



Fondazione
Ri.MED

SCIENTIFIC REPORT 2016

SCOPERTA DI NUOVI FARMACI

INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI BIOMEDICALI

MEDICINA RIGENERATIVA E FARMACI BIOLOGICI

ITA

SCIENTIFIC REPORT 2016



SCOPERTA DI NUOVI FARMACI

INGEGNERIA DEI TESSUTI E DISPOSITIVI BIOMEDICALI

MEDICINA RIGENERATIVA E FARMACI BIOLOGICI

ITA





La Fondazione Ri.MED, istituita nel 2006 con Decreto della Presidenza del Consiglio dei Ministri, è frutto di una partnership internazionale pubblico-privata ed ha come proprie mission lo sviluppo di approcci di ricerca traslazionale biotecnologica e biomedica, la divulgazione del sapere scientifico e la formazione di personale altamente qualificato nel settore *Life Science*.

La ricerca traslazionale è incentrata sull'integrazione complementare di risorse e competenze di diverse matrici quali la ricerca di base, la ricerca e lo sviluppo preclinico di nuove terapie, ma anche di medical device e biomarcatori, ed infine la sperimentazione clinica. Ed è proprio grazie alla natura dei soci fondatori, tra cui il Consiglio Nazionale delle Ricerche, l'Università di Pittsburgh e UPMC, University of Pittsburgh Medical Centre, che la Fondazione è stata in grado negli anni di sviluppare programmi di ricerca traslazionale.

Grazie alla partnership strategica con l'IRCCS ISMETT, Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad alta Specializzazione, è stato possibile lo sviluppo di progettualità multidisciplinari nel campo della medicina rigenerativa e delle terapie cellulari e la creazione di una cell factory GMP per supportare la sperimentazione clinica. Realizzando la coesistenza di locali e personale, la Fondazione intende inoltre facilitare lo scambio di conoscenza tra medici e ricercatori, e dunque il percorso *"from bench to bedside"*.

La ricerca di Ri.MED si snoda su tre approcci principali: l'ingegnerizzazione di tessuti e la bioingegneria, la ricerca e sviluppo del farmaco e dei vaccini e la medicina rigenerativa, tutti approcci focalizzati su aree terapeutiche, quali l'oncologia, le neuroscienze, le malattie cardiovascolari e metaboliche.

Negli anni la Fondazione ha sviluppato una vera e propria *cultura delle alleanze* a livello regionale, nazionale ed internazionale, con enti di ricerca sia pubblici che privati. Ed è grazie anche a questa capacità di coniugare competenze interdisciplinari e massa critica, e con la guida di un forte management, che è stato possibile avviare progettualità di alto livello, costituire un portfolio progetti diversificato e bilanciato, generare proprietà intellettuale e raggiungere un consistente numero di pubblicazioni scientifiche su peer review journal con rilevante *impact factor*.

Di seguito viene descritta l'attività di ricerca condotta nel corso del 2016, con uno sguardo alla progettualità per il 2017.

Tutto questo è stato possibile grazie alla selezione dei più brillanti ricercatori e di tutte le risorse umane di Ri.MED, il vero valore aggiunto della Fondazione. La passione di tutto il nostro team si rinnova giorno dopo giorno, nella consapevolezza che il lavoro svolto può concretamente contribuire al miglioramento della vita dei pazienti e alla creazione di un positivo impatto socio economico sulla Sicilia e il Sud Italia.

Alessandro Padova
Direttore Generale

INDICE

SCOPERTA DI NUOVI FARMACI	7
Il complesso MUC1/CIN85 come nuovo target terapeutico per inibire la crescita tumorale ed il processo di metastasi <i>Sandra Cascio, PhD</i>	9
La forma tumorale ed ipoglicosilata MUC1 serve da link fra cancro ed infiammazione <i>Sandra Cascio, PhD</i>	11
Progettazione e messa a punto di un modello di zebrafish per lo studio dell'atassia cerebellare ereditaria: caratterizzazione del gene CAMTA1 <i>Chiara Cianciolo Cosentino, PhD</i>	12
Studio <i>in vivo</i> delle distrofie della macula utilizzando lo zebrafish come modello animale <i>Chiara Cianciolo Cosentino, PhD</i>	13
Nucleoporine, sindrome nefrosica e zebrafish <i>Chiara Cianciolo Cosentino, PhD</i>	14
Ruolo del recettore GABA _A e della sua modulazione nelle epilessie pediatriche <i>Pierangelo Cifelli MD, PhD</i>	15
Derivati endogeni elettrofilici di acidi grassi omega-3 per il trattamento di patologie croniche infiammatorie delle vie aeree scarsamente responsive agli steroidi <i>Chiara Cipollina, PhD</i>	19
Predire gli effetti della variazione dell'espressione dei microRNA attraverso l'utilizzo di un modello di interazione del network microRNA:geni <i>Claudia Coronello, PhD</i>	22
α Sinucleina interagisce con TOM20 e inibisce l'importo della proteina mitocondriale nella malattia di Parkinson <i>Roberto Di Maio, PhD</i>	23
Ruolo di LRRK2 nella malattia di Parkinson idiopatica <i>Roberto Di Maio, PhD</i>	25
Ruolo della NADPH ossidasi 2 nella malattia di Parkinson <i>Roberto Di Maio, PhD</i>	26
Generazione in ambiente gastrico e azione di nitro-nitrati: nuovi intermediari lipidici che formano specie nitrosanti ed elettrofiliche <i>Marco Fazzari, PhD</i>	28
Formazione gastrica, assorbimento intestinale e distribuzione sistemica dipendente da lipoproteine di nitro-coniugati dell'acido linoleico (NO ₂ - CLA). <i>Marco Fazzari, PhD</i>	29
Studi neuroprotettivi: neuroprotezione del nitrito nella malattia di Parkinson <i>Chiara Milanese, PhD</i>	30
Studi meccanicistici: riprogettazione metabolica sull'accumulo di danni al DNA e invecchiamento <i>Chiara Milanese, PhD</i>	31

INGEGNERIA DEI TESSUTI E SVILUPPO DI DISPOSITIVI BIOMEDICALI 35

Ingegneria di tessuto e dispositivi medicali per la rigenerazione e riparazione cardiovascolare 37
[Antonio D'Amore, PhD](#)

Bioreattori ad alto *throughput* per i tessuti compositi 42
[Riccardo Gottardi, PhD](#)

Effetti della microgravità sui tessuti osteocondrali 44
[Riccardo Gottardi, PhD](#)

Condroprotezione dagli ormoni del ciclo mestruale: studio su microtessuti osteocondrali 45
[Riccardo Gottardi, PhD](#)

Emodinamica e biomarkers per la stratificazione clinica dei pazienti con valvola aortica bicuspidale ad alto rischio per la formazione di un aneurisma toracico della aorta ascendente 48
[Salvatore Pasta, PhD](#)

MEDICINA RIGENERATIVA E FARMACI BIOLOGICI 53

Immunoterapia adottiva con cellule NK per la prevenzione della reinfezione HCV post-trapianto e della recidiva HCC 55
[Ester Badami, PhD](#)

Attività secretoria di cellule umane fetali (multipotent fetal dermal cells: MFDCs) e adulte dermiche (adult dermal cells: ADCs): risposte biologiche *in vitro* correlate al processo di wound healing 57
[Cinzia Chinnici, PhD](#)

Cellule multipotenti isolate da fegato fetale umano e loro impiego nel trattamento dell'insufficienza epatica acuta 59
[Cinzia Chinnici, PhD](#)

Hsp10/EPF come potenziale immuno-modulatore nel diabete di tipo 1 virus-mediato 60
[Simona Corrao, PhD](#)

Studio della funzione delle globine nella rigenerazione cardiaca e durante lo sviluppo embrionale di *zebrafish* 62
[Paola Corti, PhD](#)

Sviluppo di nuovi vaccini contro le malattie infettive 64
[Bruno Douradinha, PhD](#)

Ingegnerizzazione di un rene in un sito ectopico 67
[Maria Giovanna Francipane, PhD](#)

Esosomi per la diagnosi e il monitoraggio del rigetto a seguito del trapianto di isole pancreatiche e per il trattamento terapeutico del Diabete Mellito di tipo 1 72
[Marta Garcia-Contreras, PhD](#)

Organoidi epatici: nuove strategie per lo sviluppo di terapie cellulari autologhe e per stabilire modelli *in vitro* di malattie epatiche 77
[Antonio Lo Nigro, PhD](#)

Isolamento di cellule mesenchimali ed epiteliali da placenta umana a termine 79
[Mariangela Pampalone, PhD](#)



SCOPERTA DI NUOVI FARMACI

I ricercatori della Fondazione Ri.MED sono impegnati ad elucidare i meccanismi sottostanti a patologie senza rimedio. Attraverso approcci di genomica, proteomica, metabolica e secretomica, si è arrivati alla validazione funzionale di nuovi target terapeutici per patologie neurodegenerative come per esempio la malattia di Parkinson o per malattie tumorali.

I progetti sono ora nella fase cosiddetta di *drug discovery*. Grazie a una piattaforma integrata di biologia strutturale, bioinformatica e drug design, si è iniziato a sviluppare una chemoteca, una collezione di centinaia di migliaia di molecole di origine sintetica e naturale, molecole utili come toolkit per lo sviluppo di nuovi farmaci e adiuvanti in terapie cellulari. Il processo prevede l'ottimizzazione delle molecole biologicamente attive tramite chimica medicinale e infine la sperimentazione preclinica, lo studio dell'efficacia tramite una piattaforma di imaging molecolare e la caratterizzazione del profilo farmacocinetico e tossicologico adatto per la sperimentazione su pazienti. In parallelo sono in via di sviluppo metodi predittivi per monitorare l'efficacia dei potenziali farmaci e stratificare pazienti rispondenti alla terapia.

Il complesso MUC1/CIN85 come nuovo target terapeutico per inibire la crescita tumorale ed il processo di metastasi

Project Leader Sandra Cascio, PhD

Breve descrizione

Le metastasi sono cellule maligne che si staccano dal tumore originario e si diffondono in altri organi dove si riproducono e generano nuovi tumori. Per potere abbandonare il tessuto primario di sviluppo del tumore, le cellule tumorali perdono la loro polarità epiteliale ed acquisiscono attività migratoria ed invasiva. L'oncoproteina ed antigene tumorale Mucina 1 (MUC1) è una glicoproteina transmembrana over-espressa nelle cellule epiteliali tumorali. Inoltre, nelle cellule normali MUC1 è iperglicosilata nella regione extracellulare mentre è ipoglicosilata nelle cellule tumorali. E' ormai ben nota la correlazione fra l'over-espressione di MUC1 con un fenotipo tumorale aggressivo.

Risultati raggiunti nel 2016

Abbiamo scoperto che CIN85 (Cbl-interacting protein 85 KDa) è una nuova proteina che lega direttamente o indirettamente MUC1 nelle cellule tumorali. La co-localizzazione di MUC1 e CIN85 avviene su specifiche strutture chiamate invadopodia. Le invadopodia sono delle protusioni cellulari che facilitano i processi di invasione e migrazione cellulare.

Il complesso MUC1/CIN85 è stato localizzato sia negli stadi clinici iniziali che in quelli più avanzati del tumore alla mammella, colon, pancreas e alle ovaie. Quindi, la nostra ipotesi è che inibendo la formazione di nuovi legami CIN85-MUC1, così come distruggendo complessi proteici già esistenti, si possano ridurre i processi di migrazione, invasione e metastasi. Per poter convalidare questa ipotesi, in collaborazione con il Dipartimento di Biologia Computazionale, abbiamo identificato, testato e selezionato *in vitro* due composti chimici che, alla concentrazione di 10 uM, hanno significativamente ridotto l'associazione di MUC1 con CIN85 così come hanno drasticamente ridotto l'attività migratoria delle cellule epiteliali tumorali sia murine che umane.

Obiettivo 1. Comprensione del significato biologico del complesso MUC1 e CIN85 nelle cellule normali e tumorali della mammella e delle ovaie. Il legame di interazione fra MUC1 and CIN85 risulta essere dipendente dello stato di glicosilazione di MUC1. L'ipoglicosilazione della forma tumorale di MUC1 facilita l'interazione con CIN85.

Obiettivi 2017

In questo primo obiettivo del progetto ci proponiamo di studiare in che modo il complesso proteico MUC1/CIN85 influenza i meccanismi di segnale intracellulare. In particolare, poiché CIN85 è una molecola coinvolta nel traffico intracellulare delle proteine, studieremo se funziona come proteina di trasporto di MUC1. Inoltre, per potere scoprire quali altre proteine sono coinvolte nel *signaling* MUC1-CIN85, stiamo utilizzando la metodologia CRISPR, per rimuovere i geni MUC1 e CIN85 dalle cellule tumorali per poi analizzare il profilo di espressione genica (*gene array assay*) di molecole coinvolte nei processi di invasione and metastasi.

Obiettivo 2. Testare *in vivo* l'efficacia dei due composti che hanno dato ottimi risultati *in vitro* nella riduzione del complesso MUC1/CIN85. Per la conduzione degli esperimenti *in vivo*, saranno utilizzate ed iniettate nel topo cellule epiteliali murine tumorali che esprimono il gene umano MUC1. Più precisamente, verranno usati tre tipi di cellule tumorali murine che hanno differenti proprietà di metastatizzazione: a) cellule tumorali primarie non metastatiche b) cellule tumorali con basso fenotipo invasivo c) cellule tumorali altamente metastatiche. Le cellule tumorali verranno iniettate intraperitonealmente nei topi che verranno poi sottoposti al trattamento con i composti inibitori a diverse concentrazioni e tempistiche. L'ottimizzazione della concentrazione dei farmaci sarà effettuata tramite studi di cinetica.

Obiettivo 3. Generare ulteriori composti inibitori da testare *in vitro* ed eventualmente *in vivo*. Poiché i composti che stiamo utilizzando funzionano alla concentrazione di 10 μ M, ci proponiamo di disegnare e selezionare altri composti inibitori più specifici ed efficienti e che quindi inibiscano il legame MUC1-CIN85 alla concentrazione minima di 1 μ M. A tal fine, verranno innanzitutto studiati i siti di legame fra le due proteine. In dettaglio, stiamo conducendo degli esperimenti di affinità di legame fra diversi peptidi di MUC1, biotinilati nel dominio N-terminale, con la proteina ricombinante CIN85 e/o lisati proteici cellulari. I legami peptide-proteina verranno rilevati attraverso l'utilizzo di biglie associate alla streptavidina. Una strategia alternativa sarà quella di modificare chimicamente le molecole che già hanno dato buoni risultati *in vitro*, sopra illustrati.

Per questo terzo obiettivo abbiamo una "*pending collaboration*" con il Dipartimento del Drug Discovery a Pittsburgh. Inoltre, la GSK ha mostrato interesse in una potenziale collaborazione.

La forma tumorale ed ipoglicosilata MUC1 serve da link fra cancro ed infiammazione

Project Leader Sandra Cascio, PhD

Breve descrizione Il link fra infiammazione e cancro è un argomento ormai abbastanza documentato. La glicoproteina MUC1 è espressa nella sua forma ipoglicosilata sia negli adenocarcinomi umani così come nei tessuti caratterizzati da uno stato di infiammazione cronica. L'alterata glicosilazione di MUC1 nelle cellule tumorali altera la sua normale attività ed interferisce con diversi *signaling pathway* intracellulari.

Risultati raggiunti nel 2016 Abbiamo pubblicato che il dominio extracellulare di MUC1 partecipa all'attivazione dei membri del *pathway* NF-κB, fra cui le proteine fosforilate IκBa e p65. I nostri risultati hanno rivelato che la forma tumorale MUC1, in associazione con p65, regola l'attività trascrizionale delle citochine pro-infiammatorie, fra cui IL-6 e TNF-α.

Abbiamo altresì studiato il meccanismo di azione con cui MUC1 e p65 regolano la trascrizione di IL-6 e TNF-α, porgendo particolare attenzione agli eventi di epigenetica. A tal fine, abbiamo utilizzato come modello animale il topo transgenico per il gene umano MUC1 (MUC1.Tg) nel quale è stato indotto "*colitis-associated cancer*" attraverso la somministrazione di un composto infiammatorio, il DSS, e un composto carcinogeno, l'AOM.

Dopo il duplice trattamento di AOM/DSS, il topo MUC1.Tg ha mostrato una più elevata infiammazione intestinale così come una più elevata incidenza tumorale al colon-retto rispetto al topo *wild-type* (WT). I nostri risultati hanno dimostrato che la forma tumorale MUC1 ha indotto l'espressione dei fattori della famiglia NF-κB e attivazione della trascrizione delle citochine infiammatorie nelle cellule intestinali di topo. Importante sottolineare che in questa modulazione trascrizionale dipendente da MUC1 e p65, l'enzima *Enhancer of Zeste protein-2* (EZH2) gioca un ruolo fondamentale come modulatore trascrizionale positivo. Inoltre EZH2 contribuisce all'incremento dell'espressione di IL-6 and TNF in maniera indipendente della sua nota attività metiltransferasica sulla lisina 27 dell'istone 3 (H3K27). Ulteriori analisi della cromatina hanno permesso di identificare molteplici modificazioni epigenetiche che contribuiscono a mantenere in uno stato aperto quindi "on" i promotori delle citochine IL-6 e TNF-α nel topo MUC1.Tg. In aggiunta, abbiamo studiato il "*tumor microenvironment*" che caratterizza il topo MUC1.Tg comparandolo al WT, analizzando le cellule infiammatorie presenti nel tessuto infiammato e tumorigenico. La presenza del gene umano MUC1 influenza la popolazione dei macrofagi e in particolare quella dei Macrofagi associati al tumore (TAMs) che giocano un ruolo fondamentale nel *network* infiammazione e cancro.

Conferenze e pubblicazioni

CONFERENZE INTERNAZIONALI del 2016

Poster Presentation

Society for Glycosylation, New Orleans, LA, USA, 19-21 novembre 2016

Invited Speaker

AAI Annual Meeting, Seattle, WA, USA, 12-17 maggio 2016,

PUBBLICAZIONI del 2016

Intra- and Extra-Cellular Events Related to Altered Glycosylation of MUC1 Promote Chronic Inflammation, Tumor Progression, Invasion, and Metastasis.

Cascio S, Finn OJ. *Biomolecules*. 2016 Oct 13;6(4). pii: E39. Review. (No impact factor al momento)

Obiettivi 2017

- Sottomissione del *grant* Ovarian Spore CEP per l'ottenimento dell'estensione del *grant* in corso (Data di Sottomissione maggio 2017). \$40.000/anno
- Stabilire una nuova collaborazione con la company GlaxoSmithKline. In caso venga stabilita la collaborazione, la GSK svilupperà e fornirà nuovi composti che verranno testati *in vitro* (Progetto 1). L' incontro con la GSK e Dr. Finn è fissato per il prossimo 2 marzo, 2017
- Gli studi di cinetica per effettuare la tossicità ed attività dei *drug compound* testati nel progetto n.1 saranno condotti in collaborazione con Dr. Jan Baumer (UPMC)
- In collaborazione con il gruppo di Gastroenterologia, abbiamo stipulato un nuovo protocollo (*IRB protocol*) che ci permette di lavorare direttamente sui campioni umani. Sono in corso gli esperimenti che serviranno da dati preliminari per un nuovo grant NIH che sarà sottomesso il prossimo giugno 2017.
- Sulla base dei risultati ottenuti dal progetto 1, un nuovo grant sarà sottomesso a giugno-settembre.

Progettazione e messa a punto di un modello di zebrafish per lo studio dell'atassia cerebellare ereditaria: caratterizzazione del gene CAMTA1

Project Leader

Chiara Cianciolo Cosentino, PhD

Breve descrizione

Studio dei meccanismi molecolari dell'atassia ereditaria causata da mutazioni del gene CAMTA1 e potenziale sviluppo di nuove strategie terapeutiche per il trattamento delle atassie ereditarie.

Impatto

I risultati di questa ricerca permetteranno di fare luce sui principali meccanismi molecolari alla base della degenerazione dei neuroni cerebellari, responsabile dei sintomi dell'atassia. L'obiettivo finale della ricerca è lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per la cura dell'atassia e di altre malattie neurodegenerative

Risultati raggiunti nel 2016

- Esperimenti di *knock-down* con l'utilizzo di morpholino antisenso per *camta1a*
- Creazione di pesci mutanti per il gene *camta1a* (*camta1a*^{-/-}) tramite la tecnica del CRISPR/Cas9
- Screening dei pesci *camta1a*^{-/-}, analisi morfologiche, funzionali e comportamentali.
- Isolamento dei neuroni del cervelletto (cellule del Purkinje), selezione tramite citometria a flusso (FACS) e analisi trascrittomiche (nei topi).

Obiettivi 2017

Identificazione e caratterizzazione dei geni regolati da *camta1*

- Dai risultati dell'analisi trascrittomiche, identificazione dei geni downstream di *camta1*.
- Identificazione delle alterazioni molecolari causate da mutazioni del gene *camta1*

Identificazione di possibili strategie terapeutiche

- Calcium imaging *in vivo* nei neuroni del cervelletto di zebrafish, per l'identificare eventuali alterazioni nell'omeostasi del calcio.
- Utilizzo in zebrafish di farmaci che bloccano i canali del calcio (Calcio-antagonisti) come valutazione preliminare di una nuova possibile strategia terapeutica.

Studio *in vivo* delle distrofie della macula utilizzando lo zebrafish come modello animale

Project Leader

Chiara Cianciolo Cosentino, PhD

Breve descrizione

Questo progetto è iniziato nel 2015, in collaborazione con la ROCHE pharmaceuticals. L'obiettivo principale del progetto consiste nello sviluppo di nuove terapie per le malattie della retina ed in particolare per la degenerazione maculare senile (Age Related Macula Degeneration AMD): una malattia complessa, multifattoriale, caratterizzata dalla degenerazione dei fotorecettori e delle cellule dell'epitelio pigmentato.

Impatto

L'obiettivo finale è lo sviluppo di nuove terapie per la degenerazione maculare senile, una delle cause principali della perdita della vista nelle persone con più di 50 anni.

Risultati raggiunti nel 2016

- Abbiamo cercato gli ortologi in zebrafish di diversi geni della matrice extracellulare associati con differenti distrofie maculari ereditarie autosomiche dominanti: *ctrp5* (distrofia retinica), *fibulin3* (Malattia levantinese), *fibulin5* (AMD) and *timp3* (distrofia maculare di Sorsby).

- Abbiamo effettuato analisi di espressione (ibridazione in situ) nelle larve di zebrafish. In parallelo, abbiamo generato una linea transgenica che esprime GFP nell'epitelio pigmentato utilizzando il promotore del gene RPE65.
- Utilizzando questo elemento regolatore, abbiamo overespresso in maniera transitoria i nostri geni di interesse nell'epitelio pigmentato e abbiamo effettuato delle analisi per verificare gli effetti sulla retina dell'overespressione di questi geni.

Obiettivi 2017

Tutte le mutazioni in questi geni associate a degenerazione maculare nei pazienti umani hanno amminoacidi conservati nei corrispondenti geni in zebrafish. I geni, con le corrispondenti mutazioni, verranno introdotti in vettori di espressione e iniettati negli embrioni di zebrafish tg(rpe65a:GFP). I potenziali effetti sulla morfologia della retina verranno analizzate così come effettuato per i costrutti *wild type*.

Nucleoporine, sindrome nefrosica e zebrafish

Project Leader

Chiara Cianciolo Cosentino, PhD

Breve descrizione

Progetto iniziato nel 2016 in collaborazione con l'Istituto Jacques Monod, Univ. Paris Diderot. Lo scopo principale di questo progetto è la caratterizzazione delle nucleoporine nella sindrome nefrosica usando lo zebrafish come modello animale.

Impatto

Studio dei meccanismi molecolari che conducono allo sviluppo della sindrome nefrosica e potenziale sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

Risultati raggiunti nel 2016

- Abbiamo analizzato il genoma di zebrafish per gli ortologhi dei geni che codificano per nucleoporine potenzialmente coinvolte nella sindrome nefrosica.
- Abbiamo completato l'analisi di espressione e, in parallelo, abbiamo effettuato il knock down con il morfolino.

