



## COMMISSIONE RICERCA E SVILUPPO

### UTILITA' ED USI FUTURI DELLE CELLULE EPITELIALI RESPIRATORIE UMANE PRIMARIE NELLA RICERCA IN FIBROSI CISTICA

L'uso di modelli animali e di linee cellulari immortalizzate hanno contribuito significativamente alla comprensione di molti meccanismi cellulari implicati nella fisiopatologia della fibrosi cistica. Tuttavia la mancanza di modelli animali che possano riprodurre fedelmente il fenotipo della fibrosi cistica umana ha rallentato lo sviluppo di nuove terapie geniche o farmacologiche. L'opportunità di lavorare con cellule bronchiolari umane al momento è molto rara e in quanto solo il 10% di polmoni espianatati da pazienti FC viene utilizzata in Europa. Fino ad ora in Europa solo pochi gruppi di ricerca fra cui quello del dr. Galiotta dell'Ospedale Gaslini di Genova e il gruppo di Ward and Lordan dell'Istituto di Medicina Cellulare dell'Università di Newcastle hanno messo a punto metodiche utili all'ottenimento di colture primarie derivanti da lobectomia di soggetti non FC o da polmoni espianati da soggetti FC. Le cellule isolate da sezioni di bronchi, dopo trattamenti prolungati con agenti mucolitici e antimicrobici, vengono messe in coltura e seminate su filtri permeabili in modo da ottenere monolayers polarizzati utilizzabili sia 1) per misure di efflusso di cloro e/o trasporto di sodio mediante misure elettrofisiologiche e spettrofluorimetriche; 2) per analisi morfologiche mediante microscopia confocale; 3) per analisi biochimiche di caratterizzazioni proteiche ed enzimatiche; 4) per esperimenti di correzione farmacologica delle mutazioni del gene CFTR, nonché per il trasferimento del gene CFTR mediante vettori di terapia genica.

La mancanza di un centro qualificato che possa stabilire dei saldi contatti con i centri in cui si effettuano i trapianti polmonari e che possa non solo "fornire" colture primarie di cellule FC a laboratori di ricerca italiani, ma anche costituire una bio-banca di cellule bronchiolari di pazienti FC italiani catalogati e caratterizzati geneticamente, crediamo che possa essere estremamente utile allo sviluppo della ricerca sulla fibrosi cistica in Italia.

A tal fine, la SIFC, in occasione del V Meeting Nazionale svoltosi a Gubbio dal 2 al 4 Aprile 2009, ha organizzato un workshop in cui ricercatori operanti nella fibrosi cistica in Italia hanno esposto alcune linee della loro attività in modo da poter sensibilizzare i centri trapiantologici che vorranno adire ad una progettualità comune. Di seguito sono riportati i riassunti di due interventi.

**4 Aprile 2009**  
**Programma**

Moderatori

Valeria Casavola (Università degli Studi di Bari)

Mario Romano (Università degli Studi di Chieti)

Ore 14,30 - 15,00: **Terapia genica e cellulare**

Massimo Conese (Dipartimento di Scienze Biomediche,  
Università degli Studi di Foggia)

Ore 15,00-15,15 *Discussione*

Ore 15,15 -16,45 **Correttori e potenziatori della CFTR**

Luis V.J. Galletta (Laboratorio di Genetica Molecolare,  
Istituto G. Gaslini, Genova)

Ore 16,45-17,00 *Discussione*

Ore 17,00 -17,30 **Nuovi approcci anti-infiammatori della malattia polmonare**

Giulio Cabrini (Laboratorio di Patologia Molecolare,  
Azienda Ospedaliera di Verona e Università di Verona)

Ore 16,45-17,00 *Discussione*

## **IMPORTANZA DELLE COLTURE PRIMARIE DI CELLULE EPITELIALI PER GLI STUDI DI PATOGENESI E TERAPIA DELLA FIBROSI CISTICA**

