

University of Groningen

Exploring the regeneration potential of salivary glands using organoids as a model

Rocchi, Cecilia

DOI:
[10.33612/diss.168896082](https://doi.org/10.33612/diss.168896082)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Rocchi, C. (2021). *Exploring the regeneration potential of salivary glands using organoids as a model*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.168896082>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

CHAPTER 9
APPENDICES

Nederlandse Samenvatting

Disfunctie van de speekselklieren en de daarmee gepaard gaande onomkeerbare afname van de speekselproductie (hyposalivatie) kan leiden tot het droge mondsyndroom (Xerostomie). Xerostomie kan veroorzaakt worden door straling geïnduceerde hyposalivatie, zoals kan optreden bij patiënten met hoofd-halskanker na radiotherapie. Wanneer de speekselklieren tijdens radiotherapie in het bestraalde gebied liggen kan dit leiden tot verstoring van de micro-omgeving, de cellulaire niche, van de in het weefsel aanwezige speekselklier cellen. Een verlies van balans tussen cel verlies en cel vorming (homeostase) kan vervolgens leiden tot een progressieve en onomkeerbare achteruitgang van het aantal acinaire voorlopercellen. Dit resulteert vervolgens in een afname van acinair weefsel dat verantwoordelijk is voor de productie met hyposalivatie als gevolg. Hoewel xerostomie op zich geen levensbedreigende aandoening is, zullen van de 500.000 patiënten bij wie elk jaar hoofd-halskanker wordt vastgesteld en die met moderne radiotherapie behandeld worden, 40% een ernstige vermindering van hun kwaliteit van leven ervaren.

In de afgelopen twee decennia is er veel onderzoek gedaan naar de ontwikkeling van middelen om xerostomie te behandelen. De huidige beschikbare, door de Amerikaanse "Food and Drug Administration (FDA)" goedgekeurde, klinische strategieën zorgen echter alleen voor een tijdelijke verlichting van de ongemakken veroorzaakt door aan xerostomie gerelateerde symptomen. Er zijn dus compleet nieuwe benaderingen, zoals die afgeleid van regeneratieve geneeskunde, nodig om deze aandoening afdoende te behandelen. Het verkrijgen en verbeteren van inzichten in speekselklierbiologie, de mechanismen betrokken bij regeneratie en de mate waarin de volwassen speekselklieren kunnen regenereren, is daarom essentieel voor de ontwikkeling van nieuwe regeneratieve therapeutische strategieën gericht op een langdurig herstel van de beschadigde speekselklier.

Het is bekend dat de speekselklieren tot op zekere hoogte het vermogen behouden om te kunnen regenereren. Echter wordt de mogelijkheid om gebruik te maken van regeneratieve geneeskunde voor de behandeling van door straling beschadigde speekselklieren beperkt door het gebrek aan kennis over de identiteit van de betrokken cellen en signaalroutes die verantwoordelijk zijn voor regulatie van de weefselintegriteit van de speekselklieren.

Het werk in dit proefschrift beschreven laat zien dat pre-klinisch en klinisch onderzoek, gebruik makend van een diermodel voor stralingsschade aan de speekselklieren en muizen en humane speekselklier organoïden technologieën, gecombineerd kunnen worden om de cel types betrokken bij speekselklier homeostase en regeneratie na schade en de betrokken onderliggende regulatoren te identificeren.

Dit werk draagt daarom bij aan de ontwikkeling van potentiële klinisch relevante regeneratieve therapie om door straling geïnduceerde hyposalivatie te behandelen.

Hoofdstuk 2 beschrijft hoe de definitie van adulte stamcellen over de afgelopen 30 jaar veranderd is en hoe dit de manier waarop het behoudt van weefsel integriteit van de speekselklier onderzocht en begrepen wordt heeft beïnvloed heeft.

