



Ministero dell'Università e della Ricerca
Decreto del Direttore Generale n. 2003 del 30.12.2021 - Allegato Utente 1 (A01)
Direzione Generale per il Coordinamento, la Promozione e la Valorizzazione della Ricerca - Ufficio V

Rendiconto di spesa Fondi 5 per mille ANNO 2018
Enti della Ricerca Scientifica

Contributo percepito € 52.020,29

In data 03.12.2020

Denominazione Ente: **FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA OSPEDALE MAGGIORE
POLICLINICO**

Codice fiscale: **04724150968**

Sede legale: **Via Francesco Sforza 28 - 20122 MILANO**

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: **protocollo@policlinico.mi.it**

Dati del rappresentante legale: **Dott. Ezio Belleri ***

**TITOLO DEL PROGETTO: IDENTIFICAZIONE DI GENI DIFFERENZIALMENTE ESPRESSI IN CELLULE
STAMINALI MUSCOLARI E LORO RUOLO NELLA PROGRESSIONE DELLA DISTROFIA MUSCOLARE
DI DUCHENNE**

Data di inizio progetto: 1.9.2021

Data di fine progetto: 31.8.2023

**Fondi 5 per mille assegnati
al progetto:**
€ 52.020,29

Di cui:
**Quota sostenuta entro l'anno di
rendicontazione: € 0**
**Quota accantonata, da sostenere
per progetti pluriennali (durata
massima tre anni): € 52.020,29**

VOCI DI SPESA	Quota sostenuta entro l'anno di rendicontazione	Quota accantonata, da sostenere, per progetti pluriennali (durata massima tre anni)
Personale di ricerca (borsista)		
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)		€ 47.020,29
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)		

Elaborazione dati		€ 5.000,00
Spese amministrative		
Altro (indicare quali)		
TOTALE		€ 52.020,29

Milano, 29.6.2021

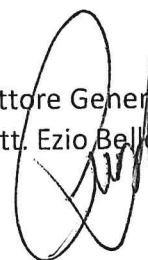
Il Responsabile del Progetto

Dott. Andrea Farini



Il Direttore Generale *

Dott. Ezio Belleri



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Direttore Generale*

Dott. Ezio Belleri



* (per conto del Legale Rappresentante Arch. Marco Giachetti - Deliberazione Consiliare n. 21 del 30.4.2019)