L. V. J. Galletta  
Laboratorio di Genetica Molecolare  
Istituto Giannina Gaslini  
Genova

Le colture primarie di cellule epiteliali delle vie aeree rappresentano un modello molto importante per gli studi sul meccanismo patogenetico della malattia polmonare nella fibrosi cistica (FC) e per la valutazione in vitro di terapie sperimentali. Esistono diversi tipi di linee cellulari derivate dall'epitelio bronchiale o tracheale umano (1-3). Queste cellule possono essere coltivate abbastanza facilmente su vasta scala rendendo possibili diversi tipi di esperimenti biochimici e funzionali. Tuttavia nessuna di queste linee cellulari riproduce in maniera completa tutte le caratteristiche dell'epitelio nativo. In molti casi le linee cellulari perdono la capacità di formare giunzioni serrate e quindi di polarizzare sviluppando una membrana apicale e una membrana basolaterale. Inoltre, il processo di immortalizzazione che viene utilizzato per generare la linea cellulare spesso determina la perdita di espressione del gene CFTR e di altre proteine importanti come il canale del sodio epiteliale ENaC.

I ricercatori che studiano la FC avvertono quindi l'esigenza di sviluppare e utilizzare colture primarie di epitelio delle vie aeree quale modello essenziale per confermare la rilevanza dei propri studi. Ad esempio, lo sviluppo di farmaci sperimentali per la terapia del difetto di base (correttori, potenziatori, attivatori di canali ionici alternativi), in genere effettuato inizialmente su linee cellulari, richiede una conferma finale su cellule primarie (4-6). Anche interventi finalizzati alla terapia genica devono superare la prova importante di efficacia su colture primarie polarizzate, che sono particolarmente refrattarie rispetto alle linee cellulari di uso comune.

Le colture primarie costituiscono un modello poco accessibile per molti ricercatori sia per la difficoltà di esecuzione delle colture sia per la scarsa disponibilità del materiale di partenza (polipi nasali o bronchi di pazienti FC e di soggetti di controllo). Una soluzione è stata la messa a punto di metodi per espandere il numero di cellule di partenza. L'uso di terreni di coltura privi di siero ma ricchi di ormoni e altri supplementi permette una forte proliferazione delle cellule e la creazione di uno stock che può essere congelato in diverse aliquote per una conservazione che può durare anche diversi anni (6-8). Al momento richiesto le cellule contenute in una singola

aliquota possono essere scongelate per una successiva fase di espansione che allarga ulteriormente la coltura. Il risultato finale è la produzione di diverse decine di milioni di cellule a partire da un piccolo numero di cellule iniziale. Alla fine della coltura in terreno privo di siero, le cellule vengono normalmente seminate su membrane porose (inserti Transwell o Snapwell) dove il trattamento con un terreno di coltura diverso dal primo arresta la proliferazione e favorisce la formazione di un epitelio polarizzato con alta resistenza elettrica. Dopo alcuni giorni dalla semina su membrane porose, il differenziamento favorisce la comparsa, nella membrana apicale, della proteina CFTR, del canale ENaC, delle ciglia e di altri marcatori tipici di una cellula epiteliale differenziata. Gli epiteli così generati possono essere utilizzati per diversi tipi di esperimenti: misure del trasporto transepiteliale di ioni in camera di Ussing; immunofluorescenza per la localizzazione di CFTR e di altre proteine; valutazione dell'attività antibatterica e di sistemi di difesa innata nel fluido periciliare; trasporto mucociliare; valutazione dell'espressione genica mediante RT-PCR e microarray.

La disponibilità di un numero maggiore di polmoni da pazienti FC, ottenuti dopo espianto in seguito a trapianto, accoppiata a tecniche di coltura ottimizzate, potrebbe soddisfare l'esigenza crescente di cellule epiteliali di alta qualità per diversi tipi di studio. Tuttavia, gran parte dei polmoni espianati non viene adeguatamente utilizzato. E' auspicabile un maggiore coordinamento tra laboratori e centri trapianti per un migliore utilizzo di una risorsa estremamente preziosa.