Het professionele dogma over stamcellen die gebaseerd is op het hematopoëtische stamcelsysteem wordt geïntroduceerd en vergeleken met de beschikbare gegevens over speekselklierstam en/of voorlopercellen, waarbij de toepasbaarheid van een dergelijk paradigma als sjabloon voor speekselklierbiologie (en andere snel delende weefsels) in twijfel getrokken wordt. Vervolgens wordt besproken welke speekselklier stamcelfuncties uitgevoerd kunnen worden door verschillende cellen onder verschillende omstandigheden, zoals tijdens homeostase of herstel van schade. Er wordt gespeculeerd dat wellicht niet een goed gedefinieerde zeldzame cel in rust zich aan de top van de hiërarchie bevindt, zoals in het hematopoëtische systeem, maar dat een dynamisch mechanisme van plasticiteit van cellen in het klierepitheel verantwoordelijk zou kunnen zijn voor de regeneratie van speekselklieren.

Verder wordt gesuggereerd dat om verloren of beschadigd weefsel te vervangen omgevingssignalen uit de niche een rol spelen bij een het induceren van een stamcelachtige functie van cellen tijdens regeneratie, in plaats van dat op het celoppervlak aanwezige fenotypische factoren bij specifieke cellen de stamcelfunctie bepalen. Tevens wordt er gespeculeerd over hoe het begrijpen van de tijdsafhankelijke cel-cel interactie dynamieken kunnen helpen bij het ontrafelen van signaal routes die betrokken zijn bij de regulatie van het lot van een cel tijdens speekselklier regeneratie en hoe een integratieve “multi-omic” benaderingen hierbij gebruikt kan worden. Ten slotte wordt besproken hoe de kennis verkregen met deze integratieve “multi-omic” aanpak mogelijkheden zou kunnen bieden om nieuwe

therapeutische strategieën voor door straling geïnduceerde hyposalivatie te ontwikkelen.

In **Hoofdstuk 3** wordt de Wnt-siginaal route geïdentificeerd als een essentieel onderdeel van het complexe signaalnetwerk dat de integriteit van het speekselklierweefsel tijdens homeostase en regeneratie reguleert. Door het immunofluorescentie co-labelen van de algemene epitheliale cel marker EpCAM met de Wnt-reporter β -catenin op de speekselklier afvoergangcellen hebben we laten zien dat voornamelijk speekselklier afvoergangcellen (ducten) ontvankelijk zijn voor Wnt geïnduceerde activatie. Vervolgens werden EpCAM positieve cellen met behulp van “Fluorescent Activate Cell Sorting (FACS)” geïsoleerd en vervolgens gekweekt in Matrigel en een specifiek media aangevuld met Wnt3a en Rspo1, beide bekende stimulators van de Wnt-siginaal route. Hieruit bleek dat alleen hoog positieve EpCAM cellen na kweken onder Wnt-stimulatie organoïden konden genereren die instaat waren om zichzelf langdurig te vernieuwen (zelfvernieuwing, een eigenschap van stamcellen die asymmetrisch delen in een nieuwe stamcel en in een vaak meer gedifferentieerde cel) en alle cel types van de speekselklier konden vormen. Toevoeging van remmers van de Wnt-siginaal route aan het medium, leidde tot een sterke vermindering van de efficiëntie waarin organoïden gevormd werden. Dit resultaat bevestigt de belangrijke rol die van buiten toegevoegde Wnt speelt bij de vorming en in stand houden bij van speekselklier-afkomstige organoïden. Ten slotte werd aangetoond dat transplantatie van cellen verkregen uit deze door Wnt-aangedreven speekselklier organoïden, in muizen speekselklieren die lokaal bestaand waren, de door straling geïnduceerde hyposalivatie in grotere mate kon verminderen dan wanneer cellen gebruikt werden die afkomstig waren uit organoïden die gekweekt waren in medium zonder Wnt.

Vervolgens wordt in **Hoofdstuk 4** aangetoond dat de Hippo siginaal route regulator YAP functioneert als een sensor van weefselintegriteit in reactie op speekselklierschade.