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

6th International Kidney.CH Symposium, Zurigo, Svizzera, 01 giugno 2016

Pubblicazioni

- Mansouri M, Bellon-Echeverria I, Rizk A, Ehsaei Z, Cianciolo Cosentino C, Silva CS, Xie Y, Boyce FM, Davis MW, Neuhauss SC, Taylor V, Ballmer-Hofer K, Berger I, Berger P. (2016) Highly efficient baculovirus-mediated multigene delivery in primary cells. *Nat Commun.* 2016 May 4;7:11529. PMID: 27143231.
- Chiara Cianciolo Cosentino & Stephan CF Neuhauss. Paradigms for the quantification of behavioral responses in zebrafish. Chapter for the Springer book project "Decoding the Structure and Function of Neural Circuits" (under review).

Ruolo del recettore GABA_A e della sua modulazione nelle epilessie pediatriche

Project Leader

Pierangelo Cifelli MD, PhD

Breve descrizione

La displasia corticale focale (FCD) è la più frequente malformazione corticale trovata in pazienti pediatriche affetti da epilessia. Le crisi epilettiche in questo tipo di malformazione si pensa siano il risultato di uno squilibrio tra mediatori eccitatori ed inibitori. Tra le varie ipotesi proposte per spiegare questo sbilanciamento, una riguarda la incompleta maturazione cellulare in questi tessuti, che associata ad una alterazione funzionale dei recettori GABA_A potrebbe contribuire all'epilettogenesi (processo patologico capace di trasformare un cervello "sano" in uno epilettico). Inoltre è stato dimostrato che diverse citochine infiammatorie, come per esempio IL1 β e TNF α , sono fortemente *up-regolate* nei tessuti cerebrali ottenuti da pazienti affetti da FCD, e che queste contribuiscono allo sviluppo dell'epilessia in modelli animali di questa patologia. In questo progetto, andremo ad investigare le proprietà funzionali dei recettori GABA_A e AMPA ed il ruolo giocato dalle citochine infiammatorie in porzioni di tessuto cerebrale ottenuto tramite chirurgia resettiva da pazienti pediatriche farmaco-resistenti. Il nostro scopo è quello di studiare il materiale chirurgico ottenuto da pazienti affetti da FCD utilizzando diversi approcci sperimentali per dimostrare come attraverso la modulazione farmacologica di diverse *pathway* infiammatorie sia possibile ridurre/ritardare l'insorgenza e la gravità delle crisi epilettiche. Per fare ciò verranno utilizzate diverse molecole ottenute dalla cannabis (fitocannabinoidi) che sono recentemente emerse in letteratura come potenziali molecole antiinfiammatorie/antiepilettiche.

Impatto

L'obiettivo di questo progetto di ricerca è quello di studiare i meccanismi legati all'infiammazione associati all'ipereccitabilità in epilessie pediatriche, e di verificare/valutare come l'evoluzione di questa malattia possa essere modificata attraverso la modulazione di diverse *pathway* infiammatorie. Inoltre andremo a valutare se e come diverse molecole cannabinoidi siano in grado di modulare la funzionalità dei recettori GABA_A e AMPA in condizioni infiammatorie.

1. Questo studio è stato ideato con l'intento di studiare una popolazione di pazienti epilettici pediatriche (dati clinici e tessuti chirurgici) affetti da una delle più comuni forme di malformazione corticale.
2. Il nostro approccio avrà ripercussioni importanti per quanto riguarda lo studio dei meccanismi infiammatori alla base dei meccanismi di epilettogenesi. Nello specifico: i) le registrazioni elettrofisiologiche su fettine di tessuto cerebrale pediatrico risultano essere molto difficoltose, in rapporto alla loro limitata disponibilità e alla difficoltà tecnica; ii) l'uso del microtrapianto di membrane

per valutare come diverse citochine infiammatorie siano in grado di modulare l'attività dei recettori GABA_A e AMPA è un approccio completamente nuovo. Inoltre, visto l'aumentato interesse sull'uso di fitocannabinoidi nel trattamento delle epilessie pediatriche, andremo a studiare questo effetto direttamente su porzioni di tessuto cerebrale ottenuto dai pazienti. Da notare come questo studio potrà favorire la ricerca di nuovi farmaci anti-epilettici caratterizzati da maggior efficacia e con meno effetti collaterali rispetto ai classici farmaci anti-epilettici presenti sul mercato.

Risultati raggiunti nel 2016

Durante l'anno 2016 ho avuto la possibilità di incrementare la mia conoscenza e pratica nell'utilizzo della tecnica del doppio *voltage-clamp* su ovociti di *xenopus laevis*. Inoltre, la collaborazione con il dipartimento di neurologia dell'ospedale "Policlinico Umberto I" mi ha dato la possibilità di fare esperimenti utilizzando campioni cerebrali e muscolari ottenuti direttamente dai pazienti. Questo interessante ed innovativo approccio mi ha permesso, in collaborazione con i colleghi del laboratorio, di effettuare un alto numero di esperimenti utilizzando piccole quantità di tessuto. Non meno importante è la collaborazione con "l'Università di Amsterdam" che ci ha fornito campioni biotici "*age-matched*" da usare come tessuto di controllo sano.

Nel primo lavoro pubblicato in questo anno, in collaborazione con il Prof. Maurizio Inghilleri, neurologo e direttore del centro per la cura della sclerosi laterale amiotrofica (SLA) del policlinico "Umberto I" di Roma, abbiamo dimostrato, utilizzando un approccio fortemente traslazionale, come il muscolo possa rappresentare un obiettivo terapeutico per il trattamento farmacologico di questa patologia. Inoltre è stato dimostrato come l'utilizzo della PEA, un cannabinoide endogeno, sia capace di migliorare la funzione muscolare di questi pazienti.

Nello specifico in questo studio è stato dimostrato che la PEA è in grado di ridurre il processo di desensitizzazione del recettore muscolare per l'acetilcolina dei pazienti affetti da SLA e che questo effetto è specifico per i recettori per l'acetilcolina adulti (contenenti la subunità ϵ)

Il lavoro ha anche fornito interessanti dati clinici; infatti nei pazienti affetti da SLA trattati con PEA si è verificato un significativo miglioramento della capacità vitale forzata polmonare (FVC) se comparati con pazienti SLA non trattati. Questo studio ha quindi confermato come in questa patologia, il muscolo ricopra un ruolo fisiopatologico molto importante, e come la modulazione della sua funzionalità sia in grado di migliorare la prognosi di questi pazienti. Va ricordato che la SLA risulta oggi essere una patologia "orfana", per cui non esistono cure specifiche, e che la aspettativa di vita di questi pazienti, dal momento della diagnosi, sia relativamente breve (3-5 anni).

Il secondo lavoro pubblicato riguarda una sindrome epilettica conosciuta come *sclerosis tuberosa* o sindrome di Bourneville-Pringle (TSC). Questa patologia è causata da un difetto genetico che induce una alterazione della differenziazione,

proliferazione e migrazione cellulare durante le prime fasi dello sviluppo cerebrale, determinando la formazione di lesioni di tipo amartomatoso, lesioni che possono verificarsi virtualmente in ogni organo dei pazienti da essa affetti. La sintomatologia è varia ed include disabilità intellettuali, ritardo dello sviluppo, alterazioni cutanee e problematiche a livello polmonare e renale. Il sintomo più comune comunque presente in questi pazienti è una forma di epilessia refrattaria ai comuni farmaci antiepilettici. In questo lavoro abbiamo investigato, su tessuti ottenuti da questi pazienti, le caratteristiche funzionali dei recettori GABA_A e AMPA. La nostra ipotesi è che in questi pazienti le caratteristiche funzionali di questi recettori rimangano immature, determinando la generazione e la ricorrenza di crisi epilettiche. Data l'estrema rarità di campioni di materiale cerebrale pediatrico, anche in questo studio è stata usata la tecnica del microtrapianto di membrane in oociti di *xenopus laevis*, con membrane ottenute da tuberi corticali di pazienti affetti da TSC; come materiale di controllo sono state usate membrane ottenute da campioni post-mortem di pazienti sani con le stesse caratteristiche di età. Oltre allo studio elettrofisiologico sono state effettuate qPCR per valutare l'espressione delle diverse subunità presenti nei recettori GABA_A e AMPA (GABA_A α 1-5, β 3, γ 2, δ ; GluA1, GluA2) e dei cotrasportatori di membrana del cloro NKCC1 and KCC2. La valutazione di nove campioni cerebrali ottenuti da pazienti sani (dalla 15 settimana di gestazione fino a 15 anni di età) ha dimostrato un progressivo spostamento del potenziale di inversione del recettore GABA_A verso valori via via più iperpolarizzati. Questo spostamento è stato associato ad una differente espressione dei trasportatori del cloro di membrana NKCC1 and KCC2. Inoltre questo spostamento avviene parallelamente alla modificazione del rapporto di espressione delle subunità AMPA GluA1/GluA2.

Al contrario, negli oociti iniettati con membrane ottenute da 7 pazienti TSC, né il potenziale di inversione del recettore GABA_A, né il rapporto di espressione tra GluA1/GluA2 hanno mostrato simili alterazioni durante il tempo. Il nostro studio ha indicato, per la prima volta, come in una coorte di pazienti affetti da TSC i *pattern* di funzionalità del recettore GABA_A e AMPA mantengono le caratteristiche tipiche dei recettori presenti nelle prime fasi di sviluppo cerebrale (cervello immaturo). Queste importanti osservazioni supportano l'ipotesi di una alterata funzionalità recettoriale come potenziale causa del disordine epilettogenico, suggerendo quindi nuovi possibili scenari per la ricerca di nuovi target terapeutici. Inoltre i nostri risultati supportano fortemente l'ipotesi che anche in altre patologie caratterizzate da alterato sviluppo cerebrale siano presenti queste alterazioni funzionali, e che esse siano importanti per la comparsa di disordini di tipo epilettico.

Il terzo lavoro pubblicato durante l'anno 2016, è un lavoro traslazionale fatto in collaborazione con il centro per il trattamento delle epilessie del Policlinico "Umberto I", di Roma. Lo studio nasce da una osservazione clinica fatta dai neurologi Dr. Carlo Di Bonaventura e Dr. Annateresa Giallonardo su un paziente affetto da una gravissima encefalopatia epilettica caratterizzata da forte farmaco-resistenza e da importanti

alterazioni cognitive, che determinava l'insorgenza di numerose crisi epilettiche su base quotidiana. E' stato documentato come l'utilizzo di piccole quantità di cannabis, in associazione con le terapie convenzionali in atto, sia stato in grado di ridurre in maniera significativa il numero e la severità delle crisi epilettiche determinando anche un forte miglioramento delle funzioni cognitive del paziente. L'analisi plasmatica dei cannabinoidi presenti nel paziente, ha messo in luce una alta concentrazione di un cannabinoide ancora poco conosciuto, la cannabidivarina (CBDV). Partendo da questa osservazione abbiamo deciso di testare in laboratorio, utilizzando il nostro sistema di espressione degli oociti, le potenziali caratteristiche farmacologiche di questa molecola. I risultati ottenuti hanno dimostrato, per la prima volta, come la CBDV sia in grado di modulare in maniera statisticamente significativa, la funzionalità del recettore GABA_A in tessuti ottenuti da pazienti affetti da epilessia farmaco-resistente, andandone a ridurre il fenomeno della desensitizzazione (GABA_A run-down). Inoltre abbiamo dimostrato come questo effetto sia specifico per i tessuti patologici, in quanto la CBDV non è stata in grado di determinare lo stesso fenomeno su tessuti ottenuti da pazienti sani (biopsie post-mortem age-matched). In conclusione, abbiamo dimostrato come i miglioramenti clinici del paziente supportino l'ipotesi che la cannabis, quando utilizzata sotto stretto controllo medico, possa rappresentare un trattamento anti-epilettico molto efficace con scarsi o nulli effetti collaterali. Inoltre i nostri dati sperimentali suggeriscono che la CBDV possa fortemente contribuire all'effetto anti-convulsivante della cannabis, attraverso il suo effetto sulla trasmissione GABAergica.

Conferenze e pubblicazioni

Pubblicazioni

- Cannabis in epilepsy: from clinical practice to basic research focusing on the possible role of cannabidivarin. Morano A*, Cifelli P*, Nencini P, Antonilli L, Fattouch J, Ruffolo G, Roseti C, Aronica E, Limatola C, Di Bonaventura C, Palma E e Giallonardo AT. *Epilepsia Open*. 16 AUG 2016 10:15AM EST | DOI: 10.1002/epi4.12015 I.F. in calculation
- Functional aspects of early brain development are preserved in tuberous sclerosis complex (TSC) epileptogenic lesions. Ruffolo G, Iyer A, Cifelli P, Roseti C, Mühlebner A, van Scheppingen J, Scholl T, Hainfellner JA, Feucht M, Krsek P, Zamecnik J, Jansen FE, Spliet WG, Limatola C, Aronica E, Palma E. *Neurobiology of disease* 2016 Nov;95:93-101. Doi: 10.1016/ I.F.4.86
- Acetylcholine receptors from human muscle as pharmacological targets for ALS therapy. Palma E , Reyes-Ruiz JM, Lopergolo D, Roseti C, Bertollini C, Ruffolo G, Cifelli P, Onesti E, Limatola C, Miledi R, Inghilleri M. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 29. Pii: 201600251 I.F.9.4

Obiettivi 2017

Durante il prossimo anno, continueremo il lavoro di caratterizzazione dei recettori GABA_A e AMPA in diverse sindromi epilettiche pediatriche (FCD, sindrome di Dravet, sindrome di Angelman), con una speciale attenzione alla interazione tra il sistema GABAergico ed endocannabinoide. Abbiamo iniziato una collaborazione con una

giovane e dinamica start-up con sede a Roma (C4T) che ha una forte competenza nella sintesi di nuove molecole con attività biologica. Dopo una serie di incontri preliminari, abbiamo deciso, di comune accordo, di selezionare alcune molecole cannabinoidi con un buon potenziale terapeutico, e di testare la loro attività su campioni di tessuto cerebrale umano epilettico e su alcuni modelli sperimentali di epilessia. Infine, andremo a valutare la funzionalità di queste nuove molecole con particolare attenzione verso il loro potenziale effetto anti-epilettico.

Inoltre l'aumentato numero di collaborazioni scientifiche (Università di Dusseldorf, Università di Lisbona) sta aprendo nuove strade di ricerca farmacologica, atte a coprire lo studio di diverse patologie, tutte caratterizzate da alterati processi di differenziazione e sviluppo cellulare.

Derivati endogeni elettrofilici di acidi grassi omega-3 per il trattamento di patologie croniche infiammatorie delle vie aeree scarsamente responsive agli steroidi

Project Leader

Chiara Cipollina, PhD

Breve descrizione

Il nostro gruppo di ricerca ha di recente scoperto che gli acidi grassi omega-3 vengono convertiti attraverso reazioni di ossidazione enzimatica e non-enzimatica in derivati elettrofilici bioattivi. Grazie alla loro efficacia anti-infiammatoria e alla loro natura endogena, questi lipidi bioattivi hanno attratto grande attenzione per lo sviluppo di nuove terapie per il trattamento di patologie croniche infiammatorie. La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e la fibrosi polmonare idiopatica (IPF) sono due patologie croniche progressive delle vie aeree scarsamente responsive agli steroidi e per le quali non esiste una terapia efficace. Ciò è in parte dovuto al coinvolgimento di eventi infiammatori che non sono inibiti dagli steroidi, come per esempio l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3. Lo sviluppo di nuovi farmaci per la cura di queste patologie è quindi di notevole interesse farmaceutico. Lo studio qui proposto è volto a testare l'ipotesi che (i) l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 è aumentata nelle vie aeree di pazienti affetti da IPF e BPCO e contribuisce a infiammazione e fibrosi attraverso l'upregolazione di interleuchina 1 β (IL-1 β) e interleuchina 18 (IL-18) e del *pathway* del TGF β ; (ii) derivati elettrofilici di acidi grassi omega-3 contrastano l'attivazione dell'inflammasoma e pertanto rappresentano una nuova opportunità terapeutica per il trattamento di queste patologie.

Gli inflammasomi sono complessi multiproteici che controllano la maturazione di IL-1 β e IL-18 mediante taglio proteolitico ad opera dell'enzima caspasi-1. Evidenze sempre maggiori suggeriscono che l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 sia coinvolto nella progressione di diverse patologie croniche delle vie

aeree, tra cui IPF e BPCO. L'inflammasoma è costituito da un "pattern-recognition receptor" noto come *NOD-like receptor* (NLR), una molecola adattatore (ASC) e l'enzima caspasi-1. Sebbene diversi recettori NLRs siano stati scoperti, il più studiato è NLRP3. L'inflammasoma NLRP3 si assembla in risposta ad una grande varietà di stimoli tra cui ATP extracellulare e prodotti microbici. L'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 induce l'autoprocessamento della caspasi-1, che a sua volta porta a maturazione e rilascio di IL-1 β e IL-18.

Elevati livelli di IL-1 β e IL-18 sono stati associati con l'infiammazione neutrofilica nella BPCO. Queste citochine, inoltre, sono aumentate durante gli episodi di riacutizzazione e hanno un ruolo di primo piano nei processi di infiammazione delle vie aeree indotti da fumo di sigaretta. Livelli elevati di IL-1 β sono anche associati con l'aumento della produzione di GM-CSF e di espressione di E-selectina, che a sua volta promuovono neutrofilia. Inoltre, il rilascio di IL-1 β e l'attivazione dell'inflammasoma sono eventi necessari allo sviluppo di fibrosi polmonare e infiammazione in modelli animali di fibrosi indotta da bleomicina, mostrando quindi un ruolo chiave di questa via negli eventi fibrotici. Inoltre, esistono evidenze che i livelli di ATP, che attiva l'inflammasoma NLRP3 attraverso il recettore P2X7, sono aumentati nei lavaggi bronchioalveolari di pazienti con BPCO e IPF. Questa evidenza descrive un comune meccanismo patologico e rafforza l'ipotesi che l'inflammasoma NLRP3 rappresenta un nuovo target terapeutico per queste patologie croniche.

Impatto

Questo studio produrrà dati del tutto nuovi e clinicamente rilevanti che serviranno come base per la futura ricerca clinica volta allo sviluppo di nuovi trattamenti per malattie croniche infiammatorie delle vie aeree scarsamente responsive agli steroidi.

Risultati raggiunti nel 2016

Abbiamo scoperto che il 17-oxo-DHA sopprime fortemente rilascio di IL-1 β e TNF α indotto da lipopolisaccaride (LPS) nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) isolate da pazienti con BPCO e individui sani. Inoltre, se aggiunto in combinazione con lo steroide fluticasone propionato (FP), 17-oxo-DHA mostra effetti anti-infiammatori additivi agendo attraverso meccanismi complementari, trascrizionali e post-trascrizionali. In particolare, abbiamo scoperto che il 17-oxo-DHA, ma non il FP, inibisce fortemente l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 inibendo il rilascio di IL-1 β e la degradazione del recettore dei glucocorticoidi dipendenti da caspasi-1

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

Poster presentations

- Cipollina C, Di Vincenzo S, Siena L, Di Sano C, Gjomarkaj M, Pace E. "The electrophilic 17-oxo-DHA enhances the anti-inflammatory efficacy of fluticasone propionate in COPD patients" *European Respiratory Journal* Sep 2016, 48 (suppl 60) PA919; DOI: 10.1183/13993003.congress-2016.PA919. European Respiratory Society International Congress, London 3-7 Sep 2016.

- Siena L, Gjomarkaj M, Ferraro M, Bruno A, Cipollina C, Di Vincenzo S, Pace E. "Effect of 17-oxo-DHA alone and in combination with gemcitabine on lung cancer cell growth" *European Respiratory Journal* Sep 2016, 48 (suppl 60) OA1526; DOI: 10.1183/13993003.congress-2016.OA1526. European Respiratory Society International Congress, London 3-7 Sep 2016.
- Bruno A, Cipollina C, Di Vincenzo S, Siena L, Dino P, Di Gaudio F, Gjomarkaj M, Pace E. "Immunomodulatory role of ceftaroline in monocytes and macrophages". *Biotechnologie – Ricerca di base interdisciplinare traslazionale in ambito biomedico*. Palermo, 15-16 dicembre 2016.

Presentazioni orali

- Cipollina C, Di Vincenzo S, Siena L, Di Sano C, Gjomarkaj M, Pace E. "17-oxo-DHA displays additive anti-inflammatory effects with fluticasone propionate and inhibits the NLRP3 inflammasome". *Biotechnologie – Ricerca di base interdisciplinare traslazionale in ambito biomedico*. Palermo, 15-16 dicembre 2016.

Pubblicazioni:

Accettate

- Cipollina C, Di Vincenzo S, Siena L, Di Sano C, Gjomarkaj M, Pace E. "17-oxo-DHA displays additive anti-inflammatory effects with fluticasone propionate and inhibits the NLRP3 inflammasome." *Sci Rep*. 2016 Nov 24; 6:37625. IF 5.228.

In revisione

- Di Vincenzo S, Heijink IH, Noordhoek JA, Cipollina C, Siena L, Bruno A, Ferraro M, Postma DS, Gjomarkaj M, Pace E. "SIRT1/FoxO3 axis alteration leads to aberrant immune responses in bronchial epithelial cells". Submitted to *Mucosal Immunology*, 23/01/2017.
- Bruno A, Cipollina C, Di Vincenzo S, Siena L, Dino P, Di Gaudio F, Gjomarkaj M, Pace E. "Ceftaroline modulates the innate immune and host defense responses of immunocompetent cells exposed to cigarette smoke." Submitted to *Toxicology in Vitro*, 06/12/2016.

In preparazione

- Siena L, Gjomarkaj M, Ferraro M, Bruno A, Cipollina C, Di Vincenzo S, Pace E. "Effect of 17-oxo-DHA alone and in combination with gemcitabine on lung cancer cell growth"

Obiettivi 2017

- Valutare l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 nelle vie aeree di pazienti con BPCO e IPF in collaborazione con ISMETT;
- Valutare gli effetti di derivati elettrofilici di acidi grassi omega-3 sull'attivazione dell'inflammasoma e su specifici marker patologici in modelli ex vivo;
- Analizzare i meccanismi molecolari attraverso cui i derivati elettrofilici di acidi grassi omega-3 inibiscono l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3.

Predire gli effetti della variazione dell'espressione dei microRNA attraverso l'utilizzo di un modello di interazione del *network* microRNA: geni

Project Leader

Claudia Coronello , PhD

Breve descrizione

Il progetto ha per obiettivo lo sviluppo di uno strumento bioinformatico per predire i cambiamenti di espressione dei geni dovuto a variazioni di espressione dei microRNA. In alternativa all'approccio classico, che considera singole interazioni tra microRNA e *target*, useremo un approccio olistico, considerando il *network* di tutte le interazioni tra microRNA e *target* e come la variazione di un componente (microRNA o mRNA) influenza l'espressione degli altri componenti del *network*. La ricerca dell'algoritmo è basata su un *data set ad hoc*, completo di profili di espressione di microRNA e RNA messaggeri, non disponibile in letteratura. Abbiamo ottimizzato il protocollo sperimentale per generare tale *data set*. In particolare, si effettuano immunoprecipitazioni di proteine del complesso RISC (AGO2 e GW182) per raccogliere i seguenti campioni:

- 1) IP, la frazione di RNA immunoprecipitato con la proteina del RISC
- 2) FT, (*flow-trough*) la frazione di RNA rimasta dopo l'immunoprecipitazione
- 3) IN, RNA input dell'esperimento di immunoprecipitazione

Nell'effettuare l'esperimento ci assicuriamo che la proteina del RISC sia immunoprecipitata completamente, lasciando la frazione FT privata di essa. Abbiamo eseguito questi esperimenti su cellule di carcinoma mammario MCF-7 e tutti i campioni prelevati sono stati analizzati con la tecnologia dei microarray Agilent.