Titolo	Identificazione di geni differenzialmente espressi in cellule staminali muscolari e loro ruolo nella progressione della distrofia muscolare di Duchenne
Background e Razionale	L'integrità e la riparazione dei tessuti dipendono da una popolazione di cellule staminali presenti nei tessuti stessi che sono in grado di auto-rinnovarsi e di differenziare in una vasta gamma di cellule più specializzate in maniera rapida e costante. Ed è su questa alta prolificità e capacità trasformistica che i ricercatori e i clinici si sono focalizzati per creare una metodologia che sostituisse le cellule e ricreasse i tessuti malati o danneggiati. Il trattamento con le cellule staminali ampiamente utilizzato in ambito clinico è il trapianto di cellule staminali del sangue, per trattare malattie e condizioni patologiche del sangue e del sistema immunitario o per rigenerare il sistema ematopoietico dopo specifici trattamenti anti-tumorali. Negli ultimi 30/40 anni, le cellule staminali della pelle sono state poi utilizzate in maniera diffusa per curare i pazienti con grandi ustioni. L'incredibile sviluppo tecnologico e scientifico degli ultimi decenni ha permesso di aumentare a dismisura la conoscenza della biologia delle cellule staminali e – per questo – di sviluppare tecnologie che ne consentissero il loro mantenimento/manipolazione in coltura e la loro applicazione clinica. All'inizio degli anni 2000, sull'onda di questi promettenti risultati ottenuti <i>in vitro</i> ed sui successi ottenuti sui modelli animali di svariate patologie, le cellule staminali sono state oggetto di numerosi studi per cercare di applicarle nell'ambito terapeutico. Sfortunatamente, la solida ricerca di base e un'attenta ricerca pre-clinica non sono riuscite ad ottenere i risultati sperati in diversi clinical trials, eccezion fatta per le patologie a carico dell'epidermide e della cornea e per alcune malattie del sistema ematopoietico. Le motivazioni sono da ricercare nella costante rigenerazione di questi tessuti e nella loro particolare conformazione ma – in primo luogo – nel fatto che per queste patologie sia possibile ottenere l'ablazione della maggior parte del tessuto patologico. In seguito a questo processo, il trapianto delle cellule donatrici avviene con una percentuale di successo elevatissima (dall'80% al 100%) tali da riuscire a sostituire (quasi) interamente le cellule residenti patologiche. Per fare un paragone nell'ambito delle distrofie muscolari, il trapianto intra-arterioso di cellule staminali (mesangioblasti o MABs) nei muscoli di pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne (DMD) risulta efficace in una percentuale così bassa (0,7%) che, malgrado la distrofina espressa dalle cellule donatrici sia stata individuata, non sia evidente alcun tipo di effetto clinico benevolo ¹. La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una patologia genetica recessiva legata al cromosoma X. Colpisce 1 su 5000 individui di sesso maschile ed è causata da mutazioni che interessano il gene codificante per la distrofina ². L'insorgere della patologia è caratterizzato da un'intensa attività rigenerativa volta alla sostituzione delle fibre danneggiate. Queste attività sono svolte dalle cellule satelliti del muscolo che esprimono il fattore di trascrizione <i>Pax7</i> e che si localizzano al di sotto della lamina basale del muscolo scheletrico. Si alternano poi continui cicli di degenerazione e rigenerazione non funzionale, che causano una rapida diminuzione del "pool" di cellule satellite ed un'inarrestabile deposizione di tessuto connettivo insieme alla comparsa di infiltrati adiposi. Il tessuto muscolare risulta così essere irrimediabilmente danneggiato tanto che i pazienti DMD vanno incontro ad una morte prematura attorno ai 30 anni per insufficienza

cardio-respiratoria ³.

Il lavoro pionieristico di Partridge utilizzando il modello murino della DMD (il topo mdx) ha confermato l'efficacia dell'iniezione dei mioblasti nel colonizzare il muscolo striato e nel migliorarne la funzionalità. In seguito a questo lavoro, altre ricerche sono state portate avanti nei topi mdx per perfezionare il trapianto allogenico di mioblasti ^{4,5} e, di conseguenza, sono stati organizzati dei clinical trials con pazienti DMD e affetti da distrofia muscolare di Becker ⁶⁻⁸. L'obiettivo del trattamento era ottenere la fusione dei mioblasti del donatore (esprimenti la distrofina) con le fibre distrofina-deficienti dell'ospite, creando un'interazione favorevole all'induzione dell'espressione della distrofina. Nonostante alcuni risultati promettenti, il trasferimento di mioblasti ha mostrato alcuni problemi associati alla limitata capacità migratoria e all'induzione di una forte reazione infiammatoria da parte delle stese cellule. Infatti la distribuzione e la fusione delle cellule del donatore sono processi che spesso avvengono con bassa efficienza, molti mioblasti muoiono subito dopo il trapianto e non sopravvivono più di due settimane senza un massiccio trattamento immunosoppressivo oppure inducono una risposta immunitaria nel tessuto trattato ⁹. Inoltre la bassa efficienza del trasferimento cellulare (sotto il 10% di fibre distrofina-positive) è insufficiente per ottenere un aumento della forza muscolare ^{4,10,11}. Allo stesso tempo però questi primi studi sulla DMD hanno alimentato con successo la discussione scientifica e diversi punti focali sono stati sollevati ed investigati nel dettaglio per migliorare l'efficienza del trapianto cellulare. In particolare, sono stati analizzati i vantaggi (e gli svantaggi) del intra-muscolare rispetto a quello sistemico; sono stati paragonati il trapianto cellulare eterologo rispetto a quello autologo ed è emersa la necessità di correggere le cellule prima del trapianto. Infine, è stato evidenziato che è di fondamentale importanza conoscere lo stato del muscolo da trapiantare dal punto di vista isto-patologico ed è stata ribadita la necessità di anticipare l'intervento clinico, prima che l'infiammazione e la fibrosi si sviluppino in maniera tale da rendere il muscolo ricevente troppo danneggiato. Per cercare di rispondere almeno in parte a queste domande fondamentali, numerose ricerche si sono concentrate sulla ricerca di cellule staminali che avessero delle buone capacità rigenerative e miogeniche e fossero facili da isolare. Alcune di queste (come i MABs e le cellule CD133+), sono state testate in studi pre-clinici sui modelli animali e, seppur limitatamente, in trial clinici su pazienti DMD. A questo proposito, nel nostro laboratorio, abbiamo ottenuto risultati promettenti utilizzando le cellule circolanti esprimenti l'antigene CD133+: queste cellule infatti possono essere espanse *in vitro* mantenendo le proprie caratteristiche miogeniche, sono in grado di migrare nel torrente circolatorio per raggiungere tutti i muscoli danneggiati del corpo e contribuiscono alla formazione del "pool" di cellule satelliti ^{12,13}. Inoltre abbiamo dimostrato come possano essere manipolate geneticamente *in vitro* mediante la metodica di exon-skipping, essendo per questo utilizzabili per trapianti di tipo autologo ¹⁴. Per tutti questi motivi, uno studio pre-clinico in modelli canini di DMD (i cani GRMD) ha poi dimostrato come il trapianto autologo di cellule CD133+ determini un miglioramento del fenotipo distrofico a lungo termine, fornendo dati importanti sulla reazione immunitaria del soggetto ricevente nei confronti della distrofina skippata prodotta in seguito all'infusione cellulare ¹⁵.