Na het toebrengen van schade aan de speekselklieren, door een gedeelte daarvan af te binden waardoor dit degenereert, worden normaal in rust zijnde ductale cellen geactiveerd via een door YAP aangedreven weefsel reactie. Deze reactie wordt gekenmerkt door hoge mate van translocatie van Yap van het cytoplasma naar de

celkern en een gerelateerde verhoogde proliferatie deze cellen in de nabijheid van de plek van schade. Dus het lijkt erop dat YAP activiteit in de celkern vereist is voor de aanzet tot regeneratie. Deze reactie op lokaal letsel suggereert ook dat gedifferentieerde epitheelcellen kunnen functioneren als een bron van stamachtige cellen ter regeneratie van het weefsel. Met behulp van het boven beschreven speekselklier organoïden kweekstelsel, werd vervolgens aangetoond dat moleculaire en genetische modulatie van translocatie van YAP naar de celkern invloed heeft op het vermogen tot zelfvernieuwing van zowel muis- als menselijke speekselklier cellen. Inderdaad leidde remming van deze nucleaire activiteit van YAP vervolgens tot een vermindering van de mate waarin organoïden gevormd werden, terwijl stimulatie van de nucleaire translocatie van YAP de efficiëntie van vorming van organoïden verhoogde en de tevens de lange termijn expansie (zelfvernieuwing) van de speekselklier afkomstige cellen bevorderde. Ten slotte werd gebruik makend van organoïden als model voor regeneratie, aangetoond dat farmacologische remming van Mst1/2-kinasen en de daaruit voortvloeiende activering van YAP-nucleaire activiteit, de regeneratieve respons van menselijke speekselklier cellen na bestraling significant verbeterde.

In **Hoofdstuk 5** wordt gerapporteerd dat autofagie een belangrijke rol speelt bij de zelfvernieuwing van organoïden van de speekselklier en dat de farmacologische manipulatie van autofagie in potentie weefselregeneratie kan bevorderen. Door organoïden te gebruiken als model voor regeneratie, werd gevonden dat een toename van de autofagie-flux binnen de stamcelachtige cel populatie het vermogen om secundaire en tertiaire organoïden te vormen reflecteert. Tevens werd aangetoond dat voor een dergelijk zelf vernieuwend vermogen van stamcellen een constante aanvoer van energie, gedreven door autofagie, vereist. Het remmen van zowel de vroege als late stappen in het autofagy proces en het uitschakelen van het autofagie-gerelateerde gen 5 (Atg5), leidde tot een significante vermindering van het zelf vernieuwingsvermogen en dus regeneratieve potentieel van speekselklier cellen. Verder werd aangetoond dat voor en na schade de niveaus van autofagische activiteit weerspiegelde eiwitten LC3, p62 en ATG16L1 allemaal constant laag blijven in gedifferentieerde acinaire cellen, terwijl deze juist significant toenemen in normaal in rust zijnde ductale, alwaar de stamcellen zouden zitten. Op basis van de expressie van cel oppervlakte markers werden in de afvoerkanalen aanwezige vermeende

stamcellen (CD24^{hi}/CD29^{hi}) en voorlopercellen (CD24^{med/hi}/CD29^{med/hi}) geïsoleerd en werd hun basale autofagie-activiteiten vergeleken. Het bleek dat CD24^{hi}/CD29^{hi} cellen een lage autofagische flux vertoonde in vergelijking met CD24^{med/hi}/CD29^{med/hi} cellen, hetgeen een reflectie is van het verschil in de basale autofagische activiteit van deze cellen *in vivo*, evenals de mogelijk verschillende rol die deze spelen tijdens homeostase en regeneratie.

