

Abstract (English)

ABCC6 is a member of ATP-binding cassette family of transporters, a class of membrane transporters sharing a common structural organization. Mutations in ABCC6 are associated with Pseudoxantoma elasticum (PXE) and with a minority of cases of Generalized Arterial Calcification of Infancy (GACI), two metabolic diseases characterized by an abnormal ectopic calcification of soft tissues. It is now recognized that ABCC6-mediated efflux of ATP from the liver is the main source of inorganic pyrophosphate, which is a strong anti-mineralization factor and is lacking in serum of patients with PXE or GACI. Extracellular ATP is not only important in controlling mineralization processes, as it is also a signaling molecule and is the main source of extracellular adenosine. Both ATP and adenosine can act as autocrine/paracrine signals, participating to the regulation of a variety of pathophysiological processes, through specific receptors. Purinergic signaling has a profound impact on tumor progression, affecting cancer cells proliferation, apoptosis, invasiveness and interaction with host immune response.

Most of studies on ABCC6 focused on the identification of substrates in relation to its role in mineralization processes, but little information is available in regard of the consequences of transport activity in cells expressing ABCC6 protein. In this thesis we studied the effects of ABCC6 gene silencing and pharmacological inhibition on migration and cytoskeleton rearrangement of cancer cells, focusing at first on liver cancer cell line HepG2. Encouraged by results obtained in these cells, we tried to extend the relevance of our findings to extra hepatic tumors as well. We investigated the effects of pharmacological inhibition on two colorectal cancer cell lines, Caco2 and HT29, which significantly differ in the levels of expression of ABCC6. Finally, we evaluated the feasibility of using hepatocytes-like cells (HLCs) derived from amniotic epithelial stem cells as a substitute of primary hepatocytes to assess the potential toxic effects arising from ABCC6 inhibition in normal cells.

Results reported here clearly show that in tumors where ABCC6 is highly expressed, it could have an important role in controlling cancer cells migration, through the modulation of extracellular purinergic signaling, thus representing a potential target for anti-cancer treatments aimed to reduce tumor invasiveness. HLCs derived from pluripotent stem cells represent a promising tool not only for regenerative medicine but also for disease modeling and toxicological studies. However, improvements in current protocols of *in vitro* differentiation are required to broaden the scope of this technology to routine toxicological studies.

Abstract (Italiano)

ABCC6 è un membro della famiglia dei trasportatori ATP-binding cassette (ABC), una classe di trasportatori di membrana che condividono un'organizzazione strutturale comune. Mutazioni nel gene ABCC6 sono associate allo Pseudoxantoma Elasticum (PXE) e ad una minoranza di casi di Calcificazione Arteriosa Generalizzata dell'Infanzia (GACI), due malattie metaboliche caratterizzate da una abnorme calcificazione ectopica dei tessuti molli. E' ora riconosciuto che l'efflusso di ATP mediato da ABCC6 dal fegato è la principale fonte di pirofosfato inorganico, che è un potente fattore anti-mineralizzante e ne è carente il siero dei pazienti affetti da PXE o GACI. L'ATP extracellulare è importante non solo nel controllo dei processi di mineralizzazione, dal momento che è anche una molecola di segnalazione ed è la principale fonte di adenosina extracellulare. Sia l'ATP che l'Adenosina possono agire come segnali autocrini/paracrini, partecipando alla regolazione di una varietà di processi fisiopatologici, attraverso specifici recettori. La segnalazione purinergica ha un profondo impatto sulla progressione tumorale, influenzando la proliferazione, l'apoptosi e l'invasività delle cellule tumorali e l'interazione con la risposta immunitaria dell'ospite.

La maggior parte degli studi su ABCC6 si è concentrata sull'identificazione dei substrati, in relazione al suo ruolo nei processi di mineralizzazione, ma poche informazioni sono disponibili riguardo alle conseguenze dell'attività di trasporto nelle cellule che esprimono la proteina ABCC6. In questa tesi abbiamo studiato gli effetti del silenziamento genico e dell'inibizione farmacologica di ABCC6 sulla migrazione e sul riarrangiamento del citoscheletro di cellule tumorali, concentrandoci inizialmente su una linea cellulare di cancro al fegato, HepG2. Incoraggiati dai risultati ottenuti su queste cellule, abbiamo provato ad estendere la portata dei nostri risultati anche a tumori extra-epatici. Abbiamo investigato gli effetti dell'inibizione farmacologica su due linee cellulari di cancro coloretale, Caco2 ed HT29, che differiscono significativamente nei livelli di espressione di ABCC6. Infine, abbiamo valutato la fattibilità dell'uso di cellule simil-epatociti (HLCs) derivate da cellule staminali epiteliali amniotiche, come sostitute degli epatociti primari per valutare i potenziali effetti tossici derivanti dall'inibizione di ABCC6 in cellule normali.

I risultati di seguito riportati mostrano chiaramente che nei tumori in cui ABCC6 è altamente espresso, potrebbe avere un ruolo rilevante nel controllo della migrazione delle cellule tumorali, attraverso la modulazione della segnalazione purinergica extracellulare, rappresentando quindi un potenziale target per una terapia anti-tumorale volta a ridurre l'invasività delle cellule tumorali. Le cellule simil-epatociti derivate da cellule staminali pluripotenti rappresentano uno strumento promettente non solo per la medicina rigenerativa, ma anche per la modellizzazione delle malattie e per gli studi tossicologici. Ad ogni modo, dei miglioramenti negli attuali protocolli di differenziazione *in vitro* sono necessari per ampliare l'ambito di applicazione di questa tecnologia agli studi tossicologici di routine.