Come descritto in precedenza, la capacità rigenerativa del muscolo è

dovuta alla presenza delle cellule satelliti. In seguito alla loro attivazione, queste cellule proliferano e differenziano fino a costituire le nuove miofibre, mantenendo al contempo un altro "pool" di cellule indifferenziate con le medesime straordinarie capacità. La progressione da uno stato quiescente a quello attivato è regolata in maniera molto complessa dai segnali intrinseci delle stesse satelliti, dai segnali estrinseci che derivano dal microambiente in cui le satelliti operano e dall'azione di altre cellule che sono in relazione con loro, quali i progenitori fibro-adipogenici (FAPs)¹⁶, i macrofagi¹⁷ e le cellule endoteliali¹⁸. Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato come - oltre alle cellule satelliti - altre cellule staminali residenti nel muscolo concorrono alla rigenerazione muscolare, quali i MABs, i periciti e i progenitori muscolari TWIST2+ (Tw2+). I MABs sono dei progenitori cellulari identificati per la prima volta nell'aorta dorsale degli embrioni in fase di sviluppo e sono stati descritti anche nel muscolo scheletrico post-natale in associazione ai vasi¹⁹. I MABs hanno delle caratteristiche *in vitro* simili a quelle dei periciti adulti e sono capaci di differenziare in diverse popolazioni cellulari tra le quali le cellule del muscolo scheletrico e cardiaco; osso e cartilagine²⁰. I MABs isolati dal muscolo scheletrico umano sono definiti in base all'espressione dei marker pericitici quali proteoglicano (NG2) e fosfatasi alcalina (ALP) mentre non esprimono alcun marcatore endoteliale: la loro capacità di differenziazione è limitata al muscolo liscio e scheletrico, sia *in vitro* sia *in vivo*²¹. Inoltre possono essere manipolati geneticamente con efficacia *in vitro* e, in conseguenza al trapianto in modelli mdx e GRMD, sono in grado di raggiungere il muscolo contribuendo alla sua rigenerazione^{22,23} e, in parte, alla ricostituzione del "pool" di cellule satellite indifferenziate²⁴. Infine, è stato dimostrato come MABs umani possano partecipare ad un'azione immuno-modulatoria secernendo indoleamina 2,3-di-ossigenasi (IDO) e prostaglandina E-2 (PGE) sopprimendo così la proliferazione dei linfociti T²⁵. Malgrado questi robusti dati preliminari facessero sperare per il meglio, un open-label clinical trial non-randomizzato di fase I-IIa in cui 5 pazienti Duchenne sono stati trapiantati sistemicamente con MABs di donatori ha dimostrato uno scarso miglioramento della forza muscolare pur dimostrandosi una procedura sicura e ben tollerata dai pazienti¹. Così come avvenuto per le CD133+, anche per il trapianto di MABs l'efficacia del trapianto si è dimostrata quasi nulla: il più grande problema è stato identificato nel background infiammatorio tipico della DMD che limita le capacità proliferative e differenziative delle cellule. Infatti, sebbene il difetto primario riscontrato nei pazienti DMD risieda nell'alterata struttura muscolare dovuta alla mancanza della distrofina, questa comporta una moltitudine di problemi secondari quali appunto l'infiammazione ed ulteriori difetti a carico del metabolismo e dell'autofagia.