In **Hoofdstuk 6** werden de mogelijke mechanismen onderzocht die de lotsbestemming van cellen tijdens regeneratie van de menselijke speekselklier zouden kunnen sturen. Met behulp van submandibulaire speekselklier organoïden als een model voor regeneratie en een onbevooroordeelde analyse gebaseerd op moleculaire netwerken, werden genexpressie patronen die gedifferentieerde cel stadia aangeven, geïdentificeerd. Gen co-expressie analyse onthulde dat vroege van speekselklier afkomstige organoïden gekenmerkt worden door een transcriptomisch profiel dat sterk lijkt op door SOX2 aangestuurde acinaire cel ontwikkeling. Acinaire cellen worden verantwoordelijk gehouden voor het onderhoud van de speekselklieren van de muis gedurende homeostase. Dit gen transcriptie profiel wordt echter negatief gereguleert in van menselijke speekselklier afkomstige organoïden die zijn verrijkt met stamcellen door een behandeling met de GSK3-remmer en Wnt-pathway-activator, CHIR, en de histondeacetylase-remmer, valproïnezuur. Het gen co-expressie patroon van deze met stamcellen verrijkte organoïden wijst richting de integratie van verschillende biologische routes die erop sturen om een proliferatief, ongedifferentieerd fenotype te behouden die meer lijkt op het fenotype van een pluripotente cel. Interessant is dat er een hoge expressie van een nutriëntensensor en enzym dat betrokken is bij lipiden metabolisme en vetzuroxidatie (FAO) “peroxisome proliferator activated receptor δ (PPAR δ)” gevonden werd. Dit gen speelt mogelijke rol bij processen betrokken bij de vorming van organoïden hetgeen verder benadrukt wordt door de bevinding dat na overexpressie van het PPAR δ gen er een verhoogde efficiëntie van menselijke speekselklier afkomstige organoïden vorming werd gevonden. Ten slotte, als we kijken naar de signaal routes en genen die actief zijn tijdens het langdurig kweken van speekselklier organoïden, zien we deze mogelijk afhankelijk zijn van integrine niveaus en mogelijk van de activering van de ITGA3-SRC-RAC2-sigtaal as die leidt tot een LATS1/2 onafhankelijke YAP-activering. Dit genexpressiepatroon zou

verantwoordelijk kunnen zijn voor de overgang van een stamcel achtige cel stadium bij vroege organoïden kweek naar een meer proliferatieve “transient amplifying” toestand van organoïden die we zien nadat ze meerdere keren gepasseerd zijn. De expressie van het vetzuur elongase ELOVL1 in biopsieën van volwassen menselijke speekselklieren bevestigt een mogelijke rol van metabole routes in de zelfvernieuwing van organoïden van de speekselklier. Deze hypothese die wordt versterkt door de waarneming dat overexpressie van ELOVL1 een verhoogde efficiëntie van organoïden vorming induceert. De informatie van gen transcriptie patronen die in dit hoofdstuk verkregen werd, zal helpen bij het onderzoeken en begrijpen van nieuwe biologische mechanismen die mogelijk betrokken zijn bij de handhaven van het evenwicht tussen weefselhomeostase en regeneratie in de volwassen speekselklier.

In **Hoofdstuk 7** wordt de ontwikkeling van een “good manufacturing practice” (GMP) -conform protocol voor de isolatie en expansie van menselijke speekselklier organoïden beschreven. Dit protocol zou geschikt kunnen zijn voor een autologe celtherapie ter herstel van de functionaliteit van de speekselklier na radiotherapie. Het voorgestelde GMP-conforme protocol maakt de isolatie en vermeerdering van patiënten speekselklier biopsieën afkomstige cellen met een vergelijkbare efficiëntie van huidige niet-GMP-onderzoeksprotocol mogelijk. Doordat de cellen na cryopreservatie levensvatbaar blijven en instaat zijn om speekselkliercellen te vormen die deelnemen aan de klierfunctie, kan deze procedure worden aangepast aan het radiotherapie behandelingschema van de patiënt. Ten slotte blijken de verkregen cellen genetisch stabiel te zijn en vertoonden ze bemoedigende resultaten wanneer ze werden (xeno-)getransplanteerd in een muizen speekselklier regeneratie model. Door ons nieuw ontwikkelde protocol te vergelijken met de huidige beschikbare behandelingsopties voor door straling geïnduceerde hyposalivatie, kunnen de sterke punten, beperkingen en toekomstige uitdagingen van een dergelijke benadering bestudeerd worden.

Acknowledgements

Edinburgh, March 2021

Some might say it is about time! And indeed, it is. After many years in Groningen and after moving country this book is finally completed. It might be true that I have written the majority of this thesis being alone in front of my computer, but the truth is that it took a whole lot of people to shape it and complete it. A whole lot of people who have taught me, challenged me, inspired me, guided me, and cheered me up throughout my time in Groningen.