1) Cozens et al. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 10: 38-47, 1994

2) Kunzelmann et al. An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the deltaF508 CFTR mutation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8: 522-529, 1993

3) Flotte et al. Gene expression from adeno-associated virus vectors in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7: 349-356, 1992

4) Pedemonte et al. Small-molecule correctors of defective deltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J. Clin. Invest.* 115: 2564-2571, 2005

5) Pedemonte et al. Antihypertensive 1,4-dihydropyridines as correctors of the cystic fibrosis transmembrane conductance

regulator channel gating defect caused by cystic fibrosis mutations. *Mol. Pharmacol.* 68: 1736-1746, 2005

6) Van Goor et al. Rescue of deltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am. J. Physiol.* 290: L1117-L1130, 2006

7) Galiotta et al. An improved method to obtain highly differentiated monolayers of human bronchial epithelial cells. *In Vitro* 34: 478-481, 1998

8) Galiotta et al. An electrogenic amino acid transporter in the apical membrane of cultured human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 275: L917-L923, 1998

## **UTILIZZO DELLE COLTURE PRIMARIE DI CELLULE RESPIRATORIE EPITELIALI NELLA TERAPIA GENICA E CELLULARE**

Massimo Conese  
Dipartimento di Scienze Biomediche  
Università degli Studi di Foggia  
Foggia

Nella fibrosi cistica (FC), l'epitelio delle vie aeree rappresenta il bersaglio primario della terapia genica. Sebbene di facile accessibilità, la varietà dei tipi cellulari e la complessa topografia dell'espressione della CFTR ne fanno un target complesso. Fin dal clonaggio del gene CFTR nel 1989, studi pre-clinici in modelli murini FC hanno rivelato che vettori di trasferimento genico sia virali (adenovirus) che non virali (liposomi cationici) sono capaci di mediare l'espressione di una proteina CFTR "wild type" umana e di correggere il difetto funzionale di base. Da allora, sono stati condotti 25 trial clinici documentati di terapia genica (fase I e II) che hanno coinvolto più di 420 pazienti con FC, i quali hanno dimostrato la possibilità di trasferire il gene CFTR nell'epitelio respiratorio ma con bassa efficienza che correlava con un recupero di basso livello del difetto elettrofisiologico di base. Ad oggi, pertanto, la terapia genica della FC non si è tradotta in un intervento clinico efficace, indipendentemente dall'uso di vettori virali o non virali.

Uno dei motivi alla base di questo insuccesso risiede nella scarsa predittività dei modelli murini. Difatti, il topo presenta una anatomia ed una funzionalità a livello di canali ionici diversa da quella umana. Inoltre, nei modelli murini FC la mancanza di una proteina CFTR funzionale non determina le medesime conseguenze fisiopatologiche riscontrabili nella patologia umana. Ad esempio, la malattia respiratoria dei pazienti con FC è caratterizzata dalla produzione di muco ispessito e disidratato, mentre questo non avviene nel topo FC. Noi ed altri abbiamo dimostrato che il muco ottenuto da pazienti FC rappresenta una barriera al trasferimento genico nelle cellule respiratorie mediato sia da adenovirus che da vettori non virali.<sup>1, 2</sup>

Le colture di cellule epiteliali respiratorie primarie ottenute da bronchi umani riproducono in vitro la complessità dell'epitelio respiratorio in vivo ed hanno permesso di identificare altre barriere extra-cellulari al trasferimento genico, sottostimate nei modelli murini: la presenza del glicocalice e la mancanza di recettori per i vettori di trasferimento genico sul versante apicale delle cellule epiteliali.<sup>3, 4</sup> Noi abbiamo recentemente dimostrato che un vettore non virale di trasferimento genico è capace di essere efficiente nelle

vie aeree murine tanto quanto in colture primarie di cellule epiteliali respiratorie umane ottenute da lobectomie o da polipi nasali.<sup>5</sup>