L'iniziale risposta del sistema immunitario al danno muscolare nei DMD è di tipo innato in quanto sottopopolazioni cellulari con azioni fagocitica e citolitica come macrofagi e neutrofili oltre a cellule infiammatorie sono rapidamente mobilitate e attivate per identificare ed eliminare gli organismi e/o i detriti cellulari che si sono formati in seguito alla distruzione dell'omeostasi nei tessuti muscolari. Questa situazione comporta quindi la riparazione delle fibre muscolari e, al tempo stesso, permette l'attivazione delle cellule che presentano l'antigene (APC) le quali - a loro volta - sono riconosciute attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità dalle cellule effettrici come i linfociti T-CD4+ e T-CD8+. A questo punto, i linfociti

T scatenano la secrezione di numerose citochine e chemochine infiammatorie, che favoriscono il reclutamento di altre cellule infiammatorie e causano la necrosi delle fibre muscolari ed il peggioramento del fenotipo patologico.

A dispetto di altri tessuti in cui è evidente il vantaggio di avere delle cellule staminali che sono attive per tutta la vita e che continuano costantemente nel "self-renewing", è stato dimostrato che il tessuto muscolare si rinnova solo poche volte in condizioni fisiologiche ed è questo il principale motivo per cui la capacità rigenerativa delle cellule staminali progenitrici in questo tessuto sia di molto inferiore rispetto a quelle del sistema ematopoietico.

- 1 Cossu, G. *et al.* Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO molecular medicine* **7**, 1513-1528, doi:10.15252/emmm.201505636 (2015).
- 2 Nowak, K. J. & Davies, K. E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO reports* **5**, 872-876 (2004).
- 3 Wallace, G. Q. & McNally, E. M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annual review of physiology* **71**, 37-57, doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163216 (2009).
- 4 Karpati, G. *et al.* Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of neurology* **34**, 8-17, doi:10.1002/ana.410340105 (1993).
- 5 Tremblay, J. P. *et al.* Myoblast transplantation between monozygotic twin girl carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders : NMD* **3**, 583-592 (1993).
- 6 Gussoni, E., Blau, H. M. & Kunkel, L. M. The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nature medicine* **3**, 970-977 (1997).
- 7 Miller, R. G. *et al.* Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle & nerve* **20**, 469-478 (1997).
- 8 Neumeyer, A. M. *et al.* Pilot study of myoblast transfer in the treatment of Becker muscular dystrophy. *Neurology* **51**, 589-592 (1998).
- 9 Bushby, K. *et al.* Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle & nerve* **50**, 477-487, doi:10.1002/mus.24332 (2014).
- 10 Gussoni, E. *et al.* Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* **356**, 435-438 (1992).
- 11 Mendell, J. R. *et al.* Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *The New England journal of medicine* **333**, 832-838 (1995).
- 12 Negroni, E. *et al.* In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **17**, 1771-1778 (2009).
- 13 Torrente, Y. *et al.* Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation* **114**, 182-195 (2004).
- 14 Benchaouir, R. *et al.* Restoration of human dystrophin following

	transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. <i>Cell Stem Cell</i> 1, 646-657 (2007). 15 Sitzia, C. <i>et al.</i> Adaptive Immune Response Impairs the Efficacy of Autologous Transplantation of Engineered Stem Cells in Dystrophic Dogs. <i>Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy</i>, doi:10.1038/mt.2016.163 (2016). 16 Uezumi, A. <i>et al.</i> Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. <i>J Cell Sci</i> 124, 3654-3664, doi:10.1242/jcs.086629 (2011). 17 Arnold, L. <i>et al.</i> Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. <i>The Journal of experimental medicine</i> 204, 1057-1069 (2007). 18 Latroche, C. <i>et al.</i> Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages. <i>Stem cell reports</i> 9, 2018-2033, doi:10.1016/j.stemcr.2017.10.027 (2017). 19 Minasi, M. G. <i>et al.</i> The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. <i>Development</i> 129, 2773-2783 (2002). 20 Dellavalle, A. <i>et al.</i> Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. <i>Nature cell biology</i> 9, 255-267 (2007). 21 Dellavalle, A. <i>et al.</i> Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. <i>Nature communications</i> 2, 499 (2011). 22 Sampaolesi, M. <i>et al.</i> Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. <i>Nature</i> 444, 574-579 (2006). 23 Sampaolesi, M. <i>et al.</i> Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. <i>Science</i> 301, 487-492 (2003). 24 Sambasivan, R. & Tajbakhsh, S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. <i>Semin Cell Dev Biol</i> 18, 870-882 (2007). 25 English, K., Tonlorenzi, R., Cossu, G. & Wood, K. J. Mesoangioblasts suppress T cell proliferation through IDO and PGE-2-dependent pathways. <i>Stem cells and development</i> 22, 512-523, doi:10.1089/scd.2012.0386 (2013).
Descrizione	Ancora al giorno d'oggi il motivo del fallimento della rigenerazione muscolare nel paziente DMD rimane un argomento molto discusso. Lavori pubblicati recentemente hanno utilizzato la tecnica del single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) per analizzare nel dettaglio le sottopopolazioni cellulari che sono presenti nel muscolo in condizioni fisiologiche²⁶⁻²⁸ ma c'è ancora molto lavoro da fare per determinare quale/quali siano le cellule staminali che determinano il fenotipo patologico della DMD. Nel nostro laboratorio abbiamo isolato delle cellule staminali CD133+ isolate da biopsie muscolari di DMD (hMuSCs¹³³⁺) e le abbiamo studiate mediante la tecnica di scRNA-seq. In base all'analisi del loro trascrittoma, abbiamo quindi determinato come l'espressione di <i>desmina</i> e di <i>fibronectina</i> diminuisca con la progressione della patologia mentre l'over-espressione di <i>PDGFRB</i>, <i>PDGFA</i> e <i>PDGFRA</i> suggerisce la migrazione delle cellule staminali interstiziali nei pazienti DMD. Inoltre abbiamo dimostrato come la progressione della malattia influisca sull'espressione dell'isoforme del collagene presenti nella matrice extra-cellulare, su marcatori tipici delle