To **Rob**, who hired me knowing that I held a pipette for the first time only six months prior to meeting him, and who believed in me before I believed in myself. Thank you for guiding me throughout all these years, for giving me the opportunity to explore, to risk and to fail; for being brutally honest sometimes, and extremely comprehensive during a difficult moment in my life; for the many animated discussions, but most of all thank you for nurturing my love for science. Thank you to you and **Monicque** also for the nice lab bbqs and the many late beers drunk around the fire in good company. Trips back home by bike on those evenings were always an adventure.

To **Ronald**, thank you for all the input and the help you gave me during my PhD meetings throughout the years. Your knowledge in stem cells as well as your always positive and peaceful vibe were fundamental for my scientific growth and helped to “buffer” the animated discussions with Rob ☺.

To **Prof. Gerald de Haan** for having recommended me for the job that led to the completion of this thesis and for always being available for discussions, thank you.

To the reading committee, **Prof. Gerald de Haan, Prof. Cathrine Ovitt and Prof. Marcel Verheij**, for taking your time to read and correct my thesis. It was an honour to have you to approve my dissertation.

To **Greetje** and **Lies**, who were always ready to help with documents and emails and did a great job to patch up my not so perfect organization, thank you. If this thesis is here it is also because of you.

To **Prof. Arjan Vissink**, to the **oral and maxillofacial surgery teams at the UMCG and at the MCL, Monique, Nienke**, and the **Pharmacy department at the UMCG**, that made the “human salivary gland project” possible, thanks. And to **all the patients who participated in the studies**, who may never read this, this literally wouldn't have been possible without you so thank you.

The work in this thesis would not have been possible without the core facilities at the UMCG. Thank you to **Klaas** from the imaging facility, for all the time spent in front of the SP8 with me; to **Geert, Hank, Roelof-Jan and Theo** from the FACS facility for all their help with sorters and analysers. To **Catriene, Miriam and Michelle**, from the CDP for their patience and help with CCD applications and animal experiments, thank you.

To all the people that made the 5th floor of the building 3215 a great, stimulating, inspiring and friendly environment to work in. To **Prof. Harrie Kampinga, Prof. Ody Sibon, Steven and Peter van Luijk**, thanks for your support and critical, yet constructive, discussion during meetings and for the great fun during lab days. **Hein**, we met a long time ago, but only in the last few years I have gotten to know you and I am thankful for everything I learned from you, part of the job in this thesis would not have been successful without your help. **Nico**, thank you for teaching me the ABC of illustrating.

There is one office that I could never thank enough on the 5th floor and it's the technicians' office, or “the confessional”. For the many coffees (maybe too many), the laughs, the tears, the complaining after a bad day, that was always my favourite place. To the people who made that office **Marianne, Anne, Mirjam, Uilke, Jeanette, Pauline, Fleur, Maria, Ellie and Bart** thank you! To **Jeanette** for all your help, even now that I am away, for all the last-minute order requests and the “Jeanette hugs” when I was down (I could still use one of those sometimes). To **Mirjam, Anne and Uilke**, the three pillars of Rob's group, without your work this thesis would not be here today. I will always be grateful for what you have taught me, for what you have done and what are still doing for me. The infinite number of hours spent in cell culture or collecting saliva would have been terribly slow without a good laugh.

To you, gone too soon, terribly missed but never forgotten, **Hette**. I wish I could say thank you knowing that we will be soon celebrating together. There is no staining I do without thinking of you and sometimes I can still hear you saying “DAUGH!!”. I wish you could see that I am not fighting anymore with paraffine or cryo blocks, and you’ll be happy to know that I didn’t chase any more mice across the floor of the CDP room. Everything I know about staining and my confidence in working with animals is because you. To **Tekla**, whose energy and positive vibes are contagious, thank you for always be so thoughtful and caring, looking forward for a day at the famous beach house. To **Reinier**, to whom I will always be grateful for pointing out I was wearing two different boots and that became a really good friend. Looking forward to having you, **Maren** and the boys up here in Edinburgh.

I was lucky enough to have shared a big part of my PhD with a bunch of great people. **Despina, Yixian, Wonde (Mr. “It’s OK”), Francesco, Matteo, Gabriel and Eduardo**. Thank you for all the take away dinner eaten in the kitchen of the 5th floor while waiting western blot or staining to be finished, for all the fun in and outside work. Our journey might have taken different paths, but I will cherish those moments forever. **Vaishali, Melanie, Anita, Roald, Yu Yi, Els, Niels, Suzanne, Wouter, Abhi, Daisy, Luc, Yi** and **Julie**, it was nice to share a part of my journey with you.