Impatto

La novità di questo progetto è la proposta di interessarsi, invece che alla predizione di *target* di microRNA, alla predizione degli effetti delle variazioni dell'espressione dei microRNA sul reale profilo di espressione dell'RNA messaggero. Vogliamo cambiare l'approccio attuale, in cui sono considerate solo le singole interazioni tra un miRNA e un suo *target* e l'*output* di un algoritmo per la predizione di target di microRNA è una lista di target putativi. Nel nostro nuovo approccio, conosciamo i profili di espressione dei miRNA e dei mRNA e l'algoritmo di predizione di target di microRNA è disegnato per predire gli effetti sui messaggeri dovuti al cambiamento (artificiale o causato da una patologia) del profilo di espressione dei miRNA.

In primo luogo, abbiamo analizzato tre esperimenti di immunoprecipitazione della proteina AGO2, in cellule MCF-7 *wild type*. Abbiamo confrontato l'approccio standard usato per individuare i geni differenzialmente espressi nell'IP rispetto al campione IN, che ha bisogno di utilizzare dati da più repliche sperimentali, con un approccio tramite singolo esperimento. Il nostro nuovo algoritmo individua efficientemente i

Risultati raggiunti nel 2016

geni differenzialmente espressi in un campione di IP rispetto al suo corrispondente campione di *Input*.

In secondo luogo, abbiamo disegnato un algoritmo per predire i geni differenzialmente espressi nella IP considerando solo le informazioni del campione di *Input* (non risulta necessario effettuare l'esperimento di IP).

Infine, abbiamo disegnato un algoritmo per predire i geni differenzialmente espressi tra due campioni di IP in due condizioni sperimentali differenti. Abbiamo testato l'algoritmo analizzando un esperimento di immunoprecipitazione di AGO2 in cellule MCF-7 dopo l'inibizione del microRNA hsa-miR-16-5p, uno dei più abbondanti in queste cellule. Questo algoritmo utilizza il reale profilo di espressione genica del campione, e predice efficientemente quali sono i target influenzati dalla variazione di espressione dei miRNA.

Conferenze e pubblicazioni

Pubblicazioni

Coronnello C, Tumminello M, Miccichè S, Gene-based and semantic structure of the Gene Ontology as a complex network, *Physica A*, (2016) 458, pp. 313-328. IF: 1.78

Obiettivi 2017

- Pubblicare un articolo che descriva i tre algoritmi sviluppati nel 2016.
- Abbiamo già effettuato analoghi esperimenti con una proteina differente, la GW182. Il *data set* ottenuto mostra caratteristiche diverse da quello precedentemente ottenuto con la proteina AGO2, nonostante entrambe le proteine facciano parte del complesso RISC e sia stato verificato che co-immunoprecipitano. Vogliamo utilizzare questo *data set* per migliorare la performance dei nostri algoritmi, aggiungendo nuovi parametri all'analisi.
- Disegnare un *web-tool* per rendere utilizzabili i nostri algoritmi dalla comunità scientifica.

α Sinucleina interagisce con TOM20 e inibisce l'importo della proteina mitocondriale nella malattia di Parkinson

Project Leader

Roberto Di Maio, PhD

Breve descrizione

L'accumulo di forme tossiche dell' α -sinucleina e la disfunzione mitocondriale sono stati entrambi implicati nella patogenesi della malattia di Parkinson (PD) e i due eventi sembrano essere strettamente correlati.

La disfunzione mitocondriale, infatti, porta ad accumulo ed oligomerizzazione dell' α -sinucleina, un fenomeno considerato causa diretta di insufficienza mitocondriale. La natura intrinseca di questa interazione bidirezionale è tuttora poco nota.

Impatto

I nostri studi riportano che alcune modificazioni post-traslazionali dell' α -sinucleina interagiscono con elevata affinità col recettore TOM20 del sistema di importo delle proteine mitocondriali, bloccando l'interazione con il suo co-recettore TOM22 e danneggiando il sistema mitocondriale di importo. Le conseguenze sono: carenza di respirazione mitocondriale, produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e perdita di potenziale di membrana mitocondriale.

L'esame *post-mortem* di tessuto cerebrale ottenuto da pazienti affetti da PD, rivela un'aberrante interazione α -sinucleina: TOM20 nei neuroni nigrostriatali associate alla perdita di Ndufs3, una sub unità del complesso I mitocondriale, confermando, in tal modo, la rilevanza di questo processo patogenico nella malattia di Parkinson. Una modesta riduzione di espressione di α -sinucleina endogena nella *substantia nigra pars compacta* (SNPC) del ratto o in colture cellulari è sufficiente a mantenere la normale funzione del complesso mitocondriale di importo delle proteine. L'incremento di espressione di TOM20 o del peptide espresso nelle forme immature delle proteine destinate all'importo mitocondriale (Mitochondrial Targeting Sequence; MTS) hanno mostrato effetti protettivi contro le conseguenze dell'interazione α -sinucleina: TOM20.

Risultati raggiunti nel 2016

Questo studio definisce un nuovo meccanismo patogenico nella malattia di Parkinson, identifica le specie tossiche di α -sinucleina, e rivela nuove strategie terapeutiche neuro protettive

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

Poster e presentazione orale Gordon Research Conference 2016
Poster e presentazione SfN 2016, San Diego

Pubblicazioni

- α -Synuclein binds TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. Di Maio R., Barrett P.J., Hoffman E.K., Barrett C., Zharikov A., Borah A., Hu X., McCoy J., Chu C.T., Burton E.A., Hastings T.G. and Greenamyre J.T. *Sci Transl Med.* 2016 Jun 8;8(342):342ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf3634. PMID: 27280685

Obiettivi 2017

Iniezioni virali contenenti mRNA che codifica per MTS saranno effettuate nella SNPC di ratti che verranno successivamente sottoposti ad induzione di PD tramite trattamento con rotenone. Il potenziale neuroprotettivo esercitato dal peptide MTS sarà così saggiato in questo sistema sperimentale.

In caso di risultati positivi, "*small molecules*" con attività analoga ad MTS saranno sviluppate e testate *in vitro* ed in modelli di Parkinson *in vivo*

Ruolo di LRRK2 nella malattia di Parkinson idiopatica

Project Leader

Roberto Di Maio, PhD

Breve descrizione

Mutazioni specifiche dell'enzima LRRK2 sono causa di familiarità della malattia di Parkinson e, in alcune popolazioni, può rappresentare fino al 40% dei casi. Il locus genico di LRRK2 contiene anche un fattore di rischio per il PD idiopatico (iPD); tuttavia, il ruolo di LRRK2 nel iPD non è ancora chiaro.

Mentre i meccanismi neurodegenerativi delle forme mutanti di LRRK2 non sono chiari, si ritiene che le mutazioni possano essere associate ad una incrementata attività chinastica dell'enzima. La valutazione dello stato di attività chinastica di LRRK2 in varie condizioni è problematico, anche se sembra che vi sia un crescente consenso che i livelli di auto fosforilazione del residuo amminoacidico Ser1292 aumentano con l'aumentare dell'attività dell'enzima. I livelli di fosfoSer1292 sono generalmente rilevati mediante western blotting, un metodo che limita la risoluzione anatomica o cellulare. L'attività di LRRK2 è regolata anche dalla sua interazione con la proteina 14-3-3, il cui legame con LRRK2 è associato a ridotta attività. L'interazione tra LRRK2 e 14-3-3 è stata generalmente valutata dal co-immunoprecipitazione, che, anche in questo caso, non è applicabile ad indagini mirate a saggiare l'attività di LRRK2 *in situ*.

Impatto

Nel nostro laboratorio abbiamo sviluppato nuovi saggi di "Proximity Ligation" con un'eccellente risoluzione anatomica in grado di fornire rapidamente informazioni riguardanti lo stato di attivazione, localizzazione cellulare e regolazione fisiologica di LRRK2. Il metodo è stato convalidato usando CRISPR / Cas9 LRRK2 - / - e cellule HEK o SH-SY5Y che esprimono la mutazione LRRK2G2019S, la più diffusa nei casi di Parkinson familiare. Il test si basa sulla (i) quantificazione *in situ* dei livelli di fosfoSer1292 e (ii) dissociazione 14-3-3 da LRRK2. Con l'utilizzo di questo e di altri test, abbiamo prova convincente che (i) LRRK2 è attivo nei neuroni nigrostriatali osservati in campioni post-mortem di SNPC da pazienti affetti da iPD; (ii) concentrazioni subletali di rotenone attivano LRRK2; (iii) l'over-espressione di α -sinucleina attiva LRRK2; (iv) la fosforilazione della Ser129 nell' α -sinucleina e l'inibizione della glucocerebrosidasi, due fenomeni cruciali nella patogenesi de Parkinson, sono dipendenti dall'attività chinastica di LRRK2. Per la prima volta, i nostri risultati suggeriscono un ruolo centrale di LRRK2 nell'evoluzione del Parkinson idiopatico.

Risultati raggiunti nel 2016

In questo contesto, il progetto attuale è stato pensato per esplorare ulteriormente e definire il ruolo di attività LRRK2 "*wild type*" nel Parkinson idiopatico.

Risultati positivi potrebbero sostenere l'utilità di terapie dirette su LRRK2, come gli inibitori della chinasi ed espandere tali approcci terapeutici all'intera popolazione di persone affette da malattia di Parkinson.

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

- Research Award: PSG Meeting, Portland - OR
- Presentazione orale SfN 2016 di San Diego

Pubblicazioni

- NIH-NINDS R-01 di Grant presentazione (febbraio 2017); R. Di Maio - Co-PI
Lo studio sarà sottomesso per pubblicazione a maggio 2017

Obiettivi 2017

Inibitori LRRK2 sviluppati da Sanofi e Pfizer Pharmaceuticals saranno testati nei nostri modelli sperimentali di Parkinson *in vitro* e *in vivo*.

Ruolo della NADPH ossidasi 2 nella malattia di Parkinson

Project Leader

Roberto Di Maio, PhD

Breve descrizione

Difetti mitocondriali e stress ossidativo sono stati fortemente implicati nella patogenesi della malattia di Parkinson. Mentre è generalmente accettato che il danno neuronale da stress ossidativo osservato nel PD derivi dai mitocondri, vi è una crescente evidenza che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) generate dall'enzima NADPH ossidasi 2 (NOX2) possano avere un ruolo critico nello sviluppo della malattia di Parkinson.

In effetti, la disfunzione mitocondriale e l'attività di NOX2 sono strettamente collegate. Mentre vi è qualche evidenza che l'inibizione di NOX2 possa proteggere i neuroni dopaminergici contro la degenerazione, questi studi sono stati spesso ostacolati dalla mancanza di inibitori altamente specifici. Inoltre, è difficile una valutazione cellulare dello stato di attivazione di NOX2 in condizioni sperimentali o patologiche.

Nel nostro laboratorio stiamo sperimentando il nuovo e inibitore NOX2 altamente specifico, Nox2ds-tat, un peptide che blocca associazione di NOX2 e p47phox, impedendo in tal modo l'attivazione NOX2.

Inoltre, abbiamo sviluppato un nuovo test istologico pensato per saggiare in "proximity Ligation" lo stato di attività di NOX2 in situ. Il metodo è basato sulla determinazione dell'associazione della subunità catalitica NOX2 e la subunità regolatoria p47phox, evento necessario affinché il complesso NOX2 sia attivo.

Impatto

Lo studio è stato progettato per definire la natura dell'interazione NOX2/ mitocondri ed accertarne il ruolo nel Parkinson idiopatico.

Esiti positivi che dimostrano tale rilevanza nell'insorgenza e nello sviluppo del-

la malattia di Parkinson e la potenziale efficacia terapeutica dei nuovi inibitori NOX2 potrebbero rivelare una nuova strategia terapeutica per la neuroprotezione e migliorare la sintomatologia correlata al PD. Come tale, questo progetto ha significato pratico per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nella prevenzione della malattia di Parkinson.

Risultati raggiunti nel 2016

Per modellare certi aspetti del PD *in vivo* ed *in vitro*, abbiamo usato la tossina mitocondriale rotenone. I nostri risultati mostrano una significativa attivazione di NOX2 nei nostri modelli sperimentali.

È importante sottolineare che il test ha anche rilevato attivazione NOX2 nei neuroni dopaminergici del cervello di pazienti con malattia di Parkinson, suggerendo l'importanza di NOX2 nei processi neurodegenerativi correlati alla malattia di Parkinson. In colture cellulari ed *in vivo*, il rotenone provoca prima (i) di accumulo, poi (ii) oligomerizzazione, e successivamente, (iii) aggregazione dell' α -sinucleina. Il co-trattamento delle colture con rotenone e Nox2ds-tat ha impedito l'accumulo, oligomerizzazione e l'aggregazione di α -sinucleina indotti dal rotenone.

Abbiamo recentemente riportato che le forme oligomeriche di α -sinucleina si legano al recettore mitocondriale, TOM20, inibendo l'importo di proteine contenenti la presequenza MTS.

Le forme oligomeriche dell' α -sinucleina si legano anche a TOM70, un recettore mitocondriale che lega le proteine contenenti un segnale di targeting mitocondriale interno. Per facilitare l'importo di queste proteine, TOM70 interagisce anche con Hsp70 per evitarne il "misfolding" e l'aggregazione.

Il trattamento con rotenone danneggia la normale interazione TOM70:Hsp70 in modo indipendente dalla sinucleina. Questo evento è impedito dal co-trattamento con Nox2ds-tat, presumibilmente perché previene le alterazioni re-dox di Hsp70.

Insieme, questi risultati indicano (i) che l'attivazione NOX2 si verifica in PD, (ii) tale attività NOX2 contribuisce alle sinucleinopatie, e (iii) tale attività contribuisce alla compromissione mitocondriale.

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

Presentazione poster SfN 2016 di San Diego

Pubblicazioni

Lo studio sarà sottomesso per la pubblicazione a luglio 2017

Obiettivi 2017

Due "*Small molecules*" con attività analoga a Nox2ds-tat sviluppate nel laboratorio del Dr. Pagano saranno testate nei nostri modelli di Parkinson *in vitro* ed *in vivo*.

NIH-NINDS R-01 Grant application (giugno 2017); R. Di Maio - PI

Generazione in ambiente gastrico e azione di nitro-nitrati: nuovi intermediari lipidici che formano specie nitrosanti ed elettrofiliche

Project Leader **Marco Fazzari, PhD**

Breve descrizione Le condizioni acide dell'ambiente gastrico promuovono la generazione di una complessa miscela di prodotti di nitrificazione, mediati dalla reazione dell'ossido di azoto (NO) e del diossido di azoto (NO₂) con gli acidi grassi insaturi, attraverso meccanismi non ancora completamente definiti. La caratterizzazione dei nuovi lipidi nitrito-nitrato, preferenzialmente generati dalla nitrificazione degli altamente reattivi acidi grassi coniugati, esplora uniche e mai descritte reazioni di nitrificazione e nitrosazione con acidi grassi insaturi liberi ed esterificati.

Impatto La nostra ricerca propone i lipidi nitrito-nitrato come una nuova classe di molecole di segnalazione cellulare capaci di indurre vasodilatazione, nitrosazione di proteine contenenti cisteine e di generare acidi grassi elettrofili nitrati (NO₂-FA), già identificati come mediatori pleiotropici del segnale cellulare. Inoltre, la generazione acido-catalizzata dei lipidi nitrito-nitrato potrebbe indurre risposte adattative cellulari in microambienti pro-infiammatori, dove le reazioni delle specie reattive dell'ossido di azoto con i lipidi contenenti acidi grassi coniugati supportano la generazione dei lipidi nitrito-nitrato.

Risultati raggiunti nel 2016 Abbiamo identificato e caratterizzato nuovi lipidi nitrito-nitrato dopo digestione gastrica *in vitro* di standard lipidici contenenti acido linoleico coniugato (CLA). Inoltre, abbiamo studiato la decomposizione di derivati nitrito-nitrato in condizioni fisiologiche.

Brevetto U.S.A. in attesa di approvazione registrato 11-2016, intitolato: Novel reversible nitroxide derivatives of nitroalkenes that mediate nitrosating and alkylating reactions.

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

- Fazzari, M. Gastric generation of active nitro-nitrates: novel lipid intermediates that form nitrosating and electrophilic species. Decimo Simposio scientifico della Fondazione RI.MED "Bridging health and economic development through public-private partnerships", Palermo, Italia, ottobre 16.

Obiettivi 2017

I nostri obiettivi di ricerca correnti e a breve termine sono indirizzati a svelare la biochimica e la farmacologia dei lipidi nitrito-nitrato, nuovi mediatori della segnalazione cellulare.

Attualmente stiamo studiando se i lipidi nitrito-nitrato sono biologicamente attivi ed agiscono rilasciando ossido d'azoto e specie nitrosanti, prima di decomporre negli anti-infiammatori acidi grassi elettrofili nitrati. Dati preliminari mostrano attivazione della guanilato ciclasi solubile (sGC) e sintesi di cGMP dopo incubazione con fosfolipidi contenenti lipidi nitrito-nitrato. Inoltre, ci proponiamo di caratterizzare il rilascio di ossido d'azoto dai lipidi nitrito-nitrato per mezzo della spettroscopia a risonanza paramagnetica elettronica (EPR) e l'ozono-chemiluminescenza. Infine, studieremo se i derivati lipidici nitriti-nitrato inducono vasodilatazione e modulano la motilità gastro-intestinale.

Formazione gastrica, assorbimento intestinale e distribuzione sistemica dipendente da lipoproteine di nitro-coniugati dell'acido linoleico (NO₂-CLA).

Project Leader

Marco Fazzari, PhD

Breve descrizione

Le ampie conoscenze circa le azioni biologiche e farmacologiche degli acidi grassi elettrofili nitrati (NO₂-FA) contrastano fortemente con le limitate informazioni sulla loro generazione e distribuzione e sul loro assorbimento. Studi con l'isotopo radioattivo [¹⁴C] dell'acido oleico nitrato (NO₂-OA) mostrano che in seguito ad una dose orale l'escrezione urinaria dei metaboliti rappresenta circa il 35% della dose iniziale, con un addizionale significativo accumulo nei tessuti e nella circolazione entero-epatica. Dunque, oltre l'80% del NO₂-OA assorbito rimane non considerato e non è correlato con la rapida degradazione nell'acido stearico nitrato (NO₂-SA, suo principale metabolita. Per l'acido linoleico coniugato nitrato (NO₂-CLA), non vi è alcun dato disponibile circa la resa di formazione, assorbimento e distribuzione.

Impatto

La nostra ricerca propone che una significativa quota di NO₂-FA sia immagazzinata nei compartimenti proteici e lipidici, come i trigliceridi, per regolare l'omeostasi dei NO₂-FA ed agire come tampone mantenendo i livelli stazionari sistemici.

Risultati raggiunti nel 2016

Abbiamo descritto la farmacocinetica dei NO₂-FA.

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

(Abstract/ Poster/ Partecipazione) Fazzari, M., Khoo, N., Woodcock, R.S., Jorkasky, D.K., Li, L., Schopfer, F.J., Freeman, B.A. Nitro-fatty acid pharmacokinetics in the adipose tissue compartment. 23rd Free Radical Biology and Medicine meeting, 16-19 novembre, San Francisco, U.S.A.

Pubblicazioni

M. Fazzari, N. Khoo, R.S. Woodcock, D.K. Jorkasky, L. Li, F.J. Schopfer, B.A. Freeman. Nitro-fatty acid pharmacokinetics in the adipose tissue compartment. *Journal of Lipid Research* 2016 - doi:10.1194/jlr.M072058 – (2015 Impact Factor: 4.368).

S.R. Salvatore, D.A. Vitturi, M. Fazzari, D.K. Jorkasky and F.J. Schopfer. Evaluation of 10-nitro oleic acid bio-elimination in rats and humans. *Scientific Reports* 2017, 7: 39900 - doi: 10.1038/srep39900 – (2015 Impact Factor: 5.228).

Obiettivi 2017

La ricerca si focalizzerà sulla determinazione delle rese di formazione di $\text{NO}_2\text{-CLA}$ in ambiente gastrico, in seguito ad una dieta a base di CLA e $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, ed alla sua incorporazione nei chilomicroni.

Studi neuroprotettivi: neuroprotezione del nitrito nella malattia di Parkinson

Project Leader

Chiara Milanese, PhD

Breve descrizione

Abbiamo scoperto che il trattamento con il nitrito rallenta la progressione della malattia di Parkinson (PD) in vari modelli animali filogeneticamente diversi (dagli zebrafish ai roditori) nonché in modelli cellulari della malattia, incluse linee di fibroblasti derivate da pazienti affetti dal morbo di Parkinson.

Impatto

La disfunzionale mitocondriale del complesso I propaga lo stress ossidativo nel PD, trattamenti attenuanti questo difetto possono quindi limitare la progressione della malattia. Il *targeting* terapeutico del complesso I è stato realizzato con successo in modelli di danno da ischemia/riperfusionazione utilizzando donatori nitrosonio, come il nitrito, in grado di modificare in modo reversibile le sue sub unità e proteggere dai danni ossidativi dopo riperfusionazione. Questa evidenza ha portato all'ipotesi innovativa che il nitrito potrebbe esercitare effetti protettivi anche in condizioni patologiche, come nel PD, dove la disfunzione del complesso I avviene in normossia.

Risultati raggiunti nel 2016

Abbiamo esaminato il meccanismo alla base della protezione a livello molecolare e dimostrato che il nitrito inorganico mitiga il PD attraverso un meccanismo sinergico che migliora contemporaneamente l'efficienza mitocondriale e attiva la principale via antiossidante mediata dal fattore trascrizionale Nrf2. Inoltre, abbiamo dimo-
stra-

to che il nitrito inorganico migliora i difetti bioenergetici in fibroblasti primari derivati da pazienti con PD familiare che presentano mutazioni sul gene LRRK2.

Nel complesso, questi risultati indicano che la somministrazione di nitrito inorganico rappresenta una potenziale terapia per limitare il danno irreversibile del complesso I e lo stress ossidativo, che sono entrambi caratteristiche del PD, e quindi ridurre la disfunzione neurologica.

Studi meccanicistici: riprogettazione metabolica sull'accumulo di danni al DNA e invecchiamento

Project Leader Chiara Milanese, PhD

Breve descrizione L'accumulo di danni al DNA stocastico è intimamente associato con lo sviluppo di diverse patologie umane e con il progressivo declino funzionale dell'invecchiamento.

La riparazione, associata alla trascrizione, modifica lesioni del DNA che bloccano la trascrizione, e difetti in questo processo causano morte cellulare accelerata tessuto-specifica e conseguente progeria segmentale. In parallelo, questi stessi difetti innescano una risposta adattativa in cui la soppressione della crescita e il potenziamento delle difese antiossidanti contrastano gli effetti nocivi dell'invecchiamento.

Impatto

Abbiamo descritto un processo molecolare che associa il blocco della trascrizione al riarrangiamento dei processi metabolici operati da meccanismi allosterici ATP dipendenti, con il fine di potenziare le risposte cellulari allo stress.

Nel complesso, abbiamo evidenziato un meccanismo che regola la risposta adattativa indotta da un prolungato blocco della trascrizione dovuto a un danneggiamento nel processo di riparazione del DNA.

Risultati raggiunti nel 2016

Presso il Dipartimento di Genetica Molecolare dell'Erasmus Medical Center, abbiamo lavorato in stretta collaborazione con il Prof. Jan J. Hoeijmakers, esperto internazionale dei meccanismi di riparazione del DNA in processi fisiologici e patologici. Il suo *team* ha generato la più ampia collezione di animali transgenici dotati di alterazioni del sistema di riparazione del DNA. Tale collezione ha permesso di ottenere una dettagliata visione dell'eziologia delle patologie umane associate ad un difettoso sistema di riparazione del DNA e ha messo in evidenza una stretta connessione tra il danno al DNA, l'invecchiamento e disturbi ad esso correlati.

Nel gruppo del Dr. Marstroberardino, abbiamo dimostrato che un'alterazione nella riparazione del DNA - che è causa di un invecchiamento precoce - è associata ad un declino dei livelli di trascrizione del DNA e determina un accumulo di

ATP intracellulare. Tale accumulo agisce a sua volta da sensore per ridisegnare - attraverso meccanismi allosterici - il processo metabolico degli zuccheri e per attivare risposte antiossidanti attraverso l'aumento dei livelli di NADPH. Nel complesso, questi studi identificano un nuovo e fondamentale meccanismo che regola la conservazione somatica nell'invecchiamento.