	cellule mesenchimali (<i>NT5E</i>, <i>THY1</i>, <i>ITGB1</i>, <i>CD44</i>, <i>ENG</i>) e di quelli associati ai pathway dipendenti da TGF-β e NOGGIN/ACTIVIN. Abbiamo quindi dimostrato che le cellule hMuSCs¹³³⁺ isolate dai pazienti distrofici assumono una precisa identità fibrotica, suggerendone un ruolo nel determinare la patologia. Insieme allo studio della trascrittomica cellulare, ulteriori sforzi del mondo scientifico sono concentrati nel determinare il ruolo del sistema immunitario – nelle sue componenti innata ed adattiva – nel regolare i processi infiammatori e la differenziazione dei progenitori muscolari in fibre mature. La delucidazione di questi processi permetterà allora di scoprire nuovi bersagli terapeutici. In base a queste premesse, gli obiettivi del nostro progetto sono i seguenti: - Isolamento delle cellule mononucleate e dei MABs da biopsie muscolari di paziente sano e paziente DMD. Le cellule mononucleate saranno poi caratterizzate mediante FACS per identificare con precisione le varie sottopopolazioni cellulari di origine muscolare (come le cellule satellite) e quelle di origine immunitaria (linfociti T e linfociti B; macrofagi; cellule T regolatorie) - Caratterizzazione mediante RNA-sequencing delle cellule isolate dalle biopsie muscolari di paziente sano e paziente DMD. 26 Dell'Orso, S. <i>et al.</i> Single cell analysis of adult mouse skeletal muscle stem cells in homeostatic and regenerative conditions. <i>Development</i> 146, doi:10.1242/dev.174177 (2019). 27 Giordani, L. <i>et al.</i> High-Dimensional Single-Cell Cartography Reveals Novel Skeletal Muscle-Resident Cell Populations. <i>Molecular cell</i> 74, 609-621 e606, doi:10.1016/j.molcel.2019.02.026 (2019). 28 Xi, H. <i>et al.</i> A Human Skeletal Muscle Atlas Identifies the Trajectories of Stem and Progenitor Cells across Development and from Human Pluripotent Stem Cells. <i>Cell Stem Cell</i> 27, 158-176 e110, doi:10.1016/j.stem.2020.04.017 (2020).
Parole Chiave	Distrofia muscolare di Duchenne; biopsie muscolari; mesangioblasti; sistema immunitario; RNA-sequencing
Attività previste	Isolamento delle cellule mononucleate del muscolo. Le biopsie muscolari saranno ottenute da individui sani e da pazienti distrofici (almeno n=3 per gruppo) della stessa età/di età paragonabile dopo che avranno preso visione e firmato (o sarà firmato dai genitori nel caso di pazienti minorenni) il documento del Consenso Informato. Il tutto avverrà secondo le linee guida del Comitato Etico del Policlinico di Milano che regola l'utilizzo di tessuti umani per la ricerca. I pazienti DMD saranno preferibilmente scelti in base alla presenza di una mutazione comune, la delezione nella regione "hot-spot" $\Delta 45-55$ nel gene della distrofina. Ogni biopsia (il cui peso sarà circa di 200 milligrammi) verrà posta in PBS 1X raffreddato in ghiaccio e qui sminuzzata; il campione così ottenuto verrà incubato nella soluzione di digestione (1 microlitro di collagenasi 5U e 1 microlitro di dispasi II) a 37°C fino ad ottenere una soluzione omogenea (per un massimo di 60 minuti). In seguito, gli enzimi saranno inattivati in presenza di PBS 1X freddo con Fetal

Bovine Serum (FBS) al 10%. Il campione verrà poi filtrato su filtri da 70 micrometri, centrifugato e lavato in PBS1X per due volte. Il pellet risultante verrà quindi risospeso in PBS1X freddo, filtrato su filtri da 40 micrometri e poi centrifugato.

Isolamento dei MABs residenti nel muscolo. Un'aliquota delle cellule mononucleate isolate dai muscoli come descritto in precedenza verranno trattate con EDTA e tripsina allo 0,05% e poi lavate in PBS con FBS al 3%. Dopo i successivi lavaggi, $2-3 \times 10^6$ cellule saranno incubate per 20 minuti al buio a 4°C con i seguenti anticorpi anti-human (alla concentrazione di 1 µg/mL) coniugati con differenti fluorofori: PE-Cy7- anti-AP (R&D Systems), FITC-anti-CD90 (BD-Pharmingen), APC-anti-CD13 (e-Bioscience), Alexa Fluor 647-anti-NG2, PE-Cy7-anti-CD146 (BD-Pharmingen), Alexa Fluor 488-anti-CD56 (BD-Pharmingen). L'anticorpo 7-AAD (Thermofisher Scientific) verrà usato per escludere le cellule morte dalle analisi. Le cellule umane saranno sortate e analizzate utilizzando il citometro di flusso FACS Astrios (BD Biosciences) e i dati verranno analizzati mediante il software FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon).