Questi risultati indicano che le colture primarie di cellule epiteliali respiratorie umane possano rappresentare un buon modello pre-clinico utile tanto quanto i modelli murini. Anzi, in tali colture è possibile modellare la malattia respiratoria umana: 1) identificando il tipo cellulare responsabile della correzione elettrofisiologica, visto che le colture primarie presentano una differenziazione in tipi cellulari che ricapitola quella presente in vivo; 2) stratificando il muco sulla superficie apicale delle cellule; 3) analizzando il trasferimento genico in condizioni di microanaerobiosi, condizione caratteristica delle prime fasi della malattia respiratoria FC.<sup>6</sup>

La terapia con cellule staminali è stata considerata come una valida alternativa alla terapia genica, in quanto le cellule staminali potrebbero rimpiazzare le cellule epiteliali respiratorie danneggiate e quindi correggere sia il difetto di base che il danno tessutale a livello polmonare. Le cellule staminali adulte ottenute da midollo osseo (sia ematopoietiche che mesenchimali stromali) possiedono una plasticità prima insospettata, per cui possono "trasformarsi" in cellule epiteliali respiratorie. Ciò è stato elegantemente dimostrato co-coltivando cellule mesenchimali stromali con cellule epiteliali respiratorie primarie. In questo studio, inoltre, si dimostra che le cellule staminali FC ingegnerizzate ex-vivo con un virus che esprime la CFTR "wild type" erano capaci di correggere parzialmente il difetto elettrofisiologico di un epitelio respiratorio primario FC.<sup>7</sup> Gli esperimenti condotti fin ora in modelli murini in seguito a somministrazione endovenosa di cellule hanno dimostrato che solo <1% di cellule staminali midollari diventano epiteliali e quindi prive della possibilità di avere un effetto terapeutico.<sup>8</sup> Noi abbiamo recentemente confermato la bassa efficienza di trasformazione delle cellule staminali midollari in un modello murino di infezione con *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>9</sup> Questi dati confermano, come nella terapia genica, una discrepanza tra risultati ottenuti in colture primarie di epitelio respiratorio umano e modelli murini. La validazione di altre fonti di cellule staminali (da cordone ombelicale o da annessi fetali) dovrà quindi prima passare attraverso l'uso di colture primarie umane.

1. Kitson C, Angel B, Judd D, Rothery S, Severs NJ, Dewar A, et al. The extra- and intracellular barriers to lipid and adenovirus-mediated pulmonary gene transfer in native sheep airway epithelium. *Gene Ther* 1999; 6:534-46.
2. Carrabino S, Di Gioia S, Copreni E, Conese M. Serum albumin enhances polyethylenimine-mediated gene delivery to human respiratory epithelial cells. *J Gene Med* 2005; 7:1555-64.
3. Pilewski JM. Gene therapy for airway diseases: continued progress toward identifying and overcoming barriers to efficiency. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002; 27:117-21.

4. Pickles RJ. Physical and biological barriers to viral vector-mediated delivery of genes to the airway epithelium. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 302-8.
5. Di Gioia S, Rejman J, Carrabino S, De Fino I, Rudolph C, Doherty A, et al. Role of biophysical parameters on ex vivo and in vivo gene transfer to the airway epithelium by polyethylenimine/albumin complexes. *Biomacromolecules* 2008; 9:859-66.
6. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* 2002; 109:317-25.
7. Wang G, Bunnell BA, Painter RG, Quiniones BC, Tom S, Lanson NAJ, et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:186-91.
8. Piro D, Rejman J, Conese M. Stem cell therapy for cystic fibrosis: current status and future prospects. *Exp Rev Resp Med* 2008; 2:365-80.
9. Rejman J, Colombo C, Conese M. Engraftment of Bone Marrow-Derived Stem Cells to the Lung in a Model of Acute Respiratory Infection by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Mol Ther* 2009; May 5. [Epub ahead of print].