Il paper "DNA damage-induced transcription arrest elicits allosteric redesign of metabolism and activation of longevity pathways" è in fase di preparazione.

Conferenze e pubblicazioni

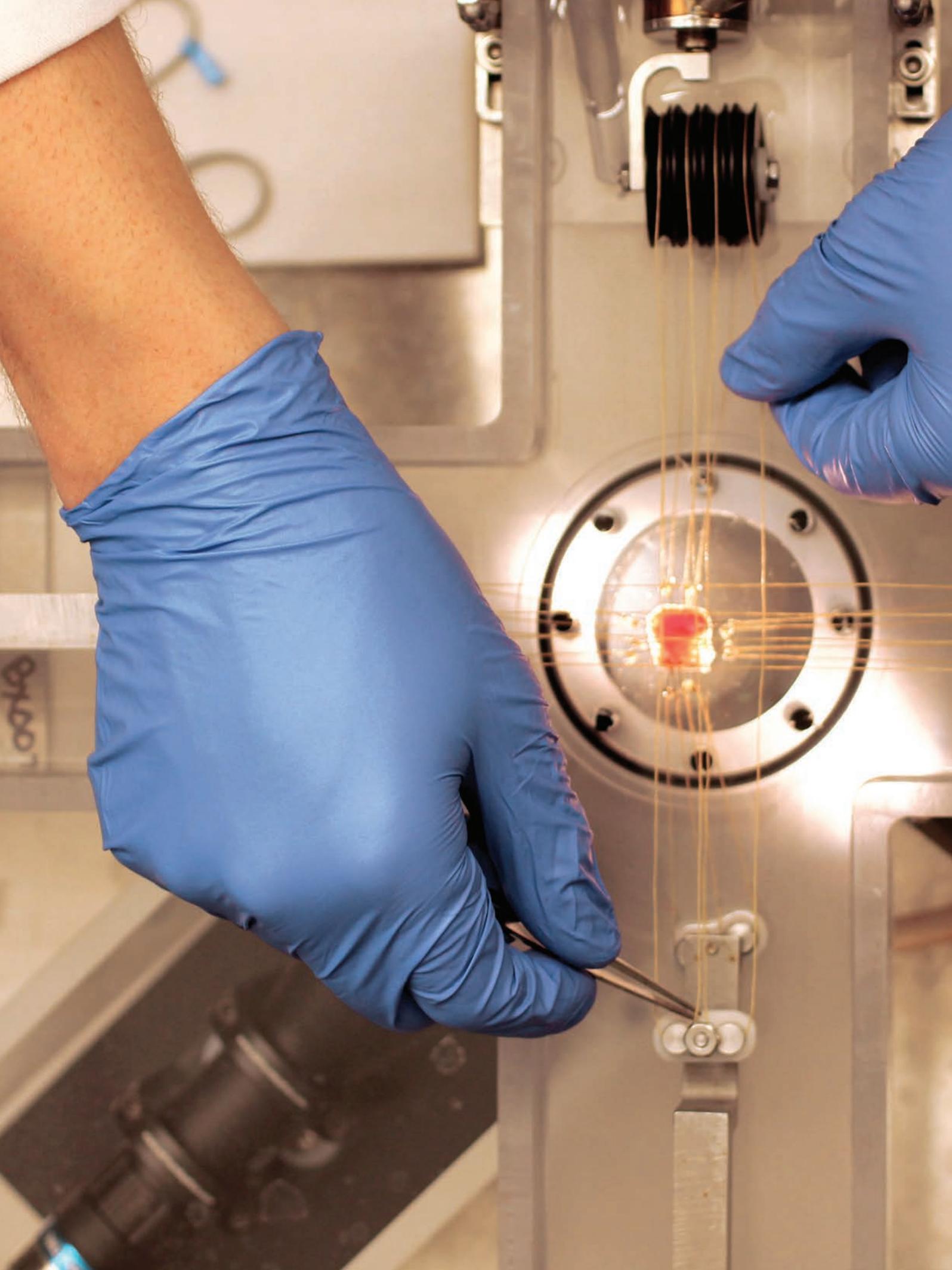
Pubblicazioni

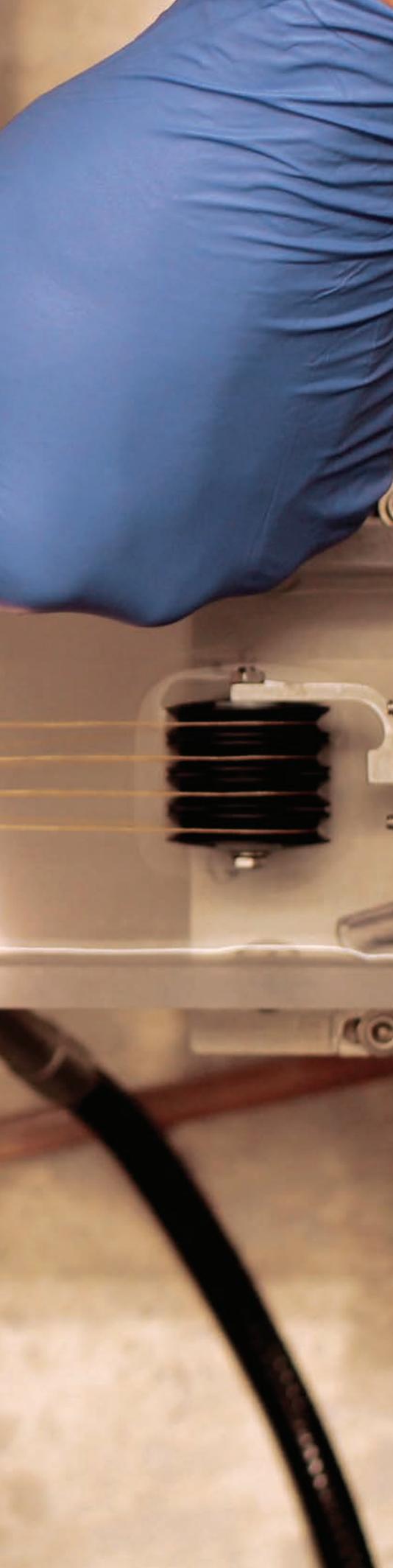
Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia. Zambetti NA, Ping Z, Chen S, Kenswil KJ, MA Mylona MA, Sanders MA, Hoogenboezem RM, Bindels EM, Adisty MN, Van Strien PM, van der Leije CS, Westers TM, Cremers EM, Milanese C, Mastroberardino PG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC, Touw IP, Kuijpers TW, Kanaar R, van de Loosdrecht AA, Vogl T and Raaijmakers MH. 2016. *Cell Stem Cell*. IF: 22.4

Inefficient DNA Repair Is an Aging-Related Modifier of Parkinson's Disease. Sepe S, Milanese C, Gabriels S, Derks KWJ, Payan-Gomez C, van Ijcken WFJ, Rijksen YMA, Nigg AL, Moreno S, Cerri S, Blandini F, Hoeijmakers JHJ and Mastroberardino PG. 2016. *Cell Reports*. 15:1866-1875. IF:8.5

Obiettivi 2017

Gli obiettivi per i prossimi 9 mesi sono la presentazione e la pubblicazione finale di questi 2 progetti principali.





INGEGNERIA DEI TESSUTI E SVILUPPO DI DISPOSITIVI BIOMEDICALI

Il team di Bioingegneria della Fondazione Ri.MED è composto da ingegneri, biologi, chimici e farmacologi che lavorano in stretta collaborazione con medici e chirurghi. Il focus delle ricerche è lo studio dei biomateriali e dei tessuti ingegnerizzati, la loro caratterizzazione reologico-meccanica e lo sviluppo di dispositivi clinici su questi basati.

Ri.MED sta realizzando una piattaforma basata su strumenti (fisici e computazionali) e attrezzature essenziali per la conduzione delle simulazioni numeriche e dei test sperimentali per la verifica e qualificazione delle prestazioni strutturali e fluidodinamiche delle soluzioni cliniche sviluppate, in accordo con le normative richieste per la certificazione CE e l'approvazione FDA.

La piattaforma permetterà l'ottimizzazione di tessuti ingegnerizzati per le diverse applicazioni e in particolare nell'ambito cardiovascolare, grazie a una migliore comprensione dell'effetto degli stimoli fluido-meccanici e strutturali sulla differenziazione e proliferazione cellulare. La piattaforma consentirà inoltre, l'impiego dei tessuti ingegnerizzati nella progettazione, nello sviluppo e nella validazione preclinica di organi e componenti cardiovascolari impiantabili di nuova generazione. La possibilità di sviluppo e validazione in house di soluzioni cliniche, unitamente alla collaborazione con i maggiori centri clinici nel territorio, faciliterà l'introduzione di trattamenti patient-specific e population-specific, offrendo al contempo nuovi strumenti di supporto nella pianificazione terapeutica e nel processo decisionale pre-intervento.

Ingegneria di tessuto e dispositivi medicali per la rigenerazione e riparazione cardiovascolare

Project Leader **Antonio D'Amore, PhD**

Breve descrizione

L'ingegneria di tessuto cardiovascolare combina approcci di terapia cellulare e biomateriali avanzati allo scopo di sostituire o riparare la funzione compromessa di organi o tessuti del sistema cardiovascolare. La divisione di ingegneria di tessuto cardiovascolare presso Ri.MED ha individuato tre principali obiettivi di sviluppo:

- Tissue Engineered Heart Valve (TE-HV);
- Tissue Engineered Cardiac Patch (TE-CP);
- Tissue Engineered Vascular Graft (TE-VG);

TEHV: sviluppare tessuti artificiali ed endoprotesi valvolari per la sostituzione e riparazione di valvole cardiache.

Obiettivi specifici:

- Riprodurre la meccanica fisiologica delle valvole cardiache native
- Crescita tessutale endogena/resistenza alla calcificazione/bassa trombogenicità
- Strategie di intervento percutaneo transcateretere

TECP: sviluppare dispositivi di confinamento e supporto della funzione cardiaca per pazienti affetti da infarto del miocardio.

Obiettivi specifici:

- Mantenimento delle funzioni ventricolari
- Crescita tessutale endogena/riduzione di tessuto fibrotico
- Riduzione dell'assottigliamento della parete di miocardio

TEVG: sviluppare vasi sanguigni ingegnerizzati da impiegare come protesi vascolare nel bypass coronarico.

Obiettivi specifici:

- Riprodurre la meccanica fisiologica di arterie e vene
- Crescita tessutale endogena/funzionalità del vaso/bassa trombogenicità
- Riduzione della iperplasia intimale

Impatto

Queste linee di ricerca produrranno strategie di bioingegneria per l'infarto cardiaco e le patologie vascolari e valvolari che hanno il potenziale di essere traslate dal laboratorio al letto del paziente riducendo morbilità e mortalità

Risultati raggiunti nel 2016

Domande di brevetto

- Verrà convertita a US provisional patent entro il 02/2017. Invention disclosure (Office of technology management internal case number: 03885, filed in 04/2016), argomento: dispositivo medico, titolo: "An expandable percutaneous venous cannula for use in extracorporeal cardiopulmonary support". Inventore principale: A D'Amore;
- Verrà convertita a US provisional patent entro il 02/2017. Invention disclosure (Office of technology management internal case number: 03844, filed in 04/2016), argomento: dispositivo medico, titolo: "A stentless biopolymer heart valve replacement capable of living tissue regeneration". Inventore principale: A D'Amore;
- US patent application PCT/US2016/019837 with WO (International publication number WO 2016/138416 A1) published in 09/2016, argomento: dispositivo medico, titolo: "Double component mandrel for electrospun stentless multi-leaflet valve fabrication". Inventore principale: A D'Amore;
- US patent application PCT/US2016/019849 with WO (International publication number WO 2016/138423 A1) published on 09/2016, argomento: dispositivo medico, titolo: "Retrievable self-expanding non-thrombogenic low-profile percutaneous atrioventricular valve prosthesis";
- Verrà convertita a US PCT entro il 02/2017. US provisional patent application (US 62/281,422), filed in 01/2016, argomento: dispositivo medico, titolo: "Trans-atrial access for transcatheter valve repair or replacement";
- US patent application PCT/US2016/051005 filed in 09/2016, argomento: dispositivo medico, titolo: "Bi-layer polyurethane - extra cellular matrix scaffolds for improved ischemic ventricular wall remodeling". Inventore principale: A D'Amore;

Conferenze e pubblicazioni

Pubblicazioni

- Bi-layered polyurethane-extracellular matrix cardiac patch improves ischemic ventricular wall remodeling in a rat model. D'Amore, T. Yoshizumi., S. K. Luketich, M. T. Wolf, X. Gu, M. Cammarata, R. Hoff, S.F. Badylak, and W. R. Wagner. *Biomaterials* 2016 (107), 1–14, 5Y-IF 8.97;
- Large strain stimulation enhances extracellular matrix production and stiffness in an elastomeric scaffold model. D'Amore, J. Soares, J. Stella, W. Zhang, N. Amoroso, J. Mayer. W. Wagner, M. Sacks. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2016 (62), 619–635, 5Y-IF 3.15;
- Timing effect of intramyocardial hydrogel injection therapy on left ventricular remodeling after myocardial infarction. T. Yoshizumi, Y. Zhu, H. Jiang, A.

- D'Amore, H. Sakaguchi, J. Tchao, K. Tobita, and W. R. Wagner. *Biomaterials* 2016, 83,182–193, 5Y-IF 8.97;
- Abdominal wall reconstruction by a regionally distinct biocomposite of extracellular matrix digest and a biodegradable elastomer. K. Takanari, Y. Hong, R. Hashizume, A. Huber, N. Amoroso, A. D'Amore, S. Badylak, W. Wagner. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*;10(9):748-61, IF 4.7;
 - Solubilized liver extracellular matrix maintains primary rat hepatocyte phenotype in-vitro. A. Loneker, D.Faulk, G. Hussey, A. D'Amore, S. Badylak. *Journal of Biomedical Material Research Part A*, 2015 104, (4), 957–965, IF 3.26;
 - Evaluation of the Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue as the Basis for a Stem Cell-Based Tissue Engineered Vascular Graft. J. T. Krawiec, K. Bruce, A. Josowitz, L. Kokai, A. D'Amore, J. Weinbaum, W. Wagner, P. Rubin, D. Vorp. In press on *Journal of Vascular Surgery* IF 3.77;
 - *In vivo* Functional Evaluation of Tissue Engineered Vascular Grafts Fabricated Using Human Adipose-Derived Stem Cells from High-Cardiovascular Risk Populations. J. Krawiec, H. Liao, A. Josowitz, J. Weinbaum, A. D'Amore, P. Rubin, W. R. Wagner, D. Vorp. *Tissue Engineering Part A*, 2016 22 (9-10), 765-775, IF 3.89;
 - Extracellular Matrix Fiber Microarchitecture is Region-Specific in Bicuspid Aortic Valve-Associated Ascending Aortic Aneurysms. A. Tsamis, J. Phillippi, R. Koch, J. Krawiec, A. D'Amore, S. Watkins, W. Wagner, D. Vorp, T. Gleason. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2016, 151, (6), 1718–1728.e5, IF 3.51;
 - Chronic exposure to arsenic in drinking water promotes NF-κB-mediated myofibroblast dysfunction and matrix remodeling to impair muscle stem cell function. C. Zhang, R. Ferrari, K. Beezhold, K. Stearns-Reider, A. D'Amore, M. Haschak, D. Stolz, P. Robbins, A. Barchowsky, F. Ambrosio. *Stem Cells* 2016, 34, (3), 732-742 IF 5.90;
 - Biomechanical and Microstructural Analysis of an Expandable Vascular Conduit Composed of ePTFE. Loneker, S. K. Luketich, D. Bernstein, A. Kalra, A. Dees, A. D'Amore, D. M. Faulk. In press on *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, IF 2.3;
 - Constitutive Modeling of Ascending Thoracic Aortic Aneurysms Using Microstructural Parameters. S. Pasta, J. Phillippi, A. D'Amore, G. Raffa, M. Pilato, S. Watkins, W. Wagner, T. Gleason, D. Vorp. *Medical Engineering & Physics* 2016, 38 (2), 121-130 IF 1.9;

Presentazioni da podio a conferenze internazionali

- Double components electrospun fibers deposition (DCD): heart valves fabrication with controlled mechanics, micro-structure and Anatomy. D'Amore, G. Raffa, S. Olia, S. K. Luketich, A. Mazzola, F. D'Accardi, X. Gu, M. Pilato, M.

- V. Kameneva, V. Badhwar, W. Wagner . LIAC Vascular Research Society Annual meeting, 14-16 Settembre, Ustica, Italy;
- Double components electrospun fibers deposition (DCD): heart valves fabrication with controlled mechanics, micro-structure and Anatomy. A. D'Amore, G. Raffa, S. Olia, S. K. Luketich, A. Mazzola, F. D'Accardi, X. Gu, M. Pilato, M. V. Kameneva, V. Badhwar, W. Wagner . Società Italiana di Chirurgia Cardiaca Bi-annual meeting, 25-27 Novembre, 2016, Rome, Italy;
 - Design of Thermoresponsive Hydrogels and Biodegradable, Thermoplastic Elastomers for Interventions in Cardiac Wall Remodeling Following Myocardial Infarction. Y. Zhu, X Gu, A. D'Amore, Y Matsumura, W. Wagner. Society for Biomaterials Conference (SFB), 5-8 Aprile, Minneapolis, Minnesota;
 - Towards Elimination of the *In Vitro* Dynamic Culture Period of SVF Cell-Seeded TEVGs. K. Saleh, D. Haskett, , L. Kokai, J. Weinbaum, A.D'Amore, W.Wagner, P. Rubin, D. Vorp. Biomedical Engineering Society (BMES) Annual Meeting, 5-8 Ottobre, Minneapolis, Minnesota;
 - Towards a "Same-Day" Autologous Tissue-Engineered Vascular Graft: Seeding and Implantation of an Elastomeric Scaffold with the Stromal Vascular Fraction. D. Haskett, K. Saleh, J. Krawiec, J. Weinbaum, A.D'Amore, W.Wagner, L. Kokai, P. Rubin, D. Vorp. 15th Biennial Meeting of the International Society for Applied Cardiovascular Biology (ISACB) 7-10 Settembre, Banff, Alberta, Canada

Lezioni su invito

- Invited speaker Lezioni su invito, "How to improve control over biomaterials structure-function to design better performing tissue surrogates". Center for Life Nano Science, Istituto Italiano di Tecnologia, Novembre 2016, Rome, Italy;
- Invited speaker, "Image based structural analysis and quantitative histology for tissue engineering applications". Bridgeside point II, Ottobre 2016, Pittsburgh, USA
- Invited speaker, "Double component electrospinning deposition a novel processing method for heart valve engineering". Tenth annual Ri.MED Foundation scientific symposium, Ottobre 2016, Palermo, Italy;
- Invited speaker, #EuFactor 2016 event organized by the European parliament to promote the interest of college students for research and innovation. Selected as example of Italian young researcher success stories: "Testimonial Stem, ricerca scientifica e innovazione tecnologica", Settembre 2016, Palermo, Italy;
- Meeting co-chair, scientific and organizing committee, LIAC Vascular research 2016 meeting, Settembre 2016, Ustica Italy;
- Session chair, "session I, molecular and supramolecular structure" LIAC Vascular research 2016 meeting, Settembre 2016, Ustica Italy;
- Scientific committee and organizing committee, Italian chapter of the european society of biomechanics, thematic symposium titled: "Frontier biomechanical challenges in cardiovascular physiopathology", Settembre 2016, Palermo Italy;

Obiettivi 2017

Scoperte scientifiche/ Innovazione

- Completare Coulter grant impianto e valutazione di valvola mitrale ingegnerizzata su 10 maiali (70-90 Kg);
- Completare CTSI grant impianto e valutazione di valvola tricuspide ingegnerizzata su 21 maiali (70-90 Kg);
- Completare "Revolutionizing Metallic Biomaterials" (ruolo di collaboratore) grant - impianto e valutazione di stent biodegradabile per valvola ingegnerizzata aortica su 10 maiali, proteggere l'IP correlato;
- Definire una strategia chirurgica minimamente invasiva per rilasciare il patch cardiaco, progetto in collaborazione con ISMETT, Drs Pilato, Raffa, Morsolini and Turrisi;
- Validare un protocollo innovativo di fabbricazione per vasi ingegnerizzati biomimetici;
- Espandere alle applicazioni 3D il software/IP: Invention disclosure (Office of technology management internal case number: 02193), copyrighted software, filed in 04/2010; Argomento: material characterization; Titolo: A method to characterize the complete fiber network topology of planar fibrous tissues and scaffolds. Inventore principale: A D'Amore;

Articoli su riviste indicizzate

- Sottomettere l'articolo: A. D'Amore, G. Raffa, S. Olia, S. K. Luketich, A. Mazzola, F. D'Accardi, X. Gu, M. Pilato, M. V. Kameneva, V. Badhwar, W. Wagner . Double components electrospun fibers deposition (DCD): heart valves fabrication with controlled mechanics, micro-structure and anatomy. To be submitted/in preparation to Biomaterials;
- Sottomettere l'articolo dello studio: NIH 5R01 HL68816- 8, *Biomechanical optimization of tissue engineered heart valves*. PI: M. Sacks University of Texas at Austin, W. Wagner University of Pittsburgh, J. Mayer Children Hospital, Harvard University. Role: A. D'Amore collaborator and coordinator, leaflet fabrication and explants assessment;
- Sottomettere l'articolo su stretch bioreactor follow up: A. D'Amore, J. Stella, R. Hoff, N. Amoroso, M. Sacks, W. Wagner. *Controlling micro-structure to enhance de novo extracellular matrix deposition in elastomeric scaffolds for cardiac tissue regeneration*. 3rd TERMIS World Congress in Vienna September 5th – 8th 2012. pubblicato su Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Vol 6,110, IF 3.278

Domande di brevetto

- Proteggere IP per corde tendinee ingegnerizzate;
- Proteggere IP per vaso artificiale biomimetico;
- Proteggere IP/existing software per la mappatura topologica di anticorpi e markers e per l'analisi di superficie di ePTFE;

Creazione di Start-up

- Formazione di start-up OneValve;

Bandi per finanziamenti ai quali si concorre

- competere sulla misura PO-FESR 1.1.3;
- competere per EU-ERC-starting grant,

argomenti: (1) condurre studio *in vivo* su cavie di larga taglia al fine di duplicare lo studio condotto sul ratto, (2) valutare le IPs di OneValve su modelli cronici.

Bioreattori ad alto *throughput* per i tessuti compositi

Project Leader

Riccardo Gottardi, PhD

Breve descrizione

I modelli organoidi sono sistemi promettenti per lo studio della patogenesi delle malattie, nonché per lo *screening* di farmaci e per la tossicologia predittiva. Tuttavia, i modelli dei tessuti *in vitro* sono oggi spesso limitati a singoli tipi di tessuto, non catturando la complessità dei sistemi umani, in cui più tessuti sono adiacenti e strettamente connessi. I pochi modelli organoidi che sono stati finora proposti per catturare la natura composita della fisiologia umana sono limitate alla giustapposizione di diversi strati di cellule, che imita una serie di barriere tessuto-tessuto, ad esempio, l'interfaccia dell'epitelio polmonare-endotelio capillare, ma non riescono a replicare i sistemi 3D più complessi con più strati e in cui la matrice extracellulare gioca un ruolo fondamentale. Per superare questo limite abbiamo recentemente sviluppato il primo prototipo di un nuovo, bioreattore con *throughput* medio-elevato che può ospitare unità di tessuti bifasici, sia nativi sia ingegnerizzati, e che può quindi sopperire alle limitazioni dei modelli di interfaccia di ingegneria tessutale esistenti. L'unità bifasica di base di questo bioreattore per sistemi microfisiologici (MPS) ha due compartimenti fluidici separati entro cui sono inseriti i costrutti bifasici. Con questa architettura, ogni componente del costrutto bifasico è esposto al proprio mezzo specifico, pur rimanendo in diretto contatto con il componente adiacente del tessuto composito. Abbiamo iniziato a testare le potenzialità del MPS studiando l'unità osteocondrale (OC), fatta di cartilagine ed osso, come esempio paradigmatico di due tessuti connessi in cui la matrice extracellulare, l'ambiente 3D, e la comunicazione tessuto-tessuto giocano un ruolo chiave. Inoltre, il nostro MPS offre la possibilità di confrontare direttamente costrutti ingegnerizzati con le corrispondenti unità tessutali composite native. Questa è una caratteristica unica del nostro dispositivo e sarà fondamentale per validare l'effettiva biosimilarità delle risposte fisiologiche di costrutti ingegnerizzati rispetto alle unità di tessuto nativo che queste modellano.