Isolamento mediante FACS sorting delle altre sottopopolazioni cellulari residenti nel muscolo. Le cellule ottenute dalle biopsie muscolari di individui sani e pazienti distrofici verranno incubate con un mix di anticorpi per riconoscere: i) cellule del sistema immunitario come linfociti T e linfociti B, cellule T regolatorie, macrofagi (CD45 PerCp; CD4 PeCy7; CD8 efluor 450; CD44 FITC; CD62L PE; CD25 APC; B220 APC-Cy7. CD45 PerCp; CD4 Pacific Blue; CD25 APC; GTR Pe-Cy7; CD3 FITC; B220 APC-Cy7. CD62L PE. CD8 APC-Cy7; Foxp3 Alexa fluor 488; CTLA4 PE; ICOS PerCP. CD19 PerCp; CD21 Pacific Blue; IgD PE; IgM APC. F4/80 PeCy7; CD11b PE; CD11c FITC. IL-17 PE; IFNg APC); cellule satellite (CD31-/CD34-/CD45-/sytox-/ CXCR4+/ CD56+/ CD29+). Per essere sicuri che le cellule sortate per l'espressione di CXCR4+/ CD56+/ CD29+ siano davvero satellite, ne indagheremo l'espressione di Pax7 in immunoistochimica. Tutti gli anticorpi saranno comprati da eBioscience (San Diego) o BD BioLegend (San Diego, CA). Le cellule saranno poi isolate mediante un citometro A-FACS Aria (BD Bioscience, New Jersey); i dati saranno acquisiti mediante Cytomics FC500 (Beckman-Coulter) e analizzati con il software CXP 2.1.

Analisi di trascrittoma delle sottopopolazioni isolate dal muscolo di pazienti sani e distrofici mediante RNA-seq. L'RNA-Seq è una tecnica per l'analisi del trascrittoma e la sua quantificazione basata sulle tecnologie di Next-Generation Sequencing (NGS). I sequenziatori forniscono una valutazione dell'espressione genica attraverso le read, ovvero le sequenze che identificano l'ordine in cui si susseguono le basi azotate che compongono il gene; il numero di read per ciascun gene (mappato su genoma o trascrittoma di riferimento) viene detto count e costituisce una misura dell'espressione genica. È una tecnica di tipo quantitativo: tanto maggiore è il numero di molecole di trascritto RNA, tanto maggiore sarà il numero di read prodotte attraverso il sequenziamento. L'RNA verrà estratto da ogni singola sottopopolazione cellulare, verrà trattato con il kit RNase-free DNase (Qiagen, Inc., Valencia, CA) e poi la qualità sarà valutata con il Advanced Analytical Fragment Analyzer. La preparazione delle librerie di RNA, il sequenziamento degli RNA e l'analisi dei dati sarà effettuata in

	collaborazione con la facility del Policlinico di Milano.
Risultati e prodotti conseguiti	L'analisi combinata di analisi citofluorimetrica e RNA-seq dei MABs e delle altre sottopopolazioni cellulari isolate da individui sani e da pazienti distrofici permetterà di identificare: i) differenti subsets di MABs che abbiano un'elevata capacità miogenica o che, al contrario, manifestino spiccate caratteristiche fibrotiche e/o infiammatorie. Inoltre, in seguito all'identificazione dei subsets di MABs provvederemo ad isolarne dei cloni, calcolare il tempo di "doubling" ed il numero di cellule ottenuto dal singolo clone ed infine studiarne le capacità miogeniche/infiammatorie. ii) caratteristiche particolari delle cellule immunitarie per valutarne il ruolo nella patogenesi della DMD. In questo modo cercheremo di individuare le sottopopolazioni che possano interferire negli esperimenti di trapianto cellulare (limitando l'attecchimento e la proliferazione delle cellule trapiantate nel muscolo del soggetto ricevente) e cercheremo di identificare i pathway infiammatori/fibrotici che sono up-regolati nei pazienti distrofici.
Altre Strutture dell'Istituto coinvolte	Piattaforma Genomica diretta dalla Prof.ssa Miozzo per esecuzione analisi esperimenti di RNA-sequencing
Altri Enti coinvolti	
IRG SS MDC	5.1-5.04 Terapia genica e cellulare 6.1-6.45 Genomica, epigenomica e proteomica per la medicina personalizzata