Thank you also to **Prof. Fulvio Reggiori** and his group for “adopting” me on the 7th floor during my virus work and introducing me to the autophagy world. **Mario, Pauline, Ralph and Yingying**, thank you for your help in the lab and for the many many many many beers drunk during the beer festival. To **Idil**, beside the many beers, I could not have asked for a better partner to deal with the joy and sorrows of the autophagy-salivary gland paper and with endless evening hours in an oversized fireman sweater waiting to go back to our experiment. It was great fun learning from and with you. Looking forward to seeing you again. To **Muriel**, that like me suffered from the endless grey season in Groningen and dreamed about the blue seas, you always had a smile, good advice and a word of encouragement for me, thank you.

I considered myself lucky to have started my journey in Rob’s group with people that inspired me and guided me throughout the years. To **Yamini**, the first time my name was on a paper was thanks to you. To **Martti**, your determination and passion for

science and your drive to explore new techniques were an inspiration for me. Hope to meet you, **Sara** and the little ones somewhere soon. Thank you both for always being there. **Nynke**, for all the help in the lab and for all the fun outside work, looking forward to see you, **Jurjen** and the babies again.

To all the students I had the opportunity to supervise during my PhD thank you because I have learned something from each of you. **Margherita (Mago), Cinthya, Laura, Ijsbrand** and **Victor** thank you for all your work, I wish you all the best for your future careers.

Pao, Vivian, Danielle, and **Andries**, I will always remember our trip to Hilderbergh and the “highlight” of sharing a room with all of you. Thank you for making the office and the lab a nice place to work in. **Pao**, I miss our early morning “dates” every second Friday before the work in progress meetings. Sharing the office with you was great fun. Thank you for being not only a colleague, but also a great friend. **Davide**, we met only once (in person, at least) while I was leaving, but I want to thank you for the work done with the YAP revisions, I really appreciate it.

To **Elaine** for being a great role model, for giving me all the support needed in this new journey as a Post Doc in Edinburgh, thank you. To my new colleagues **John, Ella and Sonia** for have warmly welcoming me into the group. A special thanks to **John** and **Andrea** who, besides being good friends, always make sure to provide me with my daily intake of sugar and carbohydrates. To **Emily**, who draw the cover of this book and who’s enthusiasm for putting science into art is contagious, thank you.

Then there are those people, that brought out the best of me and that kept reminding me why it’s all worth it. To **Marianne**, because besides having taught me a lot in the lab, you have become a really good friend. Your honesty, loyalty and sense of humour were fundamentals to survive the ups and down of the PhD journey. One thing only: we need to work on your wine selection. To **Peter** that turned my world upside-down and yet it never felt more right. For all the missing “s” and “ed” that you had to correct in all these pages; for all the time I said “I can’t” and you say “Yes you can”, thank you. Without your help, your support and your love I could not have done it. To **Lara**, for the fresh air you brought to the lab, for your optimism and support during the meetings

and experiments, but most of all for choosing me as a friend and be always by my side. I wish we would have had more time to spend together in Groningen. To **Brian**, for making sure I would never forget again the capital of Canada and for being always ready to help. To **Sarah**, for guiding my first steps into my PhD, for always having my back and whose company it's never boring. To **Giulia**, with **Marten, Ale and Leo**, because beside me possibly swapping your cat and crashing your car against the only pole in an empty carpark you kept me as a friend, and my journey in Groningen would have not be the same without you. To **Caterina, Francesco** and my two favourite girls **Rosa** and **Sara**, for making me part of your crazy life, for sharing all the important moments with me, for the many lunches and dinners, but most of all for all your love and affection. I miss you a lot. To **Eloisa**, for being one of the greatest people I met in Groningen and by who's side I know it is possible to get out of any bad situation including being stuck with a car in a sand dune.

To **Annemieke, Kevin, Fred** and **John**, thank you for welcoming me with open arms into their family and showing me all their support in these years.