Il nostro obiettivo a lungo termine è quello di sviluppare nuove potenzialità nel campo della biologia, della medicina, della farmacologia, della fisiologia e della tossicologia dei tessuti scheletrici attraverso la combinazione di culture micro-fisiologiche organotipiche basate sull'ingegneria tissutale con cellule staminali umane e tecniche di monitoraggio ottico in tempo reale, non invasive. Al fine di consentire l'accesso ottico per il monitoraggio in tempo reale, le dimensioni dei costrutti devono essere ridotte; quindi stiamo anche sviluppando e validando un sistema multi-well con ogni pozzetto di dimensioni planari inferiori a quelli di un singolo pozzetto di una piastra da 96 well (bioreattore 2.0). L'altezza di ogni pozzetto è realizzata in modo da contenere un costrutto di circa 10 μ l di volume (raggio ~ 1,8 millimetri, profondità di ~ 0,96 millimetri). Ciascun micropozzetto è quindi sigillato da una base e un coperchio amovibili, dotati di O-ring. Un vetrino circolare è infine inserito tra ciascun micropozzetto e il coperchio per consentire l'accesso ottico al micropozzetto. Ogni pozzetto è dotato di due ingressi e due uscite microfluidiche separate per la fornitura di mezzo di coltura specifico. I pozzetti possono essere collegati in *array* (in parallelo o in serie) in modo analogo al bioreattore precedentemente descritto fino ad ottenere un sistema a 96 pozzetti, o possono essere collegati via canali di microfluidica a serbatoi esterni di mezzo e a sacche di raccolta. Questo bioreattore permetterà la creazione di un sistema organoide che può essere paragonato ad una "sezione istologica vivente" che può essere studiata in modo non invasivo mediante microscopia ottica quanto sottoposta a stimoli fisiologici o tossici.

Impatto

Un MPS basato su cellule staminali umane può accelerare la ricerca e lo sviluppo di farmaci, riducendo il numero di composti che raggiungono la sperimentazione clinica di fase I e II, e al contempo predire più precisamente gli esiti di quelli che sono clinicamente testati, permettendo di ridurre drasticamente il costo di sviluppo di un farmaco. Questi MPS serviranno anche come base per la medicina personalizzata, in quanto possono essere derivati da cellule staminali proprie del paziente per replicare la malattia *in vitro* e per testare gli effetti di un farmaco per ridurre gli effetti o invertirne il corso. Il monitoraggio in tempo reale delle risposte temporali e spaziali delle cellule all'interno dell'MPS all'esposizione a farmaci o a sostanze tossiche aiuterà nell'identificazione dei meccanismi patologici e delle opzioni di intervento in modo molto più efficiente rispetto alle attuali tecniche analitiche distruttive.

Risultati raggiunti nel 2016

- Miglioramento delle prestazioni e test del design del bioreattore per una maggiore facilità di utilizzo e una migliore performance (bioreattore 1.2)
- Testare fino a 2 settimane di coltura di tessuto osteocondrale vitale nel bioreattore 1.2
- Modellare fluidodinamica nel bioreattore 1.2
- Validazione sperimentale della fluidodinamica nel bioreattore 1.2
- Modellare fluidodinamica nel bioreattore 2.0

Obiettivi 2017

- Test di viabilità di cultura di tessuto osteocondrale fino a 4 settimane nel bioreattore 1.2
- Confronto di risposta al TNF- α del tessuto osteocondrale nativo vs. ingegnerizzato nel bioreattore 1.2
- Validazione sperimentale della dinamica dei fluidi nel bioreattore 2.0
- Generazione di costrutti osteocondrali nel bioreattore 2.0
- Generazione di micromasse nel bioreattore 2.0

Effetti della microgravità sui tessuti osteocondrali

Project Leader

Riccardo Gottardi, PhD

Breve descrizione

Il nostro obiettivo è testare gli effetti della microgravità sulla perdita di massa ossea nei tessuti osteocondrali usando un sistema microphysiological 3D (MPS). L'MPS sarà uno strumento prezioso per testare farmaci e sviluppare terapie contro i danni a ossa e cartilagine nello spazio, così come sulla Terra. In primo luogo, intendiamo sviluppare un modello di tessuto osseo ingegnerizzato altamente biosimilare per lo *screening* ad alto *throughput*, e vogliamo testare la sua risposta ai bifosfonati. Quindi implementerò il modello di osso ingegnerizzato unitamente a cartilagine nel mio sistema microfisiologico osteocondrale (OC MPS) per studiare gli effetti della microgravità nello spazio e sulla terra (microgravità simulata) e l'azione protettiva dei bifosfonati.

Impatto

In caso di successo, questo progetto (1) confermerà il potenziale ruolo protettivo dei bifosfonati contro il riassorbimento osseo in condizioni di microgravità, (2) identificherà gli effetti della microgravità e dei bifosfonati sulla cartilagine, (3) stabilirà le piattaforme MPS come sistemi essenziali per lo sviluppo di farmaci e la tossicologia predittiva nei tessuti muscoloscheletrici, sia a terra sia nello spazio.

Risultati raggiunti nel 2016

- Ottenimento del finanziamento da parte di CASIS
- Finalizzazione del contratto di subappalto con la Vanderbilt University per il loro controllore di microfluidica
- Formazione di tecnico di ricerca
- Test di differenziazione osteoblastica su due possibili *scaffold* ossei
- Test in 2D degli assay da utilizzare per il modello di coltura 3D

Obiettivi 2017

- Test di *crosstalk* tra osteoblasti e osteoclasti in 2D e ottimizzazione dei rapporti cellulari per imitare il metabolismo osseo nativo in risposta ad un segnale di stress biochimico
- Semina in un costrutto 3D comprendente cartilagine e confronto con tessuti nativi in risposta allo stesso segnale di stress per 3 settimane
- Ottimizzazione della piattaforma microfluidica in collaborazione con Vanderbilt University per renderle il più prossima possibile ad essere “*flight ready*”

Condroprotezione dagli ormoni del ciclo mestruale: studio su microtessuti osteocondrali

Project Leader

Riccardo Gottardi, PhD

Breve descrizione

L'osteoartrosi (OA) consiste nel danneggiamento progressivo alla cartilagine articolare, il tessuto molle che copre le ossa delle articolazioni. Durante l'OA anche l'osso che è connesso alla cartilagine viene negativamente colpito dalla malattia in quanto ossa e cartilagine si influenzano continuamente a vicenda. Dopo la menopausa, le donne sono due volte più a rischio di sviluppare l'OA degli uomini della stessa età. Diversi studi suggeriscono che questo rischio più elevato di OA sia associato alla perdita di ormoni sessuali post-menopausa. Tuttavia, le attuali terapie di ormonali sostitutive (HRT) inducono solo miglioramenti nella salute delle ossa, ma non della cartilagine. Questo potrebbe dipendere dalla differenza tra il ciclo mestruale naturale e l'HRT. L'uno è caratterizzato da concentrazioni di estrogeno e progesterone che variano significativamente nel tempo e che si ripetono ciclicamente ogni 28 giorni, mentre l'altro si limita generalmente alla somministrazione continua di una concentrazione di estrogeno (o estrogeno e progesterone) che non varia nel tempo. Il nostro obiettivo è di individuare quale concentrazione ormonale o combinazione di concentrazioni ormonali possono essere protettive della cartilagine contro l'osteoartrosi, sfruttando l'innovativo sistema di bioreattore in attesa di brevetto che abbiamo sviluppato per studiare insieme cartilagine ed osso, considerati come una singola unità osteocondrale (OC).

Impatto

In caso di successo questo progetto (1) offrirà nuove linee guida per i regimi HRT che potrebbero essere protettivi della cartilagine contro l'OA e (2) identificherà i meccanismi che influenzano l'insorgenza dell'OA che sono influenzati dagli ormoni sessuali che (3) potrebbero essere il target per lo sviluppo di trattamenti per l'OA sia per gli uomini sia per le donne.

Risultati raggiunti nel 2016

Analisi della risposta a concentrazioni ormonali cicliche che imitano il ciclo mestruale dei tessuti osteocondrali nativi.

Conferenze e pubblicazioni

Pubblicazioni

- Anatomical region-specific enhancement of 3-dimensional chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by soluble meniscus extracellular matrix. B.B. Rothrauff, K. Shimomura, R. Gottardi, P.G. Alexander, R.S. Tuan. *Acta Biomaterialia*. Epub ahead of print doi:10.1016/j.actbio.2016.11.046. Impact Factor: 6.025
- Rapidly dissociated autologous meniscus tissue to enhance meniscus healing: an *in vitro* study. P.-o. Numpaisal, B.B. Rothrauff, R. Gottardi, C.-L. Chien, R.S. Tuan. *Connective Tissue Research*. Epub ahead of print doi: 10.1080/03008207.2016.1245727. Impact Factor: 1.411 (Ranking 11th in Orthopaedics)
- Supramolecular organization of collagen fibrils in healthy and osteoarthritic human knee- and hip joint cartilage. R. Gottardi*, U. Hansen*, R. Raiteri, M. Loparic, M. Düggelein, D. Mathys, N.F. Friederich, P. Bruckner, and M. Stolz. *PLoS ONE*. 11(10): e0163552. doi:10.1371/journal.pone.0163552 *equal contribution. Impact Factor: 3.234
- Distributed and lumped parameter models for the characterization of high throughput bioreactors. L. Iannetti, G. D'Urso, G. Conoscenti, E. Cutrì, R.S. Tuan, M.T. Raimondi, R. Gottardi, P. Zunino. *PLoS ONE*. 2016, 11(9): e0162774. doi:10.1371/journal.pone.0162774. Impact Factor: 3.234
- Cell and Biomimetic Scaffold Based Approaches for Cartilage Regeneration. A.X. Sun, P.-o. Numpaisal, R. Gottardi, H. Shen, G. Yang, R.S. Tuan. *Operative Techniques in Orthopaedics*. 2016, 26(3): 135–146. Impact Factor: not available
- Anisotropic Viscoelastic Biomechanical Mapping of Knee Meniscus Cartilage. L. Coluccino, C. Peres, R. Gottardi, P. Bianchini, A. Athanassiou, A. Diaspro, L. Ceseracciu. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*. Epub ahead of print doi:10.5301/jabfm.5000319. Impact Factor: 0.934

Conferenze

*presenter

- R. Gottardi*, L. Iannetti, G. D'Urso, P. Zunino, P.G. Alexander, R.S. Tuan. A High Throughput Osteochondral Bioreactor. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Americas Annual Meeting*, San Diego, CA, December 2016.
- R. Gottardi*, G. Conoscenti, P.G. Alexander, P.A. Manner, V. La Carrubba, V. Brucato, R.S. Tuan. A Continuous Pore Size Gradient PLLA Scaffold For Osteochondral Regeneration. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Americas Annual Meeting*, San Diego, CA, December 2016.
- S.K. Patel, A. Greene, S. Rothstein, Y. Zou, S. Choi, A. Glowacki, R. Gottardi, C. Sfeir, S.R. Little, L. Rohan. Application of USP 4 Dissolution Apparatus to Assess

Dissolution of Microparticles for Periodontal Disease. American Association of Pharmaceutical Scientists 2016, Denver, CO, November 2016.

- R. Gottardi*, G. Conoscenti, P.G. Alexander, P.A. Manner, V. La Carrubba, V. Brucato, R.S. Tuan. A Continuous Pore Size Gradient PLLA Scaffold For Osteochondral Regeneration. Biomedical Engineering Society Annual Meeting, Minneapolis, MN, October 2016.
- R. Gottardi*, H. Lin, L. Iannetti, G. D'Urso, P. Zunino, T.P. Lozito, P.G. Alexander, P.A. Manner, E. Sefton, T.K. Woodruff, R.S. Tuan. Validation Of An Osteochondral Bioreactor Applied To Study The Protective Role Of Sex Hormones. Biomedical Engineering Society Annual Meeting, Minneapolis, MN, October 2016.
- R. Gottardi*, A. Piroso, P.G. Alexander, P.A. Manner, D. Puppi, F. Chiellini, R.S. Tuan. An *In Vitro* Chondro-Osteo-Vascular Triphasic Model Of The Osteochondral Complex. Biomedical Engineering Society Annual Meeting, Minneapolis, MN, October 2016.
- K. Overholt, A. Piroso, R. Gottardi, R.S. Tuan. Engineering The Bone-Cartilage Interface: An Osteochondral Microphysiological System. Biomedical Engineering Society Annual Meeting, Minneapolis, MN, October 2016.
- I.S. Sondh, D.A. Nichols, E. Bayer, R. Gottardi, S.R. Little. Development of a bioreactor aimed at designing spatial and temporal drug delivery profiles for bone regeneration protocols. Biomedical Engineering Society Annual Meeting, Minneapolis, MN, October 2016.
- I.S. Sondh, D.A. Nichols, E.A. Bayer. R. Gottardi, S.R. Little. Development of a bioreactor aimed at designing spatial and temporal drug delivery profiles for bone regeneration protocols. 2016 Summer Research Symposium, Duquesne University.
- R. Gottardi*, A. Piroso, G. Conoscenti, H. Lin, G. D'Urso, L. Iannetti, P. Zunino, T.P. Lozito, P.G. Alexander, V. La Carrubba, V. Brucato, P.A. Manner, R.S. Tuan. An Osteochondral Microphysiological System to Study Cartilage-Bone Interaction in Native Tissues and Engineered Model Constructs. AAOS/ORS Tackling Joint Disease by Understanding Crosstalk between Cartilage and Bone Research Symposium, Rosemont, IL, April 2016.
- R. Gottardi*, H. Lin, T.P. Lozito, P.G. Alexander, K.C. Clark, E.A. Sefton, T.K. Woodruff, R.S. Tuan. An Osteochondral Microphysiological System to Study the Pathogenesis of Osteoarthritis and the Effect of Hormonal Exposure. Regenerative Medicine Workshop at Hilton Head 2016, Hilton Head Island, SC, March 2016.
- R. Gottardi*, A. Piroso, P.G. Alexander, P.A. Manner, D. Puppi, F. Chiellini, R.S. Tuan. An *in vitro* Chondro-Osteo-Vascular Triphasic Model of the Osteochondral Complex for Studying Osteochondral Biology and for Drug Screening. Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Orlando, FL, March 2016.
- R. Gottardi*, G. Conoscenti, P.G. Alexander, P.A. Manner, V. La Carrubba, V. Brucato, R.S. Tuan. A PLLA Scaffold with Continuous Gradient Pore Size for Osteochondral Regeneration Validated in a Microphysiological Tissue System

Bioreactor. Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Orlando, FL, March 2016.

- R. Gottardi*, H. Lin, G. D'Urso, L. Iannetti, P. Zunino, T.P. Lozito, P.G. Alexander, P.A. Manner, E.A. Sefton, T.K. Woodruff, R.S. Tuan. Validation of an Osteochondral Microphysiological System Applied to Study the Protective Role of Sex Hormones. Orthopaedic Research Society Annual Meeting, Orlando, FL, March 2016.

Obiettivi 2017

- Utilizzare gene array per identificare potenziali target attivati da sequenze ormonali *in vitro*
- Avviare prova animale preliminare in mini-pig per testare la protezione ormonale contro l'osteartrosi post-traumatica indotta.
- Valutare la risposta di tessuti umani nativi ad esposizioni ormonali settimanali, in particolare in relazione al candidato target identificato precedentemente

Emodinamica e *biomarkers* per la stratificazione clinica dei pazienti con valvola aortica bicuspidale ad alto rischio per la formazione di un aneurisma toracico della aorta ascendente

Project Leader

Salvatore Pasta, PhD

Breve descrizione

Il progetto ha come obiettivo lo sviluppo di un supporto clinico basato sul calcolo numerico per il processo decisionale (CDSS) per la stratificazione del rischio di pazienti con valvola aortica bicuspidale (BAV) ad alto rischio per la formazione di un aneurisma toracico della aorta ascendente (ATAA). L'ipotesi centrale è che l'emodinamica ottenuta dalla modellazione computazionale può giocare un ruolo chiave nello sviluppo di ATAAAs.

Impatto

Questa tecnologia (ossia un "software") per la gestione dei pazienti con ATAAAs può ridurre l'onere economico tangibile imposto sul sistema sanitario, migliorando l'allocazione delle risorse (costi per le procedure cliniche complesse) e l'invasività delle stesse procedure sul paziente con un conseguente beneficio per la società.

Risultati raggiunti nel 2016

Stato di avanzamento scientifico del progetto

- In collaborazione con ISMETT, stiamo arruolando in maniera prospettica pazienti al fine di sviluppare il modello computazionale predittivo del rischio di rottura e per il profilo di *screening* epigenetica. Allo stato attuale, abbiamo arruolato n.60 pazienti, e questa fase di arruolamento è prevista che abbia fine entro la metà del 2017.

Collaborazioni

- Abbiamo commissionato lo sviluppo di un *tool* di visualizzazione (ossia parte del CDSS) alla società biotech Orobix (<http://www.orobix.com/>).
- Sono state avviate delle collaborazioni scientifiche con il Politecnico di Losanna, POLIMI e Università di Sheffield sullo scompenso destro in pazienti di con impinato di assistenza ventricolare sinistra VAD (vedi pubblicazioni).

Progetti sottomessi per il finanziamento

- E' stata presentata una proposta di finanziamento alla Marfan Foundation (<https://www.marfan.org/>) nel quadro del programma Faculty Grant 2016. Il progetto non è stato finanziato.
- E' stata presentata una proposta di finanziamento di ricerca alla Ricerca Finalizzata 2016 del Ministero della Salute, in collaborazione con Diego Bellavia dell'IRCCS ISMETT.
- E' stata presentata una proposta di finanziamento di ricerca congiunta alla Fondazione Volkswagen con il Dr. Marino dalla Leibniz Universität di Hannover.

Formazione e Affiancamento

- Grazie al progetto finanziato GR-2011-02348129, è stato assunto un *clinical research assistant* per coordinare le attività e la gestione del progetto.
- Grazie alla collaborazione con il Dr. D'Amore, e' stato formato e seguito uno studente di dottorato presso l'Università di Pittsburgh qui a Palermo per un periodo di 10 mesi.
- Diversi studenti di UNIPA sono stati coinvolti per la realizzazione dei progetti di ricerca scientifica.

Altri risultati

- E' stato organizzato un simposio internazionale dal titolo "Frontier Biomechanical Challenges in Cardiovascular Physiopathology" in collaborazione con il Prof. Zingales di UniPA, CHAB, ISMETT e Ri.MED.
- Editor di uno special issue nella rivista scientifica Medical Engineering & Physics. (impact factor 1.6)

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

- Predicting Right Heart Failure in Patients with Pulmonary Hypertension. Scardulla F, S P, Bellavia D, Scardulla C. Virtual Physiological Human Conference (VPH 2016). Amsterdam, NL.
- Modelling Right Heart Failure in Patients with Pulmonary Hypertension. Scardulla F, Mercadante P, S P, Bellavia D, Scardulla C. Italian Society of Industrial and Applied Mathematics (SIMA). Milano.
- Modelling Right Heart Failure in Patients with Pulmonary Hypertension. Scardulla

- F, Mercadante P, S P, Bellavia D, Scardulla C. Gruppo Nazionale Bioingegneria, Napoli.
- Flow-mediated Mechanism of Aneurysm Formation in Bicuspid Aortic Valve.] Raffa GM, Pasta S. XXVIII Congresso della Società Italiana di Chirurgia Cardiaca (SICCH), Rome.
 - Feasibility of Thoracic Aorta Computational Modeling in clinical practice. Gentile G, Pasta S. RSNA Radiology Society of North America. Chicago, IL.
 - Accuracy of Standard Echocardiography, Cardiac Magnetic Resonance and Derived Lumped Parameter Model for Prediction of Invasive Hemodynamics in Patients with Precapillary Pulmonary Hypertension: a Pilot Study. Bellavia D, Romano G, Pasta S, Gentile G, Scardulla F, Frangi A, et al. 27th Annual of American Society of Echocardiography (ASE). Seattle, WA.

Pubblicazioni

- Evaluation of ventricular wall stress and cardiac function in patients with dilated cardiomyopathy. Scardulla F, Rinaudo A, Pasta S, Scardulla C. *Proceedings of The Institution Of Mechanical Engineers Part H, Journal of Engineering In Medicine*. 2016;230:71-4. (IF 1.0)
- Patients with bicuspid aorticwole of the Bird-Beak Configuration in Endograft Infolding in the Aortic Arch. Pasta S, Scardulla F, Rinaudo A, Raffa GM, D'Ancona G, Pilato M, et al. *An In Vitro Phantom Study on the Role of the Bird-Beak Configuration in Endograft Infolding in the Aortic Arch. Journal of Endovascular Therapy*. 2016;23:172-81. (IF 3.1)
- Constitutive modeling of ascending thoracic aortic aneurysms using microstructural parameters. Pasta S, Phillippi JA, Tsamis A, D'Amore A, Raffa GM, Pilato M, et al. Constitutive modeling of ascending thoracic aortic aneurysms using microstructural parameters. *Medical Engineering & Physics*. 2016;38:121-30. (IF 1.6)
- Computational fluid dynamics of the ascending aorta before the onset of type A aortic dissection. Malvindi PG, Pasta S, Raffa GM, Livesey S. Computational fluid dynamics of the ascending aorta before the onset of type A aortic dissection. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2016. (IF 2.8)
- In Silico Shear and Intramural Stresses are Linked to Aortic Valve Morphology in Dilated Ascending Aorta. Pasta S, Gentile G, Raffa GM, Bellavia D, Chiarello G, Liotta R, et al. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. (in press). (IF 2.9)
- Three-dimensional Parametric Modeling of Bicuspid Aortopathy and Comparison with Computational Flow Predictions. Pasta S, Gentile G, Raffa G, Scardulla F, Bellavia D, Luca A, et al. *Artificial Organs*. (in press). (IF 1.9)

Obiettivi 2017

- Depositare un brevetto sul CDSS per la diagnosi e la gestione dei pazienti con ATAAs e su un polmone artificiale per pazienti con insufficienza respiratoria come terapia ponte per il trapianto.
- Valutare la costituzione di una startup sulla modellazione computazionale di patologie cardiovascolari.
- Sviluppare dispositivi biomedicali, in particolare, un contropulsatore aortico minimamente invasivo ed dispositivi indossabili.
- Sottomettere proposte di finanziamento quali Horizon 2020 e PON.
- Proseguire nelle collaborazioni scientifiche con il Politecnico di Losanna Ecole, POLIMI e Università di Sheffield, MINIERE Saint Etienne
- Rafforzare il gruppo di ricerca in termini di collaborazione con gli studenti UNIPA, POLITO e Università di Pittsburgh e CHAB.





MEDICINA RIGENERATIVA E FARMACI BIOLOGICI

I laboratori di medicina rigenerativa e ricerca e sviluppo di terapie biologiche sono focalizzati sullo sviluppo di nuove terapie cellulari per malattie terminali d'organo e complicazioni post-trapianto, nonché sulla validazione di nuove strategie vaccinali per malattie infettive. Il laboratorio è strategicamente posizionato presso l'IRCCS ISMETT e il team è costituito da ricercatori e personale tecnico esperti in attività di ricerca e sviluppo (studi *in vitro*, *in vivo*, studi *first-in-man*) in manipolazione di campioni biologici di origine umana. Il personale è stato formato per operare secondo regole di *Good Manufacturing Practice* (GMP) e *Good Clinical Practice* (GCP) per il disegno e l'effettuazione di sperimentazioni precliniche/cliniche e la produzione di terapie avanzate. I progetti in fase di sviluppo preclinico mirano allo sviluppo di prodotti cellulari per la riparazione e/o rigenerazione di tessuti e allo sviluppo di colture organotipiche da utilizzare sia per finalità rigenerative sia come modelli per lo screening farmacologico. Altro importante focus di ricerca è lo studio e lo sviluppo di terapie cellulari per la prevenzione di ricorrenze e il trattamento di infezioni post-trapianto. La nuova generazione di vaccini, costituita da proteine ricombinanti, è diretta alla cura delle infezioni di maggiore interesse ospedaliero di diversa eziologia.

