bai, L. *et al.* Dissecting multiple steps of GLUT4 trafficking and identifying the sites of insulin action. *Cell metabolism* **5**, 47–57 (2007).
55. Berwick, D. C. *et al.* Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles. *Journal of cell science* **117**, 5985–93 (2004).
56. Taha, C. *et al.* Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 33085–91 (1999).
57. Zelzer, E. *et al.* Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *The EMBO journal* **17**, 5085–94 (1998).
58. Majumder, P. K. & Sellers, W. R. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* **24**, 7465–74 (2005).
59. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **3**, 721–32 (2003).
60. Edinger, A. L. & Thompson, C. B. Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Molecular biology of the cell* **13**, 2276–88 (2002).
61. Robey, R. B. & Hay, N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* **25**, 4683–96 (2006).
62. Elstrom, R. L. *et al.* Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer research* **64**, 3892–9 (2004).

63. Lum, J. J. *et al.* The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes & development* **21**, 1037–49 (2007).
64. Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. & Wang, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry* **269**, 23757–63 (1994).
65. Martelli, A. M., Evangelisti, C., Chiarini, F. & McCubrey, J. A. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget* **1**, 89–103 (2010).
66. Martelli, A. M. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **20**, 911–28 (2006).
67. Kumar, C. C. & Madison, V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **24**, 7493–501 (2005).
68. Wu, W.-I. *et al.* Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition. *PloS one* **5**, e12913 (2010).
69. Chin, Y. R. & Toker, A. Akt isoform-specific signaling in breast cancer: Uncovering an anti-migratory role for palladin. *Cell Adhesion & Migration* **5**, 211–214 (2011).
70. Worster, D. T. *et al.* Akt and ERK control the proliferative response of mammary epithelial cells to the growth factors IGF-1 and EGF through the cell cycle inhibitor p57Kip2. *Science signaling* **5**, ra19 (2012).
71. Kakinuma, N., Roy, B. C., Zhu, Y., Wang, Y. & Kiyama, R. Kank regulates RhoA-dependent formation of actin stress fibers and cell migration via 14-3-3 in PI3K-Akt signaling. *The Journal of cell biology* **181**, 537–49 (2008).
72. Enomoto, A. *et al.* Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Developmental cell* **9**, 389–402 (2005).
73. Yoeli-Lerner, M. *et al.* Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Molecular cell* **20**, 539–50 (2005).
74. Cenni, V. *et al.* Ankrd2/ARPP is a novel Akt2 specific substrate and regulates myogenic differentiation upon cellular exposure to H₂O₂. *Molecular biology of the cell* **22**, 2946–56 (2011).

75. Arboleda, M. J. *et al.* Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer research* **63**, 196–206 (2003).
76. Manning, B. & Cantley, L. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. **88**, 435–7 (1997).
77. Irie, H. Y. *et al.* Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* **171**, 1023–34 (2005).
78. Muschler, G. F., Nitto, H., Boehm, C. A. & Easley, K. A. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **19**, 117–25 (2001).
79. Stanford, C. M., Jacobson, P. A., Eanes, E. D., Lembke, L. A. & Midura, R. J. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *The Journal of biological chemistry* **270**, 9420–8 (1995).
80. Yoneno, K. *et al.* Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in three-dimensional collagen gel cultures. *Journal of biomedical materials research. Part A* **75**, 733–41 (2005).
81. Gebäck, T., Schulz, M. M. P., Koumoutsakos, P. & Detmar, M. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *BioTechniques* **46**, 265–74 (2009).
82. Tian Q., H. M. N. Algorithms for Subpixel registration. *Computer vision, graphics, and image processing* (1986).
83. Chin, Y. R. & Toker, A. The Actin bundling protein Palladin is an Akt1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration. *Mol. Cell*. **38**, 333–344 (2011).
84. Nocentini, S. *et al.* Myelin-associated proteins block the migration of olfactory ensheathing cells: an in vitro study using single-cell tracking and traction force microscopy. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **69**, 1689–703 (2012).
85. Charbord, P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human gene therapy* **21**, 1045–56 (2010).
86. Kang, S. K., Shin, I. S., Ko, M. S., Jo, J. Y. & Ra, J. C. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem cells international* **2012**, 342968 (2012).