Alle mie amiche di sempre **Linda e Silvia**, perche' anche a distanza di anni e centinaia di kilometri ci sono sempre.

Alla mia **mamma** e al mio **papà** che durante tutti questi anni mi hanno supportato e sopportato; mi hanno ascoltato e capito anche quando per loro era tutto incomprensibile e che nonostante la distanza continuano a dimostrarmi il loro amore incondizionatamente, grazie. Questa tesi è dedicate a voi.

To **Nora**, that filled up a place in my heart I didn't know I had and that motivates me every day to be better than the day before, love you unconditionally.

Curriculum vitae

Cecilia Rocchi

Research experience

- 2019- to present **Postdoctoral fellow**
Laboratory of Dr. Elaine Emmerson, Institute for Regeneration and Repair, Center for Regenerative Medicine, Edinburgh, United Kingdom
- 2013-2019 **Doctoral candidate**
Laboratory of Prof. Rob Coppes, Department of Biomedical Science and System, University Medical Centre Groningen, Groningen, the Netherlands
- 2012 **Intern**
Under the supervision of Prof. F.Foijer at the European Research Institute for the Biology of Ageing (ERIBA), Groningen, the Netherlands.
- 2011-2012 **Erasmus exchange program**
Under the supervision of Dr. P. Meerlo at the Department of Behavioral Physiology, University of Groningen (RUG), Groningen, the Netherlands

Education

- 2009-2012 **Master student**
University of Parma, Parma, Italy
- 2004-2009 **Undergraduate student**
University of Parma, Parma, Italy

Conference oral presentations

- 2015 3rd Annual PhD Student Meeting of the Cancer Research Centre Groningen, (Groningen, The Netherlands).
- 2017 Gordon Research Conference Salivary Gland and Exocrine Biology (Galveston, Texas, USA).
- 2017 10th Annual Meeting of the Dutch Society for Stem Cell Research (DSSCR) (Utrecht, The Netherlands).
- 2018 EMBO|EMBL Symposium: Organoids: Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture (Heidelberg, Germany).
- 2018 6th Annual PhD Student Meeting of the Cancer Research Centre Groningen, (Groningen, The Netherlands).
- 2018 NVRB Annual fall meeting (Utrecht, The Netherland).
- 2020 IRR Early Career Innovator 2020 (Edinburgh, UK). Pitch Finalist.

Awards

- 2015 NVRB Klaas Breur Travel Award (Utrecht, The Netherlands)
- 2015 Fellowship for Hydra XI: European Summer School on Stem Cells & Regenerative Medicine (Hydra, Greece).
- 2018 EMBO|EMBL Symposium Travel Grant 2018 (Heidelberg, Germany)

List of Publications

Nanduri L.S, Baanstra M, Faber H, **Rocchi C**, Zwart E, de Haan G, van Os R, Coppes R.P. Purification and ex-vivo expansion of fully functional salivary gland stem cells. **Stem Cell Reports** 2014 3(6):957-64

Maimets M, **Rocchi C**, Bron R, Pringle S, Kuipers J, Giepmans BN, Vries RG, Clevers H, de Haan G, van Os R, Coppes RP. Long-Term In Vitro Expansion of Salivary Gland Stem Cells Driven by Wnt Signals. **Stem Cell Reports** 2016 6(1):150-62

Mauthe M, Orhon I *, **Rocchi C***, Zhou X*, Luhr M, Hijlkema KL, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. **Autophagy** 2018 14(8):1435-1455 (* equal contribution)

Rocchi C and Emmerson E. Mouth-Watering Results: Clinical Need, Current Approaches, and Future Directions for Salivary Gland Regeneration. **Trends Molecular Medicine** 2020 May 1;S1471-4914(20)30089-7.

Rocchi C, Barazzuol L, Coppes R.P. The evolving definition of salivary gland stem cells. **npj Regenerative Medicine** 6, 4 (2021)

Orhon I., **Rocchi C.**, Villarejo-Zori B., Serrano Martinez P., Baanstra M., Brouwer U., Boya P., Coppes RP., Reggiori F. Autophagy induction during stem cell activation plays a key role in salivary gland self-renewal. **Autophagy** 2021 (*in press*)