Immunoterapia adottiva con cellule NK per la prevenzione della reinfezione HCV post-trapianto e della recidiva HCC

Project Leader **Ester Badami, PhD**

Breve descrizione Prevenzione della ricorrenza dell'epatocarcinoma cellulare (HCC) e/o della reinfezione da HCV dopo il trapianto di fegato tramite inoculo di cellule NK isolate dal perfusato epatico di pazienti DBD (*Donor after brain death*) immediatamente dopo il trapianto di fegato. Dal perfusato epatico è possibile isolare elevati numeri di cellule NK (0.5-2x10⁹). Abbiamo ottimizzato un protocollo di isolamento per attivare le cellule NK in modo da migliorare notevolmente sia la funzione anti-virale HCV che anti-tumorale rispetto all'attivazione classica con IL2. Il fatto che il paziente trapiantato venga trattato immediatamente dopo il trapianto, quando il reservoir più importante di HCC e/o HCV è stato rimosso, dovrebbe favorire l'eradicazione del tumore e/o del HCV.

Risultati raggiunti nel 2016

Brevetto:

"Immunoterapia NK-mediata e usi di essa";

Inventore: Ester Badami

Numero di brevetto: 102016000121081

Data di sottomissione: 29/11/2016

Stato: *Pending*

Grants:

Project Cell Therapies (ex Bioreactor) – un progetto R&D di collaborazione tra ISMETT, UPMC ed il gruppo Bioreattore dell'Università di Pittsburgh

Stato: approvato

Call AIFA 2016 – Study Protocol – SIMVOLTx

Proposal code: TRS-2016-00001081

Stato: *Pending*

Awards:

Roster, PO FESR grant, Esperto in Life Sciences ET4

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

- "EATRIS product platforms combined meeting", Gennaio 2016, Barcellona
- "The International Liver Congress 2016" European Association for the Study of the Liver EASL - Conferenza annual, Aprile 2016, Barcellona
- "7th FIRST Meeting" Forum of Italian Researchers on Mesenchymal and Stromal Stem Cells" - Meeting Annuale, Maggio 2016, Milano
- "NK 2016" - 16th meeting annual della società di immunità naturale, Ottobre 2016, Taormina

Pubblicazioni

"Proportion of lymphocytes isolated from liver perfusate after harvesting procedures in donors after brain death"

Pagano D, Badami E, Conaldi PG, Di Francesco F, Vizzini GB Casu A, Demetris A, Luca A, Gruttadauria S.

Stato: pronto per la sottomissione su American journal of transplantation - Brief report; Impact Factor 5.669

"HCV Replication in Gastrointestinal Mucosa: Potential Extra-hepatic Viral Reservoir and Possible Role in HCV Infection Recurrence after Liver Transplantation"

Russelli G, Pizzillo P, Iannolo G, Barbera F, Tuzzolino F, Liotta R, Traina M, Vizzini G, Gridelli B, Badami E and Conaldi PG

Stato: pronto per la sottomissione su PLOS Pathogens Impact Factor; 7.003

"Naturally arising antigen-specific Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells fail to protect from spontaneous autoimmunity"

Badami E, Cexus O, Dyson J, Labrousse D, Londei M and Quarantino S.

Stato: pronto per la sottomissione su Nature immunology; Impact Factor 23.358

Obiettivi 2017

- *In vivo proof-of-concept* della risposta anti-virale delle cellule NK dopo stimolazione con IFN- α
Collaborazione con Moses Bility, Pitts
- *In vivo proof-of-concept* della risposta anti-tumorale delle cellule NK dopo stimolazione con IFN- α
Presso l'IZS, Palermo
Primo step: approvazione del protocollo animale dall'OPBA e successivamente dall'ISS
- Caratterizzare i fattori solubili rilasciati dalle cellule IFN α -NK e responsabili dell'aumentata risposta anti-virale ed anti-tumorale (proteomica)
- Caratterizzazione del MirNOME delle IFN α -NK cellule

Pubblicazioni in preparazione:

- *IFN-mediated NK cell activation strongly enhances anti-viral immune response*
Badami E, Barbera F, Vella S, Gallo A, Coronello C, Gaetani M, Carreca AP, Russelli G, Carcione C, Galvagno D, Pizzillo P, Spada M, Gridelli, B, Meuleman P, Conaldi PG
- *The omics of IFN α -activated NK cells in tumor response*
Badami E, Barbera F, Vella S, Gallo A, Coronello C, Gaetani M, Carreca AP, Russelli G, Carcione C, Galvagno D, Pizzillo P, Spada M, Gridelli, B, Meuleman P, Conaldi PG.

Attività secretoria di cellule umane fetali (multipotent fetal dermal cells: MFDCs) e adulte dermiche (adult dermal cells: ADCs): risposte biologiche *in vitro* correlate al processo di *wound healing*

Project Leader**Cinzia Chinnici, PhD****Breve descrizione**

Le cellule fetali cutanee umane sono state impiegate sia nel trattamento di ulcere (ferite croniche) sia nelle ustioni pediatriche, rivelandosi un approccio sicuro ed efficace. E' opportuno sottolineare che gli autori dello studio sul trattamento delle ustioni, non hanno riscontrato presenza di cellule fetali nei pazienti trattati sei mesi dopo la fine della terapia, supportando in tal modo l'ipotesi di un meccanismo paracrino. Fattori di crescita e citochine sono state chiamate in causa come potenti modulatori del processo di *wound healing* della cute. Tuttavia, il loro ruolo rimane principalmente ipotetico e necessita di ulteriori delucidazioni. In uno studio precedente, abbiamo mostrato che cellule fetali dermiche umane costituiscono una popolazione di tipo cellule staminali mesenchimali (MSC) e presentano caratteristiche che le rendono potenziali candidate per la terapia cellulare (bassa immunogenicità, altamente proliferanti, capacità di differenziare in tipi cellulari differenti, immunofenotipo stabile, cariotipo stabile, resistenza al congelamento). Inoltre, nostri risultati più recenti mostrano che il loro terreno condizionato (CM) contiene elevate concentrazioni di fattori solubili ad azione proangiogenica.

Impatto

Circa il 50% delle ferite cutanee croniche, specialmente quelle che persistono da più di un anno, non rispondono ai trattamenti convenzionali. Tra loro citiamo la cute ingegnerizzata, sofisticata ma con molteplici limiti, rappresentata da costi elevati e mancanza di un plesso vascolare funzionale. Tra l'altro, l'angiogenesi del tessuto di neo formazione costituisce un aspetto critico ed essenziale per un corretto *wound healing*. L'alterata produzione locale di fattori di crescita e

citochine è stata associata con l'insorgenza delle ferite croniche. Il trattamento di tali lesioni con le MFDCs e/o loro CM rappresenterebbe un approccio a basso costo col potenziale di ripristinare la piena funzionalità della cute in virtù della capacità secretoria delle stesse cellule. Tra i vantaggi pratici della terapia con CM paragonata alla terapia cellulare ci sarebbe l'assenza dei rischi associati al trapianto cellulare legati a proprietà intrinseche delle cellule (tumorigenicità, oppure possibilità di provocare rigetto).

Risultati raggiunti nel 2016

Le MFDCs secernono una varietà di fattori di crescita e citochine nel loro CM. I fattori presenti a concentrazioni elevate (≥ 1 ng/ml) annoverano VEGF-A, HGF, SDF-1 alfa, MCP-1 e MIP-1 beta, il cui ruolo nel *wound healing* sembrerebbe positivamente collegato all'angiogenesi. Tali valori sono promettenti soprattutto alla luce di quanto riportato in letteratura a proposito del CM di cellule staminali mesenchimali (MSC), dove la bassa concentrazione dei fattori solubili contenuti costituirebbe un ostacolo alla CM-based terapia. In aggiunta, il CM di MFDCs e ADCs è in grado di indurre risposte cellulari *in vitro* tipicamente connesse col *wound healing* con elevata efficienza, come la formazione di capillari-like e la migrazione di cellule target, HUVEC e fibroblasti, rispettivamente. Successivamente, abbiamo isolato esosomi dal CM of MFDCs e ADCs. Gli esosomi, testati *in vitro* a concentrazioni differenti, hanno indotto formazione di capillari-like e migrazione di cellule target dimostrando di essere. Il *preconditioning* delle cellule *target* con gli esosomi si è rivelato utile per indurre una risposta cellulare, suggerendo il meccanismo di internalizzazione come meccanismo coinvolto nelle risposte mediate dagli esosomi stessi. Questo aspetto, insieme alla caratterizzazione degli esosomi con differenti approcci sarà maggiormente approfondito successivamente.

Conferenze e pubblicazioni

Pubblicazioni:

- Gaetani M, Chinnici CM et al. "Unbiased and quantitative proteomics reveals highly increased angiogenesis induction by the secretome of mesenchymal stromal cells isolated from fetal rather than adult skin". J Tissue Eng Regene Med 2017 Jan 19. doi: 10.1002/term. (IF 4.7).
- Chinnici CM et al. Exosomes from human multipotent fetal dermal cells and their biological functions related to wound healing *in vitro* (in preparazione).

Obiettivi 2017

Obiettivo 1: caratterizzazione dei fattori secreti mediante approcci differenti (tra cui espressione dei geni correlati col *wound healing*; caratterizzazione di esosomi mediante western blot, nanosight, phospho-antibody array; presenza di specifici micro RNAs isolati da esosomi)

Obiettivo 2: stesura di un protocollo/proposta di studio per testare in un modello *in vivo* (angiogenesi e/o lesione cutanea di tipo cronico) sicurezza ed efficacia del trattamento con MFDCs e loro CM e con ADCs e loro CM.

Cellule multipotenti isolate da fegato fetale umano e loro impiego nel trattamento dell'insufficienza epatica acuta

Project Leader **Cinzia Chinnici, PhD**

Breve descrizione Vogliamo testare la sicurezza ed efficacia di progenitori epatici fetali umani (*fetal liver progenitor cells*: FLPCs) e del loro terreno condizionato (CM) in un modello murino di insufficienza epatica fulminante indotta da inoculo intraperitoneale (i.p.) di una miscela di D-galattosammina e lipopolisaccaridi batterici (GalN/LPS) in topi SCID.

I vantaggi ipotetici del trapianto di FLPCs/CM rispetto al trapianto di epatociti sono molteplici: le FLPCs sono facilmente espandibili *in vitro* e resistenti al congelamento, requisiti che le rendono candidate ideali per la formazione di una banca cellulare (nostri risultati preliminari). Inoltre, i vantaggi del trapianto di FLPCs rispetto al trapianto di cellule staminali mesenchimali (MSCs) extraepatiche annovererebbero l'origine epatica delle FLPCs e il loro potenziale "commitment" verso il tessuto epatico stesso e che le renderebbe più efficienti nello stimolare il processo di riparo, attraverso un meccanismo sia di differenziamento, che dovuto alla capacità di rilasciare fattori solubili ad azione epato-protettiva. A tale scopo, il trattamento con FLPCs o col loro CM sarà paragonato al trattamento con cellule controllo, le MSCs di placenta e il loro CM.

Impatto A causa della scarsa disponibilità di organi, la terapia cellulare costituisce una potenziale alternativa al trapianto ortotopico di fegato (*orthotopic liver transplantation*: OLT). Tuttavia, il trapianto di epatociti presenta una serie di limiti, tra i quali bassa vitalità degli epatociti post-isolamento e post-scongelo, bassa capacità proliferativa *in vitro* da cui consegue un basso numero di cellule da trapiantare. Studi clinici mostrano che l'infusione di MSCs da midollo osseo, cordone e placenta per il trattamento di patologie epatiche sia acute che croniche, si è rivelato un trattamento sicuro ed efficace. Inoltre, sono in aumento gli studi da cui si evince che l'effetto benefico delle MSCs applicate al trattamento del danno epatico sia dovuto a una loro azione paracrina.

Per questo motivo, il primo passo dello studio è stato quello di isolare una popolazione cellulare dal fegato fetale che possedesse una serie di requisiti: isolabile con buona resa, espandibile *in vitro*, resistente al congelamento e col potenziale di ripristinare la funzione epatica soprattutto per la presenza di fattori con proprietà di rigenerazione epatica nel CM.

Risultati raggiunti nel 2016 Stesura del protocollo per lo studio animale da presentare all'Organismo Preposto al Benessere degli Animali (OPBA) per l'approvazione da parte del Ministero della salute.

Conferenze e pubblicazioni

Pubblicazioni:

- Chinnici CM et al. Multipotent cells isolated from human fetal liver release growth factors and cytokines with a potential role in liver tissue repair (in preparazione).
- Chinnici CM et al. Low cell-density cultured human fetal hepatocytes show *in vitro* evidences for epithelial to mesenchymal transition. Pronto per essere sottomesso.

Obiettivi 2017

- Presentare lo studio animale all'OPBA
- *Set-up* degli esperimenti *in vivo*.

Hsp10/EPF come potenziale immuno-modulatore nel diabete di tipo 1 virus-mediato

Project Leader

Simona Corrao, PhD

Breve descrizione

L'aumentata incidenza del diabete di tipo 1 (T1D) sembra essere correlata non solo ad una suscettibilità genetica, ma anche al coinvolgimento di fattori ambientali e all'associazione con precedenti infezioni virali, come quelli da citomegalovirus (CMV), Epstein Barr virus (EBV) ed altri. Il mimetismo molecolare tra antigeni virali e proteine delle cellule β (come l'insulina, il GAD65) è uno dei potenziali meccanismi in grado di influenzare le risposte immunitarie che conducono all'autoimmunità e al T1D. Poiché autoanticorpi contro l'Hsp10 sono stati trovati nei sieri di pazienti affetti da pancreatite acuta e T1D fulminante, una serie di analisi *in silico* sono state effettuate al fine di cercare analogie tra l'Hsp10 e numerose proteine virali coinvolte nel T1D e nella risposta immunitaria. Inoltre, l'Hsp10, nota anche come fattore di gravidanza precoce (EPF) per il suo coinvolgimento nella tolleranza immunitaria della madre verso il feto durante la gravidanza, mostra ruoli immunosoppressivi. Poiché le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono note per essere attive nella modulazione immunitaria, MSCs umane (hMSCs) da diversi donatori sono state trattate e non con citochine pro-infiammatorie, TNF α e IFN γ , da sole e in combinazione, poiché la possibile influenza da parte di una infiammazione del tessuto durante le infezioni potrebbe determinare modifiche locali nell'espressione dell'Hsp10.

Impatto

La domanda fondamentale da porsi è se l'Hsp10 sia direttamente correlata con l'insorgenza del T1D virus-mediato. Le ipotesi sono: 1) l'Hsp10 può funzionare come un antigene effetore, con possibili analogie di sequenza con gli epitopi antigenici di hCMV e di EBV; 2) l'Hsp10 potrebbe modulare la risposta immunitaria alle infezioni virali e quindi avere un ruolo nella fisiopatologia del T1D.ww

Risultati raggiunti nel 2016

- 1) Lo studio in silico ha mostrato che l'Hsp10 ha sorprendenti analogie con le proteine CMV UL57 e pp65, anche se la sequenza dell'Hsp10 è diversa dalla sequenza UL57 coinvolta nel mimetismo molecolare (674-PYAVAFQPLLAYAY-687). Le somiglianze con le proteine di EBV sono state trovate in una parte diversa della sequenza di Gp42, ed in BOLF1, EBNA3C e BFRF3. Nessuna somiglianza significativa è stata riscontrata con le altre proteine, gB, del complesso gH e gL, BLRF2 e BZLF1. Per queste prime analisi su omologie tra l'Hsp10 e i principali virus associati all'insorgenza di T1D, non è possibile escludere totalmente un mimetismo molecolare esercitato anche dall'Hsp10.
- 2) Pancreas da donatori deceduti spesso sono sierologicamente positivi a CMV, EBV o entrambi. L'Hsp10 è stata valutata mediante immunofluorescenza su pancreas umani da donatori che erano negativi oppure infetti e non hanno sviluppato il T1D. È interessante notare che, l'Hsp10 non solo ha mostrato una marcata espressione nel pancreas da donatori infetti non-diabetici, rispetto a quelli provenienti da donatori non-infetti, ma inoltre ha mostrato una corrispondenza con l'insulina in termini di intensità e localizzazione. Questo potrebbe suggerire un ruolo complesso dell'Hsp10 non solo nella risposta immunitaria legata al virus, ma anche nel modulare le funzioni delle cellule β , come il trasporto ed il rilascio dell'insulina.
- 3) L'analisi mediante qPCR ha mostrato che l'espressione dell'Hsp10 è sovraregolata dopo 18 e 48 ore di trattamento con 10 ng/ml TNF α , ma sorprendentemente non con IFN γ (10 ng/ml). I loro effetti sembrano essere reciprocamente influenzati (nessuna variazione in termini di espressione) quando sono mescolati insieme (cytomix).

Altre attività

Coinvolgimento nell'isolamento di isole pancreatiche umane presso il gruppo del cGMP Core Facility del DRI, guidato dalla Dr. Elina Linetsky. Il percorso formativo fornisce tutte le competenze necessarie per eseguire l'isolamento delle isole dal pancreas umano, mediante l'uso della camera di Ricordi, e di essere indipendente nelle fasi di setup del laboratorio adatto (cappe per la perfusione, l'isolamento e la purificazione) seguendo le correlate Procedure Operative Standard (SOP).

Competenza acquisita per l'utilizzo di un nuovo contatore di isole completamente automatizzato (ICC3; Biorep, Miami, FL) per quantificare la massa, la distribuzione granulometrica e la purezza delle preparazioni di isole pancreatiche umane, al fine di confrontarle con la corrente procedura manuale standard.

Studio interno retrospettivo preliminare per analizzare e calcolare lo score relativo alle caratteristiche del donatore (North American Islet Donor Score, NAIDS) secondo la descrizione di Wang et al (2016). Il NAIDS calcolato è stato poi confrontato con la resa delle isole ottenute e l'enzima utilizzato per l'isolamento. Il NAIDS potrebbe diventare un punteggio predittivo per il successo di isolamento delle isole.

Conferenze e pubblicazioni

50th Miami 2017 Winter Symposium - Diabetes: Today's Research – Tomorrow's Therapies (22–25 January 2017) Hyatt Regency Miami, USA

Obiettivi 2017

- Ulteriori informazioni e analisi con altri donatori sono necessari per comprendere il ruolo dell'Hsp10 nel T1D, così come la relazione tra le cascate infiammatorie e le infezioni virali.

Il ruolo extracellulare/immunomodulatorio dell'Hsp10 espressa dalle MSCs potrebbe essere effettuato isolando hMSCs dai tessuti (ad es. midollo osseo) provenienti da diversi donatori, e inducendole ad iperesprimere l'Hsp10 per lo sviluppo di una nuova popolazione di MSCs "ingegnerizzate" per essere utilizzate come terapia cellulare immunosoppressiva a lungo termine durante il trapianto delle isole pancreatiche umane.

Inoltre, l'espressione dell'Hsp10 nelle isole umane verrà valutata mediante immunofluorescenza in altri pancreas umani ed il suo possibile ruolo nella funzione delle isole potrebbe essere valutato in campioni derivati da topi immunodeficienti trapiantati nella capsula del rene con isole pancreatiche umane.

- Miglioramento delle competenze acquisite nell'isolamento delle isole pancreatiche umane (sia per la ricerca che per il trapianto) e nell'accettare o rifiutare pancreas offerti per la ricerca e/o il trapianto. Inoltre, lo studio retrospettivo sulle caratteristiche dei donatori, sui valori NAIDS e l'esito degli isolamenti verrà utilizzato per il confronto e per trovare possibili correlazioni.

Studio della funzione delle globine nella rigenerazione cardiaca e durante lo sviluppo embrionale di zebrafish

Project Leader

Paola Corti, PhD

Breve descrizione

La rigenerazione del cuore è un processo naturale nello zebrafish che si verifica in seguito ad amputazione ventricolare del muscolo cardiaco. Il sito infartuato viene sostituito da nuovo tessuto cardiaco grazie alla proliferazione dei cardiomiociti. Attraverso approcci biomolecolari ci proponiamo di comprendere la funzione delle globine e l'effetto dei nitriti durante la rigenerazione cardiaca di pesce al fine di comprendere i meccanismi genetici che regolano il processo rigenerativo.

Impatto

L'infarto del miocardio è una delle principali cause di mortalità nei paesi sviluppati. Il cuore umano perde la sua capacità di rigenerare il tessuto cardiaco nella fase iniziale dello sviluppo embrionale. Determinare i meccanismi molecolari coinvolti nella rigenerazione cardiaca naturale che si verifica nello zebrafish può, in ultima analisi, rendere disponibili nuove terapie genetiche per riattivare la rigenerazione cardiaca negli esseri umani.

Risultati raggiunti nel 2016

- Abbiamo analizzato gli effetti dei nitriti sul cuore durante il processo rigenerativo in condizioni di ipossia e abbiamo trovato che la risposta infiammatoria iniziale è significativamente influenzata dall'esposizione ai nitriti. Abbiamo registrato una forte diminuzione della quantità di globuli rossi e un aumento del numero di leucociti nella porzione danneggiata del ventricolo. Inoltre, all'inizio del processo rigenerativo, il trattamento con nitrito aumenta significativamente il numero di cardiomiociti in proliferazione.
- Abbiamo scoperto e caratterizzato per la prima volta una nuova globina primordiale contenuta nei globuli rossi di pesce chiamata Globina X (XGB). Questa globina mostra una geometria esa-coordinata rispetto al gruppo eme e una capacità di riduzione dei nitriti fino a 200 volte più veloce dell'emoglobina umana. Abbiamo stabilito che, l'attività di riduzione del nitrito dipendente da XGB nei globuli rossi di pesce, causa un significativo aumento dell'ossido nitrico (NO) e inibisce potentemente l'attivazione piastrinica.
- Abbiamo caratterizzato altre globine trovate nello zebrafish come neuroglobina, citoglobina 1 e citoglobina 2 e abbiamo scoperto che: la neuroglobina ha simili proprietà biochimiche a quelle della neuroglobina umana; la citoglobina 2 (ma non 1) è paragonabile alla citoglobina umana; la citoglobina 1, che abbiamo trovato per la prima volta nei globuli rossi di pesce, è inaspettatamente pentacoordinata e ha una elevata capacità nitro-reduttasi.
- Facendo uso della tecnologia CRISPR / Cas9 utilizzata per la manipolazione genetica, siamo riusciti a creare le prime generazioni di mutanti per i geni Globina X, Citoglobina 1 e 2.

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze (Invited lectureships):

Function of six-coordinate globins. O2BiP Conference, September 11, Hamburg (Germany), September 11, 2016.

Pubblicazioni:

- Corti P, Ieraci M, Tejero J (2016). Characterization of zebrafish neuroglobin and cytoglobins 1 and 2: zebrafish cytoglobins provide insights into the transition from six-coordinate to five-coordinate globins. *Nitric Oxide* 53:22-34. PMID: 26721561. (IF=3.670)
- Corti P, Xue J, Tejero J, Wajih N, Sun M, Stolz DB, Tsang M, Kim-Shapiro DB, Gladwin MT (2016). Globin X is a six-coordinate globin that reduces nitrite to nitric oxide in the fish red blood cells. *PNAS* 113(30):8538-43. PMID: 27407144. (IF=9.423)

Obiettivi 2017

- Sviluppare i modelli knock-out per le globine nello zebrafish e iniziare i test per determinare la funzione delle globine in vivo durante lo sviluppo embrionale e durante la rigenerazione del cuore.
- Caratterizzare l'effetto del nitrito sulla risposta del sistema immunitario nelle prime fasi del processo di rigenerazione del cuore, in particolare gli effetti del nitrito sui leucociti e trombociti.

- Analizzare i cambiamenti di espressione genica in risposta al trattamento con nitrito in un mutante di zebrafish che non possiede le cellule del sangue. Questo mutante si sviluppa in assenza di globuli rossi e il confronto con modelli wild type permetterà di identificare geni specificamente coinvolti nella risposta dei globuli rossi in nitriti. Questi geni verranno analizzati nel modello di rigenerazione cardiaca.

Sviluppo di nuovi vaccini contro le malattie infettive

Project Leader **Bruno Douradina, PhD**

Breve descrizione

Attualmente non esistono vaccini disponibili contro il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), nonostante i molteplici sforzi profusi nel corso degli ultimi decenni. Un vaccino contro questo patogeno virale non solo deve indurre risposte cellulari e umorali del sistema immunitario, ma anche una immunità mucosale. Però, nei casi di trasmissione sessuale, l'HIV utilizza le porte di ingresso delle mucose, e una risposta immunitaria della mucosa potrebbe prevenire una nuova infezione e l'ulteriore diffusione del virus. Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente ingegnerizzati che esprimono antigeni di HIV hanno mostrato risultati promettenti a livello pre-clinico, dal momento che sono in grado di stimolare una risposta delle cellule T. Tuttavia, la maggior parte dei ceppi di *S. cerevisiae* tende ad indurre una scarsa risposta immunitaria mucosale, anche se somministrati per via orale. In questo progetto, si propone l'uso di ceppi probiotici di *S. cerevisiae* geneticamente modificati per esprimere sulla loro superficie l'antigene Gag di HIV. Ceppi probiotici di *S. cerevisiae* sono noti per indurre una risposta immunitaria naturale nel colon e per resistere agli aggressivi ambienti gastrointestinali (sali biliari e succhi gastrici acidi). Inoltre, poiché i lieviti probiotici possono essere facilmente prodotti e immagazzinati per consumo futuro in forma liofilizzata, i vettori di vaccini da loro derivati sarebbero ideali per essere utilizzati in paesi in cui le infrastrutture non hanno la capacità di sviluppare, mantenere e gestire i prodotti che devono essere refrigerati.

Dal momento che i ceppi probiotici di *S. cerevisiae* sono stati utilizzati in esseri umani e con scopi veterinari, senza indicazione di effetti avversi, hanno anche ricevuto lo status di generalmente considerati come sicuri (GRAS) dalla FDA. All'Università di Pittsburgh, abbiamo sviluppato un progetto di ricerca indipendente, con l'obiettivo di modificare geneticamente lieviti probiotici di *S. cerevisiae* e usarli come portatori di antigeni per indurre immunità cellulare, umorale e mucosale. Stiamo elaborando una raccolta di diversi ceppi probiotici di lieviti *S. cerevisiae* e nuovi strumenti genetici per trasformarli. Stiamo disegnando le sequenze di DNA che contengono i promotori di *S. cerevisiae*, terminatori di trascrizione e proteine di membrana, insieme a sequenze di antigene HIV selezionati.

Impatto

Ad oggi non esistono vaccini disponibili contro l'HIV. Dopo molteplici tentativi infruttuosi, la strategia attualmente più promettente è l'utilizzo di RV144, un regime di prime/boost che consiste in un virus del canarino (canary pox) che codifica i geni di ENV / gag / pro e la proteina ricombinante di ENV (subunità gp120). Studi clinici in Thailandia hanno dimostrato un'efficacia del 60% dopo 12 mesi, che gradualmente diminuisce al 31,2% dopo 42 mesi. Per questo motivo, nuovi approcci sono ancora necessari per un vaccino contro l'HIV. L'impiego di ceppi di *S. cerevisiae* geneticamente ingegnerizzati che esprimono l'antigene gp160 di HIV induce una potente risposta immunitaria cellulare nei topi. Tuttavia, una risposta contro HIV deve suscitare entrambe le immunità cellulari e umorali del sistema immunitario e anche una risposta immunitaria mucosale, dal momento che questo virus può essere trasmesso sessualmente attraverso le superfici mucosali. Mentre i ceppi laboratoriali di *S. cerevisiae* conferiscono una risposta mucosale debole, i loro omologhi probiotici inducono una potente secrezione di sIgA nel colon e hanno proprietà immunomodulatorie. È interessante notare che diversi probiotici ceppi di *S. cerevisiae* inducono pure diversi tipi di risposta immunitaria.

Risultati raggiunti nel 2016

Brevetti

Probiotic yeast as vaccination vector, Douradinha B., Italian Patent Office, sottomesso il 17/11/2016

I ceppi probiotici di *S. cerevisiae* sono stati trasformati con il plasmide bicistronico pCEV-G1-Km (pCEV) nella sua forma semplice o con la sequenza HIV gag gene ottimizzato per espressione nella parete cellulare di *S. cerevisiae* con il sistema AGA1p/AGA2p (Gag). Abbiamo espresso con successo la proteina HIV Gag nella superficie dei lieviti e osservato che la modificazione genetica non ha compromesso né la fagocitosi *in vitro* dalla parte delle cellule dendritiche umane (DC) derivate dai donatori sani né resistenza agli ambienti gastrointestinali simulati. Sulla base dei marcatori di superficie delle cellule e citochine secrete da DC di donatori sani che hanno fagocitato i lieviti geneticamente modificati, assumiamo che queste cellule immunitarie polarizzano in una risposta di tipo 1. Per misurare una risposta specifica contro HIV Gag, abbiamo maturato le DC derivate da un paziente HIV+ coi lieviti trasformati e le abbiamo incubato con le cellule T autologhe dello stesso paziente. È interessante notare che solo i controller che sono stati in contatto coi probiotici ceppi di *S. cerevisiae* che esprimono l'antigene Gag sono stati in grado di svolgere efficacemente la presentazione dell'antigene virale alle cellule T, come dimostrato dall'espansione clonale del precedente, in seguito all'incubazione con un peptide pool Gag. I nostri risultati preliminari mostrano che ceppi probiotici geneticamente modificati di *S. cerevisiae* Sb e Sc47 sono promettenti strategie di vaccinazione contro l'HIV. In collaborazione con la Graduate School of Public Health (GSPH), Università di Pittsburgh, stiamo caratterizzando la loro immunogenicità *in vivo* e *in vitro*. Questo lavoro ha già portato a 1 domanda di brevetto, 4 pubblicazioni scientifiche (2 articoli di ricerca, 1 articolo di revisione e 1 presentazione pubblica di genoma) e 10 presentazioni scientifiche a convegni scientifici internazionali e colloqui invitati (4 orali e 6 poster).

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

Presentazioni di Poster

Engineering of vaccines against infectious diseases and efficacy evaluation in a humanized mouse platform. Viana IFT, Dhalia R, Palma ML, Douradinha B, Nascimento E, Garcia-Bates T, Duangkhae P, Mailliard R, Rinaldo C, Marques ETA and Bility MT. Infectious Diseases and Microbiology department retreat, September 8-9th 2016, University of Pittsburgh, Pittsburgh PA, USA

Conferenze

Presentazioni orali

Development of a mucosal vaccine against HIV based on genetically-engineered *Saccharomyces cerevisiae* probiotic strains, in American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 65th annual meeting, November 13-17th 2016, Atlanta GA, USA

Vaccine Discovery in Sicily: targeting our own problems to help others, in Ri.MED Annual Symposium, October 17-18th 2016, Palermo, Italy

Pubblicazioni (*accettate*)

Lipid droplet levels vary heterogeneously in response to simulated gastrointestinal stresses in different probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. Zamith-Miranda D, Palma ML, Matos GS, Schiebel JG, Maya-Monteiro CM, Aronovich M, Bozza PT, Bozza FA, Nimrichter L, Montero-Lomeli M, Marques ET Jr, Martins FS and Douradinha B. *J Funct Foods*. 2016 Mar. 21. (IF 3,97)

Pubblicazioni (*in preparazione*)

Non-Immune Cells Differentially Regulate the MHC Class II Expression by Modulating the Proteasomal Degradation of Class II Transactivator. Palma ML, Duangkhae P, Douradinha B, Dhalia R, Rigato PO, Nascimento EJM, Oshiro TM, Mailliard RB, Duarte AJS, Marques ETA Jr. *Ri-sottomissione a Gene Therapy*. (IF 3,24)

In vivo and *in vitro* anti-malarial effect and toxicological evaluation of the chloroquine analogue PQUI08001/06. Reis PA, Pais KC, Pereira MF, Douradinha B, Costa NF, Kaiser CR, Bozza PT, Areas ALL, Zalis MG, Ferreira ML, de Souza MVN, Frutuosa VS, Castro-Faria-Neto HC. *Sottomissione a ChemMedChem* (IF 2,98)

Obiettivi 2017

A seguito del mio ritorno in Europa, il mio scopo principale è ora quello di avviare il laboratorio di Vaccine Discovery della Fondazione Ri.MED. Il laboratorio sarà presso lo spazio di ricerca congiunta Ri.MED/ISMETT presso le infrastrutture dell'ISMETT. Inizialmente, ci concentreremo sullo sviluppo di un vaccino contro il batterio multiresistente *Klebsiella pneumoniae*, che è attualmente una delle principali fonte di complicanze cliniche per i pazienti che devono subire lunghi periodi di degenza in ospedali e per individui immunocompromessi. Attualmente stiamo stabilendo una collaborazione con GSK Vaccines (Siena, Italia) per individuare, produrre e testare nuovi antigeni contro *K. pneumoniae*. Questa collaborazione sinergica sarà rafforzata da ulteriori collaborazioni con laboratori di riferimento e ospedali

(ad esempio, Policlinico di Palermo), che forniranno campioni di siero di pazienti con infezione da *K. pneumoniae*, essenziali per studi di immunogenicità e studi funzionali. In parallelo, continueremo il progetto di vaccino contro l'HIV basato sui ceppi di *S. cerevisiae* geneticamente modificati in collaborazione con i ricercatori della GSPH (Dott.ssa L. Mariana Palma, il Prof. Robbie Mailliard e il Prof. Mosè T. Bility). Loro continueranno a studiare l'interazione *in vitro* con i lieviti modificati geneticamente con cellule dendritiche umane, sia da individui sani o HIV+, per misurare il livello e il tipo di risposta immunitaria indotta da ceppi trasformati. Inoltre, studieranno le potenzialità di immunizzazione cellulari, umorali e mucose di lieviti che esprimono Gag in un modello animale di topi umanizzati, in cui possono essere effettuate sia l'immunogenicità sia il *challenge con virus HIV*. Inoltre, abbiamo in progetto di presentare un progetto di vaccino contro l'HIV e *K. Pneumoniae* per ottenere un finanziamento dal Dipartimento della Difesa (DoD) degli Stati Uniti.

Ingegnerizzazione di un rene in un sito ectopico

Project Leader Maria Giovanna Francipane, PhD

Breve descrizione

Nel mondo, un numero crescente di pazienti sta sviluppando malattie renali allo stadio terminale, e al momento, le uniche opzioni terapeutiche sono la dialisi e il trapianto. La dialisi è associata a morbilità e mortalità elevate, scarsa qualità di vita e alti costi. Il trapianto rappresenta la migliore opzione. Sfortunatamente, il numero di reni disponibili è insufficiente a coprire la sempre maggiore richiesta. Risulta pertanto di importanza prioritaria sviluppare nuove strategie per la creazione di reni artificiali. Il rene è uno degli organi più complessi del corpo umano, essendo costituito da oltre 26 tipi cellulari diversi. Negli ultimi anni, la comprensione dei meccanismi di sviluppo del rene nel topo, e le scoperte nel campo della biologia delle cellule staminali, hanno guidato la messa a punto di protocolli per la generazione di organoidi renali umani *in vitro* a partire da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs), contenenti almeno 8 distinti tipi cellulari. Sebbene di notevole importanza, l'analisi del profilo genico di questi organoidi suggerisce una stretta somiglianza con un rene di un feto umano al terzo trimestre di gravidanza. Molte domande rimangono quindi senza risposta; per esempio, questi organoidi, sono in grado di differenziare *in vivo* in un organo sufficientemente maturo da assolvere alle sue funzioni di rimozione dei prodotti di scarto e regolazione omeostatica del contenuto di acqua e di ioni nel sangue? Inoltre, è importante sottolineare che il ricorso alle iPSCs è correlato ad un potenziale rischio di sviluppare teratomi o altre neoplasie, che deve essere accuratamente valutato affinché queste terapie basate sull'uso delle iPSCs trovino un'applicazione nella clinica. Sfortunatamente, non siamo a disposizione di siti di trapianto idonei per la

conduzione di studi *in vivo* a lungo termine. Paradossalmente, il rene adulto non fornisce un sito in grado di favorire la vascolarizzazione e il differenziamento funzionale degli organoidi renali. Il trapianto ortotopico non permette infatti la creazione di un rene perfuso in grado di produrre urina. Tra altri potenziali "bioreattori" endogeni, si distingue il linfonodo (LN) che consente la maturazione di numerosi tessuti, tra cui i rudimenti renali. Quindi, proponiamo il LN come un sistema *in vivo* per la valutazione dell'efficacia e della sicurezza dei protocolli di differenziamento delle iPSCs, e in ultima analisi, per l'identificazione della/e fonte cellulare/i ottimale/i per l'ingegnerizzazione di un rene umano funzionale. Per questo progetto abbiamo instaurato una collaborazione con i seguenti ricercatori:

- Dott. Carlton Bates, un nefrologo pediatrico, scienziato, ed esperto nello sviluppo del rene, con una particolare attenzione ai progenitori del nefrone e dell'uretere;
- Dott. Sunder Sims-Lucas, un giovane membro accademico, affiliato alla divisione di nefrologia pediatrica, e specializzato in sviluppo renale (in particolare nel compartimento stromale) e vasculogenesi;
- Dott. Leif Oxburgh, uno scienziato ed esperto nello sviluppo del rene, che ha messo a punto tecniche innovative per l'isolamento e il differenziamento di progenitori e iPSCs in cellule renali;
- Dott. Thomas Kleyman e Lisa Satlin, nefrologi e scienziati con oltre 30 anni di esperienza nel campo della biologia delle cellule epiteliali e della fisiologia renale;
- Dott. Catherine J. Baty, un giovane membro accademico, specializzato nella biologia delle cellule endoteliali linfatiche;
- Dott. Jacqueline Ho, un nefrologo pediatrico, scienziato, ed esperto nello sviluppo del rene.

Questo studio è anche supervisionato dal Dott. Eric Lagasse, un biologo e bioingegnere, con oltre 20 anni di esperienza nella rigenerazione tissutale, pioniere nell'uso del LN come un bioreattore per l'organogenesi tissutale.

Impatto

Nel complesso, questo progetto avrà un impatto ad ampio raggio nell'ingegneria tissutale, per la creazione di tessuti funzionali *in vivo* che includono, ma non sono limitati, al rene.

Risultati raggiunti nel 2016

Abbiamo dimostrato in precedenza (2014) che i metanefri (abbozzi) renali di topo maturano correttamente nel LN, sviluppandosi in nefroni con funzioni glomerulari e tubulari^{5,6}. Durante gli anni 2015-2016, abbiamo dimostrato che:

- Il LN murino supporta anche l'attecchimento e la maturazione del rene fetale umano;
- I reni umani trapiantati sono progressivamente vascolarizzati dal topo ospite;
- L'analisi dell'espressione di numerosi marcatori renali e la ricostruzione tridimensionale dimostrano che gli impianti hanno un'architettura normale;
- L'iniezione di destrosio (10,000 kDa MW Texas Red Dextran) nel topo ospite evidenzia filtrazione glomerulare e riassorbimento negli adiacenti tubuli prossimali.

Dato che l'uso di cellule/tessuti embrionali non costituisce un approccio praticabile

nella clinica vista la scarsità di questa risorsa e i problemi etici ad esso correlati, abbiamo anche considerato la possibilità di impiantare nel LN organoidi renali generati dai progenitori dei nefroni murini, e successivamente, organoidi renali generati da iPSCs umane. Le iPSCs sono state differenziate utilizzando il protocollo descritto da Bonventre. Sono stati trapiantati numerosi topi, ognuno con un organoide. Gli organoidi trapiantati sono attecchiti e sono stati vascolarizzati dal topo ospite nel giro di una settimana dal trapianto. Sono state osservate alcune strutture positive per il marcatore WT-1 (marcatore dei podociti = potenziali glomeruli primitivi) e numerosi tubuli positivi per LTL (marcatore di cellule dei tubuli prossimali). Mentre LTL era presente prima del trapianto, non c'erano vasi sanguigni o espressione di WT-1 *in vitro*. Tuttavia, le strutture positive per WT-1 non sono state in grado di maturare ulteriormente in glomeruli funzionanti. Inoltre, con il passare del tempo, all'interno del LN è stata osservata della cartilagine. Complessivamente, questi dati indicano che le condizioni per la propagazione *in vivo* a lungo termine dei progenitori dei nefroni umani devono essere ancora ottimizzate.

Riconoscimenti

Articolo "Pluripotent stem cells to rebuild a kidney: the lymph node as a possible developmental niche" in evidenza sulla copertina della rivista Cell Transplantation Journal (volume di Luglio 2016).

Nuove adesioni

American Society of Nephrology.

Nuove attività di revisione

Preso parte al Comitato Editoriale delle seguenti riviste:

- Austin Journal of Pathology & Laboratory Medicine
- SL Clinical Medicine: Research

Richieste di finanziamento sottomesse

- NIH Grant R01- 1R01DK113261-01. Ruolo: Col.
- Stem Cell Translational Medicine's Young Investigator Award. Ruolo: PI.
- DOD Funding Opportunity Number: W81XWH-16-PRMRP-IIRA. Ruolo: Col
- McCune Foundation. Pediatric Device Seed Funding RFP. Ruolo: Col FINANZIATO
- High Impact, Interdisciplinary Science in NIDDK Research Areas (RC2). Funding Opportunity Number: PARP-16-126 (Copertura del salario ma non investigatore in quanto non eleggibile per questo tipo di finanziamento). IN REVISIONE.

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

American Society of Nephrology Kidney Week 2016, 15-20 Novembre, Chicago, IL.

Poster

Regenerating a kidney in a lymph node. Francipane MG, Sims-Lucas S and Lagasse E. McGowan Institute for Regenerative Medicine - 15th Annual Scientific Retreat. Farmington, PA, USA. Marzo 6-8, 2016.

Seminari

Toward Engineering a Novel Transplantation Site for De Novo Kidney Regeneration. Francipane MG and Lagasse E. Bridgeside Research Forum, Pittsburgh, PA, USA. Febbraio 19, 2016.

Pubblicazioni

- Toward organs on demand: breakthroughs and challenges in models of organogenesis. Francipane MG and Lagasse E. Current Pathobiology Reports. Luglio 2016.
- Towards organs on demand: a new platform for successful kidney organogenesis. Francipane MG and Lagasse E. Atlas of Science. Aprile 2016.

Obiettivi 2017

Il progetto sarà focalizzato su due aspetti:

- 1) **Uso del LN come una piattaforma per la valutazione dell'efficacia di nuove fonti cellulari nell'ingegneria renale.** Ad oggi, abbiamo valutato il destino *in vivo* degli organoidi renali umani riprodotti utilizzando il protocollo descritto da Bonventre. Gli organoidi renali sono stati incapaci di raggiungere la piena maturità quando trapiantati nel LN. Piuttosto, sono state spesso osservate strutture indifferenziate, tra cui cartilagine.

Mentre altri organoidi verranno preparati utilizzando altri protocolli disponibili in letteratura, possiamo anticipare un risultato simile *in vivo*. Infatti, sebbene siano stati fatti dei progressi, gli organoidi renali umani derivati da iPSCs esibiscono *in vitro* un'alta percentuale di cellule non differenziate. Inoltre, non è chiara la stabilità delle cellule che si sono già differenziate *in vitro* verso un particolare tipo cellulare renale. E' possibile che specifici segnali chimici siano richiesti al fine di guidare e/o mantenere la maturazione dei progenitori renali *in vivo*. La manipolazione di vie di trasduzione del segnale cruciali per il differenziamento dei progenitori renali verso uno specifico feto, attraverso l'uso di molecole chimiche (small molecules) è l'unica via per rispondere a queste domande. Questo approccio richiederebbe il trapianto di numerosi gruppi di topi e i fondi attualmente disponibili sono insufficienti per perseguire questo obiettivo. Per questa ragione, ho sottomesso una richiesta di finanziamento intramurale (CMRF grant, vedi in basso). Qualora i fondi dovessero essere disponibili, aggiungeremo i seguenti fattori al mezzo di coltura APEL, in cui gli organoidi sono risospesi, prima del trapianto:

Per espandere il pool dei progenitori:

- Inibitori della fosforilazione di Smad2/3, PD169316 and SB203580, e il loro analogo inattivo, SB202474. Useremo una dose di 10- μ M per ogni inibitore (Calbiochem).
- Inibitore della fosforilazione di Smad1/5/8 Dorsomorphin (DM). Useremo una dose di 1- μ M (Sigma-Aldrich).

Per guidare il differenziamento dei progenitori dei nefroni:

- CHIR99201. Useremo una dose di 3 μ M CHIR99201 (Stemgent).

Per guidare il differenziamento dei progenitori dei nefroni in specifici segmenti del nefrone:

- Il ligando di Notch, Dll1, per guidare le cellule verso un destino prossimale. Useremo una dose di 3µg/ml di Dll1 umano solubile (PrepoTech).
- L'inibitore di Notch, DAPT, per guidare le cellule verso un destino distale. Useremo una dose di 1-µM di DAPT (Sigma).

Il nostro piano è quello di utilizzare 10 topi per molecola, 5 da essere sacrificati dopo 3 settimane, e 5 da essere sacrificati dopo 6 settimane dal trapianto. L'isolamento degli impianti ad intervalli di tempi diversi è importante per misurare la stabilità del fenotipo cellulare indotto.

Il corretto differenziamento dei progenitori dei nefroni nei principali segmenti del nefrone sarà valutato attraverso l'analisi di specifici marcatori tramite immunistochemica. La funzione tubulare sarà valutata misurando la concentrazione di metaboliti tipici dell'urina nel fluido racchiuso nelle cisti che dovrebbero svilupparsi a seguito di maturazione dei progenitori. Tra questi metaboliti citiamo la creatinina. Il fluido racchiuso nelle cisti rappresenta l'ultrafiltrato che è stato modificato a livello tubulare. Per comprendere se questo fluido origina dal sistema circolatorio del topo ospite, inietteremo destrosio a basso peso molecolare coniugato con un fluorocromo, e valuteremo il suo accumulo nelle cisti 2 ore dopo.

Possiamo anticipare che l'iniezione di molecole chimiche risulterà in un'espansione dell'impianto e/o in un migliore differenziamento (riduzione del numero delle iPSCs che rimangono indifferenziate).

Se non dovessimo notare gli effetti desiderati, potremmo trattare i LNs con le molecole sopra indicate ogni giorno e/o alterare la loro concentrazione. Potremmo anche usare altri fattori descritti in letteratura. L'incompleta maturazione dei nefroni potrebbe suggerire che gli organoidi derivati dalle iPSCs non sono pienamente in grado di dare luogo a strutture renali stabili (sulla base delle eccezionali proprietà del LN nell'organizzare il rene ed altri tessuti in via di sviluppo). Questo indirizzerebbe la comunità scientifica a raffinare gli approcci per differenziare le iPSCs verso uno specifico feto renale *in vitro*.

2) Migliorare la conoscenza del microambiente linfonodale.

La comprensione del rimodellamento del LN e l'adattamento del tessuto a seguito di trapianto nel LN potrebbero fornire preziose informazioni per la futura creazione di "nicchie" per le cellule renali umane. In questo contesto, abbiamo dati che indicano che le cellule fibroblastiche reticolari (FRCs, una sottopopolazione delle cellule non ematopoietiche stromali, che controllano l'espansione e la contrazione del LN) guidano la vascolarizzazione del tessuto ectopico, un importante prerequisito per la sua sopravvivenza, maturazione e funzione. Analisi future permetteranno di fare luce sugli specifici meccanismi molecolari indotti dalle FRCs.

Richieste di finanziamento sottomesse durante il 2017

- UPMC Competitive Medical Research Fund (CMRF) award. Assessing how co-injection of defined small molecules ameliorates expansion and differentiation of iPSC-derived renal lineages *in vivo*. Ruolo: PI. IN REVISIONE.

Richieste di finanziamento in via di preparazione

- NIH Grant R01. Ruolo da essere definito in base al tempo richiesto per l'ottenimento della residenza permanente

Esosomi per la diagnosi e il monitoraggio del rigetto a seguito del trapianto di isole pancreatiche e per il trattamento terapeutico del Diabete Mellito di tipo 1

Project Leader**Marta Garcia-Contreras, PhD****Breve descrizione**

Il Diabete Mellito di Tipo 1 (DT1), la forma più grave di diabete mellito, è una malattia autoimmune scatenata da fattori ambientali che provoca la distruzione delle cellule beta-pancreatiche, localizzate nelle isole di Langerhans e responsabili della secrezione di insulina. Ne consegue la riduzione della sintesi di insulina, che, nei soggetti affetti da DT1, conduce a episodi di iperglicemia.

L'unico biomarcatore clinicamente disponibile è la presenza in circolo di autoanticorpi, responsabili della distruzione degli autoantigeni delle cellule beta. Questo biomarcatore non è tuttavia sufficiente per la prevenzione della malattia. Gli autoanticorpi, infatti, non sono necessariamente legati alla distruzione delle cellule beta e compaiono a uno stato relativamente avanzato del processo autoimmune.

Il trapianto di isole pancreatiche umane è l'unica fonte cellulare utilizzata dalle terapie cellulari per il trattamento del DT1.

Il trapianto di isole pancreatiche in riceventi affetti da DT1 consente il miglioramento del controllo glicemico, la riduzione o l'eliminazione delle iniezioni di insulina esogena per il controllo dell'iperglicemia, la prevenzione di gravi episodi di ipoglicemia e il mantenimento dei livelli di HbA1c nella norma.

Tuttavia, l'efficacia del trapianto è limitata da alcuni fattori di rischio, tra i quali la perdita di viabilità e funzionalità delle isole pancreatiche prima del trapianto, il rigetto o la perdita di funzionalità delle stesse a seguito del trapianto. Il potenziamento della viabilità delle isole pancreatiche prima di effettuare il trapianto e il miglioramento delle funzionalità a lungo termine possono migliorare l'esito clinico.

È comunque necessario trovare biomarcatori non invasivi che consentano la diagnosi precoce del DT1 e il rilevamento della distruzione di cellule beta causata da rigetto, autoimmunità o da altri fattori. Marcatori di questo tipo consentirebbero la segnalazione

tempestiva di importanti cambiamenti nella secrezione di insulina, permettendo di intervenire precocemente e di prolungare la sopravvivenza delle isole pancreatiche innestate. Potrebbero rivelarsi altrettanto efficaci biomarcatori che segnalino il rigetto, l'autoimmunità e altri processi che danneggino l'innesto delle isole pancreatiche.

Gli esosomi (EXO) sono piccole vescicole lipidiche (ca. 30-200 nm di diametro) derivanti da corpi multivescicolari, rilasciati potenzialmente da ogni tipo di cellula. Gli esosomi si sono rivelati importanti mediatori nella comunicazione tra cellule e nel trasferimento delle proteine, dei lipidi e dell'RNA (mRNA, miRNA, tRNA, ecc.). È stato inoltre dimostrato come gli esosomi siano ricchi di un sottotipo di RNA presente nelle cellule parentali.

Gli esosomi sono presenti in diversi fluidi corporei, tra i quali il siero, l'urina, il liquido cerebrospinale, la saliva e il liquido bronchiale. Il contenuto di RNA degli esosomi estratti da diverse fonti può essere sintomo di eventi biologici e processi patologici. In particolare, è stato dimostrato che il profiling dell'RNA di esosomi provenienti dal plasma o dal siero è un potenziale strumento per la diagnosi e il trattamento di diverse patologie.

Gli esosomi derivanti dal plasma, contenenti tipi specifici di RNA, potrebbero rivelarsi efficaci per la diagnosi di patologie specifiche, permettendo la prevenzione e il monitoraggio del DT1 e della distruzione delle cellule beta. Inoltre, è dimostrato come gli esosomi provenienti da fonti diverse (es. cellule staminali mesenchimali o MSC) abbiano effetti terapeutici sulle malattie autoimmuni. Questa potrebbe essere la base di una terapia "senza cellule" che ottimizzi la coltura di isole pancreatiche umane prima del trapianto e che ne permetta il potenziale prolungamento degli esiti clinici e della funzionalità.

Impatto

Il presente studio ha l'obiettivo di:

- 1) Identificare i biomarcatori che possano consentire il trattamento tempestivo del diabete fin dai primi segnali e del rigetto delle isole pancreatiche trapiantate. Di usare tali informazioni per l'identificazione delle cause scatenanti nella distruzione delle cellule produttrici di insulina.
- 2) Di sviluppare terapie "senza cellule" per migliorare la funzionalità delle isole pancreatiche e l'induzione di tolleranza.

Risultati raggiunti nel 2016

Per la prima volta abbiamo dimostrato che le tracce di miRNA rinvenute negli esosomi di derivazione plasmatica dei soggetti affetti da DT1 rappresentano un potenziale biomarcatore per la diagnosi. Grazie all'analisi completa del microarray, sono stati identificati sette miRNA che sono potenziali biomarcatori, successivamente analizzati tramite qRT-PCR. Abbiamo anche scoperto che una traccia specifica di miRNA è indicata da alcuni fattori, quali gli esosomi rilasciati dalle cellule beta di tipo MIN6, l'ipossia delle isole pancreatiche in condizioni di stress (3% O₂) e la presenza di stati infiammatori (mix di citochine con IL-1 β , 50 U/mL; IFN- γ , 1,000 U/mL; e TNF- α , 1,000 U/mL). Due sottotipi rispettivamente di 2/4 e 14/20 miRNA sono stati indicati dalla presenza di

esosomi derivanti da MIN6 in stato infiammatorio e di esosomi derivanti da isole pancreatiche umane in stato ipossico. Inoltre, le isole pancreatiche pre-incubate per 48 ore con esosomi derivanti da plasma infetto da DT1 e stimolate con 11 mM di glucosio hanno mostrato una riduzione selettiva durante la seconda fase della reazione. La seconda fase è fondamentale per la cinetica di rilascio dell'insulina. I risultati indicherebbero un'alterazione nel rilascio di insulina dovuta all'esposizione agli esosomi derivanti da plasma infetto. Questi potrebbero essere quindi coinvolti nell'insorgere o nello svilupparsi della patologia.

In ambito clinico abbiamo dimostrato come, se messe a coltura *in vitro* con cellule delle isole pancreatiche, le MSC inducano la produzione di molecole antinfiammatorie e immunomodulanti. Il miglioramento delle funzionalità delle isole pancreatiche dovuto alle MSC o alle cellule endoteliali è parzialmente mediato dagli esosomi secreti. Inoltre le MSC e gli esosomi che ne derivano mostrano un effetto contrastante con proporzione CD4+/CD25+ cellule T. Siamo stati in grado di curare gli esosomi derivanti da MSC con farmaci immunomodulanti.

Brevetti

UMIP87 "Terapie cellulari basate sul co-trapianto di cellule incapsulate in un impianto per un effetto biologico combinato intra e peri-capsula"

CDA Thermo Fisher, e ci stiamo preparando a divulgare un'invenzione per lo sviluppo di un kit innovativo che consente l'isolamento del contenuto di esosomi.

Sovvenzioni

NIH-NIDDK-HIRN-CHIB 1UC4DK104208. Progettazione del microsistema fisiomimetico di un'isola pancreatica umana.

Fondi dell'Istituto per la Ricerca sul Diabete (DRIF)

Altro

Socio Junior della Società Internazionale delle Vescicole Extracellulari (ISEV)

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

- L.B. Boccuzzi, M.G.C. Garcia-Contreras, C.R. Ricordi. Effect of inflammation on miRNA expression in pancreatic beta cells and their exosomes. Miami Winter Symposium 2017 Diabetes. 22–25 January, 2017 | Hyatt Regency Miami, USA.
- P. Buchwald, M. Garcia-Contreras, A. Tamayo-Garcia, C.L. Stabler, C. Ricordi. Effects of Inflammation, Hypoxia, and High Glucose on Isolated Pancreatic Islets and Islet Function: A Metabolomics Study. Miami Winter Symposium 2017 Diabetes. 22–25, 2017 | Hyatt Regency Miami, USA.
- M. Garcia-Contreras, S.H. Shah, R.B. Goldberg, A. Mendez, C. Ricordi. Exosome associated microRNA profiling in Type 1 Diabetes. Miami Winter Symposium 2017 Diabetes. 22–25, 2017 | Hyatt Regency Miami, USA.

- L.B. Boccuzzi, M.G.C. Garcia-Contreras, C.R. Ricordi. Effect of Inflammation on Mirna Expression in Pancreatic Beta Cells and Their Exosomes. ABRCMS. November 9 – 12, 2016. Tampa Convention Center in Tampa, FL
- M.Garcia-Contreras, S.H. Shah, R.B. Goldberg, A. Mendez, C. Ricordi Exosome associated microRNA profiling in Type 1 Diabetes – NIH –Human Islets Research Network – Annual Meeting 24-27 may 2016.
- Andras, IE, Leda, A, Garcia Contreras, M, Bertrand, L , Skowronska, M, Toborek, M. Extracellular vesicles of the blood-brain barrier: role in the HIV-1-induced amyloid beta pathology. The Society on NeuroImmune Pharmacology 22nd Scientific Conference, April 6-9, 2016.

Pubblicazioni

- Andras IE, Leda A, Contreras MG, Bertrand L, Park M, Skowronska M, Toborek M. Extracellular vesicles of the blood-brain barrier: Role in the HIV-1 associated amyloid beta pathology. *Mol Cell Neurosci*. 2016 Dec 29;79:12-22. doi: 10.1016/j.mcn.2016.12.006.
- Baidal DA, Ricordi C, Garcia-Contreras M, Sonnino A, Fabbri A. Combination high-dose omega-3 fatty acids and high-dose cholecalciferol in new onset type 1 diabetes: a potential role in preservation of beta-cell mass. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016 Jul;20(15):3313-8.
- Gomez-Meade C. A., Lopez-Mitnik G., Messiah S. E., Garcia-Contreras M., Sanchez J. Vitamin D status in children and adolescents with type 2 diabetes in a sun-rich environment. *CellR4* dec 2016; 4 (6): e2214
- Vitamin D status in children and adolescents with type 1 diabetes in a sun-rich environment. Gomez-Meade C. A., Lopez-Mitnik G. V., Messiah S. E., Garcia-Contreras M., Sanchez J. *CellR4* 2016; 4 (5): e2140

Obiettivi 2017

Scoperte scientifiche/innovazioni

- Definizione dei profili e dei livelli delle sequenze di RNA presenti negli esosomi derivanti da campioni di siero dei riceventi di trapianti di isole pancreatiche, sia nella fase immediatamente successiva al trapianto (acuta) sia nei follow-up successivi (cronica).
- Collegamento del potenziale RNA con la storia clinica e le analisi di laboratorio sulle funzionalità del trapianto, dei rigetti e dell'autoimmunità delle isole pancreatiche.
- Miglioramento dell'apporto di farmaci alle cellule beta produttrici di insulina grazie al caricamento degli esosomi.
- Co-trapianto di esosomi derivanti da isole pancreatiche e da MSC per determinare se vi è un'effettiva protezione dalla distruzione immunomediata durante il trapianto delle isole pancreatiche.

Conferenze

- Rapamycin-loaded Exosomes: A strategy to enhance drug-delivery to Insulin-producing beta-cells. Miles Brooke, Marta Garcia-Contreras, Camillo Ricordi. ISEV 2017. Toronto, Canada.
- Exosomes secreted by Insulin-secreting cells and human islets under stress conditions reveal an altered microRNA profile: Implications for Monitoring Islet transplantation. Marta Garcia-Contreras Alejandro Tamayo, Miles Brooke, Carlo Bosi, Luciarita Boccuzzi, Peter Buchwald¹, Paul D Robbins, Camillo Ricordi. ISEV 2017. Toronto, Canada.

Pubblicazioni *under review* o accettate per il 2017

- A Metabolomics Study of the Effects of Inflammation, Hypoxia, and High Glucose on Isolated Human Pancreatic Islets. Garcia-Contreras, Marta; Tamayo-Garcia, Alejandro; Pappan, Kirk; Michelotti, Gregory; Stabler, Cherie; Ricordi, Camillo; Buchwald, Peter. Manuscript ID: pr-2017-00160c. Journal of proteome Research.
- Plasma-derived exosome characterization reveals a distinct microRNA signature in long duration Type 1 diabetes. Marta Garcia-Contreras, Sanket H Shah, Paul D. Robbins, Ronald B. Goldberg, Armando J. Mendez and Camillo Ricordi. Nature Scientific Reports.
- Human Endothelial-derived exosomes for enhancement of *in vitro* human islet function. Marta Garcia-Contreras, Paul D. Robbins, Armando J. Mendez and Camillo Ricordi. Nature Scientific Reports.
- Purification of Wnt/TCF/LEF/beta-catenin activity from bone marrow-derived mesenchymal stem cell exosomes transporting Wnt3a. McBride, Jeffrey; Rogriguez-Menocal, Luis; Candanedo, Ambar; Garcia-Contreras, Marta; Badiavas, Evangelos Van. Nature Scientific Reports.
- Review: Exosomes as biomarkers and therapeutic tools for Type 1 Diabetes Mellitus. Marta Garcia-Contreras, Paul D. Robbins, and Camillo Ricordi. Journal of endocrinology.

Organoidi epatici: nuove strategie per lo sviluppo di terapie cellulari autologhe e per stabilire modelli *in vitro* di malattie epatiche

Project Leader Antonio Lo Nigro, PhD

Breve descrizione Questo progetto mira a dimostrare il potenziale degli organoidi epatici per lo sviluppo di terapie cellulari autologhe per malattie epatiche pediatriche. Inoltre si propone di utilizzare gli organoidi come modello *in vitro* per studiare infezioni da epatite virale, malattie genetiche epatiche, cancro al fegato e per screening tossicologici.

Impatto Nel contesto delle patologie epatiche, lo sviluppo di questo progetto ci consentirà di ottenere:

- 1) Terapie cellulari di tipo autologo, che possano rappresentare un'alternativa al trapianto d'organo per le malattie pediatriche di tipo genetico, associando la terapia cellulare a quella genica.

Diverse malattie ereditarie, che dipendono da mutazioni in enzimi coinvolti nel metabolismo epatico, portano a una cirrosi precoce. Queste malattie sono diverse nella loro manifestazione clinica e hanno una diversa incidenza ed età d'insorgenza.

Ad ogni modo, come per le malattie epatiche che non dipendono da mutazioni ereditarie, in molti casi il trapianto di fegato rimane l'unica speranza per la sopravvivenza a lungo termine. Generando una biobanca di campioni di pazienti con queste malattie genetiche aiuteremo lo sviluppo e la validazione preclinica di nuovi farmaci, in maniera paziente - e malattia - specifica. Inoltre, grazie alle recenti tecnologie di *editing* genomico, che permettono la correzione precisa delle mutazioni, ci proponiamo di combinare la terapia genica e quella cellulare, aprendo nuovi scenari per terapie autologhe.

- 2) Una piattaforma predittiva *in vitro* per studi di modeling di tossicologia e *drug induced liver injury* (DILI).

La DILI è la causa principale di ritiro dei farmaci dal mercato e di *acute liver failure* negli Stati Uniti. La DILI è dovuta principalmente a differenze interindividuali nel metabolismo dei farmaci, che dipendono da polimorfismi nei geni che codificano per gli enzimi di detossificazione. Per questo motivo, la possibilità di avere test predittivi attendibili *in vitro* è di primaria importanza per l'industria farmaceutica.

- 3) Una piattaforma predittiva *in vitro* come modello d'infezione da epatite virale.

Circa 500 milioni di persone al mondo sono affette da malattie epatiche croniche causate dai virus dell'epatite, che spesso risultano letali, per l'insorgenza di cirrosi o di carcinoma epatico. A oggi sono noti 7 tipi di epatite virale determinati dai virus epatici A-G. Lo sviluppo recente di vari antivirali ad azione diretta ha

portato ad un cura effettiva contro l'HCV, la cui infezione viene eradicata, nella maggior parte dei casi, nell'arco di settimane. Purtroppo questi farmaci non possono essere somministrati a tutti i pazienti affetti da HCV, a causa del costo elevato di ogni trattamento. Inoltre per altre epatiti virali, come HEV e HGV, non si hanno a disposizione trattamenti efficaci o vaccini e potrebbero beneficiare dello sviluppo di nuovi approcci immuno-terapeutici per combattere l'infezione, o eradicarla nel caso dell'HBV.

- 4) Una biobanca di tumori epatici. I tumori epatici rappresentano, a livello mondiale, la terza causa di morte dovuta al cancro. La generazione di organoidi derivati da tessuto sano e tumorale e il loro confronto potrebbe offrire un modello paziente-specifico per capire i meccanismi del cancro al fegato e della sua progressione. La loro capacità illimitata di espansione permetterebbe lo studio dettagliato delle mutazioni accumulate nel corso dello sviluppo delle metastasi, facilitando la creazione di nuovi *tool* diagnostici, ma anche la possibilità di testare e validare in maniera *high throughput* e paziente specifica, nuove molecole antivirali.

Risultati raggiunti nel 2016

Ottimizzando un protocollo già descritto, siamo riusciti ad isolare 7 linee di organoidi epatici, da fegati espianati di donatori che hanno ricevuto un trapianto d'organo. Queste linee sono state espanse per oltre un anno e, come dimostrato da analisi molecolari, hanno un profilo d'espressione genica più simile all'epitelio duttale del fegato che agli epatociti, quando coltivate in terreno di crescita. Quando differenziate in uno specifico terreno di differenziamento, perdono l'espressione dei *marker* dell'epitelio duttale acquisendo l'espressione di enzimi di detossificazione, tipici degli epatociti, oltre alle loro caratteristiche funzionali, quali la secrezione di albumina e di acidi biliari.

Un'analisi preliminare ha dimostrato che gli epatociti derivati dagli organoidi epatici esprimono i recettori necessari per l'ingresso di HCV e HBV e, in seguito all'inoculo del replicone JFH1 di HCV, supportano il ciclo vitale di questo virus (come dimostrato dalla presenza nel loro surnatante del core virale e dell'RNA di HCV sia nel surnatante che nel pellet cellulare).

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

Poster presentation: Expandable liver organoids, an *in vitro* model of hepatocyte infections by viral agents. EMBL Symposium on Organoids: Modeling organ development and disease in 3D culture, 12-15 ottobre 2016, Heidelberg

Pubblicazioni:

- PDGFR α + Cells in Embryonic Stem Cell Cultures Represent the *In Vitro* Equivalent of the Preimplantation Primitive Endoderm Precursors. Lo Nigro A*, de Jaime-Soguero A, Khoueiry R, Cho DS, Ferlazzo GM, Perini I, Abon Escalona V, Lopez Aranguren X, Chuva de Sousa Lopes SM, Koh KP, Conaldi PG, Hu WS, Zwijsen A Lluís F, Verfaillie CM. Stem Cell Reports, 2017, IF: 7,023 *Corresponding author

- PIWI-interacting RNA (piRNA) signatures in human cardiac progenitor cells. Vella S, Gallo A, Lo Nigro A, Galvagno D., Raffa GM, Pilato M, Conaldi PG. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2016; IF: 3.905

Obiettivi 2017

- 1) Ottenere il materiale biotico e l'approvazione dell'IRRB
- 2) Finire gli esperimenti necessari per fare la domanda di brevetto "Bi-potential liver precursors, their user-friendly culture method and applications"
- 3) Terminare gli esperimenti necessari per inviare l'articolo "Expandable liver organoids, an *in vitro* model of HCV-mediated infections"
- 4) Iniziare l'attività di biobancaggio dei tumori epatici e delle malattie genetiche pediatriche
- 5) Acquisire esperienza con la tecnica di editing genomico, CRISPR/Cas9
- 6) Trovare le collaborazioni necessarie per sviluppare i vari obiettivi del progetto.

Isolamento di cellule mesenchimali ed epiteliali da placenta umana a termine

Project Leader

Mariangela Pampalone, PhD

Breve descrizione

Ottimizzazione della procedura di isolamento di cellule mesenchimali ed epiteliali da membrana amniotica umana con caratterizzazione fenotipica di marcatori caratteristici e valutazione preliminare della loro capacità immunomodulante.

Impatto

I risultati preliminari mostrano che le cellule inibiscono la proliferazione di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) stimolati con CD3 e CD28, sia per contatto diretto sia attraverso l'azione dei loro mezzi condizionati.

Abbiamo ottimizzato il protocollo di estrazione cellulare al fine di migliorare la resa, la purezza e la vitalità delle cellule mesenchimali e delle cellule epiteliali.

Le cellule in coltura sono state monitorate valutando la morfologia e la loro capacità di crescere *in vitro* per l'eventuale utilizzo in diversi passaggi in coltura. Le cellule sono state analizzate tramite FACS dal primo al quarto passaggio in coltura per monitorare l'espressione dei marcatori caratteristici comunemente espressi dalle cellule mesenchimali (CD90 - CD13) ed epiteliali (CD166 - CD324). Durante le prime estrazioni le cellule presentavano una percentuale di componente del sangue inadatta ad una possibile infusione *in vivo*.

Abbiamo dimostrato che le cellule mesenchimali ed epiteliali esprimono una più alta percentuale dei loro marcatori caratteristici dopo due passaggi in coltura in concomitanza ad una minore espressione di marcatori caratteristici del sangue.

Il protocollo di estrazione è stato ottimizzato per ottenere preparazioni con <5% di CD14, CD66 HLA-DR, CD3 post isolamento per l'utilizzo delle cellule in possibili infusioni *in vivo* senza manipolazione *in vitro*.

Abbiamo preparato lotti differenti non manipolati *in vivo* adatti per l'infusione *in vivo* di mesenchimali ed epiteliali nei ratti cirrotici.

Abbiamo, inoltre, effettuato esperimenti preliminari *in vivo* per valutare la capacità immunomodulatoria di cellule mesenchimali in co-coltura con PBMC. I PBMC sono stati estratti dal sangue umano intero e, al fine di valutare la loro proliferazione, sono stati pre-marcati con l'estere succinimidico della carbossifluoresceina (CFSE).

Abbiamo contemporaneamente confrontato la capacità immunomodulatoria dei mezzi condizionati per diversi giorni con e senza esosomi e la capacità immunomodulatoria degli esosomi, isolati mediante ultracentrifugazione dopo 48 ore di *starvation*, a diverse concentrazioni.

Conferenze e pubblicazioni

Conferenze

- 7th FIRST 13 Maggio, 2016, Milano.
- SillaJen PHOCUS (HEP024) European Investigators' Meeting 19 - 21 Ottobre 2016, Roma.

Obiettivi 2017

Migliorare il test di immunomodulazione su reazioni linfocitarie miste (MLR) per valutare la capacità immunomodulatoria di MSC e AEC (o loro derivati) contro le cellule natural killer, linfociti citotossici, cellule dendritiche. Testare la secrezione di citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatori tra cui TGF β , IL10, TNF- α e INF- γ .

Valutare l'attività angiogenetica e anti fibrotica delle cellule staminali mesenchimali ed epiteliali *in vitro* per migliorare il trapianto di isole pancreatiche.

Creazione di scaffold 3D di fibrina in grado di mantenere l'architettura delle isole pancreatiche, testare la secrezione di insulina e valutare l'angiogenesi delle isole pancreatiche in co-infusione con MSC o AEC. La bioingegneria può potenzialmente fornire un sito alternativo al trapianto extra-epatico per le isole migliorando la diffusione di nutrienti e l'afflusso